خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۳ مکرر پاییز ۹۱
ویژه‌نامه سلول‌های بنیادی(۲۷۲-۲۵۸)

مقاله مروری

کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان هموگلوبینوپاتی‌ها

سهیلا رهگذر[۱]، منصوره‌السادات انتظار قائم[۲]، مرجان عابدی[۲]، فاطمه منتظری[۳]

چکیده

سابقه و هدف

هموگلوبینوپاتی‌ها، گروهی از اختلالات وراثتی هتروژن هستند که در آن‌ها جهش باعث کاهش و یا نقص در ساخت یکی از زنجیره‌های هموگلوبین A شده و یا این که توالی طبیعی اسیدهای آمینه، زنجیره‌های گلوبین را تغییر می‌دهد. شایع‌ترین اختلالات هموگلوبین، تالاسمی و آنمی داسی شکل است. بیماران مبتلا به این اختلالات اغلب نیاز به دریافت مداوم خون دارند. با این حال این روش درمانی ممکن است باعث گرانباری آهن و متعاقب آن تخریب بافت‌ها و احتمال ابتلا به عفونت‌های ویروسی گردد. هدف از این مقاله بررسی روش‌های درمانی جدید با حداقل عوارض در خصوص دو هموگلوبینوپاتی فوق بود.

مواد و روش‌ها

این مقاله با نقد و بررسی ۵۱ تحقیق منتشر شده در مجلات معتبر، جدیدترین راه‌کارهای درمان تالاسمی و آنمی داسی شکل را به چالش کشیده است. مقالات مورد اشاره از پایگاه‌های اطلاعاتی ابسکو، Elsevier ، Pubmed ، OVID و NCBI برگرفته شده‌اند.

یافته‌ها

اگر چه تزریق خون و درمان‌های دارویی، کیفیت و طول عمر بیمار را بهبود می‌بخشد اما پیوند سلول‌های بنیادی خونساز را می‌توان به عنوان تنها راه درمان قطعی این اختلالات مطرح نمود. با این وجود هم چون سایر روش‌های درمانی، این شیوه نیز عوارضی را به همراه دارد. بیشترین عوارض طولانی مدت پیوند در این بیماران، ناباروری و نارسایی گنادها به ویژه در بانوان، GVHD (Graft-Versus-Host Disease) مزمن و بروز بدخیمی‌های ثانویه است.

نتیجه گیری

بررسی تلاش‌های صورت گرفته در زمینه درمان هموگلوبینوپاتی‌ها نشان می‌دهد که علی‌رغم محدودیت‌های موجود در پیوند سلول‌های بنیادی، این شیوه تنها روش درمانی مؤثر در درمان اختلالات هموگلوبین می‌باشد. انواع سلول‌های مورد استفاده در این خصوص و شیوه‌های جدید تسهیل‌کننده در امر پیوند، در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: هموگلوبینوپاتی‌ها، تالاسمی، کم خونی، اختلالات داسی‌شکل، سلول‌های بنیادی خونساز

تاریخ دریافت : ۹۰/ ۹/۱۶
تاریخ پذیرش : ۹۰/۱۲/۲۳

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونوهماتولوژی ـ استادیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان ـ خیابان هزار جریب ـ کدپستی: ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱
۲ـ دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی ـ دانشکده علوم دانشگاه اصفهان ـ ایران
۳- کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی ـ دانشکده علوم دانشگاه اصفهان ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

عملکرد اصلی اریتروسیت‌ها، نقل و انتقال گازها در خون است که برای انجام آن مجهز به پروتئین تخصصی هموگلوبین می‌باشند. خون فرد بالغ طبیعی دارای سه نوع هموگلوبین است؛ هموگلوبین A (α2β2)، هموگلوبین F (α2γ2) و هموگلوبین A2 (α2δ2)، که بیشترین میزان متعلق به هموگلوبین A با ۹۸٪-۹۶٪ از هموگلوبین موجود در خون است. در طی مراحل رویانی و جنینی هموگلوبین‌های Grower 1 ، پرتلند، Grower 2 و هموگلوبین جنینی(HbF)، بخش غالب هموگلوبین سلول‌های اریتروسیت را تشکیل می‌دهند. جهش‌های ژن کدکننده گلوبین، شایع‌ترین ناهنجاری‌های تک ژنی در سرتاسر دنیا بوده و حدود ۷٪ جمعیت دنیا را تحت تاثیر قرار می‌دهند. ژن‌های زنجیره گلوبین دو دسته هستند؛ گروه اول یعنی ε ، γ ، δ و β روی کروموزوم ۱۱ و دسته دیگر یعنی ζ (زتا) و α روی کروموزوم ۱۶ کد می‌شوند. جهش در مناطق مختلف این ژن‌ها می‌تواند منجر به بیماری‌های متفاوتی گردد. به طور کلی ناهنجاری‌های مربوط به هموگلوبین به دو دسته تقسیم می‌شوند:

- تولید هموگلوبین غیرطبیعی که منجر به بیماری‌هایی هم‌چون کم‌خونی داسی شکل(Sickle Cell Anemia = SCA) می‌شود.
- کاهش میزان تولید هموگلوبین که مهم‌ترین بیماری در این نوع ناهنجاری، انواع تالاسمی است(۱).

این مقاله از میان اختلالات هموگلوبین موجود، دو هموگلوبینوپاتی مذکور را بررسی کرده و ضمن تعریف و تشریح این دو اختلال ارثی، به نقد و بررسی راه‌های درمانی این دو می‌پردازد.

تالاسمی:

انواع بیماری‌های تالاسمی، گروهی هتروژن از ناهنجاری‌های ژنتیکی هستند که در نتیجه کاهش میزان تولید زنجیره‌های آلفا یا بتای پروتئین هموگلوبین به وجود می‌آیند. به طور کلی بسته به نقص در هر یک از زنجیره‌های هموگلوبین، دو نوع تالاسمی α و β وجود دارد. میزان نسبت طبیعی تولید زنجیره‌های α/β ، ۱/۱ است که این نسبت در α- تالاسمی کاهش و در β- تالاسمی افزایش می‌یابد. ۴ نسخه از ژن α- گلوبین وجود دارد که بسته به تعداد ژن‌های حذف شده یا غیر فعال شده، شدت α- تالاسمی را طبقه‌بندی می‌کنند. حذف کامل هر ۴ نسخه ژنی باعث قطع تولید زنجیره α و مرگ جنین در داخل رحم(هیدروپس فتالیس) می‌گردد. حذف ۳ ژن زنجیره α باعث بروز α- تالاسمی متوسط همراه با کم‌خونی خفیف(که به آن بیماری H گفته می‌شود) خواهد شد. β- تالاسمی به دو صورت مینور(هتروزیگوت) و ماژور(هموزیگوت) وجود دارد. در این بیماری تعداد زنجیره‌های β- گلوبین کاهش یافته که باعث رسوب زنجیره‌های α اضافی در اریتروبلاست‌ها شده و در نتیجه منجر به تولید غیر مؤثر سلول‌های رده اریتروئید و همولیز آن‌ها می‌شود. از عوارض بالینی تالاسمی، کم خونی شدید است. هم چنین بزرگی طحال و کبد به دلیل تخریب بسیار زیاد اریتروسیت‌ها و همولیز آن‌ها خارج از مغز استخوان، از دیگر عوارضی است که خود موجب افزایش بار آهن در این اندام‌ها می‌شود(۲، ۱). چنانچه قبلاً اشاره شد، ایران بر روی کمربند تالاسمی قرار دارد و شیوع این بیماری توسط WHO، ۵ درصد گزارش شده است(۲).

کم خونی داسی شکل:

از بین اختلالات کیفی شناخته شده هموگلوبین، کم خونی داسی‌شکل شایع‌ترین هموگلوبینوپاتی در جهان به شمار می‌رود. این بیماری در فرم هموزیگوت ناشی از جهش در رمز ششم ژن β- گلوبین است که باعث جابه‌جایی باز آلی آدنین با تیمین، واقع در موقعیت دوم آن می‌گردد. این جهش منجر به تبدیل رمز گلوتامیک اسید به والین شده که در نهایت این تغییر در هموگلوبین ساخته شده وارد می‌شود(۴، ۳). این بیماران دارای نوعی هموگلوبین غیر طبیعی بوده که در شرایط فیزیولوژیک ساخته شده و باعث تشکیل گلبول‌های قرمز سخت و غیرطبیعی می‌گردد. این نوع اختلال باعث همولیز و در شرایط هیپوکسی، انسداد مویرگ‌ها شده، نهایتاً منجر به کم‌خونی موضعی(Ischemia) و نکروز بافت‌ها می‌شود. از دیگر علایم بالینی این بیماری می‌توان به انسداد مکرر

Archive of SID
www.SID.ir

عـروق(Recurrent vaso-occlusive)، سـندرم حـاد قفسـه سـینه(Acute chest syndrome)، نعـوذ دایـم(Priapism) و افزایش حساسیت به عفونت اشاره کرد. این علایم ممکـن است حاد یا مزمن، موضعی یا سیستمیک و همراه یا بدون علایم بالینی باشد. برخی از عوارض این بیماری هم‌چـون جراحت‌های عروقی و همولیز دایم به صورت مزمن عمل نموده و بدون هیچ‌گونه علایم بـالینی، انـدام‌هـای حیـاتی بیمار همانند قلب، مغز، کلیه‌ها، شش‌هـا و اسـتخوان‌هـا را درگیر می‌کند. این عوارض حتـی ممکـن اسـت تـا اوایـل بزرگسالی نیز بروز نکننـد. شـدت علایـم بـالینی در ایـن بیماری ناشی از عواملی مانند سن بیمار، شـرایط محیطـی، پیوستگی ژنتیکی آن با بیماری تالاسـمی، مقـادیر متفـاوت HbF و نوع هاپلوتیپ بیماری(که وابسته به خوشه ژنی β- گلـوبین اسـت)، مـی‌باشـد(۵، ۳). بـه طـور کلـی ۵ نـوع هاپلوتیپ مشخص، وابسته به جهـش سـیکل سـل وجـود دارد کـه بـا توجـه بـه شـیوع هـر کـدام در یـک منطقـه جغرافیایی خاص، تحت عناوین Benin ، Bantu یـا CAR (Central African Republic)، Cameroon ، Senegal و Saudi Arabia-India نام‌گذاری شده‌اند(۶، ۴). با توجه بـه نحوه پراکندگی ژن این بیمـاری، کشـور مـا ایـران نیـز در محـدوده جغرافیـایی ایـن هموگلوبینوپـاتی قـرار دارد و گزارش‌های پراکنده‌ای در خصـوص مشـاهده مـواردی از مبتلایان به ایـن بیمـاری، خصوصـاً در جنـوب و نـواحی مرکزی کشور، وجـود دارد(۶، ۴). هاپلوتیـپ سـیکل‌سـل برای اولـین بـار در ایـران سـال ۲۰۰۰ مـیلادی شناسـایی شد(۳). نمونه‌های مورد بررسی، مربوط به نواحی مجـاور اصفهان و از نـوع Saudi Arabia-India مـی‌باشـد. علایـم بروز بیماری در این هاپلوتیپ به مراتب خفیف‌تر از سـایر موارد سیکل سل است. امـا از آن جـا کـه ایـران بـر روی کمربند تالاسـمی قـرار گرفتـه، اعمـال دقـت لازم جهـت شناسایی موارد سـیکل ـ تالاسـمی در تشـخیص افتراقـی تالاسمی و درمان مناسب آن، الزامی است(۷، ۳).

رویکردهای درمانی موجود در خصوص هموگلوبینوپاتی‌ها:

شیوه‌های درمانی متعددی کـه امـروزه بـرای درمـان همـوگلوبینوپاتی‌ها متداول هستند، تنها به کاهش عوارض بیماری و جلوگیری از پیشرفت آن می‌پردازنـد. هـر چنـد این رویکردها توانایی ریشه‌کنی بیماری را ندارند اما امیـد بـه زنـدگی را در بیمـاران بـه طـور چشـمگیری افـزایش داده‌اند.

بحث

درمان تالاسمی:

چنانچـه قـبلاً اشـاره شـد، تالاسـمی مـاژور یکـی از بیماری‌های ارثی شایع در ایـران اسـت. مبتلایـان بـه ایـن بیماری نیازمند تزریق مکـرر خـون بـوده کـه ایـن درمـان باعـث بـروز برخـی از عـوارض جـانبی در ایـن بیمـاران می‌شود. از جمله مهم‌ترین عـوارض تزریـق مـنظم خـون، گرانباری آهن در بدن است که این عارضـه نیـز بـه نوبـه خود منجر به آسیب اندام‌های حیاتی بیمار مانند قلب، کبد و ... می‌شود. از این رو اسـتفاده از ایـن روش درمـانی در مبتلایـان بـه تالاسـمی مـاژور، نیازمنـد تجـویز داروهـای حـذف‌کننـده آهـن اسـت. برخـی از ایـن داروهـا ماننـد دفروکسامین(Deferoxamine)، از طریق خوراکی غیر فعال شـده و در نتیجـه توسـط تزریـق داخـل وریـدی تجـویز می‌شوند. خود دفروکسامین نیز ممکن است عوارضـی در پی داشته باشد، به ویژه در کودکانی که فریتین سرم آن‌هـا پایین است. برخی از حذف‌کننده‌های آهن مانند دفریپرون (Deferiprone) را می‌توان به صورت خوراکی نیـز تجـویز کرد. آهنی که توسط دفروکسامین و دفریپرون حذف شده است به طور عمده از طریق ادرار دفع می‌شود. جدیدترین حذف کننده خوراکی آهن، دیفرازیروکس است که موجب حذف آهن فقط از طریق مدفوع می‌گـردد(۲). عـلاوه بـر این، عدم تطابق آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی اهداکننـدگان و گیرنـدگان خـون در تزریـق‌هـای مکـرر، احتمـال آلوایمونیزاسـیون را در ایـن بیمـاران افـزایش مـی‌دهـد. مطالعه‌های زیادی در زمینه عدم تطابق گروه‌بندی ABO و ناسازگاری‌های آنتـی‌ژن‌هـای خـونی هـم از نـوع توزیـع پراکندگی و هم در راستای شناسایی آلـوآنتی‌بـادی‌هـا، در این بیماران انجـام شـده اسـت(۱۰-۸). اسـتفاده از خـون سازگار، گرچه مانع بروز آلوایمونیزاسیون می‌گردد، اما بـه دلیـل لـزوم تـزریق خـون بـه دفعـات مکـرر، امکان بروز

Archive of SID
www.SID.ir

عفونت‌های ثانویه علی‌رغم غربالگری خون‌های اهدایی، همواره وجود دارد. از این رو، امروزه با توجه به سهولت تشخیص تالاسمی مینور در والدین، برنامه‌های پیشگیری از تالاسمی اهمیت زیادی یافته است. این برنامه‌ها مبتنی بر غربالگری پیش از ازدواج برای β- تالاسمی است. در این موارد، جهت انتخاب آن دسته از شاخص‌های گلبول‌های قرمز از قبیل MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) و MCV (Mean Corpuscular Volume)، که در تشخیص والد هتروزیگوت ارزش تعیین کننده دارند، تحقیقات زیادی انجام گرفته و پیشنهادهایی برای تقویت و تکمیل طرح غربالگری تالاسمی ارایه شده است که عبارتند از: ۱) تقویت برنامه‌های مشاوره و تنظیم خانواده در مراکز تالاسمی، ۲) نظارت مداوم بر آزمایشگاه‌های تشخیص قبل از ازدواج، ۳) استفاده از همکاری متخصصین زنان برای ارجاع مادران با شواهد میکروسیتوز در صورت عدم غربالگری قبل از ازدواج و ۴) تغییر طرح پیشگیری از تالاسمی به «پیشگیری از هموگلوبینوپاتی‌های شایع»(۱۱، ۲). چنان که قبلاً ذکر شد درمان قطعی در تالاسمی، پیوند مغز استخوان می‌باشد که در قسمت‌های بعدی بیشتر به آن پرداخته می‌شود.

درمان کم خونی داسی شکل:

امروزه گام‌های بلندی در جهت کنترل و پیشگیری این بیماری برداشته شده است. اهمیت پزشکی و روانی- اجتماعی حمایت از بیماران با چنین بیماری مزمنی بسیار زیاد است. تحقیقات بر روی پیش‌بینی دوره بیماری و تعیین زمان و چگونگی درمان، هم چنان ادامه دارد. شناسایی هرچه زودتر بیماران می‌تواند از آسیب‌های شدید به اندام‌های حیاتی جلوگیری کند. در حال حاضر مهم‌ترین درمان‌هایی که می‌تواند از دردهای مداوم و آسیب به اندام‌های بیمار جلوگیری کند و یا آن‌ها را کاهش دهد، شامل هیدروکسی اوره (Hydroxyurea) و در برخی مواقع تزریق خون می‌باشد. هیدروکسی اوره می‌تواند سطح هموگلوبین F را در بیماران افزایش دهد، البته در هنگام حاملگی نمی‌بایست از آن استفاده گردد. درمان‌های دیگری نیز وجود دارد که همانند هیدروکسی اوره سطح هموگلوبین F را افزایش می‌دهد و یا باعث حلالیت هموگلوبین S می‌شود، از جمله بوتیرات‌ها، دسیتابین(Decitabine) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیره. علاوه بر موارد ذکر شده، برخی از درمان‌های جدید نیز توسط دانشمندان در حال بررسی‌های بیشتر بوده که تا رسیدن به مراحل نهایی نیازمند کار و برنامه‌ریزی دقیق می‌باشد و از آن جمله می‌توان به استاتین‌ها (Statin)، آنتی‌کوآگولانت‌ها (Anticoagulant)، گلوتامین (Glutamine)، مهارکننده‌های pan-selectin و نیتریک اکسید اشاره داشت. این در حالی است که ژن درمانی نیز وارد فاز I آزمایشی خود شده است(۵).

پیوند سلول‌های بنیادی خونساز(Hematopoietic = HSCT Stem Cell Transplantation):

علی‌رغم پیشرفت‌های کنونی، بیماران مبتلا به تالاسمی و کم خونی داسی‌شکل هم چنان متحمل رنج ناشی از مبارزه دایم با این اختلالات مزمن می‌باشند. این مساله می‌تواند تا پایان عمر بیمار ادامه یابد، زیرا هیچ یک از موارد درمانی اشاره شده نمی‌تواند موجب بهبودی قطعی و کامل بیمار گردد و تنها از عوارض آن می‌کاهد. هم چنین با وجود توسعه مراقبت‌های حمایتی در هموگلوبینوپاتی‌های فوق، هم چنان امید به زندگی در این بیماران کم است. به علاوه کیفیت زندگی نیز در این بیماران معمولاً به طور مشخصی ضعیف است. با توجه به نکات ذکر شده و بررسی‌های صورت گرفته توسط دانشمندان، می‌توان پیوند سلول‌های بنیادی(HSCT) را تنها راه درمانی مؤثر در هموگلوبینوپاتی‌ها دانست(۱۵-۱۲).

اولین بار در ۳۰ سال پیش توماس و همکارانش موفق به پیوند سلول‌های بنیادی خونساز در یک کودک ایتالیایی شدند. از آن پس صدها بیمار مبتلا به تالاسمی و کم خونی داسی‌شکل، از سلول‌های مغز استخوان اهداکننده خویشاوند با HLA سازگار، پیوندهای آلوگرافتی را دریافت کردند(۱۲). امروزه درمان هموگلوبینوپاتی‌ها از جمله تالاسمی و آنمی داسی‌شکل توسط HSCT ، پیشرفت‌های زیادی داشته و مرهون روش‌های جدیدی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ : مراحل انجام پیوند مغز استخوان

ردیف	مراحل	توضیح
۱	ارزیابی‌های قبل از پیوند(۱۸، ۱۷، ۱۳)	– بررسی عفونت‌های ویروسی از قبیل ابتلا به ویروس هپاتیت B ، C و CMV – بیوپسی کبد بیمار جهت سنجش میزان گرانباری آهن – بررسی تطابق HLA بیمار و اهداکننده
۲	رژیم‌های آماده‌سازی(۱۹، ۱۵، ۱۳)	– سرکوب سیستم ایمنی بیمار – سرکوب خونسازی بیمار
۳	نمونه‌گیری از مغز استخوان(۱۳)	– معمولاً از تاج استخوان ایلیاک(Iliac crest) گرفته می‌شود
۴	رژیم‌های پیشگیری از GVHD (۲۰، ۱۵، ۱۳)	– تجویز داروهایی چون سیکلوسپورین A ، متوترکسات و متیل پردنیزولون با دوزها و دوره‌های متنوع
۵	مراقبت‌های حمایتی (۱۳)	– سرکوبگرهای ایمنی درصورت رخداد GVHD – غربالگری برای آلودگی به CMV
۶	ارزیابی نتیجه پیوند(۲۱)	– شمارش تعداد مطلق نوتروفیل‌ها(Absolute Neutrophil Count = ANC)، پلاکت و هموگلوبین(و گاهی الکتروفورز هموگلوبین) برای اثبات پذیرش میلوئیدی پیوند – انجام آزمایش‌های کایمریسم و بررسی لود آهن و بیوپسی کبد

است که کیفیت تعیین HLA (HLA Typing) را ارتقا بخشیده است. علاوه بر این، داروهای جدیدی که در سرکوب سیستم ایمنی پس از پیوند جهت جلوگیری از پس زدن آن به کار می‌روند، هم چنین تسهیل بازسازی سیستم ایمنی و درمان‌های حمایتی برای جلوگیری از عفونت‌های فرصت طلب، استراتژی‌های کاهش سمیت و ازدیاد منابع در دسترس جهت تخلیص سلول‌های بنیادی، از دیگر عواملی هستند که در تبدیل HSCT به یک گزینه درمانی مطمئن در هموگلوبینوپاتی‌ها نقش دارند(۱۶). در ادامه نکاتی چند را پیرامون پیوند مغز استخوان در هر یک از اختلالات تالاسمی و SCA می‌خوانید(جدول ۱).

پیوند مغز استخوان در تالاسمی:

اولین گزارش موفق از پیوند مغز استخوان آلوژن در سال ۱۹۸۱، مربوط به یک بیمار جوان مبتلا به تالاسمی است. در ایتالیا بیش از ۵۰۰ بیمار مبتلا به تالاسمی تحت پیوند مغز استخوان از اهداکننده خویشاوند، قرار گرفته‌اند(۲۲). در سال ۱۹۸۸ بررسی‌هایی برای ارزیابی تاثیر وضعیت قبل از پیوند بیماران مبتلا به تالاسمی بر نتیجه پیوند صورت گرفت. مشخص شد که بزرگ شدن کبد(هپاتومگالی) و فیبروز پورتال باعث کاهش احتمال بقا می‌شوند. به علاوه محققان دریافتند که بین رژیم آهن و بقا، رابطه وجود دارد(۲۳). به همین دلیل بر اساس هپاتومگالی، وجود فیبروز کبدی و درمان منظم با مهارکننده‌های آهن، بیماران از نظر میزان خطر به سه گروه تقسیم می‌شوند(۲۳، ۲۲، ۱۵)؛ ۱– بیمارانی که فاقد هر یک از این فاکتورهای فوق هستند، ۲– بیمارانی که یک یا دو فاکتور را دارا می‌باشند و ۳– افرادی که واجد هر سه فاکتورند(۲۳). تشخیص این که قبل از پیوند، بیمار در کدام یک از گروه‌های فوق قرار دارد، در بهبود بازده پیوند مؤثر است(۱۵). نتایج پیوند مغز استخوان در بیماران مبتلا به تالاسمی در بیمارستان شریعتی، نرخ بقای کل(overall survival) را تا فاصله ۱۲ سال پس از پیوند، ۷۹/۴ درصد و بقای بدون بیماری(disease free survival) را ۶۸/۴ درصد گزارش کرده است(۲۴).

پیوند مغز استخوان در کم خونی داسی‌شکل:

اولین پیوند موفق در سال ۱۹۸۶ در یک دختر مبتلا به

www.SID.ir

کم خونی داسی‌شکل و AML صورت گرفت و نتیجه آن درمان کم خونی داسی شکل بود. کودکانی که HLA سازگار با اهداکننده‌های خویشاوند خود دارند، نتایج بسیار امیدوارکننده‌ای را در درمان با HSCT نشان داده‌اند (احتمال درمان ۸۰٪ تا ۹۰٪)، از این رو اکثر پیوندهای سلول‌های بنیادی که تاکنون در سرتاسر دنیا گزارش شده است در کودکانی بوده که اهداکننده خویشاوند با HLA سازگار داشته‌اند. این پیوند در اهداکننده‌های غیر خویشاوند، به ویژه در بیماران مسن‌تر، موفقیت کمی داشته است(۱۲).

زمان ایده‌آل در پیوند سلول‌های بنیادی، سنین جوانی و قبل از پیشرفت و گسترش بیماری‌های عروقی غیر قابل برگشت مرتبط با این بیماری می‌باشد. به طور کلی در معیارهای انتخاب پیوند برای فرد مبتلا به کم خونی داسی شکل، سن کمتر از ۱۶ سال، داشتن اهداکننده سازگار از نظر HLA و داشتن حداقل یکی از نشانه‌های زیر در این رابطه الزامی است. این نشانه ها عبارتند از: سکته یا حمله سیستم عصبی مرکزی که بیش از ۲۴ ساعت پایدار باشد، سندروم حاد قفسه سینه، رتینوپاتی تکثیر شونده دو طرفه، نفروپاتی داسی‌شکل، استئونکروز مفاصل و آلوایمونیزاسیون در طول درمان‌های تزریقی طولانی مدت(۲۳، ۱۵).

با وجود این که درصد بالایی از بیماران مبتلا به β- تالاسمی و کم‌خونی داسی شکل را می‌توان با پیوند آلوژنیک مغز استخوان از یک دهنده خویشاوند با HLA سازگار درمان نمود، ولی استفاده از این روش درمانی نیز همانند اغلب روش‌های درمانی، ایده‌آل نبوده و خطر شکست درمان یا ابتلا به عوارض ثانویه، غیر قابل اجتناب می‌باشد(۲۵). بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که احتمال مرگ و میر وابسته به پیوند یا TRM (Treatment-Related Mortality) در بیماران جوان مبتلا به β- تالاسمی بین ۸٪ تا ۱۵٪ و در مبتلایان به کم‌خونی داسی شکل ۶٪ تا ۱۰٪ است(۲۷، ۲۶). هم چنین شیوع GVHD مزمن نیز در گیرنده‌های پیوند از یک دهنده سازگار در مبتلایان به β- تالاسمی ۲۷٪ و در بیماران کم‌خونی داسی‌شکل ۱۲٪ است(۲۸). پیوند در مبتلایان به β- تالاسمی مسن‌تر با گران باری آهن، به ویژه بیمارانی که ناهنجاری‌های کبدی دارند، نتایج ضعیف‌تری نشان داده است(۲۹).

سایر منابع سلول‌های بنیادی خونساز:

همان طور که اشاره شد یکی از محدودیت‌های عمده در پیوند مغز استخوان، عدم وجود اهداکننده مناسب است، به طوری که تنها ۲۵٪ پذیرندگان پیوند، واجد اهداکننده خویشاوند سازگار از نظر HLA می‌باشند. دو منبع دیگری که در پیوند سلول‌های بنیادی خونساز مطرح هستند عبارتند از: خون بند ناف(UCB)، که می‌تواند متعلق به فرد غیر خویشاوند یا خویشاوند باشد و سلول‌های بنیادی هاپلوآیدنتیکال(۳۰)(جدول ۲). همان طور که در جدول ۲ مشخص شده است، عمده‌ترین مزیت UCB بر سایر منابع سلول‌های بنیادی، توانایی عبور

جدول ۲: مزایا و معایب پیوند خون بند ناف(۳۲-۳۰، ۲۰، ۱۲)

مزایا	معایب
۱- دسترسی ایمن و سریع به HSC	۱- خطر پس زدن پیوند
۲- کاهش وقوع و کاهش شدت GVHD	۲- آهسته بودن سرعت پذیرش پیوند
۳- امکان استفاده از اهداکننده غیر خویشاوند	۳- تاخیر در بازاریابی خونسازی پس از پیوند(منشا عفونت)
۴- کم خطر بودن برای اهداکننده پیوند	۴- تعداد محدود سلول‌های در دسترس
۵- عاری بودن UCB از پاتوژن‌های ویروسی	۵- تجربیات بالینی کمتر در مقایسه با پیوند مغز استخوان

Archive of SID
www.SID.ir

از سدهای HLA است که در پیوند خون بند ناف از اهداکننده غیرخویشاوند بسیار اهمیت دارد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که در این نوع پیوند مهم‌ترین پیش‌بینی‌کننده موفقیت، تعداد سلول‌های تزریق شده و نه درجه اختلاف HLA می‌باشد(۳۲). بنابراین به طور مشخص می‌توان از پیوند UCB در بیمارانی که فرد اهداکننده‌ای با HLA سازگار برای پیوند مغز استخوان ندارند، استفاده کرد(۲۲). با این وجود تعداد سلول‌های پیوندی در این روش محدود می‌باشد و این مساله امکان موفقیت پیوند را تا حد زیادی کاهش می‌دهد(۳۴، ۳۳).

در پیوند سلول‌های هاپلوایدنتیکال می‌تواند اهداکننده مادر و پذیرنده فرزند باشد(۱۹). از مزایای این شیوه، داشتن شانس بالا برای در دسترس بودن اهدا کننده پیوند است و از جمله عمده‌ترین موانع آن که باعث پس زدن پیوند می‌شوند، GVHD ، ناکارآمدی طولانی مدت سیستم ایمنی ناشی از شیمی درمانی و رادیوتراپی شدید قبل از پیوند، افزایش احتمال وقوع عفونت‌ها و بیماری‌های لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند(Post-transplant = PTLPD Lymphoproliferative Disease) می‌باشد که منجر به محدودیت در اجرای این شیوه درمانی شده است(۳۰، ۱۵).

روش‌های جدید جایگزین پیوند سلول‌های بنیادی خونساز:

در بخش قبل به پیوند سلول‌های بنیادی خونساز و فواید و معایب آن‌ها به عنوان تنها راه درمان اختلالات هموگلوبین پرداخته شد. صرف نظر از محدودیت منابع، مشکل اساسی در استفاده از این منابع، احتمال رد پیوند می‌باشد(۳۲). به همین دلیل در کنار توسعه و تعدیل روش‌های موجود، روش‌های دیگر نیز جهت درمان اختلالات هموگلوبین مورد بررسی قرار گرفته‌اند که در ادامه به آن‌ها اشاره شده است.

ژن درمانی:

هدف از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز در اختلالات هموگلوبین، تصحیح نقص ژنتیکی به وسیله جایگزینی ژن‌های ضروری برای خونسازی طبیعی از طریق سلول‌های بنیادی آلوژن است. در این رابطه، سلول‌های بنیادی به مانند وکتورهایی عمل می‌کنند که حامل ژن سالم هستند. بنابراین پیوند سلول‌های بنیادی می‌تواند به عنوان ژن درمانی سلول‌های بنیادی آلوژن در نظر گرفته شود(۱۹). تلاش‌ها برای توسعه انتقال ژن به سلول‌های بنیادی خونساز خود فرد بیمار ادامه دارد و به طور مشخص در صورت تحقق آن، عوارض سایر روش‌ها از جمله GVHD و رد پیوند از بین خواهد رفت(۳۵).

مهم‌ترین عنصر در توسعه ژن درمانی در اختلالات خونی، پیدا کردن یک وکتور مناسب برای انتقال ژن به سلول‌های خونساز است. در اوایل دهه ۱۹۸۰ ، MLV (Murine Leukemia Virus) به عنوان یک وکتور مناسب برای انتقال ژن به ژنوم سلول‌های خونساز در مدل‌های موشی معرفی گردید. علی‌رغم موفقیت‌های حاصل، محققان گزارش دادند که فعال شدن ژن ورودی به واسطه وکتور، موجب تحریک پروتوانکوژن‌ها شده و منجر به توسعه سرطان خون در ۵ بیماری که به دلیل نقص زنجیره گاما تحت درمان بودند، گردید. این رخداد نشان از اهمیت وکتور و طراحی مناسب آن در کم خطر نمودن و امنیت بخشیدن به ژن‌درمانی دارد. از جمله دیگر وکتورهای مورد مطالعه، وکتورهای لنتی ویروسی هستند. وکتورهای لنتی‌ویروسی یک سیستم مؤثر در انتقال ژن و بیان بالای ژن‌های گلوبین می‌باشند. در اواسط دهه ۱۹۹۰، تکامل وکتورهای لنتی‌ویروسی بر پایه HIV ، امکان توسعه این وکتورها را در انتقال گلوبین فراهم کرد. در حقیقت کشف پیشرفت مهم در زمینه ژن درمانی گلوبین، در سال ۲۰۰۰ و بر پایه وکتورهای لنتی ویروسی گلوبین صورت گرفت(۳۵). سادلین و همکارانش اولین بار وکتورهای لنتی‌ویروسی کدکننده β- گلوبین انسانی را برای درمان β- تالاسمی در مدل‌های موشی به کار بردند(۳۶). مطالعه‌های بعدی باعث شناخت راه‌های تعدیل و اصلاح این روش گردید. برای مثال جهت ممانعت از ادغام غیراختصاصی ژن وارد شده با ژنوم سلول میزبان، می‌بایست یک عنصر تنظیمی اندوژن خاص در لوکوس β- گلوبین وجود داشته باشد تا بیان موفق آن

Archive of SID
www.SID.ir

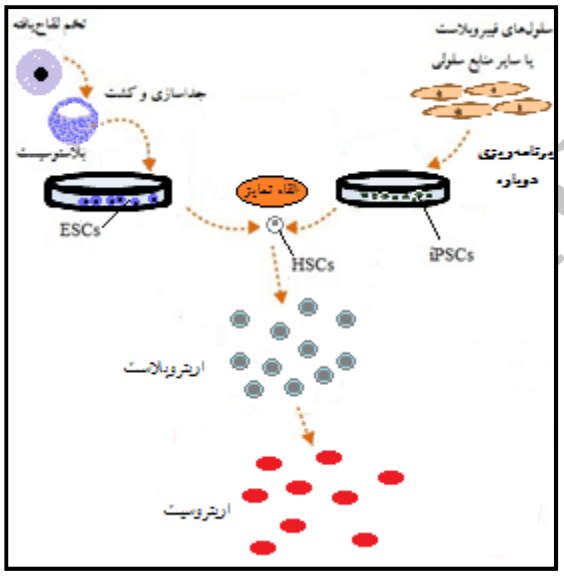
را تضمین کند. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که سطح بیان پروتئین گلوبین متاثر از مجموعه‌ای پیچیده از عناصر تنظیمی اندوژن در ژن β- گلوبین است. به علاوه جایگاه ژنومی ادغام نیز بر میزان بیان آن مؤثر است(۳۵). در سال ۲۰۱۰ کاوازانا و همکارانش توانستند یک بیمار بالغ مبتلا به تالاسمی ماژور وابسته به تزریق خون را با استفاده از انتقال لنتی‌ویروسی ژن β- گلوبین، پس از ۳۳ ماه، از تزریق خون بی‌نیاز کنند(۳۷).

درمان ایده‌آل کم خونی داسی‌شکل توسط ژن درمانی، جایگزینی یک کپی از ژن طبیعی(β^A) به جای ژن گلوبین داسی شکل (β^S) است. اخیراً نمونه‌هایی ازدرمان کم خونی داسی‌شکل توسط ژن درمانی در مدل‌های حیوانی انجام گرفته که می‌توان در این خصوص به ایجاد موش‌های ترانس ژن LCR-gβ^S اشاره نمود(۳۸). در سلول‌های بنیادی جنینی این موش‌ها، یک آلل β^S معیوب با آلل طبیعی β^A جایگزین و سپس سلول‌ها در بلاستوسیت قرار داده شدند. سلول‌های بنیادی خونساز مشتق از این سلول‌ها، در شرایط *in vivo* گلبول‌های قرمز تصحیح شده تولید کرده و در نتیجه آن کم‌خونی درمان گردید(۳۸).

در انسان هر چند، سلول‌های بنیادی جنینی(hESCs) علاوه بر آن که منبع نامحدودی برای تولید سلول‌های تمایز یافته است و گروه‌های متعددی پتانسیل خونسازی آن‌ها را با استفاده از پروتوکل‌های پیچیده بررسی کرده‌اند، اما جنین محدودیت‌هایی در رابطه با ایجاد رده‌های سلول‌های بنیادی پرتوان با طیف وسیعی از تطابق برای تزریق دارد و درمان بر پایه hESC ها به‌دلیل رد پیوند مربوط به عدم تطابق ایمونولوژیکی بین دهنده و بیمار، از موفقیت بالایی برخوردار نمی‌باشد(۴۰، ۳۹).

سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده(iPSCs):

فناوری برنامه‌ریزی دوباره(Reprogramming) سلول‌های سوماتیک برای تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده(Induced Pluripotent Stem Cells = iPSCs)، شیوه‌ای جدید برای درمان β- تالاسمی و بیماری کم خونی داسی‌شکل فراهم کرده و بعد جدیدی به تولید بافت‌هایی که سازگاری ایمونولوژیک دارند، افزوده است(۴۲، ۴۱). تا به امروز گروه‌های زیادی توانسته‌اند سلول‌های سوماتیک را با القای بیان فاکتورهای رونویسی متنوع از جمله Oct-4 ، Sox2 ، Klf4 ، c-Myc ، Nanog و Lin28 ، به iPSC ها تبدیل کنند. این سلول‌ها از نظر ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و معیارهای تکاملی، بسیار به hESCها شبیه هستند. به عبارتی قادر به خود نوزایی نامحدود به صورت *in vitro* و تمایز به هر سه لایه جنینی می‌باشند(۴۰، ۳۹). iPSC ها منبع بالقوه نامحدودی از سلول‌های بنیادی را برای تولید پیش‌سازهای سلول‌های خونی از جمله اریتروئیدها، فراهم می‌آورند و می‌توان آن‌ها را به شیوه‌ای مشابه hESC ها به سمت تمایز خونسازی سوق داد(شکل ۱)(۴۳، ۳۹).



شکل ۱: استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی(ESC) و سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده(iPSC) در تولید گلبول‌های قرمز: سلول‌های بنیادی خونساز را می‌توان از طریق سایر سلول‌های بنیادی جنینی و یا فرآیند برنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک به دست آورد و به گلبول‌های قرمز تمایز داد. HSCs : سلول‌های بنیادی خونساز

یکی از شیوه‌های رایج، تولید iPSC های خاص بیمار(patient-specific iPSC) و سپس اصلاح ژنتیکی این سلول‌ها به وسیله هدف‌گیری ژنی است. به عنوان مثال در

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های فیبروبلاست پوست فرد مبتلا به کم خونی داسی شکل، آلل β^S معیوب با آلل β^A تعویض شده و پس از تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های iPS ، پیش‌سازهای اریتروسیتی مشتق از آن‌ها پیوند زده می‌شوند(۳۸). لین یی و همکارانش فیبروبلاست‌های پوست یک بیمار β- تالاسمی هموزیگوت را به‌وسیله وکتورهای رتروویروسی حاوی ژن‌های ۴ فاکتور رونویسی Oct-4 ، Sox2 ، Klf4 و c-Myc و در دسته‌ای دیگر حاوی همین ژن‌ها منهای c-Myc ، به سمت تولید سلول‌های iPS سوق دادند(۴۱). با حضور والپروئیک اسید در محیط کشت، جهت افزایش بازده برنامه‌ریزی دوباره سلول، پس از ۳-۲ هفته کلونی‌های مشابه کلونی‌های hESC ، ظاهر شدند(۴۴). در مرحله بعد از طریق تولید جسم جنینی(EB)، سلول‌های iPS به سلول‌های خونساز تمایز یافتند و در این مرحله از دو محیط تمایز به صورت پی در پی استفاده شد. محیط تمایز اولیه، از محیط فاقد سرم(Serum-Free = SFM Media) غنی‌شده با BMP-4 (Bone Morphogenic Protein-4) نوترکیب انسانی، VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) نوترکیب انسانی(hrVEGF)، TPO (Thrombopoietin)، SCF (Stem Cell Factor) انسانی، اینترلوکین-۳ (IL-3) انسانی و IGF-II (Insulin-like Growth Factor II) انسانی، تشکیل شده بود. محیط ثانویه که سلول‌های جسم جنینی به صورت منفرد در آن کشت شدند، جهت تمایز به سمت سلول‌های خونساز حاوی SFM غنی‌شده با VEGF انسانی، SCF انسانی، FLt-3 (نوعی رسپتور تیروزین‌کینازی) انسانی، اینترلوکین۶ انسانی و اریتروپویتین انسانی بود. اثبات تولید کلونی‌های تولیدکننده هموگلوبین با رنگ‌آمیزی این کلونی‌ها با آنتی‌بادی هموگلوبین F (جنینی)، انجام شد. این سلول‌ها به دلیل آن که از خود بیمار هستند، پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌کنند(۴۱). گروه دیگری برای تولید iPSC های خاص بیمار β- تالاسمی، فیبروبلاست‌های آلوده به رتروویروس‌های حامل را برروی سلول‌های MEF-feeder تیمار شده با میتومایسین سی، کشت دادند و پس از ۲ روز محیط را با محیط کشت معمول hESC غنی‌شده با فاکتور رشد فیبروبلاستی(FGF)، تعویض کرده و ۲ هفته پس از کشت اولیه توانستند iPSC های β- تالاسمی را به دست آورند(۴۴).

iPSC ها امکان درمان زود هنگام بیماری‌های ژنتیکی سخت را فراهم می‌کنند. هنگامی‌که به منظور تشخیص پیش از تولد بیماری‌ها، مایع آمنیونی و یا نمونه پرز کوریونی(Chorionic Villus Sample = CVS) جنین گرفته می‌شود، می‌توان این سلول‌ها را منبعی برای تولید iPS قرار داد و از آن‌ها برای درمان زود هنگام بیماری‌های ژنتیکی استفاده کرد. مزیت درمان زودهنگام این خواهد بود که علاوه بر این که به تعداد سلول‌های کمتری نسبت به درمان بالغین نیاز است، می‌توان از آسیب اندام‌های فرد در بیماری‌هایی که آسیب از رحم یا در سنین ابتدایی آغاز می‌شود، جلوگیری نمود(۴۱).

تولید گلبول‌های قرمز خون از سلول‌های بنیادی در شرایط *ex vivo* ، وسیله‌ای بالقوه برای تامین این فرآورده خونی به صورت ایمن و کافی است(۳۹). تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به RBC ها، در ابتدا با استفاده ازESC انجام شد. به عنوان نمونه لو و همکارانش توانستند از ESC انسانی، انواع گروه‌های خونی A، B ، O و رزوس+D (Rh:+1) یا رزوس-D (Rh:-1) را تولید کنند(۴۵). امروزه پیشرفت‌های اساسی موجب تولید RBCهای عملکردی از iPSC ها در شرایط *in vitro* شده است. چرا که این شیوه با چالش‌های اخلاقی مربوط به منشا سلول مواجه نمی‌باشد. به علاوه امکان گزینش فنوتیپ‌های مطلوب وجود دارد و می‌تواند RBCهای گروه خاصی را ارایه دهد(۴۶). استفاده از RBCهای کشت شده، بهترین سیاست طولانی مدت برای بیمارانی است که تزریق مداوم دارند (مانند β- تالاسمی و گاهاً SCA) تا از آلوایمونیزاسیون آن‌ها جلوگیری شود. از آن جا که، تامین خون کاملاً منطبق و یا حداقل منطبق برای گروه خونی Rh و Kell دشوار است، روش iPSC ها انطباق کامل برای گروه‌های خونی Rh ، Kell ، Duffy و Kidd را فراهم می‌کند(۳۹).

موضوع اساسی، اثبات توانایی iPSC ها برای تمایز به سلول‌های کاملاً بالغ و عملکردی است که در مورد تولید اریتروسیت گروه‌های اندکی به موفقیت رسیده‌اند. اولین بار لاپی‌لون و همکارانش در سال ۲۰۱۰ میلادی توانستند

Archive of SID
www.SID.ir

تمایز کامل iPSCهای انسانی را به سلول‌های اریتروئید با توانایی بلوغ به RBC های بدون هسته و حاوی هموگلوبین جنینی تترامر و عملکردی نشان دهند. آن‌ها از لنتی‌ویروس‌های حاوی ژن‌های فاکتورهای Oct-4، Sox2 ، Nanog و Lin28 برای آلوده کردن فیبروبلاست‌ها و تولید iPSC استفاده کردند. در مرحله بعد، این سلول‌ها در کشت مایع حاوی پلاسمای انسان و SCF ، TPO ، لیگاند -FLt 3(FL) ، hrVEGF ، اینترلوکین ۳ و۶ و اریتروپویتین قرار گرفتند تا جسم جنینی تولید شود. سپس سلول‌های منفرد جسم جنینی در سه دوره در کشت حاوی پلاسما، انسولین، هپارین، EPO و SCF قرار گرفتند. بین روزهای ۹ و ۲۰ پس از کشت سلول‌های جسم جنینی، این سلول‌ها مارکرهای مورد بررسی خونسازی(CD45 و CD34) و اریتروئید(CD71 :گیرنده ترانسفرین) را به طور قابل ملاحظه‌ای بیان کردند. بلوغ اریتروسیت بر اساس مورفولوژی به وسیله نوعی رنگ‌آمیزی(گیمسا) و براساس بیان آنتی‌ژن‌های غشای اریتروئید به وسیله فلوسیتومتری اثبات شد. به طوری که در روز بیست و پنجم، ۱۰-۴ درصد از سلول‌های محیط کشت، RBC های بدون هسته و ۹۶-۹۰ درصد، اریتروسیت‌هایی با رنگ‌پذیری طبیعی بودند و هموگلوبین غالب، هموگلوبین γ بود(۳۹). بیان هموگلوبین‌های γ و جنینی و رویانی، نشان دهنده برنامه‌ریزی دوباره کامل در لوکوس گلوبین است(۴۳). به این ترتیب پدیده تولید RBC ها از iPSC اثبات شده است اما روش‌های به کار رفته برای هدایت به سمت کاربرد بالینی در تزریق خون، بایستی بهینه شوند(۴۶).

به طور کلی شیوه‌هایی که در این پژوهش‌ها برای اثبات دستیابی به سلول‌های iPS ، اثبات انشقاق iPSC ها از سلول‌های منبع اولیه و اثبات پرتوانی سلول‌های iPS در *in vivo* و *in vitro* استفاده می‌شود، دارای موارد مشترکی است که در ادامه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اثبات دستیابی به iPSC ها با بررسی فاکتورهای پرتوانی مشابه آنتی‌ژن‌های سطحی ESC انسانی شامل Nanog ، SSEA4 ، Tra-1-60 و Tra-1-81 و نیز آلکالین فسفاتاز به کمک ایمونوهیستوشیمی ، Real-Time PCR و فلوسیتومتری صورت می‌گیرد(۴۴، ۴۱، ۳۹).

برای اثبات انشقاق iPSC ها از سلول‌های منبع اولیه و نه آلودگی‌های سلولی موجود در محیط کشت، آنالیز توالی‌یابی DNA ژنومی صورت گرفته و طی آن جهش مشابه در جایگاه یکسان در هر دو نوع سلول اثبات می‌شود. به علاوه الگوهای یکسان ژنی در iPS و سلول منشا می‌تواند با استفاده از آنالیز توالی‌های تکرارشونده پشت سر هم کوتاه، بررسی شود(۴۴).

پرتوانی در *in vitro* با تشکیل جسم جنینی و پرتوانی در *in vivo* با تشکیل تراتوما در موش دارای نقص ایمنی اثبات می‌شود. Real-Time PCR کمی، می‌تواند بیان ژن‌های هر سه لایه اکتودرم(PAX6 ، MAP2)، مزودرم (SMA)، T(Brachyury)، MSX1 و اندودرم(AFP)، CK8,18 ، FOX2 را که طی تمایز رفته رفته افزایش می‌یابند، بررسی کند(۴۴، ۴۳، ۳۹).

تاکنون اکثر مطالعه‌ها از فیبروبلاست‌ها به عنوان جمعیت هدف برای برنامه‌ریزی دوباره استفاده کرده‌اند. اما بررسی‌های کیم و همکارانش روی یک مدل موشی نشان داد که نتایج حاصله در این خصوص، در صورت استفاده از iPSC های مشتق از خون به جای iPSC های مشتق از فیبروبلاست‌ها، به مراتب بهتر می‌باشد(۴۷). به علاوه استفاده از بافت خون به دلیل حداقل تهاجم، دسترسی آسان و نیز فراوانی مناسب سلول‌ها در مقایسه با استفاده از فیبروبلاست‌ها که به بیوپسی پوست و دوره طولانی کشت برای گسترش نیاز دارند، ارجح است. امروزه پژوهشگران با تخلیص سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(PBMNCs = Peripheral Blood Mononuclear Cells) و گسترش آن‌ها در محیط‌های کشت مناسب، موفق به کسب سلول‌های iPS با ویژگی‌های مشابه ESC ها شده‌اند(۵۰-۴۸). از میان سلول‌های PBMN ، T لنفوسیت‌های تمایز یافته را می‌توان به سادگی در محیط *in vitro* با استفاده از عوامل متنوعی چون IL-2 نوترکیب، IL-7 و G-CSF کشت و گسترش داد و با شیوه‌های مختلف مانند استفاده از وکتورهای ویروسی، آن‌ها را برنامه‌ریزی مجدد نمود(۵۰-۴۸). علاوه بر T لنفوسیت‌ها، سلول‌های میلوئیدی نیز به خوبی به iPS تبدیل می‌شوند. این پدیده شاهدی بر این ادعاست که حتی سلول‌های کاملاً تمایز یافته انسان نیز مستعد برنامه‌ریزی

Archive of SID
www.SID.ir

دوباره برای پرتوانی هستند(۴۸).

دانشمندان در اولین روش‌های استفاده شده برای انشقاق iPSC ها، از وکتورهای ویروسی(رتروویروس‌ها و لنتی‌ویروس‌ها) استفاده کردند. هرچند این روش‌ها کارآمد بودند، اما مشکل عمده در استفاده از آن‌ها این است که این وکتورها می‌توانند باعث بروز جهش‌های ژنی در سلول میزبان و نیز تومورزایی گردند. تولید این سلول‌ها در جهت سلول درمانی، باید از طریق روش‌هایی صورت گیرد که برای جلوگیری از خطر هرگونه جهش الحاقی، مکان‌های ورود ترانس ژن‌ها با دقت کنترل می‌شود(۴۶).

بر این اساس اخیراً پاپاپترو و همکارانش، ۵ اصل را به عنوان اصول «لنگرگاه ایمن(Safe harbor)» تعیین کرده‌اند و بر اساس آن بیان کردند در صورتی‌که جایگاه ورود وکتور ویروسی از این ۵ اصل تبعیت کند، خطر تومورزایی وکتور از بین خواهد رفت. این ۵ اصل عبارتند از: ۱) حداقل ۵۰ کیلو جفت باز فاصله از انتهای '5 هر ژن، ۲) حداقل ۳۰۰ کیلو جفت باز فاصله از هر ژن مربوط به سرطان، ۳) حداقل ۳۰۰ کیلو جفت باز فاصله از هر میکرو RNA ، ۴) موقعیت ژن بایستی خارج از یک واحد رونویسی باشد، ۵) موقعیت ژن بایستی خارج از نواحی فوق حفظ شده ژنوم انسان باشد. در این پژوهش در مواردی که از فیبروبلاست‌های پوست و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بیماران تالاسمیک و لنتی ویروس‌های حاوی ژن‌های ۴ فاکتور Oct-4 ، Sox2 ، Klf4 و c-Myc برای تولید سلول‌های iPS استفاده شد، آنالیز میکروآرایه(Microarray) کلون‌ها، هیچ گونه اخلالی در بیان ژن‌های مجاور را نشان نداد. ۱۷/۳درصد از تمام ورودهای ویروسی در این پژوهش، بر طبق ۵ اصل یاد شده، پایه‌ریزی شده بودند و بازده این شیوه ۷/۱ درصد برآورد شد. با استفاده از این شیوه علاوه بر جلوگیری از سمیت ژنتیکی، سطح بیان مناسب و تنظیم مناسب ترانس ژن وارد شده نیز حفظ شد(۵۱).

ایمنی ژنومیک iPSC ها، شرط اساسی برای کاربرد بالینی آن‌هاست(۵۱، ۴۶). به همین دلیل گروه‌های متعددی از شیوه‌های جایگزین برای تولید سلول‌های iPS استفاده کرده‌اند. نمونه‌هایی از این شیوه‌ها، استفاده از ریز مولکول‌ها، استفاده از وکتورهای اپی‌زومال غیر ادغام شونده(Non integrating)، شیوه‌های استفاده از انتقال گذرای پلاسمید، استفاده از یک وکتور برای بیان تمام ژن‌ها و یا استفاده از پروتئین‌های نوترکیب به جای وکتورهای ویروسی هستند(۴۶، ۴۲).

هانا و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میلادی از سلول‌های iPS حاصل از فیبروبلاست موش دارای بیان هموزیگوت ژن سلول داسی شکل β- گلوبین انسانی با القای بیان ژن‌های فاکتورهای پرتوانی از طریق انتقال وکتور رتروویروسی، برای درمان SCA در مدل موشی استفاده کردند. ژن گلوبین جهش‌یافته در این iPSC ها با استفاده از هدف‌گیری ژنی خاص با الکتروپوریشن یک ساختار حاوی ژن طبیعی، تصحیح شد. بررسی‌ها نشان داد که با تزریق سلول‌های پیش‌ساز خونی مشتق از این iPSC های تصحیح شده به موش بیمار پرتودهی شده، تمام پارامترهای خون‌شناسی عمومی کم خونی داسی‌شکل به طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافت و با موش‌های کنترل قابل مقایسه بود. هر چند در این بررسی هیچ نشانه‌ای از تشکیل تومور مشاهده نشد، اما نگرانی از احتمال وقوع بدخیمی در آینده این موش‌ها، هم چنان پا برجاست(۴۰).

نکات مهم متعددی برای پاسخگویی باقی مانده‌اند که عبارتند از انتخاب نوع سلول اولیه برای تولید iPSC ، شیوه برنامه‌ریزی دوباره برای اطمینان از ایمنی iPSC برای کاربرد بالینی، بهینه‌سازی تمایز اریتروسیت و تعیین شرایط GMP (Good Manufacturing Practice) برای تولید تجاری(۴۶). در یک مطالعه جدید، محققین توانستند پیش‌سازهای خونساز و سلول‌های خونی بالغ را بدون ایجاد مرحله پرتوانی، مستقیماً از فیبروبلاست‌های انسانی، تولید کنند. در این پژوهش بیان اکتوپیک تنها OCT-4 توانست بیان فاکتورهای رونویسی خونسازی و مارکرسطحی خونسازی(CD45) را القا کند. برخلاف iPSCها و سلول‌های بنیادی جنینی، این سلول‌ها در شرایط *in vivo* ، تراتوما تشکیل نمی‌دهند و مارکرهای اختصاصی و ژن‌های پرتوانی را بیان نمی‌کنند. این سلول‌ها چند توان(Multipotent) هستند و قرار گرفتن آن‌ها در معرض سیتوکین‌های خونساز، رده‌های گرانولوسیت، مونوسیت،

Archive of SID
www.SID.ir

مگاکاریوسیت و اریتروئید را به وجود می‌آورد. بر اساس تخمین این محققین، چهار سانتی‌متر مربع از پوست می‌تواند برای بازسازی کامل خونسازی، کافی باشد(۵۲).

نتیجه‌گیری

با توجه به نکات ذکر شده و بررسی‌های صورت گرفته توسط دانشمندان، می‌توان پیوند سلول‌های بنیادی (HSCT) را تنها راه درمانی مؤثر در هموگلوبینوپاتی‌ها دانست. امروزه درمان هموگلوبینوپاتی‌ها از جمله تالاسمی و آنمی داسی‌شکل توسط HSCT ، پیشرفت‌های زیادی داشته و مرهون روش‌های جدیدی است که کیفیت تعیین HLA (HLA Typing) را ارتقا بخشیده است. علاوه بر این، داروهای جدیدی که در سرکوب سیستم ایمنی پس از پیوند جهت جلوگیری از پس زدن آن به کار می‌روند، هم چنین تسهیل بازسازی سیستم ایمنی و درمان‌های حمایتی برای جلوگیری از عفونت‌های فرصت‌طلب، استراتژی‌های کاهش سمیت و ازدیاد منابع در دسترس جهت تخلیص سلول‌های بنیادی، از دیگر عواملی هستند که در تبدیل HSCT به یک گزینه درمانی مطمئن در هموگلوبینوپاتی‌ها نقش دارند. با آن که درصد بالایی از بیماران مبتلا به β- تالاسمی و کم‌خونی داسی‌شکل را می‌توان با پیوند آلوژنیک مغز استخوان از یک دهنده خویشاوند با HLA سازگار درمان نمود، ولی استفاده از این روش درمانی نیز همانند اغلب روش‌های درمانی، ایده‌آل نبوده و خطر شکست درمان یا ابتلا به عوارض ثانویه، غیر قابل اجتناب می‌باشد. عدم وجود اهداکننده مناسب یکی از محدودیت‌های عمده در پیوند مغز استخوان است، در استفاده از سایر منابع سلولی نیز، صرف نظر از محدودیت منابع، مشکل اساسی احتمال رد پیوند می‌باشد. به همین دلیل در کنار توسعه و تعدیل روش‌های موجود، روش‌های دیگر نیز جهت درمان اختلالات هموگلوبین مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از جمله آن‌ها استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده است. تحقیقات در راستای پاسخ به سوالات و ابهامات موجود در زمینه انتخاب نوع سلول اولیه برای تولید iPSC ، شیوه برنامه‌ریزی دوباره برای اطمینان از ایمنی iPSC برای کاربرد بالینی، بهینه‌سازی تمایز اریتروسیت و تعیین شرایط GMP برای تولید تجاری، ادامه دارد.

References:

1- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit J. Acute leukemias. In: Essential Hematology. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006. p. 157-168.
2- Moafi AR, Rahgozar S, Hourfar H, Shirani B. Evaluation of new cases of thalassemia major following minor thalassemia screening program in Isfahan. Journal of Isfahan Medical School 2004; 73: 11-14.[Article in Farsi]
3- Rahgozar S, Poorfathollah AA, Moafi AR, Old JM. Beta s gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. Am J Hematol 2000; 65(3): 192-5.
4- Rahgozar S, Pourfathollah AA, Moafi AR. Sickle cell in Central of Iran and the ways of preventing it's syndromes. Modarres Journal of Medical Science 2000; 2(2): 57-62.[Article in Farsi]
5- Buchanan G, Vichinsky E, Krishnamurti L, Shenoy S. Severe sickle cell disease--pathophysiology and therapy. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16(1 Suppl): S64-7.
6- Rahgozar S, Pourfathollah AA, Moafie AR. The incidence and determination of sickle cell's haplotype in Jar region of Isfahan province. J Pejouhandeh 2000; 4: 409-41.[Article in Farsi]
7- Pourfathollah AA, Rahgozar S, Moafi AR. The importance of precise measurment of HbF in the different diagnosis of sickle cell anemia from sickle beta thalassemia. Journal of Medical Council of IRI 2003; 21(1): 51-4.
8- Rahgozar S, Yavari FM, Hariri MM, Moafi AR . ABO discrepancy prevalence and qualitative study of relevant factors in blood donors of Isfahan Regional Blood Transfusion Center. Sci J Blood Transfus Organ 2006; 3(1): 53-61.[Article in Farsi]
9- Moafi AR, Rahgozar S, Pourfathollah AA, Hariri MM. Blood group antigens frequency: a comparative study in intermediate thalassemics versus healthy people in Isfahan. Sci J Blood Transfus Organ 2005; 2(3): 23-29.[Article in Farsi]
10- Rahgozar S, Moafi AR, Yavari FM, Hourfar H. Alloantibody detection in major beta thalassaemic patients transfused within less-than-20-day intervals. Sci J Blood Transfus Organ 2005; 1(2): 1-9. [Article in Farsi]
11- Moafi A. VS, Nikyar Z, Zeinalian M, Momenzadeh M, Rahgozar M. Prevalence of Minor β-thalassemia Based on RBC Indices among Final Suspected Individuals in Premarital Screening Program Referred to Genetic Laboratories. International Journal of Hematology Oncology and Stem Cell Research 2010; 4(1): 23-7.
12- Boncimino A, Bertaina A, Locatelli F. Cord blood transplantation in patients with hemoglobinopathies.

Archive of SID
www.SID.ir

Transfus Apher Sci 2010; 42(3): 277-81.
13- Rajasekar R, Mathews V, Lakshmi KM, George B, Viswabandya A, Chandy M, *et al.* Cellular immune reconstitution and its impact on clinical outcome in children with beta thalassemia major undergoing a matched related myeloablative allogeneic bone marrow transplant. Biol Blood Marrow Transplant 2009; 15(5): 597-609.
14- Locatelli F. Reduced-intensity regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006: 398-401.
15- Smiers FJ, Krishnamurti L, Lucarelli G. Hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies: current practice and emerging trends. Pediatr Clin North Am 2010; 57(1): 181-205.
16- Walters MC, Quirolo L, Trachtenberg ET, Edwards S, Hale L, Lee J, *et al.* Sibling donor cord blood transplantation for thalassemia major: Experience of the Sibling Donor Cord Blood Program. Ann N Y Acad Sci 2005; 1054: 206-13.
17- Elhasid R, Arush MB, Zaidman I, Leiba R, Barak AB, Postovsky S, *et al*. Safe and efficacious allogeneic bone marrow transplantation for nonmalignant disorders using partial T cell depletion and no posttransplantation graft-versus-host-disease prophylaxis. Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13(3): 329-38.
18- Ramzi M, Nourani H, Zakernia M, Hamidian Jahromi AR. Hematopoietic stem cell transplantation for beta-thalassemia major: experience in south of Iran. Transplant Proc 2004; 36(8): 2509-10.
19- Isgro A, Gaziev J, Sodani P, Lucarelli G. Progress in hematopoietic stem cell transplantation as allogeneic cellular gene therapy in thalassemia. Ann N Y Acad Sci 2010; 1202: 149-54.
20- Jaing TH, Chen SH, Tsai MH, Yang CP, Hung IJ, Tsay PK. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood for nonmalignant diseases: a single institution's experience with 45 patients. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16(1): 102-7.
21- Iravani M, Tavakoli E, Babaie MH, Ashouri A, Khatami F, Ghavamzadeh A. Comparison of peripheral blood stem cell transplant with bone marrow transplant in class 3 thalassemic patients. Exp Clin Transplant 2010; 8(1): 66-73.
22- Kelly P, Kurtzberg J, Vichinsky E, Lubin B. Umbilical cord blood stem cells: application for the treatment of patients with hemoglobinopathies. J Pediatr 1997; 130(5): 695-703.
23- Gaziev J, Lucarelli G. Allogeneic cellular gene therapy for hemoglobinopathies. Hematol Oncol Clin North Am 2010; 24(6): 1145-63.
24- Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Jahani M, Mousavi SA, Iravani M, Bahar B, *et al*. Stem cell transplantation; Iranian experience. Arch Iran Med 2009; 12(1): 69-72.
25- Bernaudin F, Souillet G, Vannier JP, Plouvier E, Lemerle S, Michel G, *et al.* Bone marrow transplantation (BMT) in 14 children with severe sickle cell disease (SCD): the French experience. GEGMO. Bone Marrow Transplant 1993; 12 Suppl 1: 118-21.
26- Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, Angelucci E, Baronciani D, Giardini C, *et al.* Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. N Engl J Med 1990; 322(7): 417-21.
27- Vermylen C, Cornu G, Ferster A, Brichard B, Ninane J, Ferrant A, *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. Bone Marrow Transplant 1998; 22(1): 1-6.
28- Gaziev D, Polchi P, Galimberti M, Angelucci E, Giardini C, Baronciani D, *et al.* Graft-versus-host disease after bone marrow transplantation for thalassemia: an analysis of incidence and risk factors. Transplantation 1997; 63(6): 854-60.
29- Lucarelli G, Clift RA, Galimberti M, Polchi P, Angelucci E, Baronciani D, *et al.* Marrow transplantation for patients with thalassemia: results in class 3 patients. Blood 1996; 87(5): 2082-8.
30- Cairo MS, Rocha V, Gluckman E, Hale G, Wagner J. Alternative allogeneic donor sources for transplantation for childhood diseases: unrelated cord blood and haploidentical family donors. Biol Blood Marrow Transplant 2008; 14(1 Suppl 1): 44-53.
31- Kanathezhath B, Walters MC. Umbilical cord blood transplantation for thalassemia major. Hematol Oncol Clin North Am 2010; 24(6): 1165-77.
32- Smith AR, Wagner JE. Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. Br J Haematol 2009; 147(2): 246-61.
33- Krishnamurti L, Abel S, Maiers M, Flesch S. Availability of unrelated donors for hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. Bone Marrow Transplant 2003; 31(7): 547-50.
34- Mentzer WC, Heller S, Pearle PR, Hackney E, Vichinsky E. Availability of related donors for bone marrow transplantation in sickle cell anemia. Am J Pediatr Hematol Oncol 1994; 16(1): 27-9.
35- Persons DA. Hematopoietic stem cell gene transfer for the treatment of hemoglobin disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009: 690-7.
36- Sadelian M, Boulad F, Lisowki L, Moi P, Riviere I. Stem cell engineering for the treatment of severe hemoglobinopathies. Curr Mol Med 2008; 7(8): 690-7.
37- Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, *et al*. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. Nature 2010; 467(7313): 318-22.
38- Townes TM. Gene replacement therapy for sickle cell disease and other blood disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2008: 193-6.
39- Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, Tropel P, Giarratana MC, Zanella-Cleon I, *et al.* Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. Haematologica 2010; 95(10): 1651-9.
40- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science 2007; 318(5858): 1920-3.
41- Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(24): 9826-30.
42- Dravid GG, Crooks GM. The challenges and promises

Archive of SID
www.SID.ir

of blood engineered from human pluripotent stem cells. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63(4-5): 331-41.
43- Chang KH, Huang A, Hirata RK, Wang PR, Russell
DW, Papayannopoulou T. Globin phenotype of erythroid cells derived from human induced pluripotent stem cells. Blood 2010; 115(12): 2553-4.
44- Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. Cell Res 2009; 19(9): 1120-3.
45- Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. Blood 2008; 112(12): 4475-84.
46- Mazurier C, Douay L, Lapillonne H. Red blood cells from induced pluripotent stem cells: hurdles and developments. Curr Opin Hematol 2011; 18(4): 249-53.
47- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, *et al*. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature 2010; 467(7313): 285-90.
48- Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, *et al.* Reprogramming of T cells from human peripheral blood. Cell Stem Cell; 7(1): 15-9.
49- Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Cell Stem Cell; 7(1): 11-4.
50- Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, *et al*. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell; 7(1): 20-4.
51- Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, *et al.* Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 2011; 29(1): 73-8.
52- Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, *et al*. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. Nature 2010; 468(7323): 521-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; Stem Cell Suppl. 9(3): 258-272

Review Article

Application of stem cells for the treatment of hemoglobinopathies

Rahgozar S.[1], Entezar-e-Ghaem M.[1], Abedi M.[1], Montazeri F.[1]

[1]Faculty of Sciences,University of Isfahan, Isfahan, Iran

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

Hemoglobinopathies are heterogenic hereditary disorders in which mutations lead to abnormal production of hemoglobin chains, or change in the normal sequence of the hemoglobin amino acids. Thalassemia and sickle cell anemia (SCA) are the most prevalent hemoglobinopathies. Patients with the above mentioned disorders often require hypertransfusion regimens. However, continued blood transfusion may contribute to iron overload and consequent organ deterioration, in addition to viral infections. The aim of this review article is to evaluate recent treatment programs regarding these disorders.

Materials and Methods

This paper is evaluating the newest protocols applied for the treatment of thalassemia and SCA by reviewing 51 references using Ebsco, Elsevier, Pubmed and OVID databases.

Results

Blood transfusion and medical treatments may improve the lifestyle or increase the lifespan of patients with hemoglobinopathies. However, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is presented as the only curative therapy for thalassemia and SCA. On the other hand, HSCT may contribute to complications such as infertility and gonadal failure, especially in women, chronic graft-versus-host disease (GVHD), and potential secondary malignancies.

Conclusions

In spite of the limitations and complications attributed to HSCT, this method is proved to be the most effective way for treatment of hemoglobinopathies. Different cells and novel strategies used to modify transplantation are introduced in this article.

Key words: Hemoglobinopathies, Thalassemia, Anemia, Sickle Cell Disorders, Hematopoietic Stem Cells

Received: 7 Dec 2011
Accepted:13 Mar 2012

Correspondence: Rahgozar S., PhD of Immuno-Hematology. Assistant Professor of University of Isfahan, Hezarjerib Street.
Postal code: 81746-73441, Isfahan, Iran.Tel: (+98311) 7932365; Fax: (+98311)7932456
E-mail: *rahgozar@sci.ui.ac.ir*

www.SID.ir