

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 راه کارهای درمان تالاسمی و آنمی داسی شکل را به چالش کشیده است. مقالات مورد اشاره از پایگاه‌های اطلاعاتی اسکوپ، 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.

نتیجه‌گیری

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 تسهیل کننده در امر پیوند، در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است.

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲۳

۱- مؤلف مسئول: PhD ایمونوهماٹولوژی - استادیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - خیابان هزار جریب - کدپستی: ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی - دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - ایران

۳- کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی - دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - ایران

مقدمه

عملکرد اصلی اریتروسیت ها، نقل و انتقال گازها در خون است که برای انجام آن مجهز به پروتئین تخصصی هموگلوبین می باشند. خون فرد بالغ طبیعی دارای سه نوع هموگلوبین است؛ هموگلوبین A ($\alpha_2\beta_2$)، هموگلوبین F ($\alpha_2\gamma_2$) و هموگلوبین A2 ($\alpha_2\delta_2$)، که بیشترین میزان متعلق به هموگلوبین A با ۹۸٪-۹۶٪ از هموگلوبین موجود در خون است. در طی مراحل رویانی و جنینی هموگلوبین های 1 Grower، پر تلند، 2 Grower و هموگلوبین جنینی (HbF)، بخش غالب هموگلوبین سلول های اریتروسیت را تشکیل می دهند. جهش های ژن کدکننده گلوبین، شایع ترین ناهنجاری های تک ژنی در سرتاسر دنیا بوده و حدود ۷٪ جمعیت دنیا را تحت تاثیر قرار می دهند. ژن های زنجیره گلوبین دو دسته هستند؛ گروه اول یعنی ϵ ، γ ، δ و β روی کروموزوم ۱۱ و دسته دیگر یعنی α (زتا) و α روی کروموزوم ۱۶ کد می شوند. جهش در مناطق مختلف این ژن ها می تواند منجر به بیماری های متفاوتی گردد. به طور کلی ناهنجاری های مربوط به هموگلوبین به دو دسته تقسیم می شوند:

- تولید هموگلوبین غیرطبیعی که منجر به بیماری هایی هم چون کم خونی داسی شکل (Sickle Cell Anemia = SCA) می شود.

- کاهش میزان تولید هموگلوبین که مهم ترین 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 راه های درمانی این دو می پردازد.

تالاسمی:

انواع بیماری های تالاسمی، گروهی هتروژن از ناهنجاری های ژنتیکی هستند که در نتیجه کاهش میزان تولید زنجیره های آلفا یا بتای پروتئین هموگلوبین به وجود می آیند. به طور کلی بسته به نقص در هر یک از زنجیره های هموگلوبین، دو نوع تالاسمی α و β وجود دارد. میزان نسبت طبیعی تولید زنجیره های α/β ، ۱/۱

است که این نسبت در α -تالاسمی کاهش و در β -تالاسمی افزایش می یابد. ۴ نسخه از ژن α -گلوبین وجود دارد که بسته به تعداد ژن های حذف شده یا غیر فعال شده، شدت α -تالاسمی را طبقه بندی می کنند. حذف کامل هر ۴ نسخه ژنی باعث قطع تولید زنجیره α و مرگ جنین در داخل رحم (هیدروپس فتالیس) می گردد. حذف ۳ ژن زنجیره α باعث بروز α -تالاسمی متوسط همراه با کم خونی خفیف (که به آن بیماری H گفته می شود) خواهد شد. β -تالاسمی به دو صورت مینور (هتروزیگوت) و ماژور (هموزیگوت) وجود دارد. در این بیماری تعداد زنجیره های β -گلوبین کاهش یافته که باعث رسوب زنجیره های α اضافی در اریترو بلاست ها شده و در نتیجه منجر به تولید غیر مؤثر سلول های رده اریتروئید و همولیز آن ها می شود. از عوارض بالینی تالاسمی، کم خونی شدید است. هم چنین بزرگی طحال و کبد به دلیل تخریب بسیار زیاد اریتروسیت ها و همولیز آن ها خارج از مغز استخوان، از دیگر عوارضی است که خود موجب افزایش بار آهن در این اندام ها می شود (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 داسی شکل شایع ترین هموگلوبینوپاتی در جهان به شمار می رود. این بیماری در فرم هموزیگوت ناشی از جهش در رمز ششم ژن β -گلوبین است که باعث جابه جایی باز آلی آدنین با تیمین، واقع در موقعیت دوم آن می گردد. این جهش منجر به تبدیل رمز گلوتامیک اسید به والین شده که در نهایت این تغییر در هموگلوبین ساخته شده وارد می شود (۴، ۳). این بیماران دارای نوعی هموگلوبین غیر طبیعی بوده که در شرایط فیزیولوژیک ساخته شده و باعث تشکیل گلبول های قرمز سخت و غیرطبیعی می گردد. این نوع اختلال باعث همولیز و در شرایط هیپوکسی، انسداد مویرگ ها شده، نهایتاً منجر به کم خونی موضعی (Ischemia) و نکروز بافت ها می شود. از دیگر علائم بالینی این بیماری می توان به انسداد مکرر

بیماری و جلوگیری از پیشرفت آن می‌پردازند. هر چند این رویکردها توانایی ریشه‌کنی بیماری را ندارند اما امید به زندگی را در بیماران به طور چشمگیری افزایش داده‌اند.

بحث

درمان تالاسمی:

چنانچه قبلاً اشاره شد، تالاسمی ماژور یکی از بیماری‌های ارثی شایع در ایران است. مبتلایان به این بیماری نیازمند تزریق مکرر خون بوده که این درمان باعث بروز برخی از عوارض جانبی در این بیماران می‌شود. از جمله مهم‌ترین عوارض تزریق منظم خون، گرانباری آهن در بدن است که این عارضه نیز به نوبه خود منجر به آسیب اندام‌های حیاتی بیمار مانند قلب، کبد و ... می‌شود. از این رو استفاده از این روش درمانی در مبتلایان به تالاسمی ماژور، نیازمند تجویز داروهای حذف‌کننده آهن است. برخی از این داروها مانند دفروکسامین (Deferoxamine)، از طریق خوراکی غیر فعال شده و در نتیجه توسط تزریق داخل وریدی تجویز می‌شوند. خود دفروکسامین نیز ممکن است عوارضی در پی داشته باشد، به ویژه در کودکانی که فریتین سرم آن‌ها پایین است. برخی از حذف‌کننده‌های آهن مانند دفریپرون (Deferiprone) را می‌توان به صورت خوراکی نیز تجویز کرد. آهنی که توسط دفروکسامین و دفریپرون حذف شده است به طور عمده از طریق ادرار دفع می‌شود. جدیدترین حذف‌کننده خوراکی آهن، دیفرازیروکس است که موجب حذف آهن فقط از طریق مدفوع می‌گردد (۲). علاوه بر این، عدم تطابق آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی اهداکنندگان و گیرندگان خون در تزریق‌های مکرر، احتمال آلوایمونیزاسیون را در این بیماران افزایش می‌دهد. مطالعه‌های زیادی در زمینه عدم تطابق گروه‌بندی ABO و ناسازگاری‌های آنتی‌ژن‌های خونی هم از نوع توزیع پراکندگی و هم در راستای شناسایی آلوآنتی‌بادی‌ها، در این بیماران انجام شده است (۸-۱۰). استفاده از خون سازگار، گرچه مانع بروز آلوایمونیزاسیون می‌گردد، اما به دلیل لزوم تزریق خون به دفعات مکرر، امکان بروز

عروق (Recurrent vaso-occlusive)، سندرم حاد قفسه سینه (Acute chest syndrome)، نعوذ دایم (Priapism) و افزایش حساسیت به عفونت اشاره کرد. این علایم ممکن است حاد یا مزمن، موضعی یا سیستمیک و همراه یا بدون علایم بالینی باشد. برخی از عوارض این بیماری هم‌چون جراحات‌های عروقی و همولیز دایم به صورت مزمن عمل نموده و بدون هیچ‌گونه علایم بالینی، اندام‌های حیاتی بیمار همانند قلب، مغز، کلیه‌ها، شش‌ها و استخوان‌ها را درگیر می‌کند. این عوارض حتی ممکن است تا اوایل بزرگسالی نیز بروز نکنند. شدت علایم بالینی در این بیماری ناشی از عواملی مانند سن بیمار، شرایط محیطی، پیوستگی ژنتیکی آن با بیماری تالاسمی، مقادیر متفاوت HbF و نوع هاپلوتیپ بیماری (که وابسته به خوشه ژنی β -گلوبین است)، می‌باشد (۵، ۳). به طور کلی ۵ نوع هاپلوتیپ مشخص، وابسته به جهش سیکل سل وجود دارد که با توجه به شیوع هر کدام در یک منطقه جغرافیایی خاص، تحت عناوین Bantu، Benin یا CAR (Central African Republic)، Senegal، Cameroon و Saudi Arabia-India نام‌گذاری شده‌اند (۶، ۴). با توجه به نحوه پراکندگی ژن این بیماری، کشور ما ایران نیز در محدوده جغرافیایی این هموگلوبینوپاتی قرار دارد و گزارش‌های پراکنده‌ای در خصوص مشاهده مواردی از مبتلایان به این بیماری، خصوصاً در جنوب و نواحی مرکزی کشور، وجود دارد (۶، ۴). هاپلوتیپ سیکل سل برای اولین بار در ایران سال ۲۰۰۰ میلادی شناسایی شد (۳). نمونه‌های مورد بررسی، مربوط به نواحی مجاور اصفهان و از نوع Saudi Arabia-India می‌باشد. علایم بروز بیماری در این هاپلوتیپ به مراتب خفیف‌تر از سایر موارد سیکل سل است. اما از آن جا که ایران بر روی کمربند تالاسمی قرار گرفته، اعمال دقت لازم جهت شناسایی موارد سیکل - تالاسمی در تشخیص افتراقی تالاسمی و درمان مناسب آن، الزامی است (۷، ۳).

رویکردهای درمانی موجود در خصوص هموگلوبینوپاتی‌ها: شیوه‌های درمانی متعددی که امروزه برای درمان هموگلوبینوپاتی‌ها متداول هستند، تنها به کاهش عوارض

اوره سطح هموگلوبین F را افزایش می دهد و یا باعث حلالیت هموگلوبین S می شود، از جمله بوتیرات ها، دسیتابین (Decitabine) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیره. علاوه بر موارد ذکر شده، برخی از درمان های جدید نیز توسط دانشمندان در حال بررسی های بیشتر بوده که تا رسیدن به مراحل نهایی نیازمند کار و برنامه ریزی دقیق می باشد و از آن جمله می توان به استاتین ها (Statin)، آنتی کوآگولانت ها (Anticoagulant)، گلوتامین (Glutamine)، مهارکننده های pan-selectin و نیتریک اکسید اشاره داشت. این در حالی است که ژن درمانی نیز وارد فاز I آزمایشی خود شده است (۵).

پیوند سلول های بنیادی خونساز (HSC = Hematopoietic Stem Cell Transplantation):

علی رغم پیشرفت های کنونی، بیماران مبتلا به تالاسمی و کم خونی داسی شکل هم چنان متحمل رنج ناشی از مبارزه دایم با این اختلالات مزمن می باشند. این مساله می تواند تا پایان عمر بیمار ادامه یابد، زیرا هیچ یک از موارد درمانی اشاره شده نمی تواند موجب بهبودی قطعی و کامل بیمار گردد و تنها از عوارض آن می کاهد. هم چنین با وجود توسعه مراقبت های حمایتی در هموگلوبینوپاتی های 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 بررسی های صورت گرفته توسط دانشمندان، می توان پیوند سلول های بنیادی (HSC) را تنها راه درمانی مؤثر در هموگلوبینوپاتی ها دانست (۱۵-۱۲).

اولین بار در ۳۰ سال پیش توماس و همکارانش موفق به پیوند سلول های بنیادی خونساز در یک کودک ایتالیایی شدند. از آن پس صدها بیمار مبتلا به تالاسمی و کم خونی داسی شکل، از سلول های مغز استخوان اهداکننده خویشاوند با HLA سازگار، پیوندهای آلوگرافتی را دریافت کردند (۱۲). امروزه درمان هموگلوبینوپاتی ها از جمله تالاسمی و آنمی داسی شکل توسط HSC، پیشرفت های زیادی داشته و مریض های جدیدی

عفونت های ثانویه علی رغم غربالگری خون های اهدایی، همواره وجود دارد. از این رو، امروزه با توجه به سهولت تشخیص تالاسمی مینور در والدین، برنامه های پیشگیری از تالاسمی اهمیت زیادی یافته است. این برنامه ها مبتنی بر غربالگری پیش از ازدواج برای β -تالاسمی است. در این موارد، جهت انتخاب آن دسته از شاخص های گلبول های قرمز از قبیل MCH (Mean Corpuscular Volume) MCV و (Hemoglobin) (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 ارائه شده است که عبارتند از: (۱) تقویت برنامه های مشاوره و تنظیم خانواده در مراکز تالاسمی، (۲) نظارت مداوم بر آزمایشگاه های 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 هموگلوبینوپاتی های شایع» (۱۱، ۲). چنان که قبلاً ذکر شد درمان قطعی در تالاسمی، پیوند مغز استخوان می باشد که در قسمت های بعدی بیشتر به آن پرداخته می شود.

درمان کم خونی داسی شکل:

امروزه گام های 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 پیش بینی دوره بیماری و تعیین زمان و چگونگی درمان، هم چنان ادامه دارد. شناسایی هرچه زودتر بیماران می تواند از آسیب های شدید به اندام های حیاتی جلوگیری کند. در حال حاضر مهم ترین درمان هایی که می تواند از دردهای مداوم و آسیب به اندام های بیمار جلوگیری کند و یا آن ها را کاهش دهد، شامل هیدروکسی اوره (Hydroxyurea) و در برخی مواقع تزریق خون می باشد. هیدروکسی اوره می تواند سطح هموگلوبین F را در بیماران افزایش دهد، البته در هنگام حاملگی نمی بایست از آن استفاده گردد. درمان های دیگری نیز وجود دارد که همانند هیدروکسی

جدول ۱: مراحل انجام پیوند مغز استخوان

ردیف	مراحل	توضیح
۱	ارزیابی‌های قبل از پیوند (۱۳، ۱۷، ۱۸)	- 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 (۱۳، ۱۵، ۱۹)	- 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)، (۱۳، ۱۵)	- تجویز داروهایی چون سیکلوسپورین A، متوترکسات و متیل پردنیزولون با دوزها و دوره‌های متنوع
۵	مراقبت‌های حمایتی (۱۳)	- سرکوب‌گرهای ایمنی در صورت 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 آلوزن 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- بیماران که فاقد هر یک از این فاکتورهای فوق هستند، ۲- بیماران 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

کم خونی داسی‌شکل و AML صورت گرفت و نتیجه آن درمان کم خونی داسی‌شکل 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 داسی‌شکل، سن کمتر از ۱۶ سال، داشتن اهداکننده سازگار از نظر HLA و داشتن حداقل یکی از نشانه‌های زیر در این رابطه الزامی است. این نشانه‌ها عبارتند از: سکتة 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 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 (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 داسی‌شکل ۶٪ تا ۱۰٪ است (۲۶، ۲۷). هم‌چنین 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:

همان‌طور 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). همان‌طور 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

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 (۳۳، ۳۴).

در پیوند سلول‌های هاپلوایدنیکال 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 (PTLPD = Post-transplant 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.

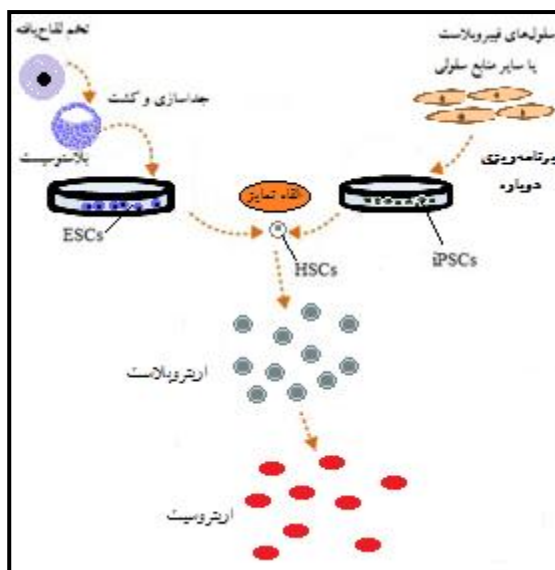
ژن درمانی:

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 وکتورهای 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 پروتوانکوزن‌ها 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 ژن درمانی دارد. از جمله دیگر وکتورهای مورد مطالعه، وکتورهای لنتی ویروسی هستند. وکتورهای لنتی ویروسی یک سیستم مؤثر در انتقال ژن و بیان بالای ژن‌های گلوبین می‌باشند. در اواسط دهه ۱۹۹۰، تکامل وکتورهای لنتی ویروسی 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 لنتی ویروسی 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

بافت هایی که سازگاری ایمونولوژیک دارند، افزوده است (۴۲، ۴۱). تا به امروز گروه های زیادی توانسته اند سلول های 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 سلول ها از نظر ژنتیکی، اپی ژنتیکی و معیارهای تکاملی، بسیار به hESC ها شبیه هستند. به عبارتی قادر به خود نوزایی نامحدود به صورت *in vitro* و تمایز به هر سه لایه جنینی می باشند (۴۰، ۳۹). iPSC ها منبع بالقوه نامحدودی از سلول های بنیادی را برای تولید پیش سازهای سلول های خونی از جمله اریتروئیدها، فراهم می آورند و می توان آن ها را به شیوه ای مشابه hESC ها به سمت تمایز خونسازی سوق داد (شکل ۱) (۴۳، ۳۹).



شکل ۱: استفاده از سلول های بنیادی جنینی (ESC) و سلول های بنیادی پرتوان القا شده (iPSC) در تولید گلبول های قرمز: سلول های بنیادی خونساز را می توان از طریق سایر سلول های بنیادی جنینی و یا فرآیند برنامه ریزی سلول های سوماتیک به دست آورد و به گلبول های قرمز تمایز داد. HSCs: سلول های بنیادی خونساز

یکی از شیوه های رایج، تولید iPSC های خاص بیمار (patient-specific iPSC) و سپس اصلاح ژنتیکی این سلول ها به وسیله هدف گیری ژنی است. به عنوان مثال در

را تضمین کند. مطالعه ها نشان می دهد که سطح بیان پروتئین گلوبین متاثر از مجموعه ای 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 کاوازاوا و همکارانش توانستند یک بیمار بالغ مبتلا به تالاسمی ماژور وابسته به تزریق خون را با استفاده از انتقال لنتی ویروسی ژن β -گلوبین، پس از ۳۳ ماه، از تزریق خون بی نیاز کنند (۳۷).

درمان ایده آل کم خونی داسی شکل توسط ژن درمانی، جایگزینی یک کپی از ژن طبیعی (β^A) به جای ژن گلوبین داسی شکل (β^S) است. اخیراً نمونه هایی از درمان کم خونی داسی شکل توسط ژن درمانی در مدل های حیوانی انجام گرفته که می توان در این خصوص به ایجاد موش های ترانس ژن LCR- β^S اشاره نمود (۳۸). در سلول های بنیادی جنینی این موش ها، یک آلل β^S معیوب با آلل طبیعی β^A جایگزین و سپس سلول ها در بلاستوسیت قرار داده شدند. سلول های بنیادی خونساز مشتق از این سلول ها، در شرایط *in vivo* گلبول های قرمز تصحیح شده تولید کرده و در نتیجه آن کم خونی درمان گردید (۳۸).

در انسان هر چند، سلول های بنیادی جنینی (hESCs) علاوه بر آن که منبع نامحدودی برای تولید سلول های تمایز یافته است و گروه های متعددی پتانسیل خونسازی آن ها را با استفاده از پروتوکل های پیچیده بررسی کرده اند، اما جنین محدودیت هایی در رابطه با ایجاد رده های سلول های بنیادی پرتوان با طیف وسیعی از تطابق برای تزریق دارد و درمان بر پایه hESC ها به دلیل رد پیوند مربوط به عدم تطابق ایمونولوژیکی بین دهنده و بیمار، از موفقیت بالایی برخوردار نمی باشد (۴۰، ۳۹).

سلول های بنیادی پرتوان القا شده (iPSCs):

فناوری برنامه ریزی دوباره (Reprogramming) سلول های سوماتیک برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القا شده (Induced Pluripotent Stem Cells = iPSCs)، شیوه ای جدید برای درمان β -تالاسمی و بیماری کم خونی داسی شکل فراهم کرده و بعد جدیدی به تولید

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) غنی‌شده با BMP-4 (Media Bone Morphogenic Protein-4) نو ترکیب انسانی، VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) نو ترکیب انسانی (hrVEGF)، TPO (Thrombopoietin)، SCF (Stem Cell Factor)، IGF-II و IL-3 (انسانی و 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 ریسپتور تیروزین‌کینازی) انسانی، ایتروکین ۶ انسانی و اریتروپوئیتین 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 بر روی سلول‌های MEF-feeder تیمار شده با میتوماکسین 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

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 از ESC 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 آلویمونیزاسیون 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 Kell ، Duffy ، Kidd را فراهم می‌کند (۳۹).

موضوع اساسی، اثبات توانایی iPSC ها برای تمایز به سلول های کاملاً بالغ و عملکردی است که در مورد تولید اریتروسیت گروه های اندکی به موفقیت رسیده اند. اولین بار لایون و همکارانش در سال ۲۰۱۰ میلادی توانستند

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

پرتوانی در *in vitro* با تشکیل جسم جنینی و پرتوانی در *in vivo* با تشکیل تراوما 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).

تاکون 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، IL-7، 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 شاهدهی بر این ادعاست که حتی سلول‌های کاملاً تمایز یافته انسان نیز مستعد برنامه‌ریزی

تمايز کامل iPSCهای انسانی را به سلول‌های اريتروئيد با توانايي بلوغ به RBC های بدون هسته و حاوی هموگلوبين جنيني تترامر و عملکردی نشان دهند. آنها از لتي ویروس های حاوی ژن های فاکتورهای Oct-4، Sox2، Nanog و Lin28 برای آلوده کردن فيرو بلاست ها و توليد iPSC استفاده کردند. در مرحله بعد، اين سلول ها در کشت مایع حاوی پلاسمای انسان و SCF، TPO، ليگان د FLT-3 (FL)، hrVEGF، ايترلوکين ۳ و ۶ و اريتروپويتين قرار گرفتند تا جسم جنيني توليد شود. سپس سلول های منفرد جسم جنيني در سه دوره در کشت حاوی پلاسم، انسولين، هپارين، EPO و SCF قرار گرفتند. بين روزهای ۹ و ۲۰ پس از کشت سلول های جسم جنيني، اين سلول ها مارکرهای مورد بررسی خون سازی (CD45 و CD34) و اريتروئيد (CD71: گيرنده ترانسفیرين) را به طور قابل ملاحظه ای بيان کردند. بلوغ اريتروست بر اساس مورفولوژی به وسيله نوعی رنگ آمیزی (گيمسا) و براساس بيان آنتی ژن های غشای اريتروئيد به وسيله فلوسيتومتري اثبات شد. به طوری که در روز بيست و پنجم، ۱۰-۴ درصد از سلول های محيط کشت، RBC های بدون هسته و ۹۶-۹۰ درصد، اريتروست هایی با رنگ پذيري طبيعي بودند و هموگلوبين غالب، هموگلوبين ۷ بود (۳۹). بيان هموگلوبين های ۷ و جنيني و رويانی، نشان دهنده برنامه ريزی دوباره کامل در لوکوس گلوبين است (۴۳). به اين ترتيب پديده توليد RBC ها از iPSC اثبات شده است اما روش های به کار رفته برای هدايت به سمت کاربرد باليني در تزريق خون، بايستی بهينه شوند (۴۶).

به طور کلی شیوه‌هایی که در این پژوهش‌ها برای اثبات دستیابی به سلول‌های iPS، اثبات انشقاق iPS 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 آنتی ژن های سطحی ESC انسانی شامل Nanog ، SSEA4 ، Tra-1-60 و Tra-1-81 و نیز آلفالین فسفاتاز به کمک ایمونوهیستوشیمی ، Real-Time PCR و فلوئیدومتری صورت می گیرد (۴۴، ۴۱، ۳۹).

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 پاپاترو و همکارانش، ۵ اصل را به عنوان اصول «لنگرگاه ایمن» (Safe harbor) تعیین کرده‌اند و بر اساس آن بیان کردند در صورتی که 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 اختلالی در بیان ژن‌های مجاور را نشان نداد. ۱۷/۳ درصد 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 (۴۶، ۵۱). 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 نو ترکیب 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 مارکر سطحی خونسازی (CD45) را القا کند. برخلاف iPSC ها 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،

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 مرمون 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 آلونژنیک 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:

- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit J. Acute leukemias. In: Essential Hematology. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006. p. 157-168.
- 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]
- Rahgozar S, Pourfathollah 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.
- 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]
- 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.
- Rahgozar S, Pourfathollah AA, Moafi 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]
- 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.
- 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]
- 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]
- 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]
- 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.
- Boncimino A, Bertaina A, Locatelli F. Cord blood transplantation in patients with hemoglobinopathies.

- 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- Irvani 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, Irvani 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- Vermynen 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- Kanathezath 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, Lisowski 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

- 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.

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

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

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