اهمیت بررسی های کروموزومی در سلول درمانی و کاربردهای آن

فاطمه منصوری[۱و۲*]، علی گلچین[۳]

[۱] گروه ژنتیک و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۳] گروه علوم سلولی کاربردی و بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۳/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۶

چکیده

در حال حاضر کاربردهای سلول درمانی یک روش درمانی موثر در برخی از انواع بیماریهاست. استفاده از سلول های بنیادی و سلولهای سوماتیک با توجه به تشابه ژنتیکی کامل با سلول های فرد سبب توسعه روش های سلول درمانی شده است. در سالیان اخیر پیشرفت های چشمگیری در روش های کشت، جدا سازی و نگهداری طولانی مدت سلول ها فراهم شده است. اما هنوز مشکلات و نگرانی‌هایی در ارتباط با استفاده بالینی از آنها وجود دارد که برطرف کردن آنها مستلزم اجرای مطالعات دقیق بیشتری در این زمینه است. یکی از این مشکلات، تغییرات ژنومی در سلولهاست که می توانند بر پتانسیل تمایز سلول های بنیادی تأثیر گذارند. ناهنجاری های ژنتیکی در طول کشت های متوالی در حین مراحل تکثیر و تمایز بوجود می آیند، می توانند بر رفتار سلول ها و متعاقب آن بر نتایج آزمایشگاهی تاثیر بگذارند. هدف از مطالعه حاضر اهمیت بررسیهای کروموزومی در سلول درمانی برای تجزیه و تحلیل کروموزوم ها و خلاصه ای از کاربردها و محدودیت این روشها در علوم پزشکی می باشد.

نتیجه گیری: استفاده از تکنیک های مختلف بررسیهای کروموزومی‌می توانند در ارزیابی نهایی و اخذ تاییدیه صحت محصولات سلولی در درمان مورد توجه قرار گیرند. و بررسی های دوره ای و منظم از پایداری ژنومی در سلولها قبل از کاربردهای کلینیکی آنها ضروری است.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی، کروموزوم، سلول درمانی، ناهنجاری های ژنتیکی

نویسنده مسئول:
گروه ژنتیک و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۰۹۱۲۳۷۰۴۱۵۳
Email: mansouri1600@hotmail.com

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

مقدمه

در حال حاضر کاربردهای سلول درمانی در بسیاری از بیماری‌ها دارای اهمیت است و یک روش درمانی موثر در برخی از بیماریهاست [۱]. استفاده از سلول های بنیادی و سلولهای سوماتیک سالم امیدهای زیادی در هر دو زمینه سلول درمانی و پزشکی شخصی فراهم آورده است[۲]. از طرفی بانک و ذخیره سازی سلولهای بنیادی بندناف جنین امکان اهدای آن را به خویشاوندان نزدیک فراهم نموده و فرصت بیشتری در اهدای سلول بوجود آورده است. سلول های بنیادی دارای پتانسیل چند گانه ای هستند که از یک طرف به عنوان سلول های حامی در ترشح سیتوکین ها و نقش تعدیلی در سیستم ایمنی و از طرف دیگر در تمایز سلول های بنیادی به سلول های تمایز یافته در بافت هدف در مهندسی بافت و پزشکی باز ساختی حائز اهمیت هستند [۳،۴]. امروزه در درمان بیماریهای قلبی- عروقی، پارکینسون، دیابت، سرطانها و حتی اخیرا در درمان مبتلایان به کرونا ویروس شایع در چندین کشور مورد استفاده قرار گرفته اند [۱]. از این رو نگهداری طولانی مدت از سلولها و ذخیره آنها در بانک های سلولی مجهز به عنوان یک منبع اساسی و در دسترس، همراه با گواهی های معتبر شناسایی اختصاصی سلول در هر کشور مورد توجه محققین است. فرایند ذخیره سازی، احیا و کشت های متوالی سلول در ارتباط با استفاده بالینی، مشکلات و نگرانی‌هایی را بوجود آورده که برطرف کردن آنها مستلزم اجرای مطالعه‌های دقیق بیشتری در این زمینه است. یکی از این مشکلات، انواع تغییرات ژنومی در سلولهاست که می توانند بر پتانسیل تمایز سلول های بنیادی تأثیر گذارند [۵،۶]. هر گونه استفاده از سلولها در پزشکی به علت حساسیت موضوع نیازمند تاییدیه سلامت محصول از جهت محتوای ژنومی می باشد [۳]. با اینحال ارزیابی مزایا و معایب استفاده از انواع سلول های بنیادی وسلولهای سوماتیک باید در مرحله ای قبل از کاربرد بالینی انجام شود و کنترل ایمنی سلول درمانی، نه تنها مشروط بر توصیف بررسیهای کروموزومی سلول، بلکه نیازمند برآورد پایداری ژنتیکی و کلون‌زایی سلول است و استفاده از تکنیک های مختلف می توانند جهت این ارزیابی و اخذ تاییدیه محصول سلولی مورد توجه قرار گیرند [۷]. Wang و همکاران کاهش طول تلومر و فعالیت آنزیم تلومراز را در سلولهای بنیادی جنینی درچند کلون در طی پاساژهای متوالی و همچنین تریزومی کروموزوم شماره ۱۰ را در یک کلون در پاساژهای بالا مشاهده کردند [۸]. هدف از مطالعه حاضر اهمیت بررسی های کروموزومی در سلول درمانی برای تجزیه و تحلیل کروموزوم ها و خلاصه ای از کاربردها و محدودیت این روشها در علوم پزشکی می باشد که با پیشرفت علم در زمینه سلول درمانی و استفاده از رهیافت های آن در تشخیص و درمان بیماری ها اهمیت شایانی پیدا کرده است.

لزوم بررسی های کروموزومی در سلول درمانی

ناهنجاری های ژنتیکی که در طول کشت های متوالی سلول در حین مراحل تکثیر و تمایز بوجود می آیند، می توانند بر رفتار سلول ها و متعاقب آن بر نتایج آزمایشگاهی تاثیر بگذارند [۹،۱۰]. برخی از انواع سلولهای با تغییرات ژنتیکی رایج، علائم سرطانی شدن همچون کاهش آپوپتوز، عدم وابستگی به فاکتور رشد و راندمان بالای کلونیزاسیون را نشان می دهند[۱۱]. نتایج مطالعه ای دیگر نشان دهنده حفظ پایداری کروموزومی سلولهای بنیادی مزانشیمی تا پاساژ دوم این سلول های طی فرایند کشت می باشد. از کشت دوم، به مرور علائم ناپایداری کروموزومی مانند شکاف‌های کروماتیدی و کروموزومی و تتراپلوئیدی مشاهده می‌شود و کشت طولانی مدت این سلول ها می تواند یک مرحله میانی برای تومورزایی باشد [۱۲]. روشهای مختلفی برای ارزیابی تغییرات ژنتیکی در سلولهای بنیادی مورد توجه بوده است. در این زمینه محققان بیشتر تمایل دارند در مطالعات سلولهای بنیادی و اطمینان از صحت آنها در زمینه درمانی و پزشکی باز ساختی از بررسی های کروموزومی استفاده نمایند (شکل۱). تغییرات ژنتیکی در سلولهای بنیادی جنینی انسان طی شرایط کشت سلولی متوالی می‌تواند نتایج ارزیابی ها را مخدوش کرده و به طور بالقوه نتیجه کاربردهای بالینی را با خطر مواجه سازد [۱۳]. Baker و همکاران تعدادی از موزائیسم های کروموزومی را در سلولهای بنیادی انسانی مشاهده کردند [۱۱]. از جمله تغییرات، اختلالات کروموزومی است که در سلول های بنیادی پرتوان انسانی و با استفاده از روش های

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

مختلف، تریزومی در کروموزوم های شماره ۱، ۱۲، ۱۷ و ۲۰ گزارش شده است [۱۱، ۱۴].

ایشان ترکیبی از تکنیک های مختلف شامل qPCR ,banding fluorescence in situ hybridization, و digital droplet PCR را برای بررسی موزائیسم های سلولی استفاده کردند. از این رو بهتر است این رده های سلولی از جهت ناهنجاری کروموزومی به طور مرتب مورد بررسی قرار گیرند. اگرچه روش های دیگری نیز برای ارزیابی ژنوتیپ های سلول های بنیادی جنینی مورد استفاده قرار گرفته است تا کاربردهای ایمن این سلول ها در پزشکی بازساختی را تضمین نماید[۸، ۱۵]. روش رنگ آمیزی کروموزومی بصورت مرسوم جهت این ارزیابی استفاده می شود[۶]. طی یک مطالعه بر روی سلول های بنیادی جنینی مشاهده شد که رنگ آمیزی DAPI (رنگ آمیزی رایج در مطالعات سلول های بنیادی) تقریبا با الگوی باند G-band قرابت دارد و باند های C و G با شدت بیشتری توسط DAPI نسبت به گروه های R-banding رنگ آمیزی می شوند [۱۶]. هتروکروماتین سازنده در اطراف سانترومرهای کروموزوم های آکروسنتریک با DAPI بسیار لکه دار دیده‌می شوند. با اینحال از تکنیک بندینگ کروموزومی از جنبه های مختلف برای ارزیابی سلول های بنیادی جنینی استفاده می شود [۱۶].

ناپایداری های کروموزومی شایع در سلولهای بنیادی

چندین مطالعه تعدادی از ناهنجاری های کروموزومی را در بین نمونه های اهدایی و طی کشت سلولی گزارش کرده اند [۵، ۱۷]. میزان کمی انحراف کروموزومی غیر کلونال در سلول های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده در کارآزمایی های بالینی مشاهده شده ولی گزارشی مبنی بر بدخیمی آنها گزارش نشده است [۱۶]. با این حال موضوع پایداری کروموزومی در سلول های بنیادی مزانشیمی قابل بحث هست و به این منظور طی چندین مطالعه ناهنجاری های کروموزومی کلونال در سلول های بنیادی مزانشیمی با استفاده از G_banding مورد بررسی قرار گرفته است [۱۲، ۱۸]. طی مطالعه ای که با استفاده از روش G-banding و کاریوتایپینگ درجا انجام شد، در کشت سلول پس از پنج پاساژ مکرر تغییرات کروموزومی با هیچ یک از دو روش مذکور مشاهده نشد [۱۶، ۱۹]. هرچند که ناهنجاری های کروموزومی در سلول های بنیادی مزانشیمی در پاساژهای اولیه نیز وجود دارد و می تواند به صورت کلونی تکثیر یابد و اغلب ناپایداری کروموزومی در این سلول ها را گزارش کرده اند [۱۸]. برای مثال در مطالعه ای که اخیرا گزارش شده است سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از لثه طی ارزیابی G-banding تا پاساژ ۱۲ فاقد هرگونه ناهنجاری کروموزومی بوده است ولی به مرور تتراپلوئیدی خصوصا در کروموزوم شماره ۸ مشاهده شده است[۱۶]. Chen و همکاران تریزومی کروموزوم شماره دو را در مایع آمنیوسنتز با کمک روش Fluorescence in situ hybridization (FISH) گزارش کردند [۲۰]. با اینحال ارزیابی مزایا و معایب استفاده از سلول های بنیادی باید در مرحله ای قبل از کاربرد بالینی انجام شود و کنترل ایمنی سلول درمانی با استفاده از تکنیکهای مختلف می توانند جهت این ارزیابی و اخذ تاییدیه محصول سلولی مورد توجه قرار گیرند. این شاخه از علم که در تعامل با سلول ها و با اتکا برتکنیک های نوین کروموزومی پیش‌می رود با شناسایی جهش های جابه جایی، معکوس شدگی، اضافه شدگی و حذف شدگی در ساختار محتوای ژنتیکی سلول های بدن و همچنین ناهنجاری های تعدادی کروموزوم ها (انیوپلوییدی و یوپلوییدی) در تشخیص بیماری هایی همچون سندرم داون، سندرم ادوارد (تریزومی ۱۸)، سندرم پاتو (تریزومی۱۳) و سندرم های اختلالات کروموزوم های جنسی مانند سندرم های کلاین فلتر و ژاکوب نقش دارند[۲۱].

روشهای بررسی و آماده سازی کروموزوم ها

کروموزوم ها حاوی اطلاعات ژنتیکی مهمی هستند که طی فشرده شدن کروماتین ها در تقسیم میتوز قابل رویت می شوند و بررسی آنها اطلاعات مفیدی در خصوص ساختار آنها و اختلالات احتمالی مربوطه را ارائه می دهد. به تصویر کشیدن کروموزوم های سلول های سوماتیک انسانی نیازمند توقف تقسیم سلول ها در میتوز است. بعضی از سلول ها بصورت اتفاقی ممکن است در مرحله متافاز یا آنافاز در زمان آماده کردن سلول ها برای مطالعه در زیر میکروسکوپ تصویر برداری شوند. با این حال تعداد زیادی از سلول های در مرحله متافاز را می توان از طریق تحریک سلول ها

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

طی کشت سلولی بدست آورد. اضافه کردن مواد ویژه مانند کلسمید به کشت های سلولی در مرحله رشد فعال برای دام انداختن و رویت سلولها در مرحله متافاز می تواند به این امر کمک کند. خیلی از انواع سلولها بطور همزمان تقسیم را شروع می کنند. اما در بعضی از موارد مانند لنفوسیت ها نیاز به تحریک کردن فعالیت میتوزی از طریق افزودن میتوژن ها در هنگام کشت سلولی دارند. موارد متنوعی از میتوژن ها برای استفاده در کشت لنفوسیت وجود دارند و تعداد سلول های یافت شده در مراحل متافاز با افزایش طول مدت قرار گرفتن میتوژن های ویژه افزایش خواهند یافت [۲۱،۲۲]. شایعترین میتوژن ها عبارتند از ماده فیتوهموگلوتینین (Phytohaemagglutinin=PHA) (گرفته شده از لوبیای قرمز) که برای تحریک لنفوسیت های نوع T و ماده پاکوید (Pokeweed) که برای تحریک لنفوسیت های نوع B استفاده می شوند. با این فرآیند همزمان سلول ها در مرحله میتوز وارد می شود. این امر از طریق افزودن مواد شیمیایی که رسیدن سلول به مرحله فاز S را به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت متوقف می کند میسر می گردد [۲۱].

افزودن تایمیدین اضافی یا آنتی متابولیتهای DNA amethopterin، برومو داکسی یوریدین (Bromodeoxyuridine=Brdu) و فلوئورو اکسی یوریدین (fluorodeoxyuridine) برای همزمان کردن کشت سلولی موثر هستند. روش برداشت شامل سانتریفوژ کردن سلولها تحت تاثیر محلول کم نمک و فیکس کردن و گذاشتن سلولها بر روی اسلایدهای شیشه ای است. هر یک از این فرآیندها در مرحله برداشت احتمالا بر گستردگی کروموزوم بر روی اسلاید تاثیر می گذارند. زمان سپری شده در تهیه کردن گستردگی کروموزوم و تهیه اسلایدهای مطلوب می تواند به مرحله تجزیه و تحلیل مطالعه کمک کند. تهیه گسترده های قابل بررسی کروموزومی و متفرق کردن کروموزوم ها بر روی اسلاید میکروسکوپ بسیار حائز اهمیت می باشد. بیشترین میزان پخش شدن تحت تاثیر چندین متغیر در زمان برداشت سلولی است و گسترشی ایده آل است که همه ٤٦ کروموزوم جدا شده متافازی در زیر میکروسکوپ در یک فیلدی بدون همپوشانی کروموزومی قابل رویت باشند. استفاده از محلول‌های نمکی و استفاده از KCl رقیق شده یا محلول سدیم سیترات به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه بطور معمول به گسترش خوب کروموزومی منجر می شود. بکارگیری ناکافی محلول های هیپوتونیک به گستردگی نامطلوب کروموزومی منجر می شود و استفاده بیش از حد محلول های هیپوتونیک منجر به از دست رفتن کروموزوم ها و غیر قابل رویت شدن آنها می شود. محلول کارنوی (Carnoy's solution) که مخلوطی از اتانول و اسید استیک گلاسیال است به عنوان تثبیت کننده سلول ها اضافه می شود[۲۳]. تقریبا تمام روش های بررسی کروموزوم ها بر مبنای هاروست کروموزوم ها در میتوز است. این روش سبب مهار توبولین ها با استفاده از کلشیسین (Colchicines) یا کلسمید (Colcemid) که سبب دپلایریزاسیون رشته های توبولین می شود انجام می پذیرد. برخی از انواع سلولها، به ویژه سلول های موش، در نهایت از بلوک کلسمید فرار و وارد چرخه سلولی می شوند. انکوباسیون سلول ها در مدت طولانی با کلسمید سبب می شود که باندهای ضعیف تری مشاهده شود. کروموزوم بندینگ بر مبنای رنگ آمیزی کروموزوم با یک رنگ و یا بررسی یک عملکرد ویژه در کروموزومهاست. طیف وسیعی از رنگها جهت مشاهده کروموزومها در زیر میکروسکوپ استفاده می شود. رنگ های کلاسیک مانند aceto-orcein, acetocarmine, gentianviolet و هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی کروموزوم ها در زیر میکروسکوپ نوری به کارمی روند. مهمترین متدها برای رنگ آمیزی کروموزومها در آزمایشگاه ها امروزه استفاده از C–banding (Centromere)، G-banding (Giemsa)، R-banding (Reverse) و Q-banding (Quinacrine) است.

پس از معرفی Q باند توسط Casperson و همکارانش در سال ۱۹٦۸، Pardueand Gall بصورت ناگهانی متوجه رنگ آمیزی افتراقی هتروکروماتین در مطالعات اولیه خود بر روی هیبریداسیون درجا شدند که مستقیماً منجر به معرفی C–banding گردید و در سال ۱۹۷۱ نیز G-banding و R-banding توسط چندین نویسنده کشف و گزارش شد [۱۹،۲٤]. مناطقی که شدیدا رنگ آمیزی شده اند به نام باند مثبت و مناطقی که رنگ آمیزی ضعیف داشته اند به نام باند های منفی نام گذاری می شوند. G باند مثبت به نام G-band و به همین ترتیب برای R باند مثبت به نام R-band، مناطق C باند مثبت به نام C-band و مناطقی که حاوی مناطق سازنده

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

هتروکروماتین است Q-band در نظر گرفته می شود. باندهای حاصل مبتنی بر عملکرد حاصل از همانندسازی است که NDA آنها در زمان های مختلف از مرحله S چرخه سلولی در حال همانند سازی است. به طور کلی می توان گفت AND ها در R-band زودتر از G-band همانند سازی می کند که متعلق به مناطق فشرده تر شده کروموزوم میتوزی می باشد [۲۵،۲۲].

شناسایی ناهنجاری های کروموزومی

مرسوم ترین روش بر مبنای رنگ آمیزی کروموزوم با یک رنگ و بررسی عملکرد کروموزومهاست. رنگ آمیزی در انواع سلول‌های تمایز یافته، سلولهای بنیادی و سلول های حاصل از مایع اطراف جنین قابل انجام است[۱۳]. رنگ آمیزی در سال ۱۹٦۸روی کروموزوم گیاه با استفاده از quinacrine mustard و در سال ۱۹۷۱ با استفاده از quinacrine (Q-banding) برای همه کروموزوم های انسان انجام شد. همچنین در مطالعات کاربردی سلولی همچون سلول درمانی و سلول های بنیادی مورد استفاده قرارمی گیرد. در ابتدا با این روش تمام ۲٤ کروموزوم انسان برای مطالعات کلینیکی به منظور بررسی کامل ناهنجاری های ساختاری و تعدادی کروموزومی قابل بررسی بودند اما در مناطق غنی از GC وضوح کافی وجود نداشت. Q-banding که شامل رنگ آمیزی با quinacrine است و به طور خاص به بازهای خاص واکنش نشان می دهد. این روش هرچند روش ساده ای بود اما برای رویت باندهای کروموزومی فلورسنت احتیاج به میکروسکوپ فلورسنت است که فلورسنت در مناطق غنی از AT روشن تر می باشد [۲۶،۲۲]. علاوه بر quinacrine، رنگ‌های فلوروکروم دیگری برای نواحی غنی از AT شامل 33258 hoechst، DIPI (diimidazolionphenylindole)، (phenylindole-4',6'-diamidino-2 DAPI) و daunomycin استفاده می شود که استفاده از آنها به طور کلی به نام Q- banding نام دارد. نورفلورسانس Hoechst و DAPI در گوانین خاموش نمی شود و بنابراین باندهای تولید شده توسط آنها نسبت به باندهای تولید شده توسط Quinacrien مبهم نیست. با این حال، فلورسانس daunomycin تا حد زیادی در DNA با محتوای GC بیش از ۳۲٪ کاهش‌می یابد. رنگ آمیزی DAPI دارای این مزیت است که نسبت به محو شدن بسیار مقاوم است و طول موج تحریک و انتشار طیف آن سازگار با مولکول های ریپورتر و فیلترهای متداول استفاده شده در روش FISH است [۲۷،۱۵]. استفاده از رنگ های دیگر متعاقب کوناکرین مانند distamycin A ، actinomycin D و یا تغییر pH میتواند به وضوح باندها کمک نماید. فلوروکروم های دیگری با اولویت برای DNA غنی از GC شامل کروموماپسین و ۷-آمینو اکتینومایسینD وجود دارد که الگویی مشابه R-band را نشان‌می دهند. پس از کوناکرین استفاده از رنگ آمیزی گیمسا متداول شده است که قبل از ریختن رنگ گیمسا از تریپسین استفاده می شود و دیگر رنگها همچون Wright و Leishman هم می توانند به جای گیمسا استفاده گردند که استفاده از آنها به طور کلی به نام G–banding نام دارد.

باندهایی که در Q-banding تیره هستند در G-banding روشن می باشند و باندهایی که در Q-banding روشن هستند در G–banding تیره می باشند. روش رنگ آمیزی دیگر که الگوی باندهای ایجاد شده آن کاملا متفاوت از دو روش ذکر شده قبل است به نام Reverse (R-banding) می باشد که از chromomycin A3, olivomycin و mithramycin استفاده میشود. همچنین استفاده از گرمای بالا و گیمسا و یا acridine orange می تواند الگوی R-banding ایجاد نمایدکه در این روش نواحی GC rich و نواحی کروماتینی فعال ژنی و نوآرایی های ساختاری کوچک در قسمت هایی از ژنوم که منجر به ناهنجاریهای فنوتیپی میگردد به خوبی مشخص میشوند.

برای نواحی تکراری و غیر کد کننده هتروکروماتین از روش C–banding استفاده می شود که در مقابل حرارت و مواد شیمیایی نواحی هتروکروماتینی مقاوم هستند و این نواحی تیره می شوند و سایر نقاط روشن باقی می مانند. در این رنگ آمیزی از محلول های اسیدی و سپس بازی و رنگ گیمسا استفاده می شود. بازوهای کوتاه و ستلایت های کروموزوم های اکروسانتریک، پری سانتریک، هتروکروماتین ها و بازوی بلند کروموزومY همه دارای ناحیه - C–band مثبت هستند که در افراد مختلف سایز متفاوت داشته و فاقد فعالیت ژنی هستند[۲۰]. روش دیگری که برای بررسی نواحی تلومری و پری سانترومریک کروموزوم ۹ با استفاده از G11-

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

banding و بازوی کوتاه کروموزوم ۱۵ با استفاده از distamycin و یا DAPI banding و مناطق سازماندهی فعال هسته ای (active nucleolar organizing regions=NOR) با استفاده از Silver staining انجام میشود، روش T-banding است که نواحی غیرعادی ژنومی را در سیتوژنتیک مشخص مینماید.

استفاده از روشهای پیشرفته تر

علاوه بر روش های استاندارد بندینگ، تکنیک دیگری که مورد توجه قرار گرفته است و آنالیز دقیقتر و بیشتر از باندهای کروموزوم را مورد توجه قرارمی دهد تکنیک High resolution است که به چند طریق انجام می شود. در ابتدا سلولها در late prophase یا در early metaphase که حداقل تراکم و حداکثر رزولوشن را دارند فیکس و ثابت می شوند. همزمان سازی سلولها و در مدت زمان کوتاه در معرض کلسمید قرار گرفتن آنها سبب رزولوشن بیشتر و ریز باندهای بیشتری مشخص خواهد شد. همچنین اضافه کردن موادی که متصل به مولکول NAD می شوند و از متراکم شدن جلوگیری می کند مانند aciridine orange , Ethidium bromide و actinomycin D به این روش کمک می کند. روش دیگر استفاده از آنالوگ بازهای DNA مانند Brdu است هر دو الگوی G and R مشخص‌می گردند و این تکنیک برای بررسی دقیق بازارایی های کروموزومی بسیار حساس بوده و در بسیاری از بررسیهای کلینیکی این روش مورد استفاده قرار می گیرد[۲۳،۲۸]. کاریوتایپ با وضوح بالا High-resolution (حدود ۲۰۰۰-۱۲۵۰باند) نیز برای کروموزومهای انسان در اواسط مرحله پرومتافاز سلولی مورد استفاده قرار میگیرند. باندها ممکن است به قسمت های کوچکتری تقسیم شده باشد و این قسمت های کوچکتر بصورت اعشار پس از باند قرار میگیرد. رزولوشن کروموزومی با ۲۰۰۰ باند کروموزوم ممکن است حاوی۱/۵ Mb از DNA، در حالی که رزولوشن ۳۰۰ باند شامل ۷-۱۰ Mb DNA است. افراد ماهر ممکن است قادر به تشخیص ۵-۱۰ Mb حذف DNA در آن محل باشند، اما در سطح مولکولی ژنوم انسان احتمالا شامل بیش از ۲۰۰۰ باند قابل تشخیص است [۲۹] متد سیتوژنتیک مولکولی نیز روش پیشرفته تر دیگری است که طی آن پروب لیبل شده DNA برای توالی های ویژه که در همان محل به سکانس مورد هدف کروموزوم انسان هیبریدمی شود. لیبل های مورد استفاده فلورسنت هستند از اینرو به نام تکنیک Fluorescence in situ hybridization (FISH) نام گذاری شده است. سایر لیبل های دقیق برای همین هدف به کارمی روند. رنگهای فلوروکروم مختلفی برای چندین پروب با یک رنگ و دو فیلتر با کمک light UV تواند مورد استفاده قرار گیرد. نواحی تکراری اختصاصی در α -Satellite با پروب FISH در سلولهای اینترفاز و متافازی با سیگنال های درخشان کاملا مشخص هستند. مزیت این روش استفاده از سلولهای غیر تقسیم شونده، حذف زمان کشت برای تقسیم میتوزی، بررسی ریز حذف ها/ مضاعف های کلینیکی که در روش سیتوژنتیک معمولی تشخیص آنها مشکل می باشد و بررسی هر کروماتید از دو کروموزوم همولوگ از طریق سیگنال های آزاد شونده از پروب ها میسرمی گردد. پروپ هایی برای تشخیص نئوپلازی و لوکمی و انواع تغییرات کروموزومی در سرطانها طراحی شده اند که برای تشخیص و درمان زودرس موثر باشند [۳۰]. امروزه کتابخانه ای از پروب های مختلف برای تمام یا قسمتی از کروموزوم برای شناسایی مارکرهای کروموزومی، منشا کروموزومی و تغییرات ساختاری کروموزومی طراحی شده است. متد دیگری که بررسی همزمان ۲۴ کروموزوم انسانی با پروب رنگی را فراهم می‌کند روش Multicolor FISH است که برای بررسی ناهنجاریهای های پیچیده و مقایسه ژنومی انسان با سایر موجودات کاربرد دارد [۱۵،۳۱].

لزوم استفاده از بررسی های کروموزومی در تشخیص و درمان بیماریها

بررسی های بندینگ کروموزومی برای شناسایی اختلالات تعدادی کروموزوم، جابه جایی ناحیه ای از یک کروموزوم به کروموزوم دیگر، حذف، معکوس و یا مضاعف شدن بخشی از کروموزوم کاربرد دارند. این روشها تاکنون تاثیر ارزشمند در ژنتیک پزشکی داشته و با پیشرفتهای این روشها به قدرت استفاده از آنها نیز افزوده شده است. سندرم های با حذف و مضاعف سازی های میکروسکوپی که با روش های معمول به سختی قابل تشخیص هستند[۱۳] بصورت ساده ای در اکثر موارد توسط روش های پیشرفته

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

تر قابل تشخیص هستند. در این روش پروب هایی بـرای شـمارش کروموزوم های جداگانه طراحی شده که در سیگنال های جداگانـه برای هر یک از کروماتید ها قابل تشخیص بوده و زمان کشت مورد نیاز برای آمادگی را کم می کند و کروموزوم های گسترش یافته ای را ایجاد می کنند که بصورت قابـل اطمینـان مـی تـوان شـمارش و ارزیابی ها را انجام داد. پروب ها فقط یک سیگنال روی کروموزوم مورد نظر برای بررسی سریع برای سایر گونـه هـا و بـرای اجـرای نقشه ژنوم مقایسه ای ایجاد می کنند. ایـن روش هـا بـرای بررسـی آنومالی های کروموزومی وسیله ای مفید برای انسان ارائه مـی کنـد که تعداد کروموزوم و توالی خاص DNA و همچنـین از سـلولهای غیر قابل تقسیم بررسی ها انجام میشـود[۳۲]. تشـخیص حـذف هـای کروموزومی در ارتبـاط بـا اخـتلالات ژنـی ارائـه کننـده برخـی از موقعیت های ژن بیماری برای اولین بار در انسـان اسـت. بـه طـور مشابه، جابه جایی ها در مشخص کردن محل ژن بیماری و ارتبـاط آن با برخی از Leukaemia مهم است. این روشها برای تشـخیص و پیش آگهی اساس مولکولی سرطان ها مهم است. یکی از بهتـرین نمونه ها برای جابه جـایی هـا میتـوان بـه جابـه جابـه جـایی بـین کروموزوم های ۹ و ۲۲ انسانی t(9;22)(11q:34q) و یا کروموزوم فیلادلفیا برای تشخیصی لوسـمی میلوئیـدی مـزمن (CML) اشـاره نمود[۳۳].

اهمیت اسـتفاده از بررسـی هـای کرومـوزومی در روابـط تکاملی

مقایسه الگوهای کروموزومی، روابط تکـاملی بـین گونـه هـا و همچنین تغییرات تدریجی در آنهـا را نشـان مـی دهـد. الگوهـای باندهای حاصـل از انسـان، گوریـل و کرومـوزوم شـامپانزه تقریبـا یکسان است، هر چند کروموزوم ۲ انسـانی نتیجـه تلفیقـی بـین دو کروموزوم بزرگ میمون اسـت. شـباهت گسـترده بـین کرومـوزوم انسانی و پستانداران وجود دارد [۲۳].

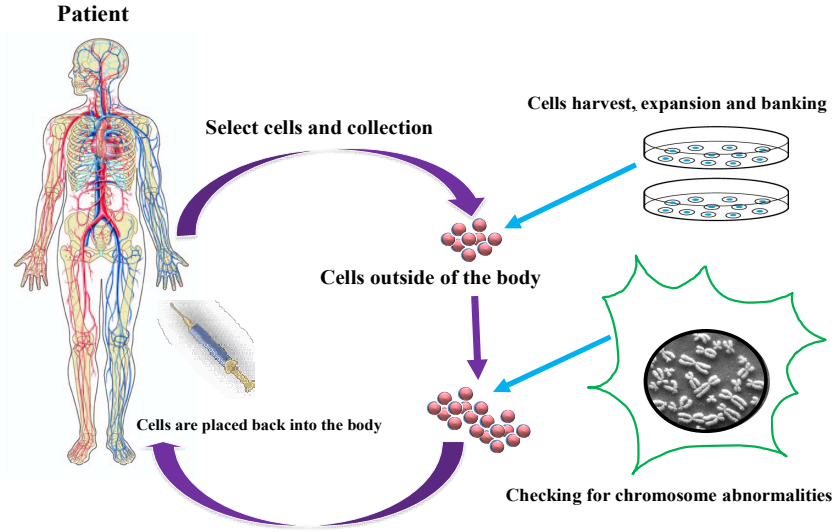
در انسان، بیشترین C-banding در بازوی بلند کرومـوزوم Y و نزدیک به سانترومر کروموزوم های ۱، ۹ و ۱۶ وجـود دارد. انـدازه این C-banding بین افراد متفاوت است. کوچکترین C-banding در ناحیه سانترومری در بازوی P در پنج کروموزوم ۲۱،۱۵،۱۴،۱۳و۲۲ پیدا شده است. در کروموزوم موش، قسمت اصـلی هتروکروماتین قابل مشاهده به صورت نزدیک به سانترومر هر کروموزوم یافت می شود و مقدار هتروکروماتین در این قسمت ها نیز بـین گونـه هـای مختلف موش متفاوت است. در مناطق هتروکروماتین منـع فعالیـت نوترکیبی، نسخه برداری و تاخیر در همانندسازی دیده می شـود [۲۳]. منـاطق جزایـر CpG و یـا منطقـه ژنـی فعـال در هتروکرومـاتین - Cbanding در ژنوم موش و انسان یافت نشده است و اغلب مناطق هتروکرومـاتین خـاموش مـی باشـند. هتروکرومـاتین هـا سـاختار کروماتینی مشخصی دارند که در کرومـوزوم مـوش و انسـان متیلـه هستند و تراکم پروتئین ^{5Me}CpG-binding protein MECP2 در این مناطق بسیار زیاد است و سـطح هیسـتون اسـتیله در آن بسـیار کـم است و در پسـتانداران سـلول هـای بنیـادی جنینـی قبـل از تمـایز هیسـتون H4 در هتروکرومـاتین اسـتیله اسـت [۳۴]. مجموعـه ای از پروتئین های کروموزومی (multi protein) موتیف هایی دارنـد کـه در تشکیل هتروکروماتین نقش دارند. بسـیاری از ایـن پـروتئین هـا مانند chromo box از مهمترین پروتئین ها در شکل گیری کمپلکس هتروکروماتین می باشند[۲۹]. بررسی پایگاه داده های ژنوم نشـان مـی دهد که جزایر CpG به صورت خوشه ای بیشـترین تـراکم ژنـی را دارند. از این رو بیشترین تـراکم ژن هـا در ژنـوم انسـانی در R- , Tbanding واقع انـد. ایـن وضـعیت مشـخص مـی کنـد کـه چـرا کروموزوم های انسان با محتوای بـالای G-band (بـه عنـوان مثـال تریزومی های ۱۳، ۱۸ و۲۱) دیده می شود در حـالی کـه تریزومـی برای کروموزوم کوچک و غنی از T, R-band (بـه عنـوان مثـال در کروموزوم ۲۲) در مراحل اولیه جنینی از بین می روند [۳۵].

همچنین در تعیین تـوالی کـل ژنـوم انسـانی(Whole genome sequencing) تراکم ژن های کمتر در کروموزوم انسانی ۲۱ نسـبت به کروموزوم ۲۲ تایید شده اسـت. در سـطح بانـدهای کرومـوزوم مناطق حفاظت شده از کرومـوزوم وجـود دارد کـه از نظـر نسـبت تـراکم ژن، زمـان تکثیـر DNA و ویژگـی هـای بانـدها، تکامـل کروموزوم پستانداران را بیش از ۱۰۰ میلیون سال نشـان مـی دهـد. این مسئله نفوذ یک فشار انتخابی قـوی بـرای حفـظ ویژگـی هـای کروموزوم، تراکم ژن، زمان همانند سازی و نوع بانـدها را در طـول زمان نشان می دهد[۳۵،۳۶].

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

هتروکروماتین ها در نواحی C-band پایین ترین نرخ نوترکیبی را نشان‌می دهد. در R-banding مناطق سیناپسی و کراسینگ اور در پستانداران و دیگر مهره داران مشخص‌می شود. در حالی که الگوهای G،Q–banding و R که تنها در برخی یوکاریوت مشاهده شده، اما باندهای نواحی همانندسازی تقریبا در میان همه موجودات زنده با در اختیار داشتن نمونه کروموزوم به اندازه کافی با استفاده از میکروسکوپ قابل بررسی است. کروموزوم پستانداران و پرندگان می تواند از نوع G-band و R-band باشد. علاوه بر این، بسیاری از کروموزوم خزنده ها دارای G-band و تا حدی R-band می باشند. دوزیستان، ماهی ها و گیاهان گونه هایی هستند که این مورد در آنها یافت نمی شود. پایینترین مهره داران که G-banding خوبی در مورد آنها گزارش شده ماهی استخوانی هستند[۲۳].

امروزه انواع سلول ها و اجزای سلولی در درمان بسیاری از بیماری‌های قلبی، سرطانها و ناهنجاریهای دارای اهمیت بسیاری در پزشکی فرد محور است [۳۷].



شکل ۱: فرایند سلول درمانی و بررسی کروموزومی

نتیجه گیری

توسعه و گسترش انواع سلول ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارای اهمیت بسیاری در پزشکی شخصی است و بررسی دقیق کروموزومی ها و جلوگیری از اختلالات بعدی در طول چند دهه گذشته قابل توجه بوده است. نگهداری طولانی مدت از سلولها و تزریق مکرر آنها به افراد ایجاب میکند که از نظر تعداد و ساختار کروموزوم ها در سلولهای هدف دائما ارزیابی شوند و از طرفی کشت طولانی مدت این سلول ها در اثر فعال شدن برخی ژنها می‌تواند آنها را به سمت تومورزایی و تغییرات سلولی هدایت نماید. چندین مطالعه تعدادی از ناهنجاریهای کروموزومی را در بین نمونه های اهدایی و طی کشت سلولی گزارش کرده اند و جهت استفاده‌های درمانی نیازمند تاییدیه سلامت محصول از جهت محتوای ژنتیکی‌می باشد. استفاده از مواد شیمیایی مناسب و دستگاههای پیشرفته در حال گسترش هستند تا برای بررسی دقیق تر کروموزومی و مقایسه سریع ژنوم انسان و سایر گونه ها کمک نمایند. استفاده از مواد جدید و همگام با آن روشهای کامپیوتری و مولکولی تحقیق و ارزیابی کروموزومها را در انواع گونه ها و مقایسه با ژنوم انسانی را برای اهداف مختلف سلول درمانی آسان‌تر

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

می نماید. در این بین تکنیکهای مختلفی امکان بررسی کروموزومها را فراهم آورده است تا سلامت سلولها از نظر محتوای کروموزومها بطور اختصاصی کنترل و بررسی شوند. استفاده از این تکنیکها هم در تشخیص بیماری های انسانی و هم در زمینه مطالعات سلول درمانی در پزشکی شخصی مورد توجه قرار گرفته است. آشنایی با این روش و انواع آن و بررسی های دوره ای و منظم از پایداری ژنومی در سلولها قبل از کاربردهای کلینیکی آنها ضروری است.

References

1. Mansouri F. A Review of Stem Cell Technology. Alborz University Medical Journal. 2018;7(3):181-9.
2. Miryounesi M, Nayernia K, Dianatpour M, Mansouri F, Modarressi MH. Co-culture of Mouse Embryonic Stem Cells with Sertoli Cells Promote in vitro Generation of Germ Cells. Iran J Basic Med Sci. 2013;16(6):779-83.
3. Golchin A, Farahany TZ. Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products. Stem Cell Reviews and Reports. 2019;15(2):166-75.
4. Golchin A, Farahany TZ, Khojasteh A, Soleimanifar F, Ardeshirylajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. Current Stem Cell Research & Therapy 2019;14(1):22-33.
5. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. Cell Death & Disease 2013;4(12):e950-e.
6. Rebuzzini P, Zuccotti M, Redi CA, Garagna S. Chromosomal Abnormalities in Embryonic and Somatic Stem Cells. Cytogenetic and Genome Research 2015;147(1):1-9.
7. Cornélio DA, Medeiros SRBd. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2014;36:238-40.
8. Wan TS, Hui EK, Ng MH. Chromosome Recognition. Methods Mol Biol. 2017;1541:67-74.
9. Barbaric I, Biga V, Gokhale PJ, Jones M, Stavish D, Glen A, et al. Time-lapse analysis of human embryonic stem cells reveals multiple bottlenecks restricting colony formation and their relief upon culture adaptation. Stem cell reports 2014;3(1):142-55.
10. Avery S, Hirst AJ, Baker D, Lim CY, Alagaratnam S, Skotheim RI, et al. BCL-XL mediates the strong selective advantage of a 20q11. 21 amplification commonly found in human embryonic stem cell cultures. Stem cell reports 2013;1(5):379-86.
11. Baker D, Hirst Adam J, Gokhale Paul J, Juarez Miguel A, Williams S, Wheeler M, et al. Detecting Genetic Mosaicism in Cultures of Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports 2016;7(5):998-1012.
12. Borgonovo T, Vaz IM, Senegaglia AC, Rebelatto CLK, Brofman PRS. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2014;36:202-7.
13. Mansouri F. Non-invasive Prenatal Testing: New Prospects to Personalized Prenatal Medicine. Alborz University Medical Journal 2019;8(1):1-10.
14. Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. Nature Biotechnology 2011;29(12):1132-44.
15. Rao PH, Nandula SV, Murty VV. Molecular cytogenetic applications in analysis of the cancer genome. Methods Mol Biol. 2007;383:165-85.
16. 16. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood, The Journal of the American Society of Hematology 2010;115(8):1549-53.
17. Capelli C, Pedrini O, Cassina G, Spinelli O, Salmoiraghi S, Golay J, et al. Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols. Haematologica 2014;99(6):e94-7.
18. Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, Lo Surdo JL, Bauer SR, Hursh DA. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. Cytotherapy 2016;18(3):336-43.
19. Sumner A. The nature and mechanisms of chromosome banding. Cancer genetics and cytogenetics 1982;6(1):59-87.
20. Chen CP, Su YN, Chern SR, Chen YT, Wu PS, Su JW, et al. Mosaic trisomy 2 at amniocentesis: prenatal diagnosis and molecular genetic analysis. Taiwan J Obstet Gynecol. 2012;51(4):603-11.
21. Charleen M Moore RGB. Chromosome Preparation and Banding. ENCYCLOPEDIA OF LIFE

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

SCIENCES 2001:1-7.

22. Holmquist GP. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. Am J Hum Genet. 1992;51(1):17-37.
23. Bickmore W. Karyotype analysis and chromosome banding. Encyclopedia of Life Sciences, Vol. 10. John Wiley & Sons: Chichester, UK; 2005.
24. Sumner AT. Chromosome banding and identification absorption staining. Chromosome Analysis Protocols: Springer; 1994. p. 59-81.
25. Bakhoum SF, Silkworth WT, Nardi IK, Nicholson JM, Compton DA, Cimini D. The mitotic origin of chromosomal instability. Current Biology 2014;24(4):R148-R9.
26. Jacobs K, Zambelli F, Mertzanidou A, Smolders I, Geens M, Nguyen HT, et al. Higher-density culture in human embryonic stem cells results in DNA damage and genome instability. Stem Cell Reports 2016;6(3):330-41.
27. SC R. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatric neoplastic diseases. Cancer investigation 2000.
28. Das K, Tan P. Molecular Cytogenetic Analysis: Applications in Cancer. eLS. 2001.
29. Bickmore WA. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2001:1-7.
30. Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoohi R, Fereidooni F, Mansouri F, et al. Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in breast cancer in Iran. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(3):873-7.
31. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, et al. Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 2010;7(2):249-57.
32. Mansouri F. The role of the clinical and molecular assays in pro state cancer detection. Asian J Pharm Clin Res. 2017;10(6):11-5.
33. Xiao H, Yang Y, Zhang C, Liao E, Zhao H, Liao S. Karyotype analysis with amniotic fluid in 12365 pregnant women with indications for genetic amniocentesis and strategies of prenatal diagnosis. Journal of Obstetrics and Gynaecology 2016;36(3):293-6.
34. Jeppesen P, Turner BM. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. Cell 1993;74(2):281-9.
35. Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR, Collins JE, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. Nature 1999;402(6761):489-95.
36. Jeppesen P. Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. Bioessays 1997;19(1):67-74.
37. Mansouri F. Use of stem cell-derived exosomes as a therapeutic approach in cardiovascular disease in personalized medicine. Alborz University Medical Journal 2021;10(3):90-96.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, October 2021, Vol. 10, No. 4: 501-511 *Review Article*

Fatemeh Mansouri [1,2*] ***Ali Golchin*** [3]

[1] *Department of Genetics and Immunology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[3] *Department of Applied Cell Sciences and Biochemistry, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

Importance of Chromosomal Studies in Cell Therapy and Its Applications

Received: 8 Jun 2020 ; Accepted: 6 Sept 2020

Abstract

Currently, the use of cell therapy is an effective treatment method in some types of diseases. The use of stem cells and somatic cells, due to the complete genetic similarity with individual cells, has led to the development of cell therapy methods. In recent years, significant advances have been made in the methods of culturing, isolating, and long-term cell maintenance. However, there are still problems and concerns related to their clinical use, the resolution of which requires more detailed studies in this area. One of these problems is genomic changes in cells that can affect the potential for differentiation of stem cells. Genetic abnormalities occur during successive cultures during the process of proliferation and differentiation, and can affect cell behavior and subsequent laboratory results. The aim of this study is to investigate the importance of chromosomal studies in cell therapy for the analysis of chromosomes and summarize the applications and limitations of these methods in the medical sciences.

Conclusion: The results of this discussion show that the use of different techniques of chromosomal studies can be considered in the final evaluation and obtaining confirmation of the accuracy of cellular products in treatment. Periodic and regular examinations of genomic stability in cells before their clinical use are essential.

Keywords: Stem cells, Chromosome, Cell therapy, Genetic abnormalities

***Corresponding Author:**

Department of Genetics and Immunology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Tell: 09123704153
E-mail: ansouri1600@hotmail.com

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.29252/aums.10.4.501]