REVIEW ARTICLE

Cell Therapy Using Embryonic Stem Cell Source in Clinical Trial Studies: Advantages and Limitations

Ali Golchin[1],
Hasan Niknejad[2]

[1] PhD Student in Applied Cell Science, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Applied cell science, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received December 24, 2016 ; Accepted March 6, 2017)

Abstract

Background and purpose: The unique characteristics and potency of stem cells have attracted interest for their use in cell therapy. However, the use of these cells has some limitations and problems such as ethical issues. The aim of this study was to perform a systematic review on the use of embryonic stem cell for clinical therapy targets and investigating its advantages and limitations.

Materials and methods: Data was collected from electronic databases including PubMed, Science direct, Medline, Clinical trial.gov, SID, etc. The search keywords included pluripotent stem cell, Embryonic stem cell (eSC), and stem cell therapy.

Results: Study of published articles and ongoing studies showed that pluripotency, cell viability and low immunogenicity of eSC are amongst the major reasons for their use.

Conclusion: Recent developments in clinical application of eSC make them a major candidate in using stem cells alongside MSC and iPS. But, further studies are needed due to its importance in many aspects.

Keywords: embryonic stem cells, cell therapy, advantage, limitations

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (148): 161-175 (Persian).

مجـلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـزشـکـــی مـازنـــدران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۸ اردیبهشت سال ۱۳۹۶ (۱۷۵-۱۶۱)

سلول درمانی با استفاده از سلول های بنیادی جنینی در مطالعات کارآزمایی بالینی: مزایا و محدودیت ها

علی گلچین[1]
حسن نیک نژاد[2]

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی جنینی به دلیل دارا بودن پتانسیل‌های منحصر به فرد همواره مورد توجه پژوهشگران پزشکی بازساختی بوده است، هرچند در ابتدا محدودیت های ذاتی این منبع سلول بنیادی در کنار مسائل عقیدتی و اخلاقی استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی را در پژوهش های پزشکی بازساختی و سلول درمانی محدود ساخت. هدف از این مطالعه مروری بر پژوهش های صورت گرفته در استفاده از سلول های بنیادی جنینی در مطالعات کارآزمایی بالینی، مزایا، محدودیت ها و مسائل مخصوص به آن بوده است.

مواد و روش‌ها: برای تدوین مقاله حاضر جست و جوی سرواژه های کلیدی Embryonic stem cell(eSC)، pluripotent stem cell و stem cell therapy از منابع اطلاعاتی معتبر شامل clinicaltrial.gov، Medline، Science direct، Scopus و سایر بانک مقالات صورت گرفت.

یافته‌ها: بررسی مطالعاتی که نتایج آن‌ها منتشر گردیده است و مطالعات در حال اجرا که در Clinicaltrial.gov ثبت گردیده‌اند، نشان می‌دهد مواردی هم چون توانایی بالای تکثیر و تمایز، ایمونوژنسیته پایین و میزان زنده مانی eSC از جمله موارد قابل توجه در استفاده از این سلول ها در مطالعات یاد شده می باشد.

استنتاج: در صورت تداوم پیشرفت‌های رخ داده در زمینه کاربرد بالینی eSC، در آینده این منبع سلولی می‌تواند به عنوان یکی از منابع اصلی سلول بنیادی در کنار MSC و iPS در سلول درمانی بیماری ها مورد استفاده قرار گیرد، با این وجود به دلیل حساسیت موضوع نیاز به بررسی‌های دقیق تر و بیش تر در مطالعات کارآزمایی احساس می گردد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی جنینی، سلول درمانی، مزایا، محدودیت

مقدمه

سلول های بنیادی جنینی یا رویانی (Embryonic Stem Cells) برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ از رویان موش استخراج شدند اما بعد از جداسازی اولین سلول‌های بنیادی رویانی انسانی توسط جیمز تامسون و همکارانش در دانشگاه ویسکانسیس در سال ۱۹۹۸، توجه به این سلول ها بیش‌تر شد. سلول‌های بنیادی به دلیل ویژگی های منحصر به فرد سال هاست توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده اند و همواره امید به

مولف مسئول: علی گلچین– تهران، ولنجک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان طالقانی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، گروه علوم سلولی کاربردی
E-mail:Agolchin.vet10@yahoo.com

۱. دانشجوی دکتری تخصصی علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانشیار، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۰/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۰/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱۲/۱۶

سلول درمانی برای درمان بسیاری از بیماری‌های غیرقابل درمان و مهم انسانی را به خود اختصاص داده‌اند(۱) سلول‌های بنیادی جنینی که به آن‌ها سلول‌های بنیادی اولیه نیز گفته می‌شود از مراحل اولیه نمو رویانی یا بلاستولا استخراج می‌شوند و می‌توان از آن‌ها در پزشکی بازساختی و سلول درمانی استفاده نمود. این سلول‌ها به دلیل دارا بودن پتانسیل های منحصر به فرد ابتدا به صورت گسترده ای مورد توجه پژوهشگران قرار گرفت اما هم زمان با پی‌گیری پژوهش‌ها به منظور استفاده درمانی از آن‌ها، مسائل عقیدتی و اخلاقی استفاده از سلول‌های بنیادی رویانی انسانی ((Human Embryonic Stem Cell (hESC) مطرح گردید که منجر به محدودیت‌سازی این پژوهش‌ها گردید. از طرفی با وجود تمامی پژوهش‌های صورت گرفته در استفاده درمانی از این سلول‌ها هنوز پیشرفت معنی‌داری در این زمینه مشاهده نشده است(۲). زیرپا گذاشته شدن شأن و کرامت انسانی، باروری و سقط جنین صرفاً جهت تهیه سلول‌های بنیادی جنینی، نگرانی از تلاش برای تولید جمعیت مورد هدف و بیم از سودجویی‌های مادی از جمله مسائل اخلاقی مطرح می‌باشند(۳،۲).

سلول‌های بنیادی رویانی انسان (hESC) را با توجه به اهداف مدنظر به روش‌های مختلف هم چون داخل عضلانی، داخل سیاهرگی، جراحی و غیره استفاده نمود(۴). سلول‌های بنیادی جنینی را می‌توان به دو صورت به دست آورد: ۱) لقاح موفق اووسیت و اسپرم و تقسیم رویان ۲) انتقال هسته سلول‌های پیکری به سلول تخمک یا پرتوان فاقد هسته(۵) ((Somatic-Cell Nuclear Transfer(SCNT) (فرآیندی که طی آن یک هسته از یک سلول پیکری موجود زنده استخراج و به یک سلول زایایی که هسته آن از قبل تخلیه شده انتقال می‌یابد.). در مسیر اول می‌توان لقاح را به دو صورت انجام داد: ۱) لقاح طبیعی که در بدن موجود زنده صورت می‌گیرد، ۲) لقاح آزمایشگاهی و کشت تخمک‌های لقاح یافته. استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی بعد از یک لقاح طبیعی جز در مواردی که نیاز به سقط اجباری باشد کم تر مد نظر اهداف درمانی و پژوهشی می‌باشد. هرچند در برخی از پروتکل‌های درمانی می‌توان بعد از اخذ مجوز و اعلام رضایت والدین از سلول‌های بنیادی به دست آمده از این روش برای اهداف درمانی در اعضای یک خانواده استفاده نمود. کشت تخمک‌های لقاح یافته بعد از لقاح آزمایشگاهی به منظور دستیابی به سلول‌های بنیادی جنینی نیز به دلایلی با محدودیت‌هایی مواجه است، چرا که این سلول‌ها توانایی رشد محدودی در محیط کشت دارند. در روش انتقال هسته سلول پیکری به سلول زایا، هسته سلول زایا خارج گشته و با هسته سلول پیکری جایگزین می‌شود که هسته جدید تحت اثر محتویات سلول میزبان برنامه‌ریزی مجدد می‌کند.

این روش می‌تواند سلول‌هایی با تشابه ژنتیکی به سلول‌های بیمار ایجاد کند که این امر می‌تواند از دفع بافت در پیوند جلوگیری کند. از روش انتقال هسته سلول پیکری (SCNT) به سلول زایا برای کلون نمودن حیواناتی مانند خوک، گاو، بز، گوسفند و اخیراً اسب و قاطر استفاده شده است(۶).

ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی جنینی شامل خود نوسازی و پرتوانی می‌باشد(۷) که به موجب آن توانایی ایجاد سه لایه زایای جنینی را ضمن حفظ خاصیت خودنوسازی دارا می‌باشند. سلول‌های پرتوان جنینی به عنوان کاندیدای سلولی در درمان بیماری‌های دژنراتیو عصبی هم‌چون پارکینسون، اسکلروزیس آمیوتروفیک جانبی (ALS)، آسیب‌های نخاعی و پزشکی بازساختی در بافت‌هایی هم‌چون چشم و پانکراس مطرح می‌باشند(۸). روش‌هایی از تمایز سلول‌های بنیادی رویانی به لایه‌های زایا ارائه گردیده که هر کدام می‌تواند کاندیدای درمانی برای برخی از بیماری‌ها و تمایز به بافت‌های مختلف مطرح گردد:

اندودرم

هپاتوسیت (دیابت، سرطان کبد، سیروز کبدی(۹،۱۰)،

سـلول‌هـای پـیش‌سـاز جزایـر لانگرهـانس پـانکراس (دیابت(۱۱)، سـلول‌هـای آلوئـولار شـشی (بیمـاری‌هـای مزمن انسدادی ششی:COPD(۱۲).

مزودرم

سلول‌های خونی (بیمـاری‌هـای مـرتبط بـا عملکـرد سیستم ایمنی(۱۳)، اسـتخوان و غـضروف (بیمـاری هـای دژنراتیو اسکلتی)، کاردیومایوسیت (بیماری‌های قلبی).

اکتودرم

سـلول‌هـای عـصبی دوپامینرژیـک (بیمـاری پارکینـسون(۱۴)، سـلول‌هـای عـصبی کولینرژیـک(۱۵) (بیماری‌هایی هم‌چون آلزایمر، هانتینگتون)، سـلول‌هـای پیگمانته شبکیه (ماکولا[16,17])، دیگـر سـلول‌هـای عـصبی (بیماری لوگهریگ یا ALS(۱۸).

با توجـه بـه ایـن کـه در مطالعـات اخیـر اسـتفاده از سـلول هـای تمـایز یافتـه بـرای اهـداف درمـانی مطـرح گردیده است و به ایـن منظـور سـلول هـای بنیـادی همـه توان (hESC, iPS) کاندیدای اصلی می‌باشند، هـدف از این مطالعه بررسی نتایج، محدودیت‌ها و مزایای اسـتفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESC) در مطالعـات تجربـی وارد شـده بـه فازهـای کارآزمـایی بـالینی طـی سال‌های اخیر بوده است.

مواد و روش ها

در ایـن مطالعـه مـروری نظـام منـد جـست و جـوی الکترونیکی مقالات بدون در نظر گرفتن محدوده زمانی آن‌ها از پایگاه‌هـای اینترنتـی Scopus، Science direct، SID و سایر بانک مقالات صـورت گرفـت کـه طـی آن کلید واژه‌هـای Pluripotent/Embryonic Stem Cell، Stem Cell Terapy مـورد جـستجو قـرار گرفـت. در پایگاه اینترنتی Pub Med با استفاده از سیـستم MeSH و فیلتـر Clinical Trial، عبـارات -Cell- and Tissue") Based Therapy"[MeSH]) AND "Embryonic Stem Cells"[MeSH] مورد جستجو قرار گرفت. سپس مقالات جمـع آوری شـده مجـدد از جهـت کارآزمـایی بالینی مورد بررسی واقع شد و مقالات مروری و پژوهش های صورت گرفته روی مدل‌های دامی از مطالعه خارج شـــدند. در ادامـــه، جـــست و جـــو هـــا در ســـایت clinicaltrial.gov (کـــه پایگـــاه ثبـــت و حمایـــت از مطالعات کارآزمایی بـالینی در سـطح جهـانی مـی‌باشـد) صـورت گرفـت. در مجمـوع از ۱۱۹ مقالـه‌ای کـه در جستجوی اولیـه جمع‌آوری شـده بـود پـس از بررسـی عنوان، چکیـده مقـالات و دیگـر معیارهـای کیفـی مـدنظر تعداد چهار مقاله اصیل کارآزمایی بالینی و تعداد ۱۰ مطالعه ثبت شده در clinicaltrial.gov برای بررسی یافـت شـد. این مطالعات در جدول شماره ۱ آورده شده‌اند.

یافته ها

بیماری‌های عصبی

اولـین مطالعـه کارآزمـایی بـالینی بـا اسـتفاده از سلول‌های بنیادی بـا منـشاء جنینـی کـه توانـست تاییدیـه سازمان غذا و داروی ایالات متحـده آمریکـا (FDA) را در سال ۲۰۱۱ بگیرد توسط شـرکـت Geron Corporation و مربـوط بـه تمـایز سـلول هـای الیگودندروسـیت از سلول‌های بنیادی جنینـی بـرای درمـان افـراد دچـار قطـع شدگی نخاع بود. طی این مطالعـه بیمـاران قطـع نخـاعی طی دو هفته بعد از زخم منجر به فلجی نخـاع بـا اسـتفاده از تزریق سلول‌های پیش‌ساز اولیگودندروسیتی مـشتق از سلول های بنیادی جنینی مورد درمان قـرار گرفتنـد، ایـن کارآزمـایی در سـال ۲۰۱۴ در سـایت ثبـت کارآزمـایی بالینی بروزرسـانی شـد ولـی نتـایج حاصـل از آن منتـشر نگردیـده اسـت(۱۹). رسـیدن بـه ایـن هـدف مـی توانـد انقلابی در درمان بیمـاری هـای عـصبی هـم چـون ALS ایجاد کند.

گزارشی که در سال ۲۰۱۶ از دهلی نو– هند منتـشر شد مبنـی بـر اسـتفاده درمـانی از الیگودندروسیت هـای مـشتق از hESC در درمـان دو بیمـار مبـتلا بـه مالتیپـل

اسکلروزیس (MS) و لایم (LD) می‌باشد(۴). مطالعات قبلی روی مدل حیوانی رت نشان داده بودند که الیگودندروسیت‌های مشتق از hESC تاثیر مثبت در میلینه شدن مجدد رشته‌های عصبی و تحریک موتور حرکتی بدن دارد(۲۰). نتایج حاصل از این گزارش نشان می‌دهد بیماران مبتلا به MS و LD در فاصله زمانی ۲۰۱۴تا ۲۰۱۵ بعد از سلول درمانی بهبودی قابل توجهی در مهارت‌های حرکتی روزمره، استقامت بدنی، توانایی یادگیری و قدرت بدنی از خود نشان می‌دهند که ارزیابی‌ها با تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI-SPECT) نیز تایید کننده این بهبودی بود. البته این دو بیمار بعد از پیوند سلول، با درمان‌های حمایتی فیزیوتراپی و مصرف آنتی بیوتیک حمایت شده بودند[4]. مطالعه ای نیز در استرالیا آغاز شده که در آن تولید سلول های عصبی مشتق از hESC برای درمان بیماری پارکینسون مورد هدف قرار گرفته است(۲۱). اما مشکل عمده این قبیل مطالعات در عدم توانایی جداسازی مناسب سلول های دوپامینرژیک مورد نیاز برای درمان بیماری پارکینسون از دیگر سلول‌های عصبی هم چون سلول های سروتوژنیک می‌باشد(۲۲). از طرفی تلاش‌هایی به منظور پیوند سلول‌های پرتوان مزانسفال شکمی جنینی برای بیماران پارکینسونی صورت گرفته است که غنی از سلول‌های عصبی دوپامینرژیک مورد نیاز بیماران پارکینسونی می‌باشد و در مدل های حیوانی مبتلا به این بیماری پاسخ‌های مناسبی گرفته شده است که ضمن ادامه زنده مانی سلول‌ها، عملکرد ناحیه مشبک را نیز تقویت می‌کند(۲۳، ۲۴). از طرفی نیز طی سال های اخیر انجمن های علمی جهت استفاده از سلول‌های مغزی جنینی برای پیوند به بیماران پارکینسونی و هم‌چنین رعایت دیگر مقررات درمانی در این خصوص فعالیت‌هایی را آغاز کرده است(۲۷- ۲۵).

سکته قلبی

مطالعه دیگری در بیمارستان عمومی پاریس- فرانسه در سال ۲۰۱۳، فاز یک کارآزمایی آن با هدف بررسی ایمنی استفاده از پیش‌سازهای کاردیومیوسیتی (SSEA1^{+}Isl-1^{+}) مشتق شده از hESC برای ۶ نفر از بیماران سکته قلبی انجام پذیرفت. در این مطالعه از داربست‌های ژلی فیبرینی به عنوان ایمپلنت حاوی سلول استفاده گردیده است تا امکان رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های کاردیومیوسیتی را فراهم نماید. این سلول‌ها بدون ایجاد تومور در ناحیه و یا بافت‌های خارجی توانایی تولید رده سلولی کاردیومیوسیتی را دارا می‌باشد. طی این مطالعه ویژگی‌هایی هم‌چون خاصیت تحریک کنندگی

جدول شماره ۱: لیست مطالعات فاز بالینی ثبت و تایید شده در سایت clinicaltrial.gov با استفاده از سلول های بنیادی جنینی

ردیف	مسئول طرح – کشور	بیماری مد نظر	وضعیت مطالعه	تعداد بیمار	فاز مطالعاتی	سال
۱	Chabiotech Co. Ltd. (S. Korea)	دژنراسیون ماکولا	Unknown	۱۲	۱و۲	۲۰۱۶-۲۰۱۲
۲	Ocata Therapeutics (MA, USA)	دژنراسیون ماکولا	Withdrawn	۰	۱و۲	۲۰۱۶-۲۰۱۳
۳	Astellas Institute for Regenerative Medicine; Astellas Pharma Inc	استارگاد (تس)	Completed	۹	۱و۲	۲۰۱۵-۲۰۱۱
		دژنراسون ماکولا	Completed	۹		
۳	Astellas Institute for Regenerative Medicine; Astellas Pharma Inc	استارگاد (تس)	Completed	۱۳	۱و۲	۲۰۱۵-۲۰۱۱
۴	Pfizer (UK)	دژنراسیون ماکولا	Active, not recruiting	۱۰	۱	۲۰۱۶-۲۰۱۵
۵	Cell Cure Neurosciences Ltd. (Israel)	دژنراسیون ماکولا	Recruiting	۱۵	۱و۲	۲۰۱۷-۲۰۱۵
۶	ViaCyte (CA, USA)	دیابت ملیتوس تیپ ۱	Recruiting	۴۰	۱و۲	۲۰۱۴
۷	Assistance Publique-Hopitaux de Paris (France)	سکته قلبی	Active/Recruiting	۶	۱	۲۰۱۷-۲۰۱۳
۸	International Stem Cell Corp. (Australia)	پارکینسون	–	Unknown	۱و۲	–
۹	Asterias Biotherapeutics (CA, USA)	آسیب نخاعی	Active/Recruiting	۱۳	۱و۲	–
۱۰	Regenerative Patch Technologies, LLC	دژنراسیون ماکولا	Recruiting	۲۰	۱و۲	۲۰۲۲-۲۰۱۵

Completed: مطالعه تمام شده است.

Unknown: وضعیت نامشخص (تیمارگیری و یا عدم بروزرسانی طی دو سال اخیر)

Recruiting: در حال تیمار گیری (شرکت کننده)

Withdrawn: مطالعه قبل تیمارگیری متوقف شده است.

Active, not recruiting: مطالعه شروع شده است ولی تیمارگیری هم چنان ادامه دارد.

ایمنی میزبان و خاصیت تلفیق جریان الکتریکی با کاردیومیوسایت خود قلبی نیز مورد توجه و بررسی می‌باشد که قرار است سال ۲۰۱۷ به اتمام برسد(۲۱).

دیابت نوع یک

در مطالعه‌ای که در ایالات متحده آمریکا در سال ۲۰۱۴ آغاز شد بستری از کشت سلولی بدون نیاز به لایه تغذیه کننده، حاوی سلول‌های β تولیدکننده انسولین جایر لانگرهانس پانکراس اشتقاق یافته از hESC برای درمان دیابت تیپ ۱ تهیه گردید. در این مطالعه ۴۰ بیمار مبتلا به دیابت تیپ یک مورد مطالعه و درمان قرار گرفتند که نتایج جالب و قابل اتکایی حاصل گردید به گونه‌ای که مرحله نهایی تمایز سلولی و بررسی پاسخ به گلوکز منجر به تولید انسولین در محیط in vivo و در داخل بدن بیماران صورت پذیرفت(۲۲)، این در حالی است که در مطالعات دیگر صورت گرفته که منجر به تولید سلول‌های β لانگرهانس تولیدکننده انسولین می گردید امکان تداوم این فعالیت در داخل بدن نیز در هاله ای از ابهام بود(۲۳).

چشم پزشکی

نتایج دیگر کارآزمایی بالینی که در سال ۲۰۱۵ منتشر گردید، شامل نتایج اولیه مطالعه کارآزمایی بالینی کمپانی درمانی Ocata بود که طی آن از سلول‌های بنیادی رویانی در تمایز سلول‌های اپیتلیالی پیگمانته شبکیه برای درمان بیماری تحلیل ماکولا و استارگارت استفاده شد و نشان‌دهنده توانایی تمایز ۹۹ درصدی سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های اپتلیالی پیگمانته شبکیه بود. در این مطالعه ۹ بیمار مبتلا به تحلیل ماکولا (سن > ۵۵ سال) و ۹ بیمار مبتلا به استارگارت (سن> ۱۸ سال) در گروه های غلظت سلولی ۱۰۰۰۰۰،۵۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰۰ برای هر یک چشم مورد تیمار قرار گرفتند که عوارض جانبی اصلی درمان ناشی از مشکلات جراحی و سرکوب سیستم ایمنی بود. پس از ۲۲ ماه از درمان، شدت بینایی در ۱۰ بیمار علایم بهبودی و افزایش بینایی را نشان داد که در ۷ بیمار شدت بینایی تغییر نکرده و در یک بیمار علایم کاهش بینایی مشهود بوده است. طی این مطالعه گسترش غیر متوازن اپیتلیال شبکیه بازسازی شده در ۷۲ درصد بیماران مشاهده شد که به دلیل دستیابی به بهترین نتیجه و ایجاد بستر متوازنی از سلول‌های اپیتلیالی نیاز است این بررسی ها و مطالعات تداوم یابد(۱۷). در این مطالعه هم چنین شاخص کیفیت زندگی مرتبط با بینایی پس از ۳تا ۱۲ ماه در بیماران مبتلا به دژنراسون ماکولا ۱۶تا ۲۵ نمره و در بیماران مبتلا به استارگاد(تس) ۸تا۲۰ نمره افزایش را نشان داد. در مطالعه مشابهی که اخیراً در کره جنوبی صورت گرفت دو بیمار مبتلا به دژنراسیون ماکولای وابسته به سن و دو بیمار مبتلا به دیستروفی ماکولا استارگارد (تس) مورد سلول درمانی و پیوند شبکیه با استفاده از سلول‌های اپیتلیومی پیگمانته شبکیه مشتق از hESC قرار گرفتند(۳۱). در این مطالعه که بعد از عمل پیوند بیماران مدت یک سال زیرنظر بودند هیچ عارضه‌ای نشان‌دهنده تکثیر بالا در محل پیوند، تومورزایی یا بافت نابه‌جا و دیگر عوارض ناشی از سلول درمانی مشاهده نگردید و شدت بینایی سه بیمار ۹ تا ۱۹ نمره افزایش و در یک مورد ثابت ماند. تست‌های افتالمولوژیک بعد از جراحی هیچ‌گونه نگرانی را نشان ندادند(۳۱). مورد مطالعات دیگری در انگلیس و کالیفرنیا که به منظور درمان بیماری تحلیل ماکولا با استفاده از سلول‌های اپیتلیالی شبکیه مشتق از سلول‌های رویانی جنینی صورت گرفته است که در آن سلول‌های اپیتلیالی حاصل روی یک داربست بسیار نازک رشد داده شد و به منظور پوشش ماکولا به زیر سلول‌های گیرنده نوری تزریق شدند. گزارش‌هایی نیز از استفاده از سلول‌های اپیتلیالی مشتق از iPS برای پیوند در شبکیه چشم، از ژاپن شده است(۳۳،۳۲).

- تبیین آیین نامه‌هایی در خصوص برنامه‌های مرتبط با کاربردهای سلول‌های بنیادی رویانی در تحقیقات پایه و مطالعات کارآزمایی بالینی

امروزه درمان‌های سلولی بر مبنای سلول‌های بنیادی در حال توسعه بوده و تعداد زیادی از آن‌ها به مرحله کارآزمایی بالینی رسیده‌اند. هم‌چنین ایده ایجاد بانک بین المللی سلول‌های بنیادی توسط انجمن بین‌المللی سلول‌های بنیادی ارائه شده است. این انجمن یک گروه ملی و بین المللی است که هدف آن تحقیق و بررسی روی سلول‌های بنیادی جهت توسعه مجموعه‌ای از اصول (اخلاقی- علمی) و روش‌ها جهت ذخیره‌سازی سلول‌های بنیادی، تست، آزمایش و استفاده از این سلول‌های بنیادی جنینی انسان در درمان می‌باشد(۳۴). در ایالات متحده آمریکا سازمان جهانی غذا و دارو (FDA) این دستورالعمل‌ها را ارائه می‌دهد و توصیه‌هایی را به داوران طرح‌های پیشنهادی برای آزمایشات درمانی سلول بنیادی صادر می‌کند. شرایط GMP که از طرف سازمان جهانی غذا و دارو (FDA) و پزشکی اروپا (EMA) تعیین گردیده است به منظور مهیا نمودن استاندارد مطلوب در کاربرد بالینی و بهینه نمودن امنیت و کیفیت لازم سلول‌های بنیادی برای سلول درمانی می‌باشد تا سلول‌های بنیادی جنینی در بالاترین کیفیت و کارایی برای کاربردهای بالینی مورد استفاده قرار گیرند(۳۶،۳۵). نکته قابل توجه اینجاست که این توصیه‌ها، کیفیت و سودمندی سلول‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی انسان برای کاربردهای درمانی را به‌طور قطعی تضمین نمی‌کنند(۳۷)، بلکه این دستورالعمل‌ها این اطمینان را حاصل می‌کنند که سلول‌های بنیادی تجدید پذیر بوده و امکان تکرار معیارهای معین و خاصی برای تضمین سلامت بیمار وجود دارد. در زیر بر چالش‌ها و راه‌حل‌های مهم در استفاده از سلول‌های بنیادی رویانی در مطالعات کارآزمایی بالینی مورد بحث قرار گرفته است:

- تیمار سلول‌های بنیادی رویانی به‌منظور استفاده در مطالعات کارآزمایی بالینی

از جمله نگرانی‌ها و محدودیت‌های استفاده از سلول‌های پر توان جنینی، پتانسیل آن‌ها در تشکیل تومورهای لایه زایا می‌باشد که در مطالعات تجربی روی موش و دیگر مدل‌ها دیده شده است(۳۹،۳۸)، لذا ضروری است که مشتقات سلول‌های بنیادی جنینی به عنوان کاندیدای در نظر گرفته شده برای استفاده در پیوند و جایگزینی سلولی عاری از سلول‌های تومورژنیک باشند. نگرانی و دلواپسی دیگر، تمایز سلول‌های مشتق شده از رده جنینی به سلول‌های ناخواسته بافت‌های دیگر می‌باشد. برای مثال پیوند نامناسب سلول‌های عضلانی به میوکاردیوم آسیب دیده می‌تواند فعالیت‌های الکتریکی (تحریک‌کنندگی آریتمی‌ها) را تغییر دهد(۴۰). بنابراین توسعه و بهینه‌سازی بیش‌تر پروتکل‌های تمایز و خالص‌سازی برای به حداقل رساندن تولید انواع سلول‌های ناخواسته برای آزمایشات پیش کلینیکی و درمان بالینی ضروری و لازم می‌باشند. از آن‌جایی که تمایز انواع سلول‌های خاص را می‌توان با استفاده از مولکول‌های مشخصی در نقاط زمانی بحرانی طی کشت به دست آورد، بیش‌تر این روش‌ها فقط غنی‌سازی متوسطی را حاصل می‌کنند که برای کاربرد بالینی مناسب و دارای معیارهای لازم نمی‌باشند. مولکول‌های نشان گر الیگونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای هستند که هنگام باند شدن با mRNAهای هدفشان، سیگنال‌های فلورسانس تولید می‌کنند که به این ترتیب این سلول‌ها را از طریق میزان فعالیت فلورسنتی شناسایی می‌کند. نکته قابل توجه این که مولکول‌های نشان گر یک دوره زندگی کوتاه درون سلول‌ها دارند و عملکرد و ساختار ژنومیکی سلول‌های بنیادی جنینی انسان را تغییر نمی‌دهند. بنابراین این روش می‌تواند برای غنی‌سازی جمعیت‌های سلولی برگرفته از سلول‌های بنیادی مطلوب و یا برای نتخاب انواع سلول‌های ناخواسته هم‌چون

سلول‌های جنینی تمایز نیافته که توانایی تشکیل تومور را دارند، استفاده شود(۴۱).

- تامین سیستم کشت سلولی عاری از هرگونه گزنوبیوتیک برای سلول‌های بنیادی جنینی

بسیاری از از رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی که در حال حاضر مورد استفاده هستند، طی ایزولاسیون و تکثیرشان در محیط آزمایشگاهی و در معرض محصولات حیوانی قرار داده می‌شوند. تحت این شرایط، سلول‌های به دست آمده می‌توانند حاوی مواد سمی، میکروارگانیسم‌ها و موجودات ناشناخته تحریک‌کننده پاسخ ایمنی در میزبان باشند.

در حال حاضر، رده سلول بنیادی جنینی برای استفاده در تست‌های میکروبولوژیکی توسط ISCBI توصیه می‌شود. در ایالات متحده آمریکا سازمان FDA از نظر قانونی به اسناد و مدارک، منبع، پتانسیل و ظرفیت ژنتیکی اجزای اصلاح شده و عوامل بیماری زا در هر سلول مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی که برای استفاده در کارآزمایی بالینی درنظر گرفته شده‌اند، نیاز دارد. بنابراین سعی می‌شود تا از قرار گرفتن آن‌ها در معرض گزنوبیوتیک ها ممانعت به عمل آید. اخیراً محیط های کشتی طراحی و تدوین شده اند که اجازه می دهند تا سلول های سلول‌های بنیادی مورد مصرف در مطالعات کارآزمایی بالینی در شرایط عاری از گزنوبیوتیک نگهداری شوند(۴۲،۴۳). این عوامل عبارتند از جایگزین‌های سرمی بدون گزنوبیوتیک هم چون Knockout Serum Replacer (اینویتروژن)؛ واسطه محیط کشت هم‌چون HESGRO (Millipore) یا TeSR (STEMCELL)(۴۶-۴۴) و نیز محیط های کشت فاقد سرم مانند MT و SP(۴۷).

در حال حاضر سیستم‌های کشت فاقد لایه تغذیه کننده در حال توسعه می‌باشند تا خطر آلودگی با مواد خارجی برای سلول‌های بنیادی جنینی هنگامی که این سلول‌ها در لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده کشت داده می‌شوند به حد اقل کاهش یابد(۴۸). محیط‌های کشت تنظیم شده فاقد لایه تغذیه‌کننده و گزنوبیوتیک که شامل ترکیبی از فاکتورهای رشد نوترکیب با ویژگی مهار تمایز و حفظ وضعیت پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشند، هم‌اکنون به صورت تجاری در دسترس هستند. با این حال برخی گزارشات حاکی از آن است که شرایط محیط کشت فاقد لایه تغذیه‌کننده با ناپایداری کروموزومی بالا و افزایش خطر ناپایداری سلول‌های بنیادی جنینی به لحاظ ژنتیکی همراه می‌باشد(۴۹) که این امر از جمله محدودیت‌های استفاده بالینی این منبع از سلول‌های بنیادی در مطالعات کارآزمایی بالینی می‌باشد. رده سلول‌های بنیادی جنینی تغذیه شده با لایه‌ای از سلول‌های تغذیه‌کننده انسانی هم‌چون فیبروبلاست‌ها تا حدودی محدودیت ذکر شده را تعدیل می‌کند(۵۰،۵۱). هم‌چنین استفاده از ماتریکس UCBS می‌تواند ضمن عدم استفاده از لایه تغذیه کننده و سرم تا حدود پاساژ دهم ضمن حفظ ثبات کاریوتایپی بالاترین سرعت تکثیر این سلول‌ها را نیز فراهم نماید(۵۲). با این وجود پیشروی به سوی ایجاد رده سلول بنیادی مناسب از منبع جنینی برای مطالعات کارآزمایی بالینی نیاز به مطالعات و حساسیت بیش تری دارد و هم چنان مطالعات در این زمینه ادامه دارد.

- ناهنجاری های ژنتیکی در رده‌های سلول های بنیادی جنینی انسان

سلول های بنیادی جنینی جدا شده از مراحل اولیه دوران جنینی بهترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را دارا می‌باشند ولی داشتن بهترین ویژگی و توانایی الزاماً به معنی مناسب بودن این رده سلولی برای کاربردهای درمانی نمی‌باشد. ناپایداری کروموزومی و ژنومی در چندین رده سلولی hESC همراه با ازدست دادن هتروزیگوسیتی یا افزایش تنوع در ژن‌های مرتبط با سرطان تشخیص داده شده است(۵۳،۵۴). با توجه به این که این تغییرات و موتاسیون‌ها در سلول‌های پاساژ پایین کم‌تر دیده شده لذا به‌نظر می‌رسد که موتاسیون‌ها در کشت طولانی مدت ایجاد می‌شود. ممکن است برخی

از این ناپایداری‌ها و جهش ها طی مراحل اولیه تکثیر و تمایز سلولی طی انطباق با محیط جدید و شرایط کشت بروز نماید(۵۵). به دلیل قدرت خودنوزایی و تکثیر سریع سلول های بنیادی جنینی در محیط کشت و بدن، احتمال رخداد آسیب‌های DNA هم چون شکست و برش در DNA دو رشته ای در ژنوم این سلول‌ها نیز بیش‌تر است. با این وجود مطالعات نشان می‌دهد پایداری ژنوم سلول‌های جنینی بیش‌تر از سلول‌های سوماتیک می‌باشد و پاسخ‌های ژنتیکی به آسیب و ترمیم آسیب در سلول‌های جنینی قوی‌تر است(۵۶). به‌هرحال این مشاهدات استانداردها و ویژگی‌هایی از کامل کردن خصوصیات رده‌های hESC به ویژه طی کشت طولانی مدت و روند کار با آن‌ها را تعیین می‌کند تا بعد آن به درجه استفاده درمانی برسد.

- دور زدن رد پیوند از طریق سیستم ایمنی توسط سلول های مشتق شده از سلول های بنیادی جنینی

سیستم ایمنی پیوند سلول های بنیادی جنینی را رد می‌کند زیرا سلول‌های بنیادی جنینی در مراحل تمایز و تکثیر هر دو کلاس مولکولی سازگاری بافتی I و II را بیان می‌کنند و این مولکول‌های سازگاری بافتی به مقدار جزیی نیز سبب تحریک فعالیت سیستم ایمنی می‌گردند(۵۷). دیگر عامل منجر به تحریک سیستم ایمنی دریافت کننده، عدم سازگاری آنتی ژن‌های گروه‌های خونی ABO بین اهدا کننده و دریافت کننده پیوند می‌باشد(۵۸). این دو مورد همواره در پیوند بافت و سلول باید مورد توجه قرار گیرند چرا که عامل تحریک سیستم ایمنی و رد پیوند می‌باشند. بهترین راه برای ممانعت از رد پیوند توسط سیستم ایمنی داشتن سلول‌هایی از اهدا کننده و بیمار است که از نظر ژنتیکی یکسان باشند. لذا انتقال هسته سلول‌های پیکری (SCNT) برای تولید رده سلولی بنیادی جنینی خاص به عنوان راه حل این مشکل مطرح، موجب توسعه و استفاده قرار می گیرد. طی این روش، سلول تخم باور شده و به آن امکان رشد و نمو داده می‌شود تا به مرحله بلاستوسیت رسیده و سلول های بنیادی جنینی از آن مشتق شوند، لذا سلول های حاصل شده یک پروفایل ایمونولوژیکی مطابق با بیمار داشته و می‌تواند برای سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک در ESC های گونه‌های خاص جانوری در حال استفاده می‌باشد اما هنوز اشتقاق ESC انسانی از طریق ترانسفر هسته‌ای سلول سوماتیک حاصل نشده است(۵۹). استراتژی دیگر برای تولید رده های سلولی hESC که سازگاری بیش‌تری با فرد گیرنده داشته باشد شامل مهندسی سلولی و ایجاد بافتی با کم‌ترین ناسازگاری بافتی می باشد. برای مثال می توان اهداکننده ای با گروه خونی O که در آن بیان HLA با روش‌های ژنتیکی سرکوب شده است استفاده نمود(۶۰). هم‌چنین پیشنهاداتی مبنی بر ایجاد بانک‌های رده‌ای hESC ارائه دهنده ترکیبات ABO/HLA که به طور بالقوه با اکثریت بیماران مطابقت دارند، مطرح شده است. مطالعاتی نیز در تایید این پیشنهاد صورت گرفته است(۶۲،۶۱)، برای مثال Taylor و همکاران (۶۲) چنین ارزیابی کردند که تقریباً حدود ۱۵۰ رده سلولی hESC توانسته اند HLA ای را نشان دهند که با بیش تر جمعیت ایالات متحده انگلستان مطابقت دارد.

- مزایای استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی افزون بردیگر منابع سلول های بنیادی در سلول درمانی

سلول‌های بنیادی جنینی در کنار محدودیت‌هایی که به آن ها اشاره شد هم چنان می تواند به عنوان یک منبع سلولی بنیادی با ویژگی های منحصر در سلول درمانی و مطالعات کارآزمایی بالینی مورد توجه و استفاده قرار گیرد. از دیگر منابع سلول های بنیادی انسانی می‌توان به سلول‌های بنیادی بالغین و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) اشاره نمود. علی‌رغم hESC ها، این سلول ها را می توان به طور مستقیم از خود فرد تحت درمان به دست آورد. بنابراین به عنوان منبعی برای سلول درمانی که محدودیت های منبع آلوژنی را ندارند معرفی می شوند.

هم‌چنین کاربرد این منابع سلول های بنیادی در مطالعات پایه ای و کارآزمایی بالینی از نظر سیاسی و اخلاقی هیچ مشکلی ندارد در حالی که در مورد استفاده سلول‌های بنیادی جنینی مشکلات اخلاقی همواره از مسائل مهم قابل بحث بوده است. با این حال سلول های بنیادی بالغین و سلول های بنیادی چند پتانسیلی القا شده (iPSCs) محدودیت‌های قابل توجهی داشته به گونه ای که hESC ها به‌طور بالقوه بر این سلول ها غلبه می کنند(۶۰).

سلول‌های بنیادی بالغین از بافت های غیر جنینی مشتق می‌شوند و به طور معمول در بافت منشاء خودشان مسقر می باشند. سلول های بنیادی بالغین نیز همانند hESC ها دارای توانایی تجدید پذیری(خود نوسازی) می باشند. با این حال سلول های بنیادی بالغین بر خلاف hESC ها ، پتانسیل محدودی داشته و تنها این توانایی را دارند که به سلول های بافت منشاء خود تمایز یابند. معمولاً دیده می‌شود که سلول های بنیادی بالغین توانایی تولید انواع سلول از بافت منشاء را ندارند و یا نمی‌توانند رشد خود را در طول زمان حفظ کنند. مشکل دیگر مواجهه با سلول‌های بنیادی به دست آمده از افراد سالخورده و پیر می باشد که پتانسیل های مدنظر برای تمایز و تکثیر در آن ها کاهش یافته است(۶۳، ۶۴).

سلول‌های بنیادی چند پتانسیلی القا شده (iPSC) توسط سلول‌های سوماتیک تمایز یافته که دچار برنامه ریزی مجدد به مرحله پر توانی شده‌اند، تولید می‌شوند. این امر که نخست توسط Yamanaka و همکارانش در سال ۲۰۰۶ گزارش گردید، طی آن با فعال کردن چهار فاکتور تقریباً متفاوت Oct4,Klf4,Sox2 و C-myc در سلول‌های فیبروبلاست موشی، سلول‌هایی با ویژگی‌های مهم سلول های بنیادی رویانی پیشین به دست آمد که در سال ۲۰۰۷ این فرآیند روی سلول‌های انسانی نیز انجام شد(۶۵). برای بیان این فاکتورها و پرتوانی القایی متدهای مختلفی به کار گرفته شده است(۶۶). روش های مختلفی به منظور انتقال این فاکتورها به سلول های سوماتیک وجود دارد که برخی از آن ها هم چون انتقال رتروویروسی، لنتی ویروسی و آدنوویروسی همواره خطر ادغام ژنومی مضر و دایمی را دارا می باشند. علاوه بر این برخی رده‌های iPSC ایجاد شده از نظر ژنتیکی ناپایدار هستند به‌طوری که بازآرایی ژنومیکی در مقیاس بالا، ناپایداری و تغییرات در تعداد کپی و تعداد متعدد کپی از ژن، ناهنجاری کاریوتیپی حتی در مراحل اولیه پاساژ را نشان می‌دهند(۶۷). برای به حداقل رساندن جهش ها و آسیب های ژنومی استراتژی‌هایی مبنی بر ادغام بدون استفاده از پلاسمید طراحی و استفاده می‌شود، هم‌چون انتقال RNA سنتتیک، انتقال RNA یروسی یا افزودن پروتئین‌های نوترکیب خالص شده نفوذکننده به سلول(۶۸، ۶۹). با این حال این روش‌ها در تولید سلول‌های بنیادی چند پتانسیلی القا شده (iPSC) در مقایسه با ادغام ویروسی کارآمدی کم‌تری دارند. علاوه بر این در برخی رده‌های سلول‌های بنیادی چند پتانسیلی القا شده (iPSC) بدون استفاده از ناقل ویروسی، تاثیر مثبتی از لحاظ کاهش موتاژنیسیته مشاهده نشده است. مطالعات اخیر هم چنین نشان داده است که iPSCها علاوه بر تغییرات ژنومیکی، ویژگی‌های اپی ژنتیکی هم‌چون برنامه ریزی مجدد ناقص یا نابجا را شامل می‌شوند. از جمله این موارد الگوهای متیلاسیون DNA سلول‌های بنیادی پرتوان القایی می باشد که اغلب یاد آور سلول سوماتیک اولیه هستند و بیان کننده این امر می‌باشند که iPSC ها به طور کامل به مرحله پر توانی نرسیده‌اند(۷۰). هم‌چنین گزارشاتی از ماندگاری سلول های بنیادی جنینی به مدت هجده سال منتشر شده است که از این قبیل گزارشات برای سلول‌های iPS وجود ندارد(۷۱). با این وجود iPSC های خاص بیمار ممکن است برای درمان بیماری های مرتبط با پیری (سن) نامناسب باشند، چرا که به احتمال زیاد سلول‌های سوماتیک افراد مسن موتاژن های ژنومیکی و نقشه‌های اپی ژنتیک مضر در مقادیر بالا داشته باشند. مطالعات در زمینه ایمنی و اثر

بخشی درمانی سلولهای بنیادی چند پتانسیلی القا شده (iPSC) کماکان ادامه دارد.

بحث

از آن‌جایی که محدودیت‌های رده‌های سلول بنیادی جنینی در مطالعات پیش بالینی و روی حیوانات آزمایشگاهی قابل تشخیص بوده اند لذا بهبودی شرایط کشت و سلول های حاصل نیاز به مطالعات بیش تر دارد. از طرفی درمان بیماری های صعب العلاج و کاندید پیوند با استفاده از سلول درمانی به عنوان یک چشم‌انداز مطرح می‌باشند و نیاز به مطالعات افزون تر دارد. با این وجود رده سلول های بنیادی جنینی در طراحی روش‌های درمانی، کشف و شناسایی داروها به عنوان یک ابزار بالقوه امید فروانی را ایجاد کرده‌اند. از طرفی امروزه سلول درمانی به سمت استفاده از سلول‌های تمایزیافته مشتق از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها سوق یافته است که به این منظور سلول های بنیادی جنینی (ESC) به دلیل ویژگی‌های منحصر بیش‌تر مورد توجه و اهمیت واقع گردیده است. واضح است که هنوز چالش‌های علمی، اخلاقی و مسائل قانونی زیادی در زمینه استفاده درمانی از رده های سلول‌های بنیادی جنینی وجود دارد که باید مورد بررسی قرار گیرند. با این حال امیدوار کننده است که آزمایشات و مطالعات بالینی شامل استفاده از hESC ها در درمان را آغاز کرده‌اند و تلاش‌های گسترده ای به طور موثر در جریان هستند تا در نهایت hESC ها به انواع سلول‌های اختصاصی و قابل استفاده در سلول درمانی متمایز گردند. این مطالعات راه را برای نفوذ مزایای درمانی hESC ها برای پزشکی بازساختی به خصوص در بیماری های مرتبط با سن و پیری که در آینده ای نچندان دور مشکلات اصلی بخش درمان را شامل می‌شود، هموار می کند.

References

1. Evans MJ, K. M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292 (5819): 152-156.
2. Ali GPera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. J Cell Sci. 2000;113 (Pt 1):5-10olchin, Saba A. *In vitro fertilization and Laboratory conditions.* Oromieh, EelkAye. 2015
3. DebK D, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. J Transl Med 2008; 6: 7.
4. Shroff G. Transplantation of Human Embryonic Stem Cells in Patients with Multiple Sclerosis and Lyme Disease. Am J Case Rep 2016; 17: 944-949.
5. Gargett CE. Stem cells in human reproduction. Reproduction. 2010; 140: 1-2.
6. Wikipedia, F. Stem cell. 2, (2014).
7. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med. 2000; 6(2): 88-95.
8. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. Cell Stem Cell. 2015; 17(1): 11-22.
9. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. Hepatology. 2007; 45(5): 1229-1239.
10. Agarwal S, Holton KL, Lanza R.. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. Stem Cells. 2008; 26(5): 1117–1127.

11. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat Biotechnol. 2008; 26(4): 443-452.
12. Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, Wetsel RA. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. Proc. Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(11): 4449–4454.
13. Ng ES , Davis RP, Azzola L, Stanley EG, Elefanty AG. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. Blood. 2005; 106(5): 1601–1603.
14. Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, Du Z, Werbel B V C, Pearce RA, et al. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. Stem Cells. 2005; 23(6): 781-790.
15. Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Miller RJ, Kessler JA. The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. Stem Cells. 2011; 29(5): 802-811.
16. Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee J H, Choi J, Chong YS, et al. Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. Stem Cell Reports. 2015; 4(5): 860-872.
17. Schwartz SD, Regillo CD, Larm BL, Eliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. Lancet. 2015; 385(9967): 509–516.
18. Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA,et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2005; 23(2): 215221.
19. Health U S N I. A phase 1 safety study of GRNOPC1 in patients with neurologically complete, subacute, spinal cord injury. 2011; Avaiable at: http://clinicaltrials.gov/archive/NCT01217008/2011_03_09.2010.
20. Sharp J, Frame J, Siegenthaler M, Nistor G, Keirstead HS. Human embryonic stem cell-derived Cervical, oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after spinal cord injury. Stem Cells. 2010; 28(1): 152–163.
21. Menasche ´ P, Vanneaux V, Fabreguettes J-R, Bel A, Tosca L, Garcia S, et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. Eur Hear J. 2015; 36(12): 743-750.
22. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, Bhoumik A, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. PLoS One. 2012; 7(5): e37004.
23. Kushner JA, MacDonald PE, Atkinson MA. Stem cells to insulin secreting cells: Two steps forward and now a time to pause? Cell Stem Cell. 2014; 15(5): 535-536.
24. CARLSBAD C, ISCO. International Stem Cell Corporation to Conduct Parkinson's Disease Clinical Study in Australia. Available at: http://www.marketwired.com/press-release/international-stem-cell-corporation-conduct-parkinsons-disease-clinical-study-australia-otcqb-isco-1987126.htm (2015).

25. Canet-Aviles R, Lomax GP, Ellen G. Proceedings: Cell Therapies for Parkinson ' s Disease from Discovery to Clinic. Stem Cells Trans Med. 2014, 3: 979-991.
26. Takagi, Y. Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. 2005; 115 (1): 102-109.
27. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders–how to make it work. Nat Med. 2004; 10: S42–S50.
28. Abbott A. Fetal-cell revival for Parkinson's. Nature. 2014; 510(7504): 195-196.
29. Barker RA. Developing stem cell therapies for Parkinson's disease: Waiting until the time is right. Cell Stem Cell. 2014; 15(5): 539–542.
30. Grealish S, Diguet E, Kirkeby A, Mattsson B, Heuer A, Bramoulle Y, et al. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. Cell Stem Cell. 2014; 15(5): 653–665 .
31. SongW K, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY, et al. Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. Stem Cell Reports. 2015; 4(5): 860–872.
32. Cyranoski D. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells. 2014. Available at: http://www.nature.com/news/japanese–woman–is–first .Sep 12 ,2014
33. TurnerM, Leslie S, Martin NG, Peschanski M, Rao M, Taylor CJ, et al. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. Cell Stem Cell. 2013; 13(4): 382–384.
34. Crook JM, Hei D, Stacey G. The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): Raising standards to bank on. In Vitro Cell Dev Biol Anim. InVit Cell Dev Biol Anim. 2010; 46(3-4): 169-172.
35. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Sirac dilber M, Hovatta O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. Hum Mo Genet. 2008; 17(R1): R48-53.
36. Carpenter MK, Rao MS. Concise review: making and using clinically compliant pluripotent stem cell lines. Stem Cells Transl Med. 2015; 4(4): 381-388.
37. United States Food and Drug Administration. Guidance for FDA reviewers and sponsors: Content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human somatic cell therapy investigational new drug applications (INDs). https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Xenotransplantation/ucm074131.htm
38. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase immortalized midbrain astrocytes. Nat Med. 2006; 12(1): 1258–1268.
39. Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M T, Bussow H, Beck H, et al. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. J Neurosci. 2004; 24(22): 5258-5268.
40. Gepstein L, Ding C, Rahmutula D, Wilson EE, Yankelson L, Caspi O. In vivo assessment of the electrophysiological

integration and arrhythmogenic risk of myocardial cell transplantation strategies. Stem Cells. 2010; 28(12): 2151–2161.

41. King FW, Liszewski W, Ritner C, Bernstein HS. High throughput tracking of pluripotent human embryonic stem cells with dual fluorescence resonance energy transfer molecular beacons. Stem Cells Dev. 2011; 20(3): 475-484.
42. Stasi K, Goings D, Huang J, Herman L, Pinto F, Addis RC, et al. Optimal isolation and xeno-free culture conditions for limbal stem cell function. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55(1): 375-386.
43. Catalina P, Montes R, Ligero G, Sanchez L, de la CT, Bueno C, et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hesc lines due to inherent properties? Mol Cancer. 2008;7: 76.
44. Gaur M, Ritner C, Sievers R, Pedersen A, Prasad M, B. HS, Y. Y. Timed inhibition of p38MAPK directs accelerated differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes. Cytotherapy. 2010; 12(6): 807-817.
45. Wong SS, Bernstein HS. Cardiac regeneration using human embryonic stem cells: Producing cells for future therapy. Regen Med. 2010; 5(5): 763-775.
46. Ritner C, Wong SS, King FW, Mihardja SS, Liszewski W, Lee RJ, et al. An engineered cardiac reporter cell line identifies human embryonic stem cell derived myocardial precursors. PLoS One. 2011; 6(1): e16004.
47. Hannoun Z, Fletcher J, Greenhough S, Medine C, Samuel K, Sharma R, Pryde A, et al. The comparison between conditioned media and serum-free media in human embryonic stem cell culture and differentiation. Cell Reprogram. 2010; 12(2): 133–140.
48. Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, et al. Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells. PLoS One. 2013; 8(1): e55226.
49. Catalina P, Montes R, Ligero G, Sanchez L, de la C Cueva, Bueno C, et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hesc lines due to inherent properties? Mol Cancer. 2008; 7: 76.
50. Strom S, Holm F, Bergstrom R, Stromberg AM, Hovatta O. Derivation of 30 human embryonic stem cell lines—improving the quality. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2010; 46(3-4): 337–344.
51. Ilic D, Giritharan G, Zdravkovic T, Caceres E, Fisher SJ, Krtolica A, et al Derivation of human embryonic stem cell lines from biopsied blastomeres on human feeders with minimal exposure to xenomaterials. Stem Cells Dev. 2009; 18(9): 1343.
52. Ding Y,Yang H, Yu L, Xu CL, Zeng Y, Qiu Y, et al. Feeder-free and xeno-free culture of human pluripotent stem cells using UCBS matrix. Cell Biol Int. 2015; 39(10): 1111–1119.
53. Lefort N, Feyeux M, Bas C, Feraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, et al. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11. 21. Nat Biotechnol. 2008; 26: 1366-366.
54. Narva E, Autio R, Rahkonen N, Kong L, Harrison N, Kitsberg D, et al. High resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture induced copy number

changes and loss of heterozygosity. Nat Biotechnol. 2010; 28(4): 371-377.
55. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, et al. Adaptation to culture of human stem cells and oncogenesis in vivo. Nat Biotechnol. 2007; 25(2): 207-215.
56. Fu X, Cui K, Yi Q, Yu L. Xu Y. DNA repair mechanisms in embryonic stem cells. Cell Cycle. 2005; 4 (3): 363-364.
57. Bradley JA, Bolton EM, Pedersen RA. Stem cell medicine encounters the immune system. Nat Rev Immunol. 2002; 2(11): 859-871.
58. Lee JE, Kang MS, Park MH, Shim SH, Yoon TK, Chung HM, et al. Evaluation of 28 human embryonic stem cell lines for use as unrelated donors in stem cell therapy: Implications of HLA and ABO genotypes. Cell Transplant. 2010;19(11):1383-1395.
59. Bradley JA, Bolton EM PR. Stem cell medicine encounters the immune system. Nat Rev Immunol. 2002; 2(11): 859-871.
60. Drukker M. Immunogenicity of human embryonic stem cells: Can we achieve tolerance? Springer Semin Immunopathol. 2004; 26(1-2): 201-213.
61. Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N. Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. Stem Cells. 2007; 25(4): 983-985.
62. Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S, Sharples LD, Pedersen RA, Bradley JA. Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. Lancet 2005; 366(9502): 2019-2025.
63. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone. 2003; 33(6): 919-926.
64. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair current views. Stem Cells. 2007; 25(11): 2896-2902.
65. Kaiming Ye , Sha J. Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. New York City: Humana Press; 2011.
66. Somersall AC. The amazingpower of Stem Cell Nutrition. Kuala Lumpur, Natural Wellness Group. 2013.
67. Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz Bourget J, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature. 2011; 471(7336): 63-67.
68. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell. 2009; 4(6): 472-476.
69. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell. 2009; 4(5): 381-384.
70. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature. 2011; 471(7336): 68-73.
71. Pruksananonda K, Rungsiwiwut R, Numchaisrika P, Ahnonkitpanit V, Isarasena N, Virutamasen P. Eighteen-year cryopreservation does not negatively affect the pluripotency of human embryos: evidence from embryonic stem cell derivation. Biores Open Access. 2012; 1(4): 166–173.