

استانداردهای استفاده از سلول های بنیادی انسانی در تحقیقات

تابستان 1402

www.isscr.org

حامیان انتشار
مطالب

BURROUGHS
WELLCOME
FUND 



DORIS DUKE
FOUNDATION

SFARI
SIMONS FOUNDATION
AUTISM RESEARCH INITIATIVE

ترجمه شده توسط

Dr. Mahsa Mollapour Sisakht
Mehregan Babamohamadi
Behnaz Barghian-Zarnaghi
Mohammad Taha Salmani Fard
Ardestani
Fatemeh Gholizadeh
Kosar Norouzi



INTERNATIONAL
SOCIETY FOR
STEM CELL
RESEARCH

پیش گفتار

مطالعات حوزه سلول های بنیادی در طول سال های اخیر و در ایران روند تصاعدی را نشان می دهد، تعدد شرکت های دانش بنیان ثبت شده در این حوزه و تلاش علاقمندان نشان دهنده ی افق روشن پیش روی این دانش در ایران می باشد. با این حال، به دلایل مختلفی از جمله ی کاهش بودجه ی طرح های تحقیقاتی و موسسات حمایت کننده ی تحقیقات و فناوری در این حوزه، گران قیمت بودن فناوری، عدم تمرکز محقق اصلی پروژه و تمایل ورود سریع به بازار منجر شده است که محققین در سطح دانشگاه و صنعت دست به انتشار نتایج آزمایشاتی بزنند که قدرت تکرار پذیری پایینی دارد، این مهم در بسیاری از موارد منجر به باز پس گیری مقالات پس از انتشار اطلاعات شده و در سال 2023 و به گزارش مجله ی معتبر نیچر، ایران را در رده ی هفتم از مقالات تقلبی پس از کشورهای عربستان سعودی، پاکستان، روسیه، چین، مصر، و مالزی قرار گرفت.

در این گزارش که نشر Hindawi به عنوان ناشری با بیشترین تعداد مقاله ی بازپس گرفته شده¹ معرفی شده است، وجود نویسندگان جعلی، عدم کیفیت مطالعات انجام شده که منجر به گزارش تضاد منافع از سوی سایر محققین می گردد، تکرار ناپذیری و نشر سریع اطلاعات با کیفیت پایین را از جمله مهمترین دلایل باز پس گیری مقالات می شمارد.

از این رو و در این کتاب، که ترجمه ای از گزارش ارزشمند standards for human stem cell in research می باشد که در June 2023، توسط international society for stem cell research منتشر شد، برآنیم که با معرفی راهکارهای مختلف جهت افزایش قدرت تکرارپذیری مطالعات سلول های بنیادی را توصیف کرده و گزارشی مختصر از مسیرهای قابل انجام به منظور افزایش قدرت مطالعات را تشریح کنیم.

این کتاب شامل توصیه هایی است که به محققین در سطوح مختلف کمک می کند مسیر استاندارد کار با سلول های بنیادی انسانی را از نقطه ی شروع یعنی تهیه ی مواد اولیه، تا ادامه یعنی ایجاد بیوبانک و ویژگی یابی و انتها ثبت و نحوه ی گزارش اطلاعات را فرا بگیرند.

بر کسی پوشیده نیست که رعایت اصول و استانداردهای کار با سلول های بنیادی می تواند منجر به تولید اطلاعات قابل اعتماد گردد که پتانسیل گسترش با کیفیت مسیر علم را دارد و از سوی دیگر، روشنگر مسیر پژوهشگران صنعتی در واحدهای تحقیق و توسعه ی شرکت های دانش بنیان و فناوری با تولید اطلاعات روشن که توانمندی عبور از گلوگاه های سازمان غذا و دارو را دارد، گردد.

همچنین در کتاب پیش رو، و از آنجا که فناوری های لبه ی دانش همچون کشت سه بعدی سلول های بنیادی (فناوری ارگانوئید، میکروفلوئیدیک، ارگان بر روی تراشه، ...) به عنوان فصلی نوین که نیازمند تعریف و ویژگی یابی دقیق است معرفی شده است، ما را بر آن داشت که دانش کسب شده در زمینه ی کشت، رشد، ویژگی یابی و تایید ماهیت ارگانوئید و توموروئید را به نحوی که منجر به تولید یک مدل قابل اعتماد گردد، معرفی و تشریح کنیم. امید به گام برداشتن در مسیر واقعی علم و تولید نتایجی که در عرصه ی درمان، از آلام بیماران این مرز و بوم بکاهد.



مقدمه

یکی از اهداف اولیه مطالعات سلول‌های بنیادی، شناسایی و کنترل مکانیسم‌هایی است که در کنترل رفتار سلول‌های بنیادی، توانایی تولید انواع سلول‌ها و بافت‌ها از آن‌ها به منظور استفاده در تحقیقات پایه‌ای و مطالعات بالینی مورد استفاده قرار بگیرد. با هدف افزایش دقت، قابل اعتماد بودن اطلاعات خروجی و امکان تکرارپذیری خروجی مطالعات، اصول مورد نیاز و استانداردهای ثابت و با کیفیت قابل اجرا در طول تمام مراحل تحقیق یا فرایند تحقیق و توسعه باید مورد توجه واقع شود.

این مهم به خصوص در تحقیقاتی که شامل کشت سلول‌های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود، متکی بر استفاده از استاندارد و ویژگی‌یابی مشخص است و زمانیکه این اصول با دقت بالا و به شکل مستمر اجرا شود، باعث می‌شود که ضریب اطمینان به خروجی‌های مطالعات و تسهیل تکرارپذیری نتایج در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی تضمین شود.

انواع مختلف از سلول‌های کشت داده شده، سیستم‌های زنده و پویایی هستند که در پی رسیدن به حالت سلولی خاص و به عنوان جایگزینی در تسهیل مطالعات و تحقیقات در آزمایشگاه‌ها یا بخش‌های تحقیق و توسعه‌ی شرکت‌های حوزه زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مورد سلول‌های بنیادی، کشت آنها مدل‌های تجربی در دسترسی را برای مطالعه رشد و توسعه سلول‌ها و بیماری‌ها در دسترس قرار می‌دهند، و امکان تولید سلول‌ها و بافت‌های کاربردی را با پتانسیل درمانی فراهم می‌کند.

ویژگی‌یابی سلول‌ها برای اطمینان یافتن از یکپارچگی سلول‌های کشت داده شده، ایجاد پروفایل‌های پایه‌ای بر اساس فنوتیپ سلول و ارائه بینش در مورد اینکه کدام سلول با صحت و دقت بالاتری می‌تواند برای مدل‌سازی زیستی مورد استفاده قرار بگیرد، به شدت ضرورت دارد.

بنابر همین دلیل، ویژگی‌یابی و تعیین خصوصیات ساماندهی شده دارای تأثیر مستقیم و قابل توجهی بر توانایی جمع‌آوری داده‌های تکرارپذیر و دقت در تفسیر داده‌ها توسط محقق دارد.

مشکلات در تکرارپذیری‌های داده‌ها در مطالعات پایه‌ای و مطالعات منتهی به بالین، می‌تواند منجر به کاهش دقت و پیشرفت این مطالعات گردد (Baker, 2016; Drucker, 2016). زمانیکه این داده‌ها به شکل ساماندهی شده‌ای اجرا شوند و با شیوه‌های مناسب مستندسازی همراه گردند، منجر به تسهیل تکرارپذیری و افزایش دقت میشوند.

نتایج مطالعات تجربی می‌شود. مزایای استفاده از چنین ویژگی‌یابی منسجمی در کاهش اتلاف مواد اولیه و زمان برای انجام نشدن مطالعاتی که قابلیت تکرارپذیری ندارند، قابل توجه است. علاوه بر این، چاپ مقالات بر اساس رده‌های سلولی که به خوبی تعیین خصوصیات شده‌اند منجر به تولید داده‌های با دقت بالاتر می‌شود که در نهایت این مهم خود منجر به پیشرفت و سرعت یافتن تحقیقات در این حوزه می‌گردد.

نیاز به پیاده‌سازی استانداردها و ارتقا تکرارپذیری داده‌های علمی منتشر شده، موضوعی است که در سال‌های اخیر در سطوح بالا مورد بحث و تبادل نظر قرار گرفته است و توسط مجلات علمی بزرگ مورد تأکید قرار گرفته است. (Nature Editorial, 2013; Baker, 2016). پیشرفت روش‌های کشت سلول از جمله کشت بافت و سلول‌های بنیادی پرتوان، و افزایش تقاضا و نیازهای فنی تولید کشت‌های سلولی پایدار و نتایج تکرارپذیر با این سلول‌ها، زمینه‌ای است که به دقت و تخصص قابل توجهی نیاز دارد. بنابراین، برای بهبود دقت و تکرارپذیری تمامی مطالعاتی که از سلول‌های بنیادی استفاده می‌کنند، استفاده از استانداردهای کیفی پذیرفته شده در سطح بین‌المللی مورد نیاز است. استانداردهایی که متضمن موفقیت پروژه‌های تحقیقاتی محققان هستند، دقت را در تحقیقات پیش‌بالینی تضمین می‌کند و در نهایت منجر به تقویت خط تولید درمانی را برای بیماران حاصل می‌کند.

²stem cell research

³In vitro

⁴Cell line

⁵Tissue culture

⁶Pluripotent stem cells



فصل اول

ویژگی یابی اولیه

۴

تلاش برای رسیدن به تکرارپذیری در تحقیقات و تعیین خصوصیات دقیق در تحقیقات، به ویژه آنهایی که برای شروع آزمایش ها مورد استفاده قرار می گیرند، دارای اهمیت فوق العاده ای می باشد. این بخش اصول کلیدی و ضروری را برای تولید، نگهداری و ویژگی یابی اولیه سلول های بنیادی مهم و ضروری است را بررسی میکند.

توصیه های اختصاصی در زمینه های زیر ارائه شده است:

- مسیرهای تهیه ی مواد اولیه
- بیو بانک (بانک های زیستی) اولیه
- تهیه شناسنامه و احراز هویت سلول
- از بین بردن تراریختگی (ترانس ژنیک)
- اطمینان یافتن از سلامت اولیه سلول

انجام این روش های ضروری گفته شده، پایه و اساس اصول با دقت بالا و تکرار پذیر را در آزمایشگاه فراهم می کند، که منجر به افزایش قابلیت اطمینان و اعتبار انتشارات متعاقب این مطالعات می شود.



تهیه مواد اولیه

توصیه 1.1.1: مواد (مانند نمونه های اهدا کننده، بافت های اولیه یا رده های سلولی) باید بین آزمایشگاه ها با استفاده از توافق نامه های انتقال که تمام محدودیت های اهدا کننده و تأمین کننده/ارائه دهنده مرتبط را شامل شود، صورت پذیرد. محققان و کارکنان آزمایشگاه باید این دستورالعمل ها را قبل از شروع هر آزمایشی بخوانند و با هرگونه محدودیت اضافی (به عنوان مثال موارد اخلاقی عدم افشای اطلاعات اولیه ی دهنده ی بافت،...) و الزامات مربوط به استفاده از مواد و داده های مرتبط آشنا باشند.

توافق نامه انتقال مواد (MTA) یا توافق نامه های مشابه (MoU) و غیره، یک توافق نامه الزام آور قانونی است که شرایط انتقال و استفاده از مواد و داده ها را تعیین می کند (Bubela et al., 2015). این توافقنامه در انتقال مناسب مواد برای کاربران بالقوه به منظور آگاهی فرد از محدودیت های استفاده از مواد، حمایت از حقوق کاربر و مؤسسات آنها، و مهم تر از همه در تحقیقات انسانی، اهداکنندگان ضروری است. MTA باید به گونه ای طراحی شود که شامل تمامی مقررات رضایت آگاهانه شده و محدودیت های لازم برای استفاده از اطلاعات خروجی و ابر داده های مرتبط با نتایج را نیز پوشش دهد.

توجه به این نکته مهم است که مقررات ممکن است از منطقه ای به منطقه دیگر به منظور استفاده از مواد و داده های مرتبط (به عنوان مثال، منابع مجاز مواد اولیه، اشتراک گذاری اطلاعات ژنتیکی و غیره) متفاوت باشد، بنابراین، آگاهی از مقررات منطقه ای و ملی مانند GDPR (مقررات عمومی حفاظت از داده ها) برای استفاده از اطلاعات در استفاده یا انتقال مواد یا به اشتراک گذاری نتایج مرتبط پیش از هر اقدامی ضروری است. همچنین بایستی راهبرد و شیوه حفاظت از داده ها نیز تعیین شود (به عنوان مثال <https://ria.princeton.edu/human-research-protection/data/what-kind-of-data-protect>).

علاوه بر این، در حالی که آزمایشگاه ها باید با قوانین و مقررات منطقه ای مطابقت داشته باشند، در حالت ایده آل این قوانین باید سازگاری با اصول بین المللی ارائه شده توسط نهاد های مربوطه مانند انجمن بین المللی تحقیقات سلول های بنیادی (ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation, 2021) را نیز داشته باشد.

مهمتر از همه، در جایی که شرایط قانون گذاری یک کشور یا منطقه، برحسب تصمیمات داخلی یک یا بخشی از تعهدات لازم برای تحقیقات سلول های بنیادی را ممنوع می کند، آزمایشگاه یا شرکت انجام دهنده ی تحقیق باید بتواند اقدامات جایگزین جهت تأمین تضمین کیفیت را جایگزین کند (The International Stem Cell Banking Initiative, 2009).

¹¹donor samples

¹²primary tissues

¹³Cell lines

¹⁴Material Transfer Agreement (MTA)

¹⁵Memorandum of Understanding (MoU)

¹⁶General Data Protection Regulation



اصول تهیه بانک سلولی از رده های سلول های بنیادی به منظور نگهداشت طولانی مدت

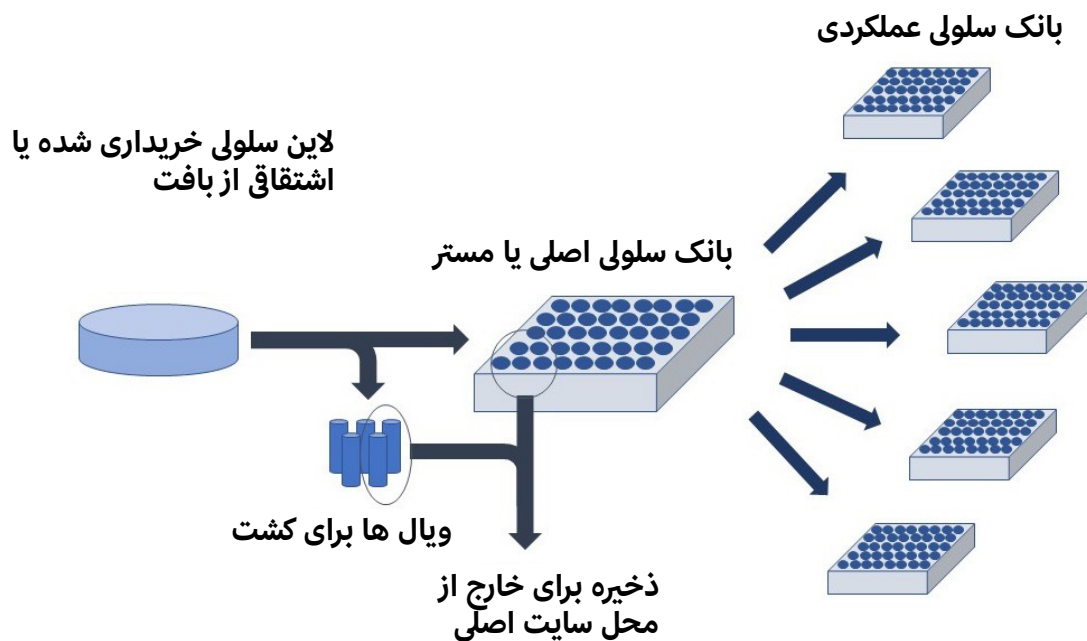
توصیه 1.2.1: پس از تولید رده های سلول های بنیادی، یک بانک سلولی اصلی یا مَستر (MCB) باید قبل از هر گونه استفاده یا توزیع سلول ها ایجاد شود. بانک سلولی مَستر باید از اولین پاساژهای ممکن از رده سلولی تولیدی یا بسط و توسعه کشت غیر چسبنده ایجاد شده باشد. هم چنین باید تعیین ویژگی های سلول قبل از هر گونه استفاده ای مشخص شود.

تهیه بانک زیستی از رده های سلول های بنیادی برای اطمینان از حفظ و نگهداری و در دسترس بودن سلول های که کیفیت آنها کنترل شده است برای تحقیقات علمی و تولید محصول ضروری است (Coecke et al., 2005; Crook and Ludwig, 2017; International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), 2005; "OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres," 2007; Pamies et al., 2022). سلول های فریز و ذخیره شده باید از منابع قابل ردیابی و قابل اعتماد (مانند رده های سلولی، نمونه های اهدا کننده یا بافت های اولیه) و معرف های با کیفیت (محیط کشت، ماتریکس و مکمل ها) با استفاده از شیوه نامه ها و روش های استاندارد شده تهیه شوند، که به خوبی مستند شده و دارای اثر منفی بر کیفیت سلول ها و تحقیقات در آینده نباشند. هرگونه انتخاب عمده سلول ها یا دستکاری در سلول ها (ساب کلونینگ، ویرایش ژن، و غیره) منجر به ایجاد یک رده سلولی جدید می شود، در نتیجه ایجاد بانک سلولی اصلی یا مَستر جدید (MCB) و تمامی آزمایش های مرتبط با آن ضرورت پیدا می کند.

پس از حصول یک رده سلول بنیادی، قبل از هر کار آزمایشی، ایجاد یک بانک سلولی مَستر و پس از آن تاسیس بانک سلولی کاربردی (WCB) به شدت توصیه می شود. برای رسیدن به اهداف این توصیه ها، رده سلولی به هر نسلی از سلول گفته می شود که بتواند قبل از رسیدن به سن پیری به طور سریالی و پشت سرهم پاساژ داده شده و امکان ایجاد بانک سلولی را داشته باشد. ایجاد بانک های سلولی مَستر در مقیاس کوچک حتی برای یک آزمایشگاه متوسط دانشگاهی ضروری است، زیرا منابع سلولی مشترک و تعیین خصوصیت شده مبنای دقت و تکرارپذیری در نتایج تحقیقات می باشد. این سلول ها بدون در نظر گرفتن تعداد پاساژ و یا نامیرا بودن، به عنوان مبنایی برای ادامه تحقیقات عمل کرده و می توانند برای توزیع در سایر گروه های تحقیقاتی استفاده شوند، بنابراین باید بیوبانک، نگهداری و تعیین خصوصیات شوند. حفظ و نگهداری پاساژهای اولیه (ویال های سلولی) باعث محافظت سلول های اصلی در برابر از بین رفتن ناشی از آلودگی، یا استفاده نادرست سهوی می شود. استفاده از یک سیستم تهیه بانک سلولی دو قسمتی (یک قسمت بانک سلولی اصلی یا مَستر و یک قسمت بانک سلولی کاربردی) برای امکان تولید مداوم ذخایر سلولی به منظور استفاده در آزمایشات به نحوی که در تصویر 1 نشان داده شده است توصیه می شود (شکل 1).

برای اطمینان از اینکه بانک سلولی مَستر دارای سلول های همگن و واحد باشد، سلول های کشت داده شده از فلاسک های مختلف در پاساژ پایین باید قبل از انجماد با هم ادغام شوند. این موضوع منجر به ایجاد سازگاری اکتسابی از سلول ها شده که تکرارپذیری را ارتقا می دهد و به طور مساوی برای تولید در نسل های مختلف از بانک های سلولی کاربردی (WCB) اعمال می شود.

¹⁷Cell Line Biobanking¹⁸Preservation¹⁹Master Cell Bank²⁰non-adherent culture²¹media²²matrices²³subcloning²⁴gene editing²⁵Working Cell Banks (WCB)



شکل 1. استراتژی تهیه بانک سلولی دو قسمتی. کشت اولیه (رده سلولی مشتق شده یا مهندسی ژنتیک شده) گسترش و کشت داده شده و ویال های باید در کشت جهت پاساژهای بعدی باقی بماند (seed vials) جداسازی می شوند. سایر سلول ها در بانک سلولی اصلی به شکل منجمد نگهداری می شود، که می توان از آن بانک های سلولی کاربردی متعدد (WCB) را برای تحقیقات بعدی ایجاد کرد. ذخایر (استوک های) از بانک سلولی اصلی (فقط برای بازیابی پس از از دست رفتن کشت اولیه یا جهت تولید مجدد بانک های سلولی مستر در آینده) می تواند در محلی خارج از محل انجام آزمایشات نگهداری شوند.

از آنجایی که بانک سلولی مستر اساس تمام کارهای آینده با رده سلول های بنیادی خواهد بود، باید به خوبی تعیین خصوصیات شود (به پیوست 1، جدول A1.1 مراجعه کنید). سیستم دو قسمتی اجازه می دهد تا تعیین خصوصیات بانک سلولی اصلی و بانک سلولی کاربردی، مقرون به صرفه تر شده و متضمن در دسترس بودن مواد با کیفیت بالا برای سایر آزمایشات در یک آزمایشگاه یا بخش تحقیق و توسعه می باشد. نگهداری و حفظ بخشی از بانک سلولی مستر در خارج از محل انجام تحقیقات، ترجیحا خارج از محل جغرافیایی پژوهش، برای محافظت در برابر ضایعات ناشی از حوادث فاجعه بار محلی (مانند خرابی فریزر، بلایای طبیعی و غیره) به شدت توصیه می شود.

آزمایشگاه های سلول های بنیادی باید تحقیقات خود را با استفاده از سلول های تأیید ماهیت شده انجام دهند، سلول های فوق باید به شکل انجماد یافته و کشت داده شده در چارچوب اصول تضمین کیفیت تهیه شوند (Crook et al., 2010; Crook and Stacey, 2014; Stacey et al., 2013). حداقل، همه پروتکل های معمول آزمایشگاهی باید به خوبی مستند شده، همه کارها باید قابلیت ردیابی داشته باشند، و همه تجهیزات اصلی کار باید به طور منظم نظارت و نگهداری شوند.

چنانچه امکان انجام این کارها برای همه ی آزمایشگاه های دانشگاهی قابل انجام نباشد، محققان باید تلاش کنند تا حد ممکن به استانداردهای عملکرد آزمایشگاهی پایبند باشند (https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-A/part-58). این شیوه ها و فرآیندها منجر به تضمین کیفیت و یکپارچگی رده های سلولی شده، که نهایتاً می تواند ایمنی و عملکرد سلول در تحقیق اصلی را قابل پیش بینی کند.



احراز هویت رده سلول های بنیادی

توصیه 1.3.1: سلول های مورد استفاده در تحقیقات باید احراز هویت شوند. تحلیل های کوتاه مدت و تکرار پذیر (STR) برای احراز هویت رده های سلولی توصیه می شود.

احراز هویت موارد شروع کننده ی یک تحقیق از این نظر دارای اهمیت می باشد که تایید کننده ی صحت شروع کار توسط محققان بوده و نشان می دهد که این مواد فاقد هر گونه آلودگی متقابل با سلول هایی از منبع دیگر (آلودگی متقابل یا متقاطع که از سایر منبع سلولی به سلول دیگر در انکوباتور منتقل می شود) هستند. متأسفانه، به دلیل ماهیت سلول، کشت سلولی در شرایط *in vitro*، امکان رخداد خطاهایی را فراهم می کند که می تواند منجر به شناسایی نادرست و یا آلودگی متقاطع با رده های سلولی دیگر در آزمایشگاه شود، این امر موضوعی است که به شکل طولانی مدت و مستند شده نقش بزرگی در نتیجه گیری های تجربی دارای خطا، انتشار و نهایتاً استرداد مقالات دارد (Casadevall et al., 2014; Freedman et al., 2015; Horbach and Halfman, 2017; Souren et al., 2022). این امر نیاز به احراز هویت را در رده های سلولی های بنیادی به طور خاص و همه ی انواع سلول ها به صورت کلی، برجسته تر می کند و منجر به پایایی داده های به دست آمده از یک تحقیق می شود.

اصولاً نیاز به تأیید اعتبار مواد شروع کننده ی یک تحقیق برای تحقیقات با کیفیت ضروری بوده و این امر با آزمایش مستقیم مواد و قابلیت ردیابی دقیق آنها قابل دستیابی می باشد. در مورد رده های سلولی به ویژه سلول های بنیادی که می توانند به طور نامحدود پاساژ داده شوند، خطر قابل توجهی وجود دارد که سلولی که به شکل اشتباهی مشخصه یابی شده است، به طور گسترده تکثیر شده و به طور بالقوه منجر به انحراف داده ها و اطلاعات خروجی تحقیقاتی از اصول بین المللی شود.

بنابراین، در مورد رده های سلولی، تست های تعیین هویت به شدت توصیه می شود. برای بافت ها و سلول هایی که به تعداد کم پاساژ داده می شوند، مانند سلول های بنیادی بافتی (TSC)، تأثیر حضور سلول های تغییر یافته یا دارای آلوده های متقاطع کمتر است. بنابراین، برای چنین موادی ممکن است اینگونه استدلال شود که آزمایش ژنتیکی همه ی کشت ها ضرورت ندارد. با این حال، در این شرایط، محققین باید از منبع موادی که استفاده می کنند از نگاه امکان کنترل و قابلیت ردیابی، اطمینان حاصل کنند.

مستند سازی و آزمایش دقیق بانک های سلولی به شکل تمرکز یافته در نهایت منجر به کاهش خطا در احراز هویت اشتباه شود و مستندات کافی به منظور دریافت منابع مالی پژوهش یا انتشار آن را از سوی سازمان ها و نهادهایی که سرمایه گذاری مطالعات را فراهم می کنند و نیازمند مستندات احراز هویت رده سلولی هستند را فراهم میکنند (Nature Editorial, 2013; "Guidance: Rigor and Reproducibility in Grant Applications," 2019).

از چندین روش می توان برای احراز هویت رده های سلولی، از جمله تحلیل های کوتاه مدت و تکرارپذیر (STR)، پروفایلینگ پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP)، توالی یابی کل ژنوم (WGS)، و سایر فناوری های پروفایلینگ DNA استفاده کرد. همه موارد ذکر شده، استراتژی های احراز هویت قابل قبولی هستند که می توانند در آزمایشگاه برای شناسایی و تایید هویت رده های سلولی استفاده شوند. با این حال، تنها تجزیه و تحلیل STR به طور رسمی به یک استاندارد بین المللی شناخته شده و مورد تایید برای احراز هویت رده سلولی انسانی تبدیل شده است (Almeida et al., 2016).



STR standards document "Authentication of Human Cell Lines: Standardization of Short Tandem Repeat (STR) Profiling. ANSI/ATCC ASN-0002-2021" ANSI/ATCC ASN-0002-2021 و پروتکل های دقیق برای تجزیه و تحلیل STR را ارائه می دهد. مزایای استفاده از STR بسیار زیاد است، از جمله آنها می توان به مقرون به صرفه بودن، تکرارپذیری، قابلیت مقایسه نتایج در بین پلتفرم های دیگر و توانایی تشخیص چندین منبع سلول در یک کشت را اشاره کرد. صرف نظر از استراتژی احراز هویت انتخاب شده، به منظور محافظت از حریم خصوصی اهداکنندگان، پروفایل های ژنتیکی مورد استفاده برای احراز هویت نباید عمومی شود.

توصیه a.1.3.1: هنگام احراز هویت سلول های بنیادی، باید از یک نمونه مرجع از دهنده اصلی برای تأیید منشأ استفاده شود. در مواردی که سلول های اهدا کننده در دسترس نباشد، می توان از پروفایل به دست آمده از اولین پاساژ های موجود به عنوان مرجع استفاده کرد.

توصیه می شود از رده سلولی که مستقیماً از اهدا کننده کشت داده شده برای ایجاد یک پروفایل مرجع به منظور احراز هویت سلول ها، استفاده شود. این امر اجازه می دهد تا تعیین خصوصیات، بدون ابهام در تأیید هویت فرد و ردیابی رضایت نامه فرد باشد.

توصیه b.1.3.1: احراز هویت رده های سلول های بنیادی باید در محل استقرار MCB انجام شود.

هنگامی که بانک سلولی ماستریا اصلی ساخته شد (بخش 1.2)، باید مطابقت کشت سلولی بدست آمده با نمونه مرجع اولیه تأیید شود. برای مواردی که سلول ها دستکاری ژنتیکی یا پاساژ داده می شوند، توصیه می شود که در نقاطی که دستکاری انجام شده است (مانند ویرایش ژن، جداسازی کلون های سلولی و غیره) یا در پایان مطالعات ارزیابی تطابق انجام شود تا از پیوستگی و دوام ماهیت سلول های اصلی در طول فرآیندهای تجربی اطمینان حاصل شود.

در حالت ایده آل، اعم از سلول یا ماده ی اولیه، مواردی که از خارج از یک آزمایشگاه تامین می شوند (مواردی که توسط همکاران به اشتراک گذاشته می شوند) باید فقط از استوک های احراز هویت شده (MCB یا WCBS) تهیه شده و آزمایشگاه دریافت کننده باید رده سلولی را پس از دریافت، احراز هویت کند. هر گونه کشت سلولی زنده که بین آزمایشگاه ها جابجا می شوند تا زمانی که به درستی احراز هویت نشوند، باید با عنوان «دارای هویت ناشناخته» در نظر گرفته شوند (برای اطلاعات بیشتر در مورد زمان احراز هویت در طول فرآیند آزمایش، لطفاً به پیوست 1، جدول A1.1 مراجعه کنید).



²³Single nucleotide polymorphisms (SNP)

²⁴whole genome sequencing (WGS)

²⁵DNA profiling technologies

²⁶clonal isolation

نامگذاری/ اختصاص یک شناسه منحصر به فرد

توصیه 1.4.1: به رده های سلولی باید یک شناسه بدون ابهام اختصاص داده شود. شناسه باید توسط یک سیستم ثبت بین المللی (open-sourced) ایجاد شود تا از مشابهت اطلاعات رد و بدل شده بین تمامی آزمایشگاه ها اطمینان حاصل شود. در گزارش های منتشر شده نیز باید به این شناسه منحصر به فرد اشاره شود.

رده های سلولی دارای یک ماهیت فیزیکی و هویت دیجیتالی هستند که در نتیجه ی یک بایگانی آنلاین بروز به وجود آمده است. اطمینان از اینکه هویت دیجیتال رده سلولی بدون ابهام است، بخش مهمی از ایجاد اطمینان در مورد منشأ و تکرارپذیری ماهیت فیزیکی رده سلولی می باشد. توصیه برای ایجاد یک مرجع دیجیتالی منحصر به فرد، دائمی و بدون ابهام که توسط یک سیستم ثبت، و توسط شخص ثالث قابل اعتماد فراهم شود، زیربنایی را ایجاد می کند تا شناسه ی مورد نظر دارای قابلیت ردیابی بین افراد باشد. ثبت رده های سلولی مؤلفه اساسی در مدیریت بیوبانک اصلی یا کاربردی است، زیرا امکان یافتن آن شناسه خاص را در سطوح مختلف فراهم می کند و همچنین متضمن این امر که منشأ مشتقات حاصل شده مربوط به کدام سلول رفرنس یا منبع است (مانند رده های سلولی دارای ژن گزارشگر که به شکل ژنتیکی اصلاح شده، رده های ویرایش شده ژنی ایزوژن، یا ساب کلون هایی که دارای ویژگی های متمایز هستند). نمونه های از این دست سیستم های ثبتی (CelloSaurus (<https://web.expasy.org/cellosaurus/>) با تحقیقات زیست پزشکی می باشند (Bairoch, 2018)، و یا سیستم ثبتی سلول بنیادی پرتوان انسانی (hPSCreg; <https://hpscereg.eu/>) که به شکل کاملاً اختصاصی برای سلول های بنیادی پرتوان انسانی توسعه یافته است (hPSCreg; Kurtz et al., 2018). رده های سلولی را به داده های ثبت شده منطبق با این توصیه ها و به پایگاه داده RRID متصل می کند (برای اصول کلی یک سیستم ثبت به پیوست 2 مراجعه کنید).

ثبت اطلاعات گام مهمی در پایبندی به اصول FAIR (اصول FAIR: قابل ردیابی، در دسترس، قابل تبادل و قابل استفاده مجدد) است، حتی اگر خود رده های سلولی دارای دسترسی محدود باشند. این فرآیند، اخذ حداقل اطلاعات در مورد تولید، منشأ و در دسترس بودن یک رده سلولی را تسهیل می کند. ثبت اطلاعات رده سلولی به محققان سلول های بنیادی که به دنبال برآورده کردن الزامات حاکمیت محلی یا نهادهای تامین کننده بوده هستند، کمک می کند. توجه داشته باشید که ایجاد بانک زیستی از یک رده سلولی (توصیه 1.2) مانع از نیاز به ثبت اطلاعات رده سلولی نمی شود. تهیه بانک زیستی منجر به شکل گیری ماهیت فیزیکی و اختصاص دادن یک شناسه منحصر به فرد و پایدار برای هر رده سلولی منجر به تشکیل ماهیت دیجیتالی و پشتیبانی بانک می شود. در حال حاضر هیچ گونه ثبت اطلاعات بین المللی برای بافت های اولیه یا سلول هایی که فقط برای مدت زمان محدود و کوتاهی تکثیر می شوند، طراحی نشده است. با این وجود، وقتی که داده ها تولید می شوند و به شکل عمومی در دسترس قرار می گیرند، نیاز به وجود یک هویت دیجیتالی فاقد هر گونه ابهام وجود دارد تا اطمینان حاصل شود که داده های تولید شده از یک رده سلولی اهدایی با یکدیگر تطابق دارد، و داده های منتج از رده های سلولی اهدا کنندگان مختلف قابلیت تمایز از یکدیگر را دارند. در این موارد، توصیه به آزمایشگاه هایی که با بافت یا سلول های اولیه کار می کنند این است که برای اینکه امکان ردیابی دیجیتال فراهم شود، قوانین نامگذاری برای این امر اتخاذ کنند (Kurtz et al., 2018).

استفاده از نام های «معمول» مرتبط با سلول های اولیه که جداسازی شده را توصیه می کنیم به نحوی که مؤسسه یا آزمایشگاه مبدأ، نوع سلول، و شناسه اهدا کننده منحصر به فرد، با اختصاص دادن 3 حرف یا عدد یا بیشتر انجام می شود تا احتمال رخداد شناسه های تکراری کاهش یابد. همچنین توصیه به استفاده از اطلاعات ماهیت بافت، سلول و رده سلولی برای کاهش ابهام در مورد منشأ یا سلول تکثیر شده وجود دارد (Santivijai et al., 2014). بهترین تمرین در این خصوص استفاده از ابزارهایی مانند (Research Resource Identification site (<https://www.rrids.org>) است.

³³genetically modified transgenic reporter lines

³⁴gene edited isogenic lines

³⁵human pluripotent stem cell

³⁶FAIR principles of Findable, Accessible, Interoperable and Reusable



بازبرنامه ریزی با هدف حذف ترانس ژن

توصیه 1.5.1: بررسی حذف بیان ترانس ژن در رده های سلول های بنیادی پرتوان انسانی (hiPSC) که به تازگی تحت دست ورزی ژنتیکی قرار گرفته است، قبل از تهیه بانک سلولی، توزیع و استفاده در تحقیقات انجام شود.

سیستم های ویروسی معمولاً برای برنامه ریزی مجدد در سلول های سوماتیک با هدف تولید hiPSC استفاده می شوند. روش های برنامه ریزی مجدد یا بازبرنامه ریزی شامل آدنووایروس (RNA)، Sendai (SeV) خود همانند سازی شونده از ویروس آنسفالیت اسب (EEV) و ناقل های اپیزومی هستند که حاوی توالی هایی از ویروس اپشتین بار (EBV) می باشند (Haridhasapavalan et al., 2019).

سلول هایی که با این ویروس ها یا ناقل های مهندسی شده ترانسدیوس (تبدیل) می شوند، ذرات ویروسی عفونی تولید نمی کنند، اما به طور گذرا و موقت توالی های ویروسی حاوی فاکتورهای برنامه ریزی مجدد را بیان می کنند. حذف شدن این عوامل از رده سلول بنیادی بسیار مهم است، زیرا بیان مداوم فاکتورهای بازبرنامه ریزی در سلول های hiPSC می تواند بر تکثیر و پتانسیل تمایز آنها تأثیر بگذارد و خطر تشکیل تومور را در مدل موشی افزایش دهد (Okita et al., 2007). بنابراین، حذف ناقل های برنامه ریزی مجدد باید در رده های سلولی جدید hiPSC قبل از تهیه بانک های زیستی یا هر گونه استفاده در تحقیقات مشخص شود.

بیان ترانس ژن در رده های سلولی که به تازگی از hiPSC مشتق شده اند، باقی می ماند ولیکن معمولاً در طی چند پاساژ سلولی بیان ترانس ژن را میتوان حذف کرد. زمان پاکسازی ویروس بستگی به سیستم مورد استفاده دارد. برای رده های سلولی hiPSC مشتق از ویروس سندی، حذف ناقل باید با رنگ آمیزی ایمنی با آنتی بادی های ضد ویروس یا qPCR (quantitative PCR) برای توالی های خاص ویروس سندی تأیید شود. بسیاری از رده های سلولی hiPSC مشتق شده از ویروس SeV طی 10 پاساژ ژن حذف می شود. در رده های سلولی hiPSC که توسط ناقل های اپیزومی ایجاد شده اند، حذف ژن به شکل سریع تری و به طور کلی با 3-5 پاساژ رخ می دهد، با این حال، گزارش شده است که در 30 درصد از لاین های hiPSC، به دلیل ادغام ناقل در ژنوم، ناقل حذف نشده است. حذف ناقل های اپیزومی را می توان با استفاده از qPCR ارزیابی کرد (Schlaeger et al., 2015).

³⁷Reprogramming transgene elimination

³⁸human induced pluripotent stem cell

³⁹adenovirus

⁴⁰Equine encephalitis virus (EEV)

⁴¹Episomal vectors



سلامت سلول

توصیه 1.6.1: کشت های سلولی باید تحت آزمایش های میکروبیولوژیکی و ویروسی از جمله مایکوپلازما، سترونی و غربالگری عامل الحاقی نابجا (adventitious agent) قرار گیرند تا صلاحیت سلول و ایمنی فنی کارکنان ارتقا یابد.

توصیه a.1.6.1: کشت سلولی (هم کشت اولیه و هم کشت سلول های بنیادی) باید برای تایید عدم وجود مایکوپلازما در بدو ورود به آزمایشگاه ارزیابی شود و به طور منظم (حداقل سه ماهه) پایش شود تا از عدم وجود آلودگی مایکوپلازما در طی زمان کشت سلول اطمینان حاصل شود. کشت های سلولی که برای تحقیقات آزمایشگاهی در نظر گرفته شده اند، باید در شروع و اتمام تحقیقات بررسی شوند. هر رده سلولی که از خارج از آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفته است باید قبل از استفاده و تکثیر دارای تأییدیه منفی از نظر مایکوپلازما باشد.

آلودگی مایکوپلازمایی کشت های سلولی به عنوان یک مسئله مهم در هر منبع سلولی می باشد، نرخ آلودگی در سراسر جهان بسته به محل و سطح نظارت بین 15% تا 80% است (Chernov et al., 2014; Corral-Vázquez et al., 2017; Drexler and Uphoff, 2002; Hay et al., 1989). تأثیر آلودگی مایکوپلازما بر کشت سلولی قابل توجه بوده و ساختار و عملکرد سلول های میزبان را به خطر می اندازد (Cimolai, 2001; Drexler and Uphoff, 2006). این موضوع می تواند تمام شاخص های قابل اندازه گیری مورفولوژی (ریخت شناسی) و فیزیولوژی سلول را تحت تأثیر قرار دهد و نتایج به دست آمده با استفاده از کشت آلوده را نامعتبر کند. مایکوپلازما با تجهیزات آزمایشگاهی استاندارد قابل شناسایی نیست، این میکروارگانیسم فاقد دیواره سلولی بوده لذا در برابر اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم نشان میدهد، همچنین اندازه و انعطاف پذیری آن منجر به عبور از فیلتر میگردد.

آنچه گفته شد به همراه احتمال بالای گسترش سریع، به مایکوپلازما اجازه می دهد تا به سرعت و به راحتی در یک کشت سلولی تکثیر شده و بیشتر شود، و غربالگری و حذف کشت های سلولی آلوده را برای بهبود شرایط سلولی حیاتی می کند.

حفظ و نگهداری محیط کشت عاری از مایکوپلازما نیاز به مراقبت اولیه و نظارت پیوسته و دائمی دارد. تمامی کشت های سلولی ورودی، صرف نظر از مبدأ و تأییدیه تحقیقاتی، باید قبل از نگهداری با کشت های سلولی موجود قرنطینه شده و مورد آزمایش قرار گیرند. پس از تایید منفی بودن تست مایکوپلازما، کشت را می توان در انکوباتور کشت عمومی قرار داد و به طور روتین به عنوان بخشی از یک برنامه آزمایشی در حال انجام، غربالگری کرد.

هر بانک سلولی اصلی و بانک سلولی عملکردی باید قبل از استفاده برای اهداف آزمایشی یا اشتراک گذاری کشت های سلولی، غربالگری شده و منفی بودن تست مایکوپلازمای آنها تأیید شود. اگر در هر مرحله ای این غربالگری مثبت شد، باید سلول های مثبت شده دور انداخته شود، مگر اینکه کشت کاملاً غیرقابل تعویض و خاص باشد (برای اطلاعات بیشتر در مورد زمان آزمایش در طول فرآیند آزمایش، لطفاً به پیوست 1، جدول A1.1 مراجعه کنید).



توصیه 1.6.1.b: کشت ها برای اطمینان از عاری بودن از نظر آلودگی میکروبی و ویروسی باید مورد غربالگری قرار گیرند.

آلودگی میکروبی یا ویروسی می تواند رفتار و یکپارچگی سلولی را تغییر دهد، مشکلات سلامتی برای محققان ایجاد کند و مانع استفاده محصولات سلولی درمانی در آینده شود (Barone et al., 2020). برای جزئیات بیشتر در مورد شناسایی و کاهش این خطر در کشت سلولی به پیوست 3 مراجعه کنید.



فصل دوم

پرتوانی و حالت تمایزنیافته

۱۴

یک جنبه منحصر به فرد برای سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی وضعیت تکوینی تمایزنیافته آن‌ها و پتانسیل ایجاد انواع رده‌های سلولی سوماتیک متفاوت است. در کار با hPSCها، ویژگی‌های تمایزنیافتگی نه تنها برای رده‌های سلولی ایجاد شده از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی، بلکه در کشت‌های جدید و رده‌های اصلاح‌زنتیکی شده، برای اطمینان از این که سلول‌ها در تحقیق مطابق انتظار رفتار می‌کنند، ضروری می‌باشد. در مورد سلول‌های بنیادی جنینی موش، پرتوانی در نهایت با توانایی سلول‌ها در ایجاد و شکل‌گیری کایمرهایی از رده‌زایشی (یا انتقال به بلاستوسیت)، قابل اثبات می‌باشد.

بنا به دلایل اخلاق، مشخصاً انجام چنین آزمایشی برای hPSCها امکان‌پذیر نیست؛ بنابراین پرتوانی باید با آزمایش‌های جایگزین اثبات شود: یا 1- از طریق توانایی تشکیل تراتوم‌های حاوی هر سه لایه‌زایی جنینی، و امکان تشکیل تومورهای زئوگرافت متعاقب پس از پیوند به حیوان 2- از طریق تمایز در شرایط آزمایشگاهی. سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی معمولاً تعدادی از ژن‌های خاص و آنتی-ژن‌های سطح سلولی را بیان می‌کنند که می‌توانند برای تایید تمایز این سلول‌ها استفاده شوند.

با این حال، هیچ یک از این مارکرها به طور منحصر به فرد با ظرفیت تمایزی پرتوان مرتبط نیستند و بسیاری از آن‌ها توسط گروهی دیگر از سلول‌های بنیادی نیز بیان می‌شوند که ظرفیت تمایز را از دست داده‌اند (این دسته با عنوان سلول‌های بنیادی بی-توان شناخته می‌شوند). بنابراین، از این مارکرها نمی‌توان برای شناسایی سلول‌های پرتوان در غیاب شواهد عملکردی پرتوانی استفاده کرد. در واقع، نمی‌توان آن‌ها را «مارکهای پرتوانی» نامید؛ بلکه باید به عنوان مارکهای حالت تمایزنیافته شناخته‌شوند.

در کنار پیشرفت این زمینه از علم، به ویژه پس از گسترش دانش hiPSCها، وجود ابهام در تعریف اصطلاحات این حوزه در دقت و تکرارپذیری تحقیقات موانعی ایجاد کرده‌است. در این بخش راهنمایی‌های روشی در مورد چگونگی تعریف و ویژگی‌یابی سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی ارائه می‌دهیم تا بتوان از گزارش دقیق و بدون ابهام نتایج به دست آمده با این سلول‌ها اطمینان حاصل کرد.



ارزیابی پرتوانی

پیشنهاد 2.1.1: پرتوانی در سلول‌های انسانی باید به صورت تجربی با سنجش‌هایی که پتانسیل تمایزی را ارزیابی می‌کنند، نشان داده شود. تمایز باید با اندازه‌گیری‌های کمی از میزان القای ترکیب مارکرهای معرف رده‌های اکتودرم، اندودرم و مزودرم، در کنار از دست دادن مارکرهای حالت تمایز نیافته نشان داده شود.

پرتوان بودن یک ویژگی عملکردی می‌باشد که به معنای ظرفیت یک سلول واحد برای تمایز به تمام انواع سلول‌های سوماتیک یک ارگانیسم است. یک رده سلولی تنها در صورتی باید به عنوان پرتوان تعریف شود که به طور تجربی قادر به تمایز به سلول‌هایی که نماینده هر سه لایه زاینده جنینی هستند، باشد.

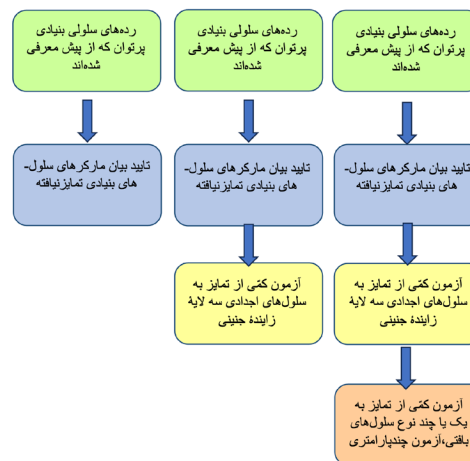
سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی ممکن است جهت گیری‌های نابجایی در لاین یا لایه(های) تولید شده را نشان دهند؛ اما باید قادر به ایجاد اکتودرم، اندودرم نهایی و مزودرم بدون دستکاری ژنتیکی یا اپی-ژنتیکی باشند. به طور معمول، سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی همچنین پتانسیل تولید سلول‌های زاینده اولیه را دارند؛ اما ممکن است این ویژگی در مراحل بعدی پرتوانی از بین برود. همچنین این سلول‌ها ممکن است قادر به مشارکت در ایجاد کایمرها باشند یا نباشند، اما دارا بودن چنین ظرفیتی بخش مهمی از تعریف آن‌ها نیست.

برای این که بتوان پرتوانی و توانایی تمایز به رده‌ها یا انواعی خاص از سلول‌ها به سلول‌های مورد نظر را ادعا کرد، بررسی‌های دقیق آزمایشگاهی از جمله شواهد صریحی از تمایز به سلول‌های اجدادی اندودرم نهایی، مزودرم و نورواکتودرم باید نشان داده شود. همچنین، ترجیحاً شواهدی از تمایل تمایزی بیشتر به انواع سلول‌های خاص هر رده نیز باید ارائه گردد. کارایی و میزان تمایز به سلول‌های هر لایه زاینده باید گزارش شود (بخش ۵ را ببینید).

شواهد تمایز باید بر اساس معیارهای متعدد باشد که ممکن است شامل مورفولوژی، بیان ترکیب‌هایی مناسب از mRNAها یا پروتئین‌های خاص آن نوع سلول یا رده سلولی، مارکرهای سطح سلول و ارزیابی ویژگی‌های عملکردی باشد. علاوه بر این، ویژگی‌های فراساختاری، بررسی‌های multi-omic و ویژگی‌های دستکاری ژنی یا تراریختگی در صورت امکان گزارش شوند. همچنین باید کاهش بیان مارکرهای سلولی متعلق به تمایز نیافتگی مشخصه-یابی شده باشد. نمونه‌هایی از مارکرهایی که در سطح وسیعی برای بررسی تمایز استفاده شده‌اند، در پیوست ۴ (جدول A4.1، A4.2، A4.3 و A4.4) ارائه شده است. در صورت امکان، بیان مارکر باید با تکنیک‌هایی مانند فلوسایتومتری یا تصویربرداری کمی، اندازه‌گیری شود. میزان حساسیت مورد نیاز برای تعیین وضعیت سلول‌های بنیادی تمایز نیافته و پتانسیل تمایزی، بستگی به زمینه آزمایش‌های انجام شده و نتیجه‌گیری‌های گرفته شده از آن‌ها دارد (شکل ۲، زیر را ببینید).



میزان ویژگی‌یابی



شکل 2. وضعیت و سرنوشت رده‌های سلول-های بنیادی پرتون انسانی بر تعیین ویژگی‌های حالت تمایز نیافته و پتانسیل پرتونی تأثیر می‌گذارد. رده‌هایی که قبلاً ایجاد و منتشر شده‌اند (ستون چپ) نیاز به ویژگی-یابی کمتری نسبت به رده‌های جدید یا کشت جدید (ستون راست) دارند.

پیشنهاد a.2.1.1: برای مطالعاتی که از رده‌های سلولی استفاده می‌کنند که در آن-ها پرتون بودن، همان-طور که در بالا توضیح داده-شد، در نشریات گزارش شده-است، ممکن است لازم نباشد آزمایش‌های تمایزی چندرده‌ای تکرار شوند. با این حال، حداقل باید وضعیت تمایز نیافته سلول‌ها توسط آنالیز کمی مارکرها بررسی شود (جدول A4.1 را ببینید).

پیشنهاد b.2.1.1: برای مطالعات با سایز بزرگ که با استفاده از تکنیک-های تاییدی، اشتقاق طیف گسترده‌ای از رده‌های سلولی پرتون جدید را توصیف می‌کنند، در صورتی که توصیف و بررسی دقیق تمام رده‌ها امکان پذیر نباشد، پرتونی در زیرمجموعه-ای از لاین‌های سلولی با آزمون‌های تمایزی تایید می‌شود. برای سایر لاین‌های باقی-مانده، وضعیت تمایز نیافته سلول‌ها باید توسط آنالیز کمی مارکرها بررسی شود تا این لاین-ها پرتون در نظر گرفته-شوند.

پیشنهاد c.2.1.1: جایی که از تکنیک‌های نوین باز برنامه‌ریزی، روش‌های کشت سلولی یا سایر پروتکل‌های تایید نشده



استفاده می‌شود، تایید وضعیت تمایزنیافته و پتانسیل تکوینی باید کامل و همه-جانبه باشد. این عمل، شامل ارزیابی پانل‌های بزرگ از مارکرهای حالت تمایزنیافته و اثبات ظرفیت تمایز به سه لایه زاینده جنینی و سلول‌های تمایزنیافته‌تر با آنالیزهای چندپارامتری است.

پیشنهاد 2.1.2: آزمایش‌های زئوگرافت (ایجاد تراتوما) با هدف اثبات پرتوانی سلول‌ها ضروری نیست.

اگرچه پیوند زئوگرافت سلول‌های بنیادی پرتوان به حیوانات دارای نقص ایمنی یک آزمون قوی برای تایید پرتوانی است و در گذشته به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته-است، نگرانی‌ها در مورد حقوق حیوانات و افزایش مقررات در حوزه‌های قضایی مختلف این روش را -در صورتی که بتوان اطلاعات مشابهی را از روش‌های آزمایشگاهی به دست آورد- نامطلوب می‌کند. سنجش زئوگرافت می‌تواند شواهدی از توانایی سلول‌های تمایزنیافته برای بافت-زایی جهت تولید بافت‌های پیچیده-تر ارائه دهد. با این حال، چندین مطالعه تایید کرده‌اند که شواهد کافی برای پرتوانی را می‌توان از تمایز سلولی در محیط آزمایشگاهی نیز به دست آورد (Bock et al., 2011; Alison et al., 2018). سنجش با استفاده از مدل‌های ارگانوئیدی یا کشت سه بعدی در شرایط آزمایشگاهی نیز ممکن است اطلاعاتی در مورد ظرفیت ریخت-زایی و بافت-زایی ارائه دهد. بنابراین، سنجش زئوگرافت به عنوان یک رویکرد معمول برای ارزیابی پرتوانی توصیه نمی‌شود؛ اگرچه ممکن است یک تست تکمیلی و مفید برای ارزیابی میزان بدخیمی بالقوه باشد. اگر از سنجش زئوگرافت استفاده شود، معیارهای ارزیابی تراتوما و تراتوکارسینوما در پیوست ۴ توضیح داده شده-است.



حالت تمایزنیافته

پیشنهاد 2.2.1: بیان مارکرهای سطح سلولی و بررسی در سطح نسخه-برداری را می‌توان برای ارزیابی وضعیت تمایز نیافتگی یک رده سلول بنیادی استفاده کرد. با این حال، بیان چنین مارکرهايي، پرتوانی را ثابت نمی‌کند.

هیچ یک از مارکرهای موجود در سلول‌های تمایزنیافته، منحصراً متعلق به این سلول‌ها نیستند؛ اگرچه اغلب به اشتباه برای شناسایی سلول‌های بنیادی پرتوان هم استفاده می‌شوند. در همین راستا، مثال‌های متعددی از سلول‌ها وجود دارند که ظرفیت تمایز ناچیزی دارند یا اساساً فاقد این ظرفیت هستند، مانند سلول‌های کارسینومای جنینی هیچ-توان از تومورهای سلول‌های زایا، که مارکرهای سلول‌های تمایزنیافته از جمله (OCT4) POU5F1 و NANOG را بیان می‌کنند (جدول A4.1 را برای فهرست مارکرها ببینید). بنابراین، این مارکرها را نباید مارکرهای پرتوانی نامید؛ زیرا پرتوانی را نمی‌توان به وسیله بیان مارکرها از سلول‌های تمایزنیافته تفریق داد. با این-همه، چنین مارکرها و پروفایل‌های بیان ژنی برای نشان-دادن وضعیت تمایزنیافته و به عنوان معیارهای جایگزین برای حفظ و تشخیص هویت در انواعی از سلول‌ها مفید هستند که پرتوانی آن‌ها توسط سنجش‌های تمایزی قبلی به خوبی مشخص شده-باشد؛ به عنوان مثال، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی و سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی. فقدان مارکرهای کلیدی خاص، مانند OCT4، می‌تواند از شاخص‌های قوی از دست دادن پرتوانی باشد؛ اما براساس آنچه گفته-شد این را نمی‌توان قطعی و نهایی در نظر گرفت.



حالت تکوینی

پیشنهاد 2.3.1: شواهدی که نشان می‌دهد کشت از یک سلول بنیادی یک حالت تکوینی خاص را بروز می‌دهد، باید بر اساس ارتباط با مرحله تکوینی جنین باشد که با پروفایل بیان ژن خاص و در صورت امکان توسط بانک‌های اطلاعاتی جهانی ارزیابی شود. حالت تکوینی باید با نشان دادن تمایز صحیح ویژه هر رده، و با در نظر گرفتن سایر جهت‌گیری‌های احتمالی در رشد، تایید شود. در مقایسه بانک‌های اطلاعاتی جهانی باید رابطه رده سلولی موجود با دیگر حالات سلول‌های بنیادی گزارش شده را روشن کرد و اطلاعات لازم در مورد تمایز یا تبدیل بین این حالت‌ها را نشان داد. شرایط کشت برای تولید و تکثیر حالت خاصی از سلول‌های بنیادی باید به طور کامل، همراه با اطلاعاتی در مورد پایداری (یا گذرا بودن)، همگونی / ناهمگونی و خاصیت کلون‌زایی گزارش شود.

انتظار می‌رود سلول‌های بنیادی در شرایط کشت با قسمت‌هایی از مراحل مسیر تکوین جنین بین زیگوت و مراحل انتهایی گاسترولاسیون مطابقت داشته باشند. چنین تطابق به معنای شباهت بالا در پروفایل‌های نسخه برداری و اپی‌ژنتیکی همراه با ارتباط در ویژگی‌های مورفولوژیک سلول، پارامترهای متابولیک و توانایی تمایزی است. سلول‌های اپی‌پلاست در جنین انسان قبل از لانه‌گزینی و لاین‌های سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی مربوط به این مرحله به عنوان ساده یا خام نامیده می‌شوند.

پرتوانی ساده به عنوان یک حالت مجزا در نظر گرفته می‌شود. پس از این مرحله، مرحله «میانی» یا «شکل‌گیری» از پرتوانی که ویژگی‌های ساده را از دست داده، اما ویژگی‌های خاص رده را به دست نیاورده است، آغاز می‌شود. به نظر می‌رسد که مرحله میانی در انسان چند روز طول می‌کشد؛ و این احتمال وجود دارد که یک سری از زیرحالت‌های این مرحله نیز در کشت دیده شود. پرتوانی میانی یک مرحله پیوسته با اپی‌پلاست تعیین سرنوشت شده در گاسترولاسیون است که به آن مرحله عملکردی نیز می‌گویند. قطعا سلول‌ها در شرایط کشت نمی‌توانند مشابه با سلول‌های بدن باشند، و باید این نکته را در نظر داشت که رشد سلول در محیط کشت به ویژه کشت دوبعدی ویژگی‌ها و خصوصیات را القا می‌کند که در جنین وجود ندارد.

پیشنهاد 2.3.1.a: ناهمگونی در کشت باید به طور کمی در سطح سلول، با فلوسایتومتری، یا تصویربرداری سلول زنده و/یا اومیکس سلول بررسی شود. ساختار کشت باید در چندین نقطه زمانی ارزیابی شود. در شرایط ایده‌آل، ویژگی‌یابی زیرجمعیت‌ها برای تبدیل بین حالت‌های پرتوانی و پتانسیل کلون‌زایی نیز جداگانه باید بررسی شود.

کشت‌های سلول‌های بنیادی پرتوان اغلب ترکیب ساختاری چندجذبی دارد. چنین ناهمگونی ممکن است به طرق مختلف ایجاد شود؛ از جمله: تمایز مداوم بخشی از سلول‌های موجود در کشت، حفظ حالت‌های پرتوانی مختلف در شرایط کشت یکسان، پیشرفت سلسله‌به‌مراتبی پرتوانی با سلول‌های اولیه ساده بیشتر یا با استفاده از سلول‌های مرحله شکل‌گیری جهت ورود به مرحله بعدی، تبدیل متقابل بین زیرحالت‌های پرتوانی که منعکس‌کننده انعطاف‌پذیری ذاتی است ولی لزوماً وابسته و مرتبط به مرحله تکوینی نیست، و پراکندگی ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی که بر هویت سلولی تأثیرگذار می‌باشد.

⁵²homogeneity⁵³intermediate⁵⁴heterogeneity⁵⁵formative⁵⁶clonogenicity⁵⁷primed⁵⁸transcriptome⁵⁹single cell -omic⁶⁰epigenome⁶¹plasticity⁶²naive

بخش ۳

فصل سوم- بررسی تغییرات ژنومی

۲۰

سلول‌های بنیادی در معرض تغییرات ژنتیکی در کشت قرار می‌گیرند (Draper et al., 2004؛ Mayshar et al., 2010؛ Weissbein et al., 2014؛ International Stem Cell Initiative, 2011). اگرچه تغییرات در ابتدا در سطح یک سلول غیر طبیعی ظاهر می‌شوند، موزاییسم (دو یا چند رده ی سلولی با اطلاعات ژنتیکی مختلف) آن‌ها می‌تواند در طول زمان بسته به ویژگی‌های سلول تغییر کند. به عنوان مثال، سلول‌های جهش یافته‌ای که دارای مزیت‌های رشد انتخابی شده‌اند، می‌توانند به سرعت در کشت سلول رشد کرده و گسترش یابند و با سلول‌های نوع وحشی برای افزایش جمعیت در کشت رقابت کنند (Draper et al., 2004؛ Olariu et al., 2010؛ Price et al., 2021). جدا از مزیت رشد، تغییرات ژنتیکی می‌تواند بسیاری از جنبه‌های مختلف فنوتیپ و رفتار سلول‌های بنیادی را تغییر دهد (Barbaric et al., 2014؛ Ben-David et al., 2014؛ Markouli et al., 2019). علاوه بر این، تغییرات ژنتیکی اکتسابی از کشت نیز ممکن است بر رفتار سلول‌های تمایز یافته مشتق شده از سلول‌های بنیادی نیز تأثیر بگذارد. با تغییر ویژگی‌های سلول‌ها، تغییرات ژنتیکی می‌تواند بر قابلیت رشد و قابلیت تکرار پذیری نتایج به دست آمده از سلول‌های بنیادی و مشتقات تمایز یافته ی آن‌ها تأثیر بگذارد. از این رو، بخش پیش رو نظارت بر ذخایر و کشت سلول‌های بنیادی برای ردیابی تغییرات ژنتیکی اکتسابی در کشت را بررسی می‌کند.



ارزیابی وضعیت ژنتیکی

توصیه 1، 3، 1: کشت-ها باید از نظر وجود تغییرات ژنتیکی اکتسابی (ایجاد شده پس از کشت) پایش شوند، زیرا این تغییرات می-توانند اثرات غیر قابل برگشت بی شماری روی سلول-های بنیادی و نتایج تمایز از آن-ها داشته باشند، مانند تغییر میزان رشد، تومورزایی، پتانسیل تمایز و عملکرد، که ممکن است به طور قابل توجهی بر تکرارپذیری و قابلیت اطمینان به داده-های جمع آوری شده تأثیر بگذارد.

تمامی کشت-های سلول در برابر تغییرات ژنتیکی اکتسابی از کشت آسیب پذیر هستند و باید برای اطمینان از ثبات محتوای ژنتیکی در طول زمان تحت پایش قرار گیرند. سلول های بنیادی پرتوان انسانی به طور خاص مستعد تغییرات ژنتیکی اکتسابی از کشت در سطوح کروموزومی، ساب کروموزومی و نوکلئوتیدی هستند (reviewed in Halliwell et al., 2020). برخی از تغییرات ژنتیکی اکتسابی رایج در سلول های بنیادی پرتوان انسانی، که البته محدود به مواردی که نام خواهیم برد نخواهد شد، شامل افزایش تعداد کروموزوم-ها یا قسمت-هایی از کروموزوم-های 1، 12، 17، 20 و، X (Draper et al., 2004: Baker et al., 2016) و تغییرات تک نوکلئوتیدی در TP53 (Merkle, et al., 2017; Lezmi and Benvenisty, 2021) می باشد.

بنابراین، غربالگری و پایش معمول سلول های بنیادی پرتوان انسانی مستلزم تجزیه و تحلیل تعداد کروموزوم ها برای تشخیص تغییرات عددی و ساختاری می باشد. از آنجایی که بسیاری از تغییرات مکرر اکتسابی کشت در سلول های بنیادی پرتوان انسانی که تا به امروز شناخته شده اند، ناهنجاری های عددی و ساختاری هستند، انتظار می رود این تجزیه و تحلیل برای تشخیص بیشتر تغییرات که احتمالاً رخ می دهد، کافی باشد. با این حال، محققان در صورت مشاهده تغییر در ویژگی های سلول های بنیادی در هنگام کشت مانند تغییر در الگوی رشد یا توانایی تمایز باید از روش های تشخیص اضافی با وضوح بالاتر نیز برای شناسایی هرگونه تغییر تکرارشونده ای در این سلول ها ارزیابی کنند، به عنوان مثال تغییرات کوچک کپی های ژن (مانند 20q11.21 CNV) و انواع تغییرات در تک نوکلئوتیدها از جمله TP53 و یا سایر ژن های مرتبط با سرطان. علاوه بر این، کاربردهای خاص (یعنی ایجاد شرایط کشت جدید، روش های باز برنامه ریزی مجدد یا کارآزمایی بالینی) ممکن است به پایش گسترده تری برای حضور تغییرات ژنتیکی نیاز داشته باشد.

اگرچه طیف وسیعی از روش-ها برای ارزیابی تغییرات ژنتیکی موجود است، در حال حاضر روش واحدی که همه ی انواع تغییرات ژنتیکی را با حساسیت بالا تشخیص دهد وجود ندارد لذا ویژگی و محدودیت های تشخیصی سنجش های مختلف باید هنگام انتخاب روش برای ارزیابی کشت و تفسیر نتایج منفی در نظر گرفته شود، به عنوان مثال، ممکن است تغییرات ممکن است در سطح موزاییسم یا با وضوح کمتر از سطح تشخیص برای یک سنجش معین، وجود داشته باشند (پیوست 5، جدول A5.1). ذکر این نکته ضروری است که این حوزه از دانش مداوما در حال تغییر است و بنابراین تغییرات خاصی که باید مورد توجه قرار گرفته و برجسته آن ها روش مناسب برای استفاده انتخاب و مورد بررسی قرار بگیرد در جدول A5.2 (پیوست 5) فهرست شده اند.



زمان ارزیابی

توصیه 1.2.3: بانک-های سلولی اصلی یا مَستر و عملکردی باید برای تعیین وضعیت ژنتیکی ارزیابی شوند.

یک زمان بسیار حیاتی و اساسی برای ارزیابی ژنتیکی در هنگام آماده سازی بانک سلولی اصلی و عملکردی است. رده-های سلول های بنیادی پس از اینکه دستخوش تغییرات اساسی مانند کلونینگ یا ویرایش ژنی قرار بگیرند، مستعد کسب تغییرات ژنتیکی هستند. روش مشخصی جهت بررسی تغییرات ژنتیکی در سطوح پایین یک سلول تغییر یافته (میزان بسیار کم تغییرات منظور است) وجود ندارد. غالب تغییرات در سطح ژنتیکی منجر به افزایش رشد سلول ها می شود، لذا اگر تغییری در پاساژهای اول و غربالگری های اولیه قابل تشخیص نباشد، ممکن است بعد از چندین پاساژ قابل تشخیص باشد (به عنوان مثال، Olariu et al., 2010 را ببینید).

توصیه 2.2.3: نظارت بر تغییرات ژنتیکی (در حالت ایده آل) باید بازه زمانی آزمایش-ها را پوشش دهد.

سلول های حامل تغییرات ژنتیکی که منجر به ایجاد یک مزیت انتخابی می شوند، می توانند به سرعت در یک کشت از سایر زیر-جمعیت ها سبقت گرفته و تبدیل به جمعیت غالب کشت شوند، (اغلب در 10-5 پاساژ) (Avery et al., 2013; Olariu et al., 2010). لذا عدم استفاده از سلول هایی که از بانک و در پاساژهای کمتر از 10 هستند به شدت توصیه شده و به طور قابل توجهی خطرات انحراف ژنتیکی را کاهش می دهد. برای جلوگیری از انحراف ژنتیکی نامحسوس در کشت-های سلولی مورد استفاده در آزمایش-ها، چندین نقطه زمانی مهم وجود دارد که پایش و غربالگری ژنتیکی در حالت ایده آل می تواند انجام شود:

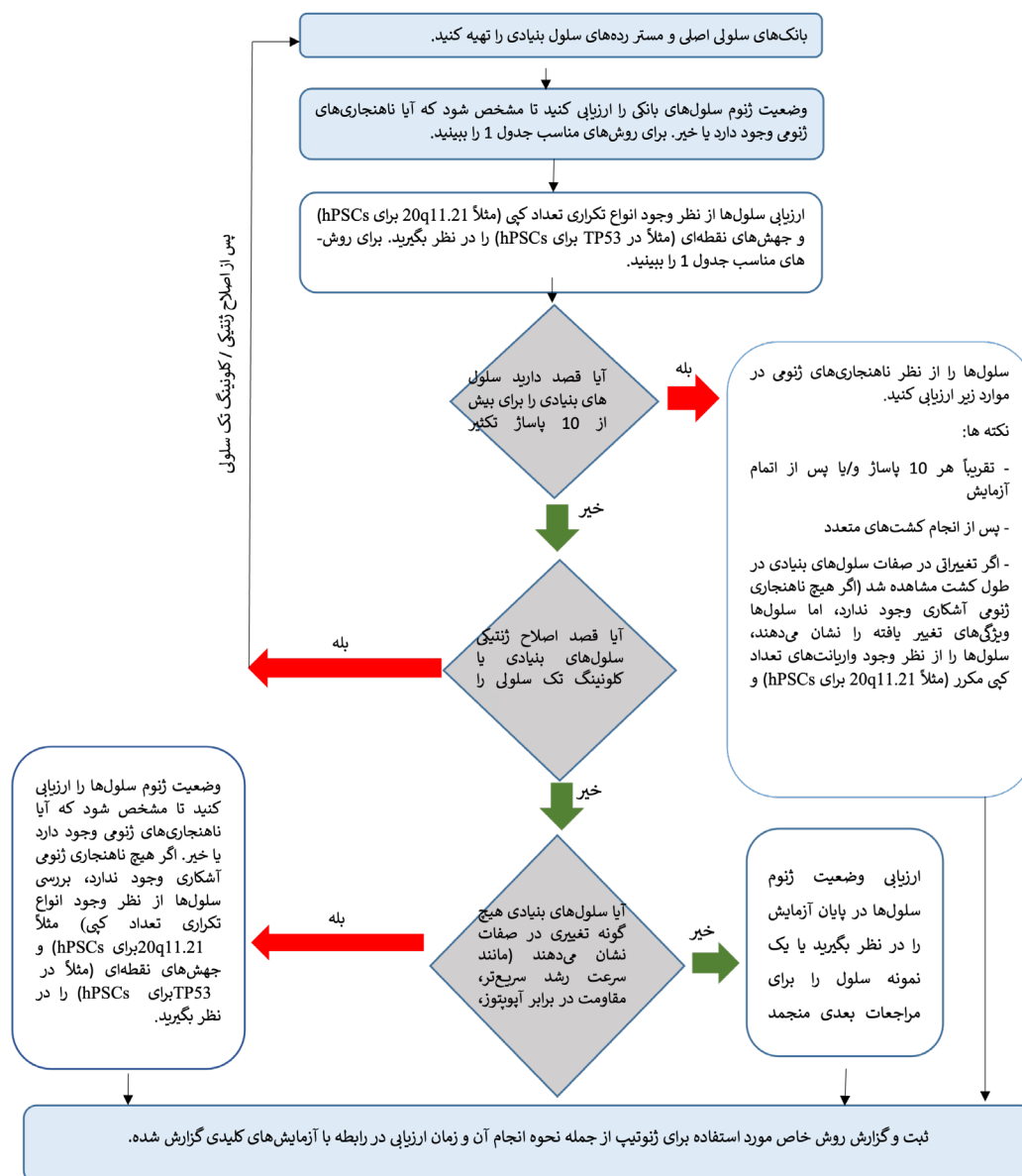
- 1) قبل از شروع آزمایشات (به عنوان مثال، در بانک سلولی اصلی یا مَستر یا بانک عملکردی).
- 2) در هنگام انجام آزمایش ها (به عنوان مثال، تقریباً پس از هر 10 پاساژ) برای کمک به تشخیص به موقع تغییرات ژنتیکی و/یا پس از اتمام آزمایش ها برای ارزیابی اینکه آیا کشت های سلولی مورد استفاده در آزمایش ها یکپارچگی ژنتیکی خود را در طول مدت آزمایش حفظ کرده اند یا خیر.
- 3) پس از انجام دستکاری های ژنتیکی که سلول ها را به شدت تحت استرس قرار می دهد (مانند انجام آزمایش های کاهش یا افزایش بیان، کریسپر، کلونینگ، ویرایش ژنومی، ...). زیرا این-تغییرات شانس رشد سلول-های ژنتیکی غیر طبیعی را افزایش می دهند.
- 4) در صورت مشاهده هرگونه تغییر در رشد یا الگوی تمایز سلول-های بنیادی در طول کشت، ارزیابی وجود تغییرات ژنتیکی برای بررسی اینکه آیا این تغییرات ناشی از تغییرات ژنتیکی اکتسابی از کشت می باشند یا خیر، توصیه می شود. اگر هیچ ناهنجاری کاریوتیپی آشکار نباشد، اما سلول ها ویژگی های تغییر یافته را نشان دهند، ارزیابی سلول ها از نظر وجود واریانت های تکراری تعداد کمی که به راحتی توسط تجزیه و تحلیل کاریوتیپ شناسایی نمی شوند (مثلاً 20q11.21 hPSCs) و جهش های نقطه ای (مثلاً در TP53 برای hPSCs) توصیه می شود.

توصیه 3.2.3: هنگامی که یک رده سلولی یا مشتق جدید با تغییر شرایط کشت یا با استفاده از روش-های بازبرنامه ریزی سلولی، دستکاری ژنومی یا اپی ژنومی تولید می-شوند، باید از نظر تغییرات ژنتیکی پس از مداخله ارزیابی شوند.



تجزیه و تحلیل سلول ها قبل و بعد از تولید یک رده سلولی یا مشتق جدید، مقایسه مشخصات ژنومی و شناسایی واریانت-های جدید معرفی شده در مقابل واریانت-هایی که قبلاً در سلول های اصلی وجود داشته اند، را امکان پذیر می-کند (Stee et al., 2021).

برای مروری بر زمان و چگونگی ارزیابی وضعیت ژنومی سلول-های بنیادی، به شکل 3 مراجعه کنید (شکل زیر).



شکل 3. فرآیند تصمیم‌گیری برای زمان و چگونگی ارزیابی وضعیت ژنومی سلول-های بنیادی

فصل چهارم

مدل های موجود بر پایه ی سلول های بنیادی

۲۴

مدل بافت فیزیولوژی نرمال و غیر نرمال مشتق شده از سلول های بنیادی، ارگانوئیدها و سیستم های میکرو فیزیولوژیکی

برای مدل سازی فیزیولوژی بافت می توان از قدرت سلول های بنیادی و توان تمایز سلول های اولیه استفاده کرد، اما مدل های برون تن (In-vitro) پیچیده تر با هدف شبیه سازی در سطوح بالاتر آناتومیک و فیزیولوژیکی یا پاتولوژیکی بیولوژیک انسان مورد نیاز است. برای مدل های پیچیده در شرایط آزمایشگاهی فناوری ارگانوئید و ارگان بروی تراشه (که به سیستم های میکرو فیزیولوژیک/میکروفلوییک نیز گفته می شوند) پلتفرم هایی هستند که در طول دهه ی اخیر به سرعت در حال گسترش هستند. این مدل ها، از فناوری های دوبعدی گرفته تا فناوری های پرینت سه بعدی، ابعاد مختلف اندام ها و بافت های انسان را در شرایط آزمایشگاهی بازتولید کرده و مشابهت بسیار زیاد آنها در هتروژنیستی و سلول ها به اندام های بدن منجر گشته که در پیش بینی مداخلات در آزمایشات مختلف مورد بهره برداری گسترده قرار بگیرند. برای درک فرصت ها و ویژگی هایی که این مدل ها به دانش پیشنهاد داده اند و در راستای رفع محدودیت های استفاده از این مدل ها، دستورالعمل و استانداردهایی برای عملکرد بهتر مورد نیاز است. جهت اطمینان از اینکه مدل سیستم های انسانی که به طور گسترده توسط دانشگاه ها و صنعت پذیرفته شده اند، قابلیت تکرارپذیری بین توسعه دهنده ابتدایی و کاربر نهایی در آزمایشگاه ها یا صنعت را دارد، این بخش توصیه های کاربردی را جهت بهبود دقت و تفسیرپذیری مدل ها، بهبود تکرارپذیری با کاهش تنوع ساختار و کاربرد آنها، و ارزیابی کیفیت مدل ها و ویژگی بای آنها (شامل توانایی آنها در شبیه سازی شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک انسانی) را ارائه می دهد.



اهمیت مواد اولیه و سلول منشا جهت مدل سازی

توصیه 1،4: به رده سلولی یا منشا بافتی سلول اولیه دقت کنید و در صورت آشنایی با آن، نوع سلول اولیه را برای مدل مشخص کنید.

چندین نکته مهم وجود دارد که باید هنگام تهیه مواد برای تولید مدل‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی به عنوان پلتفرم‌های آزمایشگاهی برای مطالعه فیزیولوژی طبیعی یا پاتولوژی بیماری در نظر گرفت. ماده اولیه می‌تواند بر تنوع و تکرارپذیری تأثیر بگذارد. در مرحله اول، نوع(های) سلول اولیه یا ابتدایی که آزمایش با آن آغاز می‌گردد (به عنوان مثال فیبروبلاست، سلول اپیتلیال)، باید در نظر گرفته شده و مستند شود. ثانیاً باید توجه داشت که آیا سلول‌ها از بافت جنینی یا بافت بالغ گرفته شده‌اند. ثالثاً، محلی که نمونه از آن گرفته شده است و محل آناتومیک را تا حد امکان شناسایی و اطلاعات را مستندسازی کنید. چهارم، روش جداسازی باید به دقت مورد توجه قرار گیرد، روش جداسازی می‌تواند منجر به غنی سازی سلول‌های خاص و مختلف شود. با توجه به ماهیت مواد مشتق شده با کاربرد بالینی، لازم است که منشا به طور مداوم بررسی و مکتب شود و پیوستگی استفاده از مواد مشابه در نظر گرفته شود. لازم است که منشا بافت یا سلول اولیه هر چه زودتر مشخص و تعیین ماهیت شود. در نهایت، محققان باید شرایط کشت را به دقت تعریف و مد نظر داشته باشند. زیرا تفاوت‌ها، حتی اگر کوچک باشند، می‌توانند فنوتیپ اصلی سلول را تغییر دهند یا منجر به رشد انتخابی جمعیت‌های مختلف سلولی شوند.

توصیه 4.1.2: جنس، سن، پیشینه خانوادگی و ژنتیکی، وضعیت سلامتی، عوامل خطر و هر گونه علائم یا علائم بالینی اضافی از سمت فرد اهداکننده را، در صورت وجود و طبق مقررات منطقه ای، مد نظر قرار دهید.

ماهیت سلول‌های دهنده می‌تواند بر نحوه ی شکل‌گیری مدل سیستم نهایی تأثیر بگذارد و این مسئله به نوبه ی خود منجر به تأثیر بر امکان تعمیم یافته های خروجی یک مطالعه می‌شود. بنابراین، ثبت جزئیات زمینه ای فرد اهداکننده حتی در مواردی که اهداکننده هیچ بیماری مرتبط شناخته شده ای ندارد، توصیه می‌شود. آزمایشگاه‌های دارای مدل سیستم‌ها باید با جمع‌آوری هرچه بیشتر فراداده‌ها، امکان ارزیابی یافته‌های دقیق‌تر یافته‌های مدل سیستم خود را اجرایی کنند. جنسیت، سن، وضعیت سلامتی و تجزیه و تحلیل هیستوپاتولوژیک بافت اولیه (که مدل سیستم با آن ایجاد شده است) تا جایی که در دسترس باشد باید لحاظ شود. اطلاعات اهداکننده، در صورت امکان می‌تواند حتی شامل عواملی که سبک زندگی را به خطر می‌اندازد (مانند سیگار کشیدن، رژیم غذایی، ورزش خاص و غیره)، عفونت‌های شناخته شده، درمان‌های قبلی و/یا اختلالات، و سابقه خانوادگی/ژنتیکی باشد. برای مدل‌سازی بیماری، وضعیت بیماری و سلامت اهداکننده از جمله جهش ژنتیکی و داده‌های بالینی مرتبط باید ارائه شود (ویژگی‌های ارگانوئید و توموروئید از طریق توالی‌یابی از این لحاظ حایز اهمیت می‌باشد). بهترین شیوه در مدیریت داده‌ها و حفظ حریم خصوصی اهداکنندگان را در نظر بگیرید، توجه داشته باشید که این ممکن است به این معنی باشد که همه اطلاعات جمع‌آوری شده در پایان مطالعه در دسترس عموم قرار نخواهد گرفت.



تولید مدل سیستم

توصیه 1.2.4: معیارهای کنترل کیفی روش ایجاد مدل مورد نظر باید در نظر گرفته شود، به طور کامل مستند شده و پیوستگی اطلاعات بین اهداکنندگان و سلول‌های بنیادی وجود داشته باشد.

محققان در مواردی که معیارهای ارزیابی کنترل کیفیت اجزای مورد استفاده جهت تولید یک مدل سیستم وجود ندارد، باید آن را ایجاد و مستند کنند. تمام اجزا و مواد اولیه بیولوژیک برای توسعه و حفظ یک مدل سیستم باید توسط سازنده یا محقق، برای معیارهای کلیدی مربوط به مدل سیستم مدنظر بررسی شوند.

در حالت ایده آل، یک مدل سیستم مبتنی بر یک فرایند یا دستگاه (دیوایس) مهندسی شده (مثل میکروفلوییدیک) باید از دستگاه و اجزای آماده جهت استفاده تولید شود. اگر این امکان وجود ندارد، دستگاه‌ها و فرایندها باید به نحوی ساخته شوند که به طور گسترده در موسسات دانشگاهی یا از طریق شرکت‌ها در دسترس باشند. شرح جزئیات پروتکل شامل روش ساخت دیوایس، مواد اولیه و منابع آنها باید مستند، مکتوب و قابل دسترس باشد. توضیحات مربوط به ساخت دیوایس باید نشان دهنده مشکلات احتمالی باشد و توصیه‌هایی برای عیب‌یابی را نیز ارائه دهد. جزئیات هر مرحله باید مشخص شود تا بتوان فرآیندهای ساخت را مجدداً باز تولید کرد. همچنین میزان موفقیت در تولید نهایی مدل سیستم باید ذکر شود تا انتظارات کاذب جهت موفقیت تولید در تکرارهای مختلف را ایجاد نکند.

توصیه 2.2.4: اطمینان از تکرارپذیری در یک آزمایشگاه و یا از یک آزمایشگاه یا مرکز تحقیق و توسعه به آزمایشگاه دیگر، از طریق توصیف ریزمحیط (عملکردی) و شناسایی شرایطی که بر تنوع مدل سیستم تأثیر می‌گذارد، امکان پذیر است.

توصیف دقیق روش اندازه‌گیری و بررسی یک مدل سیستم امکان تنوع تکنیکال بین ست آپ‌های مختلف را کاهش می‌دهد. شرایطی که می‌توانند به عنوان یک متغیر بر نتیجه تأثیر بگذارد، مانند تراکم کشت سلولی، مواد اولیه جهت کشت، سرعت جریان سیالات و مایعات در دیوایس‌های میکروفلوییدیک، تغییر فشار اکسیژن، اجزای ماتریکس خارج سلولی، تعداد دفعات (تکرار) تعویض محیط کشت و نوع محیط کشت، باید شرح داده شود. تکرارهای مختلف از یک آزمایش منجر می‌گردد اطلاعات حاصل از آن تمام تنوع‌های تکنیکی و بیولوژیکی را شامل شود و امکان خطا به دلیل متغیرهای مختلف را کاهش دهد. همچنین توصیه می‌شود معیارهای کنترل کیفی ثبت گردد به عنوان مثال آزمایش‌های مستقل جهت ارزیابی تغییرات داخلی یک منبع مورد استفاده از مواد اولیه، از یک منبع به منبع دیگر و از یک رده به رده‌ی سلولی دیگر مورد نیاز است.



ویژگی یابی یا تایید مدل های مشتق شده از سلول های بنیادی

توصیه 1.3.4: نشان دهید که مدل سلولی از نظر عملکردی و فنوتیپی نماینده سلول/بافت اصلی با معیارهای سنجش شده ی متعدد است.

موفقیت استفاده از سلول های بنیادی به منظور مدل سازی مستلزم تأیید عملکرد اختصاصی سلول برای تقلید سلول هایی است که فنوتیپ های سلول منشا خود را تکرار می کنند. این امر با ارزیابی تمایز سلولی مختص یک رده، مورفولوژی بافت، عملکرد و بیان مارکرهای سلولی (مانند آنتی ژن های سطح سلولی و رونوشت های RNA) به دست می آید. نکته مهم این است که فنوتیپ سلولی علاوه بر وابستگی به ساختار ژنتیکی ارگان دهنده، تحت تأثیر محیطی که سلول ها در معرض آن قرار می گیرند و شرایط اپی ژنتیکی سلول ها، نیز می باشد. به این ترتیب، ارزیابی های مکرر در طول رشد (یعنی در مقطع های زمانی مختلف) و نگهداری مدل های سلولی ضروری است. سطوح مختلف پیچیدگی در یک مدل آزمایشگاهی برای نشان دادن جنبه های مختلف عملکردی و فیزیولوژیکی مورد نیاز است. چهار نوع بافت سلولی یا سلول مستعد مشتق شده از سلول بنیادی برای مدل سازی وجود دارد که با مورفولوژی، عملکرد و مارکرهای سلولی ویژه هر بافت تعریف می شوند: اپیتلیوم، بافت همبند، عضله و بافت/سلول های عصبی.

سلول ها و بافت های اپیتلیال در مرزهای اندام ها در حفاظت، ترشح، جذب، دفع، فیلتراسیون، انتشار و دریافت حس نقش دارند. بافت ها و سلول های همبند (شامل غضروف، چربی، استخوان و عروق خونی/لنفوی) از انواع بافت های دیگر حمایت ساختاری می کنند و به انتقال مواد مغذی بین بافت ها و اندام ها، ترمیم بافت آسیب دیده و دفاع از بدن در برابر عفونت و بیماری کمک می کنند.

بافت عضلانی (اسکلتی، قلبی یا صاف) از سلول هایی تشکیل شده است که برای ایجاد حرکت اعضای بدن منقبض می شوند، در حالی که بافت عصبی، از جمله سلول های عصبی و سلول های گلیال، اطلاعات را یکپارچه و از طریق سیستم عصبی محیطی مرکزی به منتقل می کند.

مدل های تشکیل شده از این بافت ها و سلول ها باید ویژگی های مورفولوژیکی و عملکرد سلول منشا را نشان دهند. بنابراین باید ارزیابی مورفولوژیکی شکل، ساختار، فرم و/یا اندازه ی سلول های هدف را با تغییراتی در مورفولوژی سلول ها تأیید کند، که به طور بالقوه نشان دهنده تغییر در عملکرد سلول است، بعنوان مثال طی تمایز سلول های بنیادی، تشکیل تومور و فعل و انفعالات سلول پاتوژن، مورفولوژی مدل نیز تغییر میکند، در مدل ارگانوئید کبد، ارگانوئیدهای کبدی در مرحله ی رشد و افزایش تعداد دارای حفره های توخالی و اصطلاحاً ظاهر لومینال هستند در حالی که پس از تغییر ریز محیط های عملکردی فعال داخل محیط به مسیرهای سیگنال دهی تمایز به سلول های بافت کبد بالغ، مورفولوژی به نوع توو پُر تغییر می کند. در مدل سیستم ها با اینکه مدل از نوع برون تن است ولی عملکرد سلولی باید مشابه فرایندهای سلولی درون تن باشد و فعالیت هایی مانند متابولیسم، تکثیر، تنفس، انتشار، اسمز، انتقال فعال، شاریون، تحرک، و الکتروفیزیولوژی را نشان دهد.

ارزیابی مارکرهای اختصاصی سلول را می توان با روش های رایج مانند ایمونوفلورسسانس، از جمله فلوسایتومتری برای آنالیز آنتی ژن سطح سلولی سوسپانسیون های سلولی، یا ایمونوسیتوشیمی برای ارزیابی تک لایه ی سلولی از سلول های فیکس شده یا فیکس نشده، یا ایمونوهیستوشیمی، که بر روی لام های فیکس شده یا فیکس نشده انجام می شود، را انجام داد. در نمونه های بافت منشا که از آنها سطح مقطع یا برش عرضی فیکس شده تهیه شده است نیز قابل بررسی و مقایسه هستند. از روش های رایج برای تجزیه و تحلیل در سطح RNA میتوان از qPCR، توالی یابی RNA تک سلول (scRNAseq) و بررسی ریزآرایه های بیان ژن را مطرح کرد.



توصیه 2.3.4: زمانی که توسعه یک محصول نیازمند بررسی آن در یک مدل ایجاد شده از سلول های بنیادی باشد، نتایج باید در سطح گسترده ای در مقایسه با بافت منشا ویژگی یابی شده و اطلاعات درآزمایشات مختلف تکرار پذیر باشد.

آنچه از تغییر یک ژن در سلول حاصل می شود، میتواند منجر به ایجاد تغییر در وضعیت سلول و عملکرد آن شود، این دست از تغییرات نیازمند بررسی در سطح توالی یابی RNA تک سلول تا بررسی در سطح مورفولوژی سلول کشت شده هستند، با این حال، مارکر یا نشانگرها به تنهایی نباید برای تعیین لاین سلول، مرحله یا ماهیت آن مورد استفاده قرار بگیرند. بررسی فنوتیپ های مولکولی باید شامل بررسی پتلی از محصولات نهایی یک ژن باشند که رفتار همبسته آن ها به طور تکرارپذیر با رفتارهای عملکردی آن سلول مرتبط است. تعریف پتل های جدید مارکر در بین آزمایش های متعدد باید با استفاده از رویکردهای آماری مناسب از بین منابع مختلف انتخاب و برای محک زدن حساسیت و ویژگی سلول مورد استفاده قرار بگیرد.

توصیه 3.3.4: در بررسی اختلالاتی که با تغییر مورفولوژیکی همراه هستند، باید اطمینان حاصل کرد که در بررسی فنوتیپ میتوان پاسخ به استرس های عمومی را با پاسخ به تغییرات هدفمند تفکیک کرد. اگر تغییر در مرگ سلول، چرخه سلول یا رشد سلول تغییر کند، باید بررسی های وابسته به تراکم و تعداد سلول مدنظر قرار بگیرد.

هر زمان که محیط یک سلول تغییر می کند، باید انتظار پاسخ به استرس های عمومی داشت و فنوتیپ های حاصل از این استرس های عمومی میتواند بر بررسی اثر اختلالات برنامه ریزی شده و هدف در یک مدل سیستم غلبه کنند، به نحوی که تغییر مدنظر قابل بررسی نباشد. در هر غربالگری، کنترل شرایط آزمایش باید شامل بررسی فنوتیپ باشد که نشان دهد این تغییر فنوتیپی حاصل القای اختلال و ایجاد مدل بیماری است یا حاصل تغییر شرایط عمومی آزمایش می باشد. به عنوان مثال پاسخ های ضد ویروسی باید در نمونه هایی که در معرض اسیدهای نوکلئیک خارجی مانند RNA های راهنما برای ویرایش ژنوم (بعنوان مثال در کریسپر) قرار میگیرند، مورد انتظار است. این نوع دست ورزی ها می تواند منجر به خاموش شدن یا مرگ سلول های خاص شود. در بررسی این دست از اختلالات باید از گروه کنترل که دارای ترکیب مشابهی از پورین/پیریمیدین در RNA های راهنما می باشند استفاده کرد. و در بررسی های ثانویه نیز حتما ارزیابی دقیق از اتفاقات مورد انتظار (مانند تغییرات به حساسیت دارویی، پاسخ به یک عامل تمایز و غیره...)، پاسخ های تکثیری، تغییرات مورفولوژی یا مرگ سلولی را بررسی کرد. اگر هر یک از تغییرات در مسیر طراحی یک مطالعه هدف باشند، درک و گزارش موارد خاصی از سیگنال تکثیر یا مرگ سلولی (به عنوان مثال آپوپتوزیس در مقابل پیروپتوزیس) برای تعیین و تمیز اتفاق هدف مورد انتظار در مقابل گروه کنترل که متحمل اتفاقات مشابه شده است بسیار ضروری می باشد.

توصیه 4.3.4: زمانی که به دنبال ایجاد یک مدل حامل تغییر ژنتیکی هستیم، تأیید اینکه مدل بیماری مشتق شده از سلول های بنیادی حامل ژنوتیپ مورد انتظار باشد ضروری است.

تأیید اتفاقات ژنتیکی سلول های بنیادی مشتق شده از بیمار برای تأیید جهش (های) شناخته شده بسیار ضروری است و همچنین ممکن است در احراز هویت نمونه ی منشاء نیز مفید باشد (به توصیه نامه 1.3.1 مراجعه کنید). پی ثباتی ژنتیکی و همچنین موزاییسم ژنتیکی بافت اهداکننده ممکن است منجر به تجمع ژنوتیپ های ترکیبی در سلول های بنیادی هدف شود.



کنترل مطالعه یا پروژه ی تحقیق و توسعه

توصیه 1.4.4: هنگام تعیین تعداد مورد نیاز نمونه جهت تعریف یک مطالعه، تنوع نمونه های بافت منشأ را در نظر بگیرید، سلول های بنیادی مشتق از بیماری و کنترل باید در یک مطالعه دیده شوند.

از روش های آماری مناسب جهت تعیین حجم نمونه استفاده کنید. تعداد نمونه در یک مطالعه میتواند تحت تأثیر میزان اثر و میزان بروز یک فنوتیپ خاص باشد. اگر اندازه اثر برای یک نتیجه ی بیولوژیکی قابل خوانش یا بررسی نباشد، بزرگترین میزان از حجم نمونه را که برای شما قابل انجام می باشد را هدف بگیرید. برای حجم نمونه انتخابی، منطق قوی ارائه کنید. اگر تکرار امکان پذیر نباشد، باید با استفاده از کنترل های ایزوژنیک، متغیرها را کاهش داد. کنترل ایزوژنیک، در مدل سازی بیماری ها به سلول های مهندسی شده ای اطلاق می گردد که ژن های اصلی بیماری زایی (در مدل مورد نظر) را دارا باشند، و معرف یک گروه خاص از بیماران (که به دلیل نقص در آن ژن خاص بیمار شده اند) باشند.

برای مدل سازی بیماری، انتخاب نمونه های سالم یا غیر بیمار برای ایجاد گروه کنترل، مهم است (به توصیه های 2.4.4 و 3.4.4 مراجعه کنید).

توصیه 2.4.4: در مقایسه مدل های افراد بیمار با سالم، معنای "سالم" باید به وضوح تعریف شود.

بسیاری از مدل ها نیاز به مقایسه حالت های بیمار با حالت های غیر بیمار دارند. بنابراین، تعیین پارامترهای یک بیماری که در حال ارزیابی آن هستید برای انتخاب و تعریف یک گروه کنترل مناسب، مهم است. این مهم منجر می شود که بتوان نتیجه گیری درستی از مطالعه یا تحقیق در حال انجام داشت. با توجه به اینکه اکثر بیماری ها با افزایش سن مرتبط هستند و بسیاری از نمونه های کنترل ممکن است حامل فاکتورهای خطر اضافی نسبت به عامل مورد بررسی یا یک بیماری غیر مرتبط باشند، اصلاح سالم یا گروه کنترل باید به دقت تعریف شود. انتخاب گروه کنترل مستلزم در نظر گرفتن سن، قومیت، جنس، ارتباطات خانوادگی، ژنوتیپ و سابقه بالینی فرد نمونه دهنده است.

توصیه 3.4.4: زمینه ی ژنتیکی باید هنگام انتخاب سلول ها برای اصلاح جهش های مرتبط با بیماری در نظر گرفته شود.

سلول های بنیادی در اهداکننده ممکن است به دلیل پلی مورفیسم یا تغییرات ژنتیکی حاصل از کشت، صفات مرتبط با بیماری را نشان دهند. فراتر از ملاحظات کنترل های ذکر شده در توصیه 1.4.4، این جنبه های ژنتیکی می توانند بررسی نتایج فنوتیپی را بی معنی یا بدون نتیجه گیری خاص کنند. (همچنین به توصیه 1.1.3 مراجعه کنید).

توصیه 4.4.4: هنگام مقایسه سلول های ایزوژنیک مشتق شده از دستکاری ژنوم، چندین کلون مستقل باید ارزیابی شوند. در جایی که از مجموع کشت های مختلف باهم به شکل بالک استفاده می شود و نتیجه حاصل از بررسی کلون های مستقل نمی باشد، این بررسی باید مستند شود.

همه روش های فعلی برای ویرایش ژن/تصحیح ژن خطر ایجاد تغییرات ژنتیکی ناخواسته را دارند. این روش ها شامل رویکردهای مبتنی بر CRISPR، ویرایش های پایه ی ژن، چندین روش های مرسوم نوترکیبی همولوگ و غیره است. محققان باید اقدامات لازم را برای شناسایی تغییرات ژنتیکی و انتخاب مسیری برای بررسی دقیق خصوصیات فنوتیپی (مشتقات تمایز یافته) که در آنها این جهش های رایج یا نادر معرفی نشده اند، انجام دهند. علاوه بر این، باید توجه داشت که افراد بیمار و سالم می توانند حامل موزاییسم ژنتیکی باشند و نسبت نسبی سلول های جهش یافته و سالم بسته به نمونه بافت منشأ برای تولید سلول های بنیادی می تواند متفاوت باشد. در مورد آزمایشات زمان بر یا پرهزینه، یا پروتکل های تمایز طولانی، ممکن است تنها انجام آزمایشات کلیدی مرتبط با اهداف مطالعه کافی باشد.



بخش ۵

فصل پنجم) نحوه ی نگارش اطلاعات در مقالات جهت انتشار

ضروری است که هر مقاله حاوی اطلاعات دقیق در مورد پارامترهای زیر باشد تا اطمینان حاصل شود که نتایج منتشر شده قابل تکرار هستند. این بخش تاکید بر جزئیاتی دارد که باید در دست نوشته های آزمایشگاهی و هنگام کار با استفاده از سلول های بنیادی پرتوان یا بافی گزارش شود. برای فهرست کامل توصیه های گزارش نویسی، به پیوست 6 مراجعه کنید.



ویژگی یابی اولیه یا پایه ای

توصیه 1.1.5: مقالات منتشر شده باید شامل منبع رده سلولی یا جزئیات مشتقات آن، توضیحات کامل روش های مورد استفاده برای نگهداری و فریز به منظور حفظ طولانی مدت سلول های بنیادی (شامل روش کشت، پاساژ، انجماد و ذوب)، شماره پاساژ (یا زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی) برای ذخایر بانک سلول عملکردی و اصلی، تعداد پاساژهای متعاقب بعدی پس از خروج از بانک سلولی، پیش و در هنگام انجام آزمایش باشد.

درک ماهیت ساختاری مواد اولیه ی سلولی مورد استفاده در آزمایش در ارزیابی تکنیک ها و نتایج تحقیق و مقایسه آن ها میان آزمایشگاه ها ضروری است. همه گزارش های منتشر شده باید شامل شناسه رده سلولی منحصر به فرد و منبع خاص مواد اولیه سلولی (به عنوان مثال، گروه تجاری، مخزن و همکار) باشد و پروتکل های دقیق برای تکثیر و نگهداری طی استفاده آزمایشی، ارائه گردد. همچنین تعداد پاساژ رده سلولی مشتق شده از رده ی اصلی و مدت زمان پاساژ آزمایشی و ارتباط آن با ذخایر مشخص شده باید ذکر شود.

توصیه 2.1.5: گزارش های منتشر شده باید شامل شماره ثبت رده سلولی مبدأ (hESCs ، hiPSCs و سلول های سوماتیک) و یک شماره منحصر به فرد برای هر تغییر (های) انجام شده در یک رده، مانند باز برنامه ریزی به hiPSCs باشد (به توصیه 1.4.1 مراجعه کنید).



پرتوانی

توصیه 1،2،5: آزمایش‌های پرتوانی و حالت تمایزنیافتگی برای یک سلول باید به‌طور کامل شرح داده شوند، از جمله آزمایش‌های انتخاب شده جهت سنجش، منبع مواد اولیه، نتایج و تحلیل‌های آماری. همچنین باید زمان مداخله برای هر سلول (که در هر آزمایش انتخاب شده، مداخله انجام خواهد گرفت) ذکر گردد. اصطلاح «مارکر پرتوانی» نباید معادل حالت تمایزنیافتگی در نظر گرفته شود.

تست‌های مرتبط با وضعیت پرتوانی و تمایزنیافتگی باید در دوره‌های مختلف از کشت سلولی انجام شود. به عنوان مثال، اگر آزمایش‌ها در 10 پاساژ پس از دفریز از ذخایر از یک بانک سلولی عملکردی انجام شده باشند، این تست‌ها باید در زمان ابتدایی پس از انجماد و پس از 10 پاساژ، هر دو صورت گیرند.

پیوست 4 دستورالعمل‌هایی را در مورد حداقل معیارها برای ارزیابی وضعیت پرتوانی و عدم تمایز ارائه می‌دهد.

با این حال، ضرورت و درجه سختگیری مورد نیاز برای چنین ارزیابی بستگی به زمینه آزمایش‌های گزارش شده و نتیجه‌گیری‌هایی دارد که از آن‌ها گرفته می‌شود (مراجعه به شکل ۲). موارد مطرح شده توسط داوران ارزیابی می‌شوند و مهم است که آن چه انجام شده است، به وضوح مستند گردد.



ویژگی یابی ژنومی

توصیه 1.3.5: روش خاص مورد استفاده برای تحلیل ژنوتیپ، از جمله نحوه انجام آن (تعداد سلول های تجزیه و تحلیل شده) و زمان بندی (پاساژ/زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی) در ارتباط با آزمایشات کلیدی باید گزارش شود.

در عین حال که ما روش خاصی را برای آنالیز ژنوتیپ توصیه نمی‌کنیم، روش انتخاب شده باید با جزئیات کافی شرح داده شود تا وسعت سنجش (یعنی طیف واریانت‌های ژنتیکی که می‌توانستند شناسایی شوند) و حساسیت آنالیز انتخاب شده (یعنی حد آستانه‌ی پایین برای تشخیص سلول های مختلف در یک کشت موزاییکی) برای خواننده گزارش واضح باشد (مراجعه به پیوست 5). محقق باید علامت یا نشانه‌ی واضحی از زمان انجام ویژگی یابی ژنومی را در رابطه با آزمایش‌هایی که داده‌های کلیدی برای مطالعه تولید می‌کنند، تهیه کند. به طور کلی میتوان اینگونه جمع بندی کرد که، رابطه بین کشت سلول‌های مورد استفاده برای ویژگی یابی ژنتیکی و آن‌هایی که برای آزمایشات کلیدی مورد استفاده قرار میگیرند، باید شفاف باشد.

توصیه 2،3،5: پیدایش واریانت ها یا متغیرهای ژنتیکی طی مراحل آزمایشی مانع انتشار نتایج نمیشود؛ مشروط بر اینکه اثرات بالقوه آن ها به درستی در نظر گرفته شود.

در حال حاضر هیچ رویکرد کلی برای پیش‌بینی تأثیر یک تغییر ژنومی اکتسابی با کشت ویژه بر روی صفات سلول های بنیادی پرتوان انسانی یا سلول‌های تمایز یافته از این سلولها و همچنین بر روی سلول‌های سوماتیک یا پیکری انسانی وجود ندارد. این به این دلیل است که صفات ممکن است اثرات پیچیده جهش های متعدد را منعکس کنند و اثرات جهش ها بر روی صفات ممکن است به نوع سلول مورد نظر و محیط اطراف آن ها بستگی داشته باشد. بنابراین، انباشت دانش در مورد ارتباط میان تغییرات ویژگی سلولی مرتبط با کشت و جهش‌های ژنومی حاصل از کشت به عنوان منبع اطلاعاتی مشترکی (بعنوان مثال یک پایگاه اطلاعاتی) برای جامعه تحقیقاتی سلول‌های بنیادی برای اطلاع از تفسیر علمی نتایج تجربی بسیار مهم است.



سیستم های مدل سازی مبتنی بر سلول های بنیادی

توصیه 1.4.5: اطلاعات باید طوری گزارش داده شود که دیگران بتوانند کار را درک و به راحتی مطالعات را مقایسه کنند. این اطلاعات حداقل باید شامل منبع سلول ها یا بافت ها، در صورت امکان موارد مربوط به بیماری و هرگونه جهش یا ناهنجاری ژنتیکی باشد.

جزئیات روش و متدولوژی ایجاد سیستم های مدل سازی باید شامل اطلاعات کافی باشد تا دیگران بتوانند نتایج را به طور دقیق دآوری کنند و یافته ها را به کار گیرند. به طور خاص، منبع سلول ها یا بافت های مورد استفاده مانند گونه، بافت مبدأ و نوع سلول برای تولید مدل ها باید ارائه شود. این نه تنها شامل اطلاعات اهداکننده مربوط به سیستم مدل سازی است (وضعیت بیمار، ژنوتیپ و گونه)، بلکه جزئیات نحوه جداسازی سلول ها یا بافت ها را نیز شامل می شود. اطلاعات سلول های جداسازی و کشت شده از بافت ها باید دارای جزئیات محل اخذ بیوپسی، روش جداسازی، ویژگی پای دقیق جمعیت سلولی ابتدایی یا آغازین با استفاده از بررسی مارکرها و روش های ویژگی پای که در فصل قبل توضیح داده شد، ترکیب اجزای محیط کشت، سرعت دو برابر شدن و فنوتیپ سلول های کشت و رشد داده شده شامل مشاهدات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی مربوطه باشند. نحوه تهیه یا مداخله ی در سلول ها قبل از ایجاد سیستم های مدل سازی نیز باید به دقت شرح داده شود. برای مثال، اگر سلول ها از طریق FACS یا روش جداسازی مبتنی بر استفاده از فلورسنت، یا سایر استراتژی ها خالص و جداسازی شده اند، جزئیات مارکرهای مورد استفاده باید اعلام شود. اگر از رده های سلول های بنیادی پرتوان به عنوان نقطه شروع برای تمایز استفاده می شود، جزئیات مربوط به منشاء آن ها باید درج شود، برای مثال آیا ژنوتیپ آن ها تعیین شده است، جهش های مربوط به بیماری را نشان می دهند و چگونه آن ها را قبل از جداسازی با استفاده از روش های مبتنی بر ماشین (اتوماتیک) کشت داده اند (اطلاعاتی از قبیل محیط کشت، مواد کووت کننده کف پلیت های کشت، و شماره پاساژ ذکر شود). جزئیات مربوط به مدت زمانی که سلول ها یا بافت ها به عنوان یک سیستم مدل سازی در کشت نگهداری شده اند، باید ارائه شود (از جمله روش یا نحوه ی انجام پاساژ).

توصیه 2.4.5: اطلاعات مربوط به محل انجام آزمایش یا نوع نمونه باید برای هر آزمایش انجام شده، گزارش گردد. برای مثال، نمونه ی افراد، رده سلولی، کلون ها، بافت ها، ارگانوئیدها، منابع مختلف سلولی و... همگی باید گزارش شوند.

تجزیه و تحلیل کمی سیستم های مدل سازی میتواند شامل اندازه گیری در مقیاس های مختلف باشد. برای مثال، هنگام اندازه گیری یک ویژگی سلولی خاص اندازه گیری روی تک سلول انجام می شود در حالی که هنگام اندازه گیری اثر جمعیت سلولی (تعدادی سلول با یک مشخصه بخصوص) اندازه گیری در سطح بافت انجام می گیرد. برای داده هایی که پراکندگی دارند باید زیرواحدها یا نقاطی که برای تولید و شکل گیری داده ها مورد استفاده قرار می گیرد مانند نمودار ویولنی، نمودار جعبه ای و... تعریف گردد. این اطلاعات اغلب برای سیستم های مدل سازی *in vitro* (برای مثال ارگانوئیدهای مشتق شده از جمعیت های متعدد سلول های بنیادی که هر داده ممکن است از یک مجموعه جمعیت ایجاد شود حایز اهمیت می گردد) باید گزارش شوند.

اگر آنالیز آماری مانند آزمون های معناداری انجام شود، واحد یک آزمایش که میتواند شامل تکراری از اطلاعات تکنیکال یا بیولوژیکال باشد، مشخص

⁸⁰Fluorescence-Activated Cell Sorting

⁸¹Violin Plot

⁸²Box Plot

⁸³Technical Replicates

⁸⁴Biological Replicates

⁸⁵Organ-On-Chip



گردد (در این حالت باید توضیح داده شود که این تکرارها به چه چیزی اشاره دارند). به عنوان یک قاعده کلی، تکرارهای تکنیکال به تکرارهای یک ماده بیولوژیکی (مواد ژنتیکی استخراج شده از یک آزمایش منفرد) اشاره دارند که دوباره روی همان نمونه انجام می شوند، در حالی که تکرارهای بیولوژیکی نمونه های بیولوژیکی مستقل را نشان می دهند. به این ترتیب، تکرارهای تکنیکال نشان دهنده ی تغییرپذیری در سنجش یا نتیجه ی نهایی هستند، در حالی که تکرارهای بیولوژیکی تنوع بیولوژیکی واقعی نمونه های مختلف را منعکس می کنند.

تکرارهای بیولوژیکی ممکن است به انواع مختلفی از تکرارها اشاره داشته باشند. به عنوان مثال، چنانچه یک پروتیین خاص در 100 سلول از 3 مدل ارگان روی تراشه اندازه گیری شود، طوری که هر یک از 3 دسته از 3 رده سلولی مختلف ساخته شده باشند، باید تعریف شود که کدام یک از این ها برای بررسی آماری مورد استفاده قرار گرفته است. این اطلاعات بشکل متواتر باید نشان داده شده و در نسخه های جدید گزارش نیز ترتیب اطلاعات حفظ شود (Lord, et al., 2020) منطق و اساس انتخاب یک آزمایش باید توضیح داده شود (به عنوان مثال استفاده از ارگانوئیدهای منفرد در مقابل کلون یا گروهی از ارگانوئیدها). به طور کلی، نوع آزمایش باید بر اساس متغیرهای یک مطالعه و با در نظر گرفتن هدف آزمایش انتخاب شود. به عنوان مثال، اگر هدف مقایسه وضعیت بیماری با گروه کنترل (سالم) باشد، باید از چندین رده سلولی مختلف بیمار و چندین رده سلولی سالم برای مدل سازی بیماری استفاده شود و واحد آزمایشی (n) به جای خود مدل (یعنی ارگانوئید یا دسته) تعداد رده های سلولی سالم و بیمار مورد استفاده برای مدل سازی خواهد بود.

تعداد هر آزمایش باید برای مقایسه آماری به وضوح مشخص شود. در حالت ایده آل، مطالعات کافی مقدماتی جهت اخذ اطلاعات مقدماتی و در نظر گرفتن متغیرهای مربوطه باید انجام شود تا آزمایشی با توان کافی (Shin et al., 2022) و با استفاده از محاسبات آماری مناسب امکان پذیر شود (مراجعه به توصیه 3.4.4).

توصیه 3.4.5: هنگام گزارش اطلاعات در مورد نوع نمونه، ممکن است ناهمگنی و مسائل غیرقابل بررسی رخ دهد، این موارد (منابع شناخته شده ناهمگن و ناشناخته) باید تا حد امکان به طور کامل مستند گردند.

بسته به سیستم مدل سازی، منبع سلول یا بافت ممکن است به ناهمگنی فنوتیپی منجر گردد. این امر به ویژه در مورد سیستم های مدل سازی مشتق شده از سلول های بنیادی بافتی، مانند ارگانوئیدهای مشتق شده از سلول های بنیادی بافتی، مرتبط است. به طور خاص، نمونه های گرفته شده از قسمت های مختلف یک بافت ممکن است فنوتیپ هایی ناهمگن را نشان دهند. به ویژه، نمونه های تومور و سایر بافت های دارای ناهنجاری های ژنتیکی ممکن است چنین ناهمگنی را نشان دهند.

توصیه 4.4.5: با هدف انتشار، از فنوتیپ هایی که به شکل اطلاعات کامپیوتری طبقه بندی شده و بانک های اطلاعاتی دسته بندی شده مطرح شده اند باید استفاده کرد. محققان باید از اصول مدیریت داده تحت عناوین FAIR (<https://www.go-fair.org/fair-principles>) و CARE (<https://www.gida-global.org/care>) پیروی کنند. اطلاعات کامپیوتری مانند هوش مصنوعی می تواند برای تعیین نوع مدل سلولی بسیار موثر باشد و یا پاسخ های ژنریک سلولی را از اثرات سلول یا بافت خاص متمایز سازد.

فنوتیپ های کامپیوتری از تجزیه و تحلیل فراداده های مولکولی به دست می آید که ممکن است شامل ترکیبی از آنالیزهای تصویری، پانل های آنتی بادی، فسفو پروتئومیکس، متابولومیکس، ترانسکریپتومیکس، یا تعیین پروفایل اپی ژنتیکی باشند. در حالی که چندین رویکرد محاسباتی ممکن است به طور سودمند برای معیار یا ارزیابی پاسخ های سلولی به کار گرفته شوند، همگی ملزم به گزارش متغیرهای تجربی براساس اصول داده ای FAIR هستند. این گزارش نویسی باید شامل استفاده از انتولوژی ساختار یافته ابر داده، شماره های دسترسی به رده سلولی و فرمت استاندارد اطلاعات باشد که امکان تجزیه و تحلیل آزمایش را در گردش های کاری محاسباتی استاندارد شده فراهم می سازد. بهترین روش شامل استفاده از علامت گذاری برای توضیح مراحل کلیدی در دستورالعمل ها و انتشار گردش کار در نوت بوک های رمز گذاری شده یا کتابخانه های گیت است.

⁸⁶Heterogeneity⁸⁷Phenotypic Heterogeneity⁸⁸Findability, Accessibility, Interoperability, and Reusability⁸⁹Collective Benefit, Authority to Control, Responsibility, and Ethics⁹⁰Ontology⁹¹Metadata⁹²Code Notebooks⁹³Git-Libraries

پیوست یک

ویژگی یابی های توصیه شده جهت استاندارد سلول های بنیادی

۳۶



جدول A1.1) ویژگی یابی سلول های بنیادی پرتوان القایی (PSCs) و سلول های بنیادی بافتی (TSC) و مدل های مشتق شده از سلول های بنیادی (SCM)

آزمون	مشخصه یابی اولیه						وقفه			پایان مطالعه		
	PSC		TSC		SCM		PSC	TSC	SCM	PSC	TSC	SCM
تایید همسانی با دهنده	MCB	WCB	MCB	WCB	MCB	WCB						
	R	D*	R	D*	R	D*	تکرار در گلوگاه ها توصیه می شود			R		
استرلی	R	D*	R	D*	R	D*	بررسی روزانه	بررسی روزانه	بررسی روزانه			
مایکوپلاسما	R	D*	R	D*	R	D*	بررسی فصلی	بررسی فصلی	بررسی فصلی	R		
ارزیابی ژنومیک	R	D*	R	D*	R	D*	به ازای هر 10 پاساز و یا به هنگام برخورد با گلوگاه ها یا استرس های آزمایش			D ²	D ²	D ²
عوامل نابجا	D ⁴		D		D							
تاییدیه نوع سلول/ مارکر های مولکولی	R		R		R							
پژوانی	R ³											
تاییدیه دستکاری ژنتیکی	R ¹		R		R							
تاییدیه جهش های بیماری ها	R ¹		R		R							
پتانسیل تمایز			R									

بهتر است انجام شود= D / پیشنهاد می شود= R

1. قابل اجرا
2. در پایان مطالعه در صورت عدم انجام، در فواصل زمانی توصیه می شود
3. برای اشتقاقی رده های سلولی جدید یا سیستم های کشت جدید
4. در سطح اهداکننده ترجیحا انجام شود



پیوست ۲

معیار های نامگذاری

۳۸



معیار های پذیرش

نامگذاری مناسب برای شناسایی مطمئن مواد سلولی مورد استفاده در تحقیقات سلول های بنیادی بسیار مهم بوده و به منظور تولید نامگذاری سازگار و آسان برای شناسایی مواد، پایبندی به اصول کلی برای نامگذاری رده های سلولی ضروری است. در حالت ایده آل، نامگذاری اختصاص داده شده به اصول زیر پایبند می باشد:

اصول کلی :

- نامگذاری باید کد اطلاعاتی را برای ایجاد شناسه ثابت و منحصر به فرد ارائه دهد.
- شناسه باید به پروفایل اهداکننده و STR مرتبط باشد.
- شناسه باید امکان ردیابی کلون ها و مشتقات را تا منشا آن فراهم کند.
- رایگان (به آسانی) تولید شود. (مانند API)
- دسترسی رایگان در مراکز ثبت شده و مورد تایید
- در میان مجلات و ناشران، یکسان باشد.
- قابل خواندن توسط ماشین و در صورت امکان قابلیت خواندن توسط انسان را داشته باشد.
- به راحتی بر روی برچسب های لوله آزمایش جایگذاری شود. (14-18 سمبل)
- به پروفایل های احراز هویت لینک شود.
- از اطلاعات قابل اعتماد و منصفانه FAIR استفاده شود. (قابل ردیابی، دستیابی و استفاده مجدد)



پیوست ۳

تمرینات کشت سلول سالم

توصیه های زیر به طور گسترده برای کشت سلول (و نه منحصرأ سلول های بنیادی) اعمال می شود.



سترونی

توصیه 3.1.A: محققان باید ثابت و مستند کنند که رده های سلولی عاری از هرگونه آلودگی میکروبی هستند. رده های سلولی باید به طور روزانه از نظر وجود آلودگی میکروبی قابل مشاهده، بررسی شوند به علاوه بانک های سلولی مستر باید تحت تست های میکروبی سختگیرانه (باکتری، قارچ و مخمر) قرار گیرند. در صورت اثبات آلودگی، به غیر از موارد استثنایی باید دور انداخته شوند.

در حین انجام کار، به منظور جلوگیری از آلودگی ناخواسته در عدم حضور آنتی بیوتیک ها، از استخراج تا بیوبانکینگ، کشت سلول های بنیادی باید به صورت آسپتیک انجام شود (Bykowski and Stevenson, 2020; Sanders, 2012) آنتی بیوتیک ها میتوانند بیوشیمی سلول های کشت شده را تغییر دهند. Farzaneh, 2021; Llobet et al., 2015; Romorini et al., 2013; Ryu et al., 2017; Skubis et al., 2017; Varghese et al., 2017

آلودگی میتواند عوارضی را برای سلول داشته باشد، این موارد شامل عملکرد سلول، پایداری ژنتیکی و نرخ رشد میگردد. (Langdon, 2003; Stacey, 2011) مشاهده و بررسی روزانه سلول ها با استفاده از میکروسکوپ توصیه میگردد. به طور کلی، با توجه به رشد سریع باکتری، قارچ و مخمرها به راحتی در روزهای اولیه آلودگی قابل ردیابی هستند. علائم آلودگی شامل: مرگ سلول، کدر شدن و تغییر رنگ محیط کشت (به علت وجود قتل رد به عنوان شناساگر pH) میباشد. در صورت آلودگی محیط های کشت، باید دور انداخته شوند.

تمرین خوب کشت سلولی و غربالگری مناسب باید به منظور اطمینان از سترونی کشت سلول باید حاصل شود. (Pamies et al., 2022) برای اطمینان از استریل بودن MCB (پایه اصلی استفاده آتی از رده های سلولی) آزمون های میکروبی سخت گیرانه توصیه می شود.

آزمون می تواند استفاده از محیط کشت میکروبی به منظور شناسایی آلودگی های پنهان باشد. (European Pharmacopoeia Method 2.6.1, 2022 "Sterility") یا رشد رده سلولی برای 14 روز در محیط کشت غنی از گلوکز بدون آنتی بیوتیک و شناسایی علائم آلودگی های عفونی.



عوامل اتفاقی

توصیه A3.2: به طور کلی اهداکنندگان باید برای ویروس های بیماری زا، از قبل غربال شده باشند. در صورتی که این امکان وجود نداشت، باید سلول های اهدایی یا رده سلولی در اولین فرصت زمانی مناسب مورد ارزیابی قرار گیرند. کلیه رده های سلولی قبل از بیوبانکینگ یا گسترش، حداقل باید از نظر ویروس نقص ایمنی نوع یک و دو (HIV1, 2)، هپاتیت B و هپاتیت C مورد آزمایش قرار گیرند همچنین، کلیه مشتقات بافت انسانی (تست شده یا نشده) باید با استفاده از استاندارد های BSL2 مورد کار قرار گیرد.

در کشت سلولی، ویروس ها، سخت ترین آلاینده برای تشخیص هستند. اکثر ویروس ها قطر متفاوت از 20 تا 400 نانومتر دارند و بنابراین زیر میکروسکوپ نوری دیده نمی شوند، و نمیتوان آن ها را فیلتر کرد.

آلودگی ویروسی می تواند منجر به از دست دادن کشت سلولی، داده های علمی نامعتبر، خطرات بالقوه برای اپراتورها و خطر شیوع بیماری های ویروسی از امکانات حیوانی (زمانی که سلول ها برای مطالعه حیوانات in-vivo استفاده می شود). آلودگی ویروسی نادیده گرفته شده ممکن است عملکرد سلول ها را تغییر دهد و منجر به نتایج ناقص، هدر رفتن فنی و مالی شود. و به طور بالقوه منجر به استرداد توسط نشریات شوند. (Merten, 2002).

خطر عمده آلودگی توسط ویروس های انسانی از مواد اولیه مورد استفاده به منظور تولید سلول های بنیادی است، اگر اهداکننده نتواند قبل از جمع آوری بافت، مورد آزمایش قرار گیرد، باید نمونه را به طور بالقوه عفونی فرض کرده و با استفاده از استانداردهای BSL2 یا دسته دوم با آن رفتار کرد. (Artika and Ma'roef, 2017) در حالی که استفاده مداوم از این سطح از تجهیزات حفاظتی از اپراتورها محافظت می کند، در برخی زمینه های تحقیقاتی خاص، آلودگی چالش برانگیز بوده و نقش تست ها پررنگ تر می باشد. (به عنوان مثال: فلوسایتومتری و مرتب سازی سلول ها) (Pamies et al., 2016).

ویروس ها میتوانند با روش های مستقیم (شناسایی وجود ویروس) یا غیر مستقیم (شناسایی تأثیرات ویروس) شناسایی شوند. آزمون های مستقیم شامل شناسایی توالی ویروسی با استفاده از qPCR یا شناسایی آنتی ژن ویروسی با ایمونوفلورسنس یا ELISA می باشد. آزمون های غیرمستقیم بر پایه بررسی اثرات آسیب سلولی ناشی از ویروس ها می باشد. آزمایش qPCR بسیار حساس و نسبتاً آسان بوده بنابراین باید روش انتخابی باشد، در غیر این صورت آزمایش ویروسی می تواند توسط آزمایشگاه های مورد تایید انجام شود.

به طور کلی، تست شایع ترین ویروس های انسانی، برای محافظت از اپراتورها و کاهش تأثیر بر کشت ها به شدت توصیه میشود. در نهایت، هنگام در نظر گرفتن معرفهای بیولوژیکی، چه انسان و چه حیوانی، اهمیت سرمایه گذاری در معرف با کیفیت بالا و ردیابی مناسب نمی تواند نادیده گرفته شود.



پیوست ۴

مارک‌های برای شناسایی hPSC‌های تمایزنیافته و نظارت بر تمایز چنده‌ای

۴۳

تعداد کمی از رونوشت‌های ژن، پروتئین‌ها یا الیگوساکاریدها به طور منحصر به فرد توسط یک نوع سلول بیان می‌شوند، به طوری که شناسایی و نظارت بر hPSC‌های تمایزنیافته، یا سلول‌های مربوط به اکتودرم، مزودرم یا اندودرم نیاز به استفاده از چندین مارکر دارد. نهاد بین‌المللی نوآوری سلول‌های بنیادی با تکیه بر مجموعه‌ای از آنتی‌ژن‌های سطح سلولی که قبلاً در سلول‌های کارسینومای جنین انسانی تعریف و مشخص شده بودند (Andrews et al., 1996)، مجموعه‌ای از مارک‌های سطح سلولی (جدول A4.1) را شناسایی کرد که معمولاً توسط سلول‌های ES انسانی تمایزنیافته بیان می‌شوند. (نهاد بین‌المللی نوآوری سلول‌های بنیادی، 2007). نهاد بین‌المللی نوآوری سلول‌های بنیادی همچنین از تجزیه و تحلیل پروفایل رونویسی از پانل ژن‌ها (جدول A4.2، جدول A4.3) برای نظارت بر hPSC‌های تمایزنیافته انسانی و تمایز آن‌ها به مشتقات مربوط به اکتودرم، مزودرم و اندودرم استفاده کرد. پانل مشابهی از ژن‌ها در مطالعه Bock و همکاران (2011) استفاده شد که سپس توسط Tsankov و همکاران (2015) برای تعیین کمیت تمایز به سه لایه زایا استفاده شد.



جدول A4.1. آنتی-ژن-های مارکر سطح سلولی برای سلول-های ES تمایزنیافته انسانی

آنتی-ژن	ی‌داب-ی‌ت‌ن‌آ
SSEA3	MC631
SSEA4	MC813-70
TRA-1-60	TRA-1-60
TRA-1-81	TRA-1-81
GCTM2	GCTM2
L-ALP	TRA-2-54
L-ALP	TRA-2-49
CD90(Thy-1)	F15-14-1
CD9	TG30

(منبع: (نهاد بین‌المللی نوآوری سلول-های بنیادی، 2007



جدول A4.2: ژن‌های مارکری که در پنل‌های پروفایل رونویسی برای نظارت بر hPSC‌های تمایزنیافته و تمایز چندرده‌ای آن‌ها استفاده می‌شوند

این جدول ژن‌هایی را فهرست می‌کند که بیان آن‌ها در مطالعات منتشرشده برای ارائه شواهدی از سلول‌های تمایزنیافته یا تمایز به لایه‌های مختلف زاینده استفاده شده است. توجه به این نکته مهم است که هیچ ژن به طور منحصر به فرد توسط یک نوع سلول یا دودمان بیان نمی‌شود. بنابراین، نتیجه‌گیری باید بر اساس الگوهای بیان ژن مشاهده شده در مقایسه با کنترل‌های مناسب باشد. هر نتیجه‌گیری، حداقل می‌تواند بر اساس بیان دو یا سه ژن باشد که نشان‌دهنده هر لایه زایا هستند؛ اما اعتبار هر نتیجه‌گیری با گنجاندن نشانگرهای اضافی در پانل بیشتر می‌شود.

ژن	تمایزنیافتگی	اکتودرم	مزودرم	اندودرم	ترفوبلاست
ABCB1		3	3		
ABCG2	3	2, 3	2, 3		
ACTA2			3		
ACTB			3		
ACTC			1		
ACTN1			3		
ADIPOQ			2, 3		
AFP				1, (3?)	
ALB				3	
ALPL	3				
ANPEP			2, 3		
APOE		2, 3		2, 3	
BMP2			3		
BRIX	1				
CAMK2A	3				
CAPN1			3		
CD14			3		
CD151			3		
CD19			3		
CD24	3	3	3		
CD34			2, 3	1	
CD36			2, 3		
CD4			2, 3		



CD44		2, 3	2, 3	2, 3	
CD59			3		
CD9	1, 3		3		
CDCP1			3	3	
CDH1	3		2, 3		
CDH15			3		
CDH2		2, 3	2, 3	2, 3	
CDH5			2, 3	1	
CDKN2A	3				
CDX2	3			2, 3	
CEACAM1			2, 3		
CGB					1
COL1A1			1		
COL2A1			1		
COMMD3	1				
CRABP2	1	2, 3			
CREBBP	3				
CSF1R			3		
CTNNB1	3			2, 3	
CXCR4		3	3	3	
DDX3X	3				
DES			1, 3		
DIAPH2	1				
DLL1	3		2, 3		
DLX5				3	
DNMT3B	1				
DPPA3	3				
E2F1	3				
EBAF	1				
EDNRB	1				
EN1		2, 3			
ENG			3		
ENO3			3		
EOMES					1
EP300	3				
EPCAM	3				
EPHB2	3				
ERAS	3				



FABP1				3	
FABP2				3	
FABP4			3		
FAS		2, 3			
FCGR3A			3		
FCGR3B			3		
FGF10	3				
FGF2	3				
FGF4	1				
FGF5	1				
FGFR2		2, 3			
FLT1				1	
FN1		3	3	1	
FOXA1				3	
FOXA2			3	1, 2, 3	
FOXO3	1, 3				
FUT4	3	2, 3	2, 3		
GABRB3	1				
GAL	1				
GATA2		2, 3			
GATA3		2, 3	2, 3	3	
GATA4			2, 3	1, 2, 3	
GATA6	1			2, 3	
GBX2	1				
GCG				1, 2, 3	
GCM1					1
GDF3	1				
GFAP		1, 3			
GNL3	3				2, 3
GRB7	1				
GREM1	3				
GSC			3		
GSK3B	3				
HAND1		2, 3	3		
HBB			1		
HBZ			1		
HHEX			2, 3		
HLA-DRA			3		



HLXB9		1			
HNFI1A				2, 3	
HNFI1B				2, 3	
HTATSF1				3	
IAPP				1	
ICAM1		2, 3	2		
IFITM1	1				
IFITM2	1				
IFNGR1	3				
IGFBP3			3		
IL6ST	1				
IMP2	1				
INHBA			2, 3		
INS				1	
IPF1				1	
IRF6	3				
ISL1		1		2, 3	
ITGA2B			3		
ITGA4		2, 3	2, 3		
ITGA6	3	2, 3	2, 3	2, 3	
ITGAL			2, 3		
ITGAM			2, 3		
ITGAV			2, 3		
ITGAX			2, 3		
ITGB1	3	2, 3	2, 3	2, 3	
ITGB2			3		
ITGB3			2, 3		
JAG1	3	3			
JMJD6	3				
KDR			2, 3		
KIT	1, 3		2, 3		
KLF4	3				
KRT1					1
LAMA1				1	
LAMB1				1	
LAMC1				1	
LEF1			2, 3		
LEFTB	1				



LIFR	1				
LIN28	1, 3				
LRP2				3	
MAP2		2, 3			
MAP2K1	3				
MAPK1	3				
MAPK3	3				
MAPT		2, 3			
MCAM		2, 3	2, 3		
MIXL1			3	3	
MME			2, 3		
MNX1		2, 3			
MYC	3				
MYF5			1		
MYH3			3		
MYOD1			1, 2, 3		
MYOG			2, 3		
NANOG	1, 3				
NCAM1		2, 3	2, 3		
NEFL		2, 3			
NES		1, 2, 3	2, 3		
NEUROD		1			
NEUROG3	3	2, 3		2, 3	
NGFR		2, 3	2, 3		
NKX2-5				2, 3	
NODAL	1, 3		3		
NOG	1				
NOG		2, 3			
NOTCH1	3	2, 3	2, 3		
NPPA			1		
NR5A2	1, 3				
NR6A1	1				
NUMB	1				
OLIG2		1			
OTX2		2, 3			
PAX3		2, 3			
PAX4				1	
PAX5		3			



PAX6		1, 2, 3		2, 3	
PAX7		2, 3			
PDGFRA		2, 3			
PDX1				3	
PDX1				2	
PECAM1			2, 3	1	
PODXL	1, 3				
POU5F1	1, 3				
PROM1	3				
PTEN	1				
PTF1A				1	
PTPRC			3		
RAF1	3				
REST	1				
ROCK1	3				
RUNX2			1		
S100B		3			
SDC1			2, 3		
SEMA3A	1				
SERPIN				1	
SFRP2	1				
SHH	3				
SLC2A2				2, 3	
SNAI2		2, 3			
SOX10		2, 3			
SOX17	3			3	
SOX17				1	
SOX2	1, 3	2, 3			
SOX7				3	
SOX9		2, 3			
SP1	3				
SPARC				3	
SPI1			2, 3		
SRF			2, 3		
SST				1, 2, 3	
STAT1	3				
STAT3	3		2, 3		
STAT5A	3				



SYP		1, 2, 3		2, 3	
SYT1		3			
TBXT			1, 2, 3		
TAT				1	
TAZ			3		
TDGF1	1, 3	2, 3			
TERT	1, 3				
TFCP2L	1				
TFRC			3		
TGFB1			3		
TGIF1	3				
TH		2, 3			
TH0		1			
THBD			3		
THY1		2, 3	2, 3	2,3	
TNFRSF1A			2, 3		
TNFRSF1B			3		
TNFRSF8	3				
TNNI3			3		
TP63		3			
TWIST1			2, 3		
UTF1	1, 3				
VCAM1			3		
VIM		3	3	3	
WT1			1		
XIST	1				
ZFP42	1, 3				
ZFX	3				

1. ویژگی-یابی رده-های سلول-های بنیادی جنینی انسانی، توسط نهاد بین-المللی نوآوری سلول-های بنیادی (نهاد بین-المللی نوآوری سلول-های بنیادی، 2007).
2. نقشه-های مرجع تغییرات hESC و hiPSC، خصوصیات پرتوانی رده-های سلولی پرتوان را امکان-پذیر می-کند (Bock et al., 2011).
3. ارزیابی تکنیک-های ایجاد-شده برای تعیین پتانسیل رشدی و بدخیمی سلول-های بنیادی پرتوان انسانی توسط نهاد بین-المللی نوآوری سلول-های بنیادی (Allison et al., 2018).



پیوست 4) جدول A4.3: مجموعه ژن-های مارکر کاهش-یافته که برای آنالیز جسم امبریوئید استفاده می-شوند

مردودن ا	مردوزم	مردوت ک ا	هت فای ن زی ا مت
FABP1	PECAM1	TH	TNFRSF8
ALB	CSF1R	PAX3	TERT
FOXA1	ITGB3	MAP2	FOXD3
HNF1A	VCAM1	OTX2	MYC
LRP2	ANPEP	MAPT2	ALPL
HNF1B	IGFBP3	PAX7	UTF1
SST	CDH5	EN1	POU5F1
ISL1	SPI1	NOG	NANOG
DLX5	THBD	MNX1	E2F1
SPARC	ITGB2	CRABP2	PODXL
GATA6	PTPRC	PDGFRA	GREM1
FABP2	CD36	SNAI2	FGF2
HTATSF1	BMP2	SOX9	SHH
SLC2A2	CD34	S100B	DPPA3
GCG	CD14	NEFL	LIN28

(Allison et al., 2018). منبع: نهاد بین-المللی نوآوری سلول-های بنیادی



بررسی-های تومور زئوگرافت

ما استفاده روتین از سنجش تومور زئوگرافت (تراتوما) را برای ارزیابی پرتوانی توصیه نکرده ایم زیرا سنجش‌های آزمایشگاهی می‌توانند به اندازه کافی توانایی hPSC را برای تمایز به سلول‌های دودمان-های اکتودرم، مزودرم و اندودرم تأیید کنند. با این حال، سنجش تومور زئوگرافت ممکن است برای ارزیابی میزان بلوغ و بافت-زایی مشتقات تمایز یافته hPSC مفید باشد. علاوه بر این، سنجش زئوگرافت می‌تواند پتانسیل بدخیمی یک رده سلولی را نشان دهد که با حضور سلول‌های بنیادی پرتوان تمایز نیافته، یا عناصر کیسه زرده و نورواکتودرم نابالغ، در داخل تومور آشکار می‌شود (Allison et al., 2018). علاوه بر این، پیوند زئوگرافت می‌تواند نشان دهد که آیا کشت‌های مشتق-شده از بیمار که «سالم» در نظر گرفته می‌شوند حاوی سلول‌های تومورزا هستند یا خیر (Georgakopoulos et al., 2020). در صورت استفاده از روش زئوگرافت، جزئیات کامل سویه موش مورد استفاده، محل و روش تلقیح و روش تهیه سلول باید ارائه شود. بافت-شناسی تومورها باید توسط یک هیستوپاتولوژیست واجد شرایط با استفاده از معیارهای WHO و/یا با مراجعه به اطلس-های بافت-شناسی مناسب ارزیابی شود (Damjanov and Andrews, 2016). اصطلاح تراتوما باید برای تومورهای حاوی بافت-های مربوط به هر سه لایه زاینده، اما بدون شواهدی از سلول-های بنیادی تمایز نیافته استفاده شود. اصطلاح تراتوکارسینوما باید برای تومورهای حاوی بافت-های مربوط به هر سه لایه زاینده و سلول-های بنیادی تمایز نیافته استفاده شود (Damjanov and Andrews, 2007). رویکردهای مورفولوژیکی بافت-شناسی سنتی را می‌توان با رویکردهای محاسباتی ترکیب کرد؛ مانند سنجش (Teratoscore (Avior et al., 2015)، که در آن داده-های RNA-seq از تراتوماها برای به دست آوردن اطلاعات دقیق در مورد ترکیب سلولی آن-ها، از جمله وجود سلول-های بنیادی تمایز نیافته استفاده می‌شود (Allison et al., 2018).

آنتی-ژن‌های مناسب برای تشخیص سلول-های بنیادی تمایز نیافته و عناصر کیسه زرده در زیر فهرست شده-اند.

سلول-های بنیادی تمایز نیافته: OCT4، TNFRSF8، TRA-1-60/GCTM2

کارسینومای کیسه زرده: CDX2، GPC3، AFP، SALL4

نورواکتودرم اولیه: PAX6، CD99، CD56، POU5F1، TNFRSF19



پیوست ۵

ارزیابی روش‌های آنالیز ژنتیکی

۵۴



جدول A5.1. روش‌های رایج برای تشخیص تغییرات ژنتیکی سلول‌ها

معایب	مزایا	سرعت	هزینه	حساسیت	رزولوشن یا میزان تشخیص	انواع تغییرات شناسایی شده	روش
نیاز به آزمایش تکثیر سلول‌ها دارد. وضوح محدودی دارد. نیاز به مهارت‌های تخصصی دارد.	یک نمای کلی از کل مکمل کروموزوم در یک سلول را در یک آزمایش ارائه می‌دهد. کلون‌های فردی را متمایز می‌کند. می‌تواند جایجایی‌های متعادل را تشخیص دهد.	آهسته	در حد متوسط	بستگی به تعداد متافازهای تحلیل شده دارد، به عنوان مثال، 20 متافاز تجزیه و تحلیل شده می‌تواند 15 درصد موزاییسم را حذف کند.	10-5 Mb (بسته به سطح باند و ناحیه کروموزومی)	آنیوپلوئیدی تکرار/حذف جابه جایی‌های متعادل و نامتعادل	کاریوتایپینگ
نمی‌تواند جایجایی‌ها یا وارونگی‌های متعادل را تشخیص دهد. نمی‌توان تغییرات بسیار کوچک تعداد کپی را تشخیص داد.	می‌توان روی سلول‌های غیر تکثیری انجام داد. وضوح بالاتری نسبت به کاریوتایپینگ ارائه می‌دهد که امکان تشخیص انواع کپی‌های کوچک را فراهم می‌کند.	در حد متوسط	در حد متوسط	به طور معمول، 10-20%.	100-10 kb	آنیوپلوئیدی تکرار/حذف جابه جایی‌های نامتعادل	آرایه‌های SNP/CGH
وضوح و حساسیت محدود شده.	امکان استفاده از داده‌های RNAseq موجود برای ارزیابی وجود تغییرات ژنتیکی را فراهم می‌کند و در نتیجه می‌توان هر دو یکپارچی ژنتیکی و تجزیه و تحلیل بیان را روی یک نمونه انجام داد.	آهسته	در حد متوسط	بستگی به عمق توالی دارد.	5-10 MB	آنیوپلوئیدی تکرار/حذف	eSNP karyotyping
رویکرد هدفمند، یعنی فقط جهش‌ها را در مکان‌های از پیش تعیین شده تشخیص می‌دهد.	قابل دسترس برای هر آزمایشگاه استاندارد. اجازه گردش سریع را می‌دهد. نسبتاً ارزان.	سریع	اکم	بستگی به نوع ناهنجاری تحلیل شده دارد. برای SNV حساسیت می‌تواند $>0.1\%$ باشد. برای تغییرات تعداد کپی معمولاً حدود 10% است.	$<1\text{ bp}$	تغییرات تک نوکلئوتیدی تغییرات تعداد کپی آنیوپلوئیدی	qPCR/ddPCR



FISH	آنیوپلوئیدی تعداد کمی تغییرات ادغام ژن	Mb 100-1	بستگی به تعداد سلول-های بررسی شده و نوع جهش-های ارزیابی شده دارد. به عنوان مثال، برای دستیابی به کل کروموزوم، غریبالگری 100 سلول معمولاً حساسیت 5% را به همراه دارد.	در حد متوسط	در حد متوسط	می-تواند بر روی سلول-های تکثیری یا غیر تکثیر شونده انجام شود. می-تواند وضوح و حساسیت بالاتری نسبت به کاریوتایپینگ داشته باشد. کلون-های فردی را تمایز می-کند. وضوح و حساسیت محدود.	رویکرد هدفمند، یعنی فقط جهش-ها را در مکان-های از پیش تعیین شده تشخیص می-دهد. تشخیص تکرارهای پشت سر هم به دلیل همپوشانی در سیگنال دشواری است.
Next generation low-pass sequencing	آنیوپلوئیدی تغییرات تعداد کمی	Mb 0.5-5 (بسته به عمق توالی)	بستگی به عمق توالی دارد.	در حد متوسط	در حد متوسط	می-تواند بر روی سلول-های تکثیری یا غیر تکثیر شونده انجام شود. توان عملیاتی بالا	
Next generation deep sequencing (whole genome (WGS) or whole (exome (WES	توالی Indels را تغییر می-دهد تغییرات تعداد کمی	bp 1	بستگی به عمق توالی دارد.	بالا	آهسته	وضوح سطح نوکلئوتیدی که امکان تشخیص انواع تک نوکلئوتیدی را فراهم می-کند. توان عملیاتی بالا ممکن است نیاز به تایید اخلاقی داشته باشد.	تقاضاهای بالا برای ذخیره سازی داده-ها و زمان نسبتاً طولانی برای پردازش بیوانفورماتیک (هر دو در WES کاهش می-یابند، اما WES تنها حدود 1% از ژنوم را مورد بازجویی قرار می-دهد).



جدول A5.2. تغییرات ژنتیکی مکرر رایج در hPSCها، برخی از پیامدهای فنوتیپی آن‌ها و روش‌های مناسب برای تشخیص آن‌ها

تاریخ	تست‌های ارب‌ب‌سان‌م‌ی‌اه‌-شور	ی‌اه‌-پ‌ی‌ت‌ون‌ف‌ز‌ا‌ی‌خ‌رب ی‌اه‌-ل‌ول‌س‌ز‌ا‌ه‌د‌ش‌ش‌رازگ ری‌غ‌ت‌م	ه‌ب‌ه‌د‌ش‌ب‌س‌ک ... ن‌ا‌ون‌ع	ی‌ک‌ی‌ت‌ن‌ژ‌ری‌ی‌غ‌ت ر‌ر‌ک‌م
در برخی موارد، دستیابی به 1q به عنوان یک تکرار بینابینی زیر وضوح کاریوتایپینگ به دست می‌آید.	کاریوتایپینگ (به عنوان مثال، low pass یا G-banding (sequencing) qPCR یا ddPCR SNParrays یا aCGH arrays ؛eSNP-karyotyping FISH		دستیابی به کل کروموزوم (تری‌زومی 1)، بازوی q کامل یا تکثیر بینابینی.	Chromosome 1q gain
در برخی موارد، دستیابی به 12p به عنوان یک تکرار بینابینی زیر وضوح کاریوتایپینگ به دست می‌آید.	کاریوتایپینگ (به عنوان مثال، low pass یا G-banding (sequencing) qPCR یا ddPCR SNParrays یا aCGH arrays ؛eSNP-karyotyping FISH	در حالت تمایز نیافته، سلول‌های تری‌زومی 12 افزایش تکثیر و تشکیل تراتوکارسینوم را نشان می‌دهند (Ben-David et al., 2014). تغییرات با دستیابی به 12p نیز توانایی کاهش یافته برای تمایز را نشان می‌دهند (Keller et al., bioRxiv).	دستیابی به کل کروموزوم 12 (تری‌زومی 12)، ایزوکروموزوم 12p یا دستیابی به کل یا قسمت‌هایی از بازوی p.	Chromosome 12 gain
	کاریوتایپینگ (به عنوان مثال، low pass یا G-banding (sequencing) qPCR یا ddPCR SNParrays یا aCGH arrays ؛eSNP-karyotyping FISH	تغییرات با دستیابی به کروموزوم 17q مزیت رشد انتخابی، فنوتیپ فوق رقابتی در کشت‌های با تراکم سلولی بالا (Price et al., 2021) و الگوهای تمایز تغییر یافته را نشان می‌دهند (Lee et al., 2015).	دستیابی به کل کروموزوم 17 یا دستیابی به کل یا قسمت‌هایی از بازوی q	Chromosome 17q gain



Chromosome 18q loss	حذف بینابینی بازوی q		کاریوتایپینگ (به عنوان مثال، low pass یا G-banding (sequencing) ddPCR یا qPCR aCGH arrays یا SNParrays FISH	حذف ممکن است کمتر از وضوح کاریوتایپینگ باشد.
Chromosome 20q gain	دستیابی به کل کروموزوم 20 (تریزومی 20)، دستیابی به ایزوکروموزوم 20q یا تکرار بینابینی	مزیت رشد انتخابی در حالت تمایز نیافته (Avery et al., 2013; Nguyen et al., 2014) ثبات ژنتیکی را کاهش داد (Zhang et al., 2019) و الگوهای تمایز را تغییر داد (Markouli et al., 2019; Werbowetski-Ogilvie., 2009)	کاریوتایپینگ (به عنوان مثال، low pass یا G-banding (sequencing) qPCR یا ddPCR. SNParrays یا aCGH arrays؛ FISH	کاریوتایپ می-تواند تریزومی 20 و ایزوکروموزوم 20q را تشخیص دهد، اما تکرار بین بافتی 20q اغلب کمتر از وضوح کاریوتایپینگ است.
تغییرات تک نوکلئوتیدی در TP53	به طور معمول در دمین اتصال به DNA از TP53 به عنوان جهش منفی غالب به دست می-آید.	مزیت رشد انتخابی در حالت تمایز نیافته؛ همچنین برای برخی از پروتکل های تمایز انتخاب شده است (Merkle et al., 2017)	توالی یابی نسل بعدی (DNA یا RNA) توالی یابی سنگر	



پیوست ۶

شیوه های گزارش نویسی برای انتشار نتایج سلول های بنیادی بافتی و پرتوان انسانی

۵۹



شیوه های گزارش نویسی برای انتشار نتایج سلول های بنیادی بافتی و پرتوان انسانی

این چک لیست برای کمک به دانشمندان، داوران و ویراستاران برای تهیه و ارزیابی نسخه های خطی جهت گنجاندن جزئیات مهم مربوط به کار با سلول های بنیادی پرتوان (PSC) و سلول های بنیادی بافتی (TSC) با هدف افزایش دقت و قابلیت بازتولید تحقیق از طریق گزارش نویسی می باشد. ضروری است که هر مقاله منتشر شده حاوی اطلاعات دقیقی در مورد پارامترهای زیر باشد تا شفافیت جزئیات آزمایشی افزایش یابد و اطمینان حاصل شود که نتایج منتشر شده قابل تکرار هستند.

برای اطلاعات بیشتر در مورد توصیه ها، لطفاً به بخش های خاص استانداردهای ISSCR برای استفاده از سلول های بنیادی انسانی در تحقیقات ارجاع شده در چک لیست (www.isscr.org/standards-document) مراجعه فرمایید. لازم به ذکر است، همه بخش ها در مورد PSC و TSC اعمال می شوند، مگر اینکه خلاف آن ذکر شده باشد.

بخش مرجع	فرا داده
	توصیف منبع سلول ها / رده سلولی
1.4; 5.1.2	نام (یا نام ها) / نام مستعار رده
1.4	شناسه منحصر به فرد / شماره رجیستری (نام رجیستری)
4.1.1; 5.1	منبع (فروشنده و شماره کاتالوگ در صورت کسب تجاری)؛ محل بیوپسی و جزئیات استخراج (در صورت استخراج)
4.1.2; 5.4.1	فراداده های اضافی در صورت لزوم (مانند جنسیت، قومیت، اطلاعات بیماری، جهش های شناخته شده و...)

بخش مرجع	جزئیات کشت
	شرح روش های مورد استفاده برای جداسازی، نگهداری و حفظ سلول ها
3.2; 4.2.2; 5.1.1	نسبت تقسیم / تفکیک / پاساژ
5.1.1	انجماد و ذوب
4.2.2; 5.1.1	معرف های کشت مورد استفاده (به عنوان مثال محیط، ماتریس، فاکتورهای رشد و...) با شماره کاتالوگ و فروشنده
1.2; 3.2.2; 5.1.1	شماره بانک / پاساژ یا ذخیره انجماد / سلولی مشخصه مورد استفاده

بخش مرجع	خصوصیات پایه
	شرح ارزیابی موارد زیر، از جمله زمانی که آن ها نسبت به آزمایشات انجام شده اند
1.3; 1	احراز هویت
1.6; 1	مایکوپلازما
1.6; 3	سترون سازی (مهار باکتری و قارچ)



بخش مرجع	خصوصیات ژنومی
	شرح خصوصیات ژنومی
3.1; 5.3; پیوست 5	روش مورد استفاده شامل جزئیات کافی برای ارزیابی حساسیت (به عنوان مثال، تعداد سلول های تجزیه و تحلیل یافته / وضوح / میزان آنالیز)
3.2	گزارش زمان تجزیه و تحلیل در رابطه با آزمایشات کلیدی

بخش مرجع	ویژگی پرتوان و حالت تمایز نیافته (فقط PSCs)
	شرح موارد زیر
2.1; 2.2; 5.2; پیوست 4	روش شناسی سنجش
2.1; 2.2; 5.2; پیوست 4	نتایج کمی همراه با تجزیه و تحلیل آماری
2.1; 2.2; 5.2	گزارش زمان تجزیه و تحلیل در رابطه با آزمایشات کلیدی

بخش مرجع	تایید نوع سلول (فقط TSC)
	شرح خصوصیات موارد زیر
4.1; 4.3.1; 5.4.1	جمعیت (های) آغازین با نشانگرها و روش های شناخته شده
4.1; 4.3.1; 5.4.1	فنوتیپ سلول های منبسط شده
4.1; 4.3.1	نشان دادن پتانسیل سوپه

بخش مرجع	خصوصیات مولکولی
	شرح موارد زیر
4.3.4	تایید جهش بیماری (در صورت وجود)
4.4.3; 4.4.4	تایید اصلاح ژنتیکی (در صورت وجود)

بخش مرجع	جزئیات تجربی
	شرح موارد زیر
4.4.4; 5.4.2	اطلاعات مربوط به واحد آزمایشی یا نوع نمونه برای هر آزمایش (به عنوان مثال افراد، رده های سلولی، کلون ها، بافت ها، ارگانوئیدها، دستگاه ها، دسته ها، سلول ها و...)
4.2.2; 5.4.2	تعداد تکرار (بیولوژیکی / تکنیکال)

بخش مرجع	الگوهای داده
	اطلاعات در مورد
4.4.1; 5.4.2	روش های آماری مورد استفاده
5.4.4	گنجاندن داده ها و کد حاشیه نویسی / نرم افزار مورد استفاده برای طبقه بندی فنوتیپ جهت طبقه بندی کننده های محاسباتی (در صورت وجود)
5.4.4	تأیید اینکه اصول مدیریت داده - CARE (https://www.gida-global.org/care) رعایت شده است. FAIR (https://www.go-fair.org/fair-principles/)



- Allison, T.F., Smith, A.J.H., Anastassiadis, K., Sloane-Stanley, J., Biga, V., Stavish, D., Hackland, J., Sabri, S., Langerman, J., Jones, M., Plath, K., Coca, D., Barbaric, I., Gokhale, P., Andrews, P.W., 2018. Identification and Single-Cell Functional Characterization of an Endodermally Biased Pluripotent Substate in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 10, 1895–1907. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.04.015>
- Almeida, J.L., Cole, K.D., Plant, A.L., 2016. Standards for Cell Line Authentication and Beyond. *PLOS Biol.* 14, e1002476. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002476>
- American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002, 2010. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat. Rev. Cancer* 10, 441–448. <https://doi.org/10.1038/nrc2852>
- Andrews, P.W., Casper, J., Damjanov, I., Duggan-Keen, M., Giwerzman, A., Hata, J., von Keitz, A., Looijenga, L.H.J., Millan, J.L., Oosterhuis, J.W., Pera, M., Sawada, M., Schmoll, H.-J., Skakkebaek, N.E., van Putten, W., Stern, P., 1996. Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. *Int. J. Cancer* 66, 806–816. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960611\)66:6<806::AID-IJC17>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960611)66:6<806::AID-IJC17>3.0.CO;2-0)
- Artika, I.M., Ma'roef, C.N., 2017. Laboratory biosafety for handling emerging viruses. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7, 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.020>
- Avery, S., Hirst, A.J., Baker, D., Lim, C.Y., Alagaratnam, S., Skotheim, R.I., Lothe, R.A., Pera, M.F., Colman, A., Robson, P., Andrews, P.W., Knowles, B.B., 2013. BCL-XL Mediates the Strong Selective Advantage of a 20q11.21 Amplification Commonly Found in Human Embryonic Stem Cell Cultures. *Stem Cell Rep.* 1, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.005>
- Avior, Y., Biancotti, J.C., Benvenisty, N., 2015. TeratoScore: Assessing the Differentiation Potential of Human Pluripotent Stem Cells by Quantitative Expression Analysis of Teratomas. *Stem Cell Rep.* 4, 967–974. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.05.006>
- Bairoch, A., 2018. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J. Biomol. Tech. JBT* 29, 25–38. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002>
- Baker, M., 2016. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature* 533, 452–454. <https://doi.org/10.1038/533452a>
- Baker, D., Hirst, A.J., Gokhale, P.J., Juarez, M.A., Williams, S., Wheeler, M., Bean, K., Allison, T.F., Moore, H.D., Andrews, P.W., Barbaric, I. 2016. Detecting Genetic Mosaicism in Cultures of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 7, 998-1012, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.10.003>
- Barbaric, I., Biga, V., Gokhale, P.J., Jones, M., Stavish, D., Glen, A., Coca, D., Andrews, P.W., 2014. Time-lapse analysis of human embryonic stem cells reveals multiple bottlenecks restricting colony formation and their relief upon culture adaptation. *Stem Cell Rep.* 3, 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.006>



- Barone, P.W., Wiebe, M.E., Leung, J.C., Hussein, I.T.M., Keumurian, F.J., Bouressa, J., Brussel, A., Chen, D., Chong, M., Dehghani, H., Gerentes, L., Gilbert, J., Gold, D., Kiss, R., Kreil, T.R., Labatut, R., Li, Y., Müllberg, J., Mallet, L., Menzel, C., Moody, M., Monpoeho, S., Murphy, M., Plavsic, M., Roth, N.J., Roush, D., Ruffing, M., Schicho, R., Snyder, R., Stark, D., Zhang, C., Wolfrum, J., Sinskey, A.J., Springs, S.L., 2020. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies. *Nat. Biotechnol.* 38, 563–572. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0507-2>
- Ben-David, U., Arad, G., Weissbein, U., Mandefro, B., Maimon, A., Golan-Lev, T., Narwani, K., Clark, A.T., Andrews, P.W., Benvenisty, N., Carlos Biancotti, J., 2014. Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 5, 4825. <https://doi.org/10.1038/ncomms5825>
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Gnirke, A., Eggan, K., Meissner, A., 2011. Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell* 144, 439–452. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.032>
- Bubela, T., Guebert, J., Mishra, A., 2015. Use and Misuse of Material Transfer Agreements: Lessons in Proportionality from Research, Repositories, and Litigation. *PLOS Biol.* 13, e1002060. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002060>
- Bykowski, T., Stevenson, B., 2020. Aseptic Technique. *Curr. Protoc. Microbiol.* 56. <https://doi.org/10.1002/cpmc.98>
- Casadevall, A., Steen, R.G., Fang, F.C., 2014. Sources of error in the retracted scientific literature. *FASEB J.* 28, 3847–3855. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256735>
- Chernov, V.M., Chernova, O.A., Sanchez-Vega, J.T., Kolpakov, A.I., Ilinskaya, O.N., 2014. Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Vesicular Traffic in Bacteria and Control over Infectious Agents. *Acta Naturae* 6, 41–51.
- Cimolai, N., 2001. Do mycoplasmas cause human cancer? *Can. J. Microbiol.* 47, 691–697.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.-W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., Stokes, W., 2005. Guidance on Good Cell Culture Practice: A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Altern. Lab. Anim.* 33, 261–287. <https://doi.org/10.1177/026119290503300313>
- Corral-Vázquez, C., Aguilar-Quesada, R., Catalina, P., Lucena-Aguilar, G., Ligerio, G., Miranda, B., Carrillo-Ávila, J.A., 2017. Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of cell lines in biobanking. *Cell Tissue Bank.* 18, 271–280. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9617-6>
- Crook, J.M., Hei, D., Stacey, G., 2010. The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 46, 169–172. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9301-7>
- Crook, J.M., Ludwig, T.E. (Eds.), 2017. *Stem Cell Banking: Concepts and Protocols, Methods in Molecular Biology.* Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0>
- Crook, J.M., Stacey, G.N., 2014. Setting Quality Standards for Stem Cell Banking, Research and Translation: The International Stem Cell Banking Initiative, in: Ilic, D. (Ed.), *Stem Cell Banking, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine.* Springer New York, New York, NY, pp. 3–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0585-0_1
- Damjanov, I., Andrews, P.W., 2016. Teratomas produced from human pluripotent stem cells xenografted into immunodeficient mice - a histopathology atlas. *Int. J. Dev. Biol.* 60, 337–419. <https://doi.org/10.1387/ijdb.160274id>
- Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., Andrews, P.W., 2004. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 53–54. <https://doi.org/10.1038/nbt922>



- Drexler, H.G., Uphoff, C.C., 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39, 75–90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
- Drucker, D.J., 2016. Never Waste a Good Crisis: Confronting Reproducibility in Translational Research. *Cell Metab.* 24, 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.006>
- European Pharmacopoeia Method 2.6.1 Sterility, 2022.
- Farzaneh, M., 2021. Concise Review; Effects of Antibiotics and Antimycotics on the Biological Properties of Human Pluripotent and Multipotent Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 16, 400–405. <https://doi.org/10.2174/1574888X16999201203214425>
- Freedman, L.P., Cockburn, I.M., Simcoe, T.S., 2015. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLOS Biol.* 13, e1002165. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002165>
- Georgakopoulos, Nikitas, Nicole Prior, Brigitte Angres, Gianmarco Mastrogiovanni, Alex Cagan, Daisy Harrison, Christopher J. Hindley, et al. "Long-Term Expansion, Genomic Stability and in Vivo Safety of Adult Human Pancreas Organoids." *BMC Developmental Biology* 20, no. 1 (February 26, 2020): 4. <https://doi.org/10.1186/s12861-020-0209-5>
- Guidance: Rigor and Reproducibility in Grant Applications, 2019. <https://grants.nih.gov/policy/reproducibility/guidance.htm>
- Halliwell, J., Barbaric, I., Andrews, P.W., 2020. Acquired genetic changes in human pluripotent stem cells: origins and consequences. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 715–728. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00292-z>
- Haridhasapavalan, K.K., Borgohain, M.P., Dey, C., Saha, B., Narayan, G., Kumar, S., Thummer, R.P., 2019. An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene* 686, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.069>
- Hay, R.J., Macy, M.L., Chen, T.R., 1989. Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature* 339, 487–488. <https://doi.org/10.1038/339487a0>
- Horbach, S.P.J.M., Halffman, W., 2017. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. *PLOS ONE* 12, e0186281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186281>
- International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), 2005. Best Practices for Repositories I: Collection, Storage, and Retrieval of Human Biological Materials for Research. *Cell Preserv. Technol.* 3, 5–48. <https://doi.org/10.1089/cpt.2005.3.5>
- ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation, 2021. <https://www.isscr.org/guidelines>
- Keller, A., Lei, Y., Krivec, N., de Deckersberg, E.C., Dziedzicka, D., Markouli, C., Sermon, K., Geens, M., Spits, C., 2021. Gains of 12p13.31 delay WNT-mediated initiation of hPSC differentiation and promote residual pluripotency in a cell cycle dependent manner (preprint). *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.22.445238>
- Kurtz, A., Seltmann, S., Bairoch, A., Bittner, M.-S., Bruce, K., Capes-Davis, A., Clarke, L., Crook, J.M., Daheron, L., Dewender, J., Faulconbridge, A., Fujibuchi, W., Gutteridge, A., Hei, D.J., Kim, Y.-O., Kim, J.-H., Kokocinski, A.K., Lekschas, F., Lomax, G.P., Loring, J.F., Ludwig, T., Mah, N., Matsui, T., Müller, R., Parkinson, H., Sheldon, M., Smith, K., Stachelscheid, H., Stacey, G., Streeter, I., Veiga, A., Xu, R.-H., 2018. A Standard Nomenclature for Referencing and Authentication of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.002>
- Langdon, S.P., 2003. Cell Culture Contamination: An Overview, in: *Cancer Cell Culture*. Humana Press, New Jersey, pp. 309–318. <https://doi.org/10.1385/1-59259-406-9:309>



- Lee, C.-T., Bendriem, R.M., Kindberg, A.A., Worden, L.T., Williams, M.P., Drgon, T., Mallon, B.S., Harvey, B.K., Richie, C.T., Hamilton, R.S., Chen, J., Errico, S.L., Tsai, S.-Y.A., Uhl, G.R., Freed, W.J., 2015. Functional Consequences of 17q21.31/WNT3-WNT9B Amplification in hPSCs with Respect to Neural Differentiation. *Cell Reports* 10, 616–632. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.050>
- Lezmi, E. and Benvenisty, N. 2021. Identification of Cancer-Related Mutations in Human Pluripotent Stem Cells Using RNA-seq Analysis. *Nat Protoc.* 16, 4522-4537, <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00591-5>.
- Llobet, L., Montoya, J., López-Gallardo, E., Ruiz-Pesini, E., 2015. Side Effects of Culture Media Antibiotics on Cell Differentiation. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 1143–1147. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0062>
- Lord, S.J., Velle, K.B., Mullins, R.D., Fritz-Laylin, L.K., 2020. SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology. *J. Cell Biol.* 219, e202001064. <https://doi.org/10.1083/jcb.202001064>
- Markouli, C., Couvreur De Deckersberg, E., Regin, M., Nguyen, H.T., Zambelli, F., Keller, A., Dziedzicka, D., De Kock, J., Tillemann, L., Van Nieuwerburgh, F., Franceschini, L., Sermon, K., Geens, M., Spits, C., 2019. Gain of 20q11.21 in Human Pluripotent Stem Cells Impairs TGF- β -Dependent Neuroectodermal Commitment. *Stem Cell Rep.* 13, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.05.005>
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., Benvenisty, N., 2010. Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.017>
- McGarrity, G.J., Vanaman, V., Sarama, J., 1984. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: A review. *In Vitro* 20, 1–18. <https://doi.org/10.1007/BF02633326>
- McIntire, E., Taapken, S., Leonhard, K., Larson, A.L., 2020. Genomic Stability Testing of Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 52, e107. <https://doi.org/10.1002/cpsc.107>
- Merkle, F.T., Ghosh, S., Kamitaki, N., Mitchell, J., Avior, Y., Mello, C., Kashin, S., Mekhoubad, S., Ilic D., Charlton, M., Saphier, G., Handsaker, R.E., Genovese, G., Bar, S., Benvenisty, N., McCarroll, S.A., Eggan, K. 2017. Human Pluripotent Stem Cells Recurrently Acquire and Expand Dominant Negative P53 Mutations. *Nature* 545, 229-233, <https://doi.org/10.1038/nature22312>
- Merten, O.-W., 2002. [No title found]. *Cytotechnology* 39, 91–116. <https://doi.org/10.1023/A:1022969101804>
- Nature Editorial: Reducing our irreproducibility, 2013. . *Nature* 496, 398–398. <https://doi.org/10.1038/496398a>
- Nelson-Rees, W.A., Flandermeyer, R.R., 1977. Inter- and Intraspecies Contamination of Human Breast Tumor Cell Lines HBC and BrCa5 and Other Cell Cultures. *Science* 195, 1343–1344. <https://doi.org/10.1126/science.557237>
- Nguyen, H.T., Geens, M., Mertzaniidou, A., Jacobs, K., Heirman, C., Breckpot, K., Spits, C., 2014. Gain of 20q11.21 in human embryonic stem cells improves cell survival by increased expression of Bcl-xL. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 20, 168–177. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat077>
- OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres, 2007. <https://www.oecd.org/sti/emerging-tech/38777417.pdf>
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Olariu, V., Harrison, N.J., Coca, D., Gokhale, P.J., Baker, D., Billings, S., Kadirkamanathan, V., Andrews, P.W., 2010. Modeling the evolution of culture-adapted human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 4, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.09.001>
- Pamies, D., Bal-Price, A., Simeonov, A., Tagle, D., Allen, D., Gerhold, D., Yin, D., Pistollato, F., Inutsuka, T., Sullivan, K., Stacey, G., Salem, H., Leist, M., Daneshian, M., Vemuri, M., McFarland, R., Coecke, S., Fitzpatrick, S., Lakshminpathy, U., Mack, A., Wang, W.B., Yamazaki, D., Sekino, Y., Kanda, Y., Smirnova, L., Hartung, T., 2016. Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models. *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.1607121>



- Pamies, D., Estevan, C., Vilanova, E., Sogorb, M., 2022. Alternative methods to animal experimentation for testing developmental toxicity in Reproductive and developmental toxicology, Third edition. ed. Academic Press, an imprint of Elsevier, Amsterdam.
- Price, C.J., Stavish, D., Gokhale, P.J., Stevenson, B.A., Sargeant, S., Lacey, J., Rodriguez, T.A., Barbaric, I., 2021. Genetically variant human pluripotent stem cells selectively eliminate wild-type counterparts through YAP-mediated cell competition. *Dev. Cell* 56, 2455-2470.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.07.019>
- Romorini, L., Riva, D.A., Blüguermann, C., Videla Richardson, G.A., Scassa, M.E., Sevillever, G.E., Miriuka, S.G., 2013. Effect of Antibiotics against Mycoplasma sp. on Human Embryonic Stem Cells Undifferentiated Status, Pluripotency, Cell Viability and Growth. *PLoS ONE* 8, e70267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070267>
- Ryu, A.H., Eckalbar, W.L., Kreimer, A., Yosef, N., Ahituv, N., 2017. Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci. Rep.* 7, 7533. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07757-w>
- Sanders, E.R., 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *J. Vis. Exp.* 2754. <https://doi.org/10.3791/2754>
- Sarntivijai, S., Lin, Y., Xiang, Z., Meehan, T.F., Diehl, A.D., Vempati, U.D., Schürer, S.C., Pang, C., Malone, J., Parkinson, H., Liu, Y., Takatsuki, T., Saijo, K., Masuya, H., Nakamura, Y., Brush, M.H., Haendel, M.A., Zheng, J., Stoeckert, C.J., Peters, B., Mungall, C.J., Carey, T.E., States, D.J., Athey, B.D., He, Y., 2014. CLO: The cell line ontology. *J. Biomed. Semant.* 5, 37. <https://doi.org/10.1186/2041-1480-5-37>
- Schlaeger, T.M., Daheron, L., Brickler, T.R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., Gupta, D., McPherson, J., Malwadkar, P., Gupta, M., Bell, B., Doi, A., Jung, N., Li, X., Lynes, M.S., Brookes, E., Cherry, A.B.C., Demirbas, D., Tsankov, A.M., Zon, L.I., Rubin, L.L., Feinberg, A.P., Meissner, A., Cowan, C.A., Daley, G.Q., 2015. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat. Biotechnol.* 33, 58–63. <https://doi.org/10.1038/nbt.3070>
- Shin, M.-G., Kaye, J.A., Amirani, N., Lam, S., Thomas, R., Finkbeiner, S., 2022. RMeDPower for Biology: guiding design, experimental structure and analyses of repeated measures data for biological studies (preprint). *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.07.18.500490>
- Skubis, A., Gola, J., Sikora, B., Hybiak, J., Paul-Samojedny, M., Mazurek, U., Łos, M., 2017. Impact of Antibiotics on the Proliferation and Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2522. <https://doi.org/10.3390/ijms18122522>
- Souren, N.Y., Fusenig, N.E., Heck, S., Dirks, W.G., Capes Davis, A., Bianchini, F., Plass, C., 2022. Cell line authentication: a necessity for reproducible biomedical research. *EMBO J.* 41. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111307>
- Stacey, G.N., 2011. Cell Culture Contamination, in: Cree, I.A. (Ed.), *Cancer Cell Culture, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 79–91. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_7
- Stacey, G.N., Crook, J.M., Hei, D., Ludwig, T., 2013. Banking Human Induced Pluripotent Stem Cells: Lessons Learned from Embryonic Stem Cells? *Cell Stem Cell* 13, 385–388. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.007>
- Steeg, R., Mueller, S.C., Mah, N., Holst, B., Cabrera-Socorro, A., Stacey, G.N., De Sousa, P.A., Courtney, A., Zimmermann, H., 2021. EBISC best practice: How to ensure optimal generation, qualification, and distribution of iPSC lines. *Stem Cell Rep.* 16, 1853–1867. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.07.009>
- The International Stem Cell Banking Initiative, 2009. Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes. *Stem Cell Rev. Rep.* 5, 301–314. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9085-x>



- The International Stem Cell Initiative, 2011. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 29, 1132–1144. <https://doi.org/10.1038/nbt.2051>
- The International Stem Cell Initiative, 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25, 803–816. <https://doi.org/10.1038/nbt1318>
- The Steering Committee of the International Stem Cell Initiative, 2005. The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat. Biotechnol.* 23, 795–797. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-795>
- Tsai, S., Wear, D.J., Shih, J.W., Lo, S.C., 1995. Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10197–10201. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10197>
- Uphoff, C.C., Denkmann, S.A., Steube, K.G., Drexler, H.G., 2010. Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in human and other primate cell lines. *J Biomed Biotechnol* 2010, 904767. <https://doi.org/10.1155/2010/904767>
- Varghese, D.S., Parween, S., Ardah, M.T., Emerald, B.S., Ansari, S.A., 2017. Effects of Aminoglycoside Antibiotics on Human Embryonic Stem Cell Viability during Differentiation In Vitro. *Stem Cells Int.* 2017, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2017/2451927>
- Weissbein, U., Ben-David, U., Benvenisty, N., 2014. Virtual Karyotyping Reveals Greater Chromosomal Stability in Neural Cells Derived by Transdifferentiation than Those from Stem Cells. *Cell Stem Cell* 15, 687–691. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.018>
- Werbowski-Ogilvie, T.E., Bossé, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M.-J., Dingwall, S., Carter, T., Williams, C., Harris, C., Dolling, J., Wynder, C., Boreham, D., Bhatia, M., 2009. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* 27, 91–97. <https://doi.org/10.1038/nbt.1516>
- Zhang, J., Hirst, A.J., Duan, F., Qiu, H., Huang, R., Ji, Y., Bai, L., Zhang, F., Robinson, D., Jones, M., Li, L., Wang, P., Jiang, P., Andrews, P.W., Barbaric, I., Na, J., 2019. Anti-apoptotic Mutations Desensitize Human Pluripotent Stem Cells to Mitotic Stress and Enable Aneuploid Cell Survival. *Stem Cell Reports* 12, 557–571. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.013>
- Zhang, S., Tsai, S., Lo, S.-C., 2006. Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer* 6, 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-116>

Translated by:

Dr. Mahsa Mollapour Sisakht

Mehregan Babamohamadi

Behnaz Barghian-Zarnaghi

Mohammad Taha Salmani Fard Ardestani

Fatemeh Gholizadeh

Kosar Norouzi

