



Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells

Hüseyin AVCILAR¹, Berkay SARAYMEN¹, Okan Özgür ÖZTURAN², Mustafa Yavuz KÖKER¹

1 Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Bilim Dalı, Kayseri, Türkiye
Department of Immunology, Erciyes University, Faculty of Medicine, Kayseri, Turkey

2 Özel Ortadoğu Hastanesi, Plastik Cerrahi Kliniği, Ankara, Türkiye
Department of Plastic Surgery, Ortadoğu Hospitals, Ankara, Turkey

ÖZ

Embriyonik kök hücreler embriyonik blastosistlerin iç hücre kitlesinde yerleşen hücrelerden implantasyon öncesi evrede elde edilirler. Bu hücreler kendini sonsuz bir şekilde yenileyebilen ve çok sayıda farklı hücreye dönüşme (pluripotent) kabiliyetine sahip olan hücrelerdir. Bu özellikleri nedeni ile birçok dejeneratif ve genetik hastalığın tedavisinde kullanılabilceği düşünülmektedir. İnsan embriyonik kök hücreleri ile çalışmanın; etik, politik ve dini tartışmalar nedeniyle zorlaşması ve bilimsel araştırmalarda kullanımının sınırlandırılması araştırmacıları yeni arayışlara itmiştir. Japon araştırmacılar Yamanaka ve ark. 2006 yılında dört transkripsiyon faktörünü kullanarak (Oct 3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) (OSKM faktörleri) fare ve insandan elde edilen fibroblast hücrelerini yeniden programlayarak indüklenmiş pluripotent kök (İPK) hücre elde etmeyi başarmış ve kök hücre araştırmalarında yeni bir dönemi başlatmışlardır. Elde edilen İPK hücrelerin embriyonik kök hücre ile aynı işlevlere sahip olması nedeniyle kök hücre araştırmalarında yeni bir ufuk açılmıştır. Özellikle kişiye ve hastalığa özel İPK hücre elde edilebilmesi, ilaç araştırmaları için laboratuvarında hastalık modellenmesinin yapılabilmesini sağlayarak hücre düzeyinde araştırmalar için yeni bir alan açmıştır.

Anahtar kelimeler: Embriyonik kök (EK) hücre, parthenogenetik embriyonik kök (pgEK) hücre, indüklenmiş pluripotent kök (İPK) hücre

Geliş Tarihi: 26/05/2015 • **Kabul Tarihi:** 07/09/2016

ABSTRACT

Embryonic stem (ES) cells are derived from cells embedded in the inner cell mass of embryonic blastocysts at the preimplantation stage. These cells have self-renewal and pluripotent capacities. Because of these properties, these cells are thought to be useful in the treatment of many degenerative and genetic diseases. Scientists are forced into new research areas as experiments on human embryonic stem cells become harder because of ethics, politics and religious issues and their limitations related to scientific research. Yamanaka et al. were able to produce induced pluripotent stem (IPS) cells by reprogramming human and mice fibroblasts with four transcription factors (Oct 3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) (OSKM factors) in 2006 and they started a new era. A new field in stem cell research is established as the produced IPS cells have the same functions as embryonic stem cells. A new scientific field in cellular research for in vitro drug experiments has emerged as personal and disease-specific IPS cells can now be produced.

Key words: Embryonic stem (ES) cell, parthenogenetic embryonic stem (pgES) cell, induced pluripotent stem (IPS) cell

Received: 26/05/2015 • **Accepted:** 07/09/2016

GİRİŞ

Kök hücre çalışmaları yaklaşık yarım asırlık bir geçmişinden bugüne iki ana akımla gelmiştir. Birinci ana akım embriyonik kök hücre çalışmaları, ikinci ana akım ise vücut somatik hücrelerinin yeniden programlanması

ile elde edilen kök hücreler ile yapılan çalışmalardır (1). Fare embriyonik kök hücreleri ilk defa 1981 yılında iki farklı araştırmacı grubu tarafından, insan embriyonik kök hücresi ise ilk defa 1998 yılında Thomson ve ark. tarafından keşfedilmiştir (2-4).

Vücut somatik hücreleri, üç temel metot kullanılarak pluripotent kök hücreye dönüştürülmüştür;

- 1962 yılında John Gurdon kurbağa bağırsak epitel hücre çekirdeğini yumurta hücresine naklederek ilk somatik nükleer transfer metodunu geliştirmiş ve kurbağa yavrusu elde etmiştir (5). Benzer bir metotla Wilmut ve ark. (6) memeli epitel hücresini klonlamış ve Dolly'nin doğumunu 1996 yılında rapor etmişlerdir.
- Somatik hücre füzyonu metodu yeniden programlanmada kullanılan ikinci uygulama olup hücrenin farklılaşma (pluripotent) kabiliyeti kazanmasını sağlamıştır (7).
- Üçüncü yeniden programlama (reprogramming) metodu ise bazı transkripsiyon faktörlerini kullanarak vücut somatik hücrelerinin pluripotent kök hücre haline dönüştürülmesidir (8).

Kök Hücre Çeşitleri

İnsanda farklı gelişimsel aşamalarda bulunan dokuya özgün kök hücreler vücutta yaşlanan ve ölen hücrelerin yenilenmesini sağlar (9). Kolios ve ark. (10,11), orijinlerine göre kök hücreleri embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler, fetal kök hücreler, perinatal kök hücreler ve erişkin (adult) kök hücreler olmak üzere beş grupta ele almıştır.

Kök hücrelerin üç temel fonksiyonel özelliği vardır;

- a) Kendini Yenileme (Self-Renewal):** Kök hücrelerin sınırsız kendini yenileme kabiliyetleri erken embriyonik dönemde en yüksek düzeydedir. Bu hücrelerin bölünebilme kabiliyetleri sonraki jenerasyona aktarılabilir ve farklılaşmanın ileriki dönemlerinde bölünme kabiliyetleri azalmaya başlar (9).
- b) Özelleşmemiş Hücrelerdir:** Özelleşmiş fonksiyonları yerine getiremezler ve herhangi bir doku hücresine özgü karaktere sahip değildir.
- c) Farklılaşabilme (Plastisite):** Kök hücreler farklılaşarak kalp, sinir, kas, kan ve kıkırdak gibi birçok özelleşmiş hücreyi oluşturabilirler.

Farklılaşma (plastisite) kabiliyetlerine göre kök hücreler beş grupta incelenir (2-5,10).

- 1. Totipotent Kök Hücreler:** Zigot oluşumundan blastosist aşamasına kadar embriyonun en erken evresindeki farklılaşmamış kök hücrelerdir. Embriyo, embriyo sonrası bütün dokuları, embriyo dışı plasenta ve amniotik membran gibi yapıları oluşturan sınırsız çoğalma yeteneğine sahip kök hücrelerdir.
- 2. Pluripotent Kök Hücreler:** Embriyonun 5-6. günlerinde 64-200 hücre aşamasına geldiği blastosist evresindeki iç hücre kitlesindeki embriyoblastlardır. Plasenta haricinde, ektoderm, endoderm ve mezoderm karakterli tüm germ hücrelerine dönüşerek bütün organ ve dokuları oluşturabilir. Sınırsız çoğalma yeteneğine sahip hücrelerdir (11). Embriyonik kök hücre olarak da ifade edilen pluripotent kök hücreler rejeneratif tıp için çok önemlidir.
- 3. Multipotent Kök Hücreler:** Tek bir germ tabakasında farklılaşmaya programlanmış ve embriyonik gelişimin ilerleyen aşamalarındaki kendini yenileme özelliğine sahip erişkin kök hücreleri oluştururlar. Kemik iliği hücreleri ve mezenkimal kök hücreler multipotent kök hücrelerdir. Multipotent hücreler somatik kök hücreler olup kemik iliği, kas, göz, sinir, karaciğer ve deri gibi dokularda bulunabilir. Ölen ya da hasar gören hücreleri yenileme özelliğine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Bölünebilme ve kendini yenileme özellikleri vardır. Hematopoetik kök hücreler tüm kan hücrelerini (miyeloid hücreler, eritrositler, lenfositler) oluşturan multipotent kök hücrelerdir.

Mezenkimal kök hücreler osteoblastlara, kıkırdak hücrelerine, kas hücrelerine, yağ hücrelerine, sinir hücrelerine ve pankreas beta hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler, kemik iliğinden, kas, plasenta, dental pulpa, yağ dokusu ve göbek kordonundan elde edilebilir. Hücresel tedavi uygulamalarına mezenkimal kök hücre tedavi uygulamasına eklenmesi özellikle kemik iliği nakil hastalarında graft versus host hastalığı (GVHD) oluşumunu azalttığı ve immün modülasyona katkı sağladığı gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler salgılamış oldukları sitokinler ve kemokinler gibi mediatörler ile immün sistemin regülasyonunda, diğer hücrelerin farklılaşmasında ve hücrelerin çeşitli bölgelere yönelimde (homing) önemli işlevlere sahiptir. Mezenkimal kök hücreler ayrıca bölgesel hücresel kontakt ile de çevrelerindeki hücreleri etkileyerek de etki edebilmektedir.

- 4. Oligopotent Kök Hücreler:** Özel bir doku veya organda iki veya daha fazla hücre hattına farklılaşabilen kendini yenileme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Miyeloid ve lenfoid hücrelere dönüşebilen miyeloid ve lenfoid öncül (progenitör) hücreler oligopotent kök hücrelere örnektir.
- 5. Unipotent Kök Hücreler:** Yalnız tek bir hücre serisine dönüşebilen kendini yenileme özelliğine sahip en az potent kök hücrelerdir. Kas kök hücreleri buna örnek olup sadece olgun kas hücrelerine farklılaşabilir olabilirler.

Embriyonik Kök (EK) Hücre

Embriyonik kök hücreler fertilizasyonun 5-6. günlerinde iki katmanlı olarak oluşan blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Trofoblast olarak bilinen dış hücre katmanı plasentayı ve amnion zarını oluştururken, iç hücre kitlesi ektoderm, endoderm ve mezoderm doku hücrelerini oluşturur. Embriyonik kök hücreler ilk defa iki farklı araştırmacı grubu tarafından fare embriyolarından elde edilmiştir (2,3). Kendini yenileyebilme ve pluripotent özelliğe sahip olan ilk insan embriyonik kök hücresi Thomson ve ark. (4) tarafından 1998 yılında elde edilmiştir.

Günümüzde üç farklı kaynaktan embriyonik kök hücre elde edilebilmektedir.

- İn vitro fertilizasyon ünitelerinde kullanılmayan embriyolardan elde edilen embriyonik kök hücreler: Bu hücreler gerçek embriyonik kök (gEK) hücre veya fertil embriyonik kök (fEK) hücre olarak isimlendirilir.
- Somatik nükleer transfer metoduyla elde edilen embriyonik kök hücreler: Bu metotla yumurta hücre çekirdeği ince iğne ile çıkartılıp, yerine vücut somatik hücre çekirdeği nakledilir. Yeniden programlanan yumurta hücresi aktive edilip çoğalmaya bırakılır. Bu metotla elde edilen hücre nükleer transfer embriyonik kök (ntEK) hücre olarak isimlendirilir (13).
- Dölllenmemiş yumurta hücrelerinden parthenogenez ile elde edilen embriyonik kök hücreler: Bu hücrelere parthenogenetik embriyonik kök (pgEK) hücre denir. Elde edilen embriyoya parthenot denir (14).

Embriyonik kök hücreler elde edildikten sonra büyüme faktörü içeren özel besi yerlerinde dondurularak sonraki bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere saklanır.

Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamları değiştirilir ya da bazı büyüme faktörleri eklenir veya çıkarılırsa diferansiye olur ve ortamda genellikle üç germ tabakasını içeren embriyoid cisim oluşturur (12).

Embriyonik kök hücreler ile yapılan çalışmalarda blastosiste müdahale edilmesi gerektiği için insan kaynaklı çalışmalar yapılmasında etik, dini ve politik tartışmalar ortaya çıkmıştır. Ülkemizde 2006 yılında Sağlık Bakanlığı yönetmeliği ile embriyonik kök hücre çalışmaları düzenlenmiştir (15).

Parthenogenetik Embriyonik Kök (pgEK) Hücre

Uniseksüel üreme olan parthenogenez genellikle bitkiler, balıklar, bal arıları, amfibiler ve sürüngenler gibi canlılarda görülür. Memelilerde ise görülmez. İnsanlarda oosit nadiren kendiliğinden aktive olarak ovaryumda teratoma oluşturabilir. Dölllenmemiş memeli oositi, mekanik ve kimyasal etkenlerle uyarılarak in vitro koşullarda parthenogenetik aktivasyonla embriyonik olmayan blastosist oluşturulabilir. Oluşan blastosist iç hücre kitlesinden pluripotent parthenogenetik embriyonik kök hücreler elde edilebilir. Bu hücreler in vitro kendini yenileme özelliği ve klonogenik kapasite gösterir. Oluşan embriyoda normal embriyonik ve ekstra embriyonik gelişim görülmez (16).

Parthenogenetik embriyonik kök (pgEK) hücre ilk defa Kaufman ve ark. tarafından 1983 yılında farelerde izole edilmiş, daha sonra tavşan, maymun ve insanlarda elde edilmiştir. pgEK hücrelerinin sperm hücreleri ile döllenme sonucu elde edilen embriyonik kök (EK) hücrelere benzer olduğu, kök hücre belirteçlerini eksprese ettiği, embriyoid cisim oluşturduğu ve üç germ tabakasına ait hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir (17). Embriyonik kök (gEK) hücrelerle yapılan çalışmaların immünolojik rejeksiyonlara neden olması, etik tartışmalar ve teratom oluşumu gibi sebeplerle klinik uygulanmaları sınırlandırılmaktadır. Ayrıca, İPK hücrelerin elde edilmesinde karşılaşılan zorluklar, yüksek maliyet ve uzun bir sürece gerek duyulması, araştırmacıları alternatif pluripotent kök hücre arayışlarına itmiştir. Parthenogenetik embriyonik kök (pgEK) hücrede döllenmiş blastosiste müdahale söz konusu olmadığından etik tartışmaları sonlandırmaktadır. Bunun yanında elde edilmesinin kolay ve düşük maliyetli olması, immünojenetik yönden HLA tam uyumlu hücrelerin kolayca elde edilebilmesi sebebi ile alternatif kök hücre kaynağı olarak öne çıkmaktadır (Tablo I) (18).

İndüklenmiş Pluripotent Kök (İPK) Hücreler

İndüklenmiş pluripotent kök (İPK) hücre embriyonik kök hücre benzeri işlevi olan ve vücut somatik hücrelerinin bazı transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanması (re-programming) sonucu elde edilen hücrelerdir. İlk olarak Yamanaka ve ark. (8) tarafından retroviral gen aktarım metodu ile Oct 3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, (Yamanaka faktörleri, OSKM faktörleri) genleri kullanılarak fare cilt fibroblast hücreleri pluripotent kök hücreye dönüştürülmesi ile İPK hücresi elde edilmiştir (Şekil 1). Bir yıl sonra aynı ekip insan cilt fibroblast hücrelerinden pluri-

potent İPK hücresi elde etmiştir (20). Elde edilen İPK hücrelerinin EK hücreler ile aynı özelliklere sahip olduğu anlaşıldı. Bir başka çalışma grubu ise Sox2, Oct 3/4, Nanog ve Lin28 transkripsiyon faktörlerini kullanarak İPK hücresi elde etmiştir (21). Bu ilk çalışmalardan sonra birçok ekip, farklı transkripsiyon faktör kombinasyonları kullanarak, farklı somatik hücrelerden, farklı gen aktarım metotları ile İPK kök hücreleri elde etmişlerdir (22).

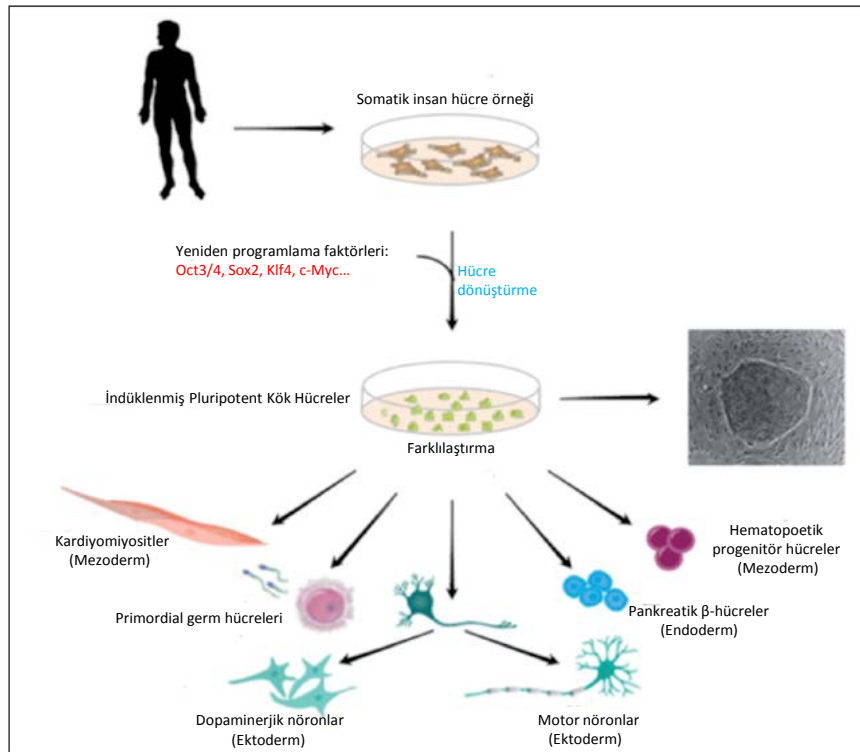
A) İPK Hücre Elde Etmede Kullanılan Kaynaklar

Bugüne kadar insan, fare, tavşan, domuz, maymun gibi birçok farklı canlı hücresi transkripsiyon faktörleri

Tablo I: Pluripotent kök hücrelerin karşılaştırılması*.

	pgEK HÜCRE	gEK HÜCRE	İPK HÜCRE
Etik Sorunlar	Embriyoya müdahale yoktur	Embriyoya müdahale vardır	Embriyoya müdahale yoktur
Güvenilirlik	Virüs ve plasmidler kullanılmaz	Virüs ve plasmidler kullanılmaz	Virüs ve plasmidler gereklidir
Epigenetik	Genomik kopya sadece maternal kaynaklıdır pgEK hücre normal kopya	Genomik kopya genellikle normal Bozuk metilasyon olan kopya olabilir	Genomik kopya genellikle normal Bozuk metilasyon olan kopya olabilir
HLA Uyumu	HLA tam uyumlu hücre serileri kolayca elde edilir	HLA tam uyumlu hücre serileri nadiren elde edilir	HLA tam uyumlu hücre serileri elde edilir
Malignite	Zayıf	Yüksek	Yüksek

* "Reprogrammed Parthenogenetic ES Cells" Takuro Horii and Izuho Hatada, 2011 den uyarlanmıştır (19).



Şekil 1. İPK hücre eldesi ve uygulamalarının şematizasyonu (24).

ile yeniden programlanarak İPK hücre elde edilmiştir. Farelerde fibroblast, periferik kan, karaciğer, pankreas hücresi, nöral progenitör hücrelerden İPK hücre elde edilmiştir. İnsanlarda fibroblast, periferik kan hücreleri, keratinosit, üriner epitel hücreleri, karaciğer, mide epitel hücreleri, mezenkimal hücreler, B ve T hücre, nöral kök hücre, pankreas hücreleri, progenitör kan hücreleri, kord kan hücresi İPK hücre elde etmede kullanılmıştır (22).

Başarılı bir şekilde İPK hücre elde edilebilmesi birçok faktöre bağlıdır;

- Hücre kültür ortam şartları,
- Kullanılan olgun hücre tipi ve karakterine, (fibroblast, lenfosit gibi)
- Kullanılan gen aktarım metodunun özelliği (viral, non-viral)
- Kullanılan hücrenin bulunduğu farklılaşma basamağına göre İPK hücre elde süresi ve elde edilen İPK hücre oranı değişebilmektedir (19).

Retroviral gen aktarım yöntemiyle fare embriyonik fibroblast hücresi ile yapılan çalışmada 8-12 günde İPK hücre elde edilirken, aynı yöntem kullanıldığında insan cilt fibroblast hücresinden 20-25 günde İPK hücre elde edilebilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en çok cilt fibroblast hücreleri tercih edilmiştir. Kordon kanından elde edilen CD133+ kök hücreler ile yapılan çalışmada sadece OCT4 ve SOX2 kullanılarak İPK hücre elde edilmiştir (20).

Hastaya özgün İPK hücre elde edilebilmesi hücre tedavinin en önemli basamaklarından birisidir. Cilt fibroblast hücreleri yüksek oranda İPK hücre elde edilebilmesi nedeniyle hücre kaynak olarak ilk tercih olmaktadır. Ancak, cilt fibroblast hücresi eldesi için cilt biyopsisine ihtiyaç duyulması, enfeksiyon riski, cilt hücrelerinin ultraviyole maruziyeti nedeniyle mutasyona uğrayabilmesi ve primer hücre kültürünün eldesi için 3-4 hafta gibi uzun bir zamana ihtiyaç duyulması gibi nedenler cilt fibroblastların İPK için hücre kaynak olarak kullanımını sınırlamaktadır (23).

İPK hücre eldesinde hücre kaynak olarak cilt fibroblastların kullanımındaki zorluklar araştırmacıları yeni arayışlara itmiş ve kaynak olarak kolaylıkla elde edilebilen periferik kan hücreleri hedeflenmiştir. İPK hücre elde etme ve yeniden programlama işleminde nükleusu

olan periferik kan hücreleri gerektiği için eritrosit ve trombositler haricindeki granülositler, monosit, B lenfosit, T lenfosit ve progenitör hücreler İPK hücre üretimi için kullanılabilir. Özellikle periferik kan progenitör kök hücreleri ve matür T lenfositler yeterli, gerekli hücre çoğaltım metotları olması sebebi ile yeniden programlama işleminde tercih edilmektedir (23).

B) İPK Hücrede Gen Aktarım Yöntemleri

İPK hücre elde etmek için yapılan yeniden programlama işleminde farklı gen aktarım yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu uygulamaları iki kısımda ifade edebiliriz. Her iki yöntem de kendi içinde virüslerin kullanılıp kullanılmamasına göre ayrıca ikiye ayrılmaktadır (Tablo II).

a) **Genoma Entegre Olan Yöntemler;** retroviral ve lentiviral gen aktarım yönteminde konak genomuna entegrasyon oluşması nedeniyle in vitro çalışmalarda yüksek İPK eldesi mümkün olabilmektedir. Ancak, viral genomda oluşan mutasyonlar bu yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır. İn vivo çalışmalarda hastalık modelleri çalışılacaksa ve hücre tabanlı tedavi düşünülüyorsa genoma entegre olmayan (non-integratif sistemler) kullanılmalıdır. İlk İPK çalışmasında Moloney murin lösemi retrovirusu (MMLV) gen transferi için kullanılmıştır. MMLV sadece aktif bölünen hücreleri enfekte edebilmektedir. Retro virüslerin kullanıldığı yöntemde ise fare embriyonik fibroblastlarda OSKM ekspres oranı %0.1 iken, insan fibroblastlarında bu oran %0.001 kadardır. Lentiviral gen aktarımında ise daha yüksek oranda hücreleri enfekte etmek mümkündür. Lentivirüsler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmekte ve daha yüksek oranda İPK hücresi elde edilebilmektedir (24).

Tablo II: Faktör aktarım yöntemleri ve transfer araçları.

	Viral Aktarım (+)	Viral Aktarım (-)
Genoma entegre (+)	Retro virüs	
	Lenti virüs	
	Adeno virüs	Epizomal
	Sendai virüs	Piggy Bac
Genoma entegre (-)		Protein
		RNA
		Küçük (small) molekül

b) Genoma Entegre Olmayan (Non-integrating) Yöntemler; genoma entegre olmayan viral gen aktarımı olarak Adeno virus (25), Sendai virus (26) kullanılmaktadır. Adeno virus kullanarak yapılan uygulamalarda İPK hücre elde etme oranları diğer yöntemlere göre düşük bulunmuştur. Viral olmayan gen aktarım metodlarından bazıları episomal (27), Piggy Bac, RNA(28), protein(29) ve küçük (small) molekül (30) ile gen aktarım metodlarıdır (Tablo II). Episomal gen aktarım yönteminde plasmidlerle monte transkripsiyon faktörleri elektroporasyonla direkt hücreye aktarılır. Bu yöntem basit ve daha az zaman alması ve viral partiküllerle çalışılmaması yönünden diğer yöntemlerden avantajlıdır. RNA aktarımı metodunda sentetik mRNA kullanılarak farklı insan somatik hücrelerinden İPK hücre elde edilmiştir. Bu yöntem ile İPK hücre elde etme oranları diğer yöntemlere göre hem yüksek hem de daha kısa sürelidir. Eksojen genetik materyal kullanmaya gerek kalmadan uygulanan diğer bir yeniden programlama yöntemi ise protein metodudur.

C) İPK Hücre Elde Etmede İşlem Basamakları

İPK hücre elde edilme süresi, deneyin başlama aşamasına bağlı olarak yaklaşık 3 aylık bir zaman gerektirir. Bu süreçte ilk basamaklar deneyde kullanılacak cilt fibroblast hücrelerinin ve lentivirüslerin elde edilmesidir (31).

- **Primer Cilt Fibroblast Hücre Kültürlerinin Elde Edilmesi;** Deneyde kullanılacak cilt fibroblast hücreleri için vericilerin ön kol bölgesinden biyopsi alınır. Alınan materyal 1 mm'lik parçalara ayrılarak doku kültür plağına nakledilir, üzerine uygun besi yeri eklenir ve 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübatöre nakledilir. Başladıktan 3-4 hafta sonra deneyde kullanılacak primer cilt fibroblast hücre kültürü elde edilmiş olur.
- **Lentivirüs Üretimi;** Lentivirüsler 3'lü plasmid sistemi kullanılarak güvenlik kabinli ortamda elde edilir. Plasmidler 293 FT hücre kültürüne eklenir ve kültür plağı 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilerek 4-5 gün içerisinde transfeksiyonla Lentivirüs elde edilir. Lentivirüslerin etkinliğinin kontrolü ikinci hafta yapılacak transdüksiyon deneyi ile yapılır.
- **Fibroblast Hücrelerinin Yeniden Programlanması (Reprogramming) (İPK Deneyi);** Reprogramming deneyinde taze ekimi yapılmış fibroblast hücreleri

kullanılır. Fibroblast hücreleri hücre kültür plaklarına deneyden 24 saat öncesinden ekimi yapılır. Ertesi gün daha önceden hazırlanan transkripsiyon faktörlerini içeren transfekte Lentivirüs solüsyonu fibroblast kültür plaklarının üzerine eklenerek fibroblast hücreleri enfekte (transdüksiyon) edilir. Deneyin 5. gününde Lentivirüsle transdüse edilmiş fibroblast hücreleri, FEF hücreleri ekilmiş hücre kültür plaklarına nakledilir (re-plating). FEF hücreleri transdüse hücrelere destek hücre (feeder cell) görevi görecektir. Deneyin bu basamağında nakil öncesi fibroblast hücrelerinin akım sitometride hücre analizi yapılarak transdüksiyon işleminin kontrolü yapılır. Hücre kültür plaklarında İPK kolonileri toplanmaya başlanıncaya kadar plaklar 37°C'de %5 CO₂ inkübe edilir. Bu sürede her gün kültür plaklarının Human Embriyonik Serum (HES) medyumuna yenilenir.

- **İPK Kolonilerinin Toplanması;** Dördüncü haftadan itibaren İPK kolonileri plakta görülmeye başlar. Kolonilerin invert mikroskopta kesme ve kaldırma işlemi ile toplama yapılır. Her örnekten yaklaşık 20 farklı İPK kolonisi alınıp kültür plaklarına ekimi yapılarak p1 pasajı yapılır. Toplanan İPK kolonilerinin her hafta pasajı yenilenecek çoğaltma işlemi yapılır. Ortalama 5 ile 10 arasında İPK hücre hattı tespit edilip, her hücre hattından 5 cryovial tüp stok hazırlanır ve likit nitrojen tankında veya -150°C'de uzun dönem saklanır.
- **İPK Hücrelerinin Karakterizasyonu;** Yeni üretilen İPK hücrelerinin kalite kontrol testlerinin ve EK hücreler gibi olduğu pluripotent karakterizasyon testlerinin yapılması gerekir. Bu amaçla ilk önce morfolojik inceleme, karyotipleme, alkalin fosfataz ve DAPI boyama testlerinin, immünokimyasal pluripotensi belirteç (markır) incelemesi, farklılaşma (diferansiyasyon) ve mikrobiyolojik testlerin yapılması gerekir (32).
- **Morfolojik İnceleme:** İPK hücre kolonisinin, mikroskop altında embriyonik kök hücre kolonisine benzerliği değerlendirilir. İPK kolonilerinin morfolojik olarak görüntüsünün, embriyonik kök hücre kolonisine benzer, kültür plağına sıkı şekilde yapışık, keskin sınırlı, dens ve yoğun görüntüsünün olması gerekir.
- **Pluripotensi Belirteç İncelemesi:** Embriyonik kök hücreler alkalin fosfataz (ALP) aktivitesine sahip

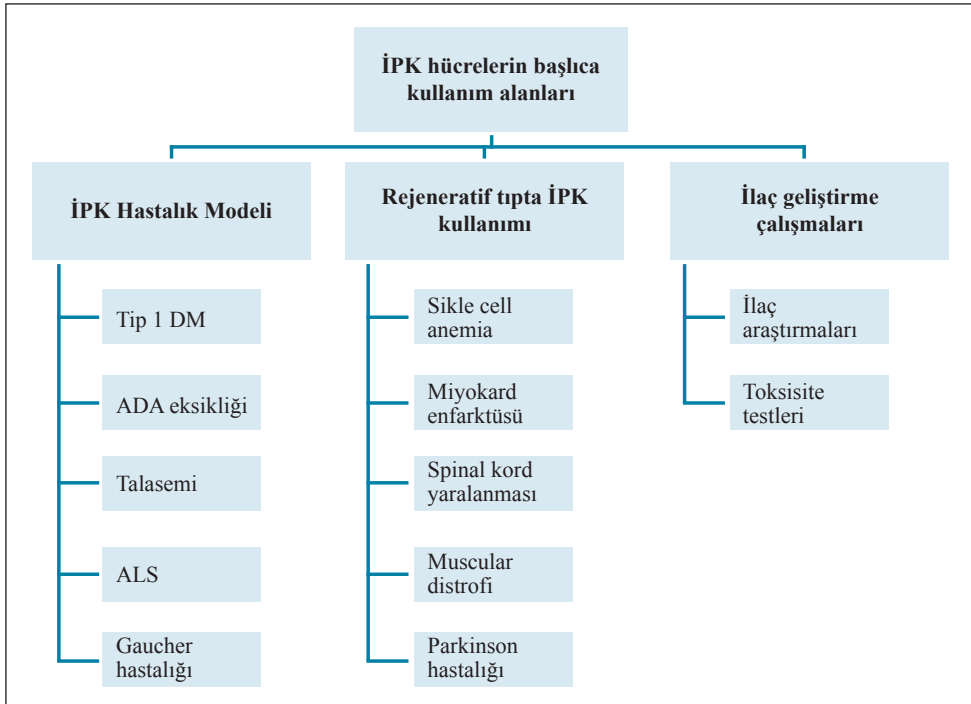
olup, bu amaçla İPK kolonileri toplanmış hücre kültür plakları toplama işleminden sonra medyumunu aspire edilip formaldehitte tespit edildikten sonra ALP boyası ile boyanır. İnsan embriyonik kök hücrelerinin hücre içi pluripotensi belirteçleri Oct4, Nanog ve Sox2'dir. Ayrıca yüzeylerinde keratan sülfat antijenleri Tra-1-60, Tra-1-81 ve glikolipit antijenleri SSEA3, SSEA4 eksprese ederler. Fare pluripotensi belirteçleri ise Oct4, Nanog, Sox2 ve SSEA1 antijenleridir.

- **Farklılaşma Testleri (Diferansiyasyon İncelemesi):** İPK hücrelerinin pluripotensi testleri pozitif ise, pluripotensi belirteçlerini eksprese ettiği doğrulanmışsa bir sonraki aşamada, embriyoyu oluşturan üç germ tabakasından kaynaklanan dokulara farklılaştığının gösterilmesi gerekir. Bunun için in vitro ve in vivo farklılaşma testleri yapılır. İn vitro farklılaşma testi için Embrioid cisim oluşturma testi yapılır. İn vivo farklılaşma testi için İPK hücreleri ağır kombine immün yetmezlik (SCID) olan farelere deri altı veya kas içi olarak enjekte edilir. Pluripotent karakterde olan hücreler enjeksiyon yerinde çoğalmaya başlar ve üç germ tabakasından kaynaklanan dokuları oluşturur. Enjeksiyon yerinde 2-3 ay içerisinde oluşan teratom dokusu histolojik boyama ile incelenir.

- **Genomik İPK Karakterizasyonu:** DNA fingerprinting ve DNA metilasyon analizleri yapılır.
- **Karyotip İncelemesi:** Kromozomal anomalilerin araştırılması için yapılır. G-banding işlemi için hücre bölünmesi metafaz safhasında durdurulur, giemsa ile boyanır ve ışık mikroskobunda incelenmesi yapılır.
- **Mikrobiyolojik İnceleme:** İPK kültür plakları için rutin Mikoplazma kontrol testlerinin ve gram pozitif ve negatif bakteri testlerinin ilgili etkenlerine karşı periyodik olarak yapılması gerekir. Bu amaçla ilk önce morfolojik inceleme, karyotipleme, alkalin fosfataz ve DAPI ile boyama testlerinin yapılması daha sonra farklılaşma için akım sitometrik analiz ve ortam kontrolü için mikrobiyolojik testlerin yapılması gerekir (32).

D) İPK Hücrelerin Başlıca Kullanım Alanları

İPK hücrelerini bilimsel çalışmalarda ve hücresel tedavi araştırmalarında kullanılacak üç temel alan bulunmaktadır. Bunlar insan hastalık modellenmesi, rejeneratif tıp çalışmaları ve ilaç araştırmalarıdır (Şekil 2) (33).



Şekil 2. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin kullanım alanları.

Hasta Spesifik İPK Hastalık Modellemesi

Birçok genetik hastalıkta bilimsel araştırmalarda kullanılacak insan kaynaklı deneysel materyal eldesi konusunda birçok ÷lkede etik kurullar tarafından katı kısıtlamalar uygulanmaktadır. Dolayısıyla yeterli miktarda ve istenilen zamanda deneysel materyal elde etmek araştırmaların önündeki en önemli engellerden biridir. Yeterli miktarda ve uygun zamanda deneysel örneklerle erişebilmek bir araştırmacı için büyük bir avantajdır. İPK hücreler bu sorunların üstesinden gelmede başvurulacak önemli bir argüman haline gelmektedir. Beraberinde hastalıklara özgü deneysel modeller ve hasta spesifik İPK hücreler üretilebilmektedir. Ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılabileceğimiz hücre hatları da elde edilebilmektedir. Bugün birçok hastalık modelinin İPK kök hücre modelleri elde edilmiştir (34). Bu hastalıklar içerisinde Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Spinal muskular atrofi, Parkinson hastalığı, Talasemi, Rett sendromu, Adenozin deaminaz eksikliği, Gaucher hastalığı, Duchen muskuler distrofi, Becker muskuler distrofi, Hantington hastalığı, Tip 1 DM, Down sendromu, Lesch Nyhan sendromu sayılabilir. Hastalık modelleri hastalığın patogenezinin araştırılmasında ve tedaviye yönelik ilaç geliştirme çalışmalarına yardımcı olmaktadır (35).

Rejeneratif Tıpta İPK Kullanımı

İmmün rejeksiyon sorunu, organ transplantasyonu ve hücresel tedavinin önündeki en önemli sorundur. Bu sorunu çözmeye kullanılan immün baskılayıcı ilaçlar ise hastalarda ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Hasta spesifik elde edilmiş İPK hücrelerden farklılaşma ile elde edilecek hücre ve dokular, hasta ile aynı HLA doku antijeni taşıdığından doku reddi problemi olmamaktadır.

Mutasyonlara bağılı oluşan tek gen hastalıkları İPK hücreleri kullanılarak tedavi edilebilmektedir. Hasta spesifik elde edilen İPK hücrelerde gen hedefleme ile mutasyon düzeltilmektedir. İPK hücreler hedef hücrelere farklılaştırıldıktan sonra hastalık bölgesine nakledilerek hatalı hücrelerin görevini yapabilmekte ve hastalık bulgularının ortadan kalkması hedeflenmektedir. Rejeneratif tıpta ana hedef, İPK hücreleri kullanarak hastalara nakledilecek hücre ve dokuları yapay olarak elde etmektir. Bu hedefi sınırlayan birçok etken vardır. Bunlardan başlıcaları güvenli ve etkin İPK hücre elde etme tekniklerinin henüz yeterince gelişmemiş olmasıdır.

Hanna ve ark. (36) fare modelini kullanarak orak hücreli (sickle cell) anemide bulguları ortadan kaldırıp hastalığı tedavi etmişlerdir.

Genetik mutasyonu düzeltilmiş ve düzeltilmemiş KGH hasta kaynaklı İPK hücrelerinden hematopoetik farklılaşma tekniği ile CD34+ ve CD45+ hematopoetik kökprogenitör hücreler elde edilmiştir. Bu iki grup hücre serisinden de nötrofil, monosit ve makrofaj hücreleri elde edilmiştir. Genetik bozukluğu düzeltilmiş KGH İPK hücrelerinden elde edilen nötrofil, monosit ve makrofajlara phorbol myristate acetate (PMA) uyarımı sonrası dihydrorhodamine (DHR) testi ile fonksiyonel analiz yapılmış ve nötrofil fonksiyonunun normale döndüğü gösterilmiştir. Bu çalışma ile İPK hücrelerinden genetik düzeltme sonucu fonksiyonel olgun nötrofil, monosit ve makrofaj elde edilebildiği gösterilmiştir (37).

Wang ve ark. (38) deneysel astım modeli olan fareleri alum-adsorbed ovalbumin (OVA) aerosolü ile duyarlılaştırmış daha sonrada damar içi İPK hücreleri ile tedavi uygulamışlardır. Dört haftalık uygulama sonunda serum allerjen spesifik IgG, İgG1, İgG2a ve İgE antikor düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. Bronko alveolar lavaj sıvısındaki (BALS) eosinofil ve nötrofil hücre sayılarının kontrol grubuna göre belirgin şekilde az olduğu ölçülmüştür. Çalışmada ayrıca dalak ve BALS'daki interferon (IFN)- γ , interlökin (IL)-4 ve IL-5 düzeyleri belirgin şekilde az, IL-10 düzeyleri ise yüksek bulunmuştur. Bu çalışma damar içi İPK uygulamasının sistemik allerjik cevabı azalttığını ve artmış havayolu cevabını azalttığını göstermiştir.

Ogurlur ve ark. (39) benzer astım modeli farede İPK ve EK hücrelerini nasal yoldan uyguladıkları çalışmada distal ve proksimal havayolu patolojisinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığını göstermiştir.

Dendritik hücreler (DH) potent antijen sunum hücreleri olup, antitümoral immün yanıt başlatılmasında kritik rolü vardır. Başta akciğer ve meme kanseri olmak üzere birçok kanser hastasında DH kullanılarak yapılan kanser aşılı ile tedavi uygulamaları yapılmaktadır. DH periferik monosit hücrelerinden lökoferez ile elde edilmektedir. Bu ise hem zaman alıcı hem de pahalı bir yöntemdir. Bunun yanı sıra kanser hasta DH yetersiz ve bozuk fonksiyonlu olması diğer bir problemdir. Son yıllarda İPK hücrelerden elde edilen DH bu olumsuzlukların üstesinden gelmekte ve otolog DH eldesi için alternatif bir kaynak oluşturabilmektedir.

Iwamaoto ve ark. İPK hücrelerinden elde ettikleri DH ile kemik iliği kaynaklı DH mukayese çalışması yapmışlardır. Çalışmada antijen sunum kapasitesi ve migrasyon kapasitesini denk bulmuşlardır. Geliştirilen DH aşısının terapötik etkin olduğunu bulmuşlardır (40).

İşitme kayıplarının en önemli sebeplerinden biri de iç kulakta bulunan tüylü hücrelerin geri dönüşsüz kaybı ile karakterize sensörinöral işitme kaybıdır. İPK hücreler kullanılarak sensörinöral işitme kaybına bir çözüm bulunması amacıyla yoğun araştırmalar devam etmektedir. Bu amaçla özellikle ilaç toksisitesine bağlı olarak gelişen işitme kaybında tedavi amacıyla tüylü hücrelerin İPK hücre kullanılarak elde etme araştırmaları devam etmektedir (41).

İlaç Geliştirme Çalışmaları

İlaç geliştirme çalışmalarında yeni geliştirilen bir molekülün tedavi etkinliğinin ve yan etkilerinin araştırılması gerekir. Bu çalışmalar için genellikle laboratuvar fare, köpek ve domuz gibi uygun hayvanlarla deneyler yapılmaktadır. Bu çalışmalar hem pahalı hem de hayvanlar ve insanlar arasında biyolojik ve fizyolojik farklılıklar olması sebebi ile standardize edilmesinde zorluklar vardır. Bu nedenle hayvan deneyleri öncesinde İPK hücre çalışmaları, hedefin daha doğru seçilmesi ve hayvan deneylerindeki gereksiz tekrarların önlenmesini sağlayabilir. Geliştirilen hasta ve hastalık spesifik İPK hücreler yeni ilaç test ve çalışmalarını hem kolaylaştırmakta, hem de farmakolojik ve toksikolojik çalışmaları hızlandırmaktadır (42).

SONUÇ

EK hücre, pgEK hücre ve İPK hücre; pluripotent karakterli hücreler olup vücudun üç germ tabakasındaki hücrelere farklılaşabilme yeteneğindeki hücrelerdir. Bu sebeple hücresel tedavilerde, ilaç geliştirme çalışmalarında ve hastalık modelleme çalışmalarında tercih edilmektedir. ES hücre elde edilmesinde oluşan etik sınırlamalar nedeniyle alternatif pluripotent hücre kaynağı olarak somatik hücre nükleer transferi ile embriyo oluşturularak oluşan blastosisten EK hücre elde edilmiştir.

Bu konuda etik ve politik sakıncaları ortadan kaldıran diğer bir yöntem ise pgEK hücre yöntemidir. Bu yöntemde, kendiliğinden aktive edilen oositten uniparental embriyo elde edilir. Bu embriyo blastosisti kullanılarak EK hücre elde edilir. Bir başka yöntem, somatik hücrelere gen

transfer tekniği ile pluripotent karakterli İPK hücre elde edilmesidir. Bu yöntemde embriyoya müdahale sonucu embriyonun parçalanması ve hücre klonlanması işlemi yoktur. Dolayısı ile etik ve politik sakıncaları tamamen ortadan kaldırmaktadır. Bu yöntem ile kişiye özel pluripotent hücre elde edilmekte ancak henüz standardize edilememiştir.

Pluripotent karakterli farklı hücreler ile hücre sel tedavi ve rejeneratif tıp çalışmaları büyük bir hızla devam etmektedir. Bu yazımızla bu konudaki çalışmalara yönelik bilim çevrelerinde bir farkındalık oluşturmak temel amacımızdır.

KAYNAKLAR

1. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012;10:678-84.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent tail cells from Mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-6.
3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-8.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
5. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958;182:64-5.
6. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-3.
7. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Takahashi H, Suzuki Y, Haraguchi N, et al. Emerging methods for preparing iPS cells. *Jpn J Clin Oncol* 2012;42:773-9.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
9. Karasahin T. Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2012;9:65-71.
10. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: Introduction. *Br Med Bull* 2011;98:117-26.
11. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 2013;85:3-10.
12. Vatansever HS. Embriyonik kök hücreler. *Sağlıkta Birlik* 2009;1:25-44
13. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013;153:1228-38.

14. Daughtry B, Mitalipov S. Concise review: Parthenote stem cells for regenerative medicine: Genetic, epigenetic, and developmental features. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3:290-8.
15. Sağlık Bakanlığı. Erişim tarihi:13-11-2014 Available from: <http://www.ttb.org.tr>
16. Paffoni A, Brevini TA, Gandolfi F, Ragni G. Parthenogenetic activation: Biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* 2008;29 (Suppl B):S121-5.
17. Mai Q, Yu Y, Li T, Wang L, Chen MJ, Huang SZ, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 2007;17:1008-19.
18. Liu Y, Ye X, Mao L, Cheng Z, Yao X, Jia X, et al. Transplantation of parthenogenetic embryonic stem cells ameliorates cardiac dysfunction and remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2013;97:208-18.
19. Horii T, Hatada I. Reprogrammed parthenogenetic ES cells - New choice for regenerative medicine. In: Atwood C (ed). *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications*. 1st ed. New York: InTech, 2011:221-36.
20. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
21. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20.
22. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 2011;12: 231-42.
23. Zhang XB. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013;11:264-74.
24. Bayart E, Cohen-Haguener O. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther* 2013;13:73-92.
25. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008;322:945-9.
26. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:348-62.
27. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011;8(5):409-12.
28. Plews JR, Li J, Jones M, Moore HD, Mason C, Andrews PW, et al. Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One* 2010;5: e14397.
29. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:472-6.
30. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013;341:651-4.
31. Ohnuki M, Takahashi K, Yamanaka S. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. In: Chambers K (eds). *Curr Protoc Stem Cell Biol*. New Jersey, John Wiley and Sons, 2009.
32. Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L, et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2013;8:223-53.
33. Sevim H, Gürpınar ÖA. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve uygulamaları. *Marmara Medical Journal* 2012;25:5-9.
34. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877-86.
35. Onder TT, Daley GQ. New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:500-8.
36. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007;318:1920-3.
37. Merling RK, Sweeney CL, Chu J, Bodansky A, Choi U, Priel DL, et al. An AAVS1-targeted minigene platform for correction of iPSCs from all five types of chronic granulomatous disease. *Mol Ther* 2015;23:147-57.
38. Wang CY, Chiou GY, Chien Y, Wu CC, Wu TC, Lo WT, et al. Induced pluripotent stem cells without c-Myc reduce airway responsiveness and allergic reaction in sensitized mice. *Transplantation* 2013;96:958-65.
39. Ogulur I, Gurhan G, Kombak FE, Filinte D, Barlan I, Akkoc T. Allogeneic pluripotent stem cells suppress airway inflammation in murine model of acute asthma. *Int Immunopharmacol* 2014;22:31-40.
40. Iwamoto H, Ojima T, Hayata K, Katsuda M, Miyazawa M, Iida T, et al. Antitumor immune response of dendritic cells (DCs) expressing tumor-associated antigens derived from induced pluripotent stem cells: In comparison to bone marrow-derived DCs. *Int J Cancer* 2014;134:332-41.
41. Kepekçi AH, Özturan OÖ, Köker MY. Pluripotent stem cells and their use in hearing loss. *Turk J Biol* 2016;40:1508-15.
42. Liu W, Deng Y, Liu Y, Gong W, Deng W. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *J Biochem Mol Toxicol* 2013;27:17-27.