
DERLEME

KÖK HÜCRELERİN TOKSİKOLOJİ ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

Can Özgür YALÇIN¹, Sezen YILMAZ SARIALTIN^{2,*}

¹ Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye

² Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye

ÖZET

Yeni ilaç moleküllerinin ve kimyasalların insanlar üzerinde ortaya çıkartabileceği potansiyel toksik etkilerin belirlenebilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Kimyasallar genellikle hayvanlara veya *in vitro* hücre kültürlerine uygulanmaktadır. Ancak bu modeller metabolizmadaki farklılıklardan dolayı insanlarda ortaya çıkabilecek muhtemel toksik etkileri tam olarak yansıtamamaktadır. Bu nedenle insan kök hücrelerine dayalı *in vitro* modellerin toksikoloji araştırmalarında yeni bir alternatif olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Kök hücreler günümüzde ilaç/toksikite taramalarında, hastalık yollarının araştırılması ve gelişimsel toksisite gibi mekanistik çalışmalarda kullanılmaktadır. İndüklenmiş pluripotent kök hücreleri (iPSC) farklılaşmış, olgun ve özelleşmiş hücrelerden pluripotensi genlerinin manüplasyonu ile elde edilebilmektedir. Bu sayede kişinin genetik yapısı yansıtılabildiği gibi çevresel maruziyetin neden olduğu toksisite düzeyleri de belirlenebilmektedir. İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC) ve iPSC'lerin genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik kalıpları kapsamlı olarak çıkartılarak, hastalık ve toksisite durumlarının ortaya çıkmasına neden olan yolların aydınlatılması sağlanabilmektedir. Her ne kadar teknolojik zorluklar ve etik engeller yaygın kullanımlarının önüne geçse de ilaç keşiflerinde ve toksisite çalışmalarında insan kök hücre temelli sistemlerden faydalanılmasının maliyet ve deney hayvanı kullanımının azaltılmasına, daha güvenli kişiselleştirilmiş ilaçların üretilmesine ve çevresel toksikanlar için daha doğru risk değerlendirmelerinin yapılmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu derlemede insan kök hücre temelli sistemlerin nörotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite, embriyotoksisite gibi toksikoloji çalışmalarındaki kullanımlarından bahsedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Embriyonik kök hücreler, İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, Kök hücreler, Toksikite testleri

THE USE OF STEM CELLS IN TOXICOLOGY STUDIES

ABSTRACT

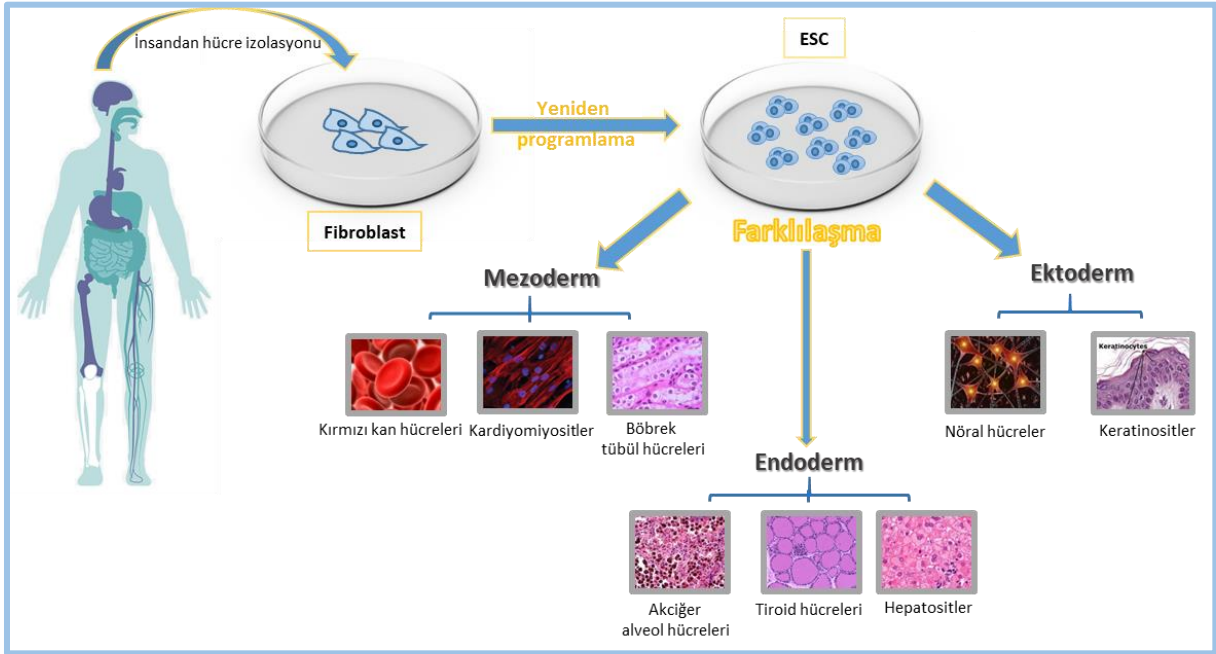
Several studies have been conducted to determine the potential toxic effects of new drug molecules and chemicals on humans. The chemicals are generally applied to animals or *in vitro* cell cultures. However, due to the differences in metabolism, these models can not show the possible effects of chemicals on human completely. Therefore it is thought that *in vitro* models based on human stem cells could be used as a new alternative in toxicology studies. Stem cells are currently being used in drug/toxicity screening studies, mechanical studies such as developmental toxicity and in the investigation of disease pathways. Induced pluripotent stem cells (iPSC) can be obtained by manipulation of pluripotency genes from differentiated, mature and specialized cells. Thus the toxicity caused by environmental exposure can be determined, as well as effecting the genetic structure of the individual. Pathways underlying disease and toxicity conditions can be illuminated by identifying genomic, proteomic, transcriptomic and metabolomic patterns of human embryonic stem cells (hESC) and iPSC extensively. Although technological challenges and ethical restrictions prevent common use, the use of human stem cell-based systems in drug discovery and toxicity studies allows reducing cost and experimental animal use, making safer personalized medicine and more accurate risk assessments for environmental toxicants. In this review, the use of human stem cell based systems in toxicology studies such as neurotoxicity, hepatotoxicity, cardiotoxicity, embryotoxicity has been mentioned.

Keywords: Embryonic stem cells, Induced pluripotent stem cells, Stem cells, Toxicity tests

1. GİRİŞ

İnsanlar yaşamları boyunca ilaçlar, gıda katkı maddeleri, pestisitler, endüstriyel kimyasallar gibi birçok ksenobiyotiğin yanı sıra ultraviyole ışınlar ve radyasyon gibi fiziksel etkenlere maruz kalmaktadırlar. Bu etkenlerin insan vücudunda oluşturabileceği potansiyel toksik etkilerin belirlenebilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmakta, bu amaçla *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır. Toksikite çalışmalarının yürütülebilmesi için çok sayıda hayvan gerekmektedir. Son yıllarda deney hayvanlarının kullanımı hayvan refahı, maliyet ve insana özgü farmakolojik-toksikolojik etkilerin tamamının görülebilmesi gibi nedenlerden dolayı kısıtlanmaktadır. Diğer bir seçenek olan *in vitro* insan ve hayvan kökenli hücre kültürleri de insan fizyolojisini tam olarak yansıtmadığından yeni yöntemler araştırılmaktadır. İnsan kök hücre temelli sistemlerin deney hayvanı ve hücre kültürü çalışmalarına alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Kök hücreler, kendilerine özgü yenileme ve vücutta birçok farklı hücreye gelişebilme potansiyelleri sayesinde bilimsel araştırmalarda ve tıpta büyük gelecek vaatmektedir. Kök hücreler kardiyomyositler, hepatositler, sinir hücreleri, kas hücreleri gibi birçok hücre türüne farklılaşabilmektedirler. Farklılaşma potansiyellerine göre unipotent, multipotent, pluripotent ve totipotent olarak gruplandırılmaktadırlar [1]. Genel olarak embriyonik olan ve embriyonik olmayan kök hücreler şeklinde ikiye ayrılırlar. Blastositin iç hücre kütesinden elde edilen embriyonik kök hücreler (ESC'ler) üç farklı embriyonik tabakadan (endoderm, mezoderm, ektoderm) köken alan farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeli yani pluripotens özellik göstermekte ve sınırsız olarak yenilenebilmektedir (Şekil 1). Endodermden akciğer, karaciğer, tiroid hücreleri vb hücreler; mezodermden kırmızı kan hücreleri, kardiyomyositler, böbrek hücreleri vb hücreler, ekzodermden ise deri ve nöral hücreler gibi hücreler oluşabilmektedir. ESC'ler bu özellikleri sayesinde prenatal gelişimsel toksikoloji çalışmalarında kullanılırken, embriyonik olmayan kök hücreler hedef organ toksisitesi ve hastalık modelleme çalışmalarında tercih edilmektedir [2].



Şekil 1. ESC'lerin elde edilmesi ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşması

Günümüzde hESC'ler hastalık modellemelerinde, rejeneratif tıpta, ilaç geliştirme ve toksisite araştırmalarında önemli bir potansiyele sahip olsa da gerek teknik zorluklar gerekse etik nedenlerden dolayı kullanımları kısıtlıdır. Bu nedenle embriyonik olmayan iPSC'ler iyi bir alternatif olarak tercih

edilmektedir. iPSC'ler ilk kez Gurdon ve Yamanaka tarafından erişkin somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla elde edilmiştir. Pluripotens ile ilişkili dört transkripsiyon faktörü (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) kullanılarak yetişkin fare fibroblastları yeniden programlandırılmış ve iPSC'ler oluşturulmuştur [3]. Bu başarıları neticesinde iki bilim adamı 2012 Nobel Fizyoloji/Tıp Ödülü'nü almıştır. Farklılaşmış, olgun ve özelleşmiş somatik hücrelerin yeniden programlanması pluripotens genlerinin manüplasyonu ile sağlanmaktadır [4]. Hasta bireylerden elde edilen iPSC'lerin hastalıkların patoloji mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasında kullanılabilmesi düşünülmektedir. Son yıllarda iPSC'ler hastalık modellemelerinde ve hastalığa özgü biyogöstergelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Birçok durumda insan kök hücre kültürleri hayvan modellerine göre insan patolojilerini daha iyi yansıtmaktadır. Fare ve insanların büyük oranda genetik benzerliğine karşın fizyolojik farklılıklar hastalık sürecinde de farklılıklara neden olmaktadır. Bazı durumlarda genetik bozukluğun neden olduğu patoloji hayvanlarda gelişmemektedir. Böyle durumlarda insanlarda hastalığa özgü kök hücrelerin kültür edilmesi ile hastalığın gelişimi mekanistik yönden incelenebilmekte ve aynı hastalığın seyrinde bireyler arasındaki farklılıklar değerlendirilebilmektedir.

2. TOKSİSİTE ÇALIŞMALARINDA KÖK HÜCRELER

2.1. Nörotoksosite Çalışmalarında Kök Hücreler

Sinir sistemi merkezi ve çevresel sinir sistemi olmak üzere iki gruba ayrılır. Merkezi sinir sistemi beyin ve omurilikten oluşurken, çevresel sinir sistemi ganglia ve periferel sinirlerden oluşmaktadır. Nöronlar ve nöroglia hücreleri sinir sisteminde bulunan iki temel hücre tipidir. ESC'ler ve iPSC'lerin fonksiyonel nöron ve nöroglia hücrelerine farklılaşabilme potansiyellerinin olduğu bilinmektedir [5]. Günümüzde çevresel ve farmakolojik toksisite araştırmalarında insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y), fare nöroblastom hücre hattı (N2A), sıçan feokromasitoma hücre hattı (PC-12) gibi immortalize edilmiş hücre hatları kullanılsa da bilimsel çevreler bu tür hücre hatlarının nöronların fenotipik özelliklerini tam olarak yansıtmadığı konusunda fikir birliği içerisinde [6-8]. Kök hücreler aracılığıyla beyin içerisindeki fonksiyonel ortamı taklit etmek ve biyokimyasal/nörofizyolojik değişkenleri test etmek mümkün olabilmektedir. Bu durumun öncelikli olarak nörolojik mekanizmaları net olarak anlaşılabilen Alzheimer, Parkinson hastalıkları olmak üzere Huntington hastalığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilgili araştırmalarda faydalı olabileceği düşünülmektedir. Spinal müsküler atrofi, şizofreni, ailesel disotonomi, Friederich ataksisi gibi hastalıklardan elde edilen iPSC hatlarının patogenezi ve ilaç araştırmalarında kullanıldığına dair çalışmalar bulunmaktadır [9-12]. ALS hastalığında *in vitro* model olarak fare ESC'lerinden farklılaştırılmış motor nöron hücreleri incelenmiştir [13]. Otizm spektrum bozukluklarından X-kromozomuna bağlı MeCP-2 mutasyonu sonucu oluşan Rett sendromu ile ilgili bir araştırmada yine iPSC'ler kullanılmıştır [14]. Kök hücre modelleri üzerinde yapılan toksisite araştırmaları her ne kadar çok yeni olsa da insan kordon kanından elde edilen nöral kök hücreler (HUCB-NSC) kullanılarak nörotoksosite değerlendirmeleri yapılmaktadır. Sonuçların PC-12 ve serebellar granül hücreleri ile uyumlu olduğu ve HUCB-NSC'nin en az PC-12 kadar hassas olduğu bildirilmiştir [15]. iPSC'lerden elde edilen sinir hücreleri ile bazı kemoterapötik ilaçların periferel nöropati oluşturma etkisi incelenerek kök hücrelerin ilaca bağlı farklılıkların belirlenmesi ve nöroprotektif etkinliğinin değerlendirilmesi için iyi bir model olabileceği vurgulanmıştır [16].

hESC'lerden elde edilen 3 boyutlu modeller üzerinde gelişimsel nörotoksosite çalışmaları yapılabilmektedir [17]. Schwartz ve ark. (2015) hESC'lerden sağlanan nöral öncü hücreler, endotelial hücreler, mezenşimal kök hücreler ve mikroglia/makrofaj hücrelerini kullanarak doku mühendisliği ile *in vitro* nörotoksosite taramalarında faydalanılmak üzere 3 boyutlu beyin modeli geliştirmiştir [18].

Nöral gelişim süresince apoptozis üzerinde etkili olan kimyasallar beyin gelişimi üzerine de etkilidir. Sinir sisteminde apoptozis sonucu nöroprogenitör hücre havuzu tükenebilir. Druwe ve ark. (2015) iPSC'lerden elde edilen nöral progenitör hücrelerde kimyasallar ile indüklenmiş apoptozis tayini yapmıştır [19]. hESC ve iPSC'lerde yapılan elektrofizyolojik çalışmalar kök hücrelerin birçok

özelleşmiş iyon kanalını eksprese edebildiğini göstermiştir [20]. Kök hücrelerden elde edilen nöronların voltaj ve ligand kapılı iyon kanallarını eksprese edebildiği bulunmuştur. Tüm bu özelliklerin ilaç geliştirme ve nörotoksosite çalışmalarında önemli fayda sağlayabileceği düşünülmektedir [21].

2.2. Kardiyotoksosite Çalışmalarında Kök Hücreler

Kardiyotoksosite piyasaya sürülen ilaçların klinik kullanımdan geri çekilmesine neden olabilen önemli bir sorundur. Son yıllarda cisaprid, rofekoksib, rosiglitazon, sibutramin vb etken maddeleri içeren ilaçlar dünyanın farklı bölgelerinde kardiyak yan etkiler nedeniyle piyasadan çekilmiştir [22]. Bu nedenle yeni keşfedilen ilaçların kardiyovasküler sistem üzerine oluşturabileceği kan basıncı değişiklikleri, aritmi, iskemi gibi yan etkilerin ve kardiyak güvenilirliklerinin değerlendirilebilmesi için çeşitli ön çalışmalar yapılmaktadır [23-27]. Purkinje lifleri veya klonlanmış insan iyon kanallarının kullanıldığı *in vitro* sistemler ilaç aday moleküllerinin insan kardiyomiyositleri üzerine etkilerini göstermek için kullanılmakta ancak yetersiz kalmaktadır. Yeni kimyasal maddelerin kardiyotoksik etkilerinin taranması ve insanlarda potansiyel kardiyak güvenlik düzeylerinin belirlenebilmesi için yeni test sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir [28, 29]. Bu amaçla insan kardiyomiyosit kültürlerinin iyi bir *in vitro* model olabileceği düşünülmektedir [30]. Ancak sağlıklı donörlerden doku kullanımının sınırlı olması primer kardiyomiyosit kullanımını kısıtlamaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı son yıllarda kardiyotoksosite değerlendirme çalışmalarında *in vitro* hiPSC kaynaklı kardiyomiyositler kullanılmaya başlamıştır [31, 32]. hiPSC'ler potansiyel kardiyotoksikanlar ve uzun QT aralığına neden olan yeni kimyasal maddelerin taranmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca beklenmeyen veya istenmeyen proaritmik ilaç etkilerini azaltmak ve önlemek amacıyla kullanılmaktadır [33, 34].

Fonksiyonel kardiyomiyositler hESC kültürlerinden elde edilir [35, 36]. hESC-kardiyomiyositlerin yapısında α -kardiyak aktin, atrial miyozin hafif zincir, ventriküler miyozin hafif zincir, α -miyozin ağır zincir, atrial natriüretik peptid, kardiyak troponin T ve kardiyak troponin I gibi çok sayıda kardiyomiyosit proteini bulunmaktadır. Z bantları ve interkale diskler gibi özellikleri ile kardiyomiyosit benzeri morfoloji göstermektedirler. Ayrıca kardiyomiyositler gibi daha uzun aksiyon potansiyeli (AP) süresi olan ritmik kontraksiyonlar göstermektedirler [37, 38]. hESC-kardiyomiyositler fonksiyonel açıdan primer kardiyomiyositlere benzemektedir. Ancak etik sorunlar nedeniyle hESC-kardiyomiyositlerin, kardiyomiyosit progenitörlerinin potansiyel kaynakları olarak gelişimi sınırlanmıştır. Bazı araştırmacılar kemik iliği gibi erişkin dokularından elde edilen kök hücrelerin *in vitro* kardiyomiyosit prekürsörü olarak kullanımının daha uygun olduğu görüşünü savunmaktadır.

hESC'lerin kardiyak hücrelere farklılaşması için 3 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar embriyonik gövde (EB) oluşumu, endorderm hücrelerle hESC kaynaklı hücrelerin birlikte üretilmesi ve spesifik sinyal faktörleri ile indüklenen tek katmanlı kültürde farklılaşmadır [39]. hESC-kaynaklı kardiyomiyositlerin, olgun kardiyomiyositlere benzer şekilde birçok ilacın reaktif olduğu düşünülmektedir [40]. Antiaritmik bir ilaç olan E-4031 ve sotalol terminal polarizasyonu etkileyerek AP süresini uzatır. E-4031, ventrikül benzeri hESC kaynaklı kardiyak yapılarda AP uzaması ve erken-ard-depolarizasyonuna neden olur. Sonrasında triangülasyon ve kısa süreli değişiklik (STV) değerleri artar. E-4031 tedavisinin ADP uzamasına etkisi değerlendirildiğinde tavşan purjinke liflerinin hESC kaynaklı kardiyomiyositlerden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak tedaviden sonra triangülasyon ve STV değerlerinin her iki grupta da karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görülmüştür [41].

Erişkin dokusu kaynaklı murin iliği kültürleri, kardiyomiyosit farklılaşmasını uyarmak amacıyla 5-azasitidin ile tedavi edilmiştir [42,43]. Histon değiştirici bir kemoterapötik olan 5-azasitidin tedavisi sonucunda çok sayıda miyotüp oluşmuş, kardiyak aktin, miyosin ve kardiyomiyosit spesifik transkripsiyon faktörleri gibi kardiyomiyosit göstergeleri eksprese edilmiştir. Elde edilen bu yapılar kardiyomiyositlere fonksiyonel olarak benzer özellikler göstermiştir. Ayrıca bu kültürlerin kalbe yerleştirilmesinin ardından *in situ* kardiyomiyojenik farklılaşmaya uğradıkları gösterilmiştir [44,45]. Kültürlerin *in vitro* genişleme yeteneği sayesinde kardiyomiyosit progenitör üretimi için sınırsız bir

kaynak oluşturulabileceği bildirilmiştir. Bu sayede yeni kimyasal maddelerin insan eter-a-go-go'yla bağlantılı gen (hERG), potasyum (K⁺), sodyum (Na⁺) ve kalsiyum (Ca²⁺) gibi kardiyak iyon kanalları, elektrik aktivitesi, Ca²⁺ homeostazı ve kontraktilitesi üzerine etkilerinin ölçülebileceği ve potansiyel kardiyak elektrofizyolojik etkiler ile ilgili olarak değerlendirme yapılabileceği düşünülmektedir. Böylece yeni kimyasal maddelerin keşfinde ve pre-klinik çalışmalar sırasında kolaylık sağlanabileceği öngörülmektedir [46, 47].

Doksorubisinin kardiyotoksikite potansiyelini araştırmak ve moleküler mekanizmasını aydınlatmak amacıyla hiPSC-kardiyomiyositler kullanılarak yürütülen bir çalışmada ilacın, intraselüler doza bağımlı Ca²⁺ konsantrasyonunda artış, mitokondriyal disfonksiyon, reaktif oksijen türleri üretimi, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünde artış gibi birçok etkiye neden olduğu gösterilmiştir [48]. hiPSC-kardiyomiyositlerin ekstraselüler alan potansiyeli analizlerinde ve türev alan potansiyel süresi (FPD) değerlerinin elde edilmesinde doza bağımlı yanıtlar oluşturduğu görülmüştür. QT aralığına etkileri bilinen ilaçların serum seviyelerinin hiPSC-kardiyomiyosit FPD uzamaları ile örtüştüğü bildirilmiştir. Bu nedenle yeni ilaç aday moleküllerinin kardiyak güvenilirliğinin belirlenmesinde hESC-kardiyomiyosit FDP uzaması verilerinin kullanılabilirliği bildirilmektedir [49]. hiPSC-kardiyomiyositlerin video mikroskopisi ve görüntü analizi temeline dayanan non-invaziv bir yöntem ile yeni ilaç moleküllerinin kardiyotoksik potansiyellerinin belirlenmesinde kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bu yöntemle kalp atım sıklığı, atım süresi, atımlar arası değişimler, nabız gibi göstergeler otomatik olarak ölçülebilmektedir [50]. Liang ve ark., sağlıklı ve hasta bireylerin kardiyotoksik ilaçlara karşı duyarlılığını incelemiştir. Hastalığa özgü hiPSC-kardiyomiyositlerin advers ilaç cevaplarını değerlendirmede standart hERG gen testinden veya kontrol hiPSC-kardiyomiyosit/hESC-kardiyomiyosit tarama analizlerinden daha doğru sonuçlar ortaya çıkarttığı bildirilmiştir [51].

hiPSC'lerden farklılaşan kardiyomiyositlerin morfoloji, gen ekspresyon ve elektrofizyolojik özellikler bakımından hESC'lere benzediği bildirilmiştir. hiPSC-kaynaklı kardiyak hücrelerde, hESC-kaynaklı kardiyomiyositlere göre, Ca²⁺ sinyalinin daha yüksek maturasyon derecesi gösterdiği görülmüştür [52]. Kontraktilite ve atım sıklığı değerlendirildiğinde kardiyoaktif ilaçların hem hiPSC hem de hESC-kaynaklı kardiyomiyositler üzerinde aynı etkiyi oluşturduğu bildirilmiştir [53]. E-4031, isoprenalin, kinidin ve haloperidolun kardiyotoksikitesinin değerlendirilmesi amacıyla hESC ve hiPSC kardiyomiyositler karşılaştırılmış ve her iki tür kardiyomiyositin de kullanılabilirliği kanısına varılmıştır [54]. hESC kaynaklı kardiyomiyositlerin, birçok iyon kanalının farmakolojik blokajına karşı çok duyarlı olduğu, bu durumun da AP değişikliklerine yol açabileceği bildirilmiştir [55]. Sonuç olarak hem hiPSC hem de hESC kaynaklı kardiyomiyositlerin kardiyotoksikite çalışmalarının da dahil olduğu birçok araştırma için umut olabileceği düşünülmektedir.

2.3. Hepatotoksikite Çalışmalarında Kök Hücreler

İlaçlar ile indüklenen hepatotoksikite hem yeni ilaç aday moleküllerinin, hem de piyasadaki ilaçların geri çekilmesine neden olabilecek temel sorunlardan biri olmakla birlikte akut karaciğer hasarı ve hatta karaciğer nakli ile sonuçlanan ciddi problemlere yol açabilmektedir [56-58]. Son yıllarda beklobrat, ketokonazol, nevirapin, nefazodon, sitaksentan sodyum vb etken maddeleri içeren ilaçlar dünyanın farklı bölgelerinde karaciğere bağlı yan etkiler nedeniyle piyasadan çekilmiştir [22].

Karaciğer hasarı ilaç veya metabolitlerinin tetiklemeyle oluşan immun reaksiyonlar ve reaktif metabolitlerin yol açtığı hücre stresi nedeniyle oluşabilmektedir. Reaktif bileşikler etkilerini glutatyon havuzunu tüketme; DNA, RNA, protein, lipid ve enzimlere bağlanma şeklinde göstermektedir. Bu süreç genellikle apoptotik veya nekrotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır [59].

İzole edilen primer insan hepatositleri (PIH) ilaç metabolizması ve hepatotoksikite çalışmaları için en uygun *in vitro* hücre modellerinden biridir. Metabolizasyondan sorumlu enzimleri yüksek düzeyde eksprese etmektedirler. Bu nedenle metabolizasyonla ilişkili toksisitenin aydınlatılmasında ve ilaç

metabolizma yollarının değerlendirildiği moleküler genetik çalışmalarında kullanılmaktadırlar [60, 61]. Ayrıca hücre canlılığı, toksik ilaç metabolitlerinin oluşumu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, biliyer taşıma sisteminin inhibisyonu gibi ilaçların indüklediği karaciğer hasarına neden olabilecek etkenlerin araştırılmasında kullanılabilirler. Ancak *in vitro* proliferasyon kapasitelerinin sınırlı olması nedeniyle standart hepatotoksisite testlerinde kullanımları kısıtlıdır [62].

Temel ve klinik ilaç araştırmalarında insan hepatositlerinin sıklıkla kullanımı bu hücrelerin üretiminin artmasına neden olmuştur. İnsan hepatositleri için insan karaciğerinden başka kaynaklar da bulunmaktadır. Fetal karaciğerinin yanı sıra pankreas, kemik iliği, kan sistemi kök hücreleri, ESC gibi karaciğer dışı kaynaklardan da hepatosit benzeri hücreler elde edilebilmektedir [63-65]. hESC'lerin hepatosit farklılaşması genellikle 3 temel basamaktan oluşur. Süreç, hESC'lerin kesin endoderm hücrelerine farklılaşması ile başlar, hepatik progenitör hücrelere dönüşmesi ile devam eder ve hepatosit benzeri hücrelere olgunlaşması ile sonlanır [66].

Pre-klinik dönemde ilaç adaylarının karaciğer üzerine oluşturduğu olumsuz etkilerin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Son yıllarda deney hayvanı kullanımının azalmasıyla birlikte hepatotoksisitenin değerlendirilmesinde kök hücre kaynaklı hepatosit kullanımı artmıştır [67-69]. İlaç aday moleküllerinin hepatotoksisite testlerinin erken evrede değerlendirilmesi için ticari ve hESC'den elde edilen saf (≥ 98) hepatositlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada hESC'den elde edilen hepatositlerin *in vitro* hepatotoksisite testleri için uygun bir kaynak olduğu bildirilmiştir [70].

Sirenko ve ark., toksisite mekanizması bilinen 240 bileşiğin hücre canlılığı, şekli, ortalama ve entegre hücre alanı, mitokondriyal membran potansiyeli, fosfolipid birikimi ve apoptoz üzerine etkileri değerlendirmiştir. hiPSC-kaynaklı hepatosit modelinin ilaç ve diğer kimyasalların güvenlik değerlendirmesini kolaylaştırabileceği ve toksisite mekanizmaları hakkında doğru bilgiler verebileceği sonucuna ulaşılmıştır [71]. hiPSC'ler birçok sitokrom (CYP) P450 genini eksprese etmektedir. hiPSC-kaynaklı hepatosit benzeri hücrelerin, ilaçların metabolizmasında görev alan Faz I ve Faz II enzimlerinin indüksiyon ve inhibisyon profillerinin değerlendirilmesinde kullanılabilirliği düşünülmektedir [72, 73]. Ayrıca bu hücrelerin ilaca bağlı hepatotoksik immünolojik olayları değerlendirmek için kullanılabilirliği bildirilmiştir. Hücrelerde asetaminofen tedavisi inflamatuvar sitokin seviyesini artırırken, asetaminofen uygulanan hücrelerin olduğu ortamda kültüre edilen immün hücre hatlarının (Jurkat, THP-1, NK92MI) aktive olduğu görülmüştür. Hepatotoksitesi nedeniyle piyasadan çekilen troglitazon uygulandığında da proinflamatuvar sitokinlerin ve immün hücre aktivasyonunun arttığı görülmüştür [74].

PİH ile hiPSC-kaynaklı hepatosit benzeri hücrelerin CYP3A4 aktiviteleri karşılaştırıldığında farklı sonuçlar yayınlanmıştır. Basma ve ark. PİH'lerin 3 kat daha fazla CYP3A4 transkript düzeyi gösterdiğini [75], diğer araştırmacılar ise transkripsiyonun 1000 kattan daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [76, 77]. Rambhatla ve ark. CYP1A2 aktivitesinin, PİH ile karşılaştırılabilir olduğunu göstermişlerdir [78]. HepG2 hücrelerle kıyaslandığında ise hiPSC-kaynaklı hepatosit benzeri hücrelerin CYP1A ile fenasetin metabolizasyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür [76]. PİH ile kıyaslandığında HepG2 hücrelerin ise yaklaşık 100 kat fazla Cyp1A2 aktivitesi oluşturduğu bildirilmiştir [79]. hiPSC-kaynaklı hepatosit benzeri hücrelerde GST1A-1 bulunurken, GSTM-1 düşük düzeyde eksprese olmuş, GSTP-1 ekspresyonu ise saptanamamıştır. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ile ölçülen GST aktivitesi HepG2'den oldukça fazla, PİH'lerle ise kıyaslanabilir düzeyde olduğu gösterilmiştir [80]. Farklılaşmaya başladıktan sonra hepatosit benzeri hücrelerden alfa-1-antitripsin (AAT) salınımı yaklaşık 6 kat artmıştır ancak hem albumin hem de AAT salınımının PİH'lere kıyasla düşük olduğu bildirilmiştir [81]. hiPSC-kaynaklı hepatosit benzeri hücrelerin ilaçların indüklediği immün aracılı hepatotoksisitenin değerlendirilmesi için uygun bir *in vitro* model olduğu bildirilmiştir. Olgun karaciğer fonksiyonlarının gözlenmesi, bu hücrelerin toksikoloji ve ilaç metabolizması çalışmalarının yanı sıra karaciğere bağlı hastalıkların tedavisinde de yol gösterici olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

2.4. Embriyotoksisite Çalışmalarında Kök Hücreler

Kök hücrelerin toksikoloji testlerinde kullanımı ile ilgili bir diğer alan embriyotoksisite ve embriyo gelişimi değerlendirmeleridir [82]. Embriyo ya da fetüs gelişiminin karmaşık yapısı ve gebelik sırasında anne ile fetüs arasındaki karmaşık etkileşimlerden dolayı var olan çeşitli bileşiklerin teratojenite potansiyelleri belirlerken hızlı sonuç alabilmek, maliyeti düşürmek ve en önemlisi de hayvan tüketimini azaltmak amacıyla bazı *in vitro* teknikler geliştirilmiştir. hESC'lerin deneysel amaçlı kullanımındaki etik engeller nedeniyle fare embriyonik kök hücre testi (Embryonic Stem Cell Test - EST) uygun olarak kullanılabilir *in vitro* testlerden biridir. Embriyotoksisite testinde en önemli faktör ESC'lerin *in vivo* erken dönem embriyonik gelişimi taklit etmeleri ve dokuya özgü ekspresyon profillerine sahip olmalarıdır [83]. Üreme ve gelişimsel toksisite değerlendirmesi için geliştirilen EST, Avrupa Alternatif Metodları Değerlendirme Merkezi (European Centre for the Validation of Alternatif Methods - ECVAM) tarafından güvenilirliği resmi olarak kabul edilmiş bir yöntemdir [84]. EST ilk olarak Horst Spielman ve ark. tarafından 1997'de fare embriyo hücreleri üzerinde geliştirilmiştir [85]. Fare EST yönteminin prensibi üç toksikolojik son noktanın değerlendirilmesine dayanmaktadır. Bunlar: 1- Farklılaşmış hücreleri temsil eden 3T3 fibroblastların büyümesinin inhibisyonunun veya diğer bir ifadeyle sitotoksitelerinin değerlendirilmesi; 2- Maruziyetten 10 gün sonra farklılaşmamış embriyonik hücrelerin sitotoksitelerinin değerlendirilmesidir. Sitotoksite değerlendirmesinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid (MTT) yöntemi kullanılır. Bu kimyasal canlı hücelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülerek bulunan değerler yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. 3- Maruziyetten 10 gün sonra embriyonik hücrelerin kalp kası öncülleri olan myoblastlara farklılaşmasının inhibisyonunun değerlendirilmesidir [86]. EST ile Birleşik Devletler Teratoloji Derneği tarafından yayımlanmış bir listeden seçilen embriyotoksik etkili 20 kimyasal referans alınarak, potansiyel toksik etkili olabilecek maddeler zayıf, güçlü ve embriyotoksik olmayan olarak üç sınıf altında kategorize edilmektedir [87]. EST yönteminde kimyasal maruziyetinin hücre farklılaşması ile ilgili genlerin ifadelerini ne türlü etkileyebileceğinin araştırılması toksikolojik son nokta ile ilgili yeni moleküler yaklaşımlardandır [88].

Günümüzde EST birçok türde maddenin embriyotoksik etkisinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Zhou ve ark. endokrin bozucu kimyasallardan perflorooktan sulfonat, perflorooktanoik asit ve bisfenol A'nın gelişimsel toksik etkisini EST yöntemi ile değerlendirmiştir [89]. Bir diğer çalışmada petrol türevi bazı bileşiklerinin *in vitro* toksik etkileri EST gerçekleştirilerek daha önceden yayınlanmış *in vivo* deney verileri ile karşılaştırılmıştır. Petrol türevi bileşiklerin ES-D3 hücrelerinin kardiyomyositlere farklılaşmalarının konsantrasyona bağlı engelledikleri bulunmuş ve sonuçların *in vivo* veriler ile iyi bir korelasyon gösterdiği vurgulanmıştır ($R^2=0.97$) [90]. Dimopoulou ve ark. bazı azol bileşiklerinin plasentadan geçiş oranlarına göre embriyotoksisite testlerine toksikokinetik ve toksikodinamik yaklaşımda bulunmuştur. Söz konusu kimyasalların tamamının embriyo kültürü testi ve EST yöntemi ile elde edilen potansiyel toksik etkilerinin korelasyonunun iyi olduğunu rapor etmiştir ($R^2=0.67$) [91]. *In vitro* koşullarda karmaşık *in vivo* etkileşimler, maternal farmakokinetik, plasenta bariyeri gibi karmaşık faktörlerin bertaraf edilmesi aynı zamanda yöntemin dezavantajları arasında sayılabilir. Imai tarafından 2016 yılında yürütülen bir çalışmada embriyonik kök hücre kültürü ile hepatosit kültürü birleştirilmiş ve hibrit bir sistem oluşturulmuştur. Bu sayede diş hekimliğinde kullanılan bazı monomer bileşiklerin embriyotoksik etkileri metabolik aktivasyon etkisi dahilinde incelenmiştir [92]. Kimyasal maddelerin cinsiyete özgü etkileri erkeklere-duyarlı, dişilere-duyarlı ve her iki cinsiyete de duyarlı şeklinde sınıflandırılabilir. Embriyonik kök hücrelerin kromozom karyotiplenmesi yapılarak erkek (XY) ve dişi cinsiyetine (XX) bağlı embriyotoksik ve özellikle de gelişimsel etkiler araştırılabilir [93]. Ayrıca embriyotoksisitenin mekanistik yönden araştırılmasında sinyal yollarının incelenmesi de yeni bir açılım olarak yerini almıştır [94].

3. SONUÇ

Kök hücreler; sürekli bölünebilme, yenilebilme ve farklılaşabilme özellikleri sayesinde kalp-damar ve akciğer hastalıkları, sinir sistemi hastalıkları, kas ve iskelet sistemi hastalıkları, endokrin sistem hastalıkları gibi durumlarda fonksiyonu azalan, kaybolan veya ölen hücrelerin yerine sağlam hücre dokularının çoğaltılarak hastalıkları tedavi etmeye yönelik araştırmalarda kullanılmasıyla ön plana çıkmaktadır. Günümüzde tüm bu tedavi amaçlı araştırmaların yanısıra kök hücrelerin hastalık mekanizmalarının aydınlatılabilmesinde, ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalarda ve kimyasal maddelerin insan sağlığı üzerindeki muhtemel toksik etkilerinin değerlendirilmesinde de önemli bir seçenek haline geldiği görülmektedir. Kök hücrelerin toksisite testlerinde kullanılmasına yönelik yaptığımız literatür taramasında özellikle nörotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite ve embriyotoksisite gibi sistemik ve gelişimsel toksisite çalışmalarında insan kök hücre temelli *in vitro* yöntemlerin yeni bir alternatif olduğu görülmektedir. Embriyo, amniyon sıvısı, fetüs, göbek kordonu, kordon kanı, kemik iliği, kıkırdak, yağ doku gibi dokular kök hücre elde etme kaynakları olarak olarak sayılabilir. Etik sorunlar, öncelikle insan embriyonik kök hücreleri olmak üzere, kök hücrelerin toksikolojik analizlerde kullanılmasının önündeki en büyük engellerden biridir. Diğer taraftan son yıllarda toksisite testlerinde hayvan refahı göz önünde bulundurularak hayvan kullanımının kısıtlanması *in vitro* yöntemlerin önemini daha da arttırmıştır. Sonuç olarak kök hücrelerin toksikolojide kullanılması gelecek vadetmektedir. Ancak diğer *in vitro* ve *in vivo* yöntemlere iyi bir alternatif olabilmesi için daha yeni ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Sobhani A. Multipotent Stem Cell and Reproduction. J Stem Cells 2016; 11(4):219-229.
- [2] Deshmukh RS, Kovács KA, Dinnyés A. Drug discovery models and toxicity testing using embryonic and induced pluripotent stem-cell-derived cardiac and neuronal cells. Stem Cells Int 2012; 2012:379569.
- [3] Rashid ST, Alexander GJ. Induced pluripotent stem cells: from Nobel Prizes to clinical applications. Journal of Hepatology 2013; 58:625-629.
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126:663-676.
- [5] Liu W, Deng Y, Liu Y, Gong W, Deng W. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. J Biochem Mol Toxicology 2012; 27(1):17-28.
- [6] Popova D, Karlsson J, Jacobsson SOP. Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. BMC Pharmacol Toxicol 2017; 18(1):42.
- [7] Pisapia F, Holland WC, Hardison DR, Litaker RW, Fraga S, Nishimura T, Adachi M, Nguyen-Ngoc L, Sechet V, Amzil Z, Herrenknecht C, Hess P. Toxicity screening of 13 Gambierdiscus strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. Harmful Algae 2017; 63:173-183.
- [8] Wu Y, Jiang X, Yang K, Xia Y, Cheng S, Tang Q, Bai L, Qiu J, Chen C. Inhibition of α -Synuclein contributes to the ameliorative effects of dietary flavonoids luteolin on arsenite-induced apoptotic cell death in the dopaminergic PC 12 cells. Toxicol Mech Methods 2017; 6:1-33.

- [9] Ebert AD, Yu J, Rose FF, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(7227): 277-280.
- [10] Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 473(7346):221-225.
- [11] Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers S, Tomishima MJ, Fasano CA, Kanat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009; 461(7262):402-406.
- [12] Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, Delatycki MB, Michalska A, Leung J, Crombie D, Sarsero JP, Williamson R, Dottori M, Pebay A. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Reviews and Reports* 2011; 7(3):703-713.
- [13] Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature Neuroscience* 2007; 10(5):608-614.
- [14] Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Gene WY, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 143(4):527-539.
- [15] Buzanska L, Sypecka J, Nerini-Molteni S, Compagnoni A, Hogberg HT, del Torchio R, Domanska-Janik K, Zimmer J, Coecke S. A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells* 2009;27(10):2591-2601.
- [16] Wing C, Komatsu M, Delaney SM, Krause M, Wheeler HE, Dolan ME. Application of stem cell derived neuronal cells to evaluate neurotoxic chemotherapy. *Stem Cell Res* 2017; 22: 79-88.
- [17] Hoelting L, Scheinhardt B, Bondarenko O, Schildknecht S, Kapitza M, Tanavde V, Tan B, Lee QY, Mecking S, Leist M, Kadereit S. A 3-dimensional human embryonic stem cell (hESC)-derived model to detect developmental neurotoxicity of nanoparticles. *Arch Toxicol* 2013; 87:721-733.
- [18] Schwartz MP, Hou Z, Propson NE, Zhang J, Engstrom CJ, Costa VS, Jiang P, Nguyen BK, Bolin JM, Daly W, Wang Y, Stewart R, Page CD, Murphy WL, Thomson JA. Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(40):12516-21.
- [19] Druwe I, Freudenrich TM, Wallace K, Shafer TJ, Mundy WR Sensitivity of Neuroprogenitor Cells to Chemical-Induced Apoptosis Using a Multiplexed Assay Suitable for High-Throughput Screening. *Toxicology* 2015; 333:14-24.
- [20] Jiang P, Rushing SN, Kong CW, Fu J, Lieu DK, Chan CW, Deng W, Li RA. Electrophysiological properties of human induced pluripotent stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298(3):486-495.
- [21] Coyne L, Shan M, Przyborski SA, Hirakawa R, Halliwell RF. Neuropharmacological properties of neurons derived from human stem cells. *Neurochem Int* 2011; 59(3):404-412.

- [22] Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med* 2016; 14:10.
- [23] Sun W. Cardiotoxicity Testing in Drug Development. *OPEN SM J Cardiovasc Dis* 2016; 1(1):1005.
- [24] Ferri N, Siegl P, Corsini A, Herrmann J, Lerman A, Benghozi R. Drug attrition during pre-clinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity. *Pharmacol Ther* 2013; 138(3):470-84.
- [25] Evans GO. *Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologists and Biomedical Researchers* Second Edition. CRC Press. 2009.
- [26] Herman EH, Ferrans VJ. Animal models of anthracycline cardiotoxicity: Basic mechanisms and cardioprotective activity. *Progress in Pediatric Cardiology* 1997; 8(2):49-58.
- [27] Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol* 1998; 25:4(10):15-21.
- [28] Mandal J, Parija SC. Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol* 2013; 3(1):4–6.
- [29] Fenwick N, Griffin G, Gauthier C. The welfare of animals used in science: How the “Three Rs” ethic guides improvements. *Can Vet J* 2009; 50(5):523-530.
- [30] Bird SD, Doevendans PA, van Rooijen MA, Riviere AB, Hassink RJ, Passier R, Mummery C. The human adult cardiomyocyte phenotype. *Cardiovasc Res* 2003; 58,423–434.
- [31] Holmgren G. In vitro toxicity testing using human pluripotent stem cell derivatives. Printed in Gothenburg, Sweden 2016. https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/47401/1/gupea_2077_47401_1.pdf.
- [32] Mordwinkin NM, Burridge PW, Wu JC. A Review of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for High-Throughput Drug Discovery, Cardiotoxicity Screening and Publication Standards. *J Cardiovasc Transl Res* 2013; 6(1):22–30.
- [33] Sinnecker D, Laugwitz KL, Moretti A. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug development and toxicity testing. *Pharmacol Ther* 2014; 143(2):246-52.
- [34] Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H, Boulos M, Gepstein L. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7337):225-9.
- [35] He JQ, Ma Y, Lee Y, Thompson JA, Kamp T. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: Action potential characterization. *Circ Res* 2003; 93,1-9.
- [36] Lavon N, Bevenisty N. Differentiation and genetic manipulation of human embryonic stem cells and the analysis of the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13,47–52.
- [37] Koseki N, Deguchi J, Yamada T, Funabashi H, Seki T. Usefulness of field potential as a marker of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, and endpoint analysis of embryonic stem cell test. *J Toxicol Sci* 2010; 35(6):899-909.

- [38] Potta SP, Liang H, Winkler J, Doss MX, Chen S, Wagh V, Pfannkuche K, Hescheler J, Sachinidis A. Isolation and functional characterization of alpha-smooth muscle actin expressing cardiomyocytes from embryonic stem cells. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25(6):595-604.
- [39] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 407–414.
- [40] Caspi O, Itzhaki I, Kehat I, Gepstein A, Arbel G, Huber I, Satin J, Gepstein L. In vitro electrophysiological drug testing using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* 2009; 18(1):161-72.
- [41] Jonsson MK, Duker G, Tropp CZ, Andersson B, Sartipy P, Vos MA, van Veen TA. Quantified proarrhythmic potential of selected human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2010; 4(3):189-200.
- [42] Schuh AC, Döhner H, Pleyer L, Seymour JF, Fenaux P, Dombret H. Azacitidine in adult patients with acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 116:159-177.
- [43] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103,697–705.
- [44] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger, MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73,1919–1925.
- [45] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105,93–98.
- [46] Li GR, Deng XL. Functional ion channels in stem cells. *World J Stem Cells* 2011;3(3):19–24.
- [47] Youm JB. Electrophysiological properties and calcium handling of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Integr Med Res* 2016; 5(1):3–10.
- [48] Maillet A, Tan K, Chai X, Sadananda SN, Mehta A, Ooi J, Hayden MR, Pouladi MA, Ghosh S, Shim W, Brunham LR. Modeling Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Human Pluripotent Stem Cell Derived-Cardiomyocytes. *Sci Rep* 2016; 6, 25333.
- [49] Braam SR, Tertoolen L, van de Stolpe A, Meyer T, Passier R, Mummery CL. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2010; 4(2):107-16.
- [50] Maddah M, Heidmann JD, Mandegar MA, Walker CD, Bolouki S, Conklin BR, Loewke KE. A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing. *Stem Cell Reports* 2015; 4(4):621-31.
- [51] Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y, Diecke S, Sallam K, Knowles JW, Wang PJ, Nguyen PK, Bers DM, Robbins RC, Wu JC. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* 2013; 127(16):1677-91.

- [52] Gai H, Leung EL, Costantino PD, Aguila JR, Nguyen DM, Fink LM, Ward DC, Ma Y. Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts. *Cell Biol Int* 2009; 33(11):1184-93.
- [53] Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387(3):482-8.
- [54] Zhao Q, Wang X, Wang S, Song Z, Wang J, Ma J. Cardiotoxicity evaluation using human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1):54.
- [55] Peng S, Lacerda AE, Kirsch GE, Brown AM, Bruening-Wright A. The action potential and comparative pharmacology of stem cell-derived human cardiomyocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 61:277–286.
- [56] Alempijevic T, Zec S, Milosavljevic T. Drug-induced liver injury: Do we know everything? *World J Hepatol* 2017; 9(10):491-502.
- [57] Chen M, Suzuki A, Borlak J, Andrade RJ, Lucena MI. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *J Hepatol* 2015; 63(2):503-14.
- [58] Suzuki A, Andrade RJ, Bjornsson E, Lucena MI, Lee WM, Yuen NA, Hunt CM, Freston JW. Drugs associated with hepatotoxicity and their reporting frequency of liver adverse events in Vigibase: unified list based on international collaborative work. *Drug Saf* 2010; 33(6):503-22.
- [59] Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem* 2009; 16(23):3041-53.
- [60] Kim DS, Ryu JW, Son MY, Oh JH, Chung KS, Lee S, Lee JJ, Ahn JH, Min JS, Ahn J, Kang HM, Kim J, Jung CR, Kim NS, Cho HS. A Liver-specific Gene Expression Panel Predicts the Differentiation Status of in vitro Hepatocyte Models. *Hepatology* 2017; 66(5):1662-1674.
- [61] Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005; 28(3):249-68.
- [62] Hewitt NJ, Lechón MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG. Primary Hepatocytes: Current Understanding Of The Regulation Of Metabolic Enzymes And Transporter Proteins, And Pharmaceutical Practice For The Use Of Hepatocytes In Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, And Hepatotoxicity Studies. *Drug Metab Rev* 2007; 39(1):159-234.
- [63] Sumitran-Holgersson S, Nowak G, Thowfeequ S, Begum S, Joshi M, Jaksch M, Kjaeldgaard A, Jorns C, Ericzon BG, Tosh D. Generation of hepatocyte-like cells from in vitro transdifferentiated human fetal pancreas. *Cell Transplant* 2009; 18(2):183-93.
- [64] Zorn AM. Liver Development, Stembook, Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA 2008.
- [65] Teramoto K, Asahina K, Kumashiro Y, Kakinuma S, Chinzei R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teraoka H, Arii S. Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12(3):196-202.

- [66] Baxter MA, Rowe C, Alder J, Harrison S, Hanley KP, Park BK, Kitteringham NR, Goldring CE, Hanley NA. Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Res* 2010; 5(1):4-22.
- [67] Goldring C, Antoine DJ, Bonner F, Crozier J, Denning C, Fontana RJ, Hanley NA, Hay DC, Ingelman-Sundberg M, Juhila S, Kitteringham N, Silva-Lima B, Norris A, Pridgeon C, Ross JA, Young RS, Tagle D, Tornesi B, Water B, Weaver RJ, Zhang F, Park BK. Stem cell-derived models to improve mechanistic understanding and prediction of human drug induced liver injury. *Hepatology* 2017; 65(2): 710–721.
- [68] Krueger W, Boelsterli UA, Rasmussen TP. Stem Cell Strategies to Evaluate Idiosyncratic Drug-induced Liver Injury. *J Clin Transl Hepatol* 2014; 2(3):143–152.
- [69] Njoku DB. Drug-Induced Hepatotoxicity: Metabolic, Genetic and Immunological Basis *Int J Mol Sci* 2014; 15(4):6990–7003.
- [70] Kim JH, Wang M, Lee J, Park HJ, Han C, Hong HS, Kim JS, An GH, Park K, Park HK, Zhu SF, Sun XB, Kim JH, Woo DH. Prediction of hepatotoxicity for drugs using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Cell Biol Toxicol* 2018; 34(1):51-64.
- [71] Sirenko O, Hesley J, Rusyn I, Cromwell EF. High-Content Assays for Hepatotoxicity Using Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells. *Assay Drug Dev Technol* 2014; 12(1):43-54.
- [72] Park HJ, Choi YJ, Kim JW, Chun HS, Im I, Yoon S, Han YM, Song CW, Kim H. Differences in the Epigenetic Regulation of Cytochrome P450 Genes between Human Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocytes and Primary Hepatocytes. *PLoS One* 2015; 10(7):e0132992.
- [73] Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, Miki T, Ranade AR, Serra MP, Doratiotto S, Sini M, Sharma S, Mitamura K, Sellaro TL, Tahan V, Skvorak KJ, Ellis ECS, Badylak SF, Davila JC, Hines R, Laconi E, Strom SC. Hepatic Differentiation of Amniotic Epithelial Cells. *Hepatology* 2011; 53(5):1719–1729.
- [74] Kim DE, Jang MJ, Kim YR, Lee JY, Cho EB, Kim E, Kim Y, Kim MY, Jeong WI, Kim S, Han YM, Lee SH. Prediction of drug-induced immune-mediated hepatotoxicity using hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Toxicology* 2017; 15(387):1-9.
- [75] Basma H, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, Ellis E, Carson SD, Sato S, Chen Y, Muirhead D, Navarro-Alvarez N, Wong RJ, Roy-Chowdhury J, Platt JL, Mercer DF, Miller JD, Strom SC, Kobayashi N, Fox IJ. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 2009; 136(3):990-9.
- [76] Brolén G, Sivertsson L, Björquist P, Eriksson G, Ek M, Semb H, Johansson I, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, Heins N. Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 2010; 145(3):284-94.
- [77] Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, Okita K, Zern MA. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant*. 2004; 13(3):197-211.
- [78] Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12:1–11.

- [79] Westerink WM, Schoonen WG. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2007; 21:1581–1591.
- [80] Söderdahl T, Küppers-Munther B, Heins N, Edsbagge J, Björquist P, Cotgreave I, Jernström B. Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(5):929-37.
- [81] Shiraki N, Umeda K, Sakashita N, Takeya M, Kume K, Kume S. Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *GenESCs* 2008;13:731–746.
- [82] Spielmann H. Predicting the risk of developmental toxicity from in vitro assays. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(2): 375-80.
- [83] Wobus AM, Löser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol* 2011;85:79–117.
- [84] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern Lab Anim* 2002; 30(2): 151-76.
- [85] Spielmann H, Pohl I, Liebsch M, Moldenhauer F. The embryonic stem cell test, an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 1997; 10:119–27.
- [86] Statement on the scientific validity of embryonic stem cell test (EST)-an in vitro test for embryotoxicity 17th meeting of ECVAM scientific advisory committees 16-17 Oct. 2001, EC JRC, IHCP ECVAM, Ispra, Italy. ECVAM news and news and views. *Alternatives to laboratory animals (ATLA)* 2002; 30:165–268.
- [87] Paquette JA, Kumpf SW, Streck RD, Thomson JJ, Chapin RE, Stedman DB Assessment of the Embryonic Stem Cell Test and application and use in the pharmaceutical industry. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83(2):104-11.
- [88] Tandon S, Jyoti S. Embryonic stem cells: An alternative approach to developmental toxicity testing. *J Pharm Bioallied Sci* 2012; 4(2): 96–100.
- [89] Zhou R, Cheng W, Feng Y, Wei H, Liang F, Wang Y. Interactions between three typical endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in binary mixtures exposure on myocardial differentiation of mouse embryonic stem cell. *Chemosphere* 2017; 178:378-383.
- [90] Kamelia L, Louise J, de Haan L, Rietjens IMCM, Boogaard PJ. Prenatal developmental toxicity testing of petroleum substances: Application of the mouse embryonic stem cell test (EST) to compare in vitro potencies with potencies observed in vivo. *Toxicology in vitro* 2017; 44:303-312.
- [91] Dimopoulou M, Verhoef A, Gomes CA, van Dongen CW, Rietjens IMCM, Piersma AH, van Ravenzwaayad B. A comparison of the embryonic stem cell test and whole embryo culture assay combined with the BeWo placental passage model for predicting the embryotoxicity of azoles. *Toxicology Letters* 2018; 286:10-21.
- [92] Imai K. Development of technique for in vitro embryotoxicity of dental biomaterials. *Jpn Dent Sci Rev* 2016; 52(3):54-62.

- [93] Cheng W, Zhou R, Liang F, Feng Y, Wang Y. Application of Mouse Embryonic Stem Cell Test to Detect Gender-Specific Effect of Chemicals: A Supplementary Tool for Embryotoxicity Prediction. *Chem Res Toxicol* 2016; 29(9):1519-33.
- [94] Yang L, Ge Y, Lin S, Fang X, Zhou L, Gao J. Sevoflurane inhibits the self-renewal of mouse embryonic stem cells via the GABAAR-ERK signaling pathway. *Mol Med Rep* 2016; 14(3):2119-26.