

PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERDEN SİNİR HÜCRELERİNE FARKLILAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

METHODS OF DIFFERENTIATION FROM PLURIPOTENT STEM CELLS TO NEURAL CELLS

Meltem KURUŞ¹, Kemal ERGİN^{2,3}, Rahmi ÇETİNKAYA³

¹ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, TÜRKİYE

² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Aydın, TÜRKİYE

³ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, Aydın, TÜRKİYE

Cite this article as: Kuruş M, Ergin K, Çetinkaya R. Pluripotent Kök Hücrelerden Sinir Hücrelerine Farklılaştırma Yöntemleri. Med J SDU 2022; 29(4): 691-696.

Öz

İnsan embriyonik kök hücreleri, embriyoların erken blastokist evresindeki iç hücre kütesinden türetilen hücrelerdir. Pluripotent özellikte olan bu hücreler, uygun koşullar altında fonksiyonel nöronlara ve farklı tipte sinir hücrelerine farklılaştırılabilir. Ancak bu alandaki en büyük zorluklardan biri, yenilenebilir, kültürü kolay, nöral soylara bağlı nöral prekürsör hücre popülasyonu oluşturmaktır. Bu nedenle, insan embriyonik kök hücrelerini prekürsör hücrelere uygun şekilde farklılaştırmak, bunların kendi kendini yenileyen bir popülasyon olarak devam etmesi ve farklı bölgelerdeki sinir hücre tiplerini saf bir popülasyon şeklinde üretmek için kritik öneme sahiptir. Hücre sinyalleri ve bunlarla ilişkili moleküller de bu olaylarda önemli bir rol oynamaktadır. Nöral prekürsör hücrelerinin üretilmesi için kök hücre biyolojisinin ve nöral hücrelere farklılaşmada rol oynayan önemli yolların daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu derlemede kök hücrelerden nöral hücrelere farklılaştırma yöntemlerine ve bu süreçte önemli olan sinyal yollarına ve moleküllere odaklanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nöronal farklılaşma, Pluripotent kök hücre, Sinyal yolları

Abstract

Human embryonic stem cells are derived from inner cell mass of early stage blastocyst embryos. These cells are pluripotent and can differentiate into functional neurons and various nerve cells under appropriate conditions. However, one of the biggest challenges in this area is to establish a renewable, easy-to-culture, neural lineage-linked neural precursor cell population. Therefore, it is crucial to conveniently differentiate human embryonic stem cells into precursor cells, maintain them as a self-renewing population, and achieve nerve cell types from different regions as a pure population. Cell signals and their associated molecules also play an important role in these events. For the generation of neural precursor cells, a better understanding of stem cell biology and the important pathways involved in differentiation into neural cells is required. This review focuses on the differentiation methods from stem cells to neural cells and the important signaling pathways and molecules in this process.

Keywords: Neuronal Differentiation, Pluripotent Stem Cell, Signaling pathways

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: M.K. / meltem.kurus@gmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 15.04.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 25.07.2022

ORCID IDs of the authors: M.K: 0000-0002-2455-9605; K.E: 0000-0002-0222-2710;

R.Ç: 0000-0003-0955-3413

Giriş

Blastosistin iç hücre kütesinden elde edilen embriyonik kök hücreleri (EKH) pluripotent özelliğe sahiptir ve her türlü embriyonik dokuya teorik olarak farklılaşabilmektedirler. *In vitro* EKH'lerden farklılaşan hücreler ve nöronlar *in vivo*'dakine benzer bir patern gösterdiğinden dolayı kök hücre çalışmaları tıbbi uygulamalar açısından umut verici bir alan haline gelmiştir. Günümüzde özellikle üç boyutlu hücre teknolojileri ve yazıcıları kullanılarak tedaviler denenmektedir [1].

Embriyonik kök hücrelerde pluripotent durumun sürdürülmesi, diğer hücre türlerine farklılaşmayı önlerken, kendilerinin kültürde sürekli olarak çoğalmasına olanak sağlamaktadır. Pluripotensinin herhangi bir şekilde bozulması (temel faktörlerin ortamdaki çekilmesi veya EKH'lerin süspansiyonda büyümeye zorlanması vb. gibi) ile bu hücreler üç germ yaprağına ait başka birçok hücre tipine spontan olarak farklılaşabilmektedir. Ancak bu tip bir farklılaşma süreci, spesifik olarak nöral hücrelerinin üretilmesi için etkili bir yöntem değildir. Özgüllüğü sağlamak için embriyonik kök hücrelerden nöral gruplara farklılaşmasına yönlendiren özellikle bazı faktörlerin veya kimyasal maddelerin kullanılması gerekmektedir. İnsan EKH'leri, nöronal prekürsör/progenitor (NP) hücrelerine farklılaştığında, hücreler Sox-2, Pax-6, Tuj ve Nestin gibi nöroepitelial markerleri ekspres ederken Oct-4 gibi pluripotensi belirteçleri azalmaya başlamaktadır [2]. 'Nöral rozet'lerin oluşması, insan EKH'nin nöral hücrelere farklılaşmasının gösteren bir morfolojik belirteç olup bu aşama için Notch ve Sonic Hedgehog (SHH) sinyal yolları önemli rol oynamaktadır. Nöroektodermal kolumnar hücreler, kendilerine has belirteçleri de ekspres etmekte ve gelişen nöral tüpün *in vivo* yapısal oluşumunu hatırlatan rozet benzeri bir yapı oluşturmak için radyal olarak düzenlenmektedir [3]. Oluşan bu nöral rozet hücreleri, laboratuvar ortamında uzun süre boyunca çoğalabilmektedirler ve farklı bölgelere özgü nöronal ve glial hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler [3].

Merkezi sinir sistemi hastalıkları (Örneğin Parkinson, Alzheimer, Huntington, inme vs.), bir hastanın yaşamını doğrudan tehdit etmenin yanı sıra, duyu kaybına, motor fonksiyon kaybına ve hafıza kaybına neden olabilen kronik ve tedavisi zor hastalıklardır. Günümüzde, bu hastalıkların bazılarında rol oynayan patojenik faktörler ve ilişkili patogenezi henüz belirsizdir. Tıbbi ilaç tedavileri daha çok hastalığın ilerlemesini geciktirmek için kullanılmakta, ancak kaybedilen işlevi geri getirememekte veya dokuları rejenere edememektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, sinir sistemi ile bağlantılı hastalıklarda kök hücrelerden türetilmiş

veya saf haldeki nöral hücrelerinin nakledilmesinin, bu bölgelerdeki hücrelerin veya ortamın yenilenmesi için umut verici bir tedavi yöntemi olduğunu göstermiştir [1,4]. Bu nedenle farklılaştırılması düşünülen nöral hücreler için uygun maddelerin kullanılması ve elverişli koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu derlemede de insan EKH ve indüklenebilir pluripotent kök hücreler (iPKH) gibi pluripotent özelliğe sahip hücrelerden nöral hücrelerin farklılaştırılmasında kullanılan metodlarına ve bu süreçte önemli olan sinyal yolları ve moleküllere odaklanılmaktadır.

Nöral ve Glial Progenitorlardan Spesifik Nöral Hücrelere Farklılaştırma

Dopaminerjik Nöronlara Farklılaştırma

Parkinson hastalığı Alzheimer hastalığı ile birlikte görülen en yaygın kronik nörodejeneratif hastalıklardandır. Bu hastalık için genel nüfus yaşlandıkça prevalansının artması beklenen bir durumdur. Günümüzde Parkinson hastalığında denenen hücre tedavileri, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar göstermiştir [4]. İnsan pluripotent kök hücreleri (EKH ve iPKH), dopaminerjik nöronlar da (DA) dahil olmak üzere vücudumuzdaki çoğu hücre tipine *in vitro* olarak farklılaştırılabilir. *In vitro* DA nöronal farklılaşma protokollerinde stromal hücrelerle (PA6 ve MS5 hücreleri) insan EKH'lerin hücre-hücre temaslı kökültürü kullanılmıştır [5, 6]. Bu kökültürlerde özellikle çok etkili bir şekilde nöral rozet yapısı oluşmuştur. Kökültüre fibroblast büyüme faktörü (FGF-8), SHH, kemik morfojenik protein (BMP) ve beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) gibi faktörlerin eklenmesi genellikle stabil DA nöron popülasyonları vermiştir [5, 6]. Roy ve ark. insan EKH'leri orta beyin astrositleri ile birlikte kökültürleyerek DA nöronlarına farklılaştırmayı sağlayan bir protokol de bildirmiştir. Sonrasında sıçanlara uyguladıkları dopaminerjik implantlar ile motor işlevinde önemli ve uzun süreli bir geri dönüş raporlamışlardır [7]. Yine başka bir çalışmada insan EKH'den türetilen dopaminerjik nöronların lezyonlu striatuma transplante edildiklerinde sağlıklı kaldıkları ve lokomotif fonksiyon gösterebildikleri bildirilmiştir. Ek olarak, farklılaştırma yöntemleri ile orta beyin veya substantia nigradaki dopamin nöronlarına ait fenotip gösterdiklerinden ortabeyindeki dopamin nöronlarının tamirde önemli olduğu düşünülmüştür [8].

Astrositlere Farklılaştırma

Astrositler beyinde en çok görülen nöral hücre tiplerinden biridir. Bu hücrelerin biyolojisi ve işlevselliği konusundaki bilgilerin artması ile nörolojik hastalıklardaki rolü daha iyi anlaşılacaktır [9]. Astrositler merkezi sinir sistemi savunmasının temel unsurları olup bu hücrelerin homeostatik işlevi nöroprotektif yetenek-

leriyle bağlantılıdır. Astrositler tipik olarak yıldızlı bir morfolojiye sahip olup S100 β ve glial fibriller asidik protein (GFAP) eksprese etmektedirler [10]. Astroglial işlevlerin kaybı sonrası amyotrofik lateral skleroz, toksik ensefalopati veya Alzheimer hastalığı gibi çeşitli hastalıklar ilerlemekte veya şiddetlenmektedir [9]. İnsan pluripotent kök hücrelerden astrositlere doğrudan farklılaşma için ilk ve etkin protokollerden biri Krencik ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Progenitörler oluştuktan sonraki fazda mediumda epitelial büyüme faktörü (EGF) ve FGF-2 kullanılmış ve yaklaşık 90 gün sonra astroglial progenitörleri veya astrositler şekillenmiştir [10]. Nöral indüksiyon ortamları genellikle nörobazal ortamdan veya DMEM/F12 ortamından veya her ikisinin kombinasyonundan oluşmaktadır. Ayrıca çoğu nöral indüksiyon protokolleri embriyoid cisimcikler (EB) oluşumuna neden olup besleyici katman kullanılmasını gerektirmektedir. Günümüzde EKH ve iPKH'den nöronal progenitörleri geliştirmek için BMP yolunu inhibe eden noggin ve TGF- β yolunu inhibe eden SB431542 gibi antagonistlerle nöral dönüşüm hızı artmakta ve EB protokolleri veya stromal layer gereksinimi azalmaktadır [11]. Primitif nöroektodermal agregatlar veya nöroepitelial tabakalar nöroektoderm oluşumunu teşvik etmekte ve ardından nöral kök hücreler, nöral rozet adı verilen polarize yapılar halinde düzenlenmektedir [12]. Bu nöral rozetler birkaç pasajda kültürlenmekte ve daha sonra tanımlanmış kültür ortamında çeşitli faktörler ile astroglial progenitörlere yönlendirilmektedir. Zhang ve arkadaşlarının; nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri izole etmek ve kültürlenmek için kullandıkları teknikte hücreler FGF-2 içeren kimyasal ortamda kültürlenmiş, farklılaşma başlatılmış ve sonrasında gelişen EB'ler kültürde büyütülerek nöral rozet oluşumu hedeflenmiştir. Embriyoid cisimciklerden gelişen bu nöral progenitör hücreler ve nöral hücreler Nestin, Musashi-1 ve polisizyalize nöral hücre yapışma molekülü (PSA-NCAM) ve astrositler de yaklaşık 45 gün sonra GFAP ve NF200 eksprese etmişlerdir [12].

İnsan iPKH'den türetilen nöral hücrelerin astrositlere farklılaşması için de astrosit progenitör hücrelerin S100 β pozitif (4. haftadan sonra) ve GFAP pozitif (yaklaşık 3. ay civarında) olduğu rapor edilmiştir [13]. Bu yöntemde glial farklılaşmayı daha da geliştirmek için progenitörler, ek faktörler (N1 supplement ve cAMP) ile de inkübe edilmiştir; ayrıca oligodendrosit oluşumu için de T3, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) ve nörotrofin-3 (NT-3) içeren ortamda kültüre edilmiştir [13].

Lafaille ve arkadaşları ise HSV-1 ensefaliti patogenezine yönelik yaptıkları çalışmada nöral farklılaşmayı geliştirmek için daha önce açıklanan protokollerden

uyarlayarak yüksek verimlilikte astroglial hücrelerin oluşumunu (10 hafta içinde) sağlamışlardır. İnsan PKH'lerden elde edilen nöral progenitör hücreler, 40-60 gün boyunca EGF ve FGF-2 ile desteklenmiş ve ardından 15-20 gün boyunca %5 FBS'li N2 mediumunda tutularak GFAP+ hücreleri üretilmiştir [14].

Mormone ve arkadaşları ise insan EKH ve iPKH'ye FGF-2, EGF'ye ek olarak silier nörotrofik faktör (CNTF) ile de destekleyerek nöral rozet oluşturmuşlar ve sonrasında Noggin ve SB431542 ekleyerek astrositleri üretmişlerdir. Çalışmada fizyolojik belirteç olarak Aldolaz c (ALDOC) ve glutamat taşıyıcı-1 (GLT1) kullanılmıştır. Bu iki belirteç sadece tam fonksiyon gören astrositlerde bulunmakta olup sinaptik aralıktan salınan glutamati uzaklaştırmakta (GLT1) ve glikoliz gerçekleştirebilmektedir (ALDOC) [15].

Mevcut astrosit farklılaşma protokollerinde, *in vivo* gelişim ile uyumlu büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Buna karşın farklılaşma periyotları, protokoller arasında büyük ölçüde değişiklik göstermekte ve bu durum ilgili deneyler için üretilen astrositlerin fenotipi hakkındaki belirsizliğe yol açmaktadır.

Gamma-Aminobütirik Asiterjik İnternöronlara Farklılaştırma

Gamma-aminobütirik asit (GABA)'erjik internöronlar beyin ve omurilikteki ana inhibitör nöronal sistemi oluşturmaktadır. Morfolojilerine, moleküler belirteçlerine, köken aldıkları yere, intrensek fizyolojik özelliklerine ve fonksiyonlarına bağlı olarak insan serebral korteksinde bu hücrelerin çok sayıda alt tipi vardır. GABA internöronlarının prenatal ve postnatal gelişimde gerçekleşen sinaptik entegrasyon, sinir ağ faaliyetleri ve plastisitenin düzenlenmesinde önemli rolleri vardır [16]. Serebral kortekste GABA internöronlarının işlev bozukluğu, şizofreni, otizm ve epilepsiye kadar çeşitli gelişimsel ve psikiyatrik bozukluklara neden olmaktadır [16, 17].

Transkripsiyon faktörleri olan ASCL ve DLX2'nin EKH'den GABAerjik nöron oluşturmak için gerekli olduğu gösterilmiştir [18]. Gonzalez-Ramos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan EKH'dan türeyen GABAerjik internöronlarının insan konak nöron ağının aktivitesini entegre ve modüle edebildiği düşünülmüştür. Bu çalışmada uzun süreli (yaklaşık 49 gün) bir farklılaşma protokolü uygulanarak MAP pozitif ve fonksiyonel GABAerjik internöronlar elde edilmiştir [19].

Başka bir protokolde, insan PKH'leri önce primitif nöroepitelial hücrelere doğru indüklenmekte (10 günden fazla) ve daha sonraki 2 hafta boyunca SHH veya onun agonisti olan purmorfamin uygulanarak NKX2.1

eksprese eden medial ganglionik progenitörlere modellenmiştir. Bu progenitörler de altıncı haftada neredeyse saf bir ön beyin GABA internöron popülasyonu oluşturmuştur [20]. Önceki protokollere dayanarak Sun ve arkadaşları da insan PKH'lerini etkili bir şekilde GABAerjik nöronlara yüksek verimlilikle indükleyecek tek basamaklı bir protokol belirlemişlerdir. İnsan EKH'leri doğrudan GABAerjik nöronlara dönüştürebilen dört adet transkripsiyon faktörü kullanmışlar (ASCL1, DLX2, NKX2.1 ve LIM homeobox6-LHX6) ve sonucunda FOXG1, GAD1 ve VGAT eksprese eden GABAerjik internöronlar elde etmişlerdir [21].

Oligodendrosit Farklılaştırma

Oligodendrositler, merkezi sinir sistemindeki nöronların aksonları aracılığı ile miyelin kılıfını oluşturmakta ve bu sayede verimli aksiyon potansiyeli iletimini sağlamaktadırlar [22-24]. Oligodendrosit progenitörleri (OPC'ler), erken gelişim sırasında SHH'nin indüksiyonu altında ön beyin bölgesinden ve omurilikten ortaya çıkmaktadır. OPC'ler, NKX2.1 ve GSH2 etkisi ile beyinin çeşitli bölgelerine göç etmektedirler [22]. Sonrasında da çevresel etki ve ayrıca nöronal aktiviteler tarafından sıkı düzenleme altında oligodendrositlere ve miyelinli aksonlara olgunlaşmaktadır [23].

iPKH'lerden oligodendrosit farklılaşma yöntemlerinde nöral epitel hücrelerinin RA ve FGF tarafından sırasıyla indüklenmesi, SHH kullanılarak ventralizasyon ve OPC genişlemesini iyileştirmek amacıyla PDGF uygulanmaktadır [24]. Ehrlich ve ark. yaklaşık 28 günde iPKH'den nöral progenitör hücre türetilmesini sağlayan hızlı ve etkili bir yöntem saptamışlardır [25]. Bu çalışmada iPKH'nin SOX10, OLIG2 ve NKX6.2 gibi transkripsiyon faktörleri ile indüklenmesi sonrası %70'e kadar O4⁺ verecek şekilde OPC farklılaşmasını iyileştirebildiğini göstermişlerdir. Ayrıca, iPSC'den türetilen O4⁺ oligodendrositlerin %30'unun ek 7 gün içinde de miyelin bazik protein pozitif (MBP+) olgun oligodendrosite farklılaştığını belirlemişlerdir [25].

Yakın zamanda SOX10 ekspresyonu yapan bir insan pluripotent kök hücre hattından yararlanarak oluşturulan nöroektoderm türevli organoidler 42 günlük bir protokol ile büyüme faktörleri ve küçük moleküllere maruz kalmış ve bu sayede oligodendrositlerin spesifikasyonunu ve hayatta kalmasının desteklendiği gösterilmiştir [26].

Motor Nöronlara Farklılaştırma

Motor nöron (MN), omurilikte bulunan ve aksonları ile kasların aktivitelerini kontrol eden özelleşmiş bir nöron tipi olup, hasarlarında spinal müsküler atrofi ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi hastalıklar görülmektedir. Pluripotent kök hücrelerin MN'lere ve-

rimli bir şekilde farklılaştırılması, sinir hastalıklarının modellenmesi ve hücre tedavilerinin geliştirilmesi için kritik bir öneme sahiptir [27]. İnsan PKH'lerin hücrelerinin MN'lere farklılaştırılmasında son yıllarda önemli ilerleme kaydedilmiştir. Mevcut insan iPKH MN farklılaşma protokolleri zaman ve verimlilik açısından farklılık göstermektedirler. Genelde matrijel üzerinde embriyonik kök hücrelerden önce nöral progenitörlere farklılaştırılmakta sonrasında da nörotrofik faktörler kullanılarak motor nöronlar oluşturulmaktadır. Çalışmalarda farklı faktörler (C-compound gibi) de denemekte ve belirteç olarak homeobox9 (HB9) antikorunu/ geni kullanılmaktadır [27]. Protokollerde, iPKH'ler EB oluşumu veya ikili SMAD inhibisyonu aracılığıyla nöral progenitör hücrelere indüklenmektedir. Pluripotensiyi destekleyen faktörlerin geri çekilmesi üzerine süspanse hücrelerin üç boyutlu kümeler halinde kendiliğinden düzenlenip büyüerek EB oluşturması, nöralizasyon yöntemi için en sık kullanılan yoldur. Buna karşın, EB oluşumu genellikle hayvan serumu da dahil olmak üzere tanımlanmamış kültür koşulları kullanılmakta ve uzun süren protokoller gerektirmektedir [28]. Bianchi ve ark.'nın yaptıkları çalışmada insan iPKH'lerinin fonksiyonel spinal MN'lere farklılaşması için basit, hızlı bir protokol geliştirilmiş ve doğrudan farklılaşma için küçük moleküller (CHIR-99021, compound-E, RA, SHH, SAG) kullanılarak elektrofizyolojik olarak fonksiyonel hücrelerin elde edilebildiği gösterilmiştir [28]. İndüklenmiş PKH'den doğrudan motor nöronlara farklılaştırma yöntemleri ile ALS gibi hastalıklar da modellenir hale gelmiştir [29]. Ayrıca son yıllarda ALS'li hastaların iPKH'lerinden türetilen nöral kök hücreler ve motor nöronlar çip teknolojisi üzerinde kültüre edilmekte ve ilaç araştırmaları için kullanılabilirliktedir [30].

SMAD İnhibitörleri ve Küçük Moleküller

Chambers ve ark.'nın geliştirdiği yöntemde SMAD inhibitörleri olan Noggin ve TGF- β reseptör inhibitörü (SB431542)'nin sinerjistik etki ile adherent kültür koşulları altında insan EKH'lerinin hızlı ve tam nöral dönüşümünü indüklemek için yeterli olduğu rapor edilmiştir [31]. Günümüzde ikili SMAD inhibisyonu tekniği, hem insan EKH'lerinden hem de iPKH'lerden nöral progenitör hücreleri üretmek için çokça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem stromal besleyici tabakası veya EB bazlı protokollerin önüne geçmiş ve gereksinimlerini azaltmıştır. Noggin bir BMP inhibitörü olarak görev yaparken, SB431542, ALK4, ALK5 ve ALK7 reseptörlerinin fosforilasyonunu bloke ederek Lefty/Activin/TGF- β yollarını inhibe etmektedir [31]. Ayrıca SB431542 uygulamasının hızlı bir Nanog ekspresyonu kaybına (pluripotensi kaybı) ve CDX2 ekspresyonunda büyük bir artışa neden olduğu, Noggin/SB431542 ikili uygulamasının ise belirgin bir SOX1

indüksiyonuna neden olarak nöroektodermal soya doğru güçlü bir eğilime yol açtığı saptanmıştır [31].

Li ve arkadaşları, küçük moleküller kullanarak GSK-3, TGFβ ve Notch sinyal yollarını sinerjistik olarak inhibe ederek oluşturdukları kimyasal koşullarda bir hafta içerisinde insan EKH'larının primitif nöroepitele farklılaştığını rapor etmişlerdir [32]. Lösemi inhibitör faktör, GSK3 inhibitörü (CHIR99021) ve SB431542 varlığında bu nöroepitel kararlı bir şekilde kendini yenileyebilmiştir [32]. CHIR99021, GSK3'ün küçük bir molekül inhibitörü olup embriyonik kök hücrelerinin kendi kendini yenilemesinde görev alan kanonik Wnt sinyalini aktive edebilmekte, SB431542 ise TGF-β ve Activin reseptörlerinin küçük molekülü inhibitörü olup mezenkimal-epitelial geçiş ve yeniden programlamada rol oynamaktadır [32]. Sinyal mekanizmalarının farklılaşma sürecindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte burada görev alan moleküllerin protokollerdeki kombinasyonları farklılık gösterebilecektir.

Sonuç

Beyin veya omurilikteki nöronal veya glial hücre defektleri nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Bu durumlar sonrası gelişen hafıza kayıpları, bilişsel bozukluklar, demans veya vücut hareket bozuklukları ile birlikte esas olarak Parkinson, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı ve Amyotrofik lateral skleroz gibi hastalıklara neden olmaktadır. Son yıllarda pluripotent hücrelerin nöral hücrelere farklılaştırılması ile ilgili çalışmalar ve çeşitli hastalık modelleri geliştirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları ümit vericidir ve gelecekteki tedavi stratejileri için değerli bilgiler sağlayacaktır. Bu nedenle randomize, çift kör çalışmaların sayısının artması ve merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için hücre terapisinin etkinliğinin kanıtlanması gerekmektedir.

Önceki yıllarda, nöral kök hücreleri sadece embriyonik beyinlerden elde edilebilmiştir. Ayrıca teknik sorunlar (sınırlı kaynak, izolasyon sorunları ve düşük saflık) nedeniyle hücre terapileri istenilen düzeylere ulaşamamış ve bu sorunlara etik kaygılar da eşlik etmiştir. Yeni ortaya çıkan teknolojiler, pluripotent kök hücrelerden (iEKH ve iPKH) çok sayıda sinir hücrelerinin (progenitör, olgun nöron, glia ve nöral kök hücre) elde edilmesini kolaylaştırmakta ve temel-klinik araştırmaların teşvik edilmesini sağlamaktadır. Buna karşın, pluripotent kök hücrelerin yüksek saflıktaki sinir hücreleri veya glia hücrelerine farklılaşması genellikle uzun zaman gerektirmektedir. Bu durum bu prosedürlerin klinik bir tedavide kullanılmasını kısıtlamakta veya zorlaştırmaktadır.

Her ne kadar nöron ve glia tedavileri çeşitli hayvan hastalığı modellerinde bir miktar başarı göstermiş olsa da insanlarda klinik uygulamalarda birçok sorun görülmeye devam etmektedir. Bu sorunların başında klinik tedavi protokollerinin standardizasyonu gelmektedir. Bu amaç doğrultusunda kök hücre tipleri, transplantasyon zamanı ve hücre miktarı dahil olmak üzere terapötik rutinler için detaylı ve etkin standartlar oluşturulmalıdır. Sinir hücrelerinin, glia hücrelerinin gelişiminde nöral kök hücrelerin saflığı öncelikli olduğundan ve diğer hücrelerin kontaminasyonu beklenmeyen yan etkilere neden olabileceğinden, saflık düzeyleri çok sayıda yöntemle gösterilerek konfirme edilmelidir. Ayrıca bu hücreler için optimal nakil zamanı, her akut veya kronik hastalık türü için ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Sinir hücreleri ve ilişkili kök hücre tedavisinin sonuçları ve gelişebilecek sorunlar halen belirsizdir ve bu nedenle çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi BAP birimine 2016-ÖNP-TIPF-0028 numaralı proje desteği için teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansman

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi BAP biriminin 2016-ÖNP-TIPF-0028 numaralı projesi çerçevesince desteklemiştir.

Yazar Katkıları

MK: Çalışmanın planlanması; Araştırma; Metodoloji; Denetim; Finansman Eldesi; Kavramsallaştırma; Makalenin Yazımı.

KE: Çalışmanın planlanması; Araştırma; Metodoloji; Makalenin düzenlenmesi; Makalenin Yazımı.

RÇ: Araştırma; Makalenin Yazımı. Makalenin düzenlenmesi.

Kaynaklar

1. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16(1):3-32.
2. Zhang S, Bell E, Zhi H, Brown S, Imran SAM, Azuara V, Cui W. OCT4 and PAX6 determine the dual function of SOX2 in human ESCs as a key pluripotent or neural factor. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):122.
3. Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* 2008;22(2):152-65.

4. Selvaraj V, Jiang P, Chechneva O, Lo UG, Deng W. Differentiating human stem cells into neurons and glial cells for neural repair. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:65-89.
5. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(34):12543-8.
6. Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5828-33.
7. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. (2006) Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes *Nat Med* 12, 1259–68.
8. Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, Ayala M, Zhang SC. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells*. 2008;26(1):55-63.
9. Pekny M, Pekna M, Messing A, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*. 2016;131(3):323-345.
10. Krencik R, Zhang SC. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2011;6(11):1710-1717.
11. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling [published correction appears in *Nat Biotechnol*. 2009 May;27(5):485]. *Nat Biotechnol*. 2009;27(3):275-280.
12. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1129-1133.
13. Hu BY, Weick JP, Yu J, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4335-4340.
14. Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, et al. Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature*. 2012;491(7426):769-773.
15. Mormone E, D'Sousa S, Alexeeva V, Bederson MM, Germano IM. "Footprint-free" human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes for in vivo cell-based therapy. *Stem Cells Dev*. 2014;23(21):2626-2636.
16. Le magueresse C, Monyer H. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron*. 2013;77(3):388-405.
17. Goulburn AL, Stanley EG, Elefanty AG, Anderson SA. Generating GABAergic cerebral cortical interneurons from mouse and human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 2012;8(3):416-26.
18. Yang N, Chanda S, Marro S, et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nat Methods*. 2017;14(6):621-628.
19. Gonzalez-Ramos A, Waloschková E, Mikroulis A, Kokaia Z, Bengzon J, Ledri M, Andersson M, Kokaia M. Human stem cell-derived GABAergic neurons functionally integrate into human neuronal networks. *Sci Rep*. 2021;11(1):22050.
20. Liu Y, Liu H, Sauvey C, Yao L, Zarnowska ED, Zhang SC. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2013;8(9):1670-9.
21. Sun AX, Yuan Q, Tan S, Xiao Y, Wang D, Khoo AT, Sani L, Tran HD, Kim P, Chiew YS, Lee KJ, Yen YC, Ng HH, Lim B, Je HS. Direct Induction and Functional Maturation of Forebrain GABAergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep*. 2016;16(7):1942-53.
22. Goldman SA, Kuypers NJ. How to make an oligodendrocyte. *Development*. 2015;142(23):3983-3995.
23. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):37-53.
24. Li L, Chao J, Shi Y. Modeling neurological diseases using iPSC-derived neural cells : iPSC modeling of neurological diseases. *Cell Tissue Res*. 2018;371(1):143-151.
25. Ehrlich M, Mozafari S, Glatza M, Starost L, Velychko S, Hallmann AL, Cui QL, Schambach A, Kim KP, Bachelin C, Marteyn A, Hargus G, Johnson RM, Antel J, Sternecker J, Zaehres H, Schöler HR, Baron-Van Evercooren A, Kuhlmann T. Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(11):E2243-E2252.
26. Shaker MR, Pietrogrande G, Martin S, Lee JH, Sun W, Wolvetang EJ. Rapid and Efficient Generation of Myelinating Human Oligodendrocytes in Organoids. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:631548.
27. Qu Q, Li D, Louis KR, et al. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat Commun*. 2014;5:3449.
28. Bianchi F, Malboubi M, Li Y, et al. Rapid and efficient differentiation of functional motor neurons from human iPSC for neural injury modelling. *Stem Cell Res*. 2018;32:126-134.
29. Sances S, Bruijn LI, Chandran S, Eggan K, Ho R, Klim JR, Livesey MR, Lowry E, Macklis JD, Rushton D, Sadegh C, Sareen D, Wichterle H, Zhang SC, Svendsen CN. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Neurosci*. 2016;19(4):542-53.
30. Osaki T, Uzel SGM, Kamm RD. Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPSC-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Sci Adv*. 2018;4(10):eaat5847.
31. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 2009;27(3):275-80.
32. Li W, Sun W, Zhang Y, et al. Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(20):8299–8304.