

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN ARAŞTIRMA AMAÇLI
BANKALANMASINDA STANDARDİZASYON VE KALİTE SÜRECİ - BİR
UYGULAMA MODELİ: “PEDI-STEM”**

Uzm. Biyolog Sema AYGAR

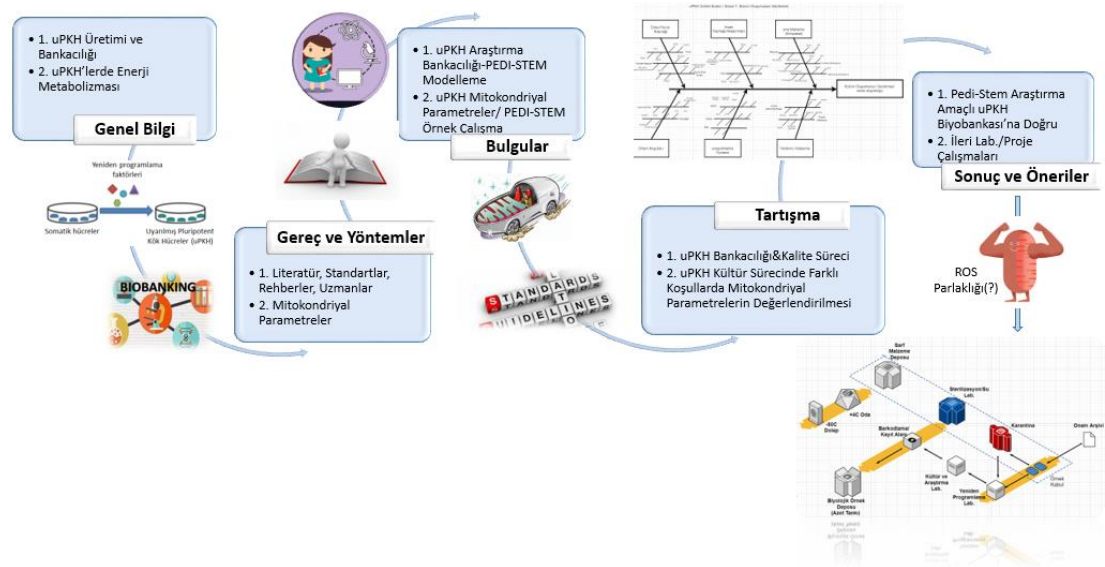
**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2020

GÖRSEL ÖZET

Aygar, S., Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Araştırma Amaçlı Bankalanmasında Standardizasyon ve Kalite Süreci - Bir Uygulama Modeli: “Pedi-Stem”, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020.



Anahtar Kelimeler: Uyarılmış/indüklenmiş pluripotent kök hücre (uPKH), mitokondri, uPKH bankası, biyobanka, kalite.

Bu çalışma, TÜBİTAK-1003 (No: 213S181) ve Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından Hızlı Destek Programı kapsamında (No:17974) desteklenmiştir.

ÖZET

Aygar, S., Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Araştırma Amaçlı Bankalanmasında Standardizasyon ve Kalite Süreci - Bir Uygulama Modeli: “Pedi-Stem”, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH), vücudun herhangi bir hücresinin genetik yapısı değiştirilerek, bu hücreye laboratuvar ortamında embriyonik kök hücre benzeri pluripotent özellik kazandırılması ile elde edilir. uPKH, başta nadir/kalıtsal hastalıklar olmak üzere, birçok hastalık mekanizmasının anlaşılması, yeni ilaç/hücre/gen araştırma ve tedavilerinin, organoid teknolojilerinin geliştirilmesi alanındaki potansiyeli ile çoklu üretim/bankalama gereksinimi doğmuş olan hücre modelidir. Dünyada, araştırma amaçlı uPKH bankalamanın yanısıra gen tedavisi ilacı olarak tedavide kullanılmak üzere pre-klinik/klinik çalışmalar başlatılmış olup bu hücrelerin tedavide kullanılmak amacıyla bankalanmasında biyolojik/biyoteknolojik ilaçların düzenlemeleri geçerlidir. Ancak araştırma amaçlı uPKH bankalanmasında standardizasyon ve kalite süreci henüz tamamlanmış değildir. Bu tez kapsamında, insan üzerinde kullanılmayacak biyolojik materyalin araştırma amaçlı biyobankalanması için hazırlanmış olan ilk standardın (ISO 20387:2018), bir (uPKH) biyobanka oluşumunda referans alınarak, “uPKH üretim” basamağı ile ilgili kalite unsurlarını belirlemeye yönelik özgün değerlendirmeler, neden-sonuç analizleri (Ishawa diyagramları) ve deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, araştırma amaçlı ulusal bir uPKH banka modeli için bilimsel/yazınsal araştırmaya dayalı iş akışı, organizasyon şeması ve banka birimleri gibi temel bileşenler sunulmuştur. Ayrıca, uPKH üretim/yeniden programlama sürecinde, tanımlanmış hücrelerin erken aşamada ayrıştırılmasında kullanıma yönelik, hücrelerdeki metabolik değişim parametrelerinden mitokondriyal kütle ve aktivite değerlendirmeleri sonucunda ROS parlaklığının, değişen ortam koşullarına duyarlılığı dikkat çekmiştir. ROS temelli bir ölçüm sisteminin uPKH elde edilmesinde kullanılabilecek bir kalite süreç bileşeni olabilirliğini destekleyici ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışma, araştırma amaçlı uPKH bankacılığına yönelik yapılmış, ilk ulusal tez çalışmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Uyarılmış/indüklenmiş pluripotent kök hücre (uPKH), mitokondri, uPKH bankası, biyobanka, kalite.

Bu çalışma, TÜBİTAK-1003 (No:213S181) ve Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından Hızlı Destek Programı kapsamında (No:17974) desteklenmiştir.

ABSTRACT

Aygar, S., Standardization and Quality Process in Research Grade Banking of Induced Pluripotent Stem Cells - an Application Model: “Pedi-Stem”, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Program of Stem Cell, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2020. Induced pluripotent stem cell (iPSC) is generated by genetic modification of any cell type of the body in laboratory conditions by transferring of embryonic stem cell-like pluripotent properties. iPSC is a cell model that requires multiple production/banking to be used for the understanding of many disease mechanisms, especially rare/hereditary diseases, the development of organoid technologies and new drug/cell/gene research and therapies. It is known that, besides research purposes, iPSC banking is evolving in the world for pre-clinical and clinical studies as gene therapy and the regulations of biological/biotechnological drugs are valid for the banking of iPSC for their therapeutic use. However, the standardization and quality process of the iPSC for research-use have not been completed yet. Within the scope of this thesis, the first standard in biobanking (ISO 20387:2018), prepared for the research-based biobanking and that will not be used for human-beings is planned to be referenced in the formation of a (iPSC) biobank. Specific evaluations, cause-effect analysis (Ishawa diagrams) and laboratory studies were performed in order to determine the quality-based elements related to the distinctive “iPSC derivation”. In this context, the basic components based on scientific and literary research such as workflow, organizational chart and units of the bank are presented for a national research-based iPSC bank model. Additionally, mitochondrial mass and activity evaluations were performed in the process of iPSC derivation/reprogramming with the idea that parameters based on metabolic/mitochondrial changes in cells can be utilized to separate the defined cells in early stages. As a result, the sensitivity of ROS brightness to changing environmental conditions was noteworthy. It is suggested that a ROS-based measurement system could be a component of the quality process that can be used for the preparation of iPSCs. However, supportive further studies are needed. This is the first representative national thesis study for research-based iPSC banking.

Key words: Induced pluripotent stem cell (iPSC, IPS cell), mitochondria, iPS cell bank, biobank, quality.

This study was supported by the TÜBİTAK-1003 (No:213S181) and Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, the Fast Support Program (No:17974).

İÇİNDEKİLER

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
GÖRSEL ÖZET	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler	6
2.1.1. uPKH'lerin Önemi ve Kullanım Alanları	9
2.1.2. uPKH Üretim Basamakları	18
2.1.3. uPKH'lerde Enerji Metabolizması ve Mitokondriyal Parametreler	30
2.1.4. Sorunlar ve Açık Alanlar	33
2.2. Biyobankacılık	39
2.2.1. Biyobankacılıkta Kalite Yönetim Sistemi	43
2.2.2. uPKH (Biyo)bankacılığı	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM	67
3.1. Teorik Araştırma Materyali ve İnceleme Yöntemleri	67
3.1.1. Literatür ve İnternet Tarama	67
3.1.2. Bilimsel Ziyaret ve Toplantılarda Uzmanların Görüşlerinden Yararlanma veya Bire-Bir Sözlü/Yazılı Görüşmeler	68
3.1.3. Resmi Otorite ve Kurul Görüşmeleri	68
3.1.4. Standart/Rehber İncelemeleri	69
3.1.5. İş Akışları, Standart Uygulama Yöntemleri ve Kalite Araçları	70
3.1.6. Bilgi Yönetim Sistemi	70
3.2. Laboratuvar Materyali ve Uygulama Yöntemleri	71
3.2.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü	72

3.2.2. MKH'lerden uPKH Eldesi/Yeniden Programlama	74
3.2.3. uPKH İdame ve Çoğaltılması	76
3.2.4. Hücrelerin Toplanması/Kaldırılması	77
3.2.5. uPKH Karakterizasyonu, Metabolik/Mitokondriyal Analizler	78
3.2.6. Veri Analizleri	84
4. BULGULAR	86
4.1. Literatür, Standart, Rehber Araştırma ve İnceleme Bulguları	86
4.1.1. Araştırma Amaçlı Bir uPKH Bankası için Kritik Noktalar ve Asgari Gereksinimler	86
4.1.2. Değerlendirme ve Pedi-Stem uPKH Banka Modellemesi	92
4.2. Laboratuvar Bulguları	114
4.2.1. Standart Koşullarda Yeniden Programlama ve uPKH Kültür Sürecinin İncelenmesi	114
4.2.2. Olumsuz Koşullar Oluşturularak Yeniden Programlama ve uPKH Kültür Sürecinin İncelenmesi	139
5. TARTIŞMA	152
5.1. uPKH Bankacılığı	152
5.2. Laboratuvar Çalışmaları	159
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	175
7. KAYNAKLAR	178
8. EKLER	
EK-1: TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ ETİK KURUL İZİNİ	
EK-2: TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	
EK-3: TURNİTİN - DİJİTAL MAKBUZ	
EK-4: BİLDİRİLER	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

aCGH	Array Comparative Genomic Hybridization
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
BBMRI	Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure
CEN	European Committee for Standardization
CIRA	Center for iPS Cell Research and Application (Kyoto University)
CNV	Copy Number Variation
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EBISC	European Bank for Induced Pluripotent Stem Cell
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECVAM	The European Centre for the Validation of Alternative Methods
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ERIC	European Research Infrastructure Consortium
ETS	Electron Transport System
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FISH	Fluorescent In-Situ Hibridization
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
HLA	Human Leukocyte Antigen
hPSC^{reg}	Human Pluripotent Stem Cell Registry
ISCBI	International Stem Cell Banking Initiative
ISCF	International Stem Cell Forum
ISBER	International Society for Biological and Environmental Repositories
ISO	International Organization for Standardization
iPSC	induced Pluripotent Stem Cell
KİT	Kemik İliği Transplantasyonu (Nakli)
KYS	Kalite Yönetim Sistemi
MCB	Master Cell Bank
MENA	Middle East and North America
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MKH	Mezenkimal Kök Hücre

MT	MitoTracker
NCI	National Cancer Institute
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
Pedi-Stem	Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PKH	Pluripotent Kök Hücre
qPCR	Quantitative PCR
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOP	Standart Operating Procedure
STR	Short Tandem Repeats
TCA	Trikarboksilik Asit
WCB	Working Cell Bank
YP	Yeniden Programlama

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeline göre sınıflandırılması.	7
2.2. uPKH teknolojisi.	8
2.3. uPKH teknolojisinin kullanım alanları.	9
2.4. İlaç geliştirme çalışmalarında uPKH'lerin kullanımı.	14
2.5. Pluripotent ve farklılaşmış hücrelerdeki metabolik farklılıklar.	31
2.6. Pluripotent durumda enerji metabolizması.	32
2.7. Kültür sisteminin bileşenleri ve karar parametreleri.	37
2.8. Biyobankacılıkta ana ve çalışan hücre banka sistemi.	42
2.9. KYS'nin temel bileşenleri ve kapsamı.	45
2.10. Biyobankacılığa yönelik OECD Rehberleri ve en iyi uygulama kılavuzları.	49
2.11. ISO 20387'nin yapısı	50
2.12. ISO 20387 – Genel gereksinimler/biyobanka işlemleri	50
3.1. uPKH elde etme süreci.	75
4.1. Araştırma amaçlı uPKH bankacılığı sürecine yönelik derlenen bazı asgari gereksinimler.	90
4.2. Kaynak doküman hiyerarşisi (solda) ve KYS bileşenleri.	91
4.3. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası için temel iş akışı.	94
4.4. uPKH bankacılığı süreci - Balık kılıçığı diyagramları ile neden sonuç analizleri.	98
4.5. “Kök Hücre Çalışmaları” nı ilgilendiren ülkemizdeki mevzuat.	100
4.6. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası için operasyonel birimler.	102
4.7. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası - organizasyon şeması.	104
4.8. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası'na yönelik aydınlatılmış onam formu içeriği.	106
4.9. Pedi-Stem- uPKH üretim süreci SOP listesi.	107
4.10. Pedi-Stem - uPKH karakterizasyonu için testler.	111
4.11. uPKH elde etme süreci-mikroskop görüntüleri.	116
4.12. YP'nin 18. günündeki hücre grubunun ince yapı özellikleri	118
4.13. MKH grubunun ince yapı özellikleri-3 farklı kesit incelemesi.	119
4.14. YP'nin 7. günündeki hücreler ve MKH'lerin akım sitometrik ölçümleri.	121
4.15. YP'nin 10. ve 13. günlerindeki hücrelerin aydınlık alan ve floresan boyama, görüntüleri (20X).	123

4.16.	YP'nin 12. ve 15. günlerindeki hücrelerin karakterizasyonu.	125
4.17.	YP'nin 16. ve 18. günlerindeki hücrelerin karakterizasyonu.	126
4.18.	Standart YP sürecindeki hücrelerin değerlendirilmesi.	127
4.19.	Erken pasaj (p6) uPKH kültür süreci - mikroskop görüntüleri.	128
4.20.	Geç pasaj (p21) uPKH kültür süreci - mikroskop görüntüleri.	129
4.21.	Erken Pasaj (P6) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.	130
4.22.	Geç Pasaj (P21) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.	131
4.23.	Geç Pasaj (p22) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.	132
4.24.	Geç Pasaj (p27) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.	133
4.25.	Erken ve geç pasaj koloniler için örnek ROS, MT ve ALDH ölçümleri.	135
4.26.	Erken ve geç pasaj uPKH'lerde MT, ROS ve ALDH için akım sitometrik ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi.	137
4.27.	p0 (erken) ve p14 (geç) uPKH'lerin değerlendirilmesi.	138
4.28.	Erken pasaj - İyi ve kötü uPKH'ler - mikroskop görüntüleri.	139
4.29.	Geç pasaj - İyi ve kötü uPKH'ler - mikroskop görüntüleri.	140
4.30.	İyi – kötü koloniler için ROS, MT ve ALDH ölçümleri.	141
4.31.	Besleme periyodu değişikliği yapılan hücrelerde pluripotenslik genlerinin ifade düzeyleri.	143
4.32.	E8 Flex ve StemFlex ile beslenen hücreler –mikroskopik görüntüler.	145
4.33.	P8-E8 grubunun ince yapı özellikleri.	147
4.34.	P8-E8 Flex grubunun ince yapı özellikleri.	148
4.35.	E8&E8 Flex besiyeri ile beslenen hücre gruplarında MT, ROS ve ALDH için akım sitometrik ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi.	149
4.36.	Besiyeri formu değişikliği yapılan hücrelerin pluripotenslik gen ifade düzeyleri.	151

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Yeniden programlamada kullanılan aktarım yöntemleri.	23
2.2. uPKH tanımlamada sıklıkla tercih edilen yöntem ve belirteçler.	28
2.3. En iyi biyobankacılık uygulamaları için önemli standartlar, yönergeler, araçlar.	51
2.4. Heterojenlik ve farklılaşma yeteneği için kullanılabilir ölçüm yöntemleri.	60
2.5. Hücre ürün karakterizasyonuna yönelik opsiyonel kalite kontrol parametreleri.	61
3.1. cDNA eldesi için işlem süreci.	83
3.2. RT-PCR için işlem süreci.	84
3.3. RT-PCR’da kullanılan primerlere ait diziler.	84
4.1. Araştırma Amaçlı uPKH üretiminde kritik aşamalar ve değişkenler.	95
4.2. EBISC&Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası - karşılaştırma.	113
4.3. Erken ve geç pasaj uPKH’lerin %yüzey belirteçleri.	138
4.4. İyi & Kötü uPKH’lerin % yüzey belirteçleri.	142
4.5. E8, E8 Flex veya StemFlex ile beslenmiş olan uPKH’lerin % yüzey belirteçleri.	150

1. GİRİŞ

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH'ler, induced pluripotent stem cells-iPS cells), laboratuvar ortamında, hücrelerin genetik yapısı değiştirilerek geliştirilen ve bir canlının sahip olduğu tüm hücre tiplerini oluşturma yeteneğine sahip, embriyonik kök hücre (EKH) benzeri hücrelerdir. İstenilen hücre tipine dönüşebilme ve sonsuz bölünebilme özellikleri sayesinde ilaç araştırmaları, hastalık modelleme ve tedaviye yönelik çalışmalara katkı sağlayabilecek kritik öneme sahip hücrelerdir (1). Kısıtlı miktarda kan/doku örneğinden geliştirilen uPKH'lerin, dondurularak saklanması ve bankalanması ile nadir/kalıtsal hastalıklar başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda araştırma imkânı sunması, EKH'lerin takıldığı etik engelleri barındırmaması ve tedaviye yönelik potansiyel taşıması, tıp alanında bir dönüm noktası olmuş; araştırmacıların, klinisyenlerin, ilaç endüstrisinin ve yatırımcıların ilgisini uPKH bankacılığı konusuna yönlendirmiştir. Halen gelişmiş ülkelerde uPKH bankaları kurulmakta, Avrupa'da birçok ülkenin katılımı ve akademi-sanayi işbirliği ile oluşturulan konsorsiyumlarla bu alanda deneyimler paylaşılmakta ve kalite unsurları dâhilinde uPKH bankacılığının esasları oluşturulmaya çalışılmaktadır (2, 3).

Vücutta bulunan herhangi bir hücreden uPKH geliştirilmesi mümkündür. Bu teknolojiye olgun hücrelere, embriyonik dönemde ifade edilen ancak farklılaşma ile birlikte sonlanan gen ifadelerinin, aktarım yöntemleri kullanılması ve/veya fiziksel, kimyasal, metabolik ortam değişiklikleri yapılması ile farklılaşma sürecinde geriye döndürülerek (dediferansiyasyon) pluripotent özelliğin yeniden kazandırılması söz konusudur (4). uPKH kolonilerinin eldesi uzun süre, yüksek maliyet, deneyimli personel ve fazla iş gücü gerektirmekte; hücreler *in vitro* ortamda çok fazla manipülasyona maruz kalmakta, ayrıca kapsamlı karakterizasyon, standardizasyon basamakları, dondurma, saklama işlemleri uPKH bankacılığında iş gücü ve maliyet yüksekliğinin temel unsurlarını oluşturmaktadır. uPKH geliştirilmesinin çok basamaklı ve çok değişkenli bir süreç olmasından dolayı bankacılıkta standardizasyon sağlanması oldukça zordur. Başlangıç hücrelerindeki farklılıklar, pluripotentlik eldesi için kullanılan protokollerin değişkenliği, uPKH kolonilerinin tanınması, seçimi, karakterizasyonunda kullanılan yöntemler ve kalite testleri başlıca değişkenlerdir.

Dünyada uPKH alanına olan ilgi büyük bir hızla artmakta ve çok sayıda araştırmacı tarafından pluripotent kök hücre (PKH) hattı üretilmektedir (2). Genetiği değiştirilen hücreleri içermesi nedeniyle gen tedavisi ilacı olarak biyolojik/biyoteknolojik ilaçlara ait yasal düzenlemelerin geçerli olduğu bilinen uPKH'lerin üretilmesi, depolanması ve paylaşılmasıyla ilgili kurallar düzenli ve yeterli değildir. 2018 yılında yayımlanan ve tüm biyolojik materyallerin gıda ve tedavi amaçlı kullanılmasını kapsamayan, araştırma amaçlı bir standart olan ISO 20387-Biyobankalama standardı, örnek toplama/tedarik etme, satın alma, etiketleme, erişim/loglama (seyir defteri), sınıflandırma, örnek muayene işlemleri (kalite-kontrol), yöntemlerin doğrulanması ve onaylanması, depolama, veri yönetimi, imha, paketleme, raporlar, dağıtım ve taşıma basamaklarına yönelik gereksinim ve tanımlamaları barındırarak araştırma amaçlı uPKH bankacılığı için çatı niteliğinde uygulanabilir bir standart olarak görülmektedir. Ancak, uPKH özelinde düşünüldüğünde, yukarıda sıralanan aşamalara, örnek toplama aşamasının ardına “örnek işleme/uPKH eldesi” gibi bir başlığın gereksinimi ve çok basamaklı olan uPKH üretim süreci düşünüldüğünde ihtiyaç duyulan bir standardın/rehberin ne derece detaylandırılması gerektiği ortadadır. Bu tez çalışması ile araştırma amaçlı uPKH bankalanmasına yönelik veri sağlanacağı öngörüldüğünden standartların güncellenmesine de katkı sağlanması ümit edilmektedir. Hücrelerin genetik yapısının değiştirilmesinde kullanılan yöntem ve teknolojiler ile elde edilen uPKH ve bu kapsamdaki araştırmalar dünyada yenidir. Ülkemizde araştırma amaçlı uPKH bankalanması konusunda oluşturulmuş herhangi bir rehber/standart bulunmadığı gibi dünyada da fikir birliği sağlanmış uluslararası onanmış, özel bir standart henüz hazırlanmış değildir. Bu nedenle araştırma amaçlı uPKH bankalanması ile ilgili standartların/dokümanların ülkemiz için yerinde, gereksinimler doğrultusunda oluşturulması ve dünyada devam eden ve yeni oluşumlara katkı sağlaması önemlidir. Böylesi bir katkının ülkemizde yapılacak olan bir tez çalışması ile sağlanacak olması, uPKH teknolojsinin keşif yeri olan Japonya başta olmak üzere gelişmiş dünya ülkeleri ile eş zamanlı takip edildiğinin göstergelerinden biri olacaktır.

Çoklu işlem basamağının ve değişkenin bulunduğu uPKH alanında, hücrelerin *in vitro* işlemler sonrası eldesinde, verim oranı (%0,0002 - %11,6) oldukça düşüktür (5, 6). Hastalık ve ilaç araştırmaları ile hücrel tedavi alanında geleceğe dönük ciddi

potansiyeye sahip olan bu hücrelerin yeterli ve kaliteli üretim kapasitesine kavuşturulması gerekmektedir. Bu kapasite biyobankalama ile gerçekleştirilebilir. Biyobankalamada uPKH'lerin üretim ve saklama basamaklarında standardizasyon ve iş gücü, maliyet ile organizasyonel yapılanma uygulamalarını kapsayan kalite yönetim sisteminin önemi yadsınmaz. Buradan yola çıkarak; i)uPKH araştırmalarında ve araştırma amaçlı uPKH bankacılığında standardizasyon ve verimlilik artışına yönelik kalite prosedürleri ve araçlarının uygulanması, ii)kalite yönetimi ve kalite araçlarının araştırma amaçlı uPKH bankacılığı alanında yerel ilk uyarlamalarının yapılması, iii)en iyi uygulama örneklerinin birleştirildiği araştırma amaçlı bir uPKH bankalama süreç ve işletim modeli önerilmesi, iv)araştırma amaçlı bankalamada, uPKH'lerin kalite/karakterizasyon/tanımlanma sürecine yönelik metabolik/mitokondriyal parametre analizlerine dayanan ön araştırmalar yapılarak örnek süreçler ile ilgili edinilecek bilgi ve tecrübenin ileriye dönük seri üretim sürecinde ihtiyaç duyulabilecek temel veriyi oluşturması ile tüm çıktılar doğrultusunda başta ülkesel olmak üzere araştırma amaçlı uPKH bankalama alanına katkı sağlanması hedeflenmektedir.

Bu amaçlarla yola çıkılan bu tez çalışmasının birinci bölümünde, uPKH üretimi ve araştırma amaçlı bankalanmasına yönelik kalite yönetimi dahilinde kritik basamaklar detaylı literatür taramaları, standart, en iyi uygulama ve rehber incelemeleri ile değerlendirilmiş, ayrıca, bu alanda çalışan, uPKH üretimi ve/veya çalışmaları yapan araştırmacı/üreticiler ile irtibata geçilmiş ve oluşturulan bilimsel (CorEuStem, GSPbmr) ve girişimsel (ISCBI, hPSCreg) ağlarda (7, 8) gerek uluslararası proje önerisi hazırlanması gerekse yıllık toplantılarda yer alınması sağlanmıştır. Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (Pedi-Stem)'nde tamamlanmış olan "uPKH Banka Prototipi" - TÜBİTAK 1003 projesi (No: 213S181) kapsamında elde edilen deneyim eşliğinde dünyada da çok yeni olan "uPKH Bankacılığı" konusunda kapsamlı bir analiz ve değerlendirme yapılmaya çalışılmıştır. uPKH üretimi ve bankacılığı açısından belirlenen kritik ve temel noktalar için kalite araçlarından balık kılçığı diyagramı (Ishawa Diyagramı) ile doğrudan ya da dolaylı olarak uPKH verim düşüklüğüne neden olan basamaklar (dokudan hücre eldesinden hücre depolama ve dağıtımına kadar) için farklı açılardan (doku/hücre, insan

kaynağı, saklama koşulları, test/yöntem/malzeme/ekipman/cihaz) detaylandırılmış incelemeler gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasının ikinci bölümü ise laboratuvar uygulamalarını kapsamaktadır. Bu bölümde, *in vitro* ortamda uPKH yeniden programlama ve ileri kültür aşamalarında istenmeden farklılaşmaya yönelen hücrelerin tanınmasına katkı sağlayacak bir yaklaşım olarak metabolik/mitokondriyal parametreler üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır. uPKH kolonilerinin seçiminde veya kültür sürecinde zorluklardan birisi hücrelerin kendiliğinden farklılaşmaya başlamasıdır ve bu istenmeyen durumun erken ve kolay tespit edilebileceği bir yaklaşım, bankalama gibi büyük çaplı bir üretim süreci için ciddi katkı sağlayabilecektir. Metabolik/mitokondriyal parametrelerin incelenmesi ile uPKH'lerin kendiliğinden farklılaşması, erken aşamalarda tespit edilerek hücrelerin kalite kontrolü yapılabilir.

uPKH alanında karakterizasyon ve kalite testleri olarak sıklıkla morfolojik, fenotipik, moleküler, sitogenetik, mikrobiyolojik yöntemler kullanılmaktadır (9). Son yıllarda kök hücre biyolojisinde metabolik değişimlerin kritik rolü üzerinde durulmakta, uPKH alanında da omiks çalışmalarını da içeren incelemeler yapılmaktadır (10, 11). Buna karşın, metabolik değişimlerin hücre üretim ve ilerleyen kültür sürecinde kalite göstergesi olarak kullanımı konusunda netlik yoktur. Oysa olumsuz kültür koşullarını hızla yansıtabilecek yaklaşım, metabolik değişimlerin tespitidir. Bu durum bankacılık alanı için özellikle önemlidir. Tez çalışmasının laboratuvar çalışmalarını içeren bu kısmında uPKH bankacılığında kullanılabilirliğini test etmek üzere metabolik/mitokondriyal parametreler değerlendirilmiştir. Bu amaçla; i) hücrelerin elektron mikroskopu (EM) ile ince yapı özellikleri incelenmiş, mitokondrilerin büyüklüğü, şekilleri (küresel, oval, uzamış, dallı veya başlıklı), yerleşimi (dağınık, perinükleer veya peristoplazmik), boyanma özelliği (elektron-yoğun veya elektron-geçirgen) ve kristalların yapısı (enine, boyuna, tübüler, trabeküler) analiz edilmiş, ii) mitokondriyal kütle bilgisi veren MitoTracker (MT) ölçümleri ve mitokondriyal metabolizma hakkında fikir edinmek üzere reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS)-düzeyi tayini yapılmış, iii) mitokondriyal özelliklerin yanında hücrelerin köklülüğü için iyi bir belirteç olduğu bilinen aldehit dehidrojenaz (ALDH) enzim seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca çekirdek

(nükleus)/sitoplazma oranı, çekirdekçik (nukleolus) varlığı, golgi, lizozomlar, endoplazmik retikulum (ER), sitoplazma, plazma membranı gibi diğer hücresel bileşenlerin özellikleri de elektron mikroskopik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, yeniden programlanma aşamasında, ayrıca farklı pasajlarda ve farklı besiyeri içeriklerinde geliştirilmiş uPKH'ler ile farklı besleme aralıkları uygulanarak oluşturulan olumsuz koşullarda kısmi programlanmış/farklılaşmaya yönelmiş örnekler incelenmiş, ortam koşullarındaki değeriklikler - başta ROS ifadeleri olmak üzere metabolik/mitokondriyal parametrelerdeki değerimler - ortaya çıkarılmış ve mitokondrinin, uPKH üretim ve kültür sürecinde hücrenin metabolik özellikleri açısından fikir verici bir parametre olabileceğine dair veriler elde edilmiştir. Bu çalışmanın devamı olacak ileri çalışmalarda, optimal kültür koşullarının sağlanması amacıyla mitokondri aktivitesini yansıtan metabolik parametrelerin solubl fazda  l lmesi, böylelikle kültür ortamını kesintiye uğratmadan, hatta uzun ve çok titiz çalışma gerektiren mikroskopik incelemelere olan gereksinimi de azaltarak yeniden programlamanın erken aşamalarında ve ilerleyen kültür sürecinde, kaliteli uPKH kolonilerin geliştirilmesine katkı sağlanabileceği sonucuna varılmıştır.

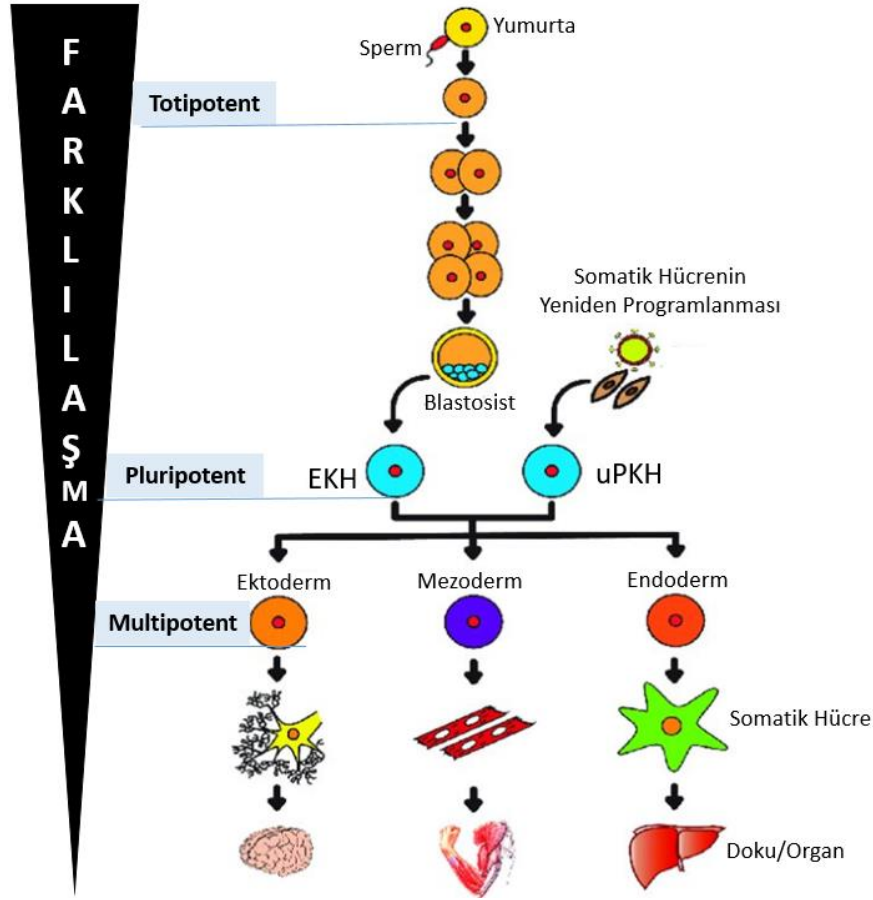
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Kök Hücreler ve Sınıflandırılması

İnsan vücudu, germ hücreleri, somatik hücreler ve kök hücreler olmak üzere 3 tip hücreden oluşmaktadır (12). Sperm ve yumurta olarak birleşip zigotu oluşturan germ hücreleri, üremenin temelini teşkil etmektedir. Somatik hücreler, herhangi bir doku yönünde özelleşmiş/farklılaşmış hücreleri ifade etmektedir. Kök hücreler ise sonsuz bölünebilen, kendini yenileyebilen ve sahip olduğu farklılaşma potansiyeli ile erişkin/özelleşmiş hücreleri oluşturabilen (plastisite) hücreler olarak ifade edilmektedir (13).

Kök hücreleri gruplandırma esaslarından biri, farklılaşma potansiyeline dayanmaktadır. Bu ifadeye göre, hücreler en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip olandan başlayarak; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent grupta yer alırlar (14). Placenta ve ekstraembriyonik dokular dâhil, bütünüyle bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan hücreler, gelişimin morula dediğimiz ilk 3 günlük, 16-32 hücreli evresinde totipotent özelliktedirler (15). İkinci sırada yer alan PKH'ler ise üç germ yaprağı olarak ifade edilen, endoderm, mezoderm ve ektoderm kökenli tüm hücrelere dönüşümlere/farklılaşarak insan vücudundaki tüm farklı hücre türlerini oluşturabilme yetisine ve sonsuz bölünme kapasitesine sahip hücreler olarak ifade edilmektedir. Giderek farklılaşma yeteneği azalan hücreleri ifade eden multipotent kök hücreler, “doku kök hücreleri” olarak tanımlanır. Örneğin, tüm kan hücrelerini oluşturabilen hematopoetik kök hücreler (HKH) ve kemik, kıkırdak veya yağ gibi bağ dokusu hücre tiplerine dönüşümlere mezenkimal kök hücreler (MKH), multipotent hücrelerdir. Unipotent özellikteki hücreler ise yalnızca özgü tek bir hücre tipine dönüşümlere bilmektedir.



Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeline göre sınıflandırılması.

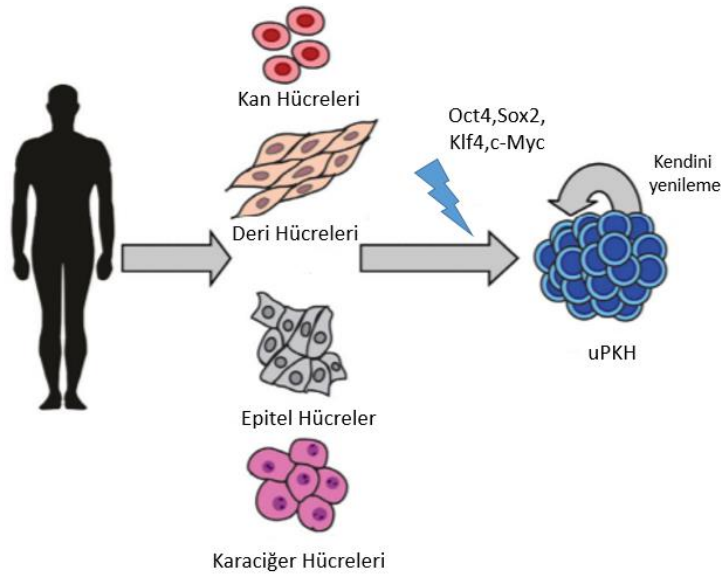
(Menon ve ark. (16)'ndan alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Kök hücreler 2006 yılına kadar, elde edildiği kaynağa ve köklülük özelliklerine göre embriyonik, fetal (kordon kanı, amniyon sıvısı kaynaklı) ve erişkin kök hücreler olarak sınıflandırılmışlardır (15). 2006 yılında, somatik/farklılaşmış hücrelerin laboratuvar ortamında muamele edilmesi sonucu elde edilen, pluripotent özellikte bir kök hücre tipi tanımlanmış ve *Induced Pluripotent Stem Cell* (IPSC, IPS cell) olarak isimlendirilerek (17) literatürdeki ve kök hücre sınıflandırmasındaki yerini almıştır. Dilimize uyarılmış/indüklenmiş pluripotent kök hücre (uPKH/iPKH) olarak çevrilmiş, günlük konuşmalarda İngilizce kısaltmasının okunuşu şekliyle, *IPS* hücresi olarak da ifadesine rastlanmaktadır.

Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreler (EKH), ancak 4-5 günlük embriyonun (blastokist) iç hücre kütesinden elde edilebilmektedir (18). EKH'erin bu şekilde elde edilmesi ve kullanımı beraberinde etik ve yasal sorunları ortaya çıkarmış ve araştırmacıları benzer özelliklere sahip hücre araştırmalarına yönlendirmiştir (19,

20). Multipotent özelliğe sahip hücrelerden HKH'ler ve MKH'ler, etik açıdan kabul edilebilir olsa da kendini yenileme ve farklılaşma potansiyellerinin kısıtlı olması açısından tam ihtiyacı karşılamamaktadır (20, 21).

2006 yılında, olgun hücrelerde pluripotente özgü genlerin ifadesi yapay olarak teşvik edilerek potansiyeli yüksek kök hücrelerin türetilbileceği Japon araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (17). Dr. Yamanaka ve arkadaşlarının öncülüğünü yaptığı bu çalışmayla, fare kaynaklı olgun (matür/pluripotente genleri metilasyon ile kapanmış) bir hücreye (fibroblast) EKH benzeri bir yapı kazandırılmış ve "uPKH" şeklinde ifade edilerek, "EKH-benzeri/yapay pluripotente kök hücreler" olarak tanımlanmıştır (17). "EKH-benzeri" denilmesinin sebebi, iki hücre tipinin de pluripotente özellikte olması, bununla birlikte aralarında, epigenetik farklılıkların (22) yanısıra sitoplazmanın hem yapışkan hem de esnek yapı (viskoelastik) özelliğinden dolayı fonksiyonel farklılıkların da gösterilmiş olmasıdır (23).



Şekil 2.2. uPKH teknolojisi.

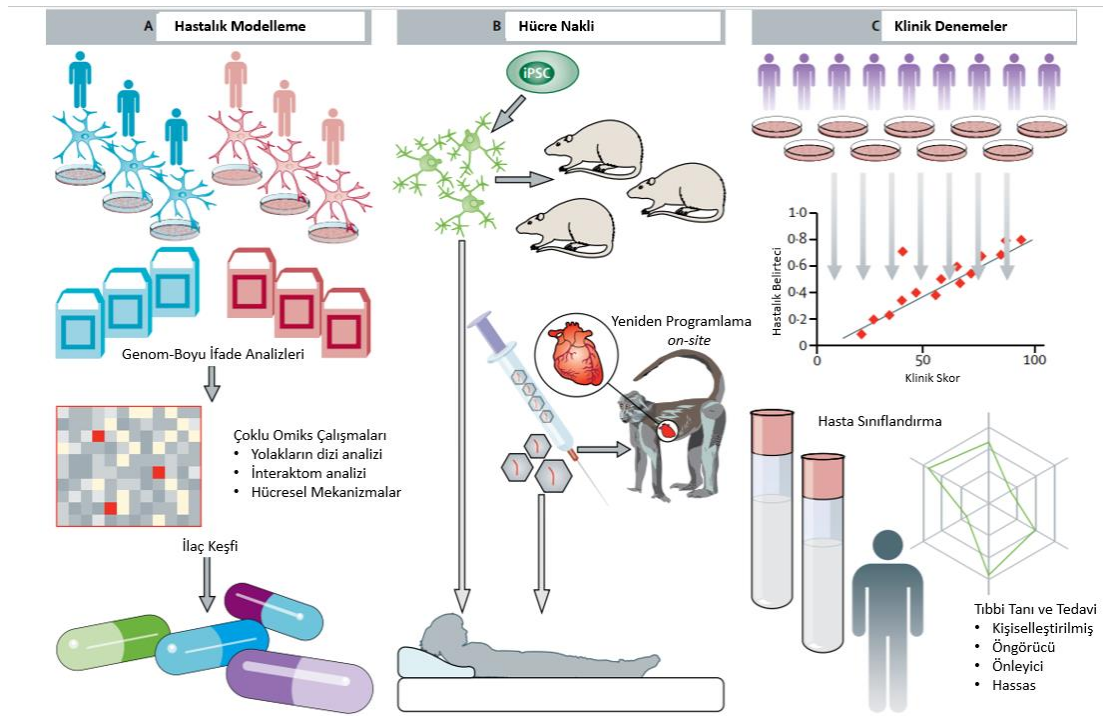
(El Hokayem ve ark. (24)'ndan alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Pluripotente özelliğe sahip olan ve EKH'ler gibi etik kısıtlılıklar taşımayan uPKH'ler, alanında büyük heyecan uyandırmıştır (25). Bu teknolojiye, EKH'lerde aktif olan pluripotente faktörlerinin (Oct4, Klf4, Sox2 ve cMyc) viral veya non-viral yöntemler kullanılarak farklılaşmış/farklılaşma yeteneği azalmış/somatik hücrelere

aktarılmasıyla bu hücreler yeniden programlanabilmektedir. uPKH'lerin bu bilimsel ve teknolojik potansiyeli, araştırmacısı olan Dr. Yamanaka'ya 2012 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır (26).

2.1.1. uPKH'lerin Önemi ve Kullanım Alanları

Kan, deri gibi herhangi bir dokuya ait olgun hücreden geliştirilebilen uPKH'ler EKH'lerde olduğu gibi sonsuz/çok sayıda bölünebilirler ve vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaştırılarak hasar onarımında, ilaç araştırmalarında, hastalık modellemede ve genetik bozukluğun/hasarın düzeltilmesinde kullanım potansiyeli taşımaktadırlar (27, 28).



Şekil 2.3. uPKH teknolojisinin kullanım alanları.

(Cossu ve ark. (29)'ndan alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

uPKH'ler, sınırsız bölünme kapasitesi ve istenilen hücre tipine dönüşebilme yetenekleri ile özellikle nadir kalıtsal hastalık araştırmalarında ve rejeneratif tıp çalışmalarında ümit vadetmektedirler (30, 31). Hastalık sebebi belirlendikten sonra, bir mutasyonun hücresel düzeyde nasıl hastalığa neden olduğunu anlamak ve özgü tedaviye yönelik uzun vadede planlar yapmak üzere yeterli miktarda ve uygun hücreler ile *in vitro* araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu amaçla, farklı nadir hastalıklara sahip

hastalardan ve akrabalarından alınacak, erişimi her zaman kolay olmayan hücre örneklerinden uPKH hattı elde edilmesi ve bu hücrelerin istenilen doku yönünde uyarılması sonucu nadir hastalık mekanizmalarının anlaşılması mümkündür. Küçük yaşlardaki (pediyatrik) bireylerden oldukça az miktarda alınabilen örnekler ile bile çocukluk çağı hastalıklarının araştırılmasında gerekli olan hücre modelleri, uPKH üretimi ile oluşturulabilir. uPKH'lerin rejeneratif tıptaki önemi, bu hücrelerin istenilen doku yönünde farklılaştırılabilmesi ve hasarlı doku onarımında kullanılabilme potansiyelinden gelmektedir. Hasarlı hücrelerin doğrudan yerine konulabilmesinin yanında, kalıtsal hastalıklarda hücrelere genetik düzenleme (modifikasyon) yapılarak hasarın giderilmesiyle de katkı sağlanabilir.

uPKH'ler, hastalıkların laboratuvar ortamında modellenmesi açısından da önemli potansiyele sahiptir. Üç boyutlu hücre kültürü koşullarında yapılan modellemeler (disease in a dish) sayesinde, hastalık mekanizmasının (patofizyolojisinin) anlaşılmaya çalışılması ve hasta üzerinde gerçekleşecek süreç ile ilgili ön bilgi edinilerek kliniğe yönelik çalışmaların doğru yönde ilerlemesine katkı sağlanmış olacaktır (32, 33). Bu özellikleri ile uPKH'ler, ilaç endüstrisi alanında da büyük heyecan yaratmıştır. uPKH'ler yeni ilaç molekülleri ve kombinasyonlarının test edilmesi veya bilinen ilaçların farklı kullanımları (endikasyon) açısından fırsat oluşturmakta (*drug repurposing* - ilaç yeniden konumlandırma) ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarına giden yolun adımlarını sağlamlaştırmaktadır.

Günümüzde kişiselleştirilmiş tıp deyimiyle, tıbbi tedavinin her hastanın kendine özgü özelliklerine göre uyarlanması üzerinde durulmaktadır (34). Hastaya özgü tedavilerin geliştirilebilmesi için ilk aşamada, hastalığa özgü hücreler ile yapılan araştırmalar önem arz etmektedir. Araştırmalarda hastalardan elde edilen kaynak hücrelerin uPKH'lere dönüştürüldükten sonra gelişim ve farklılaşmalarının baştan itibaren gözlemlenmesine yönelik çalışmalar, var olan hastalığın patolojisini anlamaya yardımcı olacaktır. Tedaviye yönelik düşünüldüğünde, bu kez hastanın sağlıklı (iyileştirilmiş) hücrelerinden geliştirilecek uPKH'ler ümit vadetmektedir. Hanna ve arkadaşları tarafından (35) 2007 yılında yapılan çalışmada, orak hücre anemili insanlaştırılmış (humanized) farenin kuyruğundan alınan fibroblastlar öncelikle, Oct4, Sox2, Klf4 ve cMyc transkripsiyon faktörlerini içeren retrovirüs ile uPKH geliştirmek

üzere genetik olarak düzenlenmiştir. Daha sonra, geliştirilen uPKH'lerde orak hücre oluşumuna neden olan mutant hemoglobin, gen hedefleme ile düzeltilmiş ve elde edilen sağlıklı uPKH'ler hematopoetik öncülere farklılaştırılarak yeniden hasta fareye (otolog) verilmiştir. Gerek uPKH elde edilişi, gerekse hastalıklı hücrenin düzeltilmesinde çok aşamalı genetik değişikliklerin yer aldığı bu çalışma, hem gen tedavisi hem de hücresel tedavi süreçlerini barındırmaktadır. Gen tedavisi, tümör oluşumu ile ilişkili riskler taşırken, hücresel tedavi immünolojik ret durumu açısından değerlendirilmelidir (36); verici ile alıcı arasındaki doku gruplarının (İnsan Lökosit Antijeni, HLA) uyumu gereklidir. Özellikle allojenik aktarımlarda bu değerlendirme çok önemlidir. Hastanın kendisine ait hücrelerden üretilen uPKH'ler, bu tür bir riski bertaraf edebilecektir. Yukarıda verilen örnek çalışmada, genetik olarak düzeltilmiş uPKH'ler otolog verilmeden önce yinde de hasta ışınlanmış ve bağışıklık reddi oluşma olasılığının önünde geçilmiştir. İlk deneysel klinik uygulama için göz ile ilgili dejeneratif bir hastalık (makula dejenerasyonu) seçilmiştir (37). Gözün nispeten küçük bir doku olması ve esas bağışıklık sisteminden ayrılmış özelliklere sahip olması, tercih edilmesinde avantajlı olarak görünen sebeplerdir. uPKH klinik uygulamalarında otolog (kişinin kendinden) kullanım yanında HLA haplotip uyumlu diğer bireylerden geliştirilen uPKH'lerin kullanımına yönelik allojenik çalışmalar üzerinde de durulmaktadır (33).

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, Parkinson hastalığı, retina ve kornea hastalıkları, kalp ve karaciğer yetmezliği, diyabet, omurilik yaralanması ile eklem ve bazı kan hastalıklarının tedavisine doğru ümit vadeden sonuçlar elde edilmiştir (38, 39). Dopaminerjik nöron aktarımı, Parkinson hastalığının tedavisinde potansiyel stratejilerden biri olarak görülmektedir. Doi ve arkadaşları (40) 2014'te, uPKH'lerden dopaminerjik nöron uyarımı ve dopaminerjik nöron öncü hücrelerinin sınıflandırılması için geliştirdikleri yöntemi sunmuşlardır. Hücre ayırma ve transplantasyon için en uygun zamanın da belirlendiği belirtilen bu çalışma, nörolojik klinik uygulamalar için yol açıcı olarak öngörülmüş ve Parkinson hastalığı tedavisi için 2018'de Kyoto Üniversitesi (Japonya) tarafından klinik denemenin başlatıldığı haber edilmiştir (41). 2019 Eylül ayındaki Nature web yayınında, yine Japonya'da, uPKH'lerden geliştirilen korneanın hastaya aktarıldığı ve gözlenen 1 aylık sürede görmenin iyileştiği bildirilmiştir (42). Kalp hastalıklarına yönelik çalışmalar ile ilgili olarak, 2019 yılı

itibari ile gelinen noktada, insan kaynaklı uPKH (i-uPKH)'lerden elde edilen kardiyomiyositlerin domuz modelinde kardiyak fonksiyonunun iyileşmesi yönünde rol oynadığı gösterilmiştir (43). Ayrıca, Osaka Üniversitesi araştırmacılarından Yoshiki Sawa önderliğinde, kalp yetmezliği olan hastalara uPKH'lerden türetilen kardiyomiyositlerin nakli için pilot çalışmanın Japon Sağlık Bakanlığı tarafından onaylandığı bilgisine ulaşılmıştır (44). Takebe ve arkadaşları (45) tarafından uPKH'lerden geliştirilen damarlanmış ve işlevsel insan karaciğeri, hasta tedavisine ışık yakan ilk örnek olarak kabul edilmektedir. Diyabet tedavisine yönelik çalışmalarda anahtar konumda olan pankreatik β hücrelerine, insülin üretimi yönünde işlev kazandırılması temel hedeflerdendir (46). İ-uPKH'lerden geliştirilen endokrin öncü (projenitör) hücreler, immün-yetersiz farenin böbrek kapsülüne yerleştirildiğinde, insülin salgılama kapasitesinin arttığı gözlenmiştir (47). Dr. Yamanaka'nın da içinde bulunduğu Japon araştırmacı ekibi, 2018 yılında sundukları derleme ile omurilik hasarına karşı uPKH-tabanlı hücre tedavisine yönelik zemin değerlendirmesi yapmışlar ve planladıkları ilk klinik uygulamayı ilan etmişlerdir (44). Detaylı açıklanan stratejiye göre, Kyoto Üniversitesi uPKH Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (CIRA) Hücre Bankası'nda kliniğe uyumlu olarak hazırlanmış olan allojenik uPKH'lerin, nöral kök/projenitör hücrelere dönüştürülerek hastalığın sub-akut fazında nakledilmesi planlanmıştır. Eklemlerdeki kıkırdak ve kemik yapısının tahrip edilmesiyle teşhis edilen Romatoid artrit (RA), kronik inflamatuvar bir hastalıktır. 2016 yılında Rim ve arkadaşları (48) tarafından yapılan çalışmada, RA patogenezinde aktif hücresel bileşen olarak görev yapan fibroblast benzeri sinoviyal hücrelerden geliştirilen uPKH'lerin RA patogenezine yönelik kullanılabileceği gösterilmiştir. Kan hastalıkları ile ilgili olarak, β Talasemi tedavisine yönelik Amerika'da yapılan çalışmada, CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) - gen düzenleme yöntemi ile hemoglobin β genindeki mutasyon düzeltilmiş olan uPKH'lerden geliştirilen eritroid öncüleri kullanılmıştır (49). Bu çalışmanın, hastaya özgü uPKH'lerin genetik onarımı ile tek gen hastalıklarının tedavisi yönünde önemli bir adım olduğu vurgulanmıştır. Ancak unutulmamalıdır ki, sadece bir hücre tipinin fonksiyon kaybıyla tanımlanan bir hastalık hücresel tedaviden fayda görebilecekken, çoklu hücresel hataların olduğu durumlarda bu tür kök hücre tedavisi yetersiz kalacaktır (50). Hücre/gen tedavisi için hedef hastalıklar sınırsız

değildir; doku/hücre özellikleri veya hastalık patogenezi tedavide belirleyici etkenlerdir ve bu durumda, kök hücrelerden beklentinin çok yüksek tutulmaması gerekmektedir (51).

Hastalık modelleme

uPKH'ler dünya çapındaki ilgili araştırmacıların tümüne dağıtılabilecek sınırsız, yenilenebilir bir kaynak olarak, aynı anda birçok laboratuvarında aynı hasta hücre hatları ile çalışılabilme olanağı sunmaktadır. Örneğin, nadir bir metabolik hastalığı modellemek üzere hastanın karaciğerinden biyopsi örneği alarak hepatosit geliştirmek oldukça zor iken, hastanın herhangi bir dokusundan türetilen uPKH'ler, hasta ile aynı genetik bilgiye sahip somatik hücreler üreteceğinden bu hücrelerle hastalığın modelini oluşturmak, patofizyolojisine yönelik bilgi edinerek etkili ve güvenli ilaçları taramak mümkün olabilecektir (32). Orak hücre anemisi (35) ve Parkinson (52) hastalığının farelerde modellenmesi uPKH kullanılarak yapılan öncü hastalık modeli çalışmalarına örnek olarak verilebilir (27).

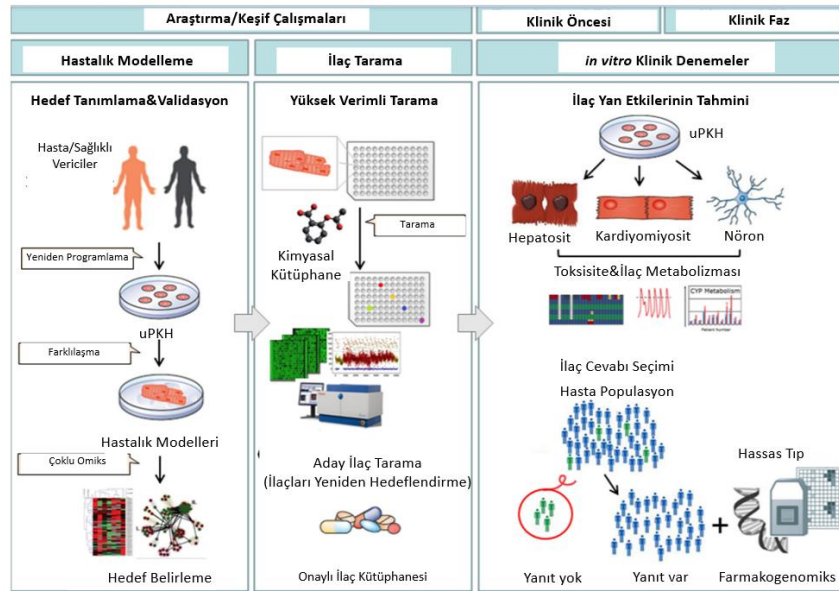
uPKH teknolojisine dayanan tanımlanmış genetik modeller, ilaç taramalarının yanısıra hastalık mekanizmalarını anlamaya yönelik yeni araştırmalara da yol açmıştır. Gerçeği en iyi yansıtma açısından, hastalık fenotiplerinin veya ilaç tepkilerinin ancak bir dokunun tüm hücresel ve hücre dışı bileşenlerinin mevcut olması ve fonksiyonel olarak olgunlaşması durumunda belirgin olması mümkündür. Bu tür modellerden optimum fayda elde etmek için, doku nişlerini taklit eden vasküler bileşenlere sahip, karmaşık, çok hücreli yapılara gereksinim duyulmaktadır. İnsan dokusu benzerleri oluşturmak amacıyla uPKH'ler kullanılarak yapılacak *in vitro* hastalık modelleme çalışmaları genomik düzenleme, birlikte kültür (co-culture), çip üzerinde organ (organ on a chip) ve organ benzeri yapı (organoid) gibi farklı model araçlar ile gerçekleştirilebilmektedir (53-55). Örneğin, genomik düzenleme araçlarıyla oluşturulabilen izogenik kontroller sayesinde hastaya özgü uPKH'lerde genetik olarak tanımlanmış koşullar oluşturulabilmektedir (56).

Hastalık modelleme ile daha etkin tanı ve hastalığın seyrine yönelik daha iyi öngörüler yapılabilmesi mümkün olacaktır. Böylece, erken aşamalarda ve daha yüksek

doğruluk ile hastalık riskinin tespiti sağlanabilecek ve dolayısıyla sağlık bakım maliyetleri düşürülebilecektir (57).

İlaç Araştırmaları

İlaç araştırmalarında, uPKH'lerden mikro-tıp ve makro-tıp çalışmalarında faydalanılabilmektedir (28). Hastalardan alınan uPKH'ler, ilacın etkinliğini analiz etmek ve ilaca olan yanıt mekanizmalarını gözlemlemede (mikro-tıp) veya klinik denemelerdeki her bir hastanın ilaç yanıtına dayanarak hastaları sınıflandırmada kullanılabilme (makro-tıp) potansiyeline sahiptir. İlaç araştırmalarında kullanıma yönelik farklı açılar şekil 2.4'te özetlenmektedir.



Şekil 2.4. İlaç geliştirme çalışmalarında uPKH'lerin kullanımı.

(Suh (58)'dan alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

İlaç taraması ve toksisite testlerinde en uygun ve yaygın modeller olarak hâlihazırda hayvanlar kullanılmaktadır. Bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların korunmasına ilişkin 63/2010 Avrupa Birliği yönergesindeki gereklilikler doğrultusunda, hayvandan önce, birincil hücre örnekleri ve tümör kaynaklı hücre hatlarının kullanılması önerilmektedir [3R Kuralı; Reduction (Sayıyı azalt), Refinement (İyileştir/uygun koşulları sağla), Replacement (Materyali değiştir) (59)]. Hayvan modelleri kritik toksik etkileri tespit etmede başarısız olabilmekte ve bu durum ancak ilaç piyasada kullanılmaktayken, kullanıcılarda olumsuz etkilere yol açtığına anlaşılabilir. Bu nedenle, pazarlama sonrası farmakoepidemiolojik

bazlı kontrollere olan ihtiyaç, son yıllarda katlanarak artmaktadır. Belirtilen gerekçeler düşünüldüğünde, uPKH'ler, ilaç taramasını hızlandırabilecek ve farmasötikler, kozmetik içerik maddeleri, kimyasal ürünler ve zirai kimyasalların güvenlik değerlendirmelerini geliştirebilecek, insan hücresi bazlı, yeni *in vitro* analizler oluşturma potansiyeli/fırsatı sunmaktadır (60).

Dünyada, hayvan deneylerine alternatif olarak PKH (EKH veya uPKH)'lerin ilaç araştırmaları için uygun hücre tipi olduğu fikrinden yola çıkan önemli projeler başlatılmıştır (60). Bunlardan bazıları:

- İnsan kaynaklı EKH (i-EKH) hatlarının gelişimsel toksisite için uygulanabilirliğini araştıran Avrupa Komisyonu Entegre Projeleri:
 1. ReProTect (2009): i-EKH kullanarak üreme toksisitesine yönelik test geliştirilmesi amaçlanmıştır (61).
 2. ESNATS (Embryonic Stem cell-based Novel Alternative Testing Strategies) (2013): Klinik çalışmalarda ilaç geliştirme sürecini kolaylaştırmak ve ilaç toksisitesini değerlendirmek için özellikle i-EKH'ye dayalı yeni bir toksisite test platformu geliştirilmesi hedeflenmiştir (62).
- “Daha Güvenli İlaçlar İçin Kök Hücreler” (Stem Cells for Safer Medicine)” Projesi (2014): Kamu/özel sektör ortaklığı ile oluşturulmuş olan projenin amacı, ilaç endüstrisinde kullanılan mevcut tarama teknolojisi platformlarına ölçeklendirilebilir, otomatikleştirilebilir ve entegre edilebilir, erken öngörülü taramaya yönelik, PKH temelli yeni, *in vitro* güvenlik ekranları geliştirmek olmuştur (63).
- Farmasötik ve kozmetik bileşenlerin toksisite testi için insan kaynaklı PKH (i-PKH) kullanma potansiyeli ve buna yönelik kalite kontrol testlerinin uyumlaştırılmasının hedeflendiği “SCR&Tox” projesi (2015): İnsanlar tarafından kullanılacak ürünlerin geliştirilmesinde, uygun olmayan ve potansiyel olarak güvenli olmayan aday ürünlere zaman ve kaynak harcanmasını önlemek için toksik özelliklere sahip bileşikler, gelişimlerinin erken bir aşamasında tanımlamanın öneminden yola çıkılarak tasarlanmış olan proje, i-PKH'nın sınırsız üretilerek çoğaltılabilme ve herhangi bir hücre tipine farklılaşmaları yönünde tetiklenebilme

özelliklerinden dolayı çok çeşitli insan hücresi bazlı test sistemleri geliştirmek için eşsiz bir fırsat sunabileceği bilinciyle başlatılmıştır (64).

- SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing) Projesi: Avrupa Birliği 7. Çerçeve Programı kapsamında desteklenmiş proje ile PKH'lerin toksikolojik araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmasını teşvik etmek için bu alanlarda uygulanabilir bilimsel standartlar oluşturulması amaçlanmıştır (65).

Ayrıca, özellikle yetersiz, tıbbi veya sosyal ihtiyaçların olduğu alanlarda yenilikçi ilaçların gelişimini ve hastaya erişimini hızlandırarak sağlığın iyileştirilmesi amacıyla oluşturulmuş olan Yenilikçi İlaçlar Girişimi (Innovative Medicines Initiative, IMI) de toksisite testi için kök hücre kaynaklı ilaç araştırmalarını desteklemektedir.

Tedavi ve Rejeneratif Tıpta Kullanım

uPKH teknolojisinin tedavi amaçlı ve rejeneratif tıpta kullanılması, tıbbin geleceğinde önemli değişikliklere yol açabilecek bir etkiye sahiptir (28, 66). Transfüzyon tıbbi alanında da uPKH teknolojisinin yeni bir dönemi başlatabileceği potansiyeli göz ardı edilemez. Dünyadaki nüfusun yaşlanan popülasyon tarafında genişliyor olması, sürekli bir ihtiyaç olan kan bağışı konusuna alternatif çözümler arayışının sebeplerinden biridir. Yapay kan ile ilgili çalışmalar, halen gelişimin ilk aşamalarında ve tek başına yeterliliği tartışılır durumdadır. Klinik kullanım için çok sayıda canlı hücreye acil ihtiyaç olduğundan, özellikle uPKH teknolojileri düzenli bir tedarik sağlamak için ideal bir kaynak olarak düşünülmektedir (67).

2014 yılında, ilk insan klinik çalışması olarak otolog uPKH'lerin kullanıldığı deneme, Japonya Sağlık Bakanlığı İlaç ve Tıbbi Cihaz Ajansı'nın onayıyla Masayo Takahashi liderliğindeki ekip (68) tarafından, yaşa bağlı maküler dejenerasyon (AMD) hastalığında pilot çalışma olarak 6 hasta için başlatılmıştır (37, 55). Çalışmada, ilk hastanın kendi deri hücrelerinden türetilen uPKH'lerden elde edilen retina pigment epitel hücreleri otolog olarak 2014 Eylül ayında subretinal uygulanmış olup, ameliyattan 1 yıl sonra, hücrelerin sağlam kaldığı, hastanın görme keskinliğinin düzelmediği veya kötüleşmediği bildirilmiştir. Ancak ikinci hastadan türetilen uPKH

kaynaklı retina pigment epitel hücrelerinde gözlenen genetik değişiklikler ve bu değişikliklerin yaratacağı tümör oluşturma potansiyeli ve riskler nedeniyle hastaya uygulama gerçekleştirilmemiş ve çalışma Mart 2015'te durdurulmuştur (37). Bu çalışma için yapılan açıklamada, sonrası için otolog yerine allojenik uPKH kullanımının planlandığı ifade edilmiştir. Japonya'nın yeni rejeneratif tıp yasalarının Kasım 2015'te yürürlüğe girmesinden sonra (69) klinik çalışmalar daha güçlü hukuksal temellere dayandırılmış ve 2017 yılında yine AMD hastalığına yönelik, en uyumlu HLA'ya sahip sağlıklı donörlerin deri hücrelerinden türetilen allojenik uPKH'lerin kullanıldığı bir diğer çalışma (70) başlatılmıştır. Bu çalışmada saptanan ilk ciddi yan etkiler, 2018'de duyurulmuştur (71).

2018 yılında, bir başka çalışmada, yine Japon Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanarak dünyada ilk kez trombositopenisi olan aplastik anemili bir hasta için kullanılan allojenik plateletlerin reddedilmesi üzerine otolog uPKH'lerin kullanıldığı bildirilmiştir (72). Ayrıca, lösemi, Ataxia-Telangiectasia (A-T), kronik granülomatöz hastalık, retinoblastoma, otizm spektrum bozukluğu, ektodermal displazi ve zihinsel yetersizlik (MYT1L Mutasyonu) gibi hastalıklara yönelik başlatılmış klinik çalışmaların bulunduğu bilinmektedir (73). Yapılan ön çalışmalara dayanarak, omurilik hasarlı (SCI) hastalara yönelik yakın gelecekte uPKH temelli klinik uygulama başlatılacağı bilgisi yayımlanmıştır (74). Bugün (12.06.2020) itibari ile ABD Ulusal Tıp Kütüphanesi tarafından sunulan “Klinik çalışmalar (Clinical trials)” web sayfasında, “iPSC” anahtar kelimesi ile erişilen kayıtlı çalışma sayısı 103'tür (75). İşaret edilen klinik çalışmalar arasında otizm, kanserler (mide, meme, akciğer, lösemi, lenfoma, glioma), kardiyomiyopati, diyabet, obezite, kalp krizi, hipertansiyon, retinal hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi yaygın hastalıkların yanı sıra down sendromu, ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis), Spinal Musküler Atrofi (SMA), kistik fibroz, Marfan Sendromu, Turner Sendromu ve Wilson Hastalığı gibi nadir hastalıklara da rastlanmıştır. İlan edilen çalışmaların çoğu, doğrudan klinik uygulama değil; klinik hasta materyallerinde yapılan araştırma çalışmasıdır. Bunlar arasında, 22 çalışma tamamlanmış (completed) olarak listelense de net bulgulara ulaşılamamıştır. Yalnızca akciğer kanserine yönelik olan bir çalışma, sonlandırılmış (terminated) olarak kaydedilmiştir (zayıf bulgular ve finansman yetersizliği nedeni ile). Ayrıca, kayıtlarda dikkat çeken en yeni çalışma, mayıs ayında Minnesota Üniversitesi

tarafından sunulan, COVID-19 hastalarında uPKH türevli doğal öldürücü (NK) hücrelerin kullanımının planlandığı çalışmadır.

2.1.2. uPKH Üretim Basamakları

2006 yılında fare (17), 2007’de insan (76) örnekleri ile başarılı uPKH teknolojisinde, olgun bir hücrenin, genleri üzerinde etkili olan uyarıcılar (transkripsiyon faktörleri) yardımıyla gelişim sürecinin başlangıç seviyesine/köklülüğün yüksek olduğu seviyeye döndürülmesi söz konusudur. uPKH üretim süreci, çok basamaklı ve her basamakta yer alan çoklu değişkenlerden dolayı seçilimin çok olduğu, oldukça zorlu bir süreçtir. Üretim basamakları aşağıda detaylandırılmaktadır.

I. Verici (Donör) Seçimi: uPKH üretmek üzere kaynak hücrenin elde edileceği donörün tipi, cinsiyeti, sağlık durumu gibi fenotipi belirleyen genomik ve biyolojik özellikleri, uPKH üretim sürecinde karşılaşılan ilk değişkenlerdir. Yapılacak çalışmanın/araştırmanın amacına göre verici tipi her zaman insan olmayabilir. Bu ilk aşamadan itibaren etik ve yasal kurallar önemlidir ve eğer kaynak insan olarak belirlenmiş ise bilgilendirilmiş onam formu gibi etik konu bileşenleri de sürece dâhil olmaktadır (19, 20).

II. Kaynak Doku/Hücre Seçimi: Kullanım amacına göre çeşitli kaynak ve dokudan alınacak herhangi bir somatik hücreden uPKH’nin elde edilmesinde teorik olarak herhangi bir engel bulunmamaktadır. Ancak seçilen kaynak hücreye bağlı olarak, uPKH elde etme süreci ve etkinliği/başarısı değişkenlik gösterebilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en çok tercih edilen kaynak hücre tipi olarak fibroblastlar ile karşılaşmıştır. Elde edilme ve üretim kolaylığı sayesinde teknolojinin öncüsü olan çalışmada (17) da bu hücreler (fibroblastlar) örneklendirilmiştir. Farklı hücre tipleri, farklı *plastisite* (hücrenin köken aldığı dokunun dışındaki dokulara farklılaşabilme özelliği) derecelerine sahip olabilirler. Örneğin, genç öncül keratinositlerin uPKH’lere dönüşüm etkinliklerinin deri fibroblastlarına oranla, en az 100 kat daha yüksek ve iki kat daha hızlı olduğu gösterilmiştir (77). Ayrıca, cilt fibroblast hücrelerine kıyasla, karaciğer ve mide hücreleri ve diğer epitel hücre

tipleri, daha yüksek verimlilikle uPKH'lere dönüştürülebilmektedir (78, 79). Raab ve arkadaşları (80) tarafından yapılan çalışmada, fibroblastların programlanmasında, epitel hücelere göre daha düşük verimlilik oranının ve yeniden programlanma için gerekli olan sürenin uzun olmasının sebeplerini açıklayabilecek hipotezlerden birinin, mezenkimal-epitelyal (MET) geçiş olabileceği belirtilmektedir. MET, normal embriyogenez ve erken gelişim sürecinde gerçekleşen bir basamaktır. Gelişimsel sürecin taklit edildiği yeniden programlamada; başlangıç, olgunlaşma ve kararlılık olmak üzere üç adım ayırt edilebilmektedir (81). MET esas olarak, pluripotentlik belirteçlerinin artışıdan önce, fibroblastın yeniden programlanmasının başlangıç aşamasında gerçekleşmektedir. Keratinositlerde başlangıçta, EPCAM (epitelyal hücre yapışma molekülü) veya epitelyal birleşme proteini olan E-kaderin (CDH1) gibi ilk epitelyal ilişkili genler tetiklenmektedir. Mezenkimal fenotipi düzenleyen transkripsiyon faktörleri, doğrudan epitel gen ifadesini bastırarak (keratinositler zaten epitel kökenli hücreler olduğundan) kendileri baskılanmış olur. Böylece mezenkimalden ektodermal germ katmanına geçiş kolaylaşmaktadır. Ektodermal kökenli keratinositlerin MET sürecinden muaf olmasıyla, YP etkinliği ve hızı üzerinde avantaj sağladığı düşünülmektedir.

Drozd ve arkadaşları (82) tarafından yapılan çalışmada, idrar kaynaklı epitel hücrelerden %1,5, amniyon sıvısından izole edilen epitel hücrelerden ise %0,1'e yaklaşan verimle uPKH üretimi gerçekleştirilmiştir. uPKH üretmek için kullanılan somatik hücre türünün, YP verimliliği ile ilişkili olduğu, bu çalışmada bir kez daha gösterilmiş ve sonuçlar fibroblast-keratinosit çalışmalarıyla karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Keratinositler, sıkı dizilim ve yüksek düzeyde kaderin ifadesi açısından PKH'lere benzer özellikler göstermektedir. PKH'ler ve keratinositlerin epitel hücre olmasından ve muhtemelen benzer bir epigenetik duruma sahip olmalarından dolayı, fibroblastlar için gerekli olan MET'in, keratinositler için gerekmediği, böylece epitel kaynaklı bu hücrelerde yeniden programlanmanın daha kolay gerçekleştiği düşünülmüş (77) ve çalışma bulgularında MET gereksiniminin hafifletilmesinin bir sonucu olarak, epitel hücrelerin sahip olduğu hızlandırılmış YP kinetiğine vurgu yapılmıştır.

III. Mikroçevre/Ekstraselüler Matriks Seçimi: uPKH kolonileri geliştirebilmek için hücrelerin birbirine ve matrikse tutunabileceği stroma desteği gereklidir. Önceleri farklılaşmamış insan uPKH'leri, kültürde sürdürülmek ve çoğaltılmak üzere genellikle besleyici tabaka (feeder layer) olarak bilinen insan veya fare kökenli - etkisizleştirilmiş fibroblastlar (mouse embryonic fibroblast, MEF) üzerinde birlikte kültür edilmişlerdir. İlerleyen süreçte, bu destek hücrelerin kültürde sınırlı bir ömre sahip olmaları ve artan pasajların başarımlarını etkilemelerinden dolayı besleyici hücreler olan primer MEF'in yararlı olmadığı görülmüş ve bu hücreler için ayrıca mikrobiyolojik kalite kontrol değerlendirmesi yapılması gerekliliğinin külfeti de düşünüldüğünde, pratik ve uygun görülmeyen bu hücreler saf dışı bırakılarak iyileştirme yönünde aşama kaydedilmiştir. Daha sonra, besleyici tabaka yerine yaygın olarak kullanılan sistemlerde kültür yüzeyleri, hayvan kaynaklı matrijel ile rekombinant laminin (83) veya vitronektin (84) gibi hayvan kaynaklı ürün içermeyen hücre yapışma (adezyon) proteinleri/hücre dışı matrikslerle kaplanmaya başlamıştır (85).

IV. Pluripotenslik Faktörlerinin Seçimi: Dr. Yamanaka ve arkadaşlarının çalışmasında, pluripotensliği sağlayacak olan transkripsiyon faktörleri, onlarcası arasından elenerek 4 taneye (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) indirilmiştir (17). Günümüzde, ticari ürün (kit) olarak da sunulurken en çok kullanılır hale getirilmiş olan bu 4 faktör; "OSKM", Yamanaka faktörleri olarak ifade edilmektedir. Bu faktörlerin bireysel etkilerini anlamaya yönelik yapılan çalışmada, Oct4 ve Sox2'nin yeniden programlama (YP) için gerekli olduğu, cMyc ve Klf4'ün ise uPKH kolonisi oluşumu yönünde verimlilik artırıcı etki yaptığı gösterilmiştir (86).

uPKH teknolojisi oldukça dinamiktir; günümüze kadar farklı sayı ve kombinasyonlarda faktörlerle, farklı başarı düzeylerinde uPKH'lerin elde edilebildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (27). Özellikle kanser hücrelerinde de ifade edilmesinden dolayı riskli bir faktör olan cMyc olmadan uPKH'lerin başarılılabileceğinin araştırıldığı çalışmalarda (87, 88), YP daha düşük verimlilikle olsa da/koloni oluşumu gecikse de somatik hücrelerin PKH'lere dönüştürebildiği gösterilmiştir. Böylece, cMyc'nin hücre çoğalmasını artırarak daha yüksek verimlilikle ve hızlandırılmış yeniden programlamaya (30 günde koloni oluşumu yerine, 21 günde oluşum) izin verdiği farkedilmiştir. Bir başka çalışmada, cMyc'siz

(Oct4, Klf4 ve Sox2 içeren) türetilen insan uPKH'lerin, 4 faktörlü OKSM türevi uPKH'lerden genomik olarak daha kararlı olduğu gösterilmiş ve onkogen olan cMyc'in hücre döngüsü kontrol noktalarını ve kromozomal kararlılığı (stabilite) bozduğu vurgulanmıştır (89). Fare primer hepatositlerinden ve gastrik epitel hücrelerinden uPKH üretiminin yapıldığı çalışmada, cMyc'in kokteylden çıkarılması sonucu YP verimliliğinin %20 - 40 oranında düştüğü gözlenmiş olsa da (78), bu onkogene sahip olmayan uPKH'lerinin üretilmesi, daha güvenli üretim yönünde büyük bir ilerlemeyi temsil etmiştir. Verimi arttırmak üzere farklı faktörlerin denendiği çalışmalar da yapılmıştır. Örneğin, Klf1 ve Klf5 ile yapılan çalışmada, verim yüksek bulunmamıştır (87).

Farklı faktör kombinasyonlarının ilk örneklerinden biri de, Dr. Thomson ve ekibi (90) tarafından, Oct3/4 (O), Sox2 (S), Nanog (N) ve Lin28 (L) (OSNL) sunulmuştur. Beş faktör (OSKMN veya OSKNL) veya altı (OSKMNL) faktör içeren kombinasyonların keratinositler ve fibroblastlarda yüksek verimlilikte pluripotentiği sağlayabildiği gösterilmiştir (91).

V. Pluripotentiği Aktarma Yönteminin Seçimi (Vektör/Taşıyıcı/Aktarım Aracı Seçimi): Seçilen hücreye pluripotentiği özelliğini kazandırmaya yönelik faktörlerin aktarımında tercih edilebilecek, yeniden programlanacak hücrenin genomuna dâhil olma/olmama özelliğine göre *integratif* ya da *non-integratif* olarak gruplandırılan farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin sahip olduğu olumlu ve olumsuz özellikler, elde edilecek uPKH'lerin kullanım amacına göre değerlendirilmektedir. Örneğin, hücrenin genomuna dâhil olabilen virüsler, aktarımda en sık kullanılan araçlardır ancak ciddi olumsuz sonuçlara (mutajenez=mutasyon oluşturma) neden olabilirler.

uPKH eldesinde, pluripotentiği faktörlerini somatik hücrede ifade ettirmek üzere ilk olarak retrovirüs, devamında yine bir viral araç olan lentivirüs kullanılmış, son dönemde ise en çok tercih edilen aktarım araçlarından biri Sendai virüs (SeV) olmuştur. SeV, negatif zincirli RNA genomuna sahip, zarflı bir virüsdür. Farelerde şiddetli solunum yolu hastalığına neden olsa da insanlar için hastalık yapıcı (patojenik) değildir. SeV vektörünün farklı hücre soylarında yüksek gen aktarım (transdüksiyon)

verimi ve protein ifadesine sahip olduğu gösterilmiştir (92). Aktarıldığı hücredeki yüksek etkinliğinin yanısıra, SeV replikasyonunun sitoplazmada gerçekleşmesi ve böylece genetik bilgisinin aktarıldığı hücrenin genomu ile birleşmemesi ve ilerleyen pasajlarda hücrelerden seyreltilebilir özellikte olması, immuno-gen tedavi gibi süreçlerde bu virüsün tercih edilme sebepleridir (93, 94). Diğer taraftan SeV'in, etkinliğinin hücre tipine göre değişiyor olması (kan hücrelerinde binde bir, fibroblastlarda yüzde bir), yeniden programlanmış uPKH'lerden tamamen kaybolmasının en erken 10 pasajı bulması ve hücrelerin virüsü tamamen çıkarmak için daha yüksek bir sıcaklıkta (39°C) kültürlenme gereği gibi sahip olduğu olumsuzluklar, uPKH üretim amacına göre üzerinde durulması gereken noktalardır (95).

Mutajenez olasılığını azaltan yöntemlerin geliştirilmesiyle, pluripotentiği uyarıcı genlerin entegrasyonu, kalıcı ifade veya yeniden aktivasyonun zararlı etkileri azaltılmıştır. Cre-Lox, transpozon tabanlı vektörler, epizomal vektörler (plazmidler, *minicircle* denilen küçük halkasal DNA'lar ve entegre olmayan epizomal virüsler), mRNA, protein, miRNA veya belirli hücresel yolları aktive/inhibe eden ve epigenetik modifikasyonlar yapan küçük moleküller, pluripotentiği faktörlerini aktarımda kullanılabilecek diğer araçlardır. Tablo 2.1'de yeniden programlamada kullanılan aktarım yöntemleri karşılaştırılmaktadır.

Pluripotentiği faktörleri dışında, yeniden programlamayı uyaran ajanlar da uPKH üretim sürecinde kullanılabilir. Örneğin, epigenetik mekanizmalar üzerinde etki gösteren DNA metiltransferaz inhibitörü olan 5'-azasitidin ile histon deasetilaz inhibitörü olan valproik asit gibi küçük moleküllerin kullanıldığı çalışmalarda, YP etkinliğinin oldukça yüksek bulunduğu gösterilmiştir (95). Ayrıca, sodyum bütirat, TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ve PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor-Receptor) inhibitörü gibi küçük moleküllerle yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (95). Küçük moleküller kullanılarak, histon deasetilasyonunun engellenmesi (96), TGF- β ve MEK sinyal yollarının bloke edilmesi (97, 98), epigenetik değiştiricilerin ve ROCK yolunun engellenmesi (99, 100) ve glikolizinin uyarılması (101) gibi yeniden programlamayı kolaylaştıran mekanizmalar hedeflenmektedir. Pluripotentiği faktörlerini aktarma yönteminin seçiminde, yalnızca

küçük moleküllerin kullanımı bile çok sayıda değişken içeren kritik bir işlem basamağı olarak değerlendirilebilir.

Tablo 2.1. Yeniden programlamada kullanılan aktarım yöntemleri.

(Rao ve Malik (5)'ten alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Programlama Yöntemi	Avantaj	Dezavantaj	Etkinlik (%)	Süre (Gün)
Retro ve lentivirüs	Etkinliği iyi, uygulaması kolay, birçok hücre tipinde doğrulanmıştır.	Küçük bir parmak izi kalır.	0,02 – 1	20-35
Lentiviral (miRNA: miR302/367cluster)	Çok yüksek etkinlik.	Parmak izi kalır.	10,4 – 11,6	18-26
miRNA (doğrudan transfeksiyon)	Parmak izi yok.	Etkinlik düşük.	0,002	20
Adenoviral	Parmak izi yok.	Etkinlik düşük ve teknik zorluk var.	0,0002	25-30
Sendai Virüs (SeV)	Parmak izi yok, etkinlik iyi, çok hücre tipinde doğrulanmış, ticari olarak sunuluyor.	Hazır alınırsa pahalı, lab.da hazırlanırsa teknik zorluk içerir, lisanslama/patentleme konuları doğabilir.	0,5-1,4	25
mRNA	Parmak izi yok, etkinlik iyi, ticari olarak sunuluyor.	Hazır alınırsa pahalı, lab.da hazırlanırsa teknik zorluk ve yoğun emek içerir.	0,6-4,4	20
Protein	Parmak izi yok	Etkinlik düşük, teknik zorlu, uzun zaman alıcı,	0,001	56
Epizomal	Parmak izi yok, etkinliği iyi ve çok hücrede doğrulanmıştır.	Bazı hücre tiplerinde etkinliği düşük.	0,0006-0,02	30
PiggyBac	Parmak izi yok ve etkinliği iyi.	Her hücre tipinde çalışılmamış, lisans ya da patent konuları doğabilir.	0,02-0,05	14-28
Minicircles	Parmak izi yok.	Etkinliği düşük.	0,005	14-16

uPKH'leri üretmek için YP yöntemine karar verirken, hangi kaynak hücrenin kullanılacağı, YP yönteminin bu hücre türünü programlayabilme kapasitesi ve ileri uygulamayı zorlayabilecek entegre dizilerin bulunup bulunmaması gibi etkenler göz önünde bulundurulmalıdır. Bu faktörlerin ağırlıklandırılması, planlanan çalışmanın hedeflerine bağlı olacaktır. Örneğin, epizomal yöntem kullanılarak yapılan YP, kan hücreleri için ideal görünürken fibroblastlar için standart kültür koşullarının değiştirilmesini gerektirmektedir. Episomal ve SeV yöntemleri arasında, ayak izini kaybetmek için geçen süreler açısından farklılıklar vardır. Kliniğe yönelik olan

kullanımlar için ayak izi bırakmayan bir yöntem seçimi önemlidir. Örneğin, mRNA ile yeniden programlanan uPKH'lerde ayak izi ile ilgili endişelenmeye gerek yoktur ancak mRNA yöntemi zahmetlidir ve ilk çalışmalarda sadece fibroblastlarla çalıştığı gösterilmiştir. Diğer hücrelerle olan performansı değerlendirilmelidir. Parmak izi bırakmaması ve %0,02 - %0,05 etkinlik oranı ile 14. günden itibaren uPKH koloni oluşumunun gözlenmeye başlayabildiği PiggyBac sistemi, çekici bir alternatif olabilir, ancak çalışmanın hedefine göre detaylı kıyaslamalar yapılmalıdır (95).

VI. Programlama Süreci ve uPKH Koloni Seçimi: Seçilen kaynak hücreye, belirlenen pluripotensite faktörlerinin belirlenen yöntemle aktarılmasıyla hücrelerin uPKH'lere dönüşümü, “(yeniden) programlama süreci”ni ifade etmektedir. Hücreler bu süreçte, uygun kültür ortam ve koşullarında tutulmaktadır. Beslenme ve gelişimleri sıklıkla düzenli olarak kontrol edilmektedir. Programlamanın ikinci haftasından itibaren görülmeye başlanabilecek uPKH kolonilerinin farklılaşmadan büyümeleri takip edilmekte ve bulunduğu kültür kabında fazlaca çoğaldıklarında yeni kültür kaplarına aktarılmaktadırlar. Programlama sürecinde hücrelerin karşılaşabileceği herhangi bir durum, onları farklılaşmaya kolayca yönlendirebilmektedir. Bu süreçte, besiyeri değişim zamanlaması/periody, besiyeri ısı ve hatta hücre kültürü sarf malzemelerinin özellikleri kritik olarak değerlendirilmektedir. New York Kök Hücre Vakfı Araştırma Enstitüsü tarafından hazırlanan en iyi uygulama dokümanında (Protocols For Human Pluripotent Stem Cell Work, 2011) uPKH üretim sürecine yönelik önerilen protokollerde, özellikle cam malzeme kullanımı vurgulanmaktadır.

Ortam koşulları da programlama süreci için önemli faktörlerden biridir. Doğal olarak gelişen embriyoların büyümesinde düşük oksijen seviyesi (hipoksi) yeterlidir ve insan EKH'leri için kültür koşulları bu şekilde düzenlenmektedir (102). YP işlemi sırasında hücre kültürünün %5 oksijen ortamında gerçekleştirildiği çalışmalarda, farelerde uPKH veriminin ~ 5 kat ve insan hücrelerinde 3 kat artırılabilirdiği gösterilmiş ve hipoksik koşulların YP sürecindeki etkisi ortaya konulmuştur (103). Hipoksik ortam ayrıca, uPKH'lerin nöronlara, kardiyomyositlere, hematopoetik progenitörlere, endotel hücrelerine ve kondrositlere farklılaşma verimliliğini arttırmak için de test

edilmiş ve düşük oksijen seviyesinin EKH pluripotentiği ile birlikte farklılaşmada da etkin olduğu gösterilmiştir (104).

VII. Kalite/Karakterizasyon Testleri: uPKH kalitesinin ölçümü; genetik içerik, pluripotent gen ifadesi, epigenetik düzenlemeler/özellikler ile ilgili olarak moleküler çalışmalar veya *in vitro* farklılaşma ile yapılabilmektedir (105). Programlama sürecinin devamında morfolojik olarak (mikroskopik incelemede) tanımlanan kolonilere uPKH özelliklerini taşıyıp taşımadıklarına dair doğrulama testleri yapılmaktadır. Bu testlerin sıklığı ile ilgili olarak, 2007- ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) çalıştayındaki (106), kök hücrelere yönelik tanımlanmış bir belirteç grubunun oranının, kültürdeki hücrelerin kalitesini ve tutarlılığını kontrol etmek için her 5-10 pasajda bir değerlendirilmesinin uygun olacağı önerisi dikkate alınmaktadır. Pluripotentiği özellikleri ve/veya belirteçleri akım sitometri, immünohistokimya, moleküler ve/veya sitogenetik yöntemlerle tespit edilebilmektedir. PKH'lerin genetik kararlılığını değerlendirmek için, her 10 pasajda bir, en az 20 metafaz ile Giemsa-bantlamanın yapılması gerektiği belirtilmiştir (106).

Birincil (primer) veya türetilmiş bir hücre hattı için yapılması gereken ilk test, HLA tiplendirme veya Kısa Ardışık Tekrar Bölgeleri (STR veya mikro uydu) analizi yoluyla tanımlama yönünde olmalıdır (107). Böylelikle, hücre hattının, kaynak hücrenin alındığı vericiden olduğu teyit edilir.

Kontaminasyon testlerine yönelik mikoplazma için polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı saptama yöntemleri veya luminometrik ölçümlere dayalı test kitleri nispeten sonuçları hızlandırmaktadır (108). Hızlandırılmış yöntemlerin/testlerin hassasiyet ve güvenilirliği değerlendirilmelidir.

Karyotipleme genel olarak genetik kararlılığı izlemek için kullanılabilirken, Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) analizi veya mikro dizi teknolojisi ile Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu (CGH), daha yüksek çözünürlükteki değişiklikleri tanımlamak için yararlı birer araç olarak değerlendirilmektedir. uPKH'ler EKH'ler ile kıyaslandığında, daha fazla genetik anormallik kazanmış oldukları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, yüksek çözünürlüklü bir SNP dizisi kullanılarak, erken pasajdaki insan uPKH'lerinde, orta pasajdaki uPKH'lere,

fibroblastlara veya EKH'lere göre daha fazla kopya sayısı varyasyonu (CNV) bulunmuştur (109). YP sürecinden sonra hücrelerin genetik profillerinin normalliğini kanıtlamak ve hastalık çalışmaları için potansiyel kullanımlarını değerlendirmek amacıyla, tüm genom analizi ve detaylı genom metilasyon çalışmalarının, hücre hatlarının kalite kontrolünün bir parçası olarak sürece dâhil edilmesi gerekebilir. Yeniden programlamayı takiben hücrelerin epigenetik açıdan değerlendirilmesinin yanısıra genetik profillerini incelemek de oldukça önemlidir ve ekzom dizilimi bu konuda önemli veri sağlayabilmektedir (110). Sonuç olarak, farklılaşmamış fenotipi, hücrelerin genetik ve epigenetik kararlılığını ve uPKH'lerin tamamen yeniden programlanmış hücre kimliğini, uygun karakterizasyon testleri ile tanımlamak kritik öneme sahiptir.

İlk çalışmalarda, PKH morfolojisi ve sınırsız kendini yenileme, pluripotellik belirteçlerinin ifadesi ve farklılaşma belirteçlerinin baskılanması, YP faktörünün yokluğu ve fonksiyonel farklılaşma (teratom), uPKH'ler için asgari karakterizasyon kriterleri olarak önerilmiştir (111). 12-14 hafta kadar zaman alan teratom oluşumu, kimi araştırmacılar tarafından olmazsa olmaz test olarak değerlendirilmiş olsa da, daha sonra *in vitro* uygulamalar için teratom oluşumunun gerekli olmadığı, floresans veya seçilebilir belirteçler içeren yeniden tasarlanan yapıların (reporter construct) uygun olacağı belirtilmiştir. uPKH'lerin özellikle tedaviye yönelik uygulamalarında, hastada herhangi bir şekilde yanlış davranan hücreleri *in vivo* izlemek ve aktarılan genlerin malignite oluşturmaya müdahale etmek için bir intihar genini kodlamak amacıyla bu tür bilgi verici araçlardan (reporter) faydalanılabileceği üzerinde durulmuştur (112). Malignite potansiyelinden dolayı önemsenen teratom testi ile ilgili olarak, 2014 yılında, en uygun insan PKH'leri ile ilgili yapılan derlemede, teratom oluşumunun tahlil edilmesinin her zaman nihai bir sonuca izin vermediği; farklı insan kaynaklarından türetilen ve farklı protokollerle oluşturulan uPKH'lerin, değişik teratom oluşum güçlerini barındırdığı yorumu yapılmış ve teratom testinin, literatürde bildirilen insan EKH ve uPKH hatlarının sadece yarısı için kullanıldığı ortaya konulmuştur (113).

2011 yılında yayımlanmış olan “Moleküler Biyoloji Yöntemleri” kitabında, esas olarak hücreler için kalite kontrol ve karakterizasyon denildiğinde 4 temel faktör

üzerinde durulmakta ve bu faktörlerin geliştirilen farklı testlerle onanabileceği belirtilmektedir (85):

- i. **Canlılık:** Dondurularak saklanmış olan hücreler, çözme sonrası tripan mavisi ile boyanarak veya erken apoptoz belirteçleri ile canlılık açısından test edilebilirler.
- ii. **Tanımlama:** Doğru kimliğini ve özgünlüğünü sağlamak için, hücre hattının türetildiği laboratuvardan başlayarak izlenebilir ve belgelenmiş bir başlangıcının olması gerekmektedir. Tanımlama, HLA tiplendirme, izoenzim ve karyotip analizleri ya da daha hassas olan STR profillemesi ile yapılabilir.
- iii. **Saflık:** Herhangi bir mikrobiyal kontaminasyon olmadığını ifade etmek üzere çeşitli testler kullanılabilir. Mikoplazma, virüs veya bakteri açısından bir bulaş olup olmadığı, günlük veya farklı periyodik aralıklarla kontrol edilmelidir. Test edilecek olan kontaminasyona yönelik, devam eden hücre kültürü için en uygun yöntem, şartlara/gereksinimlere göre belirlenmektedir. Örneğin mikoplazma testi için, hassasiyet, emek, paha ve süre açısından farklılıklar barındıran birden fazla sistem bulunmaktadır. Söz konusu kliniğe yönelik uPKH üretimi olduğunda, hassasiyetin birincil özellik olması önemlidir.
- iv. **Canlı dışı ortamda büyüme kararlılığı ve karakterizasyon:** İlk aşama kalite testleri tamamlanmış olan hücreler uygun besiyeri ile beslenmekte ve bulunduğu kültür kabında yeterli çoğunluğa ulaştığında pasajlamalarla çoğaltılmaya devam ettirilmektedir. Hücreleri kültür kabından ayırmada farklı yöntemler önerilmekte ve bu yöntemlerden dolayı oluşabilecek istenmeyen durumlar, süreci kritikleştirilmektedir. Devam eden hücre kültüründe akım sitometri veya immünohistokimya ile fenotipik karakterizasyon test edilebilir. Örneğin, i-uPKH'lerin; Oct4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60 ve alkalin fosfataz açısından pozitif ve SSEA-1 için negatif olduğu gösterilmiştir (114). Ayrıca, pluripotensiyon kontrolü için genetik karakterizasyona yönelik farklı testler de yapılabilmektedir. Aşağıdaki tabloda, tam programlanmış uPKH'leri ayırt etmek için sıklıkla tercih edilen yöntem ve belirteçler (Tablo 2.2'de) listelenmektedir (4).

Tablo 2.2. uPKH tanımlamada sıklıkla tercih edilen yöntem ve belirteçler.
(Bayart, E., & Cohen-Haguenauer (4)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Tespit Yöntemi	Belirteç
İmmünoboyama	Alkalen Fosfataz OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 , Tra-1-60, Tra-1-81, cMyc, SSEA1, SSEA3, SSEA4.
Akim Sitometri	OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 , Tra-1-60, Tra-1-81, cMyc, SSEA3, SSEA4.
Western Blotlama	OCT4, SOX2, KLF4 , CMYC.
qRT-PCR	<i>Endojen OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, LIN28, hTERT, REX1, SALL4, DPPA2, DPPA4, GDF3, cMYC, PPIA, DNMT3B reaktif olmalı; ekzojen yeniden programlama transgenler inaktif olmalı.</i>
Bisülfid Dizileme	Endojen <i>OCT4, NANOG</i> promotor bölgeleri reaktif olmalı; ekzojen yeniden programlama transgenlerini ifade eden promotor bölgeleri inaktif olmalı.
İmmün Yetmezlikli Farede Teratom Oluşumu	3 germ tabakasından farklı tipte hücrelere farklılaşma.
Embrioid Cisimcik Oluşturma	

Uluslararası Kök Hücre Bankacılığı Girişimi (ISCBI) tarafından (115) 2015 yılında, PKH'ler için önerilen standart kalite kontrol testleri; canlılık, tanımlama (DNA STR), sterillik (bakteri ve mantar açısından), mikoplazma ve virüs kontaminasyonu ile kök hücre belirteçleri, pluripotenslik ve genom durumunun değerlendirilmesi olarak sunulmuştur. Bunlar arasında tanımlama, sterillik, mikoplazma ve virüs testleri (insan kaynaklı virüsler için - hepatitis C, human immunodeficiency virus (HIV), human T-lymphotropic virus (HTLV) I/II, Epstein-Barr Virus (EBV), human cytomegalovirus (hCMV), human papillomavirus (HPV), herpes simplex virus (HSV), human herpesviruses (HHVs)), genel olarak kök hücreler alanında, iyi hücre kültürü uygulamaları (Good Cell Culture Practices, GCCP) kapsamında da yer alan standart testlerdir (116). PKH bankacılığı için önerilen tüm kalite kontrol testleri, kaynak hücre kültürlerini içeren ön-ana (pre-master) hücre bankası sürecinden başlayarak ilerleyen tüm süreçlerde (ana hücre bankası, dağıtım hücre bankası olarak ifade edilebilecek süreçte serbest bırakma testleri ve daha sonra kararlılık testleri olarak) gerektiğinde detaylandırılarak yer almaktadır. Bu testleri gerçekleştirmek üzere hangi tekniğin kullanılacağı hız/süre, maliyet ve duyarlılık ile ilgilidir. Örneğin genom durumunu test etmek üzere, karyotip analizi, aSNP, Bacs Beads Oligos, qPCR, tüm genom dizileme (WGS) veya tüm ekzom dizileme (WES) yöntemlerinden faydalanılabilir. WGS veya WES gibi yeni nesil genetik dizilim teknikleri tipik olarak daha fazla ayrıntı sağlar, ancak karyotip ve STR analizi gibi daha hızlı, kolay ve ucuz tekniklerle, üretim daha etkin sağlanmaktadır (9). StemBANCC'de tüm bu seçenekler göz önünde bulundurulmuş ve önceliğe sahip bir grup (özellikle nadir tek gen bozukluğu olan hastalar) WES testi için belirlenmiş, geri

kalanı, kalite kontrol amacıyla STR testi ve karyotipleme ile değerlendirilmiştir. İ-uPKH elde etme süreci zaten önemli miktarda zaman ve çaba gerektiren bir süreç iken tüm bağışçılarda WES'in tercih edilmeme sebebi, büyük ölçekteki/endüstriyel sürecin/üretimin kritiklerinden olan zamandan tasarruf etmek olmuştur (57).

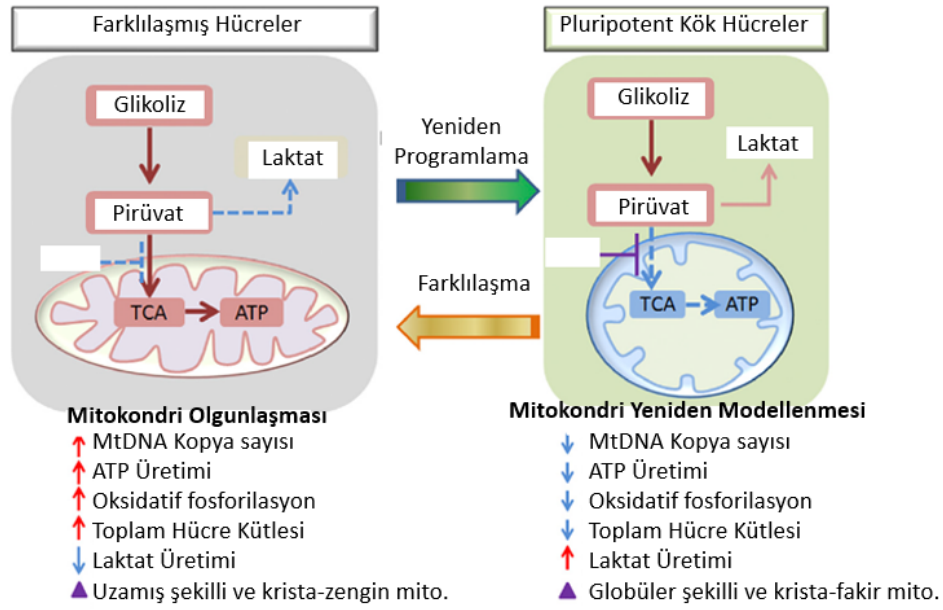
VIII. Dondurma/Çözme: İleri çalışmalarda kullanılmak üzere uPKH'ler sıvı nitrojende dondurularak saklanmaktadır (kriyoprezervasyon). Dondurulmuş olan uPKH'ler daha sonra uygun koşullarda çözülerek, amaca göre kültüre veya doğrudan deneye alınabilmektedir. Dondurma/çözme aşamasında hücrelerin farklılaşmadan kalması ve canlılığının korunması önemlidir. Bunun için hücre tipine uygun dondurma ajanlarının ve dondurma/çözme yöntemlerinin seçilmesi kritiktir ve seçilen yöntemin uygunluğu; hücre sayısı, canlılığı ve kalitesi (morfolojinin bozulmaması/farklılaşmaması) açısından test edilerek değerlendirilmektedir. Bu aşamaya yönelik farklı tipte ve oranlarda dondurarak saklama koruyucusu (kriyoprotektan) içeren sistemler/protokoller bulunmaktadır ve halen iyileştirmeye yönelik araştırmalar sürdürülmektedir. En çok tercih edilen soğuk-koruyucu olarak karşılaşılan, dimetil sülfoksit (DMSO)'tir. DMSO'ya maruz bırakılmış insan EKH'lerinin pluripotenz kapasitesinin azalması ve bu etkinin epigenetik değişiklikler üzerinden olduğunun gösterildiği çalışmanın üzerine, DMSO kullanım oranı ve alternatif kriyoprotektan arayışları daha çok önem kazanmıştır (117, 118). Dondurma besiyerine eklenmek üzere DMSO için önerilen oran, %10'dur. Hücrelerin klinikte kullanımına yönelik geliştirilen, İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practice, GMP) ile uyumlu ve hayvan kaynağı (kseno) içermeyen ticari ürünlerde de bu koruyucunun/oranın kullanıldığı görülmüştür (119). Sıvı azot içinde depolanan tüm hücre hatları, kriyoprezervasyondan sonra geri kazanım ve canlılık açısından değerlendirilmeli, tripan mavisi ve FACS (Floresans ile Aktif Olan Hücrelerin Sınıflandırılması) ile 0 ve 24 saat sonra canlılık testleri gerçekleştirilmelidir (108).

2.1.3. uPKH'lerde Enerji Metabolizması ve Mitokondriyal Parametreler

Biyobankalamaya yönelik optimize uPKH üretim ve karakterizasyon yöntemlerinin gerekliliği kaçınılmazdır (120). Yöntem esası olarak, hücrelerin mitokondriyal ve glikolitik yolak izlemleri ile enerji metabolizmalarına/metabolik özelliklerine göre ayırt edilmesinin/tanımlanmasının bilgi verici olacağı düşünülmektedir. Kök hücrelerin olgunluk durumlarına dönük metabolik özelliklerinin mitokondriyal parametreler üzerinden değerlendirilmesi son yıllarda daha çok önemsenmektedir (121). Mitokondriyal parametreler; morfolojik yapı, metabolik süreç bileşenleri (enzimler, moleküller) veya metabolik ürünler üzerinden değerlendirilebilmektedir.

Hücrelerde enerji yolları glikoliz veya mitokondri üzerinden ilerlemektedir. Glikoliz, hızlı çoğalan hücrelerin gereksinimlerini karşılamak üzere, ATP üretimi ile anabolik öncüler arasında bir denge sağlamaktadır (122). Kök hücrelerde enerji metabolizması olarak daha çok glikolizin baskın olduğu gösterilmiştir (123). Kök hücreler farklılaşmaya doğru gittikçe mitokondri devreye girmekte ve aerobik metabolizmaya geçiş olmaktadır. Böylece kök hücrenin farklılaşması sırasında belirgin metabolik/mitokondriyal durum değişiklikleri meydana gelmektedir. Şekil 2.5'te görüleceği gibi, glikoliz sonucu ortaya çıkan laktat artışı ile karakterize olan PKH'lerde mitokondriyal parametreler düşük seyretmektedir. Farklılaşmış hücrelerde mitokondrinin iç zarı olan kristanın dâhil olduğu oksidatif fosforilasyon süreci ile ATP üretiminde mitokondriyal parametreler yükselmektedir.

Kök hücrelerin sahip olduğu kendini yenileme ve çekirdek kök hücre özellikleri ile farklılaşmış hücre oluşumunun altında yatan ortak moleküler süreçlerin ifadesi olan köklülük (124) düzeylerinin tespitinde, hücrelerin enerji kaynağı seçiminin belirleyici rol oynadığı; farklılaşmaya başlamış hücrelerin daha çok mitokondriyal yolla enerji sağladığı, köklülük seviyesi yüksek olanların ise glikolitik yolağı tercih ettiği bildirilmiştir (125). Bu nedenle, uPKH özelliklerinin tespitinde mitokondriyal parametreler üzerinden yapılacak değerlendirmelerin güvenilir olacağı düşünülmüştür. Ancak halen mitokondriyal parametreler, uPKH üretimi ve bankacılığında kalite veya karakterizasyon açısından standart olarak kullanılan bir yöntem değildir.



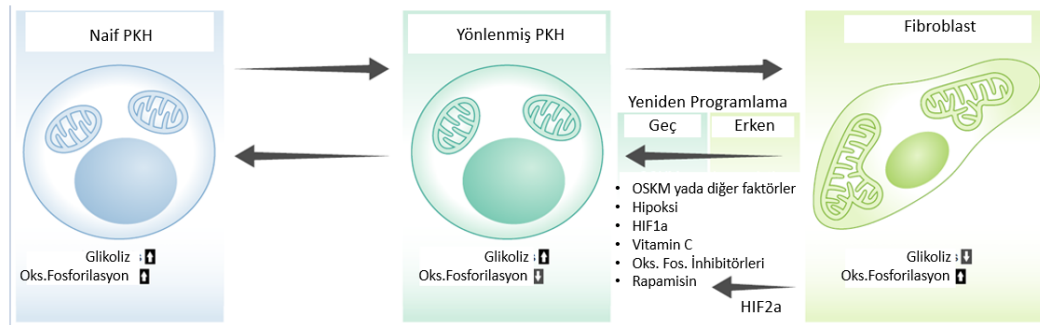
Şekil 2.5. Pluripotent ve farklılaşmış hücrelerdeki metabolik farklılıklar.

(Xu ve ark. (125)'ndan alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Somatik/farklılaşmış hücreler substratların, Trikarboksilik Asit (TCA) döngüsü ve Elektron Taşıma Sistemi (ETS) tarafından tamamen oksidasyonu yoluyla ATP'nin verimli bir şekilde üretilmesini destekleyen olgun mitokondrilere sahiptir. PKH'lerde ise mitokondriler primitif (az gelişmiş) haldedir (125). Pluripotent hücrelerin farklılaşması, oksidatif metabolizmayı desteklemek için mitokondriyal biyogenez ve olgunlaşmayı etkinleştirmekte ve anaerobikten aerobik metabolizmaya biyoenerjetik geçiş gerçekleşmektedir. TCA döngüsünün etkinleştirilmesiyle mitokondri sayısı, solunum zinciri yoğunluğu ve ATP üretimi artmaktadır. Morfolojik olarak, krista bakımından zengin olan mitokondri uzamaktadır (tübüler mitokondri).

YP sürecine alınan hücreler, buldukları ortamda karma bir popülasyon gösterirler. Programlanmayan, kısmen programlanan (intermediate/ara/kısmi) ve tam programlanan hücreler bir arada bulunmaktadır. "Tam" veya pluripotentlik belirteçleri ve epigenetik özellikleri bakımından gösterdiği değişikliklerle (126, 127) "kısmi (partially) programlanmış" olarak ifade edilen uPKH kolonilerinin metabolik durumları/metabolomu da birbirinden farklıdır (11). Belirgin TRA-1-60 ifadesi ile ayırt edilebilen tam programlanmış uPKH'lerin metabolik özellikleri EKH'lerle büyük ölçüde (yaklaşık %90) benzerlik göstermiş, kısmi programlanmış olanlarda ise bu oran

%74 bulunmuştur. Metabolomda farklı kümelenmeler tespit edilmiştir. Kısmi programlananlarda yüksek bulunan oksidatif fosforilasyonun yanısıra sitrik asit, 4-acetamidobutanoik asit artmış, tam programlananlar ise glikoliz yolağı (2-phosphoglyceric acid, 3-phosphoglyceric acid, fructose 1,6-diphosphate, 2,3-diphosphoglyceric acid, glucose 6-phosphate) ile ilişkili bulunmuştur. EKH'lerde glutasyon (glutathione), pridoksin (pyridoxine) artışı ve nikotinamid (NAD), gamma-aminobutyric acid (GABA), laktik asit, ayrıca tam programlanan uPKH'lerde NAD, GABA ve laktik asit metabolitleri saptanmıştır (11).



Şekil 2.6. Pluripotent durumda enerji metabolizması
(Teslaa ve ark. (128)'ndan alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

2015 yılında Teslaa ve arkadaşlarının (128) çalışmasında, pluripotent durum bölümlendirilmiş; “naif (naive)” ve “yönlendi (primed)” olarak isimlendirilerek enerji metabolizması açısından ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Buna göre, naif durumdaki en pluripotent/kök haldeki hücrelerde glikoliz ve oksidatif fosforilasyonun yüksek olduğu, farklılaşmaya doğru olan süreçte, yönlendi PKH'lerde ise glikoliz yine yüksekken, oksidatif fosforilasyonun düşük olduğu belirtilmiştir. Örneğin, fibroblastların yeniden programlandığı erken süreçte, hücrenin enerji profilinin fibroblastlara (kaynak hücreye), geç süreçte ise PKH'lere daha yakın olduğu anlaşılmaktadır. Farklılaşma ile artan oksidatif fosforilasyon ihtiyacını karşılamak üzere sayıca çoğalan mitokondriler ile birlikte hücre morfolojisi de özelleşmeye başlamaktadır.

Yeniden programlamada, somatik oksidatif biyoenerji süreci, anaerobik glikolitik yolağı dönüşmektedir. Somatik hücrelerden PKH'lere dönüşen (yeniden

programlanan) hücrelerde yüksek glikoz kullanımı sonucu laktat üretimi olmasıyla mitokondri regresyonu gerçekleşmektedir (125). Farklılaşmış hücrelerin fonksiyonel olarak olgunlaşmamış bir duruma geçmiş olduğu bu halde, temel olarak aerobikten anaerobik metabolizmaya geçiş olmaktadır. Mitokondri biyogenezinin baskılanmasıyla mitokondriyal gençleşmede (rejuvenasyon) azalma ve intraselüler ROS seviyelerinde düşme meydana geldiği gösterilmiştir. Yeniden programlamanın ardından, mitokondriyal morfoloji değişmekte ve mitokondriyal içerik azalmaktadır. Böylece glikolizdeki artış ile birlikte oksidatif fosforilasyon azalmakta ve ATP seviyesi düşmektedir. Ayrıca bu aşamada gerçekleşen metabolik yeniden şekillenmenin, pluripotentiğin bir sonucu olmadığı, mitokondriyal potansiyel ve glikolitik genlerin pluripotent gen ifadesinden önce tetiklendiği de bildirilmiştir (122).

2.1.4. Sorunlar ve Açık Alanlar

2012 yılında Nobel ödülü ile önemi vurgulanmış olan uPKH konusunda, Amerika ve Japonya'nın öncü olduğu, giderek artan sayıda yayın (129) ve patent (130) başvurusu bulunmaktadır. Bahsettiğimiz gelişmiş ülkelerde bu artış, gen tedavisi ilacı ya da gen tedavisi tıbbi ürünü kapsamında klinik uygulama çalışmalarına doğru yönelmeye başlamışken, halen kaynak hücre seçiminden, dondurma/çözmeye kadar her aşamayı ilgilendiren araştırmalar da sürdürülmektedir. Çünkü uPKH üretimi ile ilgili halen çözülmemiş sorunlar, iyileştirmeye açık noktalar bulunmaktadır.

Pluripotenti belirtiçlerinin ve hücre kültürü koşullarının tamamen tanımlanarak verimliliğinin artırılması, olası gelecek uygulamalar için oldukça önemlidir ve tüm aşamalardaki protokollerin standardizasyonu gereklidir. Diğer taraftan, uPKH'nin elde edildiği ilk çalışmalarda kullanılan viral vektörlerin mutajenik etki (insertional mutagenesis) gibi istenmeyen durumlar oluşturma potansiyeline sahip olduğu ve bu tür risklerden uzak, alternatif yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı da gözardı edilmemelidir. Pluripotenti mekanizmalarının bilinmesi, güvenli ve yeni hücre temelli tedavi süreci için rehber niteliğindedir. Süreç ne kadar iyi çözümlenirse o kadar iyi modellemeler/araştırmalar yapılabilecektir. uPKH'nin otolog kullanılabilme potansiyeli, yeni kişiselleştirilmiş yaklaşımların ve her bireyin kendisi için geliştirilebilecek hücre modeli olma ayrıcalığı açısından hayvan deneylerine olan

gereksinimi de hafifletmeye, belki de tamamen ortadan kaldırmaya aday olarak gösterimin (131) temelini oluşturmaktadır.

Seçilen başlangıç hücresinin yeniden programlanma oranı, “uPKH eldesinin verimi/programlanma etkinliği” olarak ifade edilmektedir ve bu oran halen çok düşüktür (95, 132). Başlangıç hücresine embriyonik genlerin transferi ve kolonilerin eldesinde verimin düşük olması, maliyet ve iş gücü gereksiniminin yüksek olması ile elde etme sürecinin uzun olması, araştırmaları zorlaştırmakta ve aynı kalitede çok miktarda/devamlı hücre eldesine giden yolda engel teşkil etmektedir (133). Diğer taraftan hücrelerin fazla müdahaleye (manipulasyona) maruz kalması ve/veya viral yöntemlerin kullanılması sonucu oluşan onkojenik/tümörojenik transformasyonlar da uPKH ile ilgili süreçlerdeki temel sorunlardandır (134).

Kliniğe yönelik düşünüldüğünde, hastanın kendi hücrelerinden üretilen uPKH'lerin kullanılmasının, nakledilen hücelere karşı bağışıklığın yeniden etkinleşmesini (reaktivite) önlemek için bir strateji olabileceği gibi bu tür yapay bir YP işleminin (uygulanan işlemler nedeni ile elde edilen hücre; genetik yapısı değişmiş bir ürün olup, gen tedavisi ilacı ya da gen tedavisi tıbbi ürünü ve biyolojik ilaç olarak kabul edildiğinden), uPKH'lerin immünolojik durumunu ne ölçüde değiştirebileceği ve alıcının bağışıklık sistemi tarafından red (immünorejeksiyon) tepkisi için ne gibi sonuçlar yaratabileceği tartışılmaktadır. Bu nedenle, genetik yapısı değiştirilerek üretilen hücresel ürünün (uPKH) iyi karakterize edilmesi, YP sürecindeki potansiyel tümör genlerinin (cMyc gibi), pluripotenz görevini tamamladıktan sonra intihar genleri ile transfeksiyon veya kök hücre öldürücü ajanlar aracılığıyla üstesinden gelinmesi önerilmektedir (113). Zhong ve arkadaşları (135) tarafından oluşturulan modelde, daha önce geliştirilmiş olan primat uPKH'lerinin transplantasyon sonrası teratoma başlatan veya onkojenik dönüşüme uğramış klonları ortadan kaldırmak için iki intihar geni/ilac sistemi (YCD/5-FC ve iCaspase/AP20187) hem *in vitro* hem de *in vivo* olmak üzere değerlendirilmiş ve sonuçlar, klinik kullanıma yönelik uPKH teknolojisinin güvenliğini sağlama yönünde faydalı bulunmuştur.

Yeniden programlamada virüs gibi enfekte edici yapıların ve cMyc gibi onkogen özellikle faktörlerin kullanılıyor olması, uPKH alanındaki temel

sorunlardandır. Programlama yöntemi açısından düşünüldüğünde, retrovirüs ile çalışma, insanda tedavi uygulamalarına yönelik uPKH'lerin kullanımında ciddi engel teşkil etmektedir. Pluripotential genlerinin iletimi için geçici gen ifade vektörlerinin kullanılması, protein transdüksiyonu ile YP faktörlerinin tanıtılması ve nihayetinde endojen pluripotential düzenleyicilerinin küçük moleküller tarafından aktive edilmesi, klinik kullanım için genetik olarak değiştirilmemiş uPKH'lerin üretilmesini sağlayacaktır. Gen aktarımı olmadan yeniden programlamayı başarmak için, bu sürecin moleküler yollarını anlamak oldukça önemlidir.

YP sürecinin etkinliğinin iyileştirilmesi ve rejeneratif tıp için uPKH'lerin uygulanması amacıyla güvenilir farklılaşma protokollerinin geliştirilmesi de açık alanlardan biridir. Dr. Yamanaka'nın ilk çalışmasında, farenin kuyruk ucundan elde edilmiş fibroblastlar ve embriyonik kök hücreler retrovirüs ile uyarılmış ve Oct4, Sox2, Klf4 ve cMyc ile uyarımdan yaklaşık 30 gün sonra on binde 2 (%0,02) etkinlikle uPKH'ler elde edilmiştir. Bir başka araştırma grubu da yine aynı faktörlerle fetal fibroblastları yeniden programlayarak 14 gün sonunda binde 1 (%0,1) başarıya ulaşmış ancak aynı faktör kokteyli ile erişkin fibroblastlar programlanamamıştır (86). YP kokteyline hTERT ve SV40 büyük T antijeni eklendiğinde ise erişkin fibroblastlarda yaklaşık on binde 25 (% 0,25) başarı elde edilmiştir. Lentivirüs kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, fetal akciğer fibroblastlarına ve yeni doğan sünnet derisi fibroblastlarına Oct4, Sox2, Nanog ve Lin28 aktarılmış ve 20 gün sonra fetal fibroblastlarda on binde 3-5 (%0,03-0,05), yenidoğan fibroblastlarında on binde 1 (%0,01) etkinlikle uPKH'ler elde edilmiştir (95).

2012 yılında, hem i-EKH'lerin hem de i-uPKH'lerin kültürü ve çoğaltılmasındaki zorluk sebepleri (60) şu şekilde sıralanmıştır:

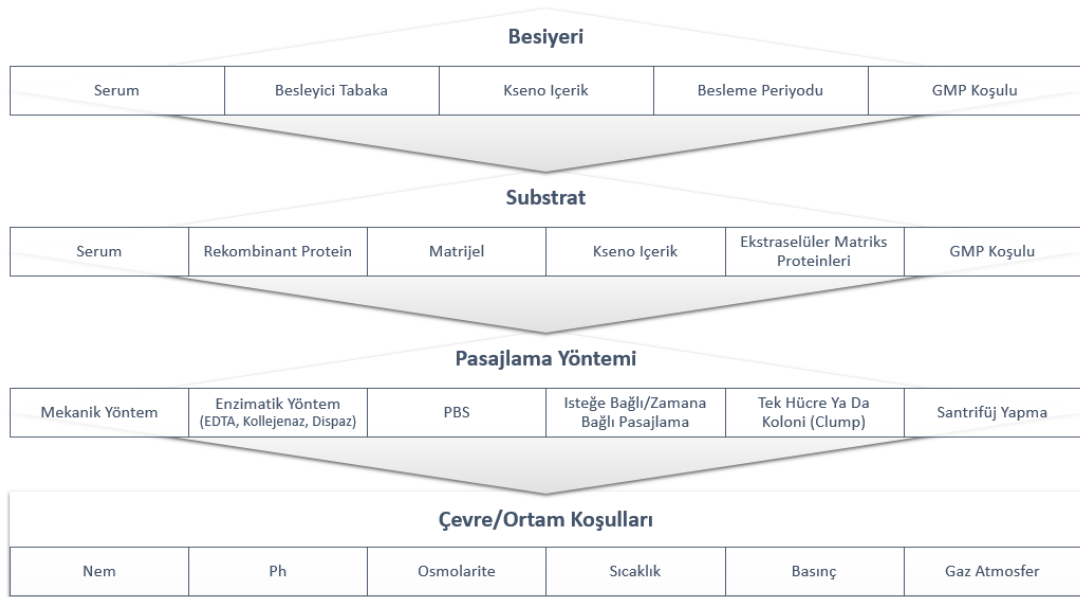
- Genellikle kültürlenmesi zor, koloniler halinde büyümeleri,
- Kolonileri sürdürmek için kullanılan en yaygın yöntemin, küçük koloniden mini kesme (mikrodisseksiyon) yöntemi olması,
- Farklılaşmamış hücrelerin korunmasında rol oynayan kritik faktörlerin (örneğin, besleyici hücreler, ortam, serum replasmanı, büyüme faktörleri) henüz tam olarak anlaşılmamış olması,

- Standart kültür koşullarında farklılaşmanın ortaya çıkması ve bunu tetikleyen koşulların henüz tam olarak kontrol edilemiyor olması.
- Genomik kararsızlığa eğilimli olan i-PKH'ler için büyük ölçekli kültür sistemlerinin temel yöntemlerinden olan pasajlama aşamasının halen iyileştirmeye açık olması. Basitleştirilmiş kültür koşulları, büyük ölçekli ilaç taraması ve tıbbi uygulamalar için oldukça önemlidir.

2012 yılında Diaferia ve arkadaşları uPKH'leri tekrarlanabilir bir şekilde üretmek için hedef hücre tipi seçimi, hücreleri yeniden programlamak için kullanılan faktörlerin seçimi, faktörleri aktarma yönteminin seçimi, zamanlama ve doz/miktar gibi faktör ifade parametreleri, kültür koşulları, tanımlama yöntemleri ve yeniden programlanmış hücrelerin karakterizasyonu gibi seçimli aşamaların kritik olduğu üzerinde durmuşlardır (108).

Kritik değişkenlere bağımlı yaşanan sorunlar doğrultusunda uPKH'lerin üretim aşamalarına yönelik iyileştirme çalışmaları sürdürülmektedir (85). Çok adımlı ve hemen her adımı değişkenli olmasından dolayı zorlu bir süreç olan uPKH üretim aşamalarının benzer sadeleştirmelere/iyileştirmelere ihtiyacı olduğu, araştırma sonuçlarıyla desteklenmektedir. Örneğin, hücrelerin pasajlanması sürecinde enzim kullanımı, kromozomal anormalliklere neden olduğuna dair edinilen bulgulardan (136) dolayı üzerinde durulması gereken diğer konulardan biri olarak vurgulanmıştır (85). EKH'ler ile yapılan kaynak çalışmada, 45 pasaja kadar kültür edilen hücrelere paralel olarak mekanik ve enzimatik pasajlama uygulanmış ve takip sonrası her iki durumda da genetik değişiklikler olduğu (137), ancak hücreler yaşlandıkça görülen kromozomal değişikliklerin, hücrenin biyolojik özelliklerini her zaman etkilemeyebileceği de gösterilmiştir (138).

Kültür sistemleri ile ilgili dünyadaki eğilime bakıldığında, tek hücre pasajlama yeni bir uygulama olarak görülmektedir. uPKH'ler için bu üretim şeklinin kolay ve müdahaleye (manipulasyona) izin veriyor olması, avantaj olarak görülmektedir. Ancak, hücreler bireyselleştirildiğinde, PKH'lerin klon oluşturma etkinliğinin oldukça düşük olduğu, uzun dönem kararlılığı göstermediklerine dair bulgular vardır (139). Emin olmak için hücrelerin karyotipinin takibi önerilmektedir.



Şekil 2.7. Kültür sisteminin bileşenleri ve karar parametreleri.

Özetle, kültür sistemi, besiyerinden/substrattan daha önemlidir. uPKH'ler için hâlihazırda standart bir kültür sistemi yoktur. İdeal kültür sistemi, durum/proje bağımlıdır. Uzun dönem kararlılık birçok parametreden etkilenmektedir, bu nedenle kültür sistemleri iyi değerlendirilmelidir. uPKH için bir kalite kontrol testi düşünürken/önerirken öncelikli olarak uPKH'nin tümör geliştirme riskinin değerlendirilmesi temel alınmalıdır.

i-PKH kültür yöntemleri ile ilgili gelişmeler devam ederken, daha ileri ve ciddi bir adım olan klinik süreç için de ayrıca düşünmek gerekmektedir. Kliniğe geçişten önce çözülmesi gereken sorunları da belirtmekte fayda vardır:

- Dondurma/çözme sonrası verim düşüklüğü (140).
- Üretim aşamalarına yönelik standardize edilmiş protokollerin eksikliği ve üretim sürecinde verim düşüklüğü (141).
- Optimal olmayan büyüme koşulları ve hücre işlenmesi sırasında, apoptotik hücrelerin ve kendiliğinden farklılaşma sinyalleri ile tetiklenen (indüklenen) hücrelerin stresini/davranışını izlemek üzere etkili analizlerin olmaması (141).
- Aynı kaynak hücreden elde edilen klonların heterojenliği (142, 143).
- Kromozomal anormalliklere bağlı genomik kararsızlık (instabilite) (144).
- Potansiyel tümör oluşumu (145, 146).

- Bağışıklık reddi (immünolojik red) (147)
- Tedavide kullanılacak hücresel ürünler için kalite kriterlerinin belirlenmesi (147)
- Farklılaştırılan uPKH'lerden farklılaşmamışların ayrıştırılması (Fenotipik heterojenite) (147)

Bu sorunlara çözümler üretme yönünde araştırmalar sürdürülürken, özellikle Japonya klinik uygulamalar alanında hızla ilerlemeye devam etmektedir. Azuma ve Yamanaka (148), 2016 yılında uPKH bazlı rejeneratif tedavilerin klinik uygulamasını destekleyen güncel politikaları referans dokümanları ile birlikte derleyerek sunmuşlardır.

İlk hücrelerinin 2006'da keşfedilmiş olduğu düşünüldüğünde uPKH teknolojisi, bilim dünyası için halen yeni olarak kabul edilmektedir. Bir taraftan dünya çapında yüzlerce araştırmacı uPKH hattı oluşturmakta, diğer taraftan, pluripotentliği ve güvenliği konusundaki kaygılardan (149) dolayı, halen işlem basamaklarındaki parametrelere yeni alternatifler sunulmaya devam edilmektedir ve optimizasyon/standardizasyon çalışmaları da tamamlanmış değildir. Dolayısıyla, çok fazla değişkenin bulunduğu bu alanda, kaçınılmaz heterojenlik sonucu üretilen hücre hatlarının kalitesi konusunda endişeler vardır. Araştırmacıların ihtiyaçlarına yönelik doğru hücreleri kullanmalarını sağlamak için yeterli veri mevcut olmadığından, bazılarının pluripotent bile olmayabileceği (istendiği durumda/amaca yönelik) akla gelmektedir. Bu tür hücrelerin çalışmalarda kullanılması hatalı verilerin üretilmesi anlamına gelecektir. Böylece projeler ve yayınlar arasındaki standardizasyon zorlaşarak bu alandaki bilimsel ilerleme ile birlikte kliniğe geçiş süreci de ertelenmiş olacaktır. Bu çalışmalarda kaybedilen zaman ve kaynaklar detaylıca düşünüldüğünde, böylesi dinamik bir alanda kabul edilebilir kalitenin etkin ve verimli bir şekilde araştırılması ile kullanılan hücre hatlarının doğru kimlik ve özelliklerde olmasını sağlamanın taşıdığı kritik önem daha net olarak ortaya konulmaktadır ve böylesi sorunları gidermenin güvenilir yolu, biyobankalama olarak görülmektedir.

Bahsedilen tüm teknik zorluklara ek olarak, uPKH alanında bazı etik endişeler de bulunmaktadır. uPKH teknolojisi teorik olarak herhangi bir somatik hücrenin bir bireyi klonlama potansiyelini barındırmaktadır. Bu nedenle, bu hücrelerin üretilmesi

ve kullanılmasıyla ilgili yapılacak düzenlemeler, bu teknolojinin yanlış kullanılmasını önlemeye yardımcı olacaktır. Tüm zorluk ve kaygılara rağmen, somatik bir hücrenin yeniden programlanması, yeni bir çağ başlatma potansiyelini koruduğundan, açık alanların geliştirilmesi, zorlukların aşılması gerekmektedir (27).

2.2. Biyobankacılık

14 ulusal ve uluslararası yönerge ve standardın (OECD, ISBER, NCI, Biobank Quality Standard (UK), NF S96-900standard (Fr), Molecular Medicine Ireland (MMI) (Ir), Brazilian Standard, Tissue/cells regulation (UK), ISO 15189, ISO 17025, ISO Guide 34, ISO 17020, ISO 27799, ISO 13485) özeti niteliğinde (150) Kasım 2018’de yayımlanan ISO 20387’de tanımlandığı haliyle biyobankalama; “tanımlanmış biyolojik materyalin yanı sıra ilgili bilgi ve verilerin toplanması, hazırlanması, korunması, test ve analiz edilmesi, dağıtılması ile ilgili faaliyetlerin bir kısmı veya tamamı ile birlikte satın alma ve depolama süreçleri”ni ifade etmektedir. Biyobanka, biyolojik insan materyalinin (doku, hücre, DNA) ve ilişkili bilginin etik konular (onam, veri güvenliği gibi) çerçevesinde programlı olarak depolandığı sistemdir ve insan sağlığı ile ilgili konularda biyoloji, tıp, biyoinformatik, hesaplama ve modelleme yaklaşımlarının tamamını kapsayan çok disiplinli bir özgünlüğe sahiptir. Son asırda, biyolojik örnek toplama, küçük koleksiyonlardan ulusal, uluslararası büyük koleksiyonlara doğru genişleme eğilimindedir. Toplanan örnekler, popülasyon, hastalık/nadir hastalık temelli olabilmektedir. Bu da, biyobankaların amaca göre tanı, ilaç araştırma-geliştirme ve hatta tedavi yönünde profil oluşturmasının esasını teşkil etmektedir (151).

Çok sayıda ve yüksek standartlarda üretimin amaçlandığı biyobanka sisteminde bağışçı tipi, veri/örnek toplanması, elde edilmesi ya da test edilmesi aşamaları için standart bir prosedürün kabul edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, biyomedikal araştırmalarda karşılaşılan tekrarlanamayan sonuçlar, bilim dünyası için büyük bir tehdit olarak kabul edilmekte ve özel ve kamu yatırımlarında önemli kayıplara neden olmaktadır. Güvenilir olmayan sonuçların elde edilmesine büyük ölçüde, zayıf biyolojik reaktiflerin ve referans materyallerin neden olduğu belirtilmektedir (152). Bu malzemelerin kalitesinin düşük olması çoğu zaman yanlış

veya standartlaştırılmamış analitik öncesi (pre-analitik) prosedürlerden kaynaklanmaktadır (153). Sunulan hücre hatlarında bile önemli sorunlar ile karşılaşılabilir. Literatürde, belirtilen kökenine uymayan (yanlış tanımlanmış) veya hücrelerarası kontaminasyona sahip hücre hatlarını tanımlayan çok sayıda veri olduğundan bahsedilmektedir (154). Uluslararası Hücre Hattı Kimlik Doğrulama Komitesi (International Cell Line Authentication Committee, ICLAC) tarafından sunulan veritabanında, hâlihazırda 529 hücre hattı kayıtlıdır; yanlış tanımlanmış, asıl (orijinal) vericisiyle uyuşmayan ve kontamine hücre hatlarının bilgisine ulaşılabilir (155).

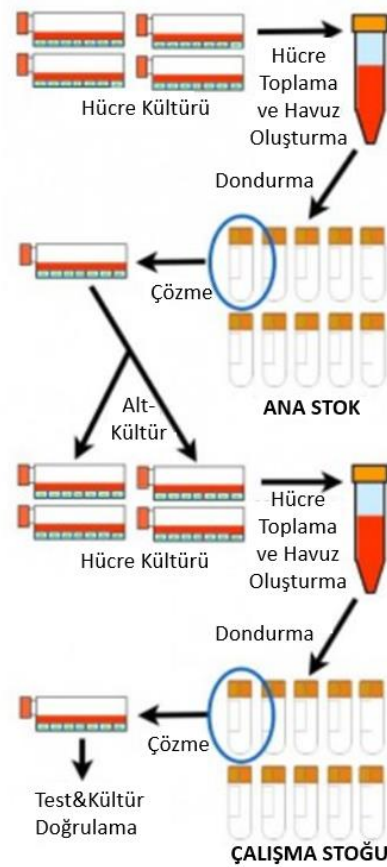
İyi tanımlanmış ve kalite kontrol gereklerini yerine getiren hücre bankalarının kurulması, araştırma çalışmalarının tekrarlanabilirliğini ve standartlaştırılmasını sağlamaktadır. Standardize edilebilmiş hücre kültürü süreçleri ile yüksek kaliteli araştırma ve geliştirme çalışmaları mümkün olmaktadır (154). Kaliteli biyolojik örnek sağlama amacı ile giderek artan sayıda profesyonel biyobanka oluşumları görülmektedir. Avrupa düzeyinde, bu biyobankalar, Biyobankalar ve Biyomoleküler Kaynaklar Araştırma Altyapısı - Avrupa Araştırma Altyapısı Konsorsiyumu (Biobanks and Biomolecular Resources Research Infrastructure - European Research Infrastructure Consortium, BBMRI-ERIC) ve ulusal birimleri tarafından desteklenmektedir (156).

Büyük çaplı/endüstriyel hücre depolama sisteminde banka, temelde 2 grup hücre havuzundan oluşmaktadır (157, 158). Bankalama için seçilen ve “tohum stoğu” olarak ifade edilen hücrelerden öncelikle “Ana Hücre Bankası (AHB)” (*Master Cell Bank, MCB*: tek bir kaynaktan belirli kültür koşullarında hazırlanmış hücrelerin depolanmasını ifade eder) oluşturulur ve bu örnekler belli bir üretim koşulu veya deneme süresi boyunca yeni kültürleri başlatmak ve büyük “Çalışan Hücre Bankası (ÇHB)” (*Working Cell Bank, WCB*: Bir ya da daha fazla vericinin ana hücre bankasından seri alt kültürleme (pasajlama) ile elde edilmiş hücrelerin depolanmasını ifade eder) üretmek için kullanılır. AHB ve ÇHB sisteminin hem araştırma dünyası hem de endüstri için uzun vadeli yüksek kaliteli hücre tedariki sağlamada kilit öneme sahip olduğu ve herhangi bir kök hücre kültürü laboratuvarı için en iyi uygulama olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmektedir (85, 159).

1998 yılında Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation, ICH) tarafından yayımlanmış olan rehber (157) göre AHB, seçilen bir hücre klonundan tanımlanmış koşullar altında hazırlanarak çoklu kaplara (vial) dağıtılmış ve tanımlanmış koşullar altında depolanan bir hücre havuzudur ve bu hücreler tüm çalışma bankası hücrelerini üretmek için kullanılır. 2008 yılında, 17 farklı ülkeden hücre bankası araştırmacılarının katıldığı toplantıda, aynı hücre hatlarını kullanarak farklı laboratuvarlar tarafından üretilen verilerin karşılaştırılabilir ve tekrarlanabilir olması ile tutarlılığın sağlanması gerekliliğinden yola çıkılmış ve tohum stoğu olan ana hücrenin kalitesini sağlamanın önemi üzerinde durulmuştur (160). Biyobankalama sürecinde ÇHB, AHB'nin kültür edilmesiyle homojen bir hücre süspansiyonu (aliquot) olarak elde edilir. Bu kademeli hücre bankalama sistemi ile aynı kültürlerin tekrarlanabilir ve güvenilir bir şekilde uzun yıllar tedarik edilmesi sağlanabilecektir (154).

Biyobanka, siyasetçiler, akademisyenler, fon veren kurumlar ve halk dâhil diğer sosyal/toplumsal tüm aktörleri ilgilendiren ahlaki, finansal, bilimsel, ekonomik, sosyal ve kültürel boyutları olan oldukça kapsamlı bir konudur ve ayrı bir değer kaynağıdır. Öyle ki, biyobanka ile hayatımıza giren ekonomi temelli yeni kavramlar bunun göstergesidir. Biyoekonomi başta olmak üzere, “biyokar/biyokazanç (biyokapital) ve biyodeğer” gibi teorik kavramların kullanımı giderek artmaktadır. Avrupa’da ve dünyada gerek proje çağrıları gerekse altyapı/kurulum için ayrılan bütçelerle, ilgili çalışmalar desteklenmeye devam etmektedir. 2009 yılında Time Dergisi’nin, “dünyayı değiştiren en iyi 10 fikirden biri” olarak biyobankaları vurgulamasının ardından (161), 2015 yılında Avrupa Komisyonu (European Commission, EC), Ortak Araştırma Merkezi (Joint Research Centre, JRC), “Avrupa’da Uyum ve Ağ oluşturma Açısından Biyobanka” (Biobanks in Europe: Prospects for Harmonisation and Networking) başlıklı bilimsel ve teknik raporu (162) yayımlamıştır. 2 yıl sonra, “Uluslararası Biyobanka Araştırmalarının Etik ve Düzenleyici Sorunlarıyla Başa Çıkma: Avrupa için Biobanka, Yönetişimi (Dealing with Ethical and Regulatory Challenges of International Biobanks Research: Biobanks for Europe, A challenge for governance)” başlıklı yayın hazırlanmıştır. Dokümanda, biyobankaların, biyolojik materyallerin yanında epidemiyolojik veriyi de depoladığı, durağan (statik) değil, sürekli ve uzun dönem (sürdürülebilir) temelli projeler olduğu,

güncel ve ileri araştırmalar ile ilişkili olabileceği, donör gizliliği için kodlama ve anonimizasyon gerekliliği, yönetim yapısı ile prosedürlerin, paydaşların ilgisini ve donör haklarını korumak üzere hazırlandığı belirtilmektedir (151).



Şekil 2.8. Biyobankacılıkta ana ve çalışan hücre banka sistemi ((163)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir).

Dünya çapında pek çok laboratuvar bilimsel topluma kök hücre hatları sağladığından, tutarlı standartlar oluşturmak ve kök hücre hatlarının küresel dolaşımına yardımcı olmak için, dağıtıcıların arasındaki uygulamaların uyumlaştırılmasının/standartlaştırılmasının araştırılması üzerinde durulmaktadır. Bilimsel araştırma veya klinik kullanıma yönelik depolama yapabilen biyobankalar (araştırma amaçlı biyobankacılık veya klinik amaçlı biyobankacılık) kaynaklı çalışmalarda örneklerin sonuçlarının etkisini ve güvenilirliğini arttırmak üzere, kalite güvencesine sahip biyolojik örneklerin hazırlanması ve depolanması önemlidir ve biyobankacılıkta bunu sağlamanın yolu, kalite yönetim sistemidir. Kalite yönetim sisteminin oluşturulması, bireysel olarak yürütülen işlemlerin genel kabul görmüş

hükümlerle uyumlu hale getirilmesi gerektiği anlamına gelmektedir. Bu açıdan bakıldığında, biyobanka hem bir işletme hem de bilimsel bir başarımlar olarak değerlendirilebilir. Bir işletmede kalite yönetim sistemi (KYS), hatasız uygulamalar yapıldığını garanti etmez ancak hataların tespitini sağlayarak bu hataların yeniden oluşmalarını önlemek için iyi bir araçtır. Uygulamaya yönelik yaklaşımlar, yerel durumlara/düzenlemelere ve uygulamalara göre değişebilmektedir (156).

2.2.1. Biyobankacılıkta Kalite Yönetim Sistemi

Banka kelimesinin özünde “değer” kavramı bulunmaktadır. Değer, oldukça genel bir kavramdır ve hangi nesneden sonra gelirse onun kıymetini, ederini, kalitesini ifade etmektedir. Biyobanka denildiğinde kastedilen “biyolojik değer”, tüm biyolojik materyallere göre özelleştirilebilmektedir; doku bankası, göz bankası, hücre bankası, uPKH bankası... gibi. Kıymeti belirleyen parametreler arasında standardizasyon, en kritik bileşenlerdendir. Genel anlamda bankalar, yatırılan verilerle değer kazanmaktadır ve verinin kalitesi ile değer katlanmaktadır (57). Hücre bankalarında başlangıçta, bir hücrenin aslında seçilen hücre olduğunu, herhangi bir kontaminasyondan arındırılmış olduğunu teyit etmek için bazı basit standart ölçütler uygulanmalıdır ve benzersiz kimliğinin doğrulanabilir olduğu gösterilmelidir. Bu tür değerlendirmeler, klinik öncesi araştırmalar aşamasında önemli bir yere sahip olan bankalama sürecinin her adımında net olarak belirlenerek gerçekleştirilmelidir. Bu değerlendirmelerin sistematik bir şekilde gerçekleştirilmesi KYS ile sağlanabilmektedir (164).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde her yıl, 28 milyar dolardan az olmayan bir miktarın yalnızca yeniden üretilmeyen veya sonuçları tekrarlanamayan klinik öncesi araştırmalara harcadığı tahmin edilmektedir (165). Bu, yalnızca temel yatırım ve kaynak kaybı değil, aynı zamanda, klinik uygulamalar ve tedavilere giden yolda güçlü durdurucu etkiye sahip bir engel olarak değerlendirilmektedir. Klinik öncesi (pre-klinik) araştırmalarda net kalite standartlarının uygulanması ile kayıp olan milyon dolarların kurtarılabilmesi tahmin edilmektedir. Klinik öncesi araştırma düzeneklerinin ilk basamağında yer alan biyobankalarda kalite standartlarının/kalite güvence ve yönetim sisteminin uygulanması birincil öneme sahiptir. Biyoteknoloji

şirketlerinin değerini yaratan, hücrelerin ve dokuların değerinden ziyade, şirketlerin doku ve hücrelerinin kıymetlerini etkileyebilecek parametreleri değerlendirme şeklidir ve bu değerlendirme şeklinin belirleyicisi de KYS'dir.

KYS, tutarlı işlemler sağlamak için standart uygulama prosedürleri (SUP)/yöntemleri (SUY) (Standart Operating Procedures, SOP) gibi işletme prosedürleriyle kalite ve kontrolü içeren bir yönetim aracıdır (166). KYS işletmelerde, uyumluluğu sağlamak, kullanıcı/yararlanıcı memnuniyetini arttırmak; organizasyonel etkinliği ve takip edilebilirliği sağlayan kalite rehberi, kalite sistemi prosedürleri, çalışma prosedürleri, SOP'ler, denetim prosedürleri, kayıtlar ve formlardan oluşan tüm dokümantasyonu ve organizasyonel kültürü geliştirmek amacıyla uygulanmaktadır.

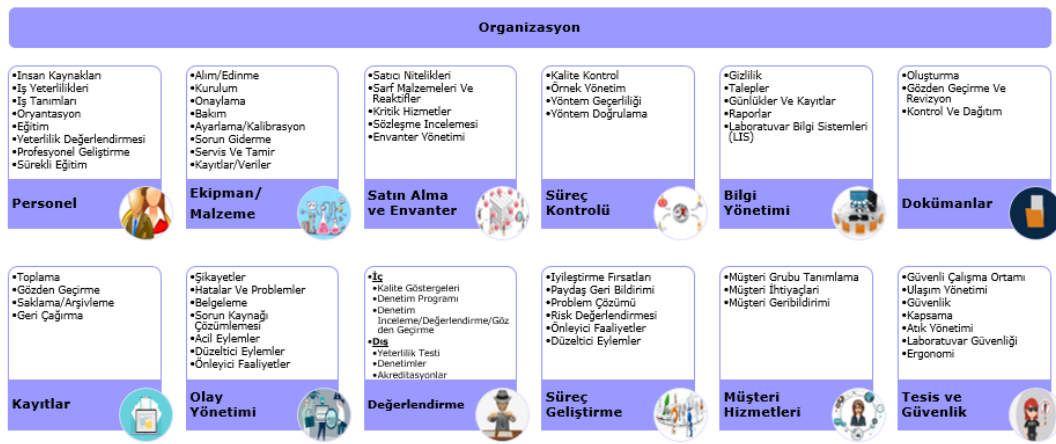
Kalite kontrol ve kalite güvencesi, KYS'yi oluşturan 2 temel koşuldur. Kalite kontrol, ürüne odaklanır ve kalite problemlerinin tespit edilmesine yönelik, özgü testlerden oluşmaktadır. Kalite güvencesi ise ürünün elde edildiği süreç bazlıdır, kalite problemlerinin önlenmesine yöneliktir ve süreçlerin tüm yönlerinin sistematik olarak izlenmesini ve değerlendirilmesini gerektirmektedir (167).

KYS kapsamında, kaynak olarak dikkate alınacak kural çerçeveleri/düzenleyiciler önemlidir. Bu kaynakların sunucuları ve bu doğrultuda etki/uygulama dereceleri farklılık göstermektedir. KYS için düzenleyici kaynaklar etki düzeylerine göre aşağıda listelenmiştir (168).

- Mevzuat: Yönetim (devlet/hükümet) tarafından belirlenen, yerel zorunluluk içeren düzenleyicilerdir.
- Politika: Yüksek seviye organizasyonel kuralları içermektedir.
- Standartlar: Alana özel tanınmış/bilinen oluşumlar tarafından hazırlanan rehberlerdir. Standartlar, dünyanın ortak dilidir ve küresel bağlantıyı geliştiren araçlardır. Zorunluluk içermemekte ancak tüm dünyada karşılıklı kabul edilebilirlik özelliği ile üstünlük sağlamaktadır. Yüksek fikir birliği ve şeffaflığa sahiptir. Uygulanması oldukça zorlu ve pahalı olabilmektedir.
- Yöntemler (Prosedürler): Mevzuata, politikaya uymak için eylemlerin, süreçlerin ve sorumlulukların sıralandığı kurallardır.

- Rehberler: Alanın söz sahipleri tarafından hazırlanan en iyi uygulama düzenlemeleri/önerileridir.
- Yerel dokümanlar: Talimatların adım adım nasıl yapılacağını anlatıldığı kaynakları ifade etmektedir.

Biyobankalar için KYS gereksinimleri oldukça kapsamlı ve karmaşıktır; yapısal bileşenler, etik ve yasal çerçeveler, kalite yönetimi ve kalite kontrol için uygun yöntemleri içermektedir. Biyolojik örnek depoları olarak da ifade edilebilen biyobankalar için de kullanıma uygun, kalite gerekliliklerini sağlamak üzere geliştirilmiş standartlar, yönergeler ve araçlar bulunmaktadır ve bu rehberlerde KYS'nin öğeleri tanımlanmaya çalışılmıştır (61). Kapsadığı konular ile Şekil 2.9'da, detaylandırılan KYS'nin temel bileşenleri, personel, ekipman/malzeme, satın alma/envanter, süreç kontrolü, bilgi yönetimi, dokümanlar, kayıtlar, olay yönetimi, değerlendirme, süreç geliştirme, müşteri hizmetleri, tesis ve güvenlik olarak sıralanmaktadır (169).



Şekil 2.9. KYS'nin temel bileşenleri ve kapsamı.

Biyobankacılık Alanındaki Standartlar, Rehberler ve En İyi Uygulama Prosedürleri

Gelecekteki çalışmalarını kolaylaştırmak ve araştırma bulguları ile çeşitli değerlendirmelerden elde edilen güçlü veri setleri sunmak için biyolojik örnekler arasında uyum sağlanması önemlidir. Bu örneklerin deneylerde kullanılmadan önce kültürlerini başlatmak için kabul edilebilirlik ve eşik değerlerinin tanımlanması doğru

olacaktır. Kastedilen kalite standartları, test değerlendirmelerinde geçerli olan bağımsız çalışmaların kabul kriterlerini tanımlayacak olmasından dolayı ve ayrıca laboratuvarların içinde ve arasında değişkenliğin azalmasına katkıda bulunacağından kıymetlidir (60). Kalite standartlarının belirlenmesi gereksinimi, biyobankalar gibi referans merkezler açısından ayrıca önemlidir. Örneğin, kök hücre hattı bazlı toksisite testleri için kalite standartlarının belirlenmesi, Avrupa Alternatif Yöntemlerin Validasyonu Merkezi (ECVAM, European Center for the Validation of Alternative Methods)'nin ön-onaylama kriterlerine uymak için zorunludur (170).

Dünyada en çok kabul gören standartların, Uluslararası Standartlar Teşkilatı (International Organization for Standardization, ISO) ve Avrupa Standartlar Komitesi (European Committee for Standardization, CEN) gibi kuruluşlar tarafından oluşturulduğu bilinmektedir. ISO, 1947'de kurulmuş ve 161 ülkeden ulusal standart kuruluşlarının katılımıyla, uluslararası ticareti arttırmak, tedarikçi ve müşteri arasındaki güveni oluşturmak amacıyla faaliyetlerini sürdürmektedir. ISO standartları, teknik gereksinimleri içermekte ancak bu gereksinimlerin nasıl karşılanması gerektiği konusunda herhangi bir zorunluluk barındırmamaktadır. En iyi uygulama kılavuzları, bu tür gereklilikleri gerçekleştirmenin en iyi yolları hakkında ayrıntılı bilgi vermektedir. Herhangi bir organizasyonun, neden alternatif bir yaklaşım kullandığını uygun bir şekilde gerekçelendirebiliyor olması, belgelendirme veya akreditasyon isteyen kuruluşlar için yeterlidir. Böylece en iyi uygulama kılavuzları da zorunluluk içermemektedir. Teknik spesifikasyonlar/şartnameler (ISO/TS), teknik raporlar (ISO/TR), kamuya açık şartnameler (ISO/PAS), Uluslararası Çalıştay Anlaşmaları (IWA) ve rehberler, ISO standartlarının besleyici dokümanlarıdır (164, 171).

Daha önce biyolojik kaynak merkezlerine özgü standart önerisinde bulunmak üzere çalışmalar yapılmış olsa da (172), biyobanka özelinde atfedilmiş ilk standart, "ISO/FDIS 20387 Biyoteknoloji-Biyobankalama-Biyobankalama için Genel Gereklilikler" (173), henüz 2018 yılı içerisinde ISO güvencesiyle yayımlanmıştır. Bu standart, gıda ve tedavi amaçlı kullanılacak biyolojik materyaller için uygulanabilir değildir; yalnızca araştırma amaçlı biyobankalama için uygundur. ISO/FDIS 20387'ye kadar biyobankalarda kullanılmakta olan genel ISO standartları 3 grupta toplanabilir: i) ISO 9000 - Kalite Yönetim Sistemi Standartları: Tipine, büyüklüğüne ve ürün

cinsine bakılmaksızın tüm kuruluşlar için uygulanabilir nitelikte hazırlanmıştır. Ürünler ve hizmetler açısından müşterinin gereksinimlerinin kesintisiz karşılandığının ve kalitesinin sürekli iyileştirildiğinin bir teminatıdır. ISO'nun kalite standartlarından biri olan 9000 serisi, etkili bir yönetim sisteminin nasıl kurulabileceği, dokümente edilebileceği ve sürdürülebileceği konusunda yol göstermek, kurumlar/kuruluşlar/kullanıcılar arasında güven ortamı yaratmak üzere; süreçlerin yönetilmesiyle ürün/hizmet kalitesinin sağlanmasını, devam ettirilmesini, iyileştirilmesini, son kullanıcıya ürün ve hizmetlerin tutarlılığının ve güveninin verilmesini amaçlamaktadır. ii) ISO 14000 Ailesi: Çevresel sorumluluklarını yönetmek isteyen kurum ve kuruluşlar için pratik araçlar sağlamaktadır. iii) Biyobankacılık alanında faydalanılan diğer ISO dokümanları.

Yakın zamana kadar mevcut, ulusal biyobankaya özgü tek standart olan, Fransız standardı (NF S 96-900 Quality of Biological Resource Centres—Management System of a Biological Resource Centre and Quality of Biological Resources of Human and Microbial Origin), 2008'de yayımlanmıştır. Biyobankaya özgü bir standardın yokluğunda, birçok biyobanka (Örneğin, Birleşik Krallık Biyobankası, İspanya HIV Biyobankası, Norveç Anne ve Çocuk Kohort Çalışması Biyobankası, Graz-Avusturya Biyobankası, Singapur Biyobankası) KYS'lerinin ISO 9001 gerekliliklerine göre belgelendirilmesini sağlamıştır (168). KYS'nin tamamlayıcısı olarak ifade edilebilen akreditasyon, mevcut normları göz önünde bulundurarak bir kuruluşun yeterliliğinin, tarafsızlığının ve bağımsızlığının kanıtı olarak kabul görmektedir. Dünyada akredite olmuş olan bazı biyobankalar da ISO 17025 (Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar) yönergelerine göre akredite edilmiştir. ISO 17025'e göre akredite olmuş olan kuruluşlar, ISO 9001 gerekliliklerini sağlamış olarak kabul edilir, çünkü KYS, ISO 17025'in ayrılmaz bir parçasıdır. En çok bilinen hücre hattı sağlayıcı kuruluşlardan biri olan Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC), hem ISO 17025 hem de ISO Kılavuzu 34'e (Referans Malzemelerin Üretilmesi için Kalite Sistem Rehberi) göre akredite edilmiştir (174). Ayrıca biyobanka kapsamında doku depoları, ISO 9001 veya ISO 13485 (Tıbbi cihaz üreticilerine uygulanabilen kalite yönetim standardı) gibi diğer ISO standartlarının şartlarını sağlayarak da sertifikalandırılmaktadır (175). Ülkemizdeki yetkili nokta

olan, Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) da ISO 20387 ile ilgili çalışmalarını yürütmektedir.

Biyobankalama konusunda en çok karşılaşılan en iyi uygulamalar, Biyolojik ve Çevresel Örnek Depoları için Uluslararası Komite (International Society for Biological and Environmental Repositories, ISBER) ve Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-Operation and Development, OECD) tarafından oluşturulmuş olan dokümanlardır (151, 176, 177). ISBER tarafından oluşturulmuş “En İyi Uygulama Dokümanları (Best Practices)”, üyelerinin birikmiş deneyimlerini yansıtan ve arşivlerindeki diğer uzmanlardan destek alarak oluşturulmuş, kılavuz niteliğindeki çıktılardır. Gönüllülük esasına dayalı bir ekibin ürünü olan bu rehberler, ulusal, bölgesel ve yerel düzenlemelere tabidir. ISBER - En İyi Uygulama Dokümanları, araştırma ve teknolojiadaki ilerlemeleri yansıtacak şekilde periyodik olarak gözden geçirilmekte ve güncellenmektedir. 2018’de yayımlanmış olan dördüncü baskı, 2005, 2008 ve 2012 yıllarında yayımlanan önceki baskılarda kurulan temel üzerine inşa edilmiştir (178, 179).

Biyobankacılıkta KYS ile ilgili, Kanada Doku Deposu Ağı (CTRNet) Biyobanka Sertifika Programı ve Amerikan Patolog Koleji (College of American Pathologists, CAP) Akreditasyon Programı gibi programlar da geliştirilmiştir. Bu alanda ISBER, biyolojik örneklerin dondurma/çözme döngüsü sonrasındaki kararlılığını tespit etmek üzere bir Excel programcığı hazırlamıştır ve bu ürün ücretsiz olarak kullanıma açıktır. Ayrıca, KYS ile ilgili iki araç daha ISBER tarafından biyobanka camiasına sunulmuştur (180). Bunlardan biri, Biyolojik Örnek Depoları için Kendini Değerlendirme Aracı (Self Assessment Tool, SAT), diğeri ise Biyolojik Örnek Deposu Yeterlilik Test (Proficiency Testing, PT) Programı’dır.

OECD, Türkiye’nin de dâhil olduğu 30 üye ülkenin, küreselleşme sürecindeki ekonomik, sosyal ve çevresel sorunlarını ele almak için birlikte çalıştığı bir forumdur. Topluluk, hükümetlerin politika deneyimlerini karşılaştırabileceği, ortak sorunlara cevap aradığı, iyi uygulamaları belirlediği ve ulusal/uluslararası politikaları düzenlemek için çalıştığı bir ortam sunmaktadır. OECD, ekonomik, sosyal ve çevresel konularla ilgili istatistikleri toplama ve araştırmasının yanı sıra üyeleri tarafından

kabul edilen kurallar, kılavuzlar ve standartların sonuçlarını da yayımlamaktadır. Biyobankacılığa yönelik OECD tarafından hazırlanmış rehberler ve en iyi uygulama kılavuzları, şekil 2.10'da verilmektedir.

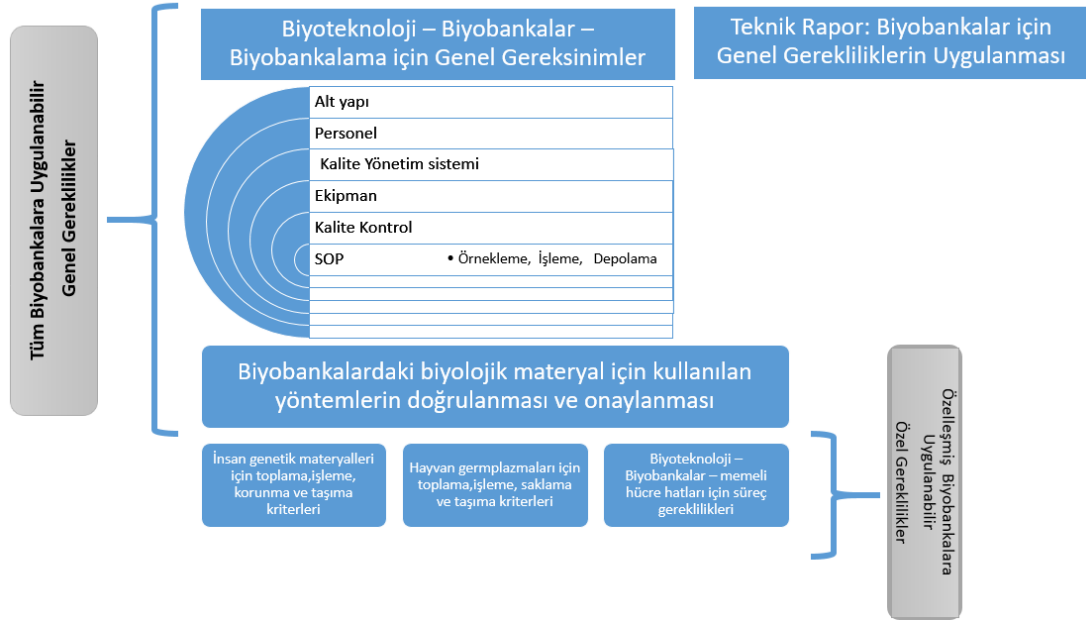


Şekil 2.10. Biyobankacılığa Yönelik OECD Rehberleri ve en iyi uygulama kılavuzları.

Biyobankacılık alanının önemli oluşumlardan biri olan BBMRI (Biyobankalama ve Biyomoleküler Kaynaklar Araştırma Altyapısı), yalnızca uluslararası standartlara dayalı KYS ve gerçekleştirme süreçlerini uyumlaştırmakla kalmayıp aynı zamanda yerel temsilcileri tarafından geliştirilmiş olan bir denetim programına dayanarak konsorsiyum çapında çapraz denetim yapılmasına da izin veren karşılıklı güveni sağlayabilmiştir. Üyesi olan biyobankalar için, KYS kapsamında “CEN/Technical Specifications (TS)” (veya ilgili ISO belgelerinin) standartları uygulanmaya devam edilirken, ISO 9001 veya CEN/TS tarafından tamamen kapsanmayan özgü hususlar konusunda en güncel biyobanka standardı olan ISO 20387'nin (173) uygulanmasının ele alınacağı ifade edilmiştir (156).

Bahsi geçen yeni standart, ISO 20387:2018 - Biyoteknoloji-Biyobankalama-Biyobankalama için Genel Gereklilikler adıyla 2018-Kasım ayında yayımlanmış; insan, hayvan, bitki, mikrop, toprak, hücre kültürü vb. biyolojik kökenli her tür biyobankaya yönelik, gıda ve tedavi dışında, araştırma geliştirme amaçlı çalışmalarda kullanılabilecek bir dizi gereksinim ve tavsiyede bulunmaktadır. Standardın oluşumunda çok sayıda rehber (Örn. OECD, ISBER rehberleri) de esas alınmıştır. Şekil 2.11'de standardın yapısı görülmektedir. Standardın içeriği biyobankalamaya özgü olmak üzere; amaç, referanslar, terimler ve tanımlar ile gereksinimler (genel,

yapısal, kaynak, süreç ve yönetim) bölümlerinden oluşmaktadır. Genel gereksinimler bölümünde, biyobanka işlemleri olarak, şekil 2.12'deki prosedürlerin detayları yer almaktadır.



Şekil 2.11. ISO 2387'nin Yapısı (181)

Toplama/Tedarik etme	Depolama
Elde Etme/Kabul	Veri yönetimi
Etiketleme	İmha
Erişim/Loglama (Sevir Defteri)	Paketleme
Kataloglama/Sınıflandırma	Emniyet/Güvence Sistemi
Muayene işlemleri	Dağıtım
Tekrarlama	Taşıma

Şekil 2.12. ISO 2387 – Genel Gereksinimler/Biyobanka İşlemleri (181)

Biyobankaya yönelik oluşturulacak bir KYS için bugüne kadar faydalanılmış uluslararası önemli standartlar tablo 2.3'te özetlenmiştir. Bunların dışında, Uluslararası Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug administration, FDA) tarafından hazırlanmış olan GMP (182), İyi Laboratuvar Uygulamaları (Good Laboratory Practice, GLP) (183) gibi dokümanlar da amaca göre (araştırma veya klinik açıdan) yol gösterici olabilecek referans dokümanlardır. Ülkemizde ise bu konuda, İstanbul

Üniversitesi önderliğinde, 2017 yılında oluşturulmuş olan “Biyobankalamada Protokol ve Kalite Kılavuzu” (184) ve “Biyobankalarda Etik ve Yasal Düzenlemeler Kılavuzu” (185) başlıklı iki kaynak doküman ve ayrıca Hacettepe Üniversitesi tarafından hazırlanmış “Araştırma Biyobankacılığı Etik Rehberi” (186) bulunmaktadır.

Tablo 2.3. En iyi biyobankacılık uygulamaları için önemli standartlar, yönergeler, araçlar (61).

STANDARTLAR	
ISO 15189	Akreditasyon Standartları
ISO 17025	
ISO 17020	
ISO 27799	
ISO 13485	
ISO 9001	Sertifikasyon Standardı
ISO Kılavuzu 34	Referans Malzeme Standartlarına Ek
YÖNERGELER/REHBERLER	
OECD yönergeleri	İnsan Biyobankaları ve Genetik Araştırma Veri Tabanları Hakkında Kılavuz
ISBER yönergeleri	ISBER Depoları İçin En İyi Uygulamalar: Toplama, depolama, alma, biyolojik malzemelerin araştırılması ve dağıtımı
NCI yönergeleri	Biyolojik Örnek Kaynakları için, Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI)'nin En İyi Uygulamaları
DİĞER TEKNİK ARAÇLAR/DOKÜMANLAR	
SPREC	SPREC, örneklenen klinik sıvıların ve katı örneklerin ve onların türevlerinin toplama, işleme ve depolama süreçlerinde bütünlüğü üzerinde etkili olabilecek temel analitik öncesi faktörleri tanımlar ve kaydeder.
BRISQ önerileri	BRISQ, biyobankaların yapılandırılmış ve standart bir biyolojik örnek raporunu sunmasını sağlayarak raporlama kalitesini kolaylaştırır.

Tabloda geçen ISO 15189 (Tıbbi Laboratuvarların Kalite ve Yeterlilik için Spesifik Gereklilikleri); ISO 17025 (Test ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar) ve ISO 900:2000 standartlarının tıbbi laboratuvarlar için

düzenlenmesiyle oluşturulmuştur. ISO 17020, muayene hizmeti yapan kuruluşların faaliyet kriterlerini belirleyerek bu kuruluşlarının yetkinliğine dair hazırlanmıştır. ISO 27799 ise “Sağlık bilişimi - ISO/IEC 27002 standardını kullanarak sağlıkta bilgi güvenliği yönetimi” başlıklı uluslararası standarttır. ISO 13485 (Tıbbi Cihazlar İçin Kalite Yönetim Sistemi) de biyobankacılık alanında faydalanılan diğer dokümanlardandır (187).

Yapılan araştırmalarda uPKH bankalama/bankacılığı konusunda doğrudan bir standart ile karşılaşılmamıştır. Ancak belirli bir komite veya üye grubundan oluşan uzman kadrosunun birikmiş deneyimlerini yansıtan, kök hücre genelinde bazı kaynaklar bulunmaktadır. “En İyi Uygulama” olarak isimlendirilen bu dokümanlar, personel eğitimi, yerel prosedürlerin gözden geçirilmesi ve iyileştirilmesi, farklı laboratuvarlar ile farklı zamanlarda yapılan deneyler arasındaki verilerin karşılaştırılmasına yönelik standart uygulamaların ve koşulların sağlanmasına yardımcı olacak temel ilkeleri sağlamaktadır. 2017 yılında sunulmuş olan 4T (the Transatlantic Think Tank for Toxicology) çalıştay raporunda, uPKH bankasına yönelik standart/rehber eksikliğinin giderilmesi amacıyla, kök hücreler ve kök hücre temelli modellere uygulanabilecek İyi Hücre Kültürü Uygulamaları’na (İHKU/Good Cell Culture Practice, GCCP) yönelik bilgilerin derlendiği görülmüştür (116). İHKU’da ele alınan esas konular; temel özelliklerin karakterizasyonu, kalite güvencesi, kayıt, raporlama, emniyet/güvenlik, eğitim ve etikdir. Ayrıca, uPKH’ler ile en benzer hücre tipi olan EKH’ler özelinde oluşturulmuş pluripotentlik ve hücre kalitesi için uluslararası bilimsel standartları tanımlayan ve belirleyen önemli çalışmalar, uPKH’ler için yararlanılabilecek önemli kaynaklar olarak kabul edilmektedir (188).

2.2.2. uPKH (Biyobankacılığı)

uPKH’lerin saf popülasyonlarının oluşturulması ve kabul edilebilir bir zaman diliminde istenen tüm ana doku tiplerine güvenilir şekilde farklılaştırılabilmesi, bu hücreleri endüstriyel uygulamalar için arzu edilebilir kılan özelliklerdir. Hücre hatlarının bu özellikleri göstereceğinin nasıl belirleneceği henüz net olarak bilinmemektedir. Bazı hücre tipleri için protokoller vardır, ancak i-uPKH'nin tüm ana

insan doku tipleri haline gelmesini hızlı, güvenilir bir şekilde gerçekleştirmek için henüz net olarak doğrulanmış/standardize yöntemlerin eksikliği hissedilmektedir.

2013 yılında yayınlanan derlemede, üretim, validasyon ve çoğaltma aşamalarının dâhil olduğu tek bir uPKH hattı için 10-20 bin dolar civarında bir maliyet tahmin edilmiş ve doku eldesinden uPKH karakterizasyonuna kadar toplam sürecin 4-6 ay kadar sürdüğü belirtilmiştir (133). İlerleyen teknoloji, yeni ve güvenilir ilave yöntemlerin geliştirilmesi gibi etkenlerle 2017 yılında, araştırma amaçlı biyobanka kalitesindeki tek bir uPKH hattının maliyeti 75 bin dolar (60 bin pound) olarak ifade edilmiştir (189). İ-uPKH'lerin standart hale gelmesi, kolayca erişilebilir olması, yüksek kaliteli reaktiflerin elde edilmesinin sağlanmasıyla bilim insanlarının, insan biyolojisini ve hastalık mekanizmalarını anlamada ve yeni tedaviler oluşturmada harcanan zamanı optimize etmeleri ciddi anlamda kolaylaşacaktır.

İlaç keşfi ve hastalık modelleme uygulamalarına yönelik potansiyelleri sayesinde gittikçe artan endüstriyel karaktere bürünmüş olan i-uPKH'lerin depolanması için üretimin ölçeklendirilmesi ve standartlaştırılması önem kazanmıştır (190). uPKH'lerin büyük çaplı gereksinimini karşılamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. 2012'de yapılan bir çalışmada, i-uPKH üretiminin verimliliğini, içeriğini, kalitesini artıran ve uPKH teknolojisinin endüstriyel ve klinik kullanımını kolaylaştıran bir platform sunulmuştur (89). Sunulan sistemin özelliği, besleyici tabaka gereksinimi olmayan (feeder-free) kültür ortamında, uPKH'lerin üretimini desteklemek ve arttırmak için, ortam katkı maddesi olarak kullanılabilen belirli sinyal yolağı inhibitörlerinden oluşan küçük molekül kokteyllerinin (TGF- β inhibitor-TGF- β i, Mitogen-Activated Protein Kinase inhibitor-MEKi, Glycogen Synthase Kinase inhibitor-GSKi, Rho-Associated Protein Kinase inhibitor-ROCKi) tanımlanmasıdır. Ölçeklenebilir yöntemlere olan ihtiyaca yönelik yapılan bir başka biyomühendislik çalışmasında, üç boyutlu biyomateryal kullanılarak uPKH çoğaltılmasına izin veren bir sistem geliştirilmiştir (191). Böylesi sistemler, biyobankalama süreci için standardize girdi sağlamada önem teşkil etmektedir.

uPKH'ler araştırma amaçlı kullanım potansiyelinin yanısıra klinik uygulamalarda kullanıma yönelik potansiyeli de bulunan, özel bir biyolojik materyal

grubu olarak değerlendirilebilir. uPKH bankacılığı, araştırmalara veya klinik uygulamalara yönelik hücre sunmak üzere 2 temel amaca göre yapılabilmektedir. Klinik uygulamalarda, insanda tedaviye yönelik kullanılmak üzere üretilen hücre hatlarının hayvansal kaynaklı ürünler veya ksenogenik katkıları ile ilişkili olmaması (GMP dereceli) gerekirken; araştırma amaçlı uPKH depolama için, GLP koşulları altında çalışmak yeterli olacaktır (9).

uPKH hatlarını özellikle klinikte kullanmadan önce karakterize etmek için sistematik, fonksiyonel ve moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Geniş bir popülasyonda, immünolojik olarak uyumlu olan hastalara özgü i-uPKH'lerden oluşan banka için kalite standartlarının oluşturulması önemli bir zorluktur. Bu nedenle, kliniğe geçmeden önce, araştırma/modelleme çalışmalarına yönelik yüksek kaliteli uPKH hatlarının depolanması ve dağıtımını amacıyla GLP ile uyumlu, araştırma dereceli bir yönetim sisteminin kurulması önceliklidir ve uluslararası alanda bu gereksinimin farkına varılmıştır. Örneğin StemBANCC, "araştırma amaçlı" olarak kabul edilen bir banka oluşumudur. "Araştırma amaçlı" terimi, insanda tedavi edici (terapötik) kullanım için uygun olmayan ancak araştırmalarda kullanılacak yeterlikleri karşılayan hücre hatlarını ifade etmektedir. Ntai ve arkadaşlarının (9) çalışmasında bazı kriterler belirlenmiş olmasına rağmen, i-uPKH ile ilgili olarak araştırma derecesinin tam olarak ne anlama geldiğine dair evrensel olarak kabul edilmiş bir tanım olmadığından bahsedilmektedir. "Araştırma" terimi, hücre hatları oluşturulurken, yapılacak çalışma özelinde neyin değerli olup olmadığına karar vermede bir değerlendirme kriteri olarak kullanılmıştır (57). Bu nedenle, araştırma dereceli bir uPKH bankası için öngörülen zorluklardan birinin de bu nokta olduğu kabul edilebilir.

Araştırma Amaçlı uPKH Bankacılığı Süreci

Standardize hücre hattı sunmak üzere oluşturulan araştırma amaçlı bir uPKH bankası için dört temel basamaktan oluşan süreç benimsenebilir. Bu süreçte, ilk adım olan biyolojik örnek alımı; onam formları, malzeme sözleşmesi ve hücre hattına dair tüm bilgilerin derlenmesi gibi yasal ve etik süreçler için kanıt olabilecek dokümanları içinde barındırmaktadır. İkinci basamak, hücre işleme basamağıdır. Bu basamak, hücre hattının eldesi, yeniden programlanması, çoğaltılması, yeterliliğinin ölçülmesi,

etiketlenmesi, dondurulması ve çözülmesi gibi alt işlemlerden oluşmaktadır. Üçüncü basamak olan kalite süreci oldukça geniş kapsamlıdır; her hücre hattı ile ilgili kalite ve karakterizasyon testlerini ifade eden operasyonel kalite kontrolün kurulması, kabul edilebilirlik ölçütlerinin belirlenmesi, analiz sertifikalarının oluşturulması ve tüm süreçlerin kalitesini kapsayan güvence sisteminin tamamlanmasından oluşmaktadır. Bahsedilen tüm süreçlerden geçtikten sonra hazırlanmış olan hücre hatlarının dağıtımını son basamaktır ve dağıtım aşamasında önemli olan noktalar; ayna bankada da uzun dönem depolamanın sağlanması ve verinin, bilgi yönetim sisteminden ulaşılabilir olmasıdır. Dağıtım noktasında biyobankanın işletme kimliği önem kazanmakta; hücre sunum, lojistik ve araştırmacı hizmetleri gibi düşünülmesi gereken diğer konular ön plana çıkmaktadır. Kar amacı gütmeyen ancak uPKH üretim/işleme maliyetlerin karşılanması hedeflenmiş olan araştırma amaçlı bir biyobanka aracılığı ile standardize hücre hattı arzındaki temel basamaklar ve kapsadığı konular aşağıda alt başlıklarla derlenmiştir:

1. Biyolojik örnek alımı (yasal düzenlemeler doğrultusunda)

- *Onam formlarının onaylanması*
- *Hücre üretiminde kullanılacak malzeme sözleşmesinin derlenmesi ve imzalanması*
- *Hücre hattı bilgi paketinin hazırlanması*
- *Donör ve kaynak hücre hattı verisinin elde edilmesi ve donör verisinin korunması*

2. Hücre işleme

- *uPKH eldesi*
- *Dondurarak depolama (kriyo-depolama)*
- *Karantinada çözme*
- *Yeniden programlama*
- *Çoğaltma (ekspansiyon) ve kararlılığını koruma*
- *Dondurarak koruma –uzun dönem (kriyoprezervasyon)*
- *Etiketleme*
- *Bankalama sonrası yeterlilik/kalite/karakterizasyon testleri*

3. Kalite

- *Operasyonel kalite kontrolün kurulması*
 - Her bir üretim partisinin (batch) standardize karakterizasyonunun sağlanması
 - Örneklerin serbest bırakılmasını sağlamak için parti serbest bırakma testi yapılması.
 - uPKH karakterizasyonunun uygunluğu için bilgilendirme testlerinin panel olarak değerlendirilmesi
- *Kabul edilebilirlik ölçütlerinin belirlenmesi*
- *Gen düzenlenme yapılmış hücre hatları için kalite kontrol*
 - Bu hücre hatları için, düzenlenen genin işlevinin kontrolüne veya tümör oluşum riskine yönelik ek testler gerekli olabilir.
- *Analiz sertifikaları*
- *Kalite güvencesi*

4. Dağıtım

- *Ayna bankada uzun dönem depolama*
- *Veriye bilgi yönetim sisteminden erişilebilmesi*
- *Araştırmacılara Sunum*
 - Web sitesi
 - Elektronik Talep
 - Araştırmacı ilişkileri yönetimi
 - Dağıtım kanalları (merkez /ayna banka)
- *Lojistik*
 - Stok yönetimi
 - Sipariş işleme
 - Taşıma (soğuk zincir)
- *Araştırmacı/yararlanıcı hizmetleri*
 - Hücre sunumu öncesi ve sonrası teknik destek
 - Geri bildirim değerlendirme

uPKH Bankası için Kalite Yönetim Sistemi ve Kalite Kontrol

Dünya genelinde kullanılan hücre hatlarının %15-20'sinin ya çapraz kontamine olması ya da yanlış tanımlanmasından yola çıkıldığında biyomedikal ve sağlık

alanlarında yapılan yüz milyonlarca dolar harcamanın yanlış veya yanıltıcı veri üretilmesinde kullanılmış olabileceği düşüncesi, biyobanka için kalite yönetim sisteminin önemine ve gerekliliğine dair yeterli bir gerekçe olarak değerlendirilecektir (154). Aynı şekilde, araştırma ve hatta doğrudan tedaviye yönelik çalışmalarda oldukça ciddi kullanım potansiyeline sahip uPKH Bankası için de potansiyeli oranında yüksek gereklilik kapsamındadır. KYS, biyobankanın çalışmasının (tüm süreçlerin) yanı sıra tutulan örneklerin ve verilerin kalitesini de kapsamaktadır (164).

Standardize edilmiş genel hücre hatları için 3 kalite kontrol seviyesinden bahsedilmektedir (9, 192): i)Hücre hatlarının tanımlanması ve sterilliği, ii)Hücrelerin performansı ve kararlılığı iii)Hücre ürünlerinin karakterizasyonu. uPKH'ler söz konusu olduğunda, genomik kararlılık, epigenomik profil ile pluripotentialik ve farklılaşma testleri de bu testlere ilave edilmiştir.

1. Hücre Hatlarının Tanımlanması ve Saflık

a) *Hücrelerin tanımlanması / kimlik doğrulaması*

Genel biyobankalardan bahsedilirken değinildiği gibi hücre hattının kökenini değerlendirmek için en çok tercih edilen yöntem STR profillemesidir. STR dışında ayrıca SNP genotiplenmesi ile de hücrenin ayrıntılı biçimde kimlik doğrulaması (parmak izi) sağlanabilmektedir.

Doku alındığında ve AHB oluşturulmadan veya tohumlama stoğundan önce yapılan STR genotiplenmesi, Uluslararası Hücre Doğrulama Komitesinin kılavuzları (155) tarafından belirlenen adımlar doğrultusunda değerlendirilmekte ve sıvı azotta depolanmadan ve dağıtımdan önce tekrarlanmaktadır. En son 2014'te, ICLAC tarafından güncellenen İnsan Hücre Hattı Kimlik Doğrulama Kılavuzu (193), yaygın kullanılan ve kabul edilen bir kimlik doğrulama yöntemi olarak STR profillemesine odaklanmaktadır.

b) *Mikrobiyal kontaminasyon*

Ntai ve arkadaşları (9), 2017 yayınında kontaminasyon tespiti için Farmasötik Preparatların Mikrobiyolojik Kalitesi (Microbiological quality of pharmaceutical preparations 5.1.4 (01/2007: 50104) dokümanına işaret etmişler fakat mevcut hiçbir

test rejiminin mikrobiyal kontaminasyonun mutlak yokluğunu garanti edemediğine ve hücrelerin detaylı testlerden sonra bile potansiyel olarak bulaşıcı kalabildiğine dikkat çekmişlerdir. Kök hücre kültürlerinde en sık karşılaşılan HBV, HCV gibi hepatit virüsleri ile HIV (1 ve 2) ve HTLV (1 ve 2) gibi insan retrovirüslerinin (194) yanı sıra, mikoplazma gibi diğer mikroorganizmalar da hücre hatlarını kirletebilmektedir ve kritik metabolitlerin seviyelerini değiştirebilmek gibi ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Kültürlenmiş hücrelere antibiyotik ilavesi, bakteri bulaşmasını azaltsa da, mikoplazma bulaşından kurtulmanın pratik olarak imkânsız olduğu belirtilmektedir. ICLAC yönergeleri izlenerek, en az ayda bir kez mikoplazma varlığı için hücre hatlarının kontrol edilebileceği önerilmektedir.

c) Opsiyonel kalite kontrol

Özellikle klinik uygulamalarda kullanılacak olan hücre hatlarında mikrobiyal veya viral kontaminasyonu test etmek için tüm transkriptom analizi gibi daha detaylı analizler ile hücre hatlarının tamamen ya da potansiyel olarak kontamine olup olmadıkları kontrol edilebilir.

2. Hücre Performansı ve Kararlılığı

a) Genetik kararlılık ölçümleri

Hücrelerin kültürde uzun süreli idamesi, YP yöntemleri, kültür koşulları, hücre kaldırma/toplama yöntemleri (mekanik veya enzimatik) ve besleyici tabaka varlığı/yokluğu gibi sebeplerle uPKH'lerin genomunda değişiklikler meydana gelebilmekte ve bu sebeplerden her biri hücre hattının kararlılığını etkilemektedir. Kararlılık için immünofenotipik (kendini yenileme belirteçleri için), genomik (mikrodizileme, kromozomal anormalliği ya da yerini belirlemek için FISH ve spektral karyotipleme, farklılaşma sırasında ortaya çıkan nokta mutasyonları için SNP genotipleme, kopya sayısı değişikliklerini tespit etmek için dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH), kendini yenileme ile ilişkili uzunluk dinamiği için telomeraz aktivitesi, ifade profili için RNA dizileme veya tüm ekzom dizileme) ve epigenetik açılardan değerlendirmeler yapılabilmektedir. Ayrıca morfoloji, genetik ve metabolik açılardan mitokondriyal parametreler bilgi verici olabilmektedir.

Gen düzeyinde kararlılığın tespitine yönelik, oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 3/4 (OCT3/4) gibi farklılaşmamış hücrelere ilişkin işaretleyicilerin kullanılmasının yanı sıra, hücre hatlarının kalitesini bozabilecek veya geçersiz kılacak ve farklılaşma potansiyellerini öngörülemeyen bir şekilde değiştirebilecek diğer faktörlerin test edilmesi gerektiği belirtilmektedir. Telomeraz aktivitesi, mitokondriyal metabolizma, genomik kararlılık ve DNA gibi epigenetik değişim belirteçleri olan metilasyon (DNAm) ve histon modifikasyonları da klinik uygulamalarda kullanılacak olan i-uPKH'ler için önerilmektedir. Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında daha uzun telomerlere sahiptir ve bu telomerlerin, uzunluğunu koruyarak hücrelerin ölümsüzlüklerini sağladıkları bilinmektedir. İnsan telomeraz ters transkriptaz (hTERT)/telomeraz ifade seviyeleri ve telomer uzunluğu ölçümü, i-uPKH farklılaşması sırasında tümör oluşumu (tümörögenез) göstergesi olarak düşünülebilir. Yüksek kaliteli, uPKH klonlarının varlığını, araştırma ve klinik uygulamalarda güvenli kullanımını garanti altına almak için iş akışının bir parçası olarak telomer profili analizinin rutin olarak uygulanması önerilmektedir (9).

PKH'lerin kapsamlı bir genomik analizi oldukça önemlidir. Genetik sapmalar, hastalık fenotipini ve fonksiyonel okumaları değiştirebilir, ayrıca genomik kararsızlık ile kanser oluşumu arasındaki hassas dengeyi bozabilir. Genom bütünlüğü, küçük CNV ve nokta mutasyonlarını tespit etmek için sayısal ve yapısal değişiklikler gözlemlenerek kromozomal anormallikler analiz edilebilmektedir. Giemsa (G) veya Quinacrine (Q)-bantlama teknikleri kullanılarak yapılan geleneksel karyotipleme analizi, >10Mb boyuttaki değişiklikleri tespit etmekte, düşük çözünürlüğe rağmen, dengeli yer değiştirme (translokasyon) veya çok düşük seviyeli mozaikliğin tanımlanmasına izin vermektedir. aCGH gibi kromozomal mikrodizi analizi ile kazanç ve kayıplar (~1Kb) uygun çözünürlükte tanımlanabilmektedir. İki teknik, numunenin genomik bileşimi hakkında birbirini tamamlayıcı bilgiler sağlamaktadır.

CNV ve SNP mikroarray analizi, özellikle klinik amaçlı (GMP dereceli) i-uPKH'lerin kromozomal kararlılığını değerlendirmek için önerilmektedir. YP sürecinde, zararlı CNV'ler ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca bu tür sapmalar, bilinen

tümör baskılayıcıların silinmesine ya da yeniden programlanmış hücre hatlarının büyüme faktörlerinin/onkojenik faktörlerin çoğaltılmasına neden olabilmektedir.

3. Hüresel Ürünün Karakterizasyonu

a) Heterojenlik Ölçümü ve Farklılaşma Yeteneği

Aynı vericiden üretilen farklı hücre hatları, kültür adaptasyonuna bağlı alel farkları nedeniyle fenotipe farklılık gösterebilmektedir. Pluripotentlik özelliklerini ve kendiliğinden farklılaşma kapasitesini değerlendirmek için en çok kullanılan yöntemler, immünohistokimya ve akım sitometri analizleridir. Aşamaya özgü embriyonik antijen-4 (SSEA-4) ve keratan sülfat antijenleri olan TRA1-81 ve TRA1-60 gibi epitoplar için üretilen antikorlar, PKH'lerin karakterize edilmesinde yaygın olarak kullanılan belirteçlerdir.

Tablo 2.4. Heterojenlik ve farklılaşma yeteneği için kullanılabilecek ölçüm yöntemleri (9).

Alkalin fosfat (canlı boyama)
İmmünohistokimya, immünohistokimya ve immünohistokimya FACS analizi
Yüksek oranda ifade edilen pluripotent belirteçler için boncuk (bead) tabanlı dizileme
Dizi hibridizasyon yöntemleri kullanılarak tüm genom ifade profili
Tüm transkriptom dizilimi
RT-PCR
Mikro-RNA profili
İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi, kütle spektrometresi kullanılarak proteomik analiz.
Tüm metilom analizi
İşlevsel analizler
Teratom analizi
Biyoinformatik analizler (Pluritest, ScoreCard, TeratoScore, Karyostat)

b) Opsiyonel Kalite Kontrol

Transkriptom, metilasyon analizi, miRNA ekspresyonu (tek tek veya kombine) gibi farklılaştırılmış hücre ürünlerini daha detaylı kontrol edebilecek testler bulunmaktadır. Bu testler, isteğe bağlı olarak yapılabilir ancak i-uPKH'lerin klinik uygulama veya farmakolojik çalışmalarda kullanılacağı durumlarda önem derecesi yükselmektedir. Epigenetik değişiklikleri test etmek için kullanılan en yaygın ölçüler,

histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu (DNAm) dur. Ayrıca, yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) gibi yüksek verimli yöntemler genom çapında, tarafsız ve son derece hassas görünümün sunmaktadır. i-uPKH'lerin elde edildiği hücre kaynaklarının hafızaya sahip olması ve uygulanan teknolojiye bağımsız olarak yeniden programlanma sürecinin, hücrenin kökenini ve parmak izini tam olarak silmemesinden (195, 196) dolayı uPKH'lerin hafızalarının, yeniden programlamadan önce, sonra ve son üründe metilasyon analizi yapılarak değerlendirilmesi önerilmektedir. DNAm profillerinin araştırılması, uPKH'lerin ilaç taramasında, hastalık modellemesinde ve rejeneratif tıpta kullanımlarında pluripotent hücre farklılaşma kapasitesi ve tümörjenik potansiyelleri hakkındaki bilgileri arttıracaktır (9).

Tablo 2.5. Hücre ürün karakterizasyonuna yönelik opsiyonel kalite kontrol parametreleri (9).

uPKH hattının köken aldığı doku kaynaklı farklılıklar
Kültür süresine bağlı olarak ortaya çıkan farklılıklar (pasaj sayısı)
Kültürde ortaya çıkan genetik mozaikliğe bağlı farklılıklar (gelişim sırasında)
Erken kültür koşulları (besleyici tabaka ve kültür koşulları)
Genetik baskılanma (imprinting) ve kromozom X inaktivasyonu
Genetik değişiklikler (genomik kısmın kaybı veya kazancı)
Genel ve özgü epigenetik değişiklikler (DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu)
Kültürlerde hücrelerin kısmi veya terminal (istenmeyen) farklılaşması
Koşulsuz epigenetik varyasyonlar

Risk değerlendirmesi ve metilasyona dayalı biyobelirteçlerin tanımlanması PKH alanında halen zorluklar içermektedir. Bununla birlikte, DNA değişiklikleri hassastır ve dışsal faktörlerden etkilenmektedir. Biyolojik belirteçlerin keşfedilmesinde güvenilir bir standart olmaması ve hücresel biyogüvenlik için potansiyel olarak tehlikeli ve istenmeyen sinyaller arasında ayırım yapmak için az sayıda veri kümesi olması, aşılması gereken darboğazlardır (9).

Kalite karakterizasyon testleri açısından İngiltere Kök Hücre Bankasının (United Kingdom Stem Cell Bank, UKSCB) uygulamaları da incelenmiştir (197). UKSCB sürecinde ana stok öncesi (pre-master), ana stok (master) ve dağıtım basamaklarında canlılık, sterillik, parmak izi, plağa tutunma (settle plates), mikoplazma, viral kontaminasyon, DNA profilleme, G-bant karyotipleme, köklülük

belirteçlerinin tespiti, farklılaşma ve homojenite kalite kontrol testleri zorunlu olarak yapılmaktadır.

Dünyada uPKH Bankacılığı

Dünyada uPKH'lerin keşfi, embriyonik kaynakları koruyan büyük sosyoetik ve politik/yasal kaygıları ortadan kaldıracak bilimsel bir gelişme olarak önemsenmektedir. uPKH'lerin önemli etik veya yasal endişeleri olmadığı (EKH'ler ile kıyaslandığında) ve doku bağıışı için genel kurallar çerçevesinde bankalama sürecinin düzenlenmesi gerektiğine dair görüşler bulunmaktadır (133). Ancak çok aşamalı ve değişken parametrelili üretim sürecine sahip olan bu hücreler özelinde kuralların ayrıca bulunması gerektiği daha çok kabul görmektedir. Bilgilendirilmiş onam, mahremiyet ve gizlilik, ticarileştirme ve araştırma katılımcılarının güvenliği ile ilgili zorlukları çözmek için uygun mekanizmalar ile etik ve yasal yaklaşımlar henüz uPKH bankacılığı için net olarak tanımlanmış değildir. "Kişisel Verilerin Korunması" kanunu bu alanda atılmış önemli bir adımdır. Ayrıca alanın öncüsü olan Japonya'da, 2015 yılında yasal düzenlemelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamaları açısından yeniden düzenlendiği bilinmektedir (69).

Biyobankacılık ile ilgili yasal ve etik düzenlemelerin belirleyicileri, alanın öncü bilimsel toplulukları ile devlet otoritesinin sağlık ile ilgili birimleridir. uPKH'leri de kapsayarak bir üst konumda olan "kök hücre bankası"nın kurulmasında (ABD Ulusal Kök Hücre Bankası) ve i-EKH kayıtlarının tutulmasında (hES Cell Registry) dünyadaki öncü bilimsel kuruluş, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) olarak kabul edilebilir. Ayrıca, Uluslararası Kök Hücre Araştırmaları Derneği (International Society for Stem Cell Research, ISSCR) ve Uluslararası Kök Hücre Bankacılığı Girişimi (International Stem Cell Banking Initiative, ISCBI) gibi kök hücre araştırmaları ve bankacılığı için uyumlaştırma ve standardizasyon süreçlerine yönelik çalışmalar yürüten uluslararası girişimler de bulunmaktadır (198).

Dünya çapında birçok merkez EKH hatları depolamakta ve sunmaktadır (198). Ancak hücre stoklarının hazırlanması ve test edilmesi genellikle yerel normlara dayalı ve doğal olarak merkezden merkeze değişmektedir. Uygun hücreleri araştırma çalışmalarında kullanmak için hazırlamanın zorluğu kabul edilmiş ve iyi hücre kültürü

uygulamaları ve hücre bankacılığı üzerine uluslararası gruplar tarafından rehberler geliştirilmiştir.

Kök hücre kültürü ile ilgili alanlarda yöntemlerin geliştirilmesi, hücre hatlarının korunması ve karakterizasyonlarının optimizasyonunda hala netleştirilmeye açık aşamalar bulunmaktadır. Kök hücre hatlarının, araştırmacılara ve klinikte kullanım amacıyla uygulayıcılara sağlanmasından sorumlu olanların, bu gelişen yöntemlerin ön saflarında yer almak için kök hücre araştırmacılarıyla yakın çalışması esastır. Uluslararası Kök Hücre Forumu (ISCF) (199) adı verilen uluslararası araştırma fonu tarafından finanse edilen projeler, bu tür çalışmaları teşvik etmektedir. ISSCR (200) gibi diğer kuruluşlar da alana yönelik rehber çalışmalarını başlatmada öncü olmuşlardır (İnsan Embriyonik Kök Hücre Araştırması için Rehber, 2006; Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımına Yönelik Kılavuz, 2008; ABD Bilimler Akademisi, İnsan Kök Hücre Araştırması için Rehber, 2005) (85).

EKH'lere yönelik hazırlanmış olan dokümanların, her ne kadar pek çok açıdan, uPKH hatları da dâhil, tüm insan kök hücre dizileri için geniş çapta uygulanabilir olduğu belirtilse de PKH'ler için özelleşmiş rehber/düzenleme ihtiyacı ortadadır. Oluşturulacak kılavuz ve düzenlemeler, hücre hatlarının tedarikini, hücre bankacılığı prosedürlerini ve dokümantasyonunu, hücre bankacılığı kalite kontrolünü ve hücre bankalarını serbest bırakma sürecini içeren, kök hücre bankacılığında yer alan geniş bir süreç yelpazesini kapsamalıdır. Aynı zamanda serbest bırakma kriterleri, mikrobiyolojik testler, hücre karakterizasyonu ve hücrelerin nakli gibi teknik gereksinimler de belirlenmeli ve bilgilendirilmiş onam, denetim, hücre kaynaklı izlenebilirlik ile dokümantasyon gibi temel etik gereklilikler de dâhil edilmelidir (175).

uPKH'lerin biyoteknoloji ve sağlık alanındaki potansiyeli farkedildikçe ilgili yatırımlar hızla artmaktadır. Büyük miktarda i-uPKH üretmek, bankalamak ve dolaşımını sağlamak için birçok ulusal ve uluslararası çaba, çeşitli gelişim aşamalarında. Öne çıkan örnekler (201, 202):

- ABD'deki New York Kök Hücre Vakfı Araştırma Enstitüsü Deposu (The New York Stem Cell Foundation, NYSCF) (Kar amacı gütmeyen kuruluş)

- Coriell-Kaliforniya Rejeneratif Tıp Enstitüsü (California Institute for Regenerative Medicine, CIRM) uPKH Bankası (Kar amacı gütmeyen kuruluş)
- Wellcome Sanger Institute ve İngiltere'deki Tıp Araştırma Konseyi tarafından finanse edilen İnsan Kaynaklı Pluripotent Kök Hücre Girişimi (Human Induced Pluripotent Stem Cell Initiative, HipSci) (Devlet destekli)
- Japonya'daki RIKEN Biyo-Kaynak Merkezi (BRC) (Devlete ait)
- Avrupa'daki Yeni İlaçların Biyolojik Tahlilleri ve Avrupa'daki Predictive Toksikology projeleri için Kök Hücreler (Stem cells for Biological Assays of Novel drugs and predictive toxicology, StemBANCC) Projesi ile oluşan depo (Kamu-özel ortaklığı)
- Avrupa Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Bankası (European Bank for Induced Pluripotent Stem Cell, EBiSC) (Kamu-özel ortaklığı)

StemBANCC projesi, büyük miktarda/yüksek bütçeli hücresel üretimin en iyi örneğini teşkil edebilecek bir kapasite (500 bireysel katılımcı tarafından bağışlanan cilt veya saç örneklerinden elde edilen 1500 i-uPKH hattının üretimi) ve bütçe (yaklaşık 55 milyon avro) ile tasarlanmıştır (203). StemBANCC, akademik kurumlardan ve ilaç endüstrisinden bilim insanlarını bir araya getiren büyük bir Avrupa konsorsiyumu olarak oluşturulmuştur. Amacı, çeşitli yaygın, karmaşık (kompleks) hastalıkları (otizm, Alzheimer hastalığı, bipolar bozukluk, diyabet, migren, nöropati, Parkinson hastalığı, şizofreni ve genel ilaçlara ters tepki verme) olan katılımcılardan veya sağlıklı gönüllülerden uPKH hatları üretmektir (57). Bu hücre dizilerinin, ilaç adaylarını taramada ve insan hastalıklarını *in vitro* modellemede kullanılması tasarlanmıştır (57). StemBANCC projesi ile üretilen hücre hatlarının dolaşımını takip etmek amacıyla oluşturulan veri tabanı, StemDB (204), altyapının bir parçasıdır. StemDB, i-uPKH için dijital bir katalog ve çevrimiçi bir kayıt defteri niteliğinde hazırlanmıştır. Standartlaştırılmış, aranabilir dijital sunum ortamında, hücrelerde istenen özelliklerin seçilebilmesi sağlanmıştır (57, 203).

Bir diğer uluslararası oluşum olan EBiSC, hastalık modellemesi ve diğer klinik öncesi araştırma biçimlerinde kullanılmak üzere akademik ve ticari amaçla çalışmakta olan bilim insanlarının kullanımına sunulan geniş kapsamlı, yüksek kaliteli, araştırma dereceli uPKH'ler geliştirmekte olan bir biyo-depodur. 2014 yılında başlatılan bu

projenin en büyük finansal kaynakları IMI (Innovative Medicines Initiative, 21,8 milyon avro) ve EFPIA (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, 8,3 milyon avro)'dır ve projenin toplam maliyeti ise 35,2 milyon avrodur. EBISC, “merkez/ana tesis” ve merkezde üretilen uPKH’lerin kopyalarının bulunduğu bir “ayna tesis” olmak üzere ikili yapıda tasarlanmıştır. Ana tesis, Babraham Enstitüsü Araştırma Kampüsü'nde (Cambridge, İngiltere) bulunmaktadır ve hücre çoğaltılması, kalite kontrol ve karakterizasyon aşamaları burada yürütülmektedir. İngiltere Halk Sağlığı Avrupa Hücre Kültürü Koleksiyonu (ECACC/İngiltere Sağlık Bakanlığı) hücre hattı dağılımını koordine etmede yetkilidir. Ayna banka (mirror bank) olarak isimlendirilerek kapsamlı operasyonel yedeklemenin yapıldığı tesis, Almanya (Fraunhofer IBMT, Sulzbach)'dadır. Projenin başlangıcında hedeflendiği/öngörüldüğü haliyle hücre hattı sayısı yılda 1000, biyobankanın toplam kapasitesi ise 10.000 hücre hattıdır. 2019 yılının ikinci yarısı itibariyle, koleksiyonunda 30'dan fazla hastalık temelli 817 uPKH hattı bulunmaktadır (205). Projenin ilk aşamasında (2014-2017) EBISC, kalite kontrollü, hastalıklara yönelik araştırma dereceli uPKH hatları üretimine yoğunlaşmışken, Mart 2019'da başlatılan ikinci aşamada, sürdürülebilirlik üzerinde durularak merkezi bir üretim noktası olmak adına, kalite, tutarlılık, mevcut veriler, standartlar ve lisans sözleşmeleri açısından yapılandırmak üzere Avrupa Birliği (AB) kaynaklarının bir araya getirilmesi amaçlanmıştır.

StemBANCC ve EBISC, kar amacı gütmeyen oluşumlardır ve hücre hatları siparişinde yalnızca maliyet geri kazanım fiyatlarını talep ederler. Hücre hatlarının satışından kar elde etmek yerine standartlaştırılmış i-uPKH hatları oluşturmayı tercih etmektedirler (203). Araştırma amaçlı uPKH bankası kapsamında olan her iki projede de, hastalık modellemesi ve özellikle ilaç keşfine yönelik çalışmalar için i-PKH’lerin eldesine odaklanılmıştır.

Küresel bir “Kök Hücre Banka Ağı” olma amacını güden ISCBI, 2007 yılında, ISCF'den fon sağlanmasıyla, hem mevcut PKH bankalarını koordine ederek hem de yeni kök hücre merkezleri kuranlara destek vererek varlığını sürdüren bir topluluktur. ISCBI, 23 ülkeden 200'den fazla kök hücre araştırmacısı, kök hücre bankası, kök hücre topluluğu, akademisyen, endüstri ve düzenleyici kurum uzmanlarının bir arada olduğu,

kök hücre hatlarının bankacılık ve karakterizasyonuna yönelik testler için standart veya en iyi uygulama kılavuzu oluşturmak amacı güden bir girişimdir (7). ISCBI, pluripotent kök hücrelerin kullanımı ve yaygınlaştırılması ile kök hücre biyobankacılığının eğitimi konularında teşvik etmeye odaklanmış, uluslararası bir kurul tarafından yönetilmektedir. ISCBI topluluğu, kök hücre bilimi, etik, üretim ve düzenleme konularında lider araştırmacıların fikir birliği ürünü olan, etkili raporlar yayımlamaktadır.

Ülkemizde uPKH bankalama teknolojisine yönelik atılmış ilk adım, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (Pedi-Stem)'nin 2014 yılında TÜBİTAK 1003 programı desteğiyle ve Teknokent ortaklı olarak başlatmış olduğu, "Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Banka Teknolojileri Geliştirme" başlıklı prototip projesi (No: 213S181) olarak bilinmektedir. Prototip proje kapsamında, sağlıklı verici kaynaklı MKH'ler ile birlikte malign infantil osteopetrozis hastalarından uPKH elde etme, çoğaltma, tanımlama ve saklamaya yönelik laboratuvar çalışmaları yürütülmüş (206) ve bir uPKH banka yazılımı da geliştirilmiştir. Bu çalışmalar ilerlerken, özellikle nadir ve yetim hastalıklar açısından potansiyeli oldukça yüksek olan ülkemizdeki ihtiyacın farkında olunarak uPKH'lerin bankalanmasına yönelik dünyadaki gelişmeler takip edilmeye devam edilmiş ve tüm gereklilikler basamak basamak gözden geçirilmiştir. Bu süreçte, gerek ülkemiz için yeni bir alan olması gerekse tüm dünyada yeterince köklü olmamasından kaynaklandığını düşündüren standardizasyon ve kalite süreçlerine dair eksiklik farkedilmiş ve bu kapsamda bir doktora tezi ile katkı sağlama fikrine yönlendirmiştir.

Ülkemizde yürütülmekte olan biyobankacılığa (genel olarak doku/kan bankacılığı veya daha özel olarak kök hücre/kordon kanı hücre bankacılığı) yönelik temel bazı düzenlemeler bulunmaktadır ve zaman zaman güncellenmektedir. Bunlar ile uPKH arasında, "hücre" ana çatısında ortak düşünülebilecek noktalar bulunsa da uPKH özelinde bu tür düzenlemeler henüz bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Teorik Araştırma Materyali ve İnceleme Yöntemleri

3.1.1. Literatür ve İnternet Tarama

uPKH üretimi, biyobankalanması ile ilişkili konularda bilimsel araştırma ve derleme makalelerinin yanısıra, uPKH'lerin ticari olarak sunulması, dünyadaki biyobanka (kök hücre bankaları, uPKH Bankaları) örnekleri, KYS programları gibi endüstriyel ve teknolojik konularda internet taramaları çalışmamızın araç ve yöntemlerini oluşturmuştur.

Literatür ve internet taramalarında kullanılan anahtar kelimeler: “Biobanks; biobanking; stem cell banking/cell banks; iPSC banking/banks; quality management systems (QMS) for biobanks or biobanking/cell banks or banking/stem cell banks or banking/iPSCs banks or banking, guidelines for biobanks or biobanking/cell banks or banking/stem cell banks or banking/iPSC bank or banking; standards for biobanks or biobanking/cell banks or banking/stem cell banks or banking/iPSC banks or banking; regulations for biobanks or biobanking/stem cell banks or banking/iPSC banks or banking”dir. Tekil/çoğul ile Türkçe anahtar kelimeler özelinde taramalar da ayrıca yapılmıştır. Tez önerisi hazırlık sürecinden itibaren (Mart 2017), tez savunma sürecine (Mayıs 2020) kadar taramalar aktif olarak sürdürülmüştür. Taramalar sonucu “Teze Yönelik (uPKH üretim, karakterizasyon kaynakları dâhil)” isimli klasörde toplam 1000 civarında dokümandam oluşan bir kütüphane oluşturulmuş ve dokümanlar “biyobanka, rehberler, standartlar, yerel dokümanlar, kalite, tezler, etik, uPKH Banka, kitaplar, klinik, sunumlar, kök hücre bankaları” isimli temel klasörlere ve kendi içlerinde alt klasörlere (kordon kanı bankası, kan bankası, EKH bankası... gibi) ayrıştırılmıştır. Görsel kaynaklar (grafik, şema, iş akışı...) ayrı bir klasörde toplanmıştır. ISO (<https://www.iso.org/home.html>), ISBER (<https://www.isber.org/>), ISCBI (<https://www.iscbi.org/>), BBMRI-ERIC (<https://www.bbmri-eric.eu/>), ECACC (www.phe-culturecollections.org.uk/), ISENET (<https://www.isenetbiobanking.com/>), Wicell (www.wicell.org), HipSci (<http://www.hipsci.org/>), EBISC (<https://ebisc.org/>) gibi oluşumların internet sayfaları da detaylıca incelenmiş ve özellikle EBISC için özet rapor hazırlanmıştır.

3.1.2 Bilimsel Ziyaret ve Toplantılarda Uzmanların Görüşlerinden Yararlanma veya Bire-Bir Sözlü/Yazılı Görüşmeler

Kongre, kurs, çalıştay gibi alanın uzmanlarının katıldığı toplantılarda yapılan yüz yüze görüşmeler, akabinde e-posta ile yazışmalar ile Skype ortamında sanal buluşmalar yapılmıştır. Ayrıca dünyaca ünlü biyoteknoloji şirketleri veya tıbbi firmalarca düzenlenmiş olan sanal sunum ortamlarına (webinar/workcast) katılım sağlanarak alanın uzmanlarının bilgi ve tecrübelerinden faydalanılmıştır. Verimli paylaşımların gerçekleştiği önemli ortamlar aşağıda listelenmiştir:

1. EBISC Projesinin Kapanış Toplantısı: “Scalability of iPSC technology for future drug discovery & therapy”, (Kasım 2017), Almanya
2. Uluslararası Seçimli/Burslu Kurs: “Welcome Genome Campus Advanced Course - Derivation and Culture of Human Induced Pluripotent Stem Cells” (1-14 Aralık 2017), Cambridge, İngiltere
3. Uluslararası Biyobanka Girişimi (ISCBI) Başkanı Dr. Glyn Stacey ile Skype Görüşmesi (18.02.2018)
4. Dr. Glyn Stacey'nin Pedi-Stem ziyareti (12-15 Mayıs 2018)
5. Uluslararası Sempozyum – Ortadoğu ve Kuzey Afrika (Middle East and North Africa, MENA) Ülkelerinde Araştırma ve Sağlık Hizmetlerini Teşvik Etmek İçin Biyobanka Köprüleri Kurulması (4 Mayıs 2018), İzmir
6. Uluslararası Çalıştay – Nadir Hastalıklar için Biyobankalama (2-3 Mayıs 2018), İzmir
7. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi, (2019) İstanbul
8. Uluslararası Sempozyum ve ISCBI Çalıştayı (ISCBI Workshop on Management of Stem Cell Data, Genetic Testing of hPSC Lines and Cost of Goods Considerations for hPSC Banking), (24-25 Eylül 2019), Güney Kore
9. Sanal Sunum: Nature Research Round Table sponsored by Stem Cell Technologies, (2018)

3.1.3. Resmi Otorite ve Kurul Görüşmeleri

uPKH Bankası ile ilgili olan temel kamu otoritesi Sağlık Bakanlığı'dır. Bakanlığın “Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü” çatısı altında hizmet veren “Kan,

Organ, Doku Nakli Hizmetleri Daire Başkanlığı'nın "Hücre ve Hücresel Tedavi Birimi" ise konumuz ile ilgili iletişim kurulacak olan noktalardan biri olarak belirlenmiş ve yüz yüze (17.09.2019'da) ve telefon ile görüşmeler yapılmıştır. Ayrıca ülkemizdeki kök hücre araştırmalarına yönelik var olan yasal düzenleme dökümanları incelenmiştir (Bknz. Şekil 4.5. "Kök Hücre Çalışmaları" nı ilgilendiren ülkemizdeki mevzuat).

Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı da alanımızla ilgili diğer bir kamu otoritesidir ve çatısı altında yer alan Ankara Kalkınma Ajansı'na "Ankara Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Biyobankası (UPKÖK)" başlıklı proje (TR51/19/FD/0017) başvurusu yapılmıştır. uPKH Bankasına yönelik fizibilite çalışmaları için almaya hak kazandığımız destek, ajans tarafından 1 yıl için sağlanacaktır.

Üniversitemiz bünyesinde yer alan, Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (2012-KAEK-14), Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından yetkilendirilmiş 125 etik kuruldan biridir (207). Ülkemizdeki klinik araştırma çalışmalarında kullanılması amacıyla TİTCK tarafından hazırlanmış olan "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunda Olması Gereken Asgari Bilgiler" başlıklı dokümandan (208) da faydalanılarak araştırma amaçlı biyobanka özelinde derlemiş olduğumuz onam formlarımız ve biyobanka örnekleri ile yapılacak olan araştırma çalışmalarımızın değerlendirme/onay makamı olmuştur.

Geçtiğimiz yıl eylül ayında Kore'de gerçekleştirilmiş olan ISCBI çalıştayına katılım, uluslararası kurul görüşmesi kapsamında değerlendirilmiştir. Bu katılım öncesinde, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü-Kan, Organ, Doku Nakli Hizmetleri Daire Başkanlığı'nda yetkililer ile yapılan görüşmeler ve edinilen bilgiler neticesinde "kök hücre çalışmaları" başlıklı ulusal bir rapor hazırlanmış ve çalıştayda sunulmasının ardından, ISCBI'nin aralık ayı bülteninde "odak rapor" olarak yer almıştır (<https://www.iscbi.org/post/iscbi-december-2019-newsletter>).

3.1.4. Standart/Rehber İncelemeleri

Biyobankacılık alanında şimdiye kadar kullanılan uluslararası standart ve rehberlerin yanısıra, biyobanka alanında dünyadaki ilk ve tek standart olan ve Kasım

2018’de yayımlanmış ISO 20387, Türk Standartları Enstitüsü (TSE) aracılığı ile 21.11.2019’da satın alınmış, incelenmiş ve önerilen KYS modellerinden uPKH bankamız için uygun olana (A seçeneği) karar verilmiştir. İlk kez bir KYS oluşturacak olan biyobankalar için önerilen A seçeneğine göre ele alınacak temel başlıklar; KYS dokümantasyonu ve kontrolü, kayıtların kontrolü; riskleri ve fırsatları ele alan eylemler; gelişim; düzeltici faaliyetler; iç denetimler; kalite yönetimi incelemeleri olarak belirtilmiştir. ISO 20387’nin “TS ISO 20387-Biyoteknoloji – Biyobankacılık – Biyobankacılık İçin Genel Gereklilikler” başlığı ile 19.03.2020 tarihinden itibaren TSE tarafından yürürlüğe alındığı görülmüştür (209). Ayrıca, ülkemizde biyobankacılık ile ilgili rastlanan tek doküman olan, İstanbul Üniversitesi’nin hazırlamış olduğu rehber incelenmiştir.

3.1.5. İş Akışları, Standart Uygulama Yöntemleri ve Kalite Araçları

Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan iş akışları ve kalite araçlarından biri olan balık kılıçığı diyagramları draw.io programından faydalanılarak oluşturulmuştur. Standart Uygulama Yöntemleri için Microsoft Word’de hazırlanan şablon kullanılmıştır.

Balık kılıçığı diyagramı veya Ishikawa diyagramı, temel kalite araçlarından biridir (210). İlk kez Kaoru Ishikawa tarafından kullanılmıştır. Sonuçları ortaya çıkaran sebepleri sunmak, görselleştirmek ve üzerinde çalışmak için iyi bir araçtır. Balık kılıçığı diyagramının genel uygulama alanı, ürün tasarımı ve kalite hatalarının engellenmesidir. Problemi yaratan tüm sebepler bazı değişkenlerden dolayı oluşur. Sebepler genellikle bu kaynakları tespit edebilmek için ana kategorilere ayrılır. Öncelikle, sebepleri araştırılacak ilgili kalite unsuru grafiğin en sağına yazılır. Daha sonra ana ve alt sebepler grafiğe eklenerek diyagram tamamlanır.

3.1.6. Bilgi Yönetim Sistemi

213S181 no.lu TUBİTAK Projesinin iş paketlerinde oluşturulan Bilgi Yönetim Sistemi, tez çalışmaları kapsamına da dâhil edilen bilgiler ışığında, H.Ü. Teknokent Firması – Hemosoft Bilişim ve Eğitim Hizmetleri A.Ş. tarafından geliştirilmiştir.

3.2. Laboratuvar Materyali ve Uygulama Yöntemleri

Çalışmamızda MKH ve uPKH'ler (2 ayrı grup uPKH: i-Çalışmamız kapsamında yeni geliştirilenler; ii-TÜBİTAK 1003 - 213S181 no.lu “Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Banka Teknolojileri”/uPKH Prototip Projesi kapsamında geliştirilmiş ve dondurulmuş olarak saklananlar) olmak üzere iki hücre tipinde analizler gerçekleştirilmiştir. uPKH geliştirme ve karakterizasyon çalışmalarında, uPKH Prototip Projesi kapsamında geliştirilen yöntemler kullanılmıştır (206). MKH'ler ve uPKH'ler, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyobankası'nda geliştirilen ve dondurularak sıvı azotta saklanmakta olan arşiv materyallerinden kullanılmıştır. Her iki hücre tipi (MKH'ler ve bunlardan geliştirilen uPKH'ler) için de H.Ü. Girişimsel Olmayan Etik Kurul (İzin no: GO 16/824-27 Karar no: 01, Sayı no: 16969557-53) kararı ile onaylanan ve kademeli biyobanka onam formu imzalatılmış örnekler kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar için ayrıca etik kurul onayı (H.Ü. Etik Kurulu Karar no: GO 18/518-50, Sayı no: 16969557-1057) alınmıştır.

uPKH elde etmek için başlangıç hücresi olarak kullanılan MKH'ler, sağlıklı kemik iliği nakli vericilerinden elde edilmiştir. MKH'lerle, YP başlatılan/tamamlanan uPKH'ler, morfolojik, elektron-mikroskopik incelemelerin yanı sıra, metabolik/mitokondriyal parametreler (ROS düzeyi ve mitokondri kütlesi), köklülük (ALDH enzim aktivitesi), yüzey belirteçleri (CD29, Oct4 ve SSEA-4) ve pluripotenslik gen ifadeleri yönünden karşılaştırılmıştır. Aynı analizler, YP aşamasında veya sonrasında kısmi programlanmış/farklılaşmaya yönelmiş veya tam programlanmış erken veya geç pasajlardaki (p6 ile >p20) uPKH'ler ile besiyeri değişim periyoduna müdahale edilerek beslenen uPKH'lerde de yapılmıştır. Herhangi bir müdahale yapılmadan ilerlenilen YP süreci, “Standart Yeniden Programlama Süreci” olarak ifade edilmiştir. Deney grupları şu şekilde tasarlanmıştır:

A. Standart koşullarda YP ve uPKH kültür sürecinin incelenmesi

1. YP Süreci
2. uPKH kültür süreci - erken ve geç pasaj uPKH'lerin incelenmesi

B. Olumsuz koşullar oluşturularak veya alternatif besiyeri kullanılarak YP ve uPKH kültür sürecinin incelenmesi

1. Besleme periyodu değişikliği (hergün & üç günde bir) yapılan uPKH'lerin incelenmesi
2. Besiyeri değişikliği (E8 Flex/StemFlex) yapılan uPKH'lerin İncelenmesi

Tüm gruplarda değerlendirme parametreleri:

- a. Morfolojik açıdan (ışık ve elektron mikroskopik)
- b. Metabolik/Mitokondriyal parametreler ve köklülük açısından (ROS, MT, ALDH)
- c. Yüzey belirteçleri açısından (CD29, Oct4 ve SSEA-4)
- d. Pluripotential gen ifadesi açısından

3.2.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

MKH Çözme

Deneyleerde, daha önceden dondurulmuş halde bulunan MKH'ler (uPKH elde etmede kaynak hücre olarak ve uPKH'ler ile karşılaştırma deneylelerinde kontrol olarak) ve uPKH'ler kullanılmıştır. MKH'lerin maruz kaldığı dondurma besiyeri içeriği: %70 DMEM (LG: low glucose), %20 fetal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS ve %10 DMSO'dan oluşmaktadır.

MKH'ler azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'deki su banyosu içerişine, tüp boyunu geçmeyecek şekilde daldırılarak hafifçe karıştırılmış, kriyovial tüp içerişindeki buz parçası iyice ufaldığında, hızlıca sudan çıkarılmış ve %70'lik etanol yardımıyla etrafı temizlenmiştir. 15 ml'lik falkon tüp içerişine oda ısısındaki DMF10 besiyerinden konularak pastör pipet yardımıyla tüpün içeriği tamamen alınıp besiyeri konulmuş olan falkon tüpe aktarılmıştır. Falkon tüp, 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüj (Eppendorf 5804R, Rotor S-4-72, 3234×g (4200 rpm)) edilmiştir. Santrifüj işleminde ve süpernatant atıldıktan sonra pelet, falkonun kenarına yavaşça vurularak çözdürülmüştür. Üzerine, oda ısısındaki DMF10 besiyeri eklenmiş ve süspansiyonu köpürtmeden yavaşça al-ver yapılarak karıştırılmıştır. Süspansiyonun tamamı alınarak damla damla halinde ekilen hücre kabının her yerine homojen dağılacak şekilde ekim yapılıp, 37°C'deki inkübatöre kaldırılmış ve 72 saat hiç hareket ettirmeden kültür edilmiştir. 3-4 günde bir besiyeri değişikliği ile %80 konfluentliğe ulaşana kadar

besleme devam ettirilmiştir. MKH'ler için çözüldüğü gün ve kültürün 3 gününde olmak üzere iki kez mikoplazma testi (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza) yapılmıştır.

uPKH Çözme

uPKH'ler azot tankından çıkarılmadan önce hücre ekimi yapılacak olan hücre kabı hazırlanmıştır. Bunun için oda ısısındaki E8 besiyeri (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) içerisine 2,5 uM ROCK inhibitörü (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) eklenmiştir. Daha önce matrijel (Corning, NY, USA) ile kaplanmış olan hücre kabına bu besiyerinden bir miktar eklenerek 37°C'deki etüve kaldırılmış ve en az 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha önce, %60 FBS, %30 E8 ve %10 DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş olarak azot tankındaki kriyoviallerde saklanmakta olan uPKH'ler çıkarılarak hızlıca, 37°C'deki su banyosu içerisine, tüp boyunu geçmeyecek şekilde daldırılarak hafifçe karıştırılmış, kriyovial tüp içerisindeki buz parçası iyice ufaldığında, tüp sudan çıkarılmış ve %70'lik etanol yardımıyla etrafı temizlenmiştir. 15 ml'lik falkon tüp içerisine 37°C'deki E8 besiyerinden konularak pastör pipet yardımıyla tüpün içeriği tamamen alınıp E8 besiyeri konulmuş olan falkon tüpe aktarılmıştır. Falkon tüp, 1030 rpm (200 g) hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden ve süpernatant atıldıktan sonra pelet, falkonun kenarına yavaşça vurularak çözdürülmüştür. Üzerine oda ısısındaki ROCK inhibitörü içeren E8 besiyeri eklenmiş ve süspansiyonu köpürtmeden yavaşça al-ver yapılarak karıştırılmıştır. Süspansiyonun tamamı alınarak daha önce ROCK inhibitörlü besiyeri eklendikten sonra inkübatörde bekletilmiş olan hücre kabının her yerine homojen dağılacak şekilde (damla damla) ekim yapıp, 37°C'deki inkübatöre kaldırılmış ve 24 saat hiç hareket ettirmeden kültür edilmiştir. Bir sonraki günden itibaren, %80 konfluentliğe ulaşana kadar günlük E8 besiyeri ile besleme devam ettirilmiştir.

MKH Kültürü

Azot tankından alınarak hücre kültürü için çözülen sağlıklı donör kemik iliği kaynaklı erken pasajlardaki (<P4) MKH'ler, cm²'de 1500-3500 hücre olacak şekilde, %10 FBS, %1 L-Glutamin (Gibco, Grand Island, NY), %40 MCDB (Sigma-Aldrich

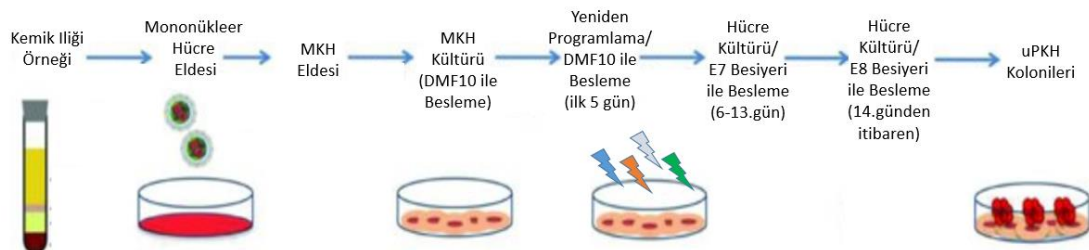
Chemical Co. St. Louis) ve %60 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose (DMEM-LG, Gibco, Grand Island, NY) içeren besiyeri (DMF10) bulunan kültür kaplarına ekilerek, çoğalmaya bırakılmıştır. Deneylede ihtiyaç duyulan hücre miktarına göre, T-25 (25 cm²/50000-150000 hücre/5 ml besiyeri), T-75 (75 cm²/150000-250000 hücre/10 ml besiyeri) veya 6 kuyucuklu plak (10 cm²/100000-150000 hücre/2 ml besiyeri) kültür kaplarına ekilen hücreler, 3-4 günde bir besiyeri değişimi ile 7-10 gün boyunca kültür edilmiş ve her besiyeri değişikliği öncesinde hücreler mikroskop (Olympus CKX41, Olympus Co. Ltd., Tokyo, Japan) altında incelenerek fenotipik özellikleri ve çoğalma yetenekleri açısından takip edilmiştir. Flask yüzeyine yapışarak çoğalan MKH'ler %70-90 yoğunluğa (konfluens) ulaştığında, kültür besiyeri atılıp, PBS ile yıkanma sonrası, hücre yüzeyini kapatacak miktarda accutase (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) hücre kaldırma solüsyonu eklenerek, 5-10 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Kaldırılan MKH'ler üzerine DMF10 besiyeri ilave edildikten sonra steril falcon tüpe aktarılmış, santrifüj edilerek gereksinim duyulan hücre sayılarına göre pasajlanmış veya deneylede kontrol hücreleri olarak kullanılmıştır.

3.2.2. MKH'lerden uPKH Eldesi/Yeniden Programlama

Çalışmamızda besleyici tabaka içermeyen (feeder-free) kültür yöntemi uygulanmış, gen aktarımı için vektör olarak Sendai virüs kullanılmıştır. Kaynak hücre olarak seçilen erken pasajdaki (p1-p3) MKH'ler yeterli konfluentliğe eriştiğinde pasajlama yapılarak 3 farklı konsantrasyonda (1×10^5 - $1,25 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$) %0,1 jelatin (Sigma, Aldrich) kaplı kuyucuklara ekilmiştir. Ertesi gün hücre sayısının iki katına çıktığı varsayılan hücreler kit (CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Life Technologies, Grand Island, NY) protokolünde önerilen virüs miktarının hesaplanarak (hKOS-hKlf4, hOct4, hSox2:hcMyc:hKlf4/5:5:3) eklendiği DMF10 besiyeri içerisinde tutulmuş ve 5. güne kadar her gün DMF10 besiyeri değişimi ile 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültürü sürdürülmüştür. (Sendai Viral Genom Belirteci: FP5'-GGATCACTAGGTGATATCGAGC-3', RP 5'-ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC--3', Thermo Fisher CytoTune-iPS Sendai Reprogramming- A16517) Uyarımın 5. gününde bulunduğu hücre kabından accutase ile kaldırılan hücreler, cm² başına 1500-3500 hücre olacak şekilde (10 mm

petki kabı/60 cm²), DMF10 besiyeri içerisinde %0,01 matrijel ile kaplanmış plaklara ekilmiş ve ertesi günden itibaren TeSR-E7 besiyeri (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) ile beslenmeye başlamıştır ve günlük değişim yapılmıştır. TeSR-E7 besiyeri serum içermeyen, protein içeriği düşük, hayvansal komponent içermeyen ve yeniden programlama vektörlerinin aktarımı için uygun olan bir besiyeridir. TeSR-E8 besiyeri içeriğinden TGF- β çıkarılarak fibroblastoid hücrelerin proliferasyonunun baskılanması ve MET uyarılması için uygun bir ortam oluşması sağlanmaktadır. Bu ortamda kültür edilen hücrelerin morfolojik değişimi ve gelişimi her gün mikroskopta (EVOS XL Core Cell Imaging System, Life Technologies) incelenerek fotoğraflanmıştır. Uyarımın (yeniden programlamanın 14. gününde hücreler, uPKH idame/çoğaltma besiyeri olan TeSR-E8 ile beslenmeye başlamış ve deneyler yapılan dek besleme günlük olarak sürdürülmüştür. TeSR-E8 ortamı, uPKH'lerin idamesinde sık kullanılan, albümin içermeyen, protein içeriği düşük, feeder-free uPKH kültürü için uygun olup DMEM/F12, L-ascorbic acid-2-phosphate magnesium (64 mg/l), sodium selenium (14 μ g/l), fibroblast growth factor 2 (FGF2) (100 μ g/l), insulin (19.4 mg/l), NaHCO₃ (543 mg/l), transferrin (10.7 mg/l), TGF- β 1 (2 μ g/l) veya NODAL (100 μ g/l) içermektedir. İnsülin ve FGF2'nin, hücrelerin sağ kalımı ve çoğalmasında, L-ascorbic acid (Vitamin C, LAA)'in hücrelerin çoğalmasında, selenyumun kültürün çoğaltılarak devamlılığında, NODAL ve TGF- β 'nin ise pluripotensite faktörlerinden Nanog'un ifade düzeyini artırarak uzun vadeli kültür kararlılığının sağlanmasında etken olduğu gösterilmiştir (211). YP için kullanılacak viral yük aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır, MOI ve virüs titresi için değerler kit içeriğinde belirtilmektedir.

$$\text{Hücre başına düşen gerekli virüs miktarı} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times \text{MOI}}{\text{Virüs titresi}}$$



Şekil 3.1. uPKH elde etme süreci.

3.2.3. uPKH İdame ve Çoğaltılması

Pasaj Durumlarına Göre (Erken pasaj: p0, p6, p7 ve p8 – Geç pasaj: ≥p20)

Tübitak 1003 “uPKH Banka prototipi” projesi kapsamında MKH'lere Sendai Viral vektör ile embriyonik genlerin (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) aktarılması sonucu oluşturulmuş ve belli pasajlarda (p5, p10, p15, p20) karakterize edilerek dondurularak saklanmakta olan uPKH'lerden erken ve geç pasajdaki örnekler seçilerek çözülmüş ve TeSR-E8 besiyerinde kültüre alınmıştır. Hücreler istenilen yoğunluğa/pasaja erişene dek besiyeri günlük olarak tazelenmiştir. Hücrelerin büyüme ve çoğalma hızına göre pasajlama süresi 7-10 gün olarak belirlenmiştir. uPKH'ler için çözüldükten sonraki 3 günde ve uzayan pasaj süreçlerinde (Örn. 5 pasajdan sonra) mikoplazma testi yapılmıştır.

Besleme Periyodlarına Göre

uPKH Banka prototipi projesi kapsamında dondurularak saklanmakta olan uPKH'ler çözüldükten sonra TeSR-E8 besiyeri ile her gün (farklılaşmamış/iyi koloni) veya 3 günde bir beslenerek (farklılaşmaya başlamış/kötü koloni) ışık ve elektron mikroskopisi ile morfolojik olarak gözlemlenmiştir.

Besiyeri İçeriklerine Göre

uPKH Banka prototipi projesi kapsamında üretilerek belirli pasajlarda E8 besiyeri içerisinde dondurulmuş olan hücreler, matrijel kaplı ve E8 besiyeri içeren hücre kaplarına ekilmiş ve ertesi günden itibaren hücrelerin bir kısmı bu besiyeri ile beslenmeye devam ettirilirken, diğer kısmı FGF2 aktivitesi artırılarak geliştirilmiş ve uPKH kolonileri için her gün besleme gereğini ortadan kaldıran E8 flex (Gibco, ThermoFisher Scientific, Cat. No. A2858501) veya StemFlex (Gibco, ThermoFisher Scientific, Cat. No. A3349401) besiyeri ile üç günde bir olmak üzere beslenmeye devam ettirilmiştir. Hücre büyüme hızına göre pasajlama süresi 3-6 gün arasında değişiklik göstermiştir.

3.2.4. Hücrelerin Toplanması/Kaldırılması

uPKH Banka prototipi projesi kapsamında üretilerek belirli pasajlarda dondurulmuş uPKH'ler kültür sürecinde istenilen yoğunluğa (%70-90 konfluentlik) eriştiklerinde, bulunduğu hücre kabındaki yüzeylerini kapatacak miktarda DPBS (Ca ve Mg içermeyen) (Gibco, Life Technologies, #14080048) ile en az bir kez yıkandıktan sonra aşağıdaki farklı kaldırma/toplama yöntemleri uygulanmıştır. uPKH'ler, pasajlama sürecinde istenildiği gibi koloni olarak kaldırılacağına EDTA, yeniden programlamanın ilk aşamasında veya akım sitometri gibi deneyler için tek hücre olarak kaldırılacağına, akutaz rutin olarak tercih edilmiştir. Scrapper ve collagenase ise süreçlerde deneme amaçlı kullanılmış, sık kullanım için tercih edilmemiştir.

EDTA

Koloni olarak kaldırılmak istenen hücreler için EDTA kullanılmıştır. 0,5 mM EDTA (Gerbü, #1034) hücrelerin üzerini kapatacak miktarda eklenmiş ve 37°C'de 5-7 dk. bekletme sonrası yavaş pipetleme hareketleri ile hücre kabı yıkanarak hücreler toplanmıştır.

Akutaz (Accutase) Enzimi

Tek hücre olarak kaldırılmak istenen hücreler için akutaz (Innovative Cell Tech. ,Cat# AT104) kullanılmıştır. Akutaz, hücrelerin üzerini kapatacak miktarda eklenmiş ve 37°C'de 5-10 dk. bekletme sonrası yavaş pipetleme hareketleri ile hücre kabı yıkanarak hücreler toplanmıştır.

Hücre Kazıyıcı (Cell scrapper)

Tek kullanımlık steril haldeki hücre kazıyıcı (25 cm, VWR International) yardımıyla hücreler yavaş hareketler ile hücre kabından kazanmış ve üzerine eklenen besiyeri ile pipetlenerek toplanmıştır.

Kollojenaz Enzimi

Kollajenaz Tip 4 (Collagenase Type IV, Gibco, Life Technologies, Cat# 17101015) hücrelerin üzerini kapatacak miktarda eklenmiş ve 37°C'de 30-60 dk.

bekletme sonrası yavaş pipetleme hareketleri ile hücre kabı yıkanarak hücreler toplanmıştır.

3.2.5. uPKH Karakterizasyonu, Metabolik/Mitokondriyal Analizler

Morfolojik İnceleme

MKH ve uPKH'ler, deney planına göre her gün, üç günde bir veya belirlenen deney günlerinde ışık ve/veya elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir.

– Işık Mikroskopisi (Inverted Mikroskop)

MKH ve uPKH'ler kültür süreçleri boyunca her gün inverted mikroskop (Olympus CKX41, Olympus Co. Ltd., Tokyo, Japan) ile incelenmiş ve laminar kabin içi mikroskop (EVOS XL Digital Inverted Microscope, Invitrogen) ile fotoğraflanmıştır. İnceleme büyüklüğü olarak genelde 4X kamera kullanılmış, 10X, 20X ve 40X büyütmelemlerde fotoğraflar da alınmıştır.

– Elektron Mikroskopisi

Deney planına uygun kaldırma protokolüne göre kaldırılarak santrifüj edilip pelet haline getirilen hücreler (test olarak çeşitli pasajlardaki veya farklılaşmış/farklılaşmamış uPKH'ler ile kontrol amaçlı olarak MKH'ler) kendi besiyerleri içerisinde 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra %2.5 glüteraldehit ile 2 saat oda ısısında fikse edilmiş ve glüteraldehitin uzaklaştırılması için hücre peleti 0.1 M fosfat tampon solüsyonu ile 1200 rpm'de 3 kez 5'er dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Postfiksasyon için hücre peleti osmium tetroksit ile oda sıcaklığında, karanlık ortamda 1 saat fikse edilmiş ve 0.1 M fosfat tampon solüsyonu ile 1200 rpm'de 3 kez 5'er dk santrifüj edilerek osmium tetroksit uzaklaştırılmıştır. 12.5 ml distile su içerisine 0.25 gr agar konularak erlenin içerisinde, içinde su bulunan beherde kısık ateşte ısıtılarak, şeffaflaşmaya kadar kaynatılıp etüve konulmuştur. Hücreler fikse edildikten sonra hücre peleti %2'lik agara gömülmüş ve takip için Leica EM TP cihazına alınmıştır. Takip cihazında 0,1M fosfat tampon solüsyonu ile 45 dakika yıkanarak dehidratasyonu sağlamak için sırayla ve aşağıda belirtilen süreler boyunca %50, %60, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirilmiştir.

- %50 alkol.....15 dakika
- %60 alkol.....15 dakika
- %70 alkol.....15 dakika
- %80 alkol.....10 dakika
- %90 alkol.....10 dakika
- %96 alkol.....10 dakika
- %100 alkol.....15 dakika

Örnekler daha sonra propilen oksit ile iki defa 15 dakika yıkanmıştır. Sudan kurtarılan hücre parçaları bloklanmadan önce dörtlü plastik karışımda alıştırılmıştır. Alıştırma yapılırken hücreler aşağıdaki süreçlerden geçirilmiştir:

- 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımda..... 2 saat
- 1 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımda..... 2 saat
- 1 ölçü propilen oksit + 3 ölçü dörtlü plastik karışımda..... 8 saat
- Plastik karışımda 10 saat tutulduktan sonra dörtlü plastik karışımla bloklanarak 60°C inkübatörde 48 saat polimerize edilmiştir.

Leica RM 2265 mikrotomunda alınan 1µm yarı ince kesitler %1'lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi-Azur II karışımında boyanmıştır. TEM de incelenecek alanın belirlenebilmesi için DC490 dijital kameraya (Leica, Wetzlar-Germany) bağlı Leica DM6000B (Wetzlar-Germany) mikroskop ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Elektron mikroskopunda görüntü alabilmek için Leica Ultracut R ile 70 nm'lik ince kesitler bakır gridler üzerine alınmıştır. Gridler Leica EM AC20 cihazı kullanılarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra JEOL-JEM 1400 elektron mikroskop ile incelenerek CCD kamera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) ile fotoğraflanmıştır.

– Floresans Mikroskopisi

MKH (kontrol grubu) ve uPKH (test grubu) kültürlerinden elde edilen hücreler (1 kuyu/6 kuyucuklu plak veya 1 bölme/4 bölmeli slayt, Eppendorf, #0030742.060) %80-90 yoğunluğa eriştiklerinde buldukları hücre kaplarından akutaz ile kaldırılarak santrifüj edilmiş ve MitoTracker boya, CM-H₂DCFDA belirteci ve Aldefluor kit bileşenleri ile muamele edilerek 30-60 dk. 37°C'de inkübasyon

sonrasında Leica (DMI6000 B, CTR600) veya Olympos (DP71 CKX41) floresans mikroskop ile görüntülenmiştir.

Akım Sitometrik Analizler

– Yüzey Belirteçlerinin İncelenmesi

uPKH karakterizasyonuna yönelik, bulunduğu hücre kabından kaldırılan koloniler (en az 2 kuyu/6 kuyucuklu plak – Eppendorf, #0030720113) DPBS ile iki kez yıkandıktan sonra hücrenin pluripotent özelliğinin belirlenmesi amacıyla hücre yüzey belirteci (SSEA-4) (BD Company, Franklin Lakes, NJ) ve hücre içi belirteç (Oct4) (BD Company, Franklin Lakes, NJ) ile boyanmıştır. Yeniden programlanma sürecinde başlangıç hücre özelliklerinin kaybolduğunun gösterilmesi amacıyla negatif kontrol olarak MKH belirteci olan CD29 (BD Company, Franklin Lakes, NJ) ile boyanmış ve hücrelerin belirteçlerle muamelesi sonrasında, ifade düzeyleri açısından BD Accuri C6 akım sitometri cihazı (BD Accuri C6 flow cytometer system, Belgium) ile değerlendirme yapılmıştır.

– Metabolik/Mitokondriyal Parametreler ve Köklülük Belirteçlerinin İncelenmesi

Kültür edilen uPKH'ler akutaz enzimi uygulaması ile kültür kabından kaldırılmıştır. MT, ROS ve ALDH seviyelerinin akım sitometri ile ölçülmesi için belirli miktarda hücre (özellikle koloni olarak büyüyen hücrelerde sayım yapılmamış ve en az 6 kuyucuklu plaktan %70-90 konfluent olan 1 kuyucuk dolusu hücre) FACS tüplerine (BD Falcon Round Bottom Tubes) ayrılmıştır. Hücre miktarına göre uygun oranda MitoTracker Green FM (M7514, Invitrogen)/CM-H₂DCFDA (General Oxidative Stress Indicator, C6827, Invitrogen)/ALDH kit (Aldefluor, Stem Cell Tech., #01700) solüsyonları eklenmiş ve kit protokolüne göre gerekli inkübasyon/santrifüj sürecinden sonra PBS içerisindeki hücreler için BD Accuri C6 FL1 (FITC) kanalından okuma yapılmıştır. Kontrol amaçlı olarak MKH'ler kullanılmıştır.

ROS Düzeyi Ölçümü

Kök hücre işlevi için kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki dengenin korunması oldukça önemlidir. Bu dengenin korunmasına aracılık eden bileşenlerden

olan ROS (212), YP sürecinde değişiklik gösteren parametrelerdendir ve hücrede moleküler oksijenin tek elektron indirgemesinden kaynaklanmaktadır. ROS, hücre metabolizmasının zararlı bir yan ürünü olmasının dışında hücre kaderi sinyalleşmesinde ikinci bir haberci olarak hareket etmektedir (213). ROS, farklı tekniklerle hücre içi olarak tespit edilebilmektedir. Geçirgen bir kimyasal olan 2',7' – dichlorofluorescein diasetat (DCFDA/H₂DCFDA) florojenik bir boya olup, hücre içerisindeki hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen radikal aktivitelerini ölçer. Hücreye difüzyonu sonrasında selüler esterazlarla deasetile olur ve floresans olmayan bir bileşik meydana gelir. Bu bileşiğin ROS ile oksitlenmesi ile yüksek floresansa sahip (eksitasyon/emisyon: 485 nm/530 nm), 2',7'–dichlorofluorescein (DCF) oluşur. (214).

Hücrelerin mitokondri aktivitesi ile ilişkili olarak ROS düzeyleri hakkında fikir edinmek amacıyla hücreSEL ROS kit, CM-H₂DCFDA kullanılmıştır. CM-H₂DCFDA; H₂DCFDA'nın klorometil türevidir, intraselüler kovalen bağla bağlanır. Canlı hücrelerde daha fazla tutulur. Asetat gruplarının selüler esterazlarla parçalanması sonucu açığa çıkan tiyol-reaktif klorometil grubu intraselüler glutatyon ve diğer tiyollerle reaksiyona girer. Oksidasyonu sonucu floresans uzun süre hücrede kalır.

ROS düzeylerinin belirlenmesi amacıyla MKH (kontrol grubu) ve uPKH (test grubu) kültürlerinden elde edilen farklı pasajlar ve besleme periyotlarındaki hücreler (~1 kuyu/6 kuyucuklu plak) %80-90 yoğunluğa eriştiklerinde buldukları hücre kaplarından enzimatik yöntem ile kaldırılarak santrifüj edilmiş ve 5µM CM-H₂DCFDA ile 30 – 45 dk 37 °C'de inkübasyon sonrası akım sitometrik (BD Accuri C6 Flow Cytometer System, Belgium) olarak değerlendirilmiştir.

MT Boyası ile Mitokondriyal Kütle/Kitle ve Aktivite Analizi

Mitokondriyal kütle ile ilgili temel bilgi vererek mitokondriyal aktivite ile ilgili yorum yapmaya imkân veren MT boyası, yaygın belirteçlerden biridir (215). MT, mitokondri için seçici, floresan bir boyadır. Plazma membranından pasif difüzyonla geçer, mitokondriyal proteinlere (sistein kalıntılarının/rezidülerin serbest tiyol gruplarına) bağlanarak mitokondride birikir. Bu boya konsantrasyonu, iç mitokondri membranının pH'ının etkisiyle mitokondri matriksinde diğer organellere göre 300 kez

yüksektir. Mitokondriyal proteinlerin bir kısmına kovalent bağla bağlanır. Muhtemelen bütün mitokondri kitlesi yerine iç mitokondriyal membran yoğunluğu ile daha yakından ilgilidir. Bu boya aktif mitokondrilerde birikir. Bu nedenle mitokondri aktivitesi hakkında da fikir verdiği şeklinde yorumlanabilir.

Mitokondriyal kitle ve aktivite hakkında fikir edinmek amacıyla MKH (kontrol grubu) ve uPKH (test grubu) kültürlerinden elde edilen farklı pasajlar ve besleme periyotlarındaki hücreler (~1 kuyu/6 kuyucuklu plak) %80-90 yoğunluğa eriştiklerinde buldukları hücre kaplarından enzimatik yöntem ile kaldırılarak santrifüj edilmiş ve 200 nM MitoTracker Green FM ile yaklaşık 30 dk – 37°C’de inkübasyon sonrası akım sitometrik olarak değerlendirilmiştir.

Köklülük (ALDH) Düzeyinin Belirlenmesi

ALDH ifadesi (ALDH1A1) kök ve öncü hücrelerin seçilmesinde ve köklülük düzeyinin belirlenmesi için kullanılmıştır. ALDH enzimleri aldehitleri detoksifiye eder. Köklülük seviyeleri incelenirken ALDH ifadesinin yüksekliği kullanılmaktadır (216, 217). ALDH-parlak ifade eden hücrelerin, köklülüğü yüksek olanlardan zengin olduğu gösterilmiştir. MKH (kontrol grubu) ve uPKH (test grubu) kültürlerinden elde edilen farklı pasajlar ve besleme periyotlarındaki hücreler (~1 kuyu/6 kuyucuklu plak) %80-90 yoğunluğa eriştiklerinde buldukları hücre kaplarından enzimatik yöntem ile kaldırılarak santrifüj edilmiş ve ALDEFLUOR™ Kit protokolü uygulaması sonrası akım sitometrik olarak değerlendirilmiştir.

Gen İfade Analizleri

Pluripotenslik belirteçleri olan Endo Oct4 (Endogenous Octamer-binding transcription factor), Sox2 (SRY (sex determining region Y)-box), Nanog (Nanog Homeobox), cMyc (cMYC binding protein, MYCBP, pseudogene), Klf4 (Kruppel like factor 4), Rex1 (RNA exonuclease 1 homolog pseudogene;), DNMT3a (DNA methyltransferase 3 alfa), UTF1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1), CDH1 (Cadherin 1), TERT (Telomerase reverse transcriptase;) için gen ifade düzeyleri incelenmiştir. RNA izolasyonundan itibaren işlem basamakları aşağıda verilmektedir.

– RNA izolasyonu

Bulunduğu hücre kabından enzimatik yöntem ile hücre kaldırma protokolümüze göre kaldırılan hücreler, santrifüj edildikten sonra üzerine 300 µl RNA Protect Cell Reagent (Qiagen) eklenerek çalışma gününe kadar -80°C’de bekletilmiştir. RNA izolasyonunun yapılacağı gün derin dondurucudan çıkarılan hücreler, oda ısısında çözülmüş ve üzerine 300 ul Qiazol (Qiagen) eklenmiştir. 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 200 ul kloroform eklenmiş ve 2-3 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler, +4°C’deki santrifüjde 12000xg’de 15 dk döndürülmüştür. Santrifüj sonrası 3 faz görülen tüpteki en üst faz (RNA içeren) dikkatlice toplanarak ependorf tüpe alınmıştır. Üzerine isopropanol eklenmiş ve alt-üst yaparak karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 12000xg devirde 10 dk +4 °C’de santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. %75’lik etanol eklendikten sonra vortekslenen tüpler 7500xg 5 dk +4°C’de santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılmış olan tüplerdeki pelet, önce kurutma kâğıdında ters çevrilerek 5-10 dk kurutulmuş ardından üzerine su eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. RNA örnekleri, 55°C’de 5 dk boyunca inkübe edildikten sonra nanodrop cihazı (NanoDrop Technologies, ND-1000) ile RNA ölçümleri (A260/A280) ng/µl olarak yapılmış ve örnekler cDNA eldesine kadar -20°C’ye kaldırılmıştır.

– cDNA Eldesi

-20°C’den alınan RNA örneklerinden cDNA elde etmek üzere kit (SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit, Biorline) protokolü uygulanmıştır. cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon karışımına eklenecek olan RNA miktarları (X) 1000ng’a göre hesaplanmıştır (Formül: $1000 \text{ ng} \times 1 = 176 \text{ ng}/\mu\text{l} \times X$). Karışım hacmi 20 µl olan reaksiyon, T100 Thermal Cycler (BIO-RAD)’da aşağıdaki program doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA eldesi için işlem süreci.

Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi	İşlem Basamağı
25°C	10 dk	Primer bağlanma
42°C	15 dk	Ters transkripsiyon
85°C	5 dk	İnaktivasyon
12°C	1 dk	Bekletme

– RT-PCR

RT-PCR çalışması kit (iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, BIO-RAD) protokülüne göre, MICPCR Biomolecular Systems cihazında aşağıdaki program doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. RT-PCR için işlem süreci.

Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi	İşlem Basamağı
25°C	5 dk	Primer bağlanma
46°C	20 dk	Ters transkripsiyon
95°C	1 dk	İnaktivasyon

Tablo 3.3. RT-PCR’da kullanılan primerlere ait diziler.

Gen Adı	Primer Dizisi	
Beta-Actin	FP	5'-AAAATCTGGCACCACACCTTC-3'
	RP	5'-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'
Endo-OCT4	FP	5'-AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG-3'
	RP	5'-ACTTCACCTCCCTCCAACC-3'
Endo-SOX2	FP	5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG-3'
	RP	5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3'
NANOG	FP	5'-CTCTCCAACATCCTGAACCTC-3'
	RP	5'-ACACCATTGCTATTCTTCGG-3'
cMYC	FP	5'-GGATTCTCTGCTCTCCTCGAC-3'
	RP	5'-CTTCCTCATCTTCTTGTTCCT-3'
KLF4	FP	5'-AAACCTACACAAAGAGTCCCAT-3'
	RP	5'-TTTCCATCCACAGCCGTCCA-3'
REX-1	FP	5'-AACAGGATGAAGCAGATTAACAGA-3'
	RP	5'-TGTAGGAGCATCTTAGTAACACC-3'
DNMT3a	FP	5'-CCTCAAACCAACAACACGCAAC-3'
	RP	5'-TCTGATCTTCATCCCCTCGGTCT-3'
UTF-1	FP	5'-AGTTCCTTAAAGACAAGTTTCGC-3'
	RP	5'-CAGCAGCCCCATGAGCTTCC-3'
CDH-1	FP	5'-ACCTTCTCCCAATACATCTCC-3'
	RP	5'-TTGTAGTCACCCACCTCTAAGGC-3'
TERT	FP	5'-TGG TGA ACT TGC GGA AGA C-3'
	RP	5'-CGG TTG AAG GTG AGA CTG G-3'

3.2.6. Veri Analizleri

Sayısal ve görsel veriler, mikroskopik incelemeler ve laboratuvar cihazları kullanılarak elde edilmiştir. Deneylerin büyük bir kısmı, H.Ü Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları’nda bulunan cihazlarla gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürleri, karbondioksit ve sıcaklık ayarlı inkübatörlerde; hücre gözlemleri, inverted ve floresans görüntü sağlayan görüntüleme sistemlerinde; MT boya ile ROS düzeyi ve ALDH enzim miktarlarının tayini akım sitometri cihazında yapılmıştır. Akım sitometri

deney sonuçları için istatistiksel analizler GraphPad Prism 8 kullanılarak, kontrol ve deney grupları arasında “one-way ANOVA” ile; iki grup arasında, t-test ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık ifadesi olan P değerine göre, P=0.05'ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı olarak kabul edilmiştir. RT-PCR veri analizlerinde Livak Metodu ($2^{\Delta\Delta Ct}$ Method, $2^{\Delta\Delta Ct}$) (218) kullanılmış, normalizasyon, β -Actin (housekeeping) genine göre yapılmıştır. Pluripotentialite seviyesinin farklı olduğu düşünölen hücreler ile kontrol hücrelerindeki mitokondrilerin detaylı morfolojik analizleri, H.Ü. Tıp Faköltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan elektron mikroskobu ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Bulguların birinci bölümünde, uPKH üretimi ve bankalanmasına yönelik kritik basamaklar detaylı literatür taramaları, standart, en iyi uygulama ve rehber incelemeleri sonucu yapılan değerlendirmeler ve mevcut bankaların analizi sonucu, araştırma amaçlı bir uPKH bankası için temel bir KYS çatısı altında belirlenen gereksinimler ve model banka için uygulanabilir öneriler sunulmaktadır. Pedi-Stem’de tamamlanmış olan “uPKH Banka Prototipi” - TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında elde edinilen deneyim eşliğinde dünyada da çok yeni olan “uPKH Bankacılığı” alanındaki bilgiler ışığında incelemeler/araştırmalar ile Pedi-Stem uPKH Banka modellemesi ve uPKH bankalama sürecinde kritik olan verim düşüklüğünü iyileştirmeye yönelik temel kalite araçlarından biri (balık kılçığı diyagramı) kullanılarak analizler yapılmıştır. Ülkemizde akraba evlilikleri sonucu kalıtsal/nadir hastalıkların sıklığının artmış olması ve H.Ü. İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesinin bu hastalıklar konusunda uzman bir merkez olması nedeniyle nadir hastalık uPKH bankası olacak şekilde bir modellemeye ağırlık verilmiştir. Bulguların ikinci bölümü ise laboratuvar uygulamalarından oluşmaktadır. Bu bölümde, uPKH karakterizasyonuna yönelik kalite süreci kapsamında, uPKH geliştirme ve ileri kültür aşamalarında istenmeden farklılaşmaya yönelerek verim düşüklüğünün sebebi olan koşulların erken tanınmasına olanak sağlayacak bir yaklaşım olarak, metabolik/mitokondriyal parametreler üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.

4.1. Literatür, Standart, Rehber Araştırma ve İnceleme Bulguları

4.1.1. Araştırma Amaçlı Bir uPKH Bankası için Kritik Noktalar ve Asgari Gereksinimler

Bir uPKH bankasının etkili ve faydalı olabilmesi için ihtiyaç duyduğu temel gereksinimleri derlemek üzere, 2013 yılında Mckernan ve arkadaşları (133) tarafından sunulan çıkarımlar incelenmiş ve katıldığımız/sonradan eriştiğimiz kongre, toplantı veya web sunumlarında görüştüğümüz veya dinlediğimiz uPKH araştırmaları ve bankacılığı alanında ciddi tecrübe sahibi bilim insanlarının üzerinde durduğu konular kendi bilgi ve birikimlerimizle harmanlanarak kritik noktalar ve gereksinimler 10 maddede derlenmiştir:

1. Doğal afet veya tüm bankadaki örnekleri riske atabilecek herhangi bir olumsuz durum düşünülerek banka güvenliğini sağlamak üzere ayna banka yapısının oluşturulması önemlidir.
2. Genetik bilgi ve ilgili tıbbi geçmiş ile birlikte uPKH'lerin üretilmesi için doku bağışını destekleyen bilgilendirilmiş bağışçı onam formları tutulmalı ve bağışçılar anonimleştirilmelidir.

Etik konusunun biyobankacılıktaki temel bileşeni olan onam formlarının ulusal ve uluslararası ilgili yönetmelik ve kanunlar doğrultusunda oluşturulması (Bu konuda, ülkemizde Mart 2016'da (6698 sayılı kanun), Avrupa'da Mayıs 2018'de yayımlanan Avrupa Veri Koruma Yönetmeliği dikkate alınmalıdır) gerekmektedir.

3. PKH'ler için standartların oluşturulmasında bilimsel otoritenin katkısı önemlidir. PKH'ler için, 2014 yılında yayımlanan, "Hücre Hatlarının Biyomedikal Araştırmalarda Kullanımı Rehberi" (219) ile İngiltere - Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontrol Enstitüsü (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) tarafından hazırlanmakta olan fiziksel standart, bu alanda önemli kaynaklardır.
4. Üretimden dağıtıma kadar uPKH bankalamayı oluşturan tüm süreçler için standart protokoller olmalıdır. Standart Uygulama Yöntemleri (SUY/Standart Operating Procedure, SOP) önemli bir bileşendir, eksiksiz ve güncel tutulmalıdır.

Standartlaştırılmış protokoller otomasyona geçişi kolaylaştırması açısından önemlidir ve otomasyon, büyük çaplı üretime açık olan uPKH hatları için elzem görünmektedir. Sadece kültür sistemine yönelik süreç bile düşünüldüğünde, genetik düzenleme teknolojisi için uygun kültür sistemi geliştirilmesi (220), ölçeklenebilir üretim ve dondurarak saklama sürecinde kullanıma yönelik mikrotarıyıcı geliştirilmesi (221), süspansiyon kültür sistemi geliştirilmesi (222), tek hücre pasajlama sistemi (223), ardından tek tabakalı kültür sistemi (224) ve daha sonra mikroorgan yapımı için 3 boyutlu birlikte kültür (co-culture) sistemi (225) gibi birçok önemli gelişmenin yaşandığı uPKH alanında, 2016'da gelinmesi öngörülen nokta, kliniğe yönelik kullanım için standardizasyon çalışmaları olmuş (141), paralel olarak dünyanın birkaç yerinde klinik uygulamalar başlatılmış olsa da çok değişkenli/alternatifli bu süreç halen (2020) tamamlanabilmiş olarak görünmemektedir. Bu tez kapsamında, araştırma

amaçlı uPKH bankası yer almakta olup, klinik amaçlı bankalama prosedürleri dâhil edilmemiştir.

Şu anda hücre çoğaltma ve karakterizasyon süreçlerini otomatikleştirmek mümkündür, ancak manuel müdahale gerektirmeyen tam otomatik bir sistem, henüz özellikle rutin kullanım için uygun görünmemektedir. Bununla birlikte, Kawasaki, Hamilton, New York Kök Hücre Vakfı (NYSCF), Tokyo Electron ve Tecan gibi bazı gruplar gelecekte rutin kullanım için mevcut olabilecek sistemlere doğru ilerlemektedir.

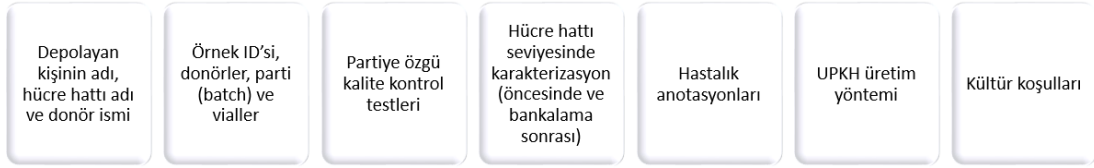
5. Farklılaşma ve belirli hücre tiplerine özgü özellikler sonrası ortaya çıkan fenotipik anormallikler ile ilgili takip mekanizması bulunmalıdır (Görüntü işleme teknolojisi ile mikroskopik ayırım yapılması gibi).
6. Dağıtım süreci için soğuk zincirdeki tüm parametreler kritiktir:
 - Sıcaklık (-80 kuru buz ya da -196°C kriyojenik)
 - Paketleme (Strofor kuru buz taşıyıcı, Cryoshipper)
 - Zamanlama (Yurt içi ve uluslararası rotalara göre değişebilir)
 - Dondurucu türü (Kuru buz veya sıvı azot)
 - Taşıyıcı performansı: Takip edilebilir (GPS ile) nakliyeler
7. Alandaki bilimsel zorluklar, genetik kararlılık, farklılaşma potansiyeli ve pluripotentlik gibi kalite ve karakterizasyon açısından kontrol testleridir. Pluripotentlik için halen ideal bir standart test sunulamamıştır. Oct4, Nanog ve Sox2 pluripotentlik belirteci olarak gerekli fakat yeterliliği net değildir, ileri testlere ihtiyaç vardır; örneğin, aktif (ökromatin) ve pasif (heterokromatin) transkripsiyon bölgeleri veya histon proteinlerinin DNA ile etkileşimlerinin belirlenerek bu etkileşimlerin gen ifadesi üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi yönünde fikir verebilen kromatin üzerinden epigenetik değerlendirme yapılabileceği önerilmektedir. ISCF önderliğinde Etik Çalışma Grubu ve ISCBI destekleriyle yürütülen projeler doğrultusunda bu alanda standart oluşturmaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır.

Pluripotentlik için teyit sağlayan bir başka test olan teratom, uzun zaman alan/emek-yoğun bir deney sürecini kapsadığından biyoinformatik temelli yenilikçi

alternatif testlerden yararlanılmalıdır. Teratom deneyi, insan pluripotent kök hücrelerinin tüm embriyonik germ katmanlarına farklılaşma kapasitesini test etmek için, bir süre altın standart olarak tercih edilen bir sistemi ifade etmektedir. Yaygın olarak kullanılsa da, bu nitel analizi nicel bir analize dönüştürmek üzere ancak 2015 yılında bir çalışma yapılmış ve bir algoritma (Teratoscore) geliştirilmiştir (226). Teratoscore ile gerekli dokuları temsil eden bir puan kartı ve bu puan kartına dayanan çevrimiçi, açık kaynaklı bir platform oluşturulmuştur. RNA-seq tabanlı olan TeratoScore, PKH'lerden türetilmiş teratomları malign tümörlerden ayırarak hücre potansiyelini kantitatif bir ölçüye (227) dönüştürmektedir. Teratom dışında embriyoid cisimciğin *in vitro* farklılaşması da fonksiyonel pluripotenzlik testi olarak önerilmektedir. Son yıllarda, farklılaşmamış hücrelerin pluripotenzlik durumunun RNA-seq tabanlı biyoinformatik analizine dayanan "Pluritest", fonksiyonel bir test olmasa da "score card" ile birlikte yeni altın standart olarak kabul edilmektedir. Pluritest, Cell Stem Cell ve Stem Cell Reports gibi kilit dergilerde kalite kontrol testi olarak kabul edilmiştir. Ancak, pluritest ile fonksiyonel doğrulama yapılmadığı gibi yeniden aktifleşmiş bir transgen ifadesinin tespiti de mümkün olmamaktadır. Ayrıca, genetik kararlılık tespiti açısından karyotip analizine karşılık olarak, daha yüksek bir çözünürlük sağlayarak hassasiyeti güçlendirilmiş olan Karyostat isimli test sunulmuştur.

8. uPKH bankasında tüm kayıtlarının tutulduğu lokal bir bilgi yönetim sistemi (BYS) vazgeçilmezdir. BYS'nin çıktısı olarak görev yapacak olan veri tabanında, biyolojik örnek sahibine ait, yaş, cinsiyet, (varsa) hastalık bilgisinin dışında uPKH elde etme yöntemi, kültür koşulları, kalite ve karakterizasyon test sonuçları gibi bilgiler sorgulanabilir olmalıdır. Veri tabanları, her i-uPKH hattı ve tüm türetilmiş hücre ürünleri için ayrıntılı bir "puan kartı" yayımlamalıdır (9). Hücre hatları, kültür koşulları, kalite ve karakterizasyon testleri gibi temel bilgilerle oluşturulacak veri tabanı, web tabanlı bir hücre katalogu şeklinde ulusal ve uluslararası araştırmacılara sunulmalıdır.
9. Araştırma amaçlı oluşturulan bir biyobankadaki hücreler ve ilgili bilgiler, araştırmalarla ilgili olabilecek tüm alanlardaki (biyoloji, biyoteknoloji, patofizyoloji ve farmakoloji) araştırmacılar için izinler doğrultusunda kullanılabilir olmalıdır.

Bilgi Yönetim Sisteminden Beklenen Temel Veriler



Asgari SOP ve Formlar

1. Doku/Hücre Kabulü

- SOP: İlgili doku örneklerinin takibi
- FORM: Doku/hücre örneği transfer kaydı
- FORM: Dışarıdan kabul edilen doku/hücre hatlarının kabulü ve kullanımı
- SOP: İlgili dokudan hücre kültürü

2. Hücre Çoğaltma/Bankalama

- SOP: Hücre kültür süreci (uzun dönem)
- FORM: Primer hücrelerin dondurulması
- SOP: Dondurulmuş tüplerden hücrelerin çözülmesi

3. Yeniden Programlama

- SOP: (Seçilen yönetime göre) Yeniden programlama
- SOP: Farklı boyutlarda hücre kaplarına göre yeniden programlama
- SOP: Besiyeri hazırlama

4. Koloni Pasajlama

- SOP: Pasajlama
- SOP: Kriyoprezervasyon

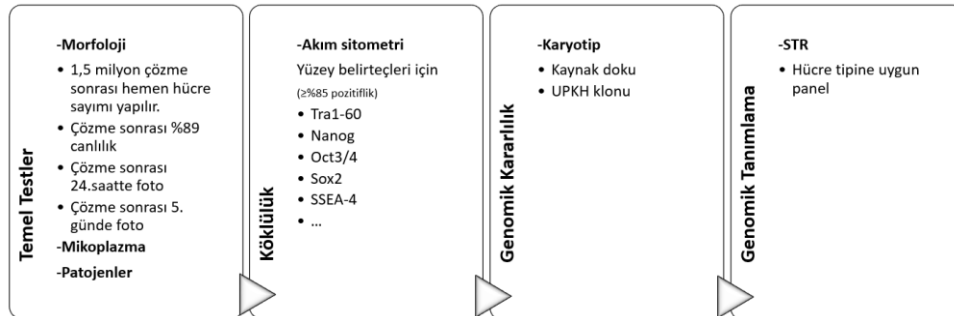
6. Bankalama/Karakterizasyon

- SOP: (Viral yeniden programlama ise) SeV genom ve transgenom için PCR tespiti
- SOP: Pluripotential genlerinin ifadenme teyidi için qPCR
- SOP: Akım sitometri ile yüzey antijenlerine göre karakterizasyon
- SOP: Gen ifade/Genomik/Transkriptomik analizler için DNA ve RNA örneklerinin Hazırlanması
- FORM: Dokulardan elde edilen UPKH klonlarının üretimi ve taşınması

7. Laboratuvar Tarafından UPKH Kabulü

- SOP: Ana stok (MCB) yaratmak için dondurulmuş örneklerden UPKH kültürü ve çoğaltılması

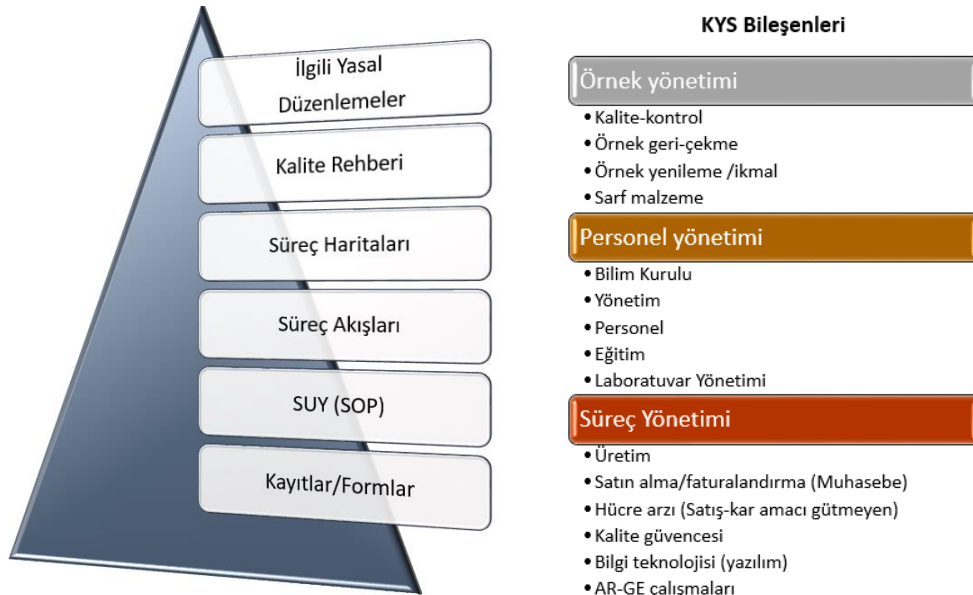
PKH Hatlarının Kalite Kontrolüne Yönelik Yapılabilecek Testler



Şekil 4.1. Araştırma amaçlı uPKH bankacılığı sürecine yönelik derlenen bazı asgari gereksinimler.

10. Uluslararası standartların güvencesinde oluşturulması beklenen KYS, biyobanka'nın güvenilirliğini sağlamanın, en kapsamlı temelidir. Biyobankacılık denildiğinde, biyobanka ağ tasarımı, uzun vadeli sürdürülebilirlik, büyük veri yönetimi, biyobankacılığın öneminin halka aktarılması, araştırma sonuçlarının örnek bağışçılara ulaştırılması gibi kritik noktaların başında kalite ve yönetim sistemi gelmektedir (228). Kalite, bir ürünün beklentilerimizi tamamen karşılaması veya aşması durumunun bir ifadesi olarak tanımlanabilir. Kalitenin temelinde 2 önemli nokta vardır; gereksinimleri belirlemek ve gereksinimler doğrultusunda ürün ve hizmet sunmak. Ürünün/hizmetin oluşumunda ve kalitenin belirlenmesinde önemsenen kavram ise süreçtir ve süreçteki değişkenlerin belirlenmesi ve kontrol altında tutulması kalitenin temel şartlarındandır. Kalite süreçlerinin analizinde/kontrolünde istatistiksel yöntemlerin uygulanması esastır (229). KYS, tüm süreçleri kapsamalıdır, bu nedenle bileşenlerden oluşmaktadır.

Temel KYS bileşenleri ile KYS'nin temelini oluşturacak kaynaklar olarak belirlenen dokümanların önem/etki derecesi açısından vurgulandığı şekil aşağıda sunulmaktadır (168).



Şekil 4.2. Kaynak doküman hiyerarşisi (solda) ve KYS bileşenleri.

4.1.2. Değerlendirme ve Pedi-Stem uPKH Banka Modellemesi

Ulusal uPKH Bankası oluşturmaya yönelik süreç riskini en aza indirmek ve planlanan sistemlerin ana teknolojik bileşenlerini geliştirmek ve test etmek için, Downey ve Peakman (230) tarafından önerilen yaklaşım değerlendirilmiştir. Buna göre, uPKH bankasının aşağıda sunulan 3 faz çalışmaları kapsamında tamamlanması uygundur:

- *Tasarım Fazı:* Kavram geliştirme ve ana riskleri belirleme (Fizibilite çalışması ve hata türleri etki analizi-FMEA): FMEA, ürün veya süreçlerdeki potansiyel arızaları inceleyen sistem mühendisliği için geliştirilmiş bir yöntemdir. Hangi arızaların/hataların/sorunların olabileceğini, bunların ne kadarının tespit edilebileceğini ve genel süreç üzerindeki etkisinin ne olacağını anlamaya yardımcı olmak üzere yapılır. Tasarım süreci boyunca kalite hususları oluşturmak, üretim mühendisliği yaklaşımının temel bir parçasıdır.
- *Prototip Fazı:* Test etme ve teknolojik elemanları/süreçleri iyileştirme adımlarını içerir.
- *Uygulama ve Komisyona Sunma:* Her bir bileşen, fiili işlemi yansıtan kararlaştırılan test programlarına karşı kapsamlı bir şekilde test edilir. Bu süreçte, tüm SOP'ler, eğitim planları ve sağlık ve güvenlik belgeleri yazılır ve uygulanır. Tesisi işletmeye almanın son basamağı, çeşitli unsurların (işlem/süreç, insan kaynakları, teknoloji, sistemler, tesisler) tüm numune işleme ve depolama protokolünün taleplerini karşılayabilecek onaylanmış bir sürece entegre edilmesini içerir.

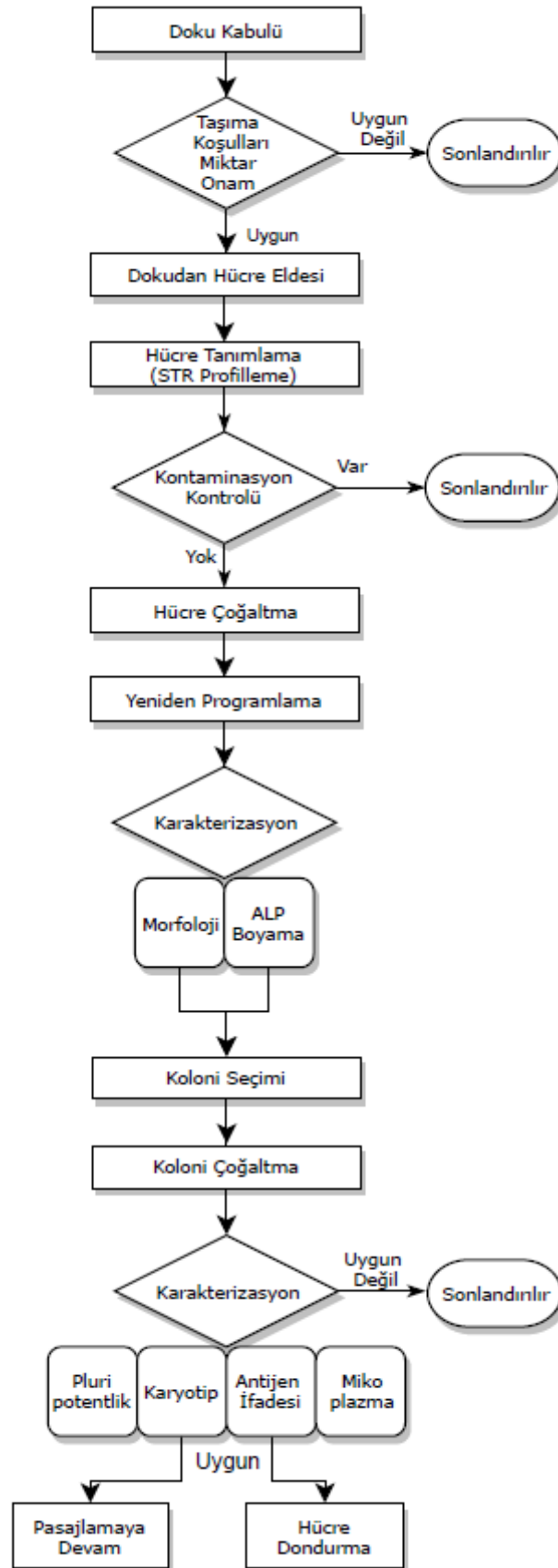
Pedi-Stem modelinde tasarım ve prototip fazının paralel yürütüldüğü söylenebilir. İlk aşamada, 2014'te başlatılan, "uPKH Banka Prototipi" projesi kapsamında, yapılan ön-tasarım doğrultusunda, literatür bilgilerinin derlenmesi ile uzun süren deneysel çalışmalara öncelik verilmiştir ve aslında iyileştirme adımlarını kapsayan çalışmalar henüz tamamlanmış değildir. Tasarlanan uPKH bankasında temel olarak, alanında uzman bilim insanlarının ve yasal otoritelerinin sunduğu yayınlar, rehberler dikkate alınmakta, aynı zamanda farklı süreç ve kültür sistemleri değerlendirilerek kendi-en iyi uygulamalarımızdan oluşan bir sistem oturtulmaya

çalışılmaktadır. Tez projesi kapsamında yapılan çalışmalar, hem tasarım hem de prototip faza, hatta ileriye dönük uygulama ve komisyona sunma fazına bilimsel açı desteği sağlamak üzere tasarlanmıştır.

İş Akışı ve Süreç Analizleri

Hücre bankalarında hücre hatlarının üretim, karakterizasyon ve kriyoprezervasyon yöntemlerinin optimizasyonu ve standardizasyonu gereklidir. uPKH üretimi uzun soluklu bir süreçtir. Bankalama için işlem basamaklarının tümü standardize edilmeli ve hücreler ile ilgili verilerin kalitesi garantilenmelidir. Bunu sağlamak üzere atılacak ilk adım, uPKH elde edilmesi sürecindeki iş akışının ve işlem basamaklarının doğru bir şekilde sıralanması, tanımlanması ve alternatifi olan kritik adımlarda karar parametrelerinin net olarak sunulması olmalıdır. Pedi-Stem uPKH Bankası için tasarlanan temel iş akışı aşağıda verilmektedir. Parametrelerle ilgili analizler ise akabinde sunulmaktadır.

uPKH'lerin üretim aşamalarında, seçimin ve karar parametrelerinin söz konusu olduğu ve varyasyon sebebi olan her bir aşama kritiktir ve istenmeyen durumların kaynağı olma potansiyeli taşımaktadır. İlk aşamada, kritik üretim basamaklarını ve ilgili olabilecek değişkenlerin listelendiği tablo aşağıda (Tablo 4.1) sunulmaktadır.

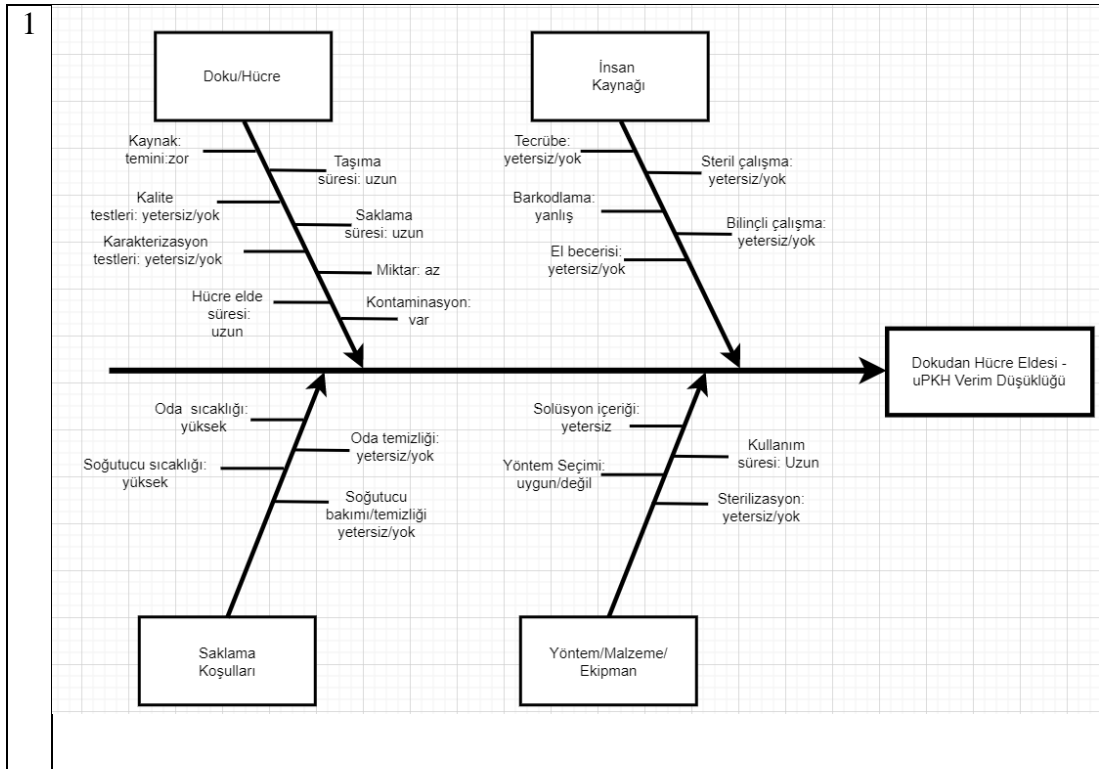


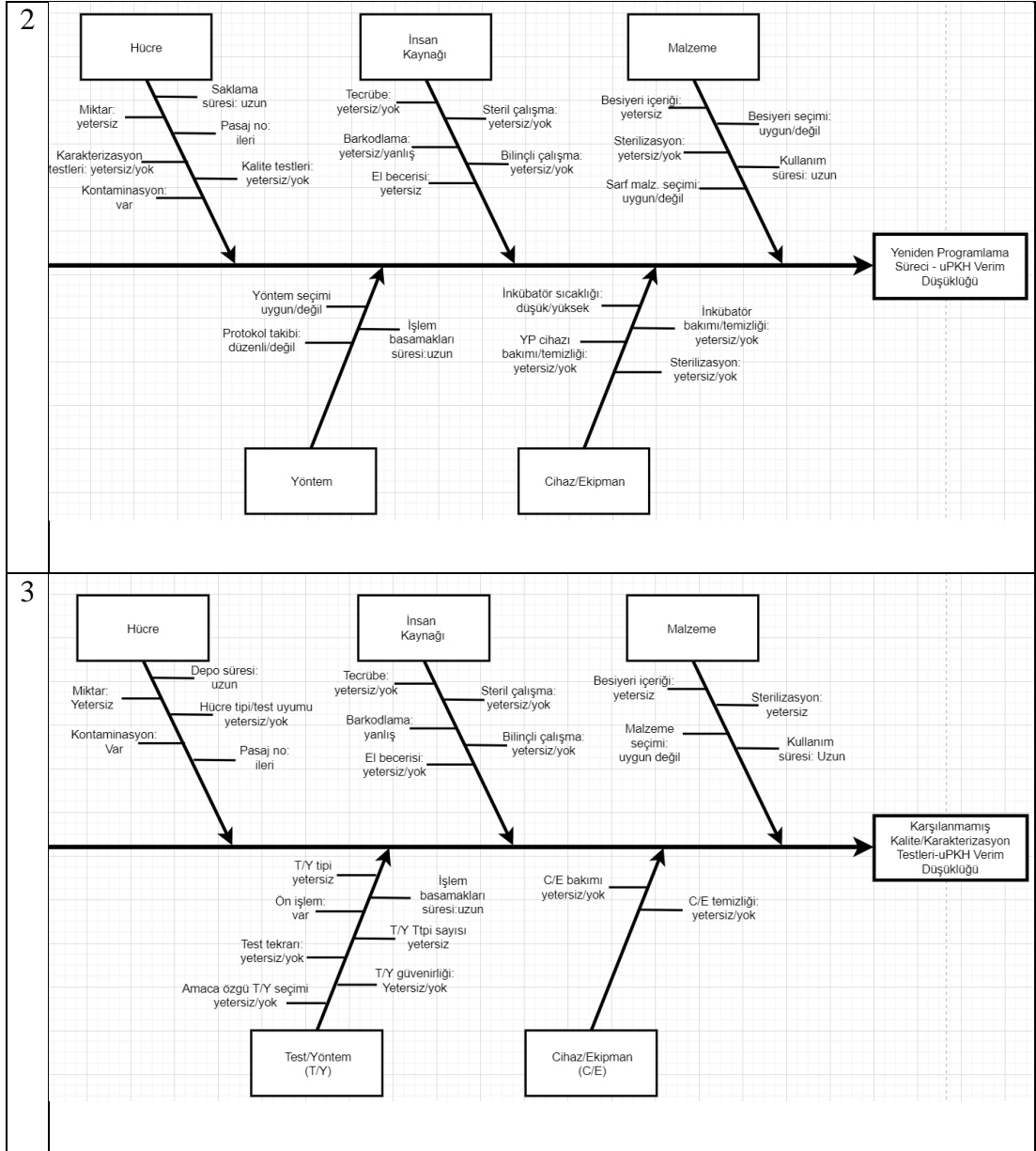
Şekil 4.3. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası için temel iş akışı.

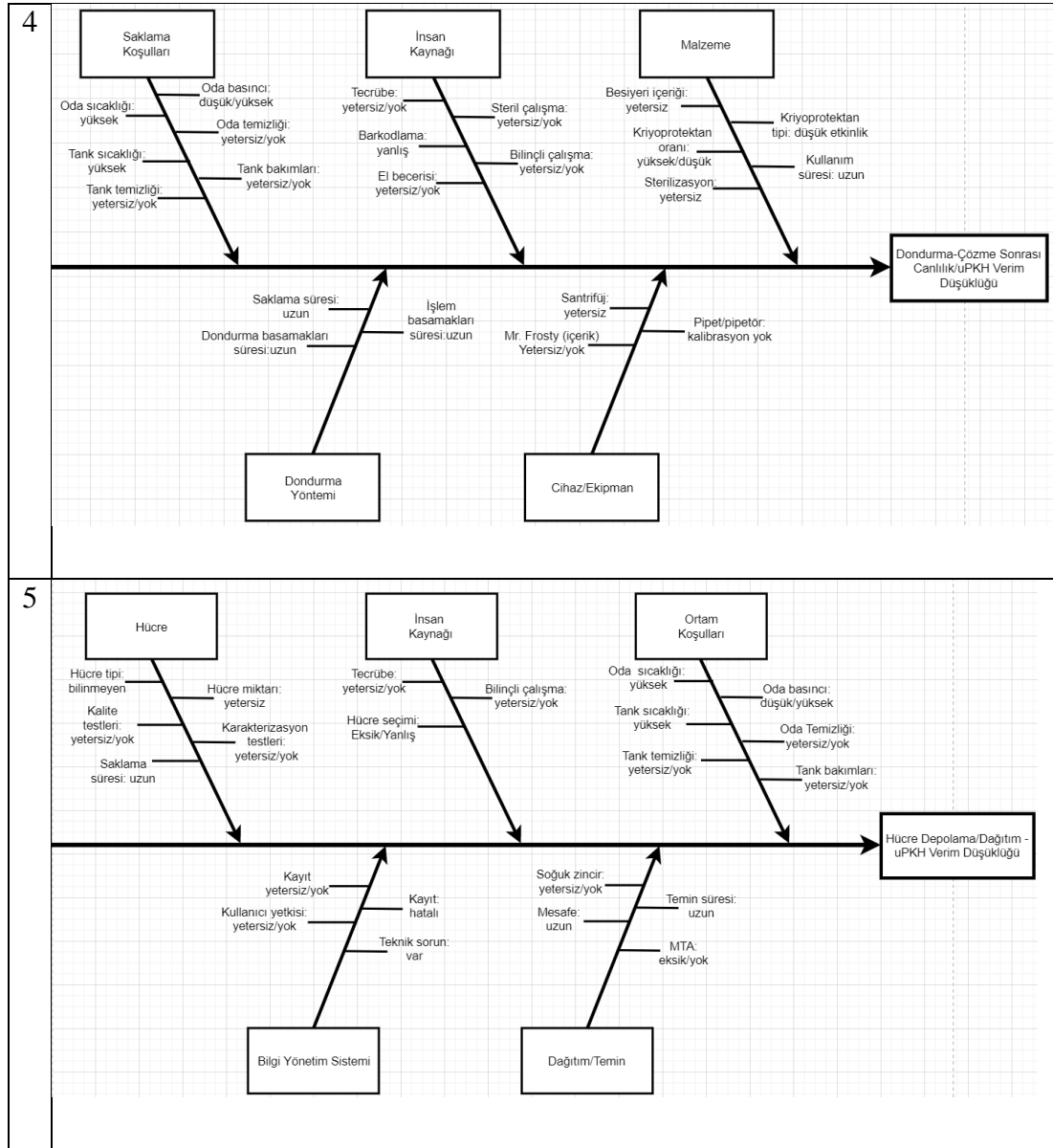
Tablo 4.1. Araştırma Amaçlı uPKH üretiminde kritik aşamalar ve değişkenler.

uPKH Üretim Süreci - Kritik Parametreler/Değişkenler					
Kaynak Hücre Seçimi	Programlama	uPKH Kültürü	Koloni Seçimi	Karakterizasyon/Kalite	Dondurma/Çözme
<p>Hücre Tipi Seçimi İzolasyon Yöntemi Kültür Özellikleri</p>	<p>Yöntemler Pluripotentlik Faktörleri</p>	<p>Besiyeri Besleme Besleyici Tabaka</p>	<p>Yöntem Zaman/Süre</p>	<p>Testler Test Zamanı</p>	<p>Kriyoprotektan Dondurma Çözme</p>
<p>Primer Hücre/Hücre Hattı Hasta/Donör Özellikleri Erişilebilirlik Elde Etme Süresi Hücre Karakterizasyonu Hücre Verimi Hücre Çoğalma Hızı Besiyeri Özellikleri Besleme Aralığı Kültür Koşulları</p>	<p>Viral/Değil Yöntem Güvenliği Amaca/Kliniğe Uygunluk Konsantrasyon/Miktar Maliyet Saklama Süre ve Koşulu Programlama Planı Programlama Süresi Programlama Koşulu İşlem Kolaylığı Cihaz Gereksinimi Cihaz Bakımları Kültür Koşulları Etkinlik Kalıcılık Tek/Kombine Faktör Faktör Konsantrasyonu Faktör Saklama Koşul. Faktör Etkinliği</p>	<p>Besiyeri İçeriği Besiyeri Koşulları Besiyeri Miktarı Besiyeri Maliyeti Besiyeri Etkinliği Besleme Aralığı Besleyici Tabaka Tipi Besleyici Tabaka Kons. Besleyici Tabaka Maliyeti</p>	<p>İlk Seçim Zamanı Mikroskopik İnceleme Seçim Yöntemi Plak Verimi Toplam Seçim Süresi</p>	<p>Pasaj Numarası Test zamanı Test Yöntem(ler)i Test Süresi Test Güvenirliği Test Tekrarı Test Maaliyeti Cihaz Gereksinimi Cihaz Bakımları Gerekli Hücre Miktarı</p>	<p>Kriyoprotektan tipi Kriyoprotektan Kons. Hücre Miktarı Pasaj Numarası Beslendiği besiyeri Dondurma Besiyeri ve Koşulları Toplam İşlem Süresi (Dondurma/Çözme) Dondurma Aşamaları Saklama Koşulları Veri Kaydı/Yönetimi Dondurma Maliyeti Saklama Maliyeti Hücre Canlılığı Dondurma Öncesi Test Çözme Sonrası Test</p>

İlk aşamada oluşturulan tablodan (Tablo 4.1) yararlanılarak uPKH üretimi ve bankacılığı açısından belirlenen kritik ve temel noktalar için kalite araçlarından balık kılıcı diyagramları ile farklı açılardan detaylandırılmış incelemeler gerçekleştirilmiştir. Literatürde örnekleri bulunan ve tez kapsamında üzerinde çalıştığımız balık kılıcı diyagramları (Ishawa Diyagramı veya Neden-Sonuç Diyagramı) (210) ile biyobanka prototip projesi ve laboratuvar çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen süreçlerde karşılaşılan seçilmiş sorunlar, olası sebepleriyle ortaya konulmaya çalışılmıştır. Diyagramlar, Şekil 4.4'te sunulmaktadır.







Şekil 4.4. uPKH bankacılığı süreci - Balık kılıçığı diyagramları ile neden sonuç analizleri.

uPKH bankacılığında, kritik noktaları ve olası sonuçlarını tespit etmek üzere balık kılıçığı diyagramından faydalanılmaktadır (231, 232). Çalışmamızda, uPKH üretim ve bankacılığında temel olan 5 basamağa (Şekil 4.4 /1-dokudan hücre eldesi 2-yeniden programlama 3-kalite/karakterizasyon testleri 4-dondurma/çözme 5-depolama ve dağıtım) yönelik sonuçları doğuran sebepleri ortaya koymak, görselleştirmek ve üzerinde çalışmak üzere bu kalite aracı ile detaylı değerlendirmeler yapılmaya çalışılmıştır. uPKH bankacılığı sürecinde karşılaşılabilecek olası kalite

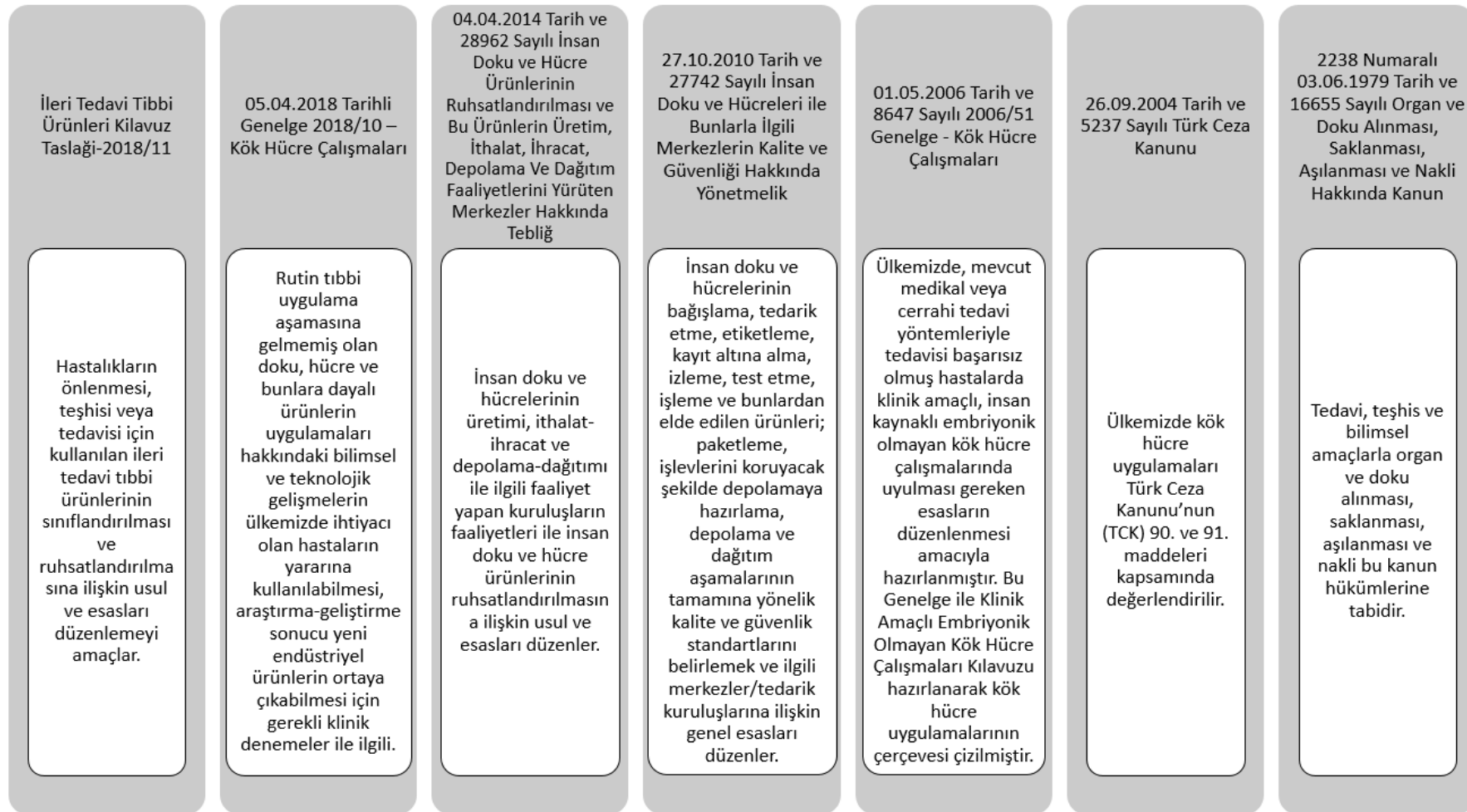
hatalarını engellemek amacıyla, ilk basamak olan, “dokudan hücre eldesi” nin uPKH üretimindeki verim düşüklüğü problemine sebep olabilecek ilgili parametreler belirlenmeye çalışılmıştır. Sebepler, asıl kaynakları tespit edebilmek için ana kategorilere (doku/hücre, insan kaynağı, malzeme/ekipman, saklama koşulları...) ayrılmış ve alt sebeplerin her birinin etki şekli (zor, uzun, yetersiz, yüksek...) ile birlikte kılçık kolu olarak sunulmuştur.

İşletimsel ve Teknik Konular

Yapılan incelemeler ve analizler sonucu, Pedi-Stem uPKH Bankası için işletimsel ve teknik konular ile ilgili bulgu ve değerlendirmeler 10 temel maddede özetlenmiştir:

1. Biyobanka kurulumu ve işletimi her ülkeye özgü yasal çerçeveler ile düzenlenir.

Ülkemizde, ilaç kapsamına giren kök hücreler için İleri Tedavi Tıbbi Ürünleri (İTTÜ: Somatik Hücre Tedavisi Tıbbi Ürünleri, Gen Tedavisi Tıbbi Ürünleri, Doku Mühendisliği Ürünleri ve Kombine İlaçlar) ile ilgili düzenlemeler yer almaktadır. uPKH’lerden elde edilecek ürünlerin insanda kullanımını düşünüldüğünde, hücrelerin genetik yapısında ileri değişiklikler söz konusu olduğundan, bu hücreler; gen tedavi tıbbi ürünü, ileri tedavi tıbbi ürünü ve biyolojik ilaç olarak değerlendirilecektir. Sonuç olarak uPKH’lerin insana uygulanması durumunda ülkemizde kullanılabilecek genel mevzuat mevcuttur. Ancak araştıma amaçlı uPKH özelinde henüz bir kılavuz veya düzenlemeye rastlanmamıştır. uPKH’lerin en yakın üst alanı olan “Kök Hücre Çalışmaları”nı kapsayan ülkemizdeki mevzuat, Şekil 4.5’te özetlenmiştir.



Şekil 4.5. “Kök Hücre Çalışmaları” nı ilgilendiren ülkemizdeki mevzuat.

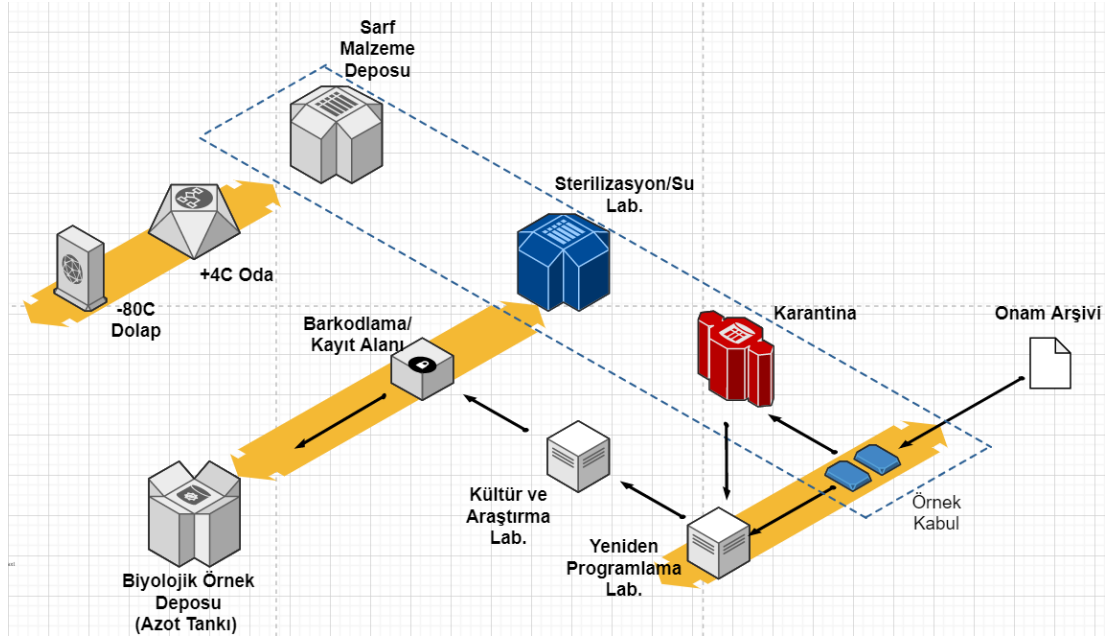
Ulusal olarak oluşturulmak istenilen uPKH Bankası ile ilgili olan kamu otoritesi Sağlık Bakanlığı'dır. Bakanlığın, uPKH bankası ile ilgili olan, "Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü" çatısı altında hizmet veren "Kan, Organ, Doku Nakli Hizmetleri Daire Başkanlığı"nın "Hücre ve Hücresel Tedavi Birimi" ile iletişim sağlanmıştır.

2. KYS biyobankanın olmazsa olmazıdır.

Örnek olarak incelenen İngiltere (UK) Biyobankasında KYS olarak ISO 9001: 2000 uygulanmıştır. Bu sistem, organizasyonun veri kaynağı örneğini etkileme potansiyeli olan herhangi bir kısmı için standartlar belirler. Laboratuvar sistemleri bağlamında, kalite sorunlarının önlenmesi ve tespitine yönelik kalite güvence ve kalite kontrol prosedürlerinin uygulanması için kullanılmıştır. Ulusal uPKH bankasında en güncel, ilk ve tek özgü biyobanka standardı olan ISO 20387 (173) esas alınacaktır. Bu standarda göre kalite yönetim sistemini ilk kez oluşturan oluşumlardan beklenen asgari kapsam başlıkları (Seçenek A) şu şekilde verilmiştir: i)KYS dokümantasyonu ii) KYS belgelerinin kontrolü iii) Kayıtların kontrolü iv) Risk/Fırsat değerlendirme v) Gelişme vi)Düzeltilici faaliyetler vii)İç denetimler viii)Kalite yönetimi incelemeleri

Pedi-Stem UPKH Bankası'nda uygulanacak KYS için canlı bileşenler ve cansız bileşenler olmak üzere iki temel gereksinimden bahsedilebilir. Cansız bileşenler biyobanka birimleri (Şekil 4.6), canlı bileşenler ise organizasyon şeması (Şekil 4.7) çatısı altında düşünülmüştür.

uPKH bankası için ihtiyaç duyulan temel alan ve bölümler/birimler aşağıda şematize edilmiştir. Onam formlarının arşivlendiği alanda başlatılan süreç, elde edilen uPKH'lerin azot tankında saklandığı alanda son bulmaktadır.



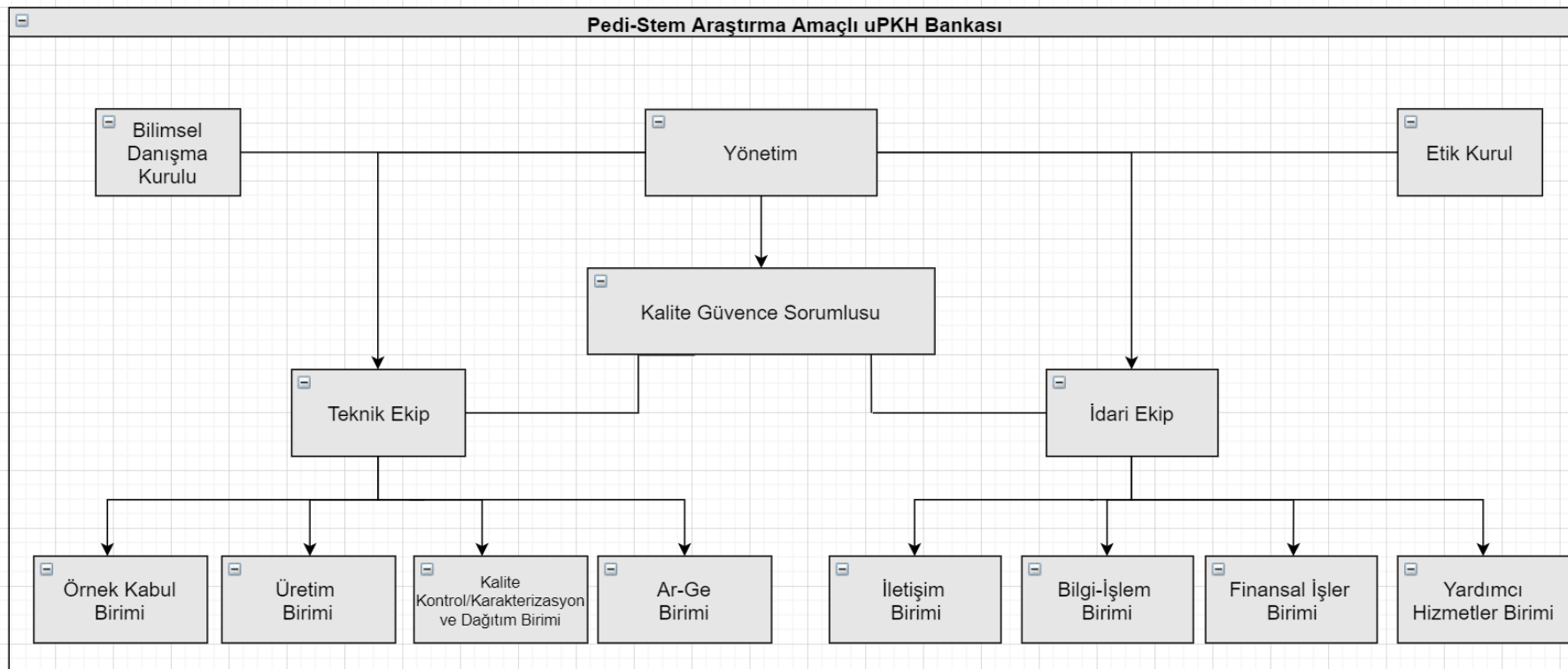
Şekil 4.6. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası için operasyonel birimler.

İspanya'daki yasal düzenlemelerde, bir biyobanka organizasyonundan bahsederken 4 ana rolden bahsedilmektedir: İdareci, veri/bilgi yöneticisi, etik komite ve bilimsel komite (20). Bu esas roller dahil edilerek oluşturulan organizasyonel yapılanma, Şekil 4.7'de sunulmaktadır. Şekil 4.6'da Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası için en temel birimler ve yapılanmadaki temel ilişkiler sunulmaktadır. Birimlerde görev alacak personelin konum ve sayıları, biyobanka kapasitesi doğrultusunda belirlenecektir. Örneğin, etik konunun esasını teşkil eden onamlar için ayrı bir sorumluluk sahiplendirilmesi olacak, veri yönetimi, biyobanka yönetim sistemi ve ürün kataloğu şeklinde, faydalanıcı ilişkileri ise paydaş ve hücre talep eden araştırmacı için olmak üzere bölümlendirilerek gerekirse ayrı personellere verilecektir.

3. Ulusal uPKH Bankası için; dış laboratuvarlardan gönderilmiş olan uPKH ve bankanın kendi üretimi olan uPKH olmak üzere 2 farklı ürün kaynağı olması planlanmaktadır. Yaklaşık 4 yılda 500.000 gönüllüden alınan örnekleri saklama kapasitesine sahip olan UK Biyobankası ve EBISC modeli incelenmiştir. Özellikle EBISC gibi çok paydaşlı bir oluşumda dış laboratuvarlardan gelen örneklerde gerek hücre bilgisi gerek karakterizasyon testleri açılarından farklılıklar olabilmekte, bu da standardizasyon/uyum zorluğuna sebep olabilmektedir. Ülkemizde uPKH araştırmaları yapan, özellikle de uPKH geliştirmekte olan

merkez sayısı kısıtlı olduğundan, Avrupa modelinin aksine dış laboratuvarlardan biyobankada saklanmak üzere gönderilecek uPKH örneklerinin, en azından kısa/orta vadede kısıtlı olacağı öngörülmekte, buna karşın uPKH geliştirme talebiyle kaynak doku/hücre gönderiminin olması, daha ağırlıklı olarak da örnek gönderimi olmadan uPKH talebinde bulunulacağı beklenmektedir.

Pedi-Stem uPKH Bankası'nın, temel biyolojik örnek besleyicisi olması planlanan Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri ile aynı yerleşkede bulunması önemlidir. Bağışlanan dokunun biyobanka hücre izolasyon merkezine taşınması (kliniğe yakın olması) önemlidir. Doku örneklerinin elde edilmesi ile ilgili SOP'lerin hazır olması beklenir. Biyolojik örnek sağlayıcılardan örnek alınmasına/kabulüne yönelik temel iş akışında, örnek etik komite onayıyla kabul edilecektir ve nadir hastalıklar için mutasyon test bilgisi mutlaka eklenecektir.



Şekil 4.7. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası - Organizasyon şeması.

4. Veri kalitesi önemlidir ve özenle tutulacak dokümantasyon ile sağlanacaktır.


Veri kalitesi, amaca yönelik beklentileri karşılama derecesi ile ilişkilidir ve hatasız verilerden elde edilen sonuçları ve yorumları destekleyecek kadar güçlü bilgiyi ifade etmektedir. Doğruluk, geçerlilik, tamlık, okunabilirlik, güvenilirlik faydalılık/kullanışlılık, maliyet etkinliği, gizlilik, tutarlılık güncellik, ilgililik, ayrıntınlık, özgüllük, kesinlik (hassasiyet), nitelik (atfedilebilirlik), kalıcılık/uçuculuk veri kalitesinin ölçüleridir. Biyobanka verilerinin güvenilir, tam, doğru ve güncel olması kalitenin göstergesidir. Bunu sağlamak için her sürecin adımlarının dokümante edilmesi önemlidir (167). Dokümantasyon, kalite yönetim sisteminin de vazgeçilmez bir parçasıdır. Kayıt altında olması gereken temel veriler; hücrelerin kökeni ve tarihçesi, tüm süreçler (dondurma, çözme, depolama... vb) için prosedürler ile tüm aşamalardaki karakterizasyon ve kontaminasyon test bilgileri.

5. Arşiv doküman kayıtları kolay erişilebilir olmalıdır.

Materyal Transfer Anlaşmaları (MTA) ve onamlar bu kapsamda değerlendirilebilir. Hücrelerin insanda veya ticari olarak kullanılmayacağı, araştırmacının bilgileri güvenli bir şekilde saklayacağı ve üçüncü kişi ve kuruluşlarla paylaşılmayacağı konuları MTA ile korunmaktadır (20). Dünya çapında uPKH ile ilgili araştırmaların yapıldığı, içlerinde Kyoto, Wisconsin, Harvard ve Kalifornia gibi üniversitelerin araştırma merkezlerinin/enstitülerinin bulunduğu, 11 farklı birime ait onam formlarının incelenerek ideal bir form için somut önerilerde bulunulan çalışmada, katılımcılarla sürekli iletişim (pediatrik örnekler, 18 yaş sonrası yeniden onam), uPKH konusu ile ilgili faydalar ve örneklerin yönetimi/geri çekilmesi temel başlıkları doğrultusunda tablolar detaylandırılmıştır (233). Pedi-Stem için tasarlanan biyobanka onamlarında da pediatrik grup önemsenmiş ve 7-11 ve 12-17 yaş olmak üzere ayrı değerlendirilerek bu gruplardan alınan onamların 18 yaş sonrası yenilenmesi için yeniden-onam (re-consent) formları ile birlikte erişkin ve ebeveyn onamları da hazırlanmıştır. Onam formları, literatür edinimlerinin yanısıra saha bilgilerinden de faydalanılarak düzenlenmiş ve anlaşılabilirliği kolaylaştıracağı düşüncesiyle, EBISC’de de olduğu gibi soru-cevap niteliğinde sunulmuştur. Örnek olarak erişkin vericilere yönelik bilgilendirici onam içeriğinin başlıkları görselleştirilerek Şekil 4.8’de verilmektedir. Yaş gruplarına göre sınıflandırılmış tüm

onamlar biyobankanın kısa tanımı ile başlamaktadır. Aktif biyobankanın kalite yönetimi sürecinde, oluşturulan onamlar için etkinlik ölçümlerinin yapılması planlanmaktadır (234).

Hücre/kök hücre bankası nedir?	
Ne tür insan örnekleri saklanır?	
Biyolojik örnekler nasıl saklanır ve ne gibi işlemler uygulanır?	
Örnekler nasıl toplanıyor ve olası riskler nelerdir?	
Sağlık kayıtlarımdan neden bilgi vermem gerekiyor?	
Gizliliğim nasıl korunacak?	
Örneklerimin hücre bankasına bağışlanmasına nasıl katılabilirim? Fikrimi değiştirsem ne olur?	
Örneklerimin hangi amaçla kullanılacağına karar verebilir miyim?	
Örnek bağışı ile ilgili bana bir ödeme yapılacak mı? Bana bir yararı olacak mı?	
Örneklerimin kullanıldığı araştırma sonuçlarını öğrenebilecek miyim?	
Örnek bağışım ile ilgili bir sorum olduğunda kime sorabilirim?	



Şekil 4.8. Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası'na yönelik aydınlatılmış onam formu içeriği.

























6. Veri koruma kanununa göre, doku bağışlarının kodlanması ve örnek takibinin yapılabilmesi önemlidir. Örnekler için iki kod verilebilir: ilki kişisel bilgi için, ikincisi örneğin serbest bırakılması için (bu kodlar “uPKH Banka Prototipi” projesinde geliştirilmiş olan Pedi-Sis yazılımı tarafından verilebilmektedir). Daha önce toplanmış olan örneklerin de biyobankaya kazandırılması söz konusu olabilecektir. Bu şekilde uPKH bankasına kazandırılmak istenen örnekler için, onam formu varlığı önemsenecek ve formun uPKH üretimi ve bankacılığını desteklediğinin teyidi alınacaktır. Araştırmacının bankadan talebi olduğunda, amacı değerlendirilecek, araştırmacılara örnek gönderileceği zaman ise MTA sözleşmesi imzalanacaktır (235).

Pedi-Stem için hazırlanan onam içeriğinde, veri güvenliğine de yer verilmiştir. Örneğin, uPKH'lerin hastalık modellemesi çalışmalarında kullanılması, hücre hattının vericisi hakkındaki tıbbi ve genetik veri gereksinimini doğuracaktır. Uluslararası uPKH trafiğinin artışı, hassas kişisel verilerin paylaşımında da bir artışa neden olacak ve veri güvenliği ile ilgili etik konuları beraberinde getirecektir (201). Bu nedenle,

bireysel verilerin korunumunda anonimleştirme önemlidir ve tam/geri dönüşümsüz veya sözde/sahte/yalancı anonimleştirme yapılabilmektedir. Sözde anonimleştirme senaryosunda, donörden gelen bilgiler kodlanır ve donörün izini sürmek mümkündür ancak bu takip, hemen/kolay erişilebilir olmayabilir (20).

7. Örneğin işlenmesi ile ilgili her bir adım için SOP'lerin varlığı önem arz etmektedir.

Biyolojik örnek depoları için hazırlanarak test edilmiş, çok kullanışlı ve kapsamlı bir koleksiyon için Kanada kökenli Tümör Araştırma Ağı (CTRNet)'nin örnekleri (236) incelenmiş ve SOP'lerde bulunması fayda sağlayacak olan alanlara (amaç, kapsam, ilgili personel, tanımlar, gerekli malzemeler, işlem içerik ve basamakları, beklenen/kabul edilebilir sonuç, ilişkili diğer SOP'ler ve referanslar) karar verilmiş ve bu doğrultuda uPKH üretim sürecine yönelik temel SOP'ler yeniden düzenlenmiş, eksikliği tespit edilmiş olanlar hazırlanmış ve yeni protokoller eklendikçe SOP'ler oluşturulmaya devam etmektedir.

-  IPS_1XDPBS_Hazirlama
-  IPS_5gun_AccutaseileHucreKaldirma
-  IPS_Dondurma
-  IPS_DondurmaBesiyeriHazirlama
-  IPS_E7BesiyeriHazirlama
-  IPS_E8BesiyeriHazirlama
-  IPS_EmbryoidCisimcikOlusturma
-  IPS_Epi5ileMKHleriProgramlama_S
-  IPS_FBSinaktivasyonu
-  IPS_Form_PluripotensiUyarimiicinSendaiVirüsTitresiHesaplama
-  IPS_HucreCozmeveEkimi
-  IPS_JelatinHazirlama_PlakKaplama
-  IPS_MatrijelAlikotlama
-  IPS_MatrijelHazirlama_Kaplama_
-  IPS_MEFBesiyeriHazirlama
-  IPS_MikoAlertKit_ileMikoplazmaTest_Protokolu
-  IPS_MKHlerinAccutaseileKaldırılmasıProtokolu
-  IPS_SendaiVirüsileFibroblastProgramlama_S
-  IPS_SendaiVirüsileMKHleriProgramlama_S
-  IPS_TeratomaDeneyi
-  IPS_TransfekteEdilmisForeskinHücrelerinAccutaseileKaldırılması
-  IPS_UPKHkolonilerininAccutase ileKaldırılmaVeSaklanmaProtokolu_DNApelleti
-  IPS_UPKHkolonilerininMolekulerCalismalaricinSaklanması
-  IPS_UPKHKulturu

Şekil 4.9. Pedi-Stem-

uPKH üretim süreci SOP listesi.

8. uPKH üretim sürecinin tüm elemanları önemlidir ve yapılan analizler doğrultusunda dikkatle seçilmelidir.

Biyobankacılık gibi seri/endüstriyel üretim söz konusu olduğunda, kaynak hücrenin seçimi farklı açılardan da önem kazanmaktadır. Büyük çaplı uPKH üretimi için seçilecek olan kaynak dokudan hücre üretim sürecinin güçlüğü, pahası ve zaman boyutu düşünüldüğünde, maliyeti de etkileyen temel faktörler dikkate alınarak karar verilmelidir. Kolay elde edilebilir hücre kaynağı olarak, parmak ucu kanının kullanıldığı çalışmanın bulguları olumlu değerlendirilmiş ve bir damla kan örneğinin, uPKH bankacılığında kullanılabilir yeni bir strateji olabileceği öne sürülmüştür (237). Seri üretimde kullanmak üzere seçilecek dokunun kolay erişilebilirliğinin yanında, etik kaygıları asgari boyuta indirgeyebilecek özelliklere sahip olması da önemlidir. Kaynak dokunun bireye zarar vermeden sağlanabilir olması düşüncesinden yola çıkıldığında, atık biyolojik örnekler akla gelmektedir. Örneğin idrar, bu anlamda oldukça uygun (non-invaziv) ve sınırsız bir kaynak olarak düşünülebilir. 2016 yılında yapılan çalışmada (238), insan idrar türevli hücrelerin (hUC) düşük çoğalma (proliferasyon) sergiledikleri ve yeniden programlanmalarının oldukça zor olduğu gösterilmiştir. Çok zayıf çoğalma gösteren hücreler için yeniden programlama yaklaşımlarının optimizasyonu üzerinde çalışılmıştır. Çeşitli küçük moleküller (Siklik pifitrin-a: P53'ü baskılayarak somatik hücrelerin yeniden programlanma etkinliğini artırır; A-83-01: hedefi olan TGF- β (smad2) üzerinden Oct4 ve Klf4 ile insan epidermal keratinositlerinin yeniden programlanmasını sağlar; CHIR99021: hedefi olan GSK-3 β 'yi baskılayarak keratinositlerin yeniden programlanmasında etkilidir; Tiazovivin: yeniden programlanma etkinliğini önemli ölçüde arttıran bir ROCK inhibitörüdür; Sodyum butirat: miR302/367 kümesinin (cluster) artması, histon H3 asetilasyonu, promotor DNA demetilasyonu ve endojen pluripotentiğe bağlı genlerin ifadesinde rol oynar ve PD0325901: MEK'e bağlanıp baskılamasıyla, fosforilasyon engellenir ve böylece, MAPK/ERK yolağı aktifleşerek tümör hücresinin çoğalması durdurulabilir.) içeren bir kokteylin, hUC'ler için YP verimliliğini önemli ölçüde (170 kat daha fazla) arttırdığı, ayrıca matrijel yerine otolog idrar türevli hücrelerin besleyici olarak kullanımı ile YP faktörlerinin aktarımı sırasında meydana gelen yoğun hücre ölümünün azaltılarak hastaya özel uPKH bankacılığı için hUC'lerin değerli bir varlık olabileceği vurgulanmıştır. Sonuçlarıyla olumlandırılmış bu çalışma

derinlemesine düşünüldüğünde, neticede idrarın, bir boşaltım ürünü olması nedeniyle, hastanın/bireyin anlık metabolik süreçlerine göre değişkenlik gösterebilme potansiyeline sahip olmasının, çalışmanın ilk aşamasında da tecrübe edildiği gibi kaynak hücre eldesinin zorluğunu arttırabileceği, küçük molekül kullanımıyla telafi edilse dahi bu durumda da fayda/zarar analizi yapılarak karar verilmesi gerektiğinden, ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Diğer taraftan, tüm dünyada bankacılığı giderek artmakta olan kordon kanının da uPKH elde etmede ve hatta uPKH bankacılığına dönüştürülmede avantajlı ve hazır bir kaynak olabileceği konusunda bilimsel öneriler sunulmuştur (239). Kordon kanı uPKH eldesi için oldukça sınırlı bir kaynaktır. Ayrıca bu tür biyobanka dönüşümleri onam formlarından itibaren tüm süreçlerin yeniden gözden geçirilerek düzenlenmesini gerektirmekte ve işlevselliği ertelemektedir. Aynı bilimsel raporda, kemik iliği kaynaklı hücrelerden oluşturulabilecek bir uPKH bankasının da fayda sağlayacağından bahsedilmektedir. Pedi-Stem için tasarlanan uPKH banka modelinde, ham madde olarak, üniversitemizdeki araştırmacıların/klinisyenlerin etik kurul onaylı projeleri kapsamında hastalardan alınan cilt biyopsileri veya diğer doku örnekleri ile Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon (KİT) Ünitesi tarafından temin edilen ve biyobanka kapsamına alınmış kemik iliği örneklerinin yanısıra kolay elde edilebilirlik açısından periferik kanın kullanımı planlanmaktadır.

YP aracı olarak, tecrübe sahibi olduğumuz SeV ile aktarım yönteminin araştırma biyobankacılığı için uygunluğuna dair destekleyici bulgulara, 2015 yılında 12 farklı ülkeden 55 araştırma merkezinin katılımıyla gerçekleştirilmiş olan çalışmada ulaşılmıştır (240). SeV, epizomal, mRNA ve lentiviral yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmanın bulgularına göre, SeV ile yeniden programlamanın, düşük iş yükü ve ileri pasajlarda virüsün kaybı ile verimli ve yüksek derecede güvenilir olmasıyla avantajlı olduğu yorumu yapılmıştır. Periferik kandan uPKH geliştirilmesinde ise daha verimli olması nedeniyle epizomal yöntemin de kullanılması planlanmıştır. YP yönteminin seçiminin, her alanın özel gereksinimlerine bağlı olduğu ve söz konusu klinik uygulama olduğunda, yöntemin yeniden değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır (241).

9. Hücre kültürü, fenotip ve potansiyelliğe yönelik araştırma amaçlı uPKH'ler için uygun ve yeterli kalite ve karakterizasyon testleri uygulanacaktır. Bu kapsamda, Pedi-Stem uPKH Bankası'ndaki hücreler 3 için temel seviye hedef alınacaktır:

- I. Kaynak hücre hatlarının tanımlanması, saflığının ve sterilliğinin kanıtı olması için, ICLAC tarafından kabul gördüğü bilinen, PCR tabanlı STR profillemeye yapılması uygun görünmektedir. SNP genotiplenmesi için ihtiyaç duyulan cihaz ve eğitimli personel konularının maliyeti artırma potansiyeli, dışlanma sebebidir.

Mikrobiyal kontaminasyonu bertaraf etmek üzere, mikoplazma testi önceliklidir. Kaynak hücre eldesinden itibaren (AHB) ve ÇHB'de her 5 pasajda bir/ayda bir ile her uPKH dondurma öncesi ve her uPKH çözmenin akabinde yapılması uygun olacaktır.

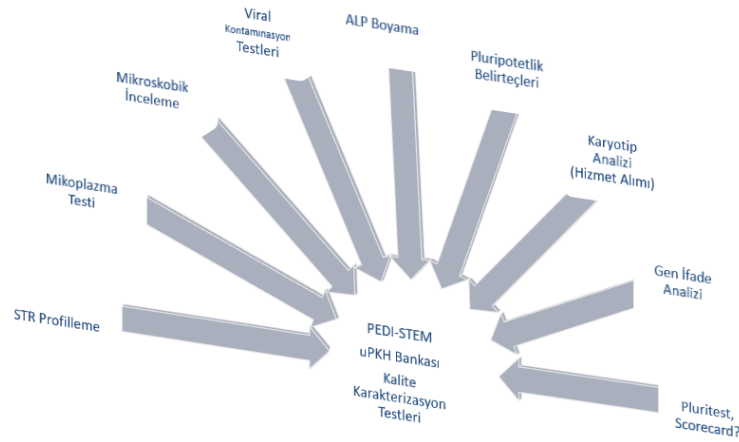
Viral kontaminasyon tespitine yönelik HIV, HCV, HBV serolojik testleri ilk olarak kaynak hücre eldesini takiben (AHB) yapılmalıdır. Hücre işleme sürecinde gerek/şüphe duyulması halinde (mikroskopik bulgular, süreç sapma... vb.) yapılabileceği gibi hücre bankasından çıkacak olan her hücre hattı için serbest bırakma testleri arasında yer almalıdır.

Bakteri, küf, mantar gibi bariz görülebilen kontaminasyon açısından besiyeri değişimi süreci doğrultusunda mikroskopik inceleme yapılmalıdır. Mikrobiyal veya viral kontaminasyonu test etmek için tüm transkriptom analizi gibi daha detaylı analizler maliyet gerektirdiğinden ilk aşama için önerilmemektedir.

- II. Hücre performansı ve kararlılığının belirlenmesi için araştırma amaçlı Pedi-Stem uPKH Bankası'nda immünojenotipik belirteçlerin tespiti ve karyotip analizinin rutin kullanıma uygun olabileceği düşünülmüştür. Kararlılık testleri klinik amaçlı uPKH bankaları için daha ön planda olmalıdır.
- III. Farklılaşma yeteneğinin belirlenmesi için Pedi-Stem'de bugüne kadar alkalin fosfataz (ALP) boyama, immünositokimya ve immunfloresans ile belirteç analizleri ve ayrıca teratoma testleri tecrübe edilmiştir. Uzun zaman alan ve canlı gereksinimi duyulan teratom testi dışındaki testler bankalamada rutin kullanım için uygundur. Teratom testi yerini alabilecek Pluritest ve ScoreCard

gibi gen ifade analizine dayalı/biyoinformatik temelli testler için yapılacak ön çalışma sonrası listeye dâhil edilebilir.

Laboratuvar çalışmaları kapsamında gerçekleştirilmiş olan testler, hücre ürün karakterizasyonuna yönelik opsiyonel kalite kontrol süreci olarak öngörülmüştür. Bu kapsamda, kültür süresine bağlı olarak ortaya çıkan farklılıklar açısından pasaj sayısı (erken-geç pasajlar) ve kültür koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan farklılıklar açısından besiyeri içeriği ile besleme aralığı temelli değerlendirmeler yapılmıştır. Pedi-Stem'de uPKH kültürleri için mikroskopik inceleme, PCR veya kit ile mikoplazma testi, ALP boyama, akım sitometri veya floresan işaretleme ile pluripotetik belirteçleri ve RT-PCR ile pluripotetik genlerinin ifade analizi kalite/karakterizasyon testleri olarak yapılmaktadır. Ayrıca, karyotip analizi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmektedir. Araştırma bankacılığı kapsamında, STR profillemeye, viral kontaminasyon testleri (HIV, HCV, HBV... gibi) ve Pluritest ve/veya Scorecard gibi ilave testlerin eklenmesi planlanmaktadır.



Şekil 4.10. Pedi-Stem - uPKH karakterizasyonu için testler.

10. Bir araştırmacının biyobanka erişimi için aşağıdaki iş akışına uyulacaktır.

- i. Araştırmacı, istediği hücreyi belirleyerek proje özeti ve etik kurul onayı ile birlikte biyobankaya talepte bulunur.
- ii. Talep biyobanka yazılımına kaydedilir ve etik kurul ve bilimsel komite tarafından değerlendirilir.

- iii. Gereken hallerde sorumlu araştırmacı ile irtibata geçilir. Sorgulama olumlu bir Şekilde tamamlandığında, biyobanka talebi iŐlemeye baŐlar ve MTA formu imza için araştırmacıya gönderilir ve istenen numune sistemden çağırılır ve numuneler araştırmacıya sevk edilir.

Son olarak, “uPKH Banka Prototip” projemiz ile aynı yıl, büyük bütçeli ve çok paydaşlı olarak başlatılmış ve hâlihazırda sürdürülebilir operasyonel bir uPKH bankası için iyi bir model olan EBISC ile gelinen noktada, Pedi-Stem uPKH Banka modeli aşağıda karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2). Katılmış olduğumuz EBISC Proje Sonlanım Toplantısı ve EBISC proje ekibinden araştırmacıların da yer aldığı uPKH retimi Kursu ile EBISC tecrübesinden faydalanılmaya çalışılmıştır.

Dünyada uPKH seri üretimine yönelik hücrelerin/kolonilerin Őeiminden itibaren izolasyonu ve çoğaltılması için geliştirilmiş otomatik sistemler bulunmaktadır (244). Otomatize sistemlerin kullanımı biyobankacılığın temel konularından biridir. uPKH bankacılığı gibi çok değişkenli süreçler için algoritma tanımlamalarıyla standardizasyon sağlanabilir. Otomatize sistemlerin kullanımı sürecin yanısıra ürün standardizasyonu açısından da önemlidir. Otomatize sistemlerin sağladığı katkılar yanında pahası da düşünülmesi gereken önemli konulardandır. Uzun vadede düşünüldüğünde, hücre kültürünün yanısıra yeniden programlama, çoğaltma ve karakterizasyon basamaklarını da yapabilecek ve farklı üretim yöntemlerine (mRNA, SeV) göre düzenlenebilecek/optimize edilebilecek Şekilde geliştirilmiş olan bu sistemlerin, solüsyon maliyetini 5-6 kat azaltıp, uPKH üretimini 10-12 kat arttırdığına dair bulgular vardır (244). Bu açıdan bakıldığında gereksinim gibi olsa da, kısa vadede ülkemizdeki durum göz önünde bulundurulduğunda, henüz oluşumuna yönelik çalışmaların srdrlė ulusal uPKH bankası için bu aşamada erken ve bütçe üstü görülmektedir. Bankanın öneminin kavranıp, yüksek talep oluŐmaya baŐlaması ile paralel olarak iŐlerliėinin artması zaman alacaktır. Bu nedenle Pedi-Stem uPKH Bankası için kısa vadede otomatize sistem öngörülememektedir.

Tablo 4.2. EBISC&Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası - karşılaştırma.

Karşılaştırma Parametresi	EBISC	Pedi-Stem
Kalite Yönetim Sistemi	DIN EN ISO9001: 2015 – Kalite Yönetim Sistemi-Şartlar	ISO 20387-Biyobanka Standardı
uPKH Kaynağı	Yerinde/kendi-üretimin yanısıra büyük konsorsiyum oluşumundan dolayı dış laboratuvarlardan hazırlanmış olan uPKH	Yerinde/kendi-üretim (Uzun vadede dış laboratuvarlardan kabul edilecek uPKH)
Test/Yöntem Geliştirme Çalışması	Mikoplazma için test geliştirme çalışmaları yapılmıştır.	Metabolik/Mitokondriyal Parametreler Açısından Ön-Değerlendirmeler
Yapılanma	Merkez: İngiltere, Ayna: Almanya	Merkez: Ankara Ayna: Yurtiçi/Bölge içi (MENA Ülkeleri/Balkan Ülkeleri/Ortadoğu Ülkeleri)
Bilgi Teknolojileri	Lab. Yazılımı- Bilgiye Erişilemedi. Hücre Hattı Katalogu	Lab yazılımı: Pedi-Sis (1003 projesi kapsamında geliştirilmiştir) Hücre Hattı Katalogu: Fizibilite projesi kapsamında oluşturulması planlanmaktadır.
Onam Formları	Aydınlatıcı	Pedi-Stem Biyobanka onam formları geliştirilmiştir (Etik Kurul Karar No:2016-03/01; Revizyon 2018)
Yasal Düzenlemeler	Uluslararası – (IMI Destekli)	Ulusal - Sağlık Bakanlığı-Hücre Birimi ile Görüşme Aşaması
Otomatize sistem	Hücre Kültür Sistemi	Otomatize Sistem uzun vadede değerlendirilecektir.
Hastalık Profili	Parkinson, Alzeimer ve diyabet ağırlıklı olmak üzere 35 farklı hastalıktan farklı yaşlara ait örnekler	Tüm hastalıklara açık olmak üzere ülkemizde yaygın olan nadir/kalıtsal hastalık temelli daha ziyade pediatrik yaş grubuna ait örnekler

4.2. Laboratuvar Bulguları

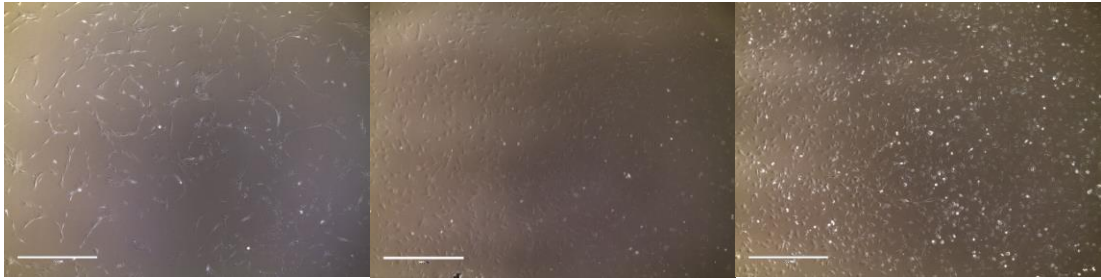
Bulguların ikinci kısmı laboratuvar uygulamalarını kapsamaktadır. Bu aşamada, uPKH kolonilerinin seçiminde istenmeden farklılaşmaya yönelen hücrelerin tanınmasına olanak sağlayacak bir yaklaşım olarak metabolik/mitokondriyal parametreler üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır. Bu bölümünün temel amacı, uPKH'lerin yeniden programlanma veya uPKH kültür aşamalarında kısmi programlanmış/farklılaşmaya yönelmiş hücrelerde morfolojik, fenotipik, moleküler özellikler yanında temel metabolik parametre (mitokondriyal morfolojik değişiklikler, miyokondriyal kütle ve ROS) değişikliklerinin ve köklülük durumlarının belirlenmesi, uPKH üretim ve çoğaltılmasında verim düşüklüğüne yol açacak olumsuz ortam koşullarının yeniden programlamanın erken aşamasında ve kültür sürecinde metabolik/mitokondriyal göstergeler üzerinden anlaşılabilirliğinin değerlendirilmesidir. Bu bağlamda, programlanmanın ve uPKH kültür sürecinin farklı zamanlarında incelemeler yapılmış, ayrıca farklı besiyeri (E8, E8 Flex ve StemFlex) ve farklı zaman aralıklarıyla (her gün/üç günde bir) ortam değişimi yapılmasının hücrelerin karakterizasyonuna ve mitokondriyal parametreler üzerine olan etkisi incelenmiştir. Erken programlanma aşamasında farklı günlerde yapılan çalışmalara ek olarak, seçilmiş kolonilerin çoğaltılması sonucu farklı pasajlarda da hücreler değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, erken pasaj olarak p0, p6, p7 ve p8; ileri pasaj olarak $\geq p21$ hücreler kullanılmıştır. Literatürde uPKH'lerin metabolik özellikleri, bilhassa son yıllar içerisinde detaylı çalışılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda uPKH'ler, EKH veya olgun fibroblastlarla karşılaştırılmış ve genellikle incelemeler >5-10 pasajlarda yapılmıştır. Çalışmamızda, en küçük p0 ve ≥ 21 . pasajlar yanında, henüz programlanmanın çok erken dönemlerinde (7. - 28. günler arası) deneyler yapılmış, uPKH üretiminde başlangıç hücresi olarak kullanılan MKH'ler (p2-p5), kontrol olarak esas alınmıştır.

4.2.1. Standart Koşullarda Yeniden Programlama ve uPKH Kültür Sürecinin İncelenmesi

A. Yeniden Programlama Süreci

a) Morfolojik İncelemeler

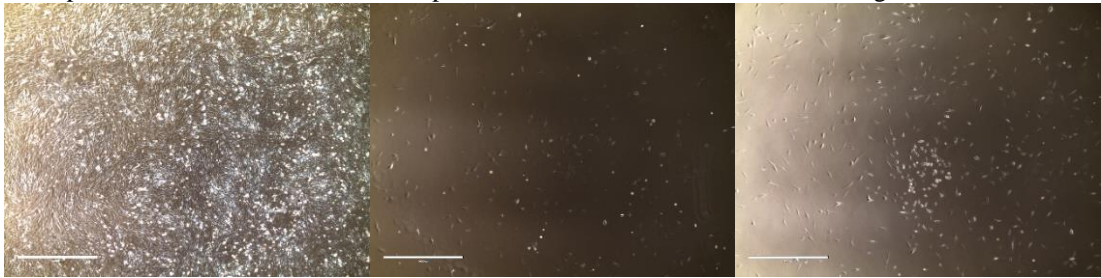
Polisistronik Klf4–Oct3/4–Sox2, cMyc ve Klf4 şeklinde üç vektör hazırlığı içeren Sendai 2.0 kiti kullanılarak MKH’lerden uPKH çoğaltmak üzere kolonilerin elde edilme süreci, ortalama 1 aylık zaman dilimini kapsamıştır. Dondurulmuş olarak saklanmakta olan pasaj 3 (p3) - MKH’ler çözülmüş ve DMF10 besiyeri ile beslenerek bulunduğu hücre kabında belirli yoğunluğa eriştiklerinde (Şekil 4.11-Foto. 1) EDTA ile toplanmış ve 1×10^5 (Şekil 4.11-Foto. 2), $1,25 \times 10^5$ ve $1,5 \times 10^5$ olmak üzere, 6 kuyucuklu plağın jelatin ile kaplanmış 3 ayrı kuyucuğuna ekilmiştir. Ekim yapılan hücre sayısının ertesi gün 2 katına çıktığı varsayılarak, en uygun (çok yoğun veya seyrek olmayan) hücresel yoğunluğa sahip hücre popülasyonu (önceki gün 1×10^5 olarak ekilmiş olan) için hesaplanan miktarda virüs yükü, DMF10 besiyeri ile hazırlanmış ve ortama eklenmiştir (Yeniden Programlama - YP/Uyarım). Uyarım sonrası ilk günden itibaren 28. güne kadar olan süreçte seçilen bazı mikroskopik görüntüler aşağıda verilmiştir. Genel olarak görüntüler 4X büyütmede fotoğraflanmıştır. Daha büyük olanlar, fotoğrafların altında ayrıca belirtilmiştir.



1. p3 -MKH

2. p4-MKH-100000

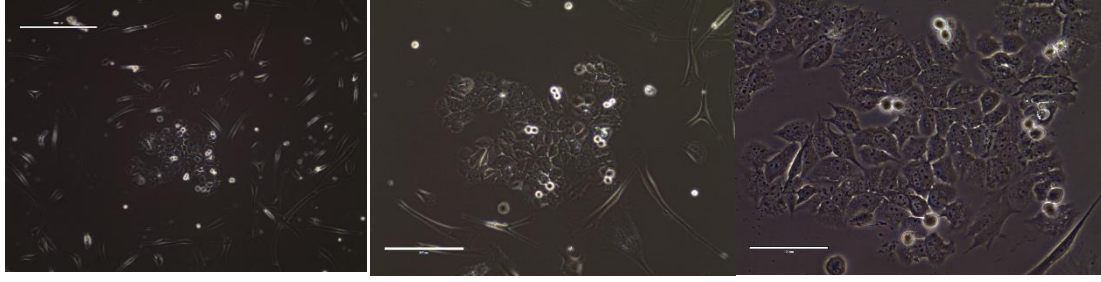
3. YP - 1.gün



4. YP - 5.gün (Matrigel kaplı plağa ekim için istenilen yoğunluğa ulaşılmış olan görünüm)

5. YP - 6.gün (Matrijel kaplı plağa aktarım sonrası ertesi gün)

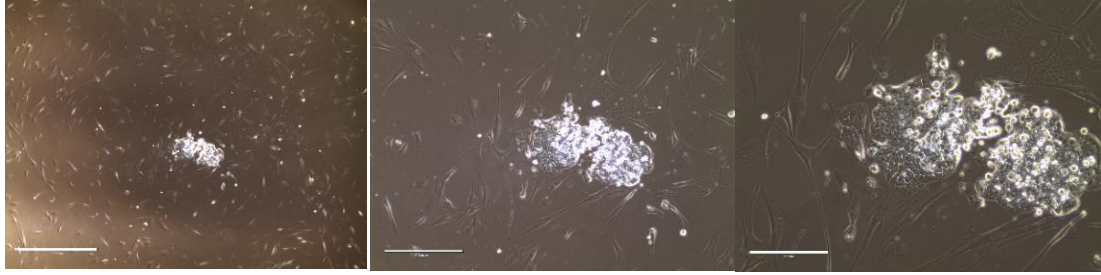
6. YP - 12.gün



7. YP - 13. gün (10x)

8. YP - 13. gün (20x)

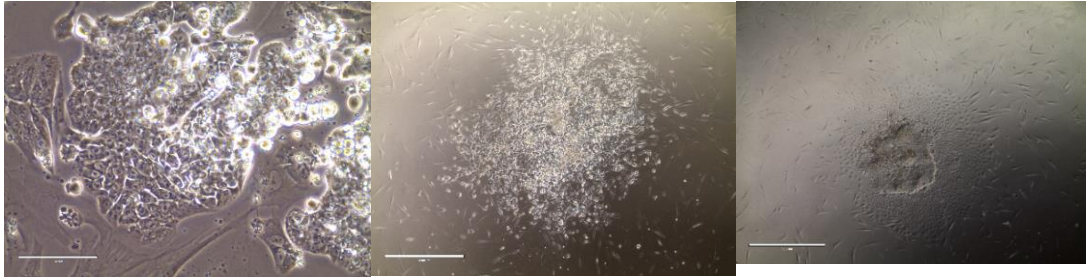
9. YP - 13. gün (40x)



10. YP - 17.gün

11. YP - 17.gün (10X)

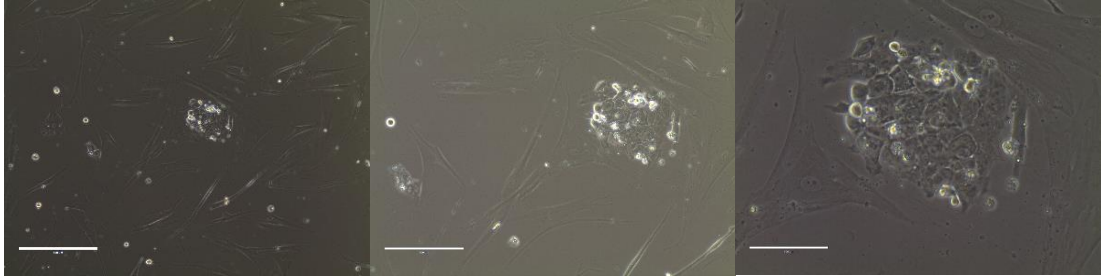
12. YP - 17.gün (20X)



13. YP - 17.gün (40X)

14. YP - 20.gün

15. YP - 20.gün



16. YP - 21. gün (10x)

17. YP - 21. gün (20x)

18. YP - 21. gün (40x)



19. YP - 24.gün

20. YP - 25.gün

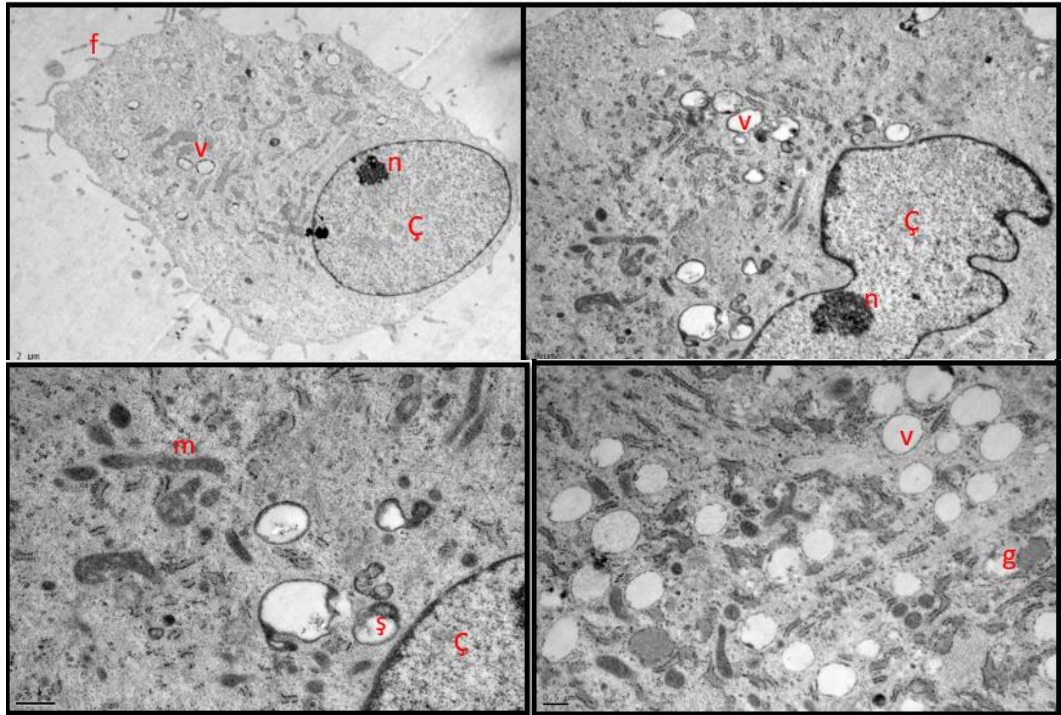
21. YP - 28.gün

Şekil 4.11. uPKH elde etme süreci-mikroskop görüntüleri.

Uyarımın 5. gününde jelatin kaplı kuyucuklarda oldukça yoğunlaşmış olan hücreler (Şekil 4.11. Foto. 5) akutaz enzimi uygulaması ile hücre kabından toplanarak matrijel kaplı kuyucuklara aktarılmıştır. Uyarımın 12. gününde, hücre kabının kimi bölgelerinde bulunan hücrelerde belirgin morfolojik değişiklikler ile birlikte yer yer kolonileşme eğilimi görülmüş, kimi bölgelerde ise MKH'lerin karakteristik iğsi görünümünün korunduğu gözlenmiştir. 17. güne gelindiğinde, ilk sıkı (kompakt) koloni yapısı farkedilmiştir (Şekil 4.11 - Foto. 11). 20. günde görülen kolonideki (Şekil 4.11 - Foto. 14) kahverengimsi renk değişiminin olduğu bölgelerin (uPKH kolonilerinin ideal yapısının bozulması), farklılaşma göstergesi olduğu düşünülmüştür. Mikroskop ile 40X'e kadar büyütülerek incelenen hücrelerden saf/sağlıklı/farklılaşmamış olan kolonilerin görsel seçilimi; oldukça sıkı bir şekilde bir araya gelmiş, sınırları belli ve şeffaf görünüm ile sağlanmıştır. Örneğin, 24. günde çekilmiş olan fotoğrafta (Şekil 4.11 - Foto. 19) görülen hücre kümesinin merkezinde farklılaşma başlamış olsa da uzantı şeklindeki şeffaf kısmı, sağlıklı uPKH'ler olarak değerlendirilmiş ve koloni seçiminde bu bölgelerin kesilerek alınabileceğine kanaat getirilmiştir. Uyarım sonrasındaki 28. günde, hücre kaplarının kimi kısımlarında oldukça saf uPKH kolonilerine (Şekil 4.11 -Foto. 21) rastlanılmış, kimi bölgelerde ise sıradışı bir şekilde yoğunluğu artan MKH'lerin yüzeyi kaplayan desen benzeri öbikleşmeler göstermesi dikkat çekmiştir (Foto. sunulmamıştır).

Standart YP süreci devam ettirilen hücreler ayrıca elektron mikroskobu ile ince yapı özellikleri açısından MKH'ler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). YP'nin 18. gününde bakılan hücrelerin çekirdeklerinin oldukça belirgin ve ökromatik yapıda olduğu gözlenmiştir. Sitoplazmanın organeller açısından fakir görümlü olduğu dikkat çekmiş ve yoğunlukla hücre iskeleti izlenmiştir. Granüllü endoplazmik retikulumun (GER) belirgin ve hücrelerin mitokondrilerinin, MKH'ler veya HKH'ler gibi potensiyeli nispeten (uPKH'ye göre) azalmış olan kök hücreler için karakteristik olarak tanımlanmış ve tübüler yapıda olduğu görülmüştür. Tübüler mitokondri yapısının bazen *primed* olarak ifade edilen uPKH'lerde de rastlanabildiğine dair bilgi edinilmiştir (121). Somatik hücrelerin mitokondriyal morfolojilerinin yeniden şekillenmesi, YP sırasında beklenen dramatik değişikliklerden biridir. Hücrelerin sitoplazmasında görülen vakuollerin, genişlemiş, düz endoplazmik retikulumun sisternaları olabileceği düşünülmüştür. Hücrelerin ortalama çapı 15 mikrometre olarak

ölçülmüş ve apoptotik hücre oranı 1/100 olarak belirlenmiştir. İnceleme esnasında, bir hücrenin kenarında omegazom (GER membranında otofajik vakuol öncülü yapı) benzeri yapı ile karşılaşmıştır. Genel olarak, yuvarlak şekilli filopodlara sahip hücrelerle karakterize olan YP'nin 18. günündeki hücrelerde henüz pluripotent özelliklerin öne çıkmadığı, daha ziyade MKH görünümünün baskın olduğu, sitoplazmanın çekirdek etrafında MKH'ye göre daha dar bir alanı kapladığı farkedilmiştir.

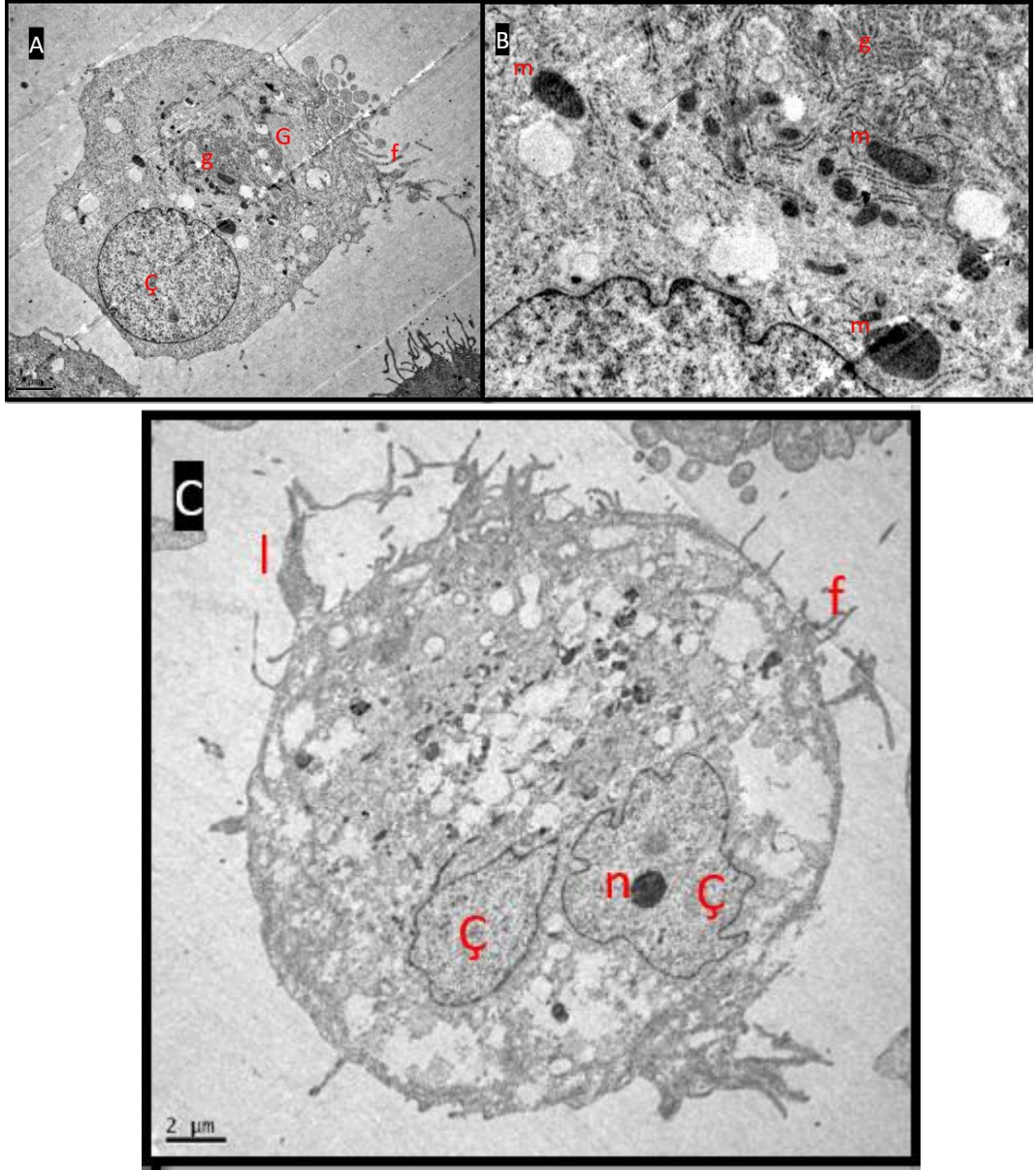


Şekil 4.12. YP'nin 18. günündeki hücre grubunun ince yapı özellikleri

(Ç:çekirdek, n:nükleolus, v:vakuol, m:mitokondri, ş:şapkalı mitokondri, g: GER sisternaları, f: filopod.)

Başlangıç hücremiz olan MKH'ler, olgun hücre olmayıp, (multipotent) kök hücre olmaları nedeniyle çekirdekleri belirgin nükleoluslu, ökromatiktir. İncelenen kesitlerde, farklı boyut ve morfolojide çekirdekler görülmüştür (Şekil 4.13). MKH'lerde GER gelişmiş, golgi kompleksi belirgin olarak gözlenmiştir. Mitokondriler uzun, tübüler görünümlüdür. MKH'lerin sitoplazma membran sınırlarının düzensiz ve filopod ile lamellipod yapıları bakımından zengin olduğu farkedilmiştir. Ortalama hücre çapı 16 mikrometre (μm) olarak ölçülmüştür. Çekirdek

sitoplazma oranının yeniden programlanmakta olan hücrelere göre azalmış olduğu gözlenmiştir.



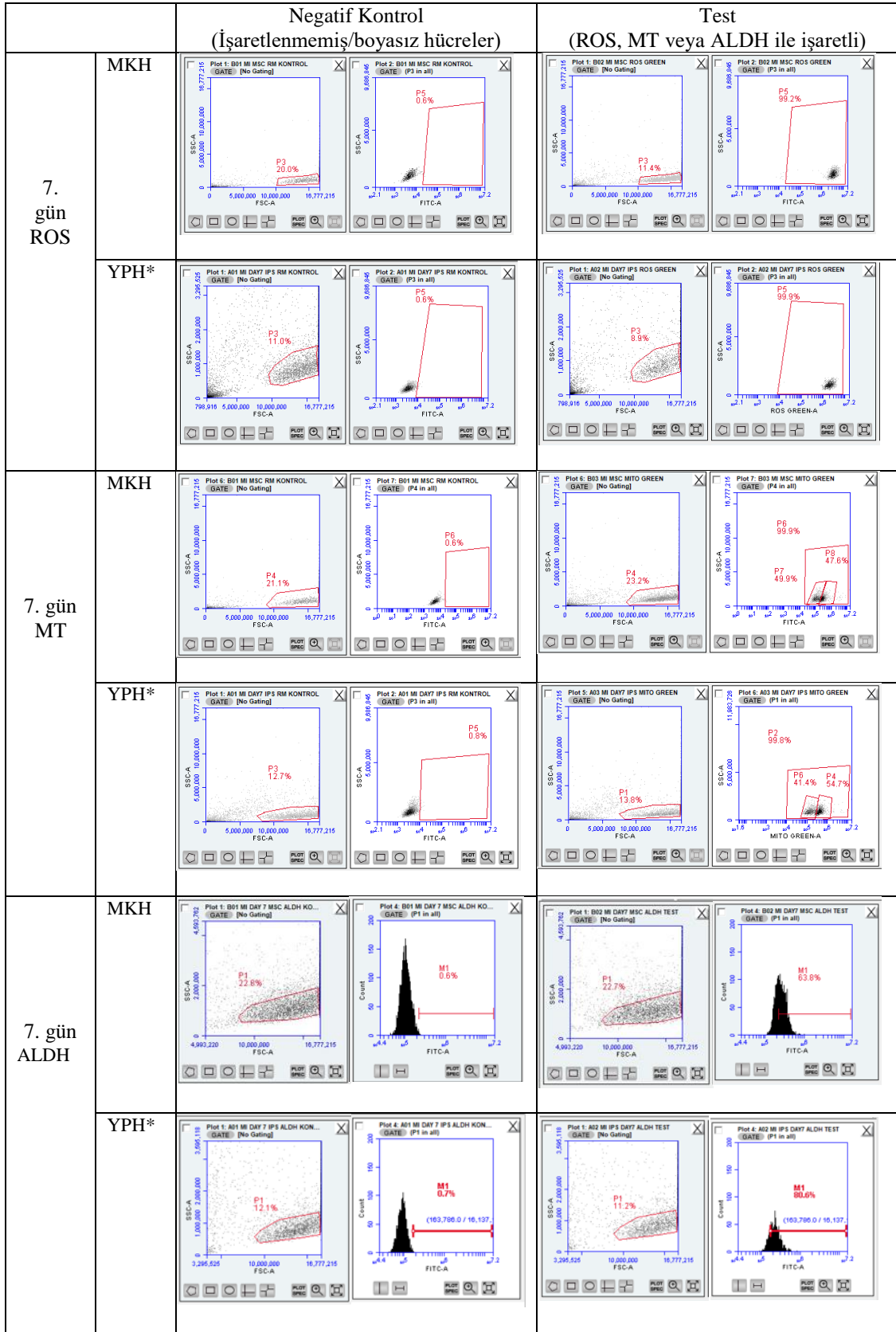
Şekil 4.13. MKH grubunun ince yapı özellikleri-3 farklı kesit incelemesi.

(Ç:çekirdek, n:nükleolus, m: mitokondri, l:lamellipod, f:filopod, g:GER, G:Golgi)

b) Metabolik/Mitokondriyal Parametreler ve Köklülük Açısından İncelemeler

Uyarım/YP sürecinin farklı günlerinde toplanan hücreler (Şekil 4.14'te akım sitometri ölçümlerini gösteren grafiklerde "IPS" şeklinde ifade edilmiştir) ve kontrol olarak MKH'ler (Şekil 4.14'te akım sitometri ölçümlerini gösteren grafiklerde "MSC")

olarak ifade edilmiştir) için mitokondri kitlesi (MitoTracker, MT), ROS ve ALDH düzeylerinin ölçümleri yapılarak metabolik süreç açısından değerlendirilmek istenmiştir. 7. gündeki ölçüm grafikleri Şekil 4.14'te verilmiştir.



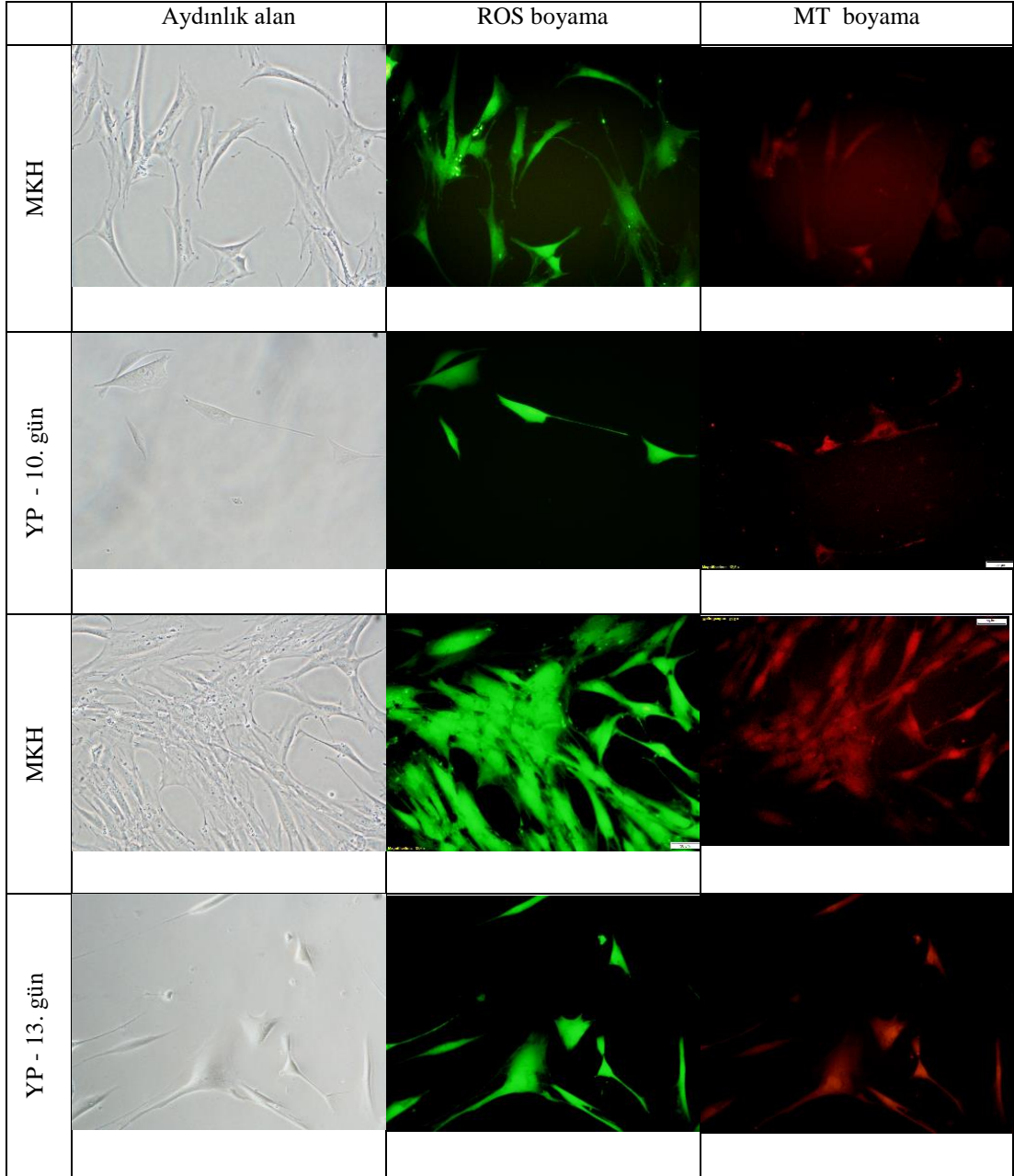
Şekil 4.14. YP'nin 7. günündeki hücreler ve MKH'lerin akım sitometrik ölçümleri.

(*YPH: Yeniden Programlanan Hücreler)

Grafiklerde, ilgilendiğimiz hücre popülasyonlarını belirtmek üzere, boyanmamış (herhangi bir belirteç/boya eklenmemiş) kontrol hücrelerine göre alınmış olan kapılar yüzde olarak gösterilmiş, ROS ve MT floresans yoğunluklarına göre parlak, dim (soluk) veya dim/negatif boyanan hücre oranları incelenmiş, ayrıca ortalama/orta floresans yoğunluğu (Mean/Median Fluorescence Intensity, MFI) değerleri de dikkate alınmıştır. Mitokondrinin tiyol (thiol, sülfidril/-SH) gruplarına bağlanarak yalnızca canlı hücreleri boyayan/işaretleyen MT (242) ile muamele edilmiş olan MKH'ler ve uyarımın 7. gününde olan hücreler MT ile yüksek oranda (hücrelerin >%99.7) boyanmıştır. MT boyanma derecesini yansıtan ortalama MFI değerleri, YP'nin 7. gününde olan hücreler ve MKH'lerde sırayla, 542,037.56 ve 341,084.48 bulunmuştur.

Hücrelerin MT ifade derecesine göre analizinde ise, MKH'lerin %47.6'sının MT ifadesinin parlak olduğu, %49.9'ünde ise dim boyanma olduğu dikkat çekmiştir. YP hücrelerde de bu oran farklı iki inceleme sonucunda %53.1 parlak ve %44.8 dim olarak bulunmuştur. Bu analizler sonucunda MT ifadesinin MKH'ler ve YP'nin 7. gününde benzer olduğu görülmüştür. Hücrelerin ROS seviyelerine bakıldığında ise hem MKH'lerin, hem de YP'nin 7. günündeki hücrelerin tamamına yakınında ROS aktivitesi bulunduğu (%99) görülmüştür. ROS boyanma derecesini gösteren MFI değerleri dikkate alındığında, YP'nin 7. günündeki hücrelerde, MKH'lere göre ROS MFI değerleri daha düşük (sırayla, 4,142,676.89 ve 5,017,913.79) bulunmuştur. MKH'lerin içinde, ROS parlaklığı yüksek hücre oranının %66 olduğu, YP'nin 7. günündeki hücrelerin analizinde ise, ROS en parlak hücrelerin oranının %39 olduğu, dim alanın oranının %50 civarında olduğu dikkat çekmiştir. YP'nin 7. gününde değerlendirilen ALDH ölçümlerinde, ALDH pozitif hücre oranını MKH'lerde %63,8 iken yeniden programlanan hücrelerde %80 olarak bulunmuş, ALDH pozitif hücreler arasında parlaklığı en yüksek hücrelerin oranı ise %20 olarak saptanmıştır.

YP'nin 10. ve 13. günlerinde akım sitometri değerlendirmesi yapılamayan hücreler, ROS kiti ve MT ile boyanarak floresans mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 4.15. YP'nin 10. ve 13. günlerindeki hücrelerin aydınlık alan ve floresan boyama, görüntüleri (20X).

Negatif kontrol olarak kullanılan ve başlangıç hücresi olan p5 MKH'lerde hücresel yoğunluğun ve boyanmanın fazla olduğu görülmüş, YP'nin 10. ve 13. günlerinde olan hücrelerin de MT ve ROS ifadesi açısından pozitif boyanma özelliğine sahip oldukları gözlenmiştir. Aydınlık alan görüntüleri ile karşılaştırıldığında/karşılaştırıldığında, ROS ifadesinin tüm yeniden programlanan hücrelerde pozitif olduğu, MT ölçümlerinde ise bazı alanlardaki hücrelerde (YP 10. gün) boyanmanın daha düşük olduğu dikkat çekmiştir. Ayrıca, YP'nin erken aşaması

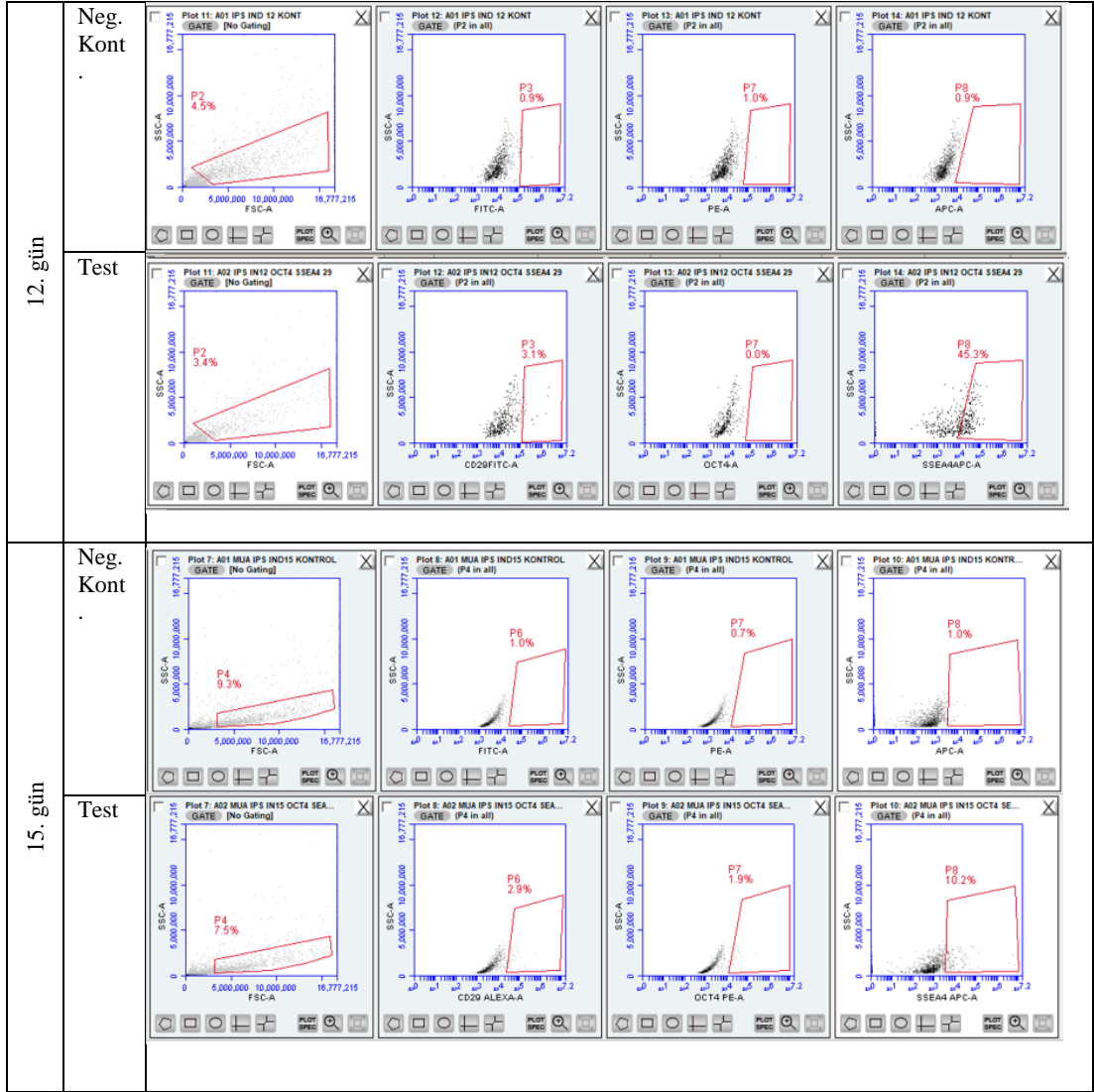
olmasına rağmen hücrelerin morfolojisinde, fibroblastoid görünümün kısmen epiteloid olmaya başladığı farkedilmiştir.

Diğer taraftan, YP'nin 12., 15. ve 18. günlerinde de ölçümler alınmaya çalışılmış ve MKH'ler ile kıyaslandığında YP sürecindeki hücrelerin toplam popülasyonlarının oldukça az ve dağınık olduğu gözlenmiştir. Genel olarak değerlendirilecek olursa, ROS MFI değerlerinin, YP'nin 12. , 15. ve 18. günlerinde (1,224,411.45, 1,680,465.81 ve 1,112,606.27) , 7. güne (4,142,676.89) kıyasla azaldığı görülmüş, >%40-50 hücrede (12, 15, 18. günler sırayla, %45, %40 ve %56) ROS ifadesinin dim/negatif olduğu dikkati çekmiştir. MT analizlerinde ise, 12. gün değerlendirme yapılamamış; 15 ve 18.günlerde, %43 ve %50 oranında hücrede MT dim/negatif hücreler olduğu gözlenmiştir. ALDH analizleri de 12. ve 15. günlerde sırayla, %59 ve %59 oranında dim pozitif olarak değerlendirilmiştir.

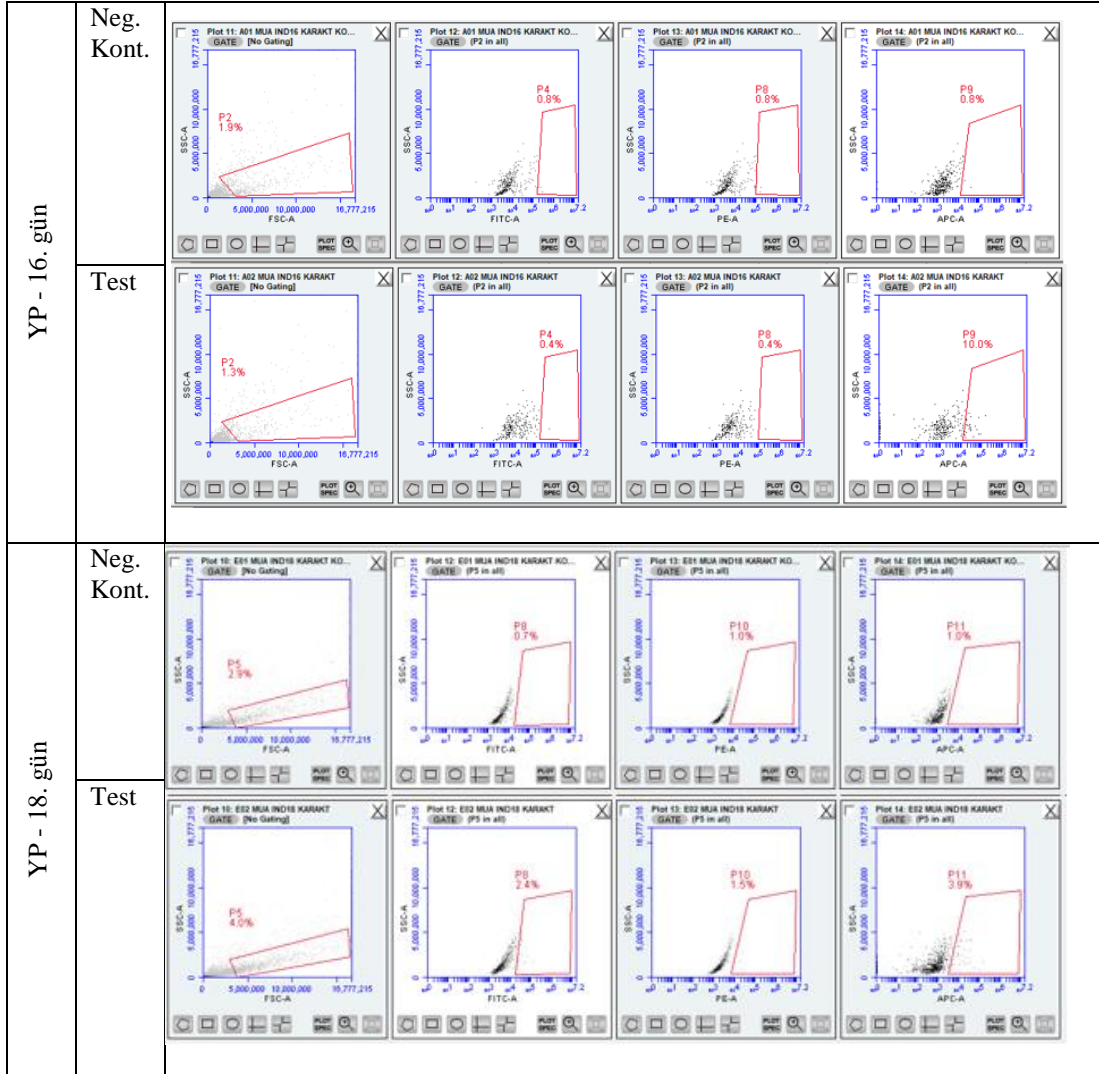
c) Yüzey Belirteçleri Açısından Değerlendirme

Uyarımın farklı günlerinde CD29, Oct4 ve SSEA-4 yüzey belirteçlerinin düzeyleri akım sitometri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.16).

YP başlatılan hücrelerde 12. günden itibaren MKH belirteci olan CD29 ifadesinin kaybolduğu (<%3) görülmüştür. Genel hücre popülasyonunun dağınık ve en fazla %10 civarında ölçüldüğü testlerde, SSEA-4 ve Oct4 yüzdesi değerlendirildiğinde pluripotentlik belirteci olan Oct4'ün <%2 olduğu ve bu aşamadaki hücrelerde henüz pozitifleşmediği; SSEA-4 düzeyinin, ilk koloni oluşumlarının görülmeye başladığı 12. günde %45 saptandığı, ancak 15. ve 16. günlerde %10 seviyesine düştüğü, 18. günde ise %3,9 olduğu, Şekil 4.16'daki ölçüm grafiklerinde görülmektedir. Boyanmamış/antikor ile işaretlenmemiş hücreler, negatif kontrol olarak temel alınmıştır.



Şekil 4.16. YP'nin 12. ve 15. günlerindeki hücrelerin karakterizasyonu.
(CD29, Oct4 ve SSEA-4)

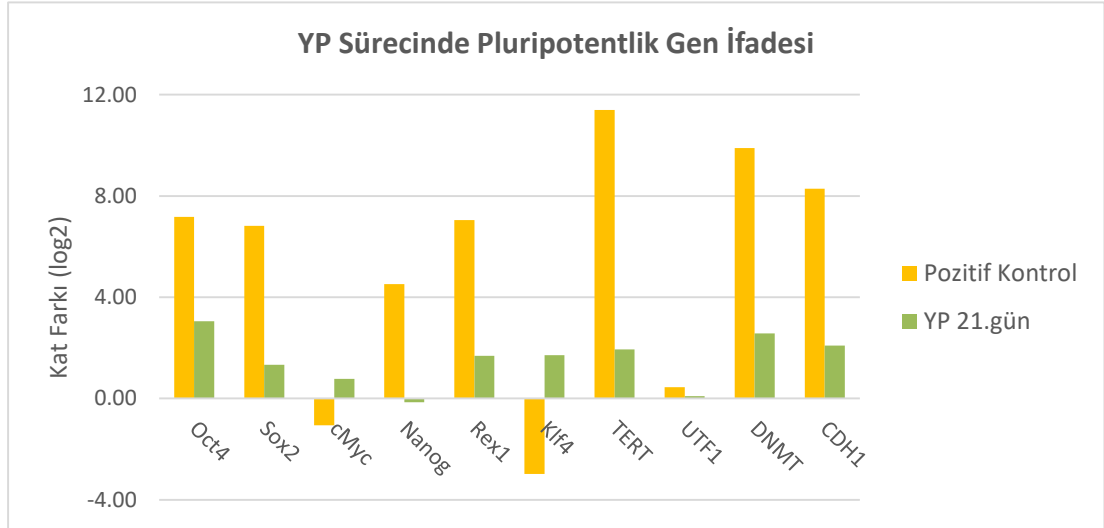


Şekil 4.17. YP'nin 16. ve 18. günlerindeki hücrelerin karakterizasyonu

d) Gen İfadesi Açısından İncelemeler

Uyarımın 21. günündeki hücrelerden alınan örneklerde, seçilen pluripotentlik genlerinin (Oct4, Sox2, cMyc, Nanog, Rex1, Klf4, TERT, UTF1, DNMT3a ve CDH1) düzeyleri kantitatif PCR ile incelenmiş ve analiz sonucu oluşturulan grafik şekil 4.18'de sunulmuştur. PCR sonuçlarını normalize etmek üzere, tüm örneklerde nispeten sabit miktarlarda bulunan bir gen dizisine sahip olan β -actin, korunmuş gen olarak, kontrol amaçlı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan MKH'lere göre normalize edilen RT-PCR verilerinde pluripotentlik gen düzeyleri, pozitif kontrol olarak ≥ 5 uPKH'ler ile karşılaştırılmıştır.

Gen ifadelerinin değerlendirildiği deneylerde teknik tekrar olarak 2 ölçüm sonucu esas alınmıştır, biyolojik tekrar bulunmadığından grafiklerde hata çubukları verilmemiştir.



Şekil 4.18. Standart YP sürecindeki hücrelerin değerlendirilmesi.

Hücrelerin toplandığı 21. günde, koloni oluşumları gözlenmeye başlamış olsa da henüz programlanmış koloniler seçilmemiş, toplanan hücre kabında, kaynak hücre olan p4 MKH'lerin yoğunlukta olduğu bir hücre popülasyonu test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan uPKH'ye dönüşmüş hücrelerde Oct4, Nanog, Sox2, Rex1, TERT, DNMT3a, CDH1 gibi pluripotenslik belirteçlerinin belirgin yüksek olduğu görülmektedir. YP başlatılan hücrelerin, YP'nin çok erken aşamasında ve çok az sayıda programlanan hücre olduğu halde, pluripotenslik belirteçlerini, Nanog ve UTF1 hariç, katsayı düşük de olsa ifade etmeye başladığı görülmüştür.

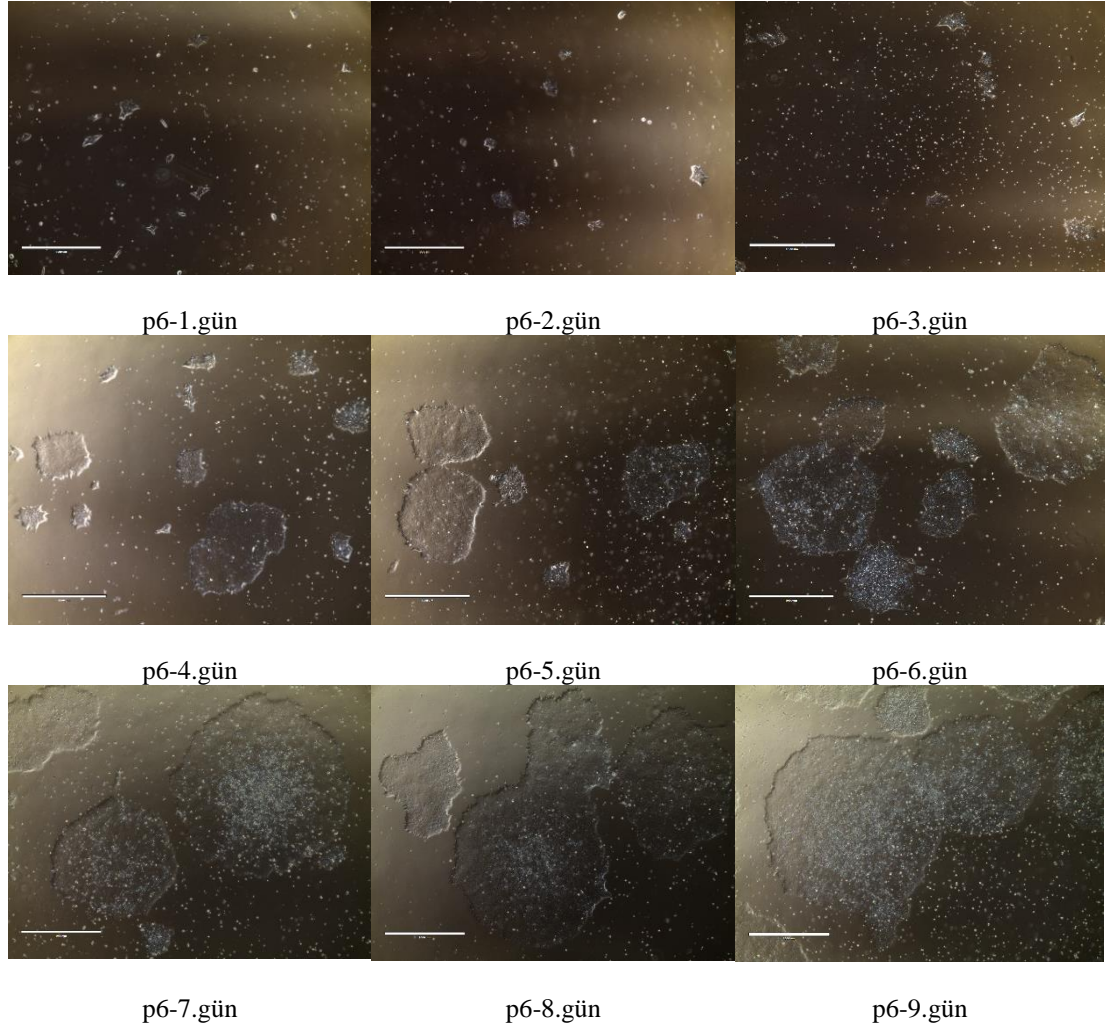
B. uPKH Kültür Süreci - Erken ve Geç Pasaj uPKH'lerin İncelenmesi

TÜBİTAK 1003 programı destekli "uPKH Banka Prototipi" projesi kapsamında daha önce, OSKM faktörlerini taşıyan Sendai virüs transdüksiyonu ile üretilmiş, karakterize edilmiş ve azot tankında saklanmakta olan insan MKH kaynaklı uPKH'lerden p5 ve p20 hücreler çözülmüş, her gün E8 besiyeri ile beslenerek bir pasaj ilerletildikten sonra günlük mikroskopik takipleri yapılmış ve ROS ve MT boyamaları ile metabolik, ALDH boyaması ile de köklülük açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca

ince yapı özelliklerinin ve pluripotential gen ifadelerinin incelenmesi için hücreler ayrılmıştır.

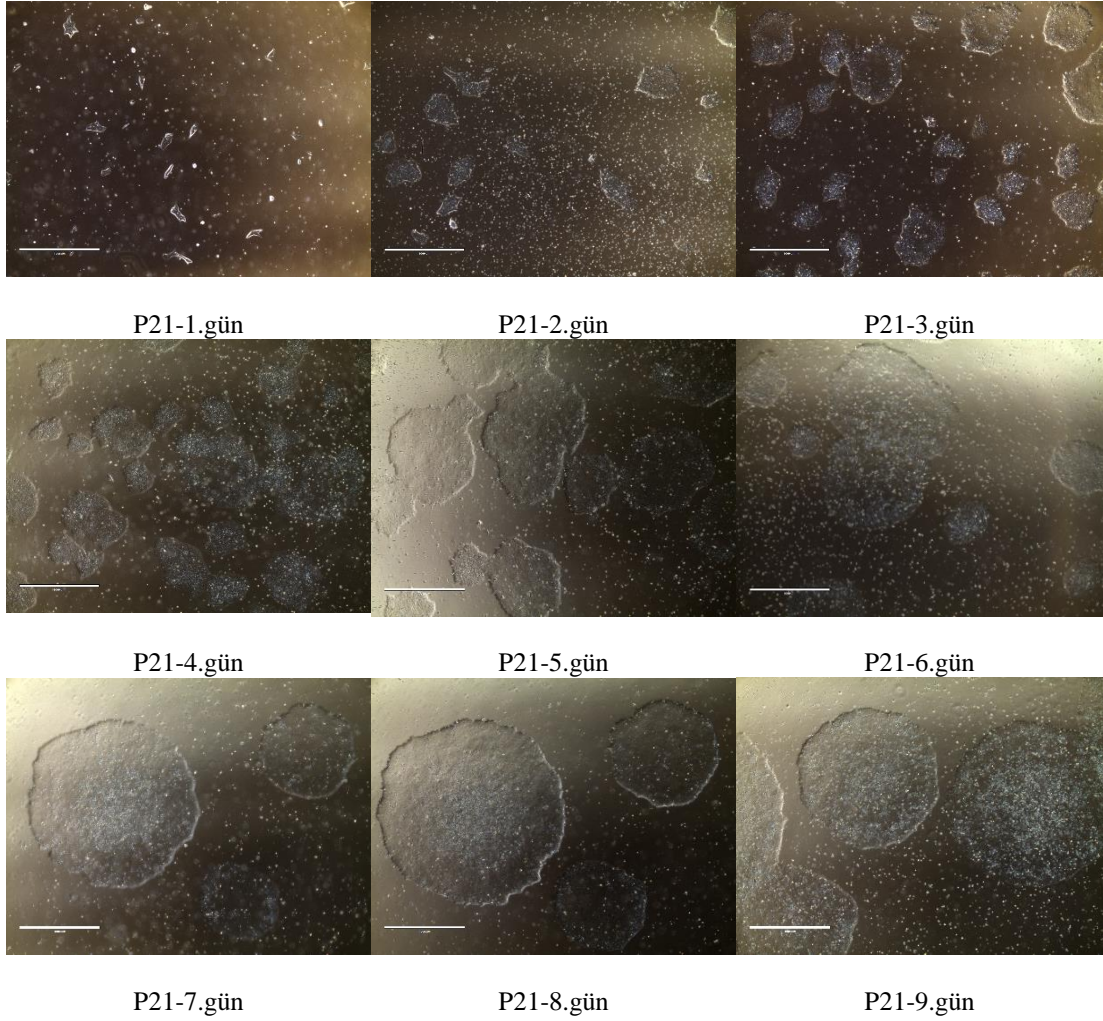
a) Morfolojik İncelemeler

Paralel kültüre alınan erken ve geç pasajlardaki hücreler, 6 kuyucuklu plaklara az yoğun ekilmiş ve 9 gün boyunca her gün beslenerek çoğaltılmıştır.



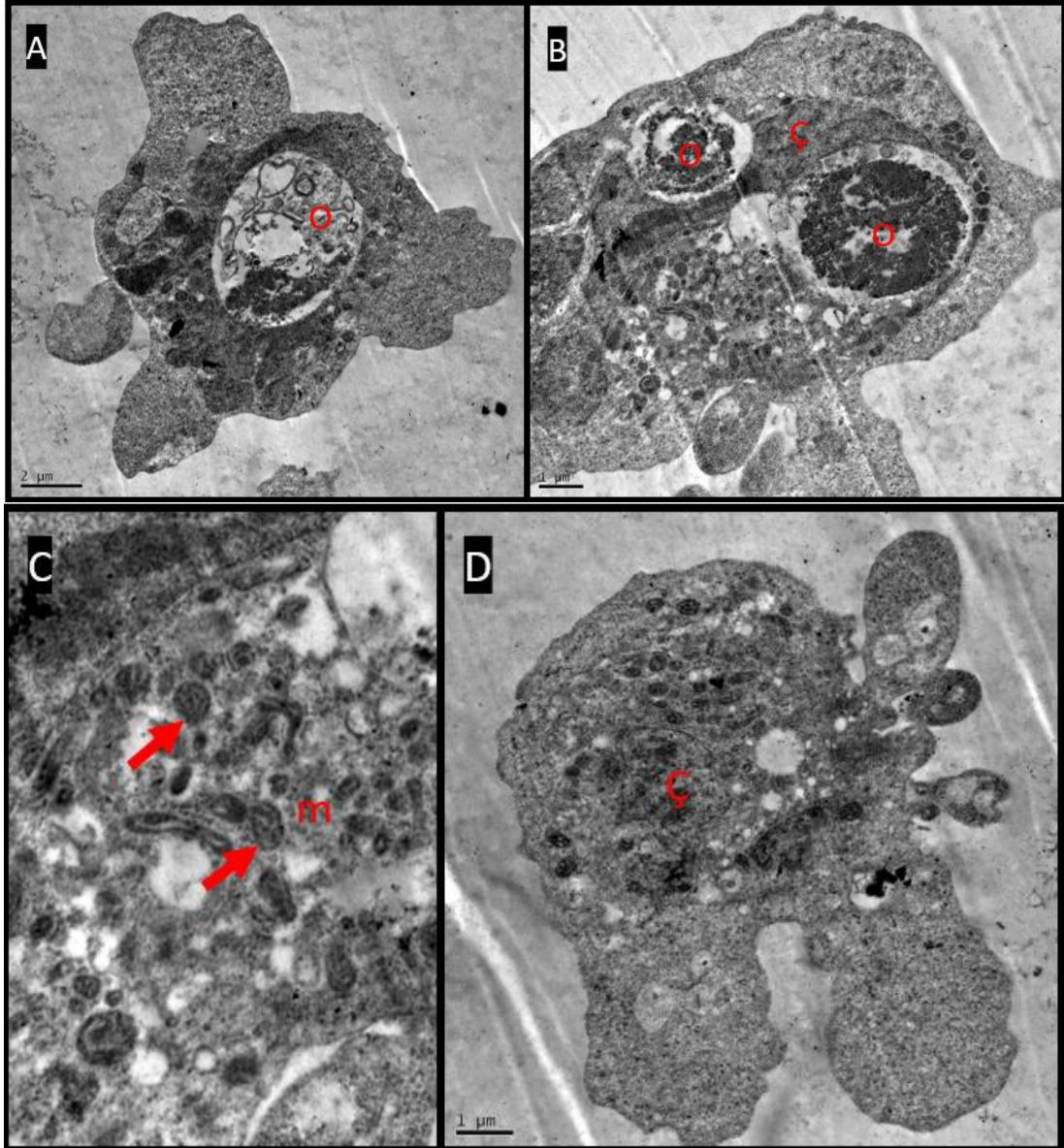
Şekil 4.19. Erken pasaj (p6) uPKH kültür süreci - mikroskop görüntüleri.

Günlük mikroskopik incelemelerde, hücrelerin morfolojik olarak oldukça karakterize uPKH kolonileri oluşturdukları gözlenmiş, herhangi bir farklılaşma belirtisi ile karşılaşılmamıştır.



Şekil 4.20. Geç pasaj (p21) uPKH kültür süreci - mikroskop görüntüleri.

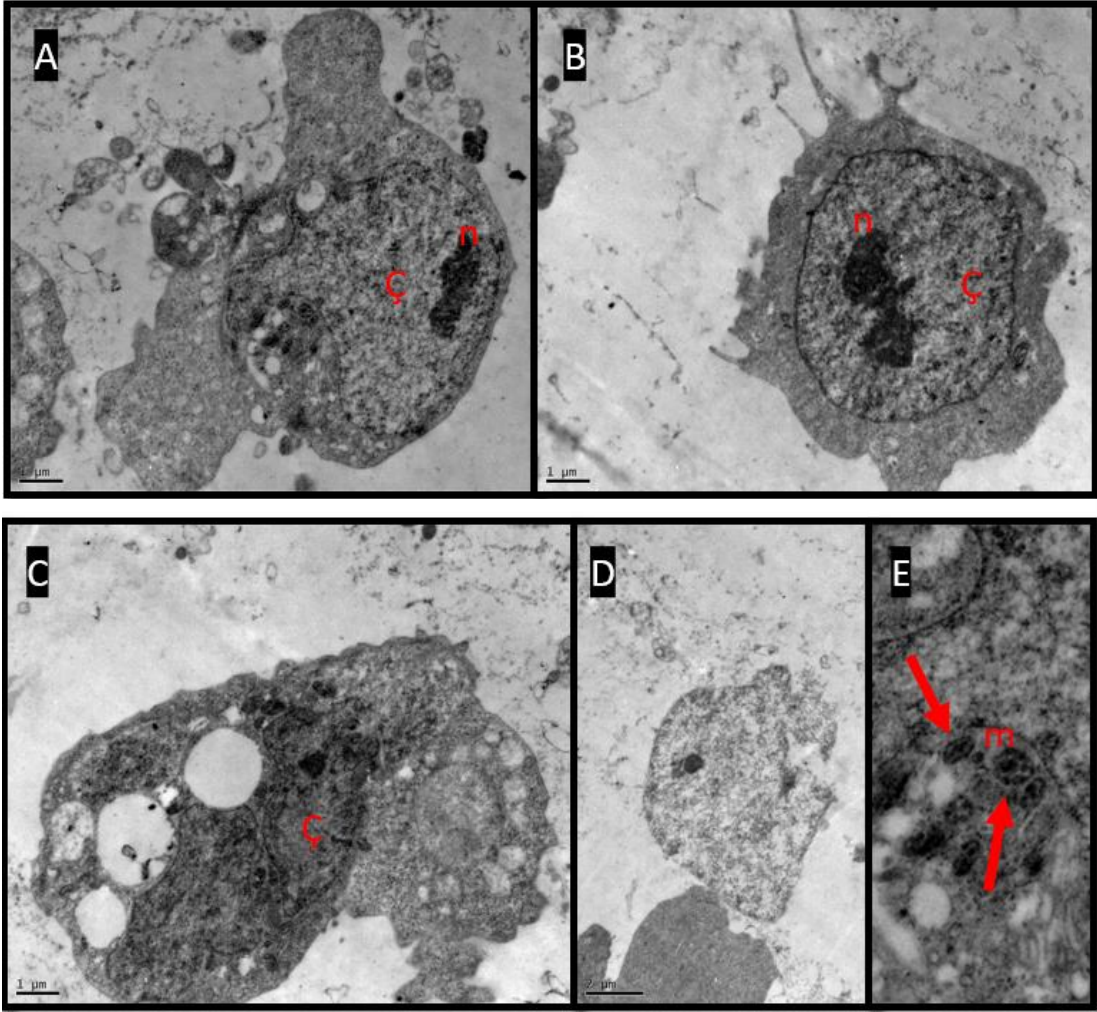
Elektron mikroskopik ince yapı analizlerinde (Şekil 4.21), p6 grubu hücrelerin sitoplazmalarındaki elektron yoğunluğunun MKH grubuna göre daha fazla olduğu (hücre sel içeriğ in fazla olduğu) görülmüştür. Çekirdek morfolojileri birbirine benzer yapıda (polimorfik değil) ve ökromatiktir. GER az gelişmiş görünmekte ve granülsüz endoplazmik retikulum (DER) seçilememiştir. Golgi kompleksleri gelişmemiştir. MKH ile kıyaslandığında, çekirdek etrafında yerleşimli daha fazla mitokondri görülmüştür. Mitokondriler globüler görünümlü ve krista yapıları ayırt edilmektedir. Ayrıca uPKH'lerdeki krista yapıları, MKH'lerin tübüler mitokondrilerine göre daha az gelişmiştir. uPKH'lerde, membran uzantıları az veya yoktur. Erken pasaj (p6) uPKH grubunun genel karakteristiği, otofajik vakuelleri olan ve yuvarlak şekilli hücrelerdir. Çekirdek sitoplazma oranı çekirdek lehine büyüktür.



Şekil 4.21. Erken Pasaj (P6) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.

(Ç:çekirdek, O:otofajik vakuol, m:mitokondri (ok ile işaretli))

p21 grubu incelendiğinde (Şekil 4.22), çekirdek sitoplazma oranı yüksek, belirgin çekirdekçik (nükleolus) içeren hücreler görülmüştür. Çekirdek sitoplazma oranı MKH grubuna ve erken pasaj gruplarına göre çekirdek lehine artmıştır. 10 hücrede 2 tane apoptotik hücreye rastlanmıştır. Az sayıda nekroze hücre görülmüştür.



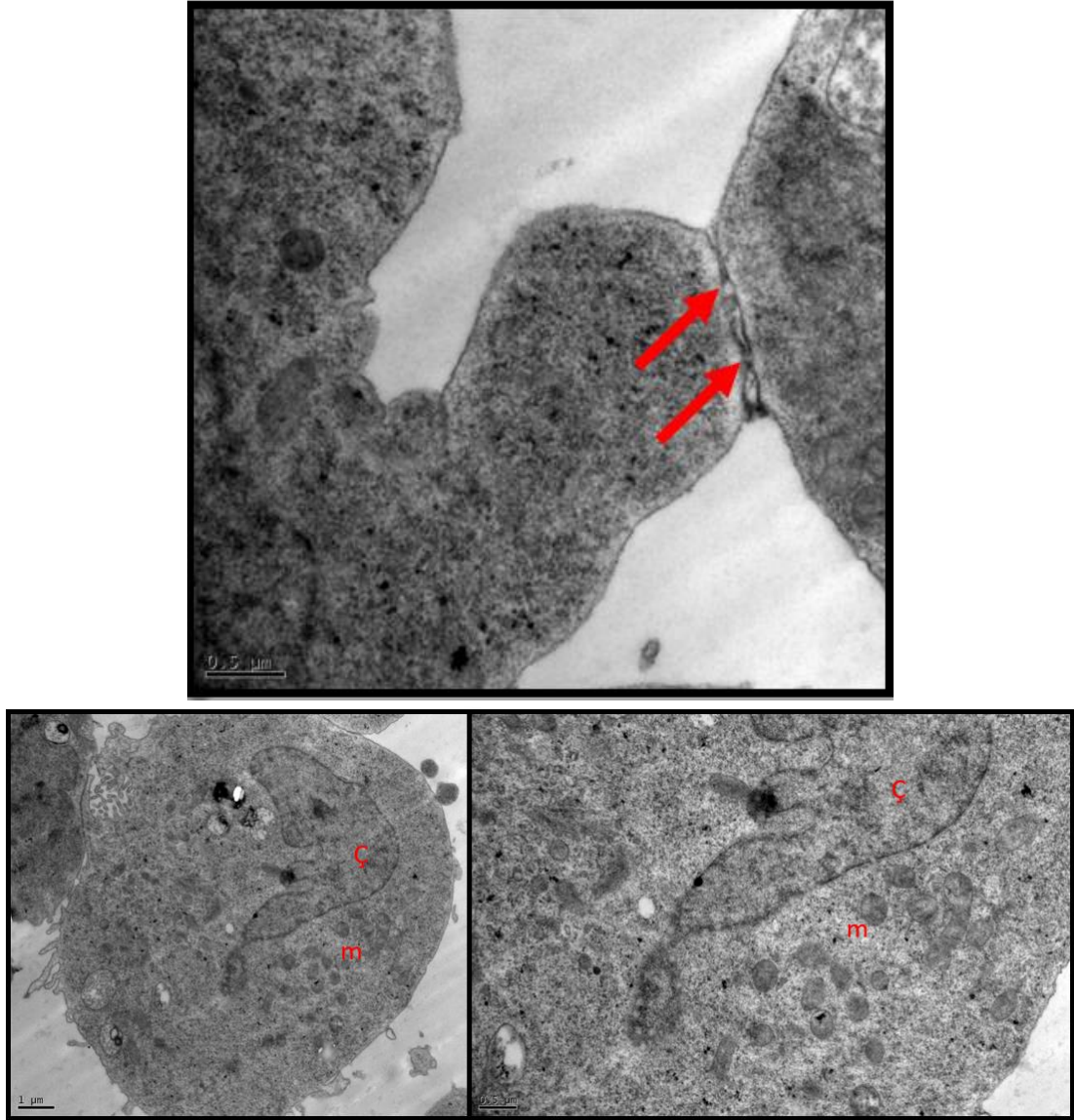
Şekil 4.22. Geç Pasaj (P21) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.

(D: Nekroze hücre çekirdeği görülmekte. Ç:çekirdek, n:çekirdekçik, m:mitokondri)

p21 hücreler organelden fakir, mitokondri sayı ve büyüklükleri erken pasaj ve MKH grubuna göre az olarak değerlendirilmiştir. Mitokondriler globüler görünümlüdür. Yer yer çekirdeği sıkıştırmış, iri vakuolleri olan hücelere rastlanmıştır. Hücrelerde filopod, lamellipod gibi membran farklılıkları yoktur. p21 grubu, uPKH ile uyumlu ince yapı özelliklerine sahip hücreler olarak değerlendirilmiştir.

Ardışık (p22) ve ilerletilmiş geç pasajlar (p27), p21 ile karşılaştırılarak, aralarında ince yapı özellikleri açısından fark olup olmadığını tespit etmek üzere yapılan değerlendirmede, p22 grubu hücrelerin belirgin nükleoluslu, ökromatik çekirdeğe sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.23). Çekirdek sitoplazma oranının p21, erken pasaj ve MKH grubuna göre çekirdek lehine arttığı hücreler izlenmiştir.

Hücrelerin sitoplazma alanlarının büyük kısmını organellerin almış olduğu görülmüştür.



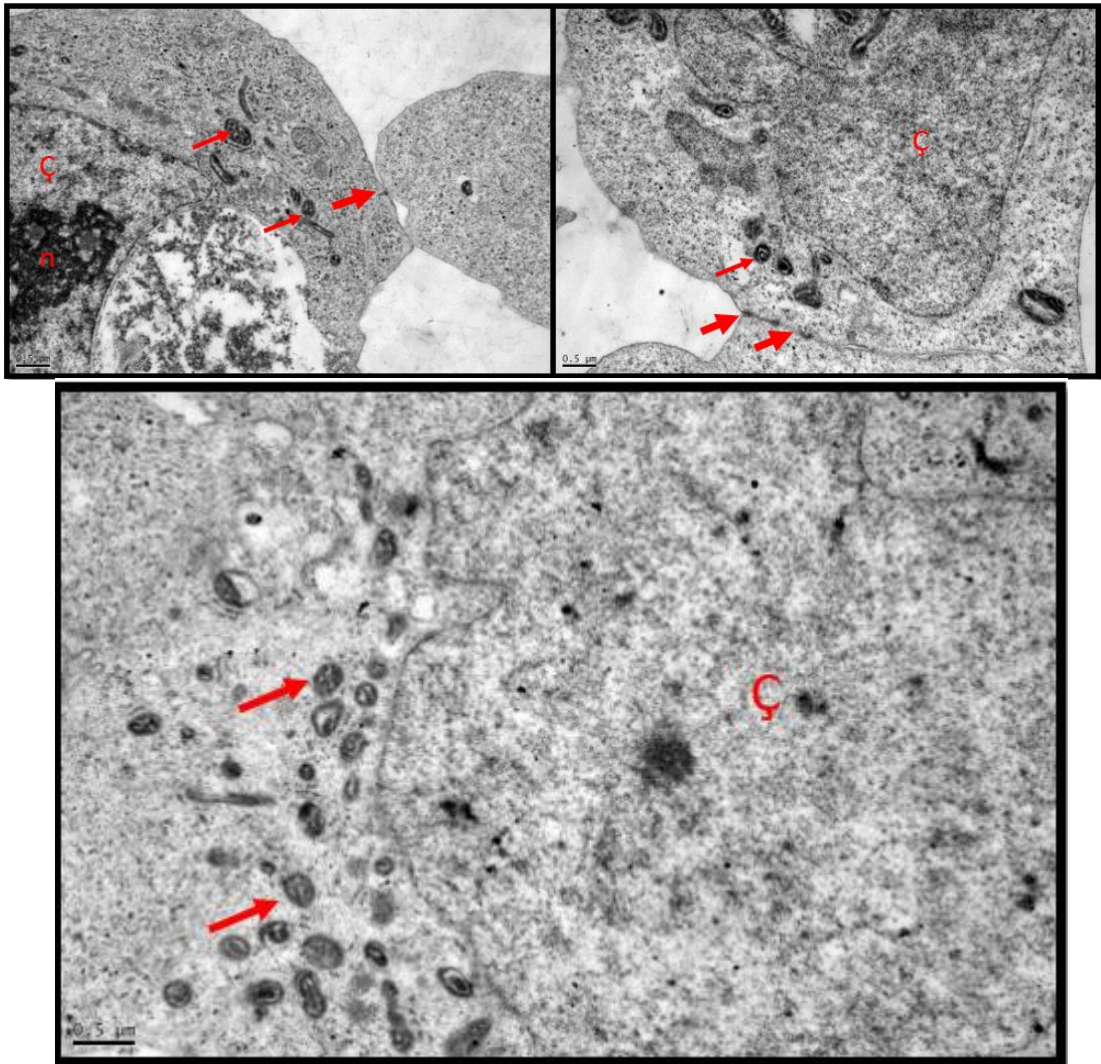
Şekil 4.23. Geç Pasaj (p22) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.

(Ç:çekirdek, m:mitokondri, oklar hücreler arası etkileşimi göstermektedir.)

p22 grubunda, golgi ve GER gelişmemiş, hücrelerin temas yerlerinde geniş ve sıkı bağlantılar dikkat çekmektedir. Hücre membranı düzgün ve yüzey farklanması göstermemektedir. Az sayıda otofajik vakuol ve globüler görünümlü mitokondriler izlenmiştir. Mitokondrilerin diğer gruplara göre büyük ancak krista sayısının oldukça

az olduğu görülmüştür. p22 grubu hücreler p21 ile kıyaslandığında, bir pasaj ilerlemiş olmasına rağmen organel oranındaki artış dikkat çekmektedir.

p27 grubu hücrelerde çekirdek sitoplazma oranı p22, p21, erken pasaj (p6) ve MKH grubuna göre artmış olarak gözlenmiştir (Şekil 4.24). Mitokondri sayısında artış görülmüştür. Sitoplazmada otofajik vakuollere ve glikojen partiküllerine rastlanmıştır. Hücreler arasında geniş bağlantı birimleri (fasia adherens) ve birden fazla nükleolusu olan hücreler görülmüştür. Hücre membranlarında filopod ve lamellipod görülmemiş, yer yer nekroze hücreler ayırt edilmiştir. Hücreler p22'ye göre, uPKH yapısının özellikleri ile daha uyumlu olarak izlenmiştir.

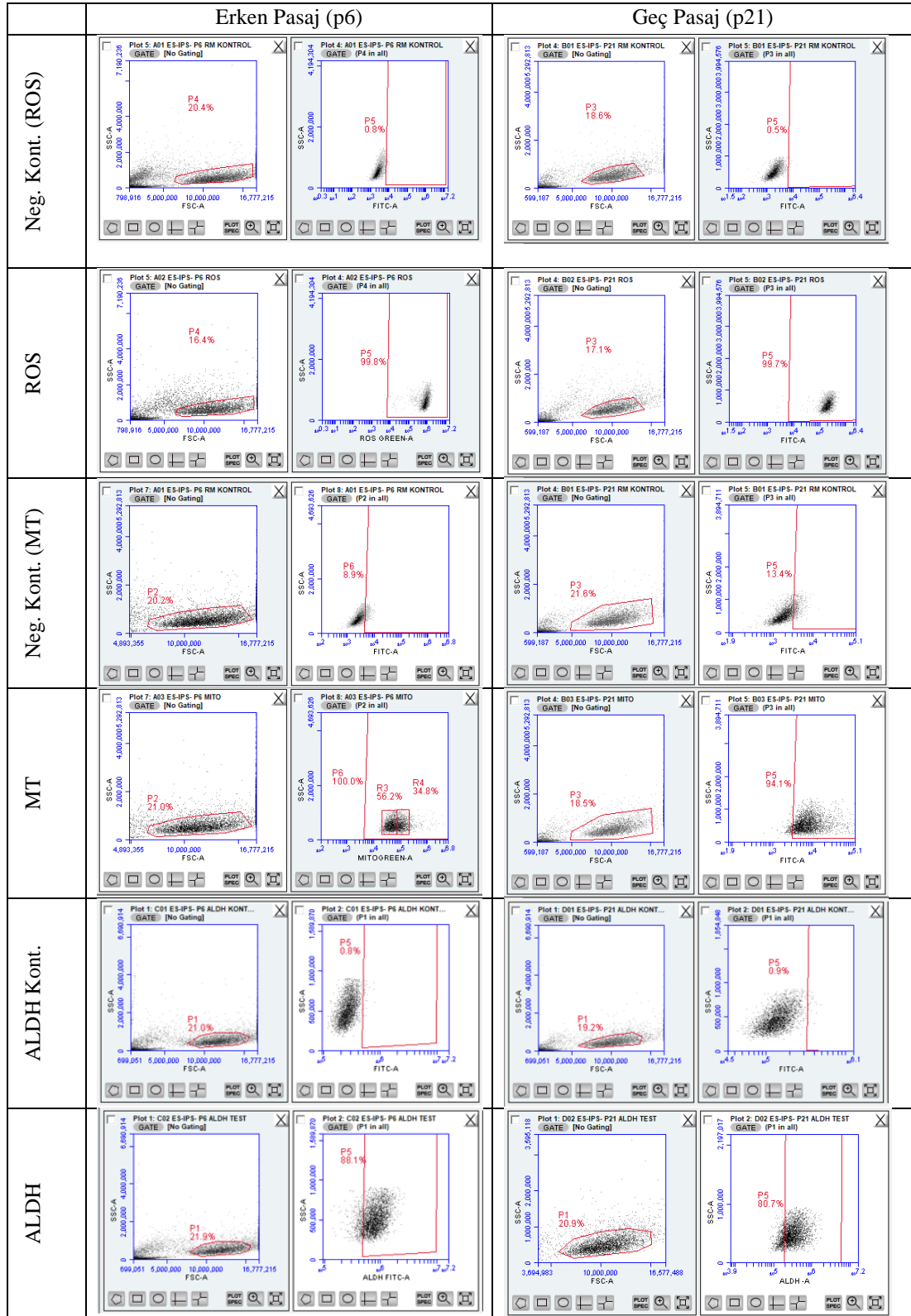


Şekil 4.24. Geç Pasaj (p27) uPKH grubunun ince yapı özellikleri.

(Ç:çekirdek, n:nükleolus, kalın oklar hücrelerarası bağlantıları, ince oklar tübüler mitokondrileri göstermektedir.)

b) Metabolik/Mitokondriyal Parametreler ve Köklülük Açısından İncelemeler

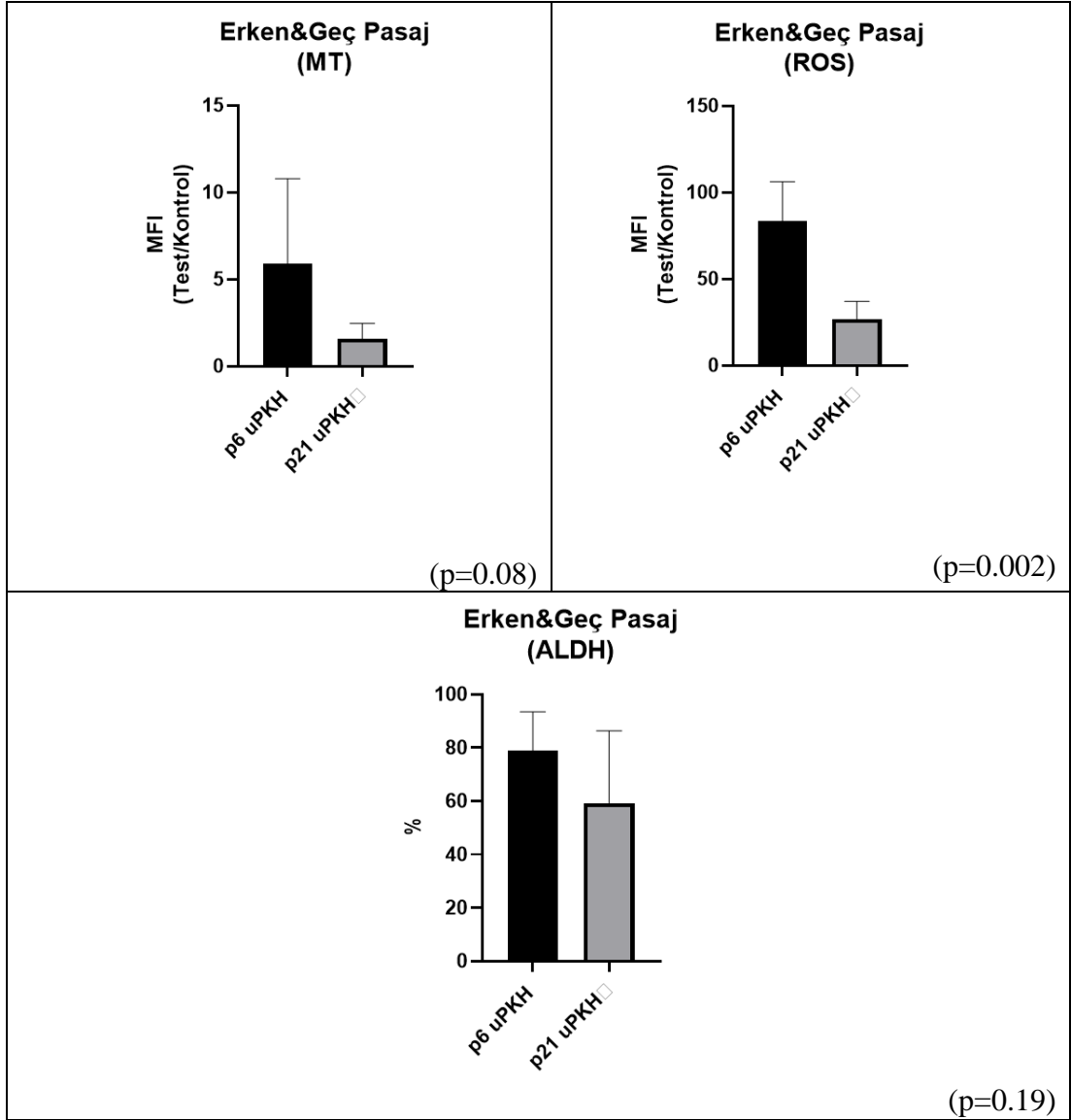
Erken ve geç pasaj uPKH'ler, metabolik açıdan ROS ve MT düzeyleri ile köklülük belirteci olan ALDH ifadesi açısından değerlendirilmiştir. Aynı grup hücreler için akım sitometri ölçümleri, farklı günlerde 5 kez tekrarlanmıştır. Cihazdan alınan (ham veri) ölçüm grafiklerinden örnekler Şekil 4.25'te verilmiştir. Grafiklerde, her boyama, kendi negatif (boyasız) kontrolüne göre alınan % değerli kapılarla (gate) gösterilmektedir.



Şekil 4.25. Erken ve geç pasaj koloniler için örnek ROS, MTve ALDH ölçümleri.

Şekil 4.25'te grafikleri verilen seçilmiş örneklerin analizinde, erken ve geç pasaj hücrelerde MT ve ROS pozitiflik oranının benzer şekilde $>99\%$ olduğu, ancak hücrelerin içerisindeki mitokondri ve ROS yoğunluğunu gösteren ortalama MFI değerlendirmesinde, pasaj ilerledikçe MT (p6: 110,824.59 ve p21: 16,054.42) ve ROS (p6: 854,803.82, p21: 216,708.01) parlaklığının belirgin azaldığı görülmüştür. Bu durum, pasaj ilerlemesi ile birlikte köklülüğün artmasıyla hücrelerde mitokondri metabolizmasının azaldığını düşündürmüştür. Histogram analizlerinde ise, MT dim ve parlak boyanan hücrelerin oranı erken pasaj hücrelerde 56.2% ve 34.8% bulunmuş, geç pasaj hücrelerin ise 55.1% 'inin parlak, 28.2% 'nin dim/negatif boyandığı görülmüştür. Bulgular, metabolik/mitokondriyal parametrelerin, uPKH karakterizasyon belirteci olarak uygun olabileceğine işaret etmektedir. Hücrelerin köklülük düzeyini gösteren ALDH analizlerinde ise geç pasaj hücrelerde ALDH dağılımının daha geniş olduğu ve parlaklığı artmış olan ve köklülüğün yüksek olduğunu gösteren popülasyon oranının 35% civarında olduğu görülmüştür. Ancak, genel olarak MFI değerlerine bakıldığında erken pasaj hücrelerin daha yüksek MFI'ye sahip olduğu görülmektedir (sırayla, 796,716.45 ve 407,377.47). Ayrıca, geç pasaj hücrelerle kıyaslandığında erken pasaj hücrelerin kontrol örneğinde dağılımın geç pasaja göre farklı olduğu, daha yüksek otofloresans gösterdiği görülmüştür.

Akım sitometrik olarak 5 kez tekrarlanan MT ve ROS boyamaları için MFI (Test/Kontrol), ALDH için ise $\%$ değerler GraphPad ile analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir. Geç pasaj uPKH'lerin MT ve ROS parlaklığının ve $\%$ ALDH düzeyinin erken pasaj uPKH'lere göre daha düşük olduğu görülmüş, T-Test ile değerlendirildiğinde ROS ölçümlerinde istatistiksel anlamlı değişim olduğu saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.26'da verilmektedir.



Şekil 4.26. Erken ve geç pasaj uPKH'lerde MT, ROS ve ALDH için akım sitometrik ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi (n=5).

c) Yüzey Belirteçleri Açısından Değerlendirme

uPKH karakterizasyonuna yönelik, erken pasaj olarak p8, geç pasajlar olarak da p18'den itibaren p27'ye kadar her 3 pasajda bir olmak üzere yüzey belirteçleri açısından akım sitometrik ölçüm yüzdeleri değerlendirilmiştir. Aynı donöre ait hücrelerin erken ve geç pasajları aynı klondan geliştirilmiştir.

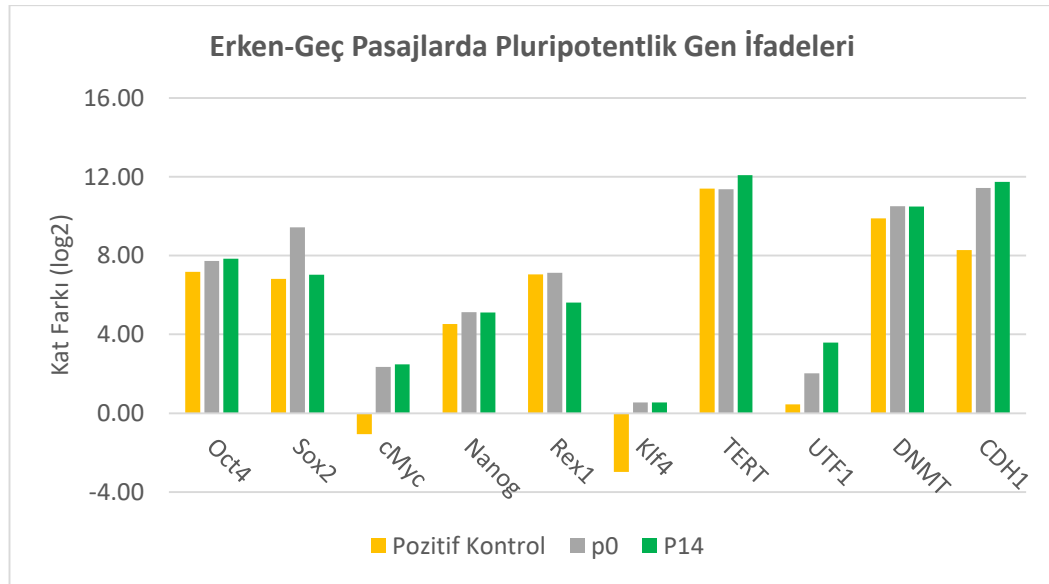
Tablo 4.3. Erken ve geç pasaj uPKH'lerin % yüzey belirteçleri

Pasaj no	CD29 (FITC)	SSEA-4 (APC)	Oct4 (PE)
p8	1,4	95,2	70,9
p18	0,7	99,9	94,8
p21	1,0	99,6	85,5
p24	0,9	97,6	93,2
p27	0,6	98,5	86,4

MKH'ler için ayırt edici bir belirteç olan ve uPKH'ler için negatif kontrol olarak değerlendirilen CD29-düzeyleri %2'nin altında, uPKH'ler için ayırt edici olan ve ifade düzeylerinin yüksek olması beklenen SSEA-4 ve Oct4 seviyeleri %70.9-%94.8 aralığında ölçülmüştür.

d) Gen İfadesi Açısından İncelemeler

Kantitatif PCR ile gen ifade düzeyleri erken (uPKH görünümü taşıyan hücrelerden koloni seçimi sonrası geliştirilen ilk pasaj, p0) ve geç pasaj (p14) karşılaştırmaları yapılmıştır. Burada p0 hücreler, YP sürecinde seçilerek ayrı kültür kabına alındıklarında oluşan ilk koloni popülasyonlarını temsil etmektedir.

**Şekil 4.27.** p0 (erken) ve p14 (geç) uPKH'lerin değerlendirilmesi.

Livak yöntemine göre analiz edilmiş olan (normalizasyon negatif kontrol olan p4 MKH'ye göre yapılmıştır) RT-PCR verileri, Şekil 4.27'de çubuk grafik ile sunulmuştur. Her iki pasaj (p0 ve p14) hücre grubunda da Oct4, Sox2, Nanog, Rex1,

TERT, DNMT3a ve CDH1 gen ifadeleri pozitif kontrol olarak kullanılan örneğin ($\geq p5$ uPKH) değerlerine yakın bulunmuştur. Pozitif kontrolde de ifadesi yüksek olmayan cMyc, Klf4 ve UTF1 genlerin ifade düzeyleri dışında tüm gruplardaki gen ifade seviyelerinde >4 kat artış görülmüştür. YP'yi takip eden p0 aşamasında henüz ifadesi düşük görülen UTF1 ifadesinin de pasaj ilerledikçe artan eğilimde olduğu görülmüştür. TERT, DNMT3a ve CDH1 ifade düzeyleri, tüm gruplarda ifade düzeyleri en yüksek (Kat farkı= 8-12) olan genler olarak görülmektedir.

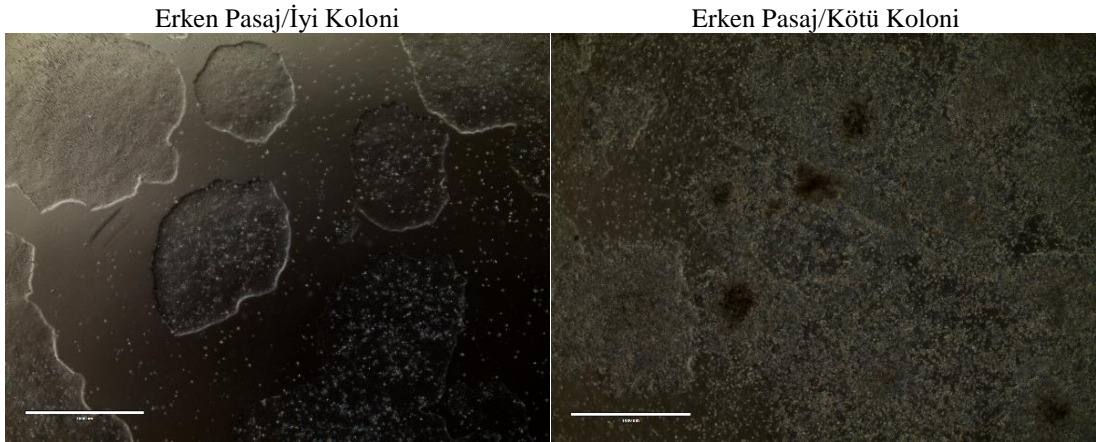
4.2.2. Olumsuz Koşullar Oluşturularak Yeniden Programlama ve uPKH Kültür Sürecinin İncelenmesi

A. Besleme Periyodu Değişikliği Yapılan uPKH'lerin İncelenmesi

uPKH kültür sürecinde, standart protokolde, hücrelere her gün besleme (besiyeri/medium değiştirme) yapılmaktadır. Deney sürecinde her gün beslenen hücreler, “iyi koloni” olarak ifade edilmiştir. Üç günde bir (standart dışı-olumsuz koşul) besleme yapılarak olumsuz koşulun oluşturulduğu hücreler (kötü koloniler) için bu bölümde, erken (p7, p8) ve geç pasaj (p24, p28) gruplarında hücresel ve metabolik parametrelerdeki değişiklikler ile ilgili bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

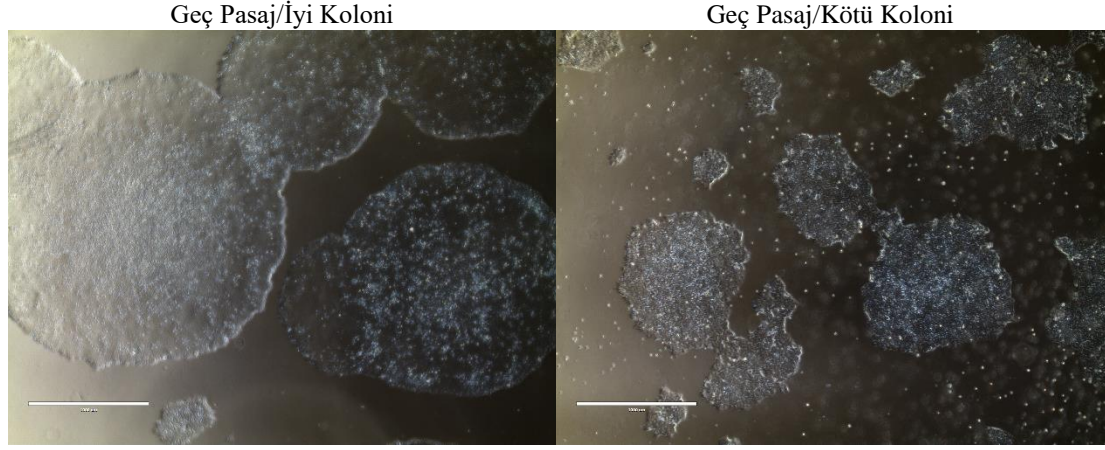
a) *Morfolojik İncelemeler*

Aşağıda sunulan iyi ve kötü koloni örnekleri ortalama 5. günde fotoğraflardaki görünümü kazanmışlardır.



Şekil 4.28. Erken pasaj - İyi ve kötü uPKH'ler - mikroskop görüntüleri.

Günlük beslenerek mikroskopik incelemelerle takip edilen sıkı koloniler, sınırları düzgün/belirgin, yüzeyi şeffaf ve birbirleri ile temas etmeyecek şekilde hücre kabında dağılarak "iyi kolonileri" temsil etmiştir.



Şekil 4.29. Geç pasaj - İyi ve kötü uPKH'ler - mikroskop görüntüleri.

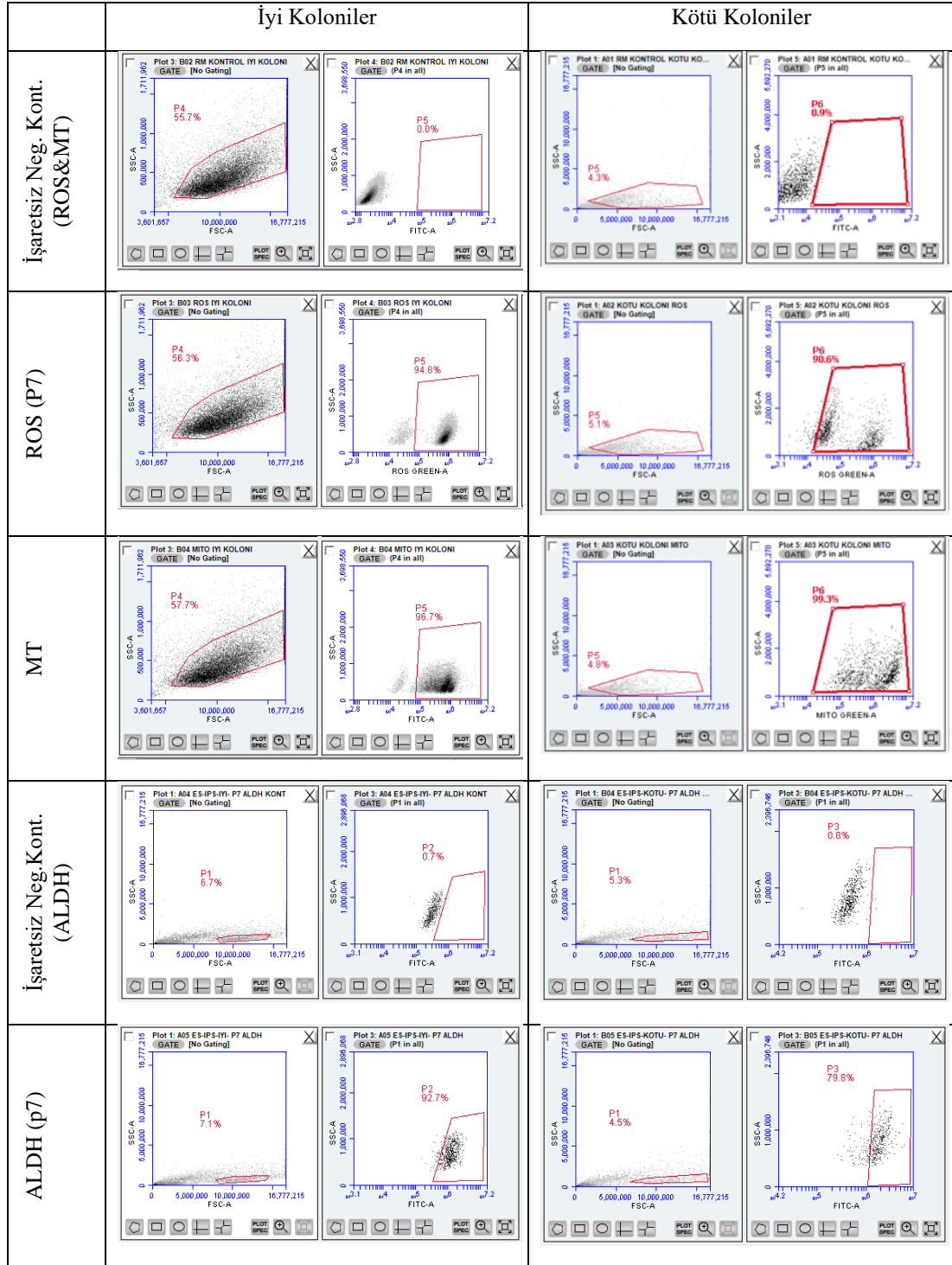
Üç günde bir besiyeri ekleme planlamasıyla besleme düzenine yapılan müdahale (manipülasyon) ile birlikte hücrelerin koloni sıklıkları (kompakt yapı) azalmış, ölü/tutunamayan/yüzen hücre sayısı artmış ve özellikle koloni merkezinde görülen kahverengimsi yoğunlaşmalar, farklılaşmayı düşündüren ve “istenmeyen (kötü) koloni” olarak ifade edilen grubun karakteristiği olmuştur.

b) Metabolik/Mitokondriyal Parametreler ve Köklülük Açısından İncelemeler

Akım sitometrik ölçümlerde (Şekil 4.30) kötü koloni popülasyonlarının oldukça az hücre içermesi ve dağınık bir görünüme sahip olması dikkat çekmektedir (Kötü koloniler-sağ sütun).

İyi-kötü koloniler için yapılan akım sitometri ölçümlerinde, kötü koloni popülasyonlarının, oldukça konfluent görünüme sahip bir hücre kabından toplandıkları düşünüldüğünde beklenilenden az olması, tutunma yeteneklerinin azalmasının bir sonucu olarak, ölçüme hazırlanan hücrelerin yıkama aşamalarında kayba uğramış olduğunu düşündürmüştür. Kötü koloni ölçümlerinde, dağınık hücresel görünümde, ROS boyamalarının pozitif alanda iki ayrılmış popülasyon olarak karşımıza çıkması, bu hücre popülasyonunun farklılaşma belirtisi gösteren hücreleri de içerdiğinden

heterojen olduğunun/farklı metabolik aktivite gösteren hücre popülasyonlarının bir arada bulunduğu göstergesi olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.30. İyi – kötü koloniler için ROS, MT ve ALDH ölçümleri.

Erken pasaja ait mitokondriyal parametreler için temsili ölçüm grafikleri Şekil 4.30'da verilmiştir. ROS ve MT düzeyleri açısından iyi koloniler (MFI: 286.432,47 ve 27.223) kötü koloniler ile (MFI: 464.124,92 ve 49.213) kıyaslandığında, kötü kolonilerde parlaklık değerlerinin (floresans yoğunluğunun) belirgin arttığı görülmektedir. Beş farklı günde yapılan değerlendirmelerde de benzer eğilim gözlenmiştir. Kötü kolonilerde ROS ve MT boyamalarındaki MFI değerlerinin yüksek olması, hücrelerin farklılaşmaya gittiğini ya da stres cevabı olarak hücre canlılığının etkilendiğini, buna karşın iyi kolonilerin uPKH özelliklerini koruduklarını (MT ve ROS parlaklıkları dim/daha düşük) düşündürmüştür.

c) Yüzey Belirteçleri Açısından Değerlendirme

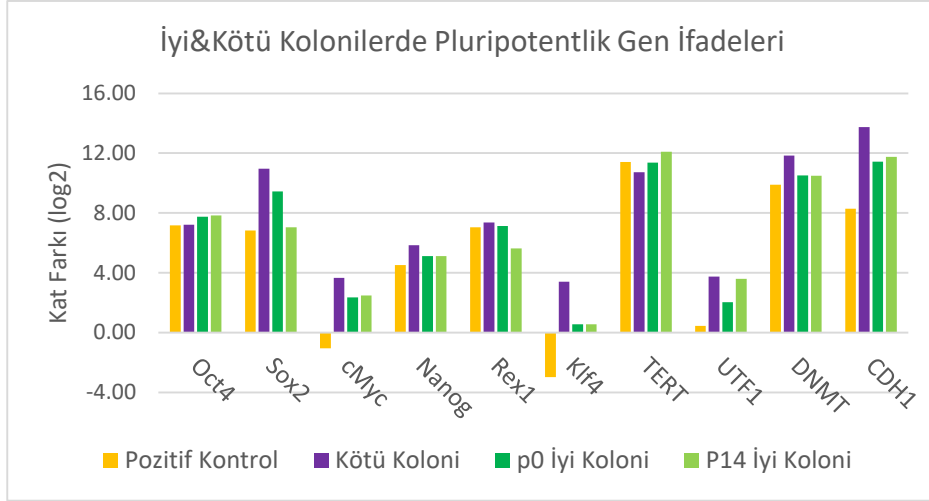
İyi ve kötü olarak ifade edilen kolonilerin yüzey belirteçleri açısından değerlendirmesinde, ileri pasajlarda (p21 ve p25) uPKH olmalarına rağmen, Oct4 değerlerindeki ciddi düşüklük (sırayla %10,5 ve %34,7) dikkat çekmektedir. Hücre kabında morfolojik farklılaşmalar olduğu gözlenen p21 ve p25 kötü kolonilerde SSEA-4 ifadelerinin \geq 85 olması, mikroskopik olarak görülen farklılaşma bulgularının Oct4 düzey düşüklüğü ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmüştür.

Tablo 4.4. İyi & Kötü uPKH'lerin % yüzey belirteçleri.

Pasaj no	CD29 (FITC)	SSEA-4 (APC)	Oct4 (PE)
p21	1,0	99,6	85,5
p21 (Kötü)	1,8	89,7	10,5
P25 (Kötü)	3,5	93,2	34,7

d) Gen İfadesi Açısından İncelemeler

Standart her gün besleme yapılan (iyi koloni) ve standart dışı/3 günde bir besleme yapılan (kötü koloni) hücre grupları, pluripotential gen ifadeleri açısından kantitatif PCR ile değerlendirilmiştir. Ölçüm sonuçları Şekil 4.31'de verilmektedir.



Şekil 4.31. Besleme periyodu değişikliği yapılan hücrelerde pluripotential genlerinin ifade düzeyleri.

Yapılan analizlerde dikkat çeken ilk bulgu, iyi veya kötü koloniler arasında pluripotential gen ifadeleri yönünden belirgin bir fark gözlenmemiş olmasıdır. Kötü kolonilerde de Oct4, Sox2, cMyc, Nanog, Rex1, TERT, UTF1, DNMT3a ve CDH1 ifadeleri görülmüş, hatta Klf4'ün diğer gruplardan yüksek bulunmuştur. Bu deneylerde, uPKH'lerin çözünmesi sonrası kültüre alınmasını takiben pasaj boyunca besleme periyodu üç günde bir olarak devam ettirilmiştir.

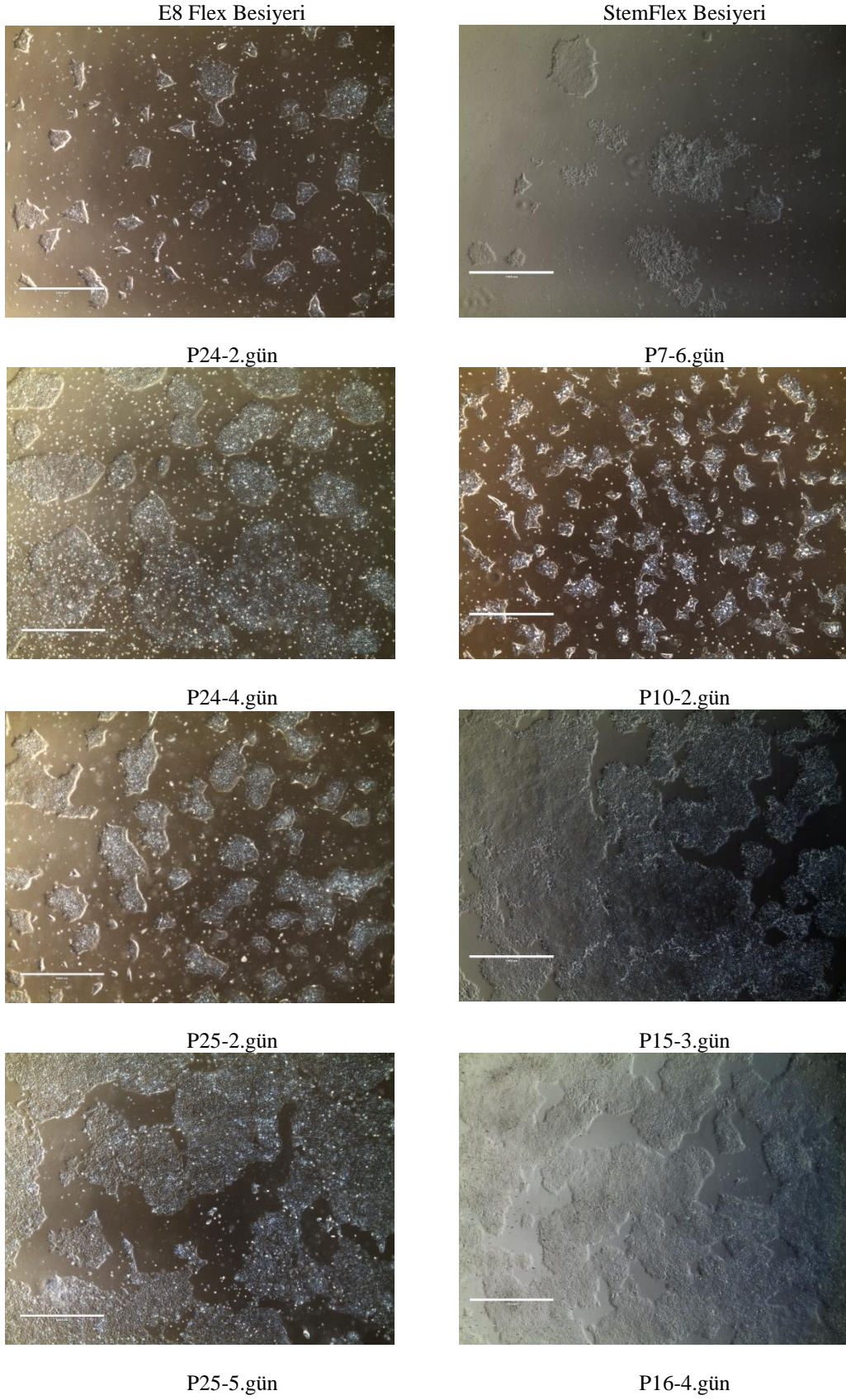
B. Besiyeri Formu (E8 Flex/StemFlex) Değişikliği Yapılan uPKH'lerin İncelenmesi

a) Morfolojik İncelemeler

Biyobankalama büyük çaplı bir üretim/işletme sürecidir ve sürece yönelik iş gücü, maliyet gibi parametreler en uygun (optimum) hale getirilmelidir. Bu noktadan hareket ile ticari bir firmanın deneme numunesi olarak sunduğu besiyerleri, Essential 8 (E8) Flex ve StemFlex test edilmiştir. Bu besleme ortamlarının özelliği, standart olarak belirtilen protokole göre, uPKH elde etme sürecinde, her gün beslenen hücrelerin özellikle hafta sonları beslenmesine gerek duyulmayan veya farklı besleme periyodlarına uyum sağlayabilen bir içeriğe sahip olmasıdır. E8 Flex Medium, FGF2 dâhil, E8 besiyerinde (TeSR E8) bulunan ısıya duyarlı bileşenlerin aktivitesini arttırmak için yeniden formüle edilmiş ve FGF2 etkinliği arttırılmıştır (TESR besiyeri içeriği: DMEM/F12, L-Ascorbic asit, Selenyum, Transferrin, NaHCO₃, Glutathione, L-Glutamine, tanımlı lipitler, Thiamine, iz elementler B, iz elementler C, β-

mercaptoethanol, bovine serum albumin, insulin, FGF2, TGF- β 1, Pipicolic acid, LiCl, GABA ve H₂O) (243). Bu besiyerlerinin çalışma kapsamında test edilmesi, nihai hedef olan biyobankalama sürecinde zamanı, iş yükünü ve maliyeti düşürme potansiyeli göz önünde bulundurularak önemsenmiştir.

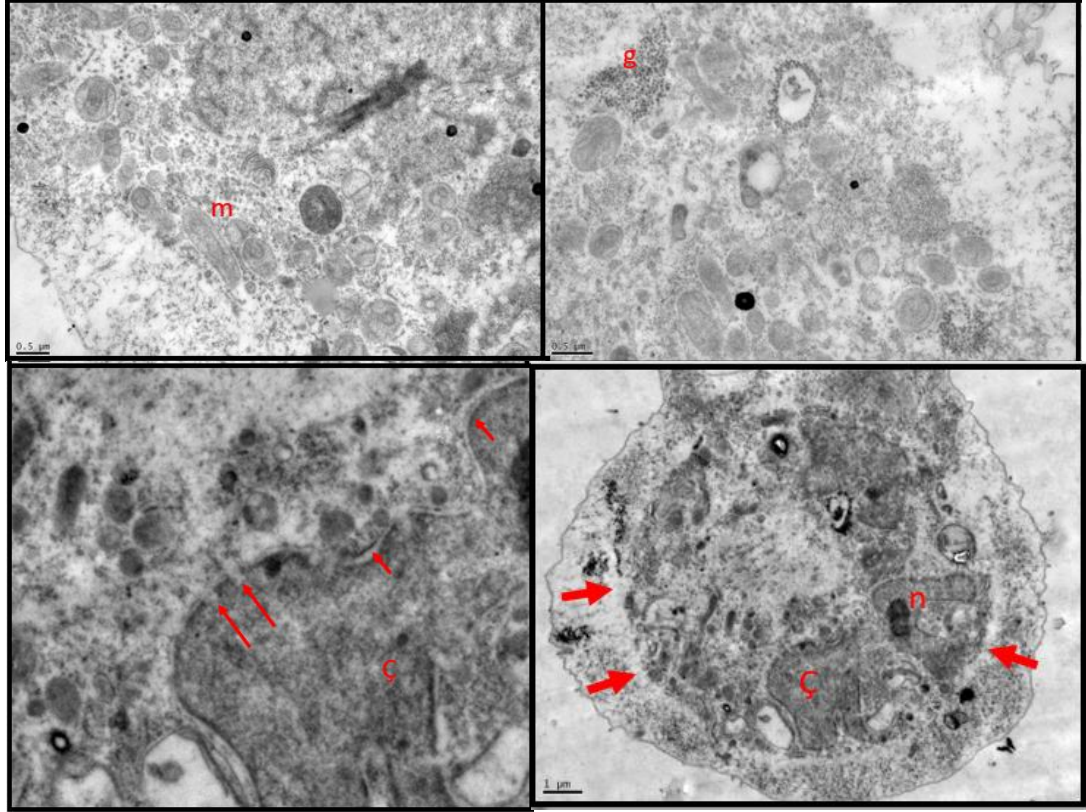
E8 Flex ve StemFlex besiyerleri ile üç günde bir besleme yapılarak devam ettirilen kültürlerin mikroskopik görünümü Şekil 4.32’de verilmektedir.



Şekil 4.32. E8 Flex ve StemFlex ile beslenen hücreler –mikroskopik görüntüler

Kısıtlı miktarda, numune besiyeri ile yapılan çalışmanın morfolojik bulgularının değerlendirme sürecinde, hücrelerin hızlı büyüme/çoğalma gösterdikleri, nispeten kısa sürede pasaj gereksinimi duydukları sonucuna varılmıştır. E8 flex ve StemFlex besiyeri karşılaştırıldığında, ilk bakışta E8 Flex ile beslenen hücre morfolojilerinin StemFlex'e göre daha uygun bir görünüm sergilediği söylenebilir. Oldukça seyrek olarak ekilmiş ve StemFlex besiyeri ile beslenen 7. pasajdaki hücrelerin 6. gündeki görüntüsü, karakteristik uPKH koloni morfolojisinin bozulduğuna işaret etmektedir. Hücreleri en geç 5-6 günde bir pasajlamak ideal görünmektedir. Besleme süresi uzadıkça farklılaşma riskinin artmakta olduğu söylenebilir. Genelleme veya istatistiksel değerlendirme yapılabilmesi için deney ve gözlem sayısının artırılması gerekmektedir.

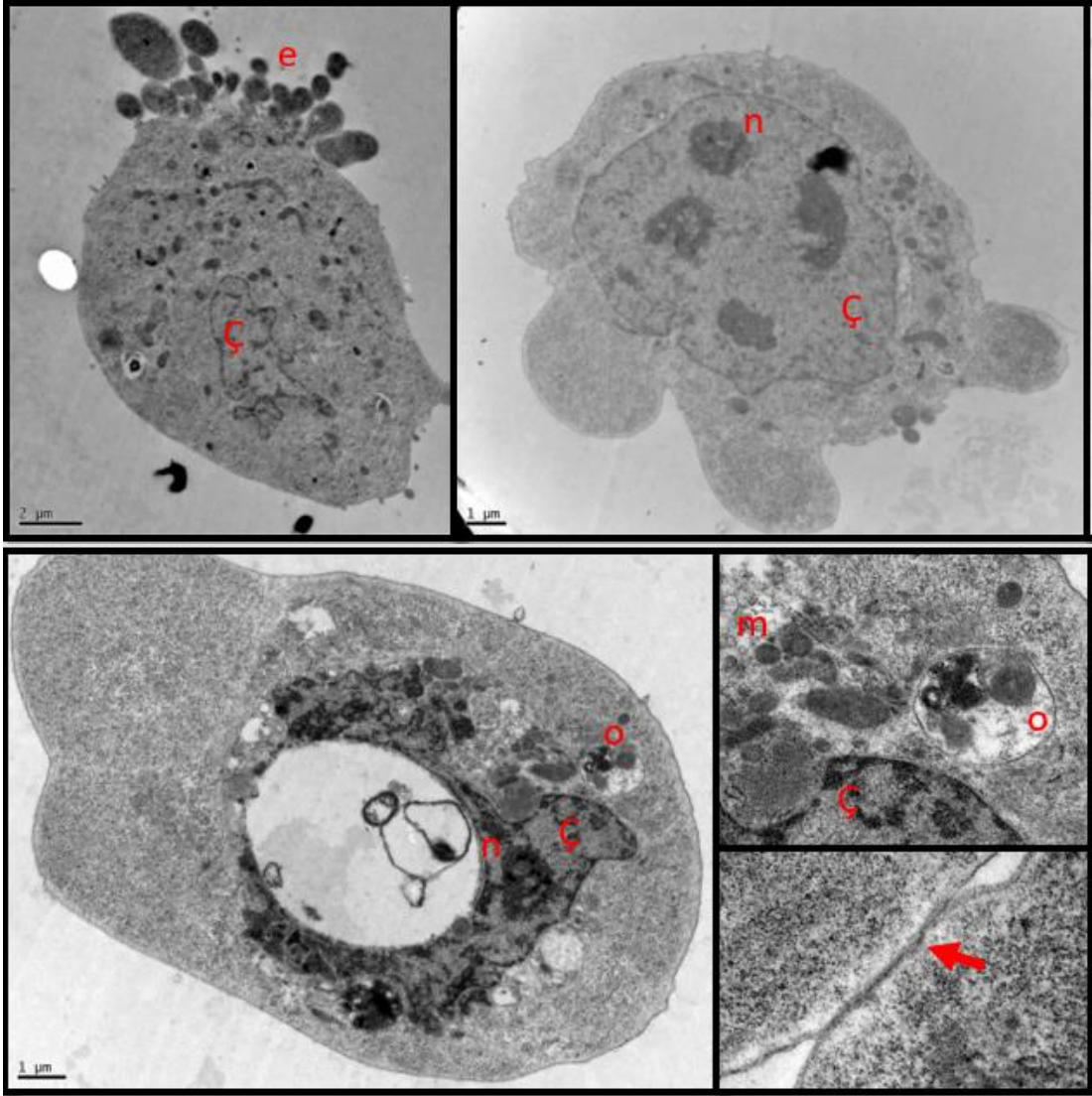
E8 flex besiyeriyle beslenen hücrelerin ince yapısal özelliklerini karşılaştırmak üzere E8 besiyeri ile beslenen hücreler ve MKH'ler referans alınmıştır. E8 besiyeri ile beslenen p8 uPKH'lerden bazılarının çift nükleolusa ve ökromatinden zengin çekirdeklere sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.33) (çekirdek etrafında sitoplazmayı hayali kompartmana ayıran çembersel bir halo ile karşılaşılmış ve bu görünüm açıklanamamıştır, artefakt/yalancı görüntü olabileceği düşünülmüştür). Mitokondriler globüler görünüm sergilemiş, krista sayısı, MKH gruplarına göre azalmış ve genişlemiş olarak ayırt edilmiştir. Mitokondilerin iç ve dış zarları arasındaki mesafe artmıştır. Çekirdek sitoplazma oranı MKH'lere göre çekirdek lehine yüksek bulunmuştur. Sitoplazmada belirgin glikojen partikülleri izlenmiş ve nükleer porlarda genişleme (dilatasyon) dikkat çekmektedir. Otofajik vakuoller mevcut iken apoptotik hücreye rastlanmamış, hücrelerde lamellipod ve filopod görülmemiştir. Ortalama hücre çapı 12 mikrometre olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.33. P8-E8 grubunun ince yapı özellikleri.

(Ç:çekirdek, n:nükleolus, m:mitokondri, g:glikojen, kalın oklar haloyu, uzun ince oklar nükleer poru, kısa ince oklar nükleer çift membran yapısını göstermektedir)

E8 Flex besiyeri ile beslenen hücrelerde çekirdek sitoplazma oranı MKH'lere göre artmıştır (Şekil 4.34). Hücreler arası iletişim araçlarından olan ektozomlar (mikroveziküller) görülmüştür. %8 civarında apoptotik hücre izlenmiştir. P6 grubuna benzer şekilde, kimi hücrelerde büyük belirgin otofajik vakuoller izlenmiş, bazı komşu hücrelerin aralarında sıkı bağlantılar görülmüştür. Dört veya daha fazla nükleoluslu hücreler dikkat çekmiştir. Nükleolus sayıları açısından erken pasaj grupları (p6 ve p8) kendi aralarında değerlendirildiğinde, P6'da tek nükleolus, E8 besiyeri ile beslenenlerde iki yada daha çok, E8 flex ile beslenenlerde dört nükleolus görülmüştür. Sitoplazmada organellerin kapladığı alan ve organel içeriği E8 besiyeri grubuna göre azalmıştır. Ortalama hücre çapı 10 mikrometre olarak ölçülmüş, filopod veya lamellipod izlenmemiştir. Çok nükleoluslu, farklı morfolojilere sahip hücreler, bu grubun genel karakteristiği olarak değerlendirilmiştir.

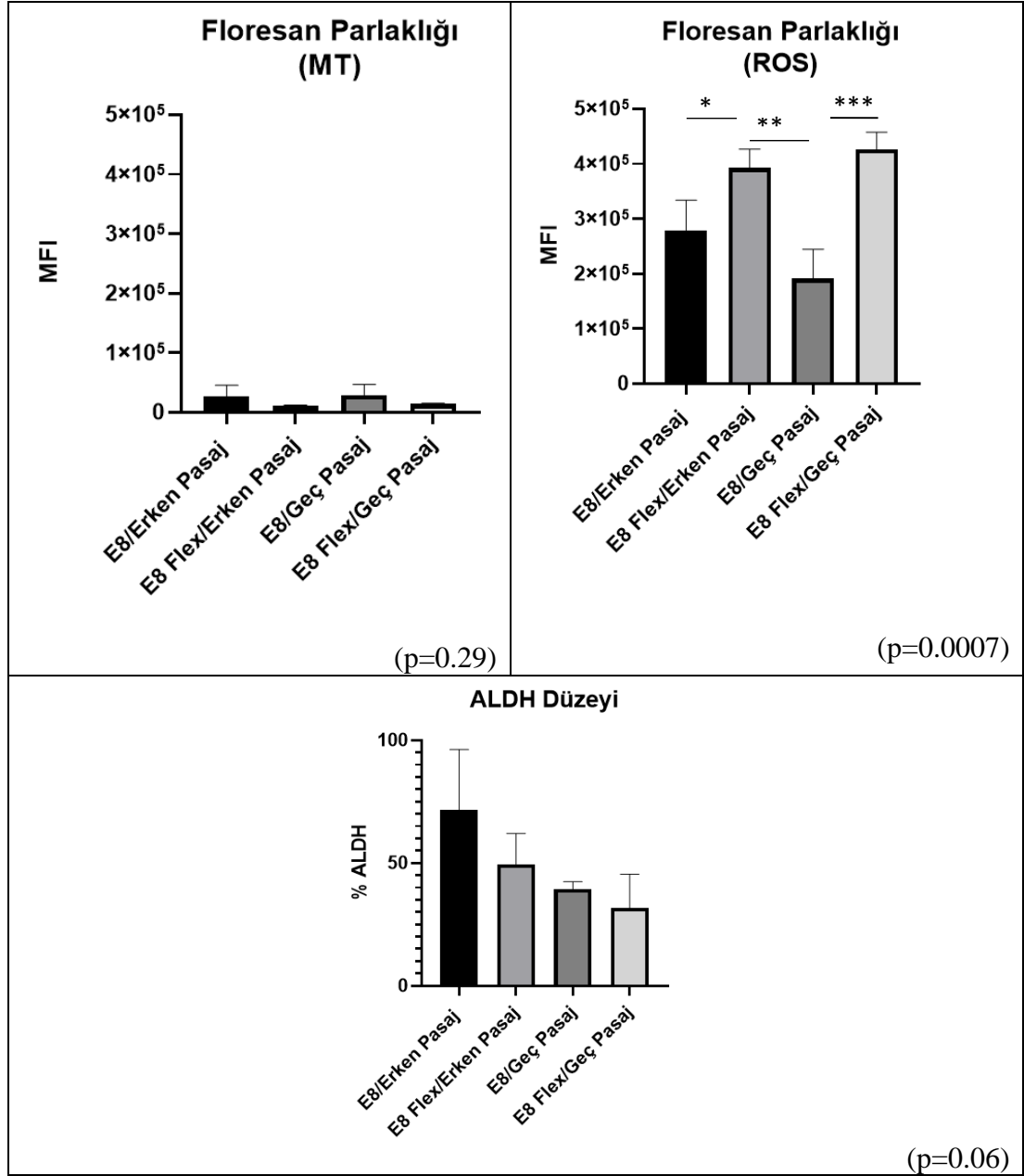


Şekil 4.34. P8-E8 Flex grubunun ince yapı özellikleri.

(Ç:çekirdek, n:nükleolus, e:ekzozomlar, o:otofajik vakuol, m:mitokondri, oklar hücrelerarası bağlantıyı göstermektedir.)

b) Metabolik/Mitokondriyal Parametreler Açısından İncelemeler

Metabolik parametreler açısından akım sitometrik değerlendirmelerde, erken pasaj olarak p7, p8 ve geç pasaj olarak p20, p21 kullanılmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Graphpad ile oluşturulan grafikler Şekil 4.35'te verilmektedir.



Şekil 4.35. E8&E8 Flex besiyeri ile beslenen hücre gruplarında MT, ROS ve ALDH için akım sitometrik ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi (n=3).

Hem erken hem de geç pasajlarda E8 besiyeri ile beslenenlere göre E8 flex besiyeri ile beslenen hücrelerdeki parlaklığın artmış olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, özellikle geç pasaj hücrelerde istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

c) Yüzey Belirteçleri Açısından Değerlendirme

Besleme periyoduna göre hücreler 3 grupta değerlendirilmiştir: i) E8 besiyeri ile her gün beslenen hücreler (p8, p18, p21, p24, p27 ve p28) ii) E8 Flex besiyeri ile üç günde bir beslenen hücreler (p8, p23 ve p24) iii) StemFlex besiyeri ile üç günde bir beslenen hücreler (p17). Bu hücreler, pluripotential belirteçleri olan SSEA-4 ve Oct4 ifadeleri açısından akım sitometrik olarak incelenmiştir. % ölçüm değerleri tablo 4.5'te sunulmaktadır.

Tablo 4.5. E8, E8 Flex veya StemFlex ile beslenmiş olan uPKH'lerin % yüzey belirteçleri.

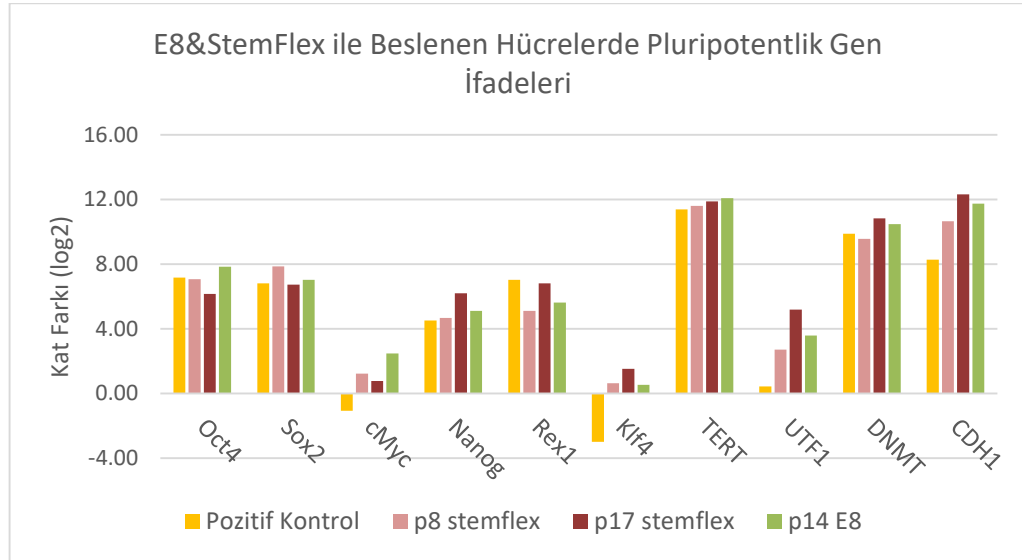
Pasaj no	CD29 (FITC)	SSEA-4 (APC)	Oct4 (PE)
p8-E8	1,4	95,2	70,9
p8-E8 flex	1,3	98,2	92,5
p17-stemflex	2,1	99,9	98,2
p18-E8	0,7	99,9	94,8
p21-E8	1,0	99,6	85,5
p23- E8 flex	3,7	96,0	66,0
p24-E8	0,9	97,6	93,2
p24- E8 flex	1,8	68,4	34,4
p27-E8	4,5	98,5	86,4
p28-E8	3,4	99,6	90,8

Fikir verici nitelikte, ön bulgu olarak kabul edilebilecek sonuçlara göre, E8 Flex besiyeri ile beslenen erken pasajdaki hücreler (Oct4: %92.5) pluripotential belirteçleri (Oct4 ve SSEA-4) açısından E8 ile beslenenlere göre (özellikle Oct4: %70.9) daha yüksek seyretse de ileri pasajlarda iki beslenme tipindeki hücreler arasında zıt yönde fark olduğu görülmüştür. E8 ile beslenen hücrelerin Oct4 seviyelerinin geç pasaja doğru yükselmiş olduğu gözlenmişken, E8 flex besiyeri ile beslenen hücrelerdeki belirteç seviyelerinin, Oct4 tarafında bariz olmak üzere azaldığı (%66 ve %34) görülmüştür.

d) Gen İfadesi Açısından İncelemeler

Farklı pasajlarda E8 besiyeri ile her gün beslenen hücrelere karşılık üç günde bir StemFlex besiyeri ile beslenen hücreler pluripotential gen ifadeleri açısından kantitatif PCR ile değerlendirildiğinde, dikkat çeken bir fark gözlenmemiştir (Şekil

4.36). Nanog, Rex1, DNMT ve CDH1 gen ifadelerinin, karşılaştırılan hücre grupları arasında en yüksek düzeylerde olduğu belirtilebilir. Pozitif kontrol olarak E8 besiyeri ile beslenmiş olan $\geq p5$ uPKH test edilmiştir. TERT, DNMT3a ve CDH1 ifade düzeyleri tüm gruplarda ifade düzeyleri en yüksek olan genler olarak görülmektedir (Kat farkı= 8-12).



Şekil 4.36. Besiyeri formu değişikliği yapılan hücrelerin pluripotenz gen ifade düzeyleri.

5. TARTIŞMA

5.1. uPKH Bankacılığı

Kök hücre ve bilgi teknolojisinin eş zamanlı gelişimi ile birlikte kök hücrelere yönelik yasal ve etik düzenlemelerin oluşturulması, kök hücre araştırmalarının ilerlemesinde çok önemli bir adım olarak biyobankalamayı getirmiştir. Biyobankalamanın belirgin avantajı, ileride yapılacak bilimsel araştırmalarda veya gelecekteki tedavide kullanılmak üzere seçilen biyolojik materyal ya da verinin korunması ve istenildiğinde sunulabilmesi için standartlaştırılmış ve düzenli/izlenebilir kayıtlara sahip olmasıdır. Biyobankalar, araştırmacılara kaliteli biyo-örnekler ve veriler sağlayarak araştırma bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (244). Nitekim 2009'da Time dergisi, biyobankaları dünyayı değiştiren en iyi 10 fikirden biri olarak ifade etmiştir (161). Birçok ülkede, özellikle kök hücre bankaları biyo-ekonominin bir direğini oluşturması açısından ayrıca önemsenmektedir.

Son yıllarda, kök hücreler arasında uPKH'leri öne çıkaran sebeplerden biri, bu hücreleri üretme süreçlerinin kök hücre kültüründe mevcut becerilere sahip kişiler tarafından gerçekleştirilebilir olmasıdır. Ayrıca PKH'ler oluşturmak için insan embriyolarına müdahale edilmesinden kaçınılması da diğer tercih sebeplerindedir. Genel olarak, "etik embriyonik/pluripotent kök hücreler" olarak görülen uPKH'ler, bu anlamda daha kabul edilebilir bir profile sahiptir. Başka bir ifadeyle, i-uPKH'ler, i-EKH'lere uygulanan daha katı ahlaki ve hukuki düzenlemelerden ve yasaklardan uzaktır (57). uPKH alanının hızla gelişmesi, üretilen pluripotent hücre hatlarının sayısındaki üstel artış ve önerilen hücre tiplerinin çok farklı kullanımları, PKH hatlarını tanımlamak, geliştirmek ve araştırmacılara sunmak için en uygun mekanizmanın geliştirilmesi ihtiyacının altını çizmiştir ve bunun karşılığı bankalamadır. İlaç araştırma-geliştirme, hastalık modelleme ve rejeneratif tıp alanlarındaki yeni çalışma bulgularının da katkısı ile uPKH'lere olan ilgi giderek artmakta ve geleceğin ümit vadeden teknolojileri arasında yer almakta, yüksek kaliteli, iyi karakterize edilmiş uPKH'lere olan talep, arzın ötesine geçmektedir. uPKH bankaları belirlenen amaçlar doğrultusunda dünya çapında büyük yatırımlar ile oluşturulmaya başlanmıştır. Örneğin, StemBANCC, özellikle ilaç geliştirme

çalışmalarına yönelik olarak hasta kaynaklı bir uPKH deposu şeklinde tasarlanmış ve 2012 yılında Oxford Üniversitesi öncülüğünde başlatılmıştır. Diğer taraftan, patoloji mekanizmalarını daha iyi anlamaya yönelik, hastalığa özel hücre bankacılığının bir örneği olan Progeria Vakfı, Amerika'da 2002 yılında kurulmuş ve önemi anlaşıldıkça bünyesine kattığı uPKH'ler ile bu konuda alanın öncülerinden olmuştur. Vakıf yönetimi, hali hazırda hastalarından ve akrabalarından topladıkları hücre ve doku örneklerini kullanarak uPKH'ler elde etmeye yönelmiş ve bu konuda Toronto Üniversitesi ile işbirliği içerisine girmiştir. Bir diğer araştırma amaçlı uPKH bankası oluşumu, Amerika'daki Coriell Enstitüsü tarafından yürütülmektedir. Verilen örneklerden de anlaşılacağı üzere StemBANCC dışındaki oluşumlar, halihazırda sahip oldukları biyobanka tecrübelerine dünyadaki eğilim doğrultusunda uPKH'leri de dâhil etme yolunu seçmişlerdir. Bu durum, alan tecrübesinin varlığı anlamında olumlu bir etken kabul edilebilirken, uPKH'lerin ihtiyaç duyduğu ilgiden mahrum kalmasına neden olmuş ve uPKH'lerin kendi alanına özel optimizasyon ve standardizasyon çalışmalarının halen tamamlanamamış olmasındaki önemli engellerden biri olmuştur. Ülkemizde, hâlihazırda bir uPKH bankası veya en yakın hücre tipi olan EKH deposu bulunmamaktadır. Öyleki, ülkemizde i-EKH ile ilgili her türlü çalışma, Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan bir genelgeyle 2005 yılında durdurulmuştur (245). 2019 yılında Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Hücre Birimi ile yaptığımız görüşmede, bu konuda en güncel düzenleyici dokümanın Genelge 2018/10 olduğu ve burada EKH çalışmaları ile ilgili alanın açık bırakıldığı/herhangi bir sınırlandırma konulmadığı belirtilmiş olsa da artık dünyadaki eğilim uPKH bankacılığı yönünde ilerlemekte hatta daha da özelleşerek araştırma uPKH bankacılığının ötesinde, klinik uPKH bankacılığında derinleşmektedir. Girişmiş olduğumuz bu alanda ülkemizde/bölgemizde benzer örneklerinin bulunmamasının ve ilk örnek/model olacak olmasının zorluklarının yanısıra nispeten kolaylık ve faydalarının da olacağı düşünülmektedir. Sıfırdan bir oluşum, yeniden yapılandırmanın zorluklarını bertaraf edebilecektir. Sunacağımız araştırma amaçlı uPKH banka modeli/sistemi, biyobankacılığın en özelleşmiş hali olacağından, olabilecek en detaylandırılmış ve güncel kurallarla (ISO 20387:2018 uygulaması gibi) düzenlenecektir. Böylesi bir sistemden edinilen birikimin, Türkiye gibi gelişmekte olan ülkeler için öncü olması ümit edilmektedir.

uPKH'lerin araştırma amaçlı kullanıma yönelik vadettiği potansiyel dışında kliniğe/tedaviye yönelik vadettiği ümit, bu yöne de kapı aralanmasına vesile olmuştur. Hücre temelli tedavilerde bir popülasyona yakın immunolojik eşleşmeler üzerinden yola çıkılabilir. Hasta uPKH bankacılığının geliştirilmesi, alanı daha da genişletecek ve hastalığın tedavisine yönelik daha emin adımlar atılmasını sağlayacaktır. uPKH üretiminde verimlilik ve güvenlik arttıkça, tek bir uPKH hücre hattı ile tedavi edilebilen hasta sayısı artacaktır (20). Nitekim uPKH'lerin keşif yeri olan ve ilgili çalışmaların hızla ilerlediği Japonya başta olmak üzere dünyada HLA homozigot uPKH bankaları oluşturulmaya başlanmıştır (246). uPKH'nin kâşifi, Dr. Yamanaka, bir roportajında, "Japon nüfusu için kaç tane uyumlu donör hücre hattının gerekli olacağını düşünüyorsunuz?" sorusunu; "Belirli bir hücre hattı, Japon nüfusunun yüzde 17'si için çalışabilir; Japonya'da 100 milyon insan için yaklaşık 100 hattın, daha çeşitli bir popülasyona sahip ABD için ise sadece 200 hattın yeterli olacağını tahmin ediyoruz" şeklinde cevaplamıştır (50). Ayrıca yalnızca 150 hücre hattının İngiltere nüfusunu temsil edebileceği 2011 yılında Prescott (247) tarafından tahmin edilmiştir. Dünyada erişilmiş olan bu aşamaya gelebilmek için, böylesi bilimsel raporlar ışığında ülkemiz şartlarının elverdiği haliyle araştırma biyobankacılığının başlatılması kritik derecede önemlidir. Araştırma amaçlı uPKH bankacılığında elde edilecek deneyim ve yetişmiş insan kaynağı, klinik/tedavi amaçlı uPKH bankacılığı için geç kalmamak adına gereklidir.

Önemi tüm dünyada anlaşılmakta olan uPKH bankacılığı, sağlık biyoteknolojisi alanında gelişim ve tedaviye yönelik potansiyel oluşturma yönünden ciddi bir gerekliliktir ve oluşturulması için ilk yapılacak iş, temel gereksinimlerin belirlenmesidir. Bir hücre bankasını hazırlamak için zaman ve kaynak yatırımı yaptıktan sonra, bankayı oluşturacak tesisin uzun süreli depolama için güvenli, temiz ve istikrarlı bir ortam sağlayacağından emin olunmalıdır. Depolanan malzemelerin güvenliği, erişimi yetkili personelle kısıtlamak için uygun yönetim sistemlerinin benimsenmesi, azot depolama tankları için uygun alarmlar ve azot deposunun doldurulması ve bakımı için dokümanite edilmiş prosedürler ile sağlanmalıdır. Bankalama yönetim sistemleri, depolanan tüm malzemelerin bir envanterini içermelidir. Geri-çekme ve girişlerin rutin dokümantasyonu olmalıdır. İzlenebilirlik açısından, saklanan herhangi bir malzeme için, bakım ile ilgili belgeler güncel

tutulmalı ve prosedürel değişikliklerin uygun şekilde kaydedilmesini sağlamak için bir denetim süreci olmalıdır (154). Bu sayılan faktörlerin tamamı kontrol edilebilir bir sistem olan KYS ile gerçekleştirilebilir.

Çok sayıda hücre uPKH hattı sağlamak için, kök hücre bankacılığının verimliliğini arttırmak ve maliyetleri düşürmek kritik bir ihtiyaçtır. Bunun için de optimize uPKH üretim ve karakterizasyon yöntemlerinin gerekliliği kaçınılmazdır. Sistematik risk analizi yapılarak, olası risklerin erken tanımlanması ve düzeltilmesi, güvenli üretimin yanısıra paha ve zaman kaybı azalmış olan üretim sürecini sağlamaktadır. Çalışmamız kapsamında değerlendirilmiş olan ulusal durumda farkedilen en büyük eksiklik, araştırma amaçlı uPKH bankacılığı için standart, rehber veya özgü düzenlemelerin ve yetkin insan gücünün olmamasıdır. Eksikleri gidermeye yönelik alana ayrılan ulusal bütçelerin artırılması ve Avrupa Birliği destekli projelere Türkiye gibi “az temsil edilen ülkeler” sınıfındaki ülkelerin katılımının teşvik edici kılınması en büyük fırsatlardan biri olarak görülmektedir. Ülkemizde her ne kadar teorik olarak tez, araştırma, rapor ve fizibilite çalışmaları yapılsa da en gerçekçi değerlendirmenin yaşayan örnek üzerinden, uygulama anında yapılabilecek olduğu unutulmamalıdır.

EBISC hücre hattı katalogunda sunulan rastgele seçilmiş hücre hatları için ilgili dokümanlar incelendiğinde, uPKH eldesine yönelik kültür süreçlerinde, farklı besiyeri, aktarım ve toplama yöntemlerinin kullanıldığı, uPKH elde edildikten sonra kalite ve karakterizasyon amacıyla farklılaşma potansiyeli, pluripotentlik ifadesi ve kendini yenileme değerlendirmelerinde oldukça farklı yöntem ve belirteçlerin yer aldığı görülmüştür. EBISC hücre katalogundaki tüm bu çeşitliliğin, derleme bir banka yapısı (farklı çalışma grupları tarafından, farklı laboratuvarlarda elde edilmiş olan uPKH’lerin ana bankada toplanarak aynı katalogta sunulması) teşkil etmesi dolayısıyla olduğu kanısına varılmıştır. Ülkesel durumu değerlendirmek üzere, EBISC örneği dikkate alındığında, konsorsiyum oluşumundan dolayı dış laboratuvarlarda yapılmış olan uPKH hatları toplandığı için karakterizasyon testleri, pasaj sayısı bilgileri standardize sayılmaz. Pedi-Stem üretimin merkezi olarak düşünüldüğü için depolanan tüm hücrelerin başlangıçtan itibaren standardize olması planlanmaktadır. Ayrıca Pedi-Stem’de donör yaş dağılımının muhtemelen daha genç olacağı ve Hacettepe

Üniversitesi Hastanelerinin ağırlıklı hasta profili olan nadir hastalıklı örneklerin ön planda olacağı (nadir/çocukluk çağı hastalıkları) öngörülmektedir.

Standardize edilmiş süreçlerin sonucu olarak mekanizasyon ve otomasyon sistemleri büyük çaplı üretimin anahtarı olacak şekilde gelişmeye devam etmektedir. Kültür ortamı ve hücre kabının yüzey kaplamalarındaki veya üç boyutlu kültürlerdeki gelişmeler sayesinde kararlı ve minimum düzeyde farklılaşmış hücrelerle sonuçlanan kök hücre kültürleri sağlanabilmektedir. Hücre bankalarının ürünlerini serbest bırakmasını kolaylaştırmak ve maliyetleri azaltmak için basit ama güvenilir kalite kontrol ve karakterizasyon tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, hücre hatlarının kabul edilebilirliği için standartların oluşturulması önemli olacaktır. Rutin kullanıma yönelik ajanların taranması ve anahtar kök hücre belirteçlerinin ifadesi için hızlı dizi tabanlı ve yeni nesil dizileme sistemleri geliştirilmektedir. Teratoma gibi zaman alıcı/zorlu deneylerin kullanımı, bu tür bir yaklaşımla bağdaşmamaktadır. Potansiyel pluripotentiğin belirlenmesine yönelik epigenetik durumun belirlenmesi için önerilmiş sistemler bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu tür profillerin pluripotent yeterliliği ile yakından ilişkili olmasını ve pluripotent olmayan hücre tiplerini içermemesini sağlamak için bu tür analizlerin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sahip olduğu pluripotentlik özelliği ile insan gametlerinin oluşturulması, insan kopyalama/klonlama veya insan-hayvan kimerik organizma oluşturulması gibi gayri meşru potansiyel barındıran PKH'ler ile ilgili etik konular bu alanda bir sorun olmaya devam etmektedir (131). Örneğin, vericinin anonimliğinin garanti altına alınması konusu önemli bir değerlendirme alanıdır. Günümüzde, genom dizileme gibi analitik tekniklerdeki gelişme ile büyük veri kümeleri oluşmaktadır. Bilimsel veriler araştırma topluluğunun kullanımına sunulurken, bağışçıların özdeşleştirilmelerini sağlayacak mekanizmalar kritiktir. Uzun vadede kök hücre bankaları ve genetik verileri yönetenlerin, donör anonimliğini garanti edemeyeceği açıktır ve onamların bu gerçeği yansıtması gerekmektedir.

Kök hücre araştırmaları ve hücresel tedavi dinamik ve hızla ilerleyen alanlardır ve kök hücre bankacılığı uzun vadede, verimsizliği ve banka kaynaklarının israfı ile

sonuçlanabilecek riskler barındırmaktadır. Bu nedenle her bir merkezin, bankanın yeni teknolojiye herhangi bir yatırımın yapılmasına yardımcı olacak güvenli kararlar almasına yönelik uygun fizibilite çalışmaları yürütmek için yüksek kaliteli bilimsel değerlendirmeler çok önemlidir (189). Tasarlanan ulusal uPKH bankasına yönelik detaylı bir fizibilite çalışması yapılması için Ankara Kalkınma Ajansı - Fizibilite Desteği'ne başvurulmuş ve proje (No: TR51/19/FD/0017) başarılı bulunmuştur, önümüzdeki yıl içerisinde fizibilite çalışmalarının tamamlanması planlanmaktadır.

Dr. Stacey 2017 yılındaki derlemesinde, bir kök hücre bankası için iki esas gereklilikten bahsetmektedir. İlki, oluşturulacak olan hücre bankasının primer amacının belirlenmesidir. İkincisi ise bankanın hitap edeceği müşteri yelpazesine karar verilmesidir (189). Pedi-Stem uPKH Bankası, öncelikli olarak ulusal ve zamanla daha geniş bir coğrafi düzeyde araştırma çalışmalarına hücre sunmak üzere tasarlanmıştır. Personel, tesis ve diğer kaynak ihtiyaçları belirlenen esas gereklilikler fizibilite çalışması sırasında belirginleştirilecektir. Ardından gerekli bütçe ve kaynakları belirledikten sonra, uygun bir yönetim yapısı ve bankanın kullanım amacı doğrultusunda, kullanıcı gruplarının ihtiyaçlarına odaklanan kalite güvence sistemini içeren bir altyapı oluşturulması gerekmektedir.

Banka yönetim yapısı normal kurumsal yönetim prosedürlerini (örneğin sağlık ve emniyet, güvenlik, finansal sorumluluk) ve tüm hücre hatları için uygun etik inceleme süreçlerini (örneğin, Kurumsal İnceleme Kurulu, Yerel Araştırma Etik Kurulu) sağlama mekanizmalarını içerecektir. Yüksek kaliteli bilimsel girdi elde etmeye yönelik bir bankanın mevcut araştırma ihtiyacına uygun standartları ve prosedürleri sürdürmesini sağlamak için harici bir bilimsel danışma kurulunun veya komitesinin varlığı da önemlidir.

Banka için oluşturulacak olan kalite güvence sistemi geliştirmenin anahtarı, başlangıçta belirlenen çalışma standardı olacaktır. Araştırma amaçlı bir biyobanka, klinik dereceli biyobankalamaya göre farklı seviyelerde güvence ve inceleme ile özel kalite standartlarına uygunluk gerektirecektir. Böylece, tipik olarak temel politikalar ve standartlar dahil olmak üzere üst düzey bir işletme el kitabının hazırlanmasını ve ayrıca gerekli izlenebilirlik seviyesini temin etmek için tüm kilit prosedürler,

protokoller, süreçteki kontroller (depolama koşulları gibi) ve üretim sürecinin validasyonu (Hücre toplama/besleme/üretme/işleme/pasajlama/diğer ürünlerle kombinasyon/dondurma/ paketleme/taşıma/depolama) ile uygun kayıt tutma sürecini de içerecektir. Ayrıca, Hücre Hattı Ana Dosyası veya Hücre Hattı Tarihçe Dosyası kalite güvence sisteminin temel kaynaklarıdır. Bu kaynaklar, bilgilendirilmiş rıza detaylarından kalite kontrol verilerine ve hücre hattının serbest bırakılmasına kadar tüm bilgileri barındıracağı ve uygun aşamalarda risk değerlendirmesi açısından kritik bir bilgi kaynağı olacağı için önemlidir (158). Pedi-Stem Araştırma Amaçlı uPKH Bankası için hazırlanacak KYS'nin ISO 20387 temelinde sunulan modele (ilk kez KYS oluşturulan biyobankalar için) dayandırılması planlanmaktadır. Araştırma amaçlı temel biyobankalama gereksinimleri ile ilgili büyük katkı sağlayacak olan bu standart, uPKH süreci düşünüldüğünde, kendi içinde basamakları olan "uPKH üretimi" noktasında sağlayacağımız ulusal katkıya açık olacak, ISO teknik komitelerine sunulmak üzere önerilebilecek bir kitapçığın esaslarını oluşturabilecektir.

UPKH bankacılığı ile ilgili dünyada tartışılan konulara (aşağıda) baktığımızda konunun klinik uygulamalara doğru yönelmiş olduğu farkedilmektedir. Henüz yeterince araştırma tecrübesi edinilmemiş olan ülkemizde öncelik, ar-ge amaçlı uPKH çalışmalarına verilmelidir. Buna yönelik, araştırmacılara güvenilir uPKH sunmanın hızlandırıcı yolu biyobankalamadır.

uPKH bankacılığı ile ilgili günümüzde üzerinde durulan başlıca konular;

- i-PKH'lerden olgun farklılaşmış hücrelere gidiş,
 - Tek hücre analizinde çoklu metrikler ve *in vivo* modelleri yansıtan 3 boyutlu (3B) sistemler ve 3B/heterotipik ve mikrofizyolojik sistemler için en iyi uygulama esasları,
 - Uluslararası veri paylaşımında veri yönetimi,
 - Hastalık araştırmalarında kontrol olarak kullanım için önemli olan izogenik hücre hatları geliştirilmesi,
 - Gen düzeltme yapılmış ve reporter hatların bilimsel kalitesinin değerlendirilmesi,
- olarak özetlenebilir.

5.2. Laboratuvar Çalışmaları

uPKH kültürü ve metabolik/mitokondriyal parametreler

uPKH araştırmalarında, hücrelerin detaylı morfolojik, fenotipik, moleküler, genetik, metabolik, epigenetik özellikleri omiks teknolojileri de kullanılarak ortaya çıkarılmakta, kapsamlı karakterizasyonları yapılmaktadır. Buna karşın, uPKH bankacılığında gereksinim duyulan kalite ve karakterizasyon testleri henüz standartlaştırılmamıştır. Bu konu, klinik uygulamaların planlandığı (özellikle Japonya’da uygulamaları başlatılmış olan) uPKH teknolojisi için giderilmesi gereken bir sorundur. Bankalamada, hücrelerin pluripotent özelliklerinin ve kültür sürecinde gelişebilecek değişimlerin takibinin yanında, kimliklendirilmesi ve tüm bu analizler yapılırken iş gücü, süre, maliyet gibi faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

PKH pluripotentiğinin gösterilmesinde fonksiyonel yöntemler de önerilmiştir. Pluripotent hücrelerin DNA-hasar verici ajanlara karşı yüksek hassasiyet göstermelerinden yola çıkılarak Secreto ve arkadaşlarının (248) tasarladığı çalışmada, i-PKH’lerinin pluripotentiğini ölçmek için, DNA’ya zarar veren bir ajan olan “etoposid”e dayalı bir yöntem sunulmuştur. Etoposid duyarlılık analizleri, hücreleri öldürmek için gerekli etoposid miktarını ölçmeye ve bu miktarı, yüksek kaliteli klonlarla ilişkili olduğu bilinen standart bir değerle karşılaştırarak uPKH uygunluğunu/kalitesini belirlemeye dayanmaktadır.

Pluripotenti testlerinin yanısıra genetik kararlılık da uPKH alanı ile ilgili bilimsel zorluklardandır. uPKH üretiminde hücre hattından hattına olan varyasyonlar dışında, aynı donöre ait 4 klon arasında bile tamamen farklılıklar olabilmektedir. Örneğin, bu 4 alt klonun Oct4 profilleri tamamen değişiklik gösterebilmektedir (akım sitometri ölçümlerinde, Oct4 ifade düzeyi %40-70 seviyeleri arasında değişebilmektedir) (249).

uPKH tabanlı teknolojiler ile klinik araştırmalar yapmak için onay almak üzere gerekli güvenlik ve etkinlik kriterlerini sağlamak için ideal bir araç gerekmektedir. 2015 yılında, otolog uPKH’lerden türetilmiş retinal pigment epitel hücrelerinin kullanıldığı dünyanın ilk klinik uPKH denemesinde, bir onkogende saptanan

mutasyon nedeniyle çalışma durdurulmuştur (37). CNV, SNP gibi genetik varyasyonlar dışında, uPKH'lerdeki kromozom sayısı ile ilgili çeşitli bozukluklar (anöploidi/özellikle kromozom 8, 12, 17 veya 20 ve trizomi X) ile de sıklıkla karşılaşmaktadır (250, 251).

uPKH klon kalitesinin çok güvenilir bir göstergesi olan koloni morfolojisini ölçmek için Kato ve ark. tarafından 2016 yılında, algoritma ve yüksek kaliteli canlı hücre görüntülemesini içeren bir yaklaşım geliştirilmiştir (252). Ancak bu yöntemin uPKH kolonilerin morfolojik özelliklerini kaybeden tek tabakalı kültürlerde geçerli olmadığını belirtilmiştir. Akım sitometri analizi, potansiyel olarak uygun fiyatlı ve yüksek verimli olmasına rağmen, yüksek kaliteli uPKH'lere özgün hücre yüzeyi işaretleyicileri net olarak tanımlanmadığından, uPKH kalitesini güvenilir bir şekilde raporlayabilecek hücre yüzeyi belirteçlerinin eksikliği ile sınırlıdır; TRA-1-60, SSEA-3 ve SSEA-4 gibi varsayılan “kök hücre” belirteçleri bile, zayıf koloni morfolojisi olan düşük kaliteli uPKH klonlarında da kalıcı olarak ifade edilebilmektedir. uPKH ile ilişkili özgü genlerin veya aslında tüm uPKH transkriptomunun RNA ifade analizi, hem PKH pluripotensiyelini hem de PKH farklılaşma potansiyelini nitelemek için diğer bir yaklaşımdır (253). Bu tip verilerin genel klon değerlendirmesine daha uygun ancak PKH farklılaşması sırasında meydana gelebilecek çok sayıda translasyonel ve post-translasyonel olayları açıklayamamasından dolayı bağımsız bir kalite kontrol deneyi olarak yetersiz kaldığı belirtilmiş ve PluriTest mikrodizi tabanlı analizlerin, pluripotent teratokarsinom hücre hatlarını veya kendilerinden (spontan) farklılaşma gösteren bir i-uPKH klonunu kesin olarak ayırt edemediği, yapılan çalışmada gösterilmiştir (248).

uPKH kolonilerinin seçimindeki zorluklardan bir diğeri, hücrelerin kendiliğinden farklılaşmaya başlamasıdır. Bu istenmeyen durumun erken ve kolay tespit edilebilmesi, uPKH kalitesinin değerlendirilmesi için uPKH bankaları ve laboratuvarları tarafından benimsenebilecek, standartlaştırılmış bir araca/teste ihtiyaç vardır. Literatür taramaları ve daha önce tecrübe ettiğimiz çalışmalardan (BAP Proje No: 8178) da yola çıkılarak mitokondrinin, uPKH üretim sürecinde hücrenin metabolik özellikleri açısından fikir verici bir parametre olabileceği üzerinde düşünülmüştür. Tez çalışması kapsamında, yeniden programlama sürecinde, ortam

koşullarında olumsuz değişiklikler oluşturularak koloni oluşumunu negatif yönde etkileyecek faktörlerin mitokondriyal parametrelere etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Bu çalışmanın devamı olacak ileri çalışmalarda, kültür ortamının uygun olup olmadığının anlaşılması için mitokondri aktivitesine yönelik metabolik parametrelerin solubl fazda ölçülmesi yoluyla kültür ortamını kesintiye uğratmadan, hatta uzun ve çok titiz çalışma gerektiren mikroskopik incelemelere olan gereksinimi de azaltarak yeniden programlamanın ve kültür sürecinin erken aşamalarında ideal uPKH kolonilerinin geliştirilmesine katkı sağlanabileceği öngörülmüştür. Böylelikle, önce hücrelerdeki mitokondriyal özelliklerin detaylı incelemelerinin yapılması, ilerleyen çalışmalarda ise bunların solubl faza yansıyan parametrelerinin test edilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Kök hücre homeostazı ve farklılaşmasında mitokondrinin biyolojik fonksiyonlarının incelenmesi, hücre kaderinin düzenlenmesindeki dinamikleri anlamaya yönelik gerekli bilgileri sağlayacaktır (121). Laboratuvar çalışmalarımızın özünde, uPKH'lerin yeniden programlanması aşamasında, farklı pasajlarda veya farklı besleme aralıklarında tam programlanmış/kısmi programlanmış/farklılaşmaya yönelmiş hücrelerdeki metabolik/mitokondriyal parametrelerdeki değişiklikler ile ilgili ön bilgi edinilerek uPKH üretim ve kültür süreçlerinde verim düşüklüğüne yol açacak olumsuz ortam koşullarının anlaşılmasına çalışılması ve bu parametrelerin olası bir kalite/karakterizasyon sürecinin değerlendirmesinde fikir verici olabilirliğinin değerlendirilmesi amacı güdülmüştür. Bu bağlamda, 3 farklı deney grubu tasarlanmıştır: i) yeniden programlama süreci başlatılmış olan hücreler ile kontrol olarak MKH'ler ii) uPKH kültür sürecindeki erken ve geç pasaj koloniler iii) günlük besleme periyodu ile koloni morfolojisi düzgün olan uPKH'ler (=iyi koloniler/standart günlük besleme ile geliştirilen uPKH kolonileri) ile besleme periyodu değişikliği yapılarak morfolojisi bozulmuş/farklılaşma özellikleri gösteren uPKH kökenli hücreler (=kötü koloniler/standart dışı-üç günde bir beslenen uPKH'ler). Bu gruplarda, mitokondriyal kütle bilgisi veren MitoTracker ölçümleri ve mitokondriyal metabolizma hakkında fikir edinmek üzere ROS düzeyi tayini yapılmış, hücrelerin köklülüğü için iyi bir belirteç olduğu bilinen ALDH (254) seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca, hücrelerin pluripotentlik özellikleri, yüzey belirteci ve gen ifade analizleri ile ortaya konulmuştur. Hücrelerin mitokondri açısından ince yapı özellikleri ise elektron

mikroskopi ile detaylı değerlendirilmiştir. Çalışmamızda bu özellikler yanında hücrelerin köklülüğü ile ilişkili olabilecek çekirdek (nükleus)/sitoplazma oranı, çekirdekçik (nükleolus) varlığı, golgi, lizozomlar, ER, sitoplazma ve plazma membran özellikleri de değerlendirilmiştir.

uPKH kalitesinin değerlendirilmesi, diğer primer veya ölümsüzleştirilmiş insan hücre hatlarının çoğunda karşılaşılmayan birçok sorunu ortaya çıkarmaktadır. Bunların başında, aynı ebeveyn hücre hattından köken alan klonlar arasında bile gözlemlenebilen heterojenlik gelmektedir (255). Tamamen otomatik ve robotik süreçlerin kurulumu ile yüksek kaliteli ve kararlı uPKH'lerin üretildiği örnek bir çalışmada, 9. ve 20. pasajlarda test edilen hücreler için pasaj sayısının etkisi, puan kartı (scorecard) testi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, ortalama farklılaşma eğiliminin iki farklı pasajdaki hücre hatlarının davranışında önemli bir rol oynamadığı, asıl varyasyon sebebinin manuel klon seçimi olduğu kanısına varılmıştır (256). Çalışmamızda test edilen erken ve geç pasaj uPKH'ler aynı klondan geliştirilmişlerdir.

Olgun hücrelerin, YP ile birlikte mitokondri metabolizmasının baskılandığı, glikolize yöneldiği bilinmektedir (121, 257). Buradan yola çıkılarak, laboratuvar çalışmaları kapsamında, ilk olarak, programlanmanın erken aşamalarında metabolik/mitokondriyal parametreler gözlenmeye çalışılmış, kaynak hücre olan MKH özelliklerinin süreç içerisinde nasıl değiştiğine dair bilgi toplanması yoluyla kültür koşullarında gelişen olumsuzlukların erken tespit edilebilirliği yönünden incelenmesi amaçlanmıştır. YP sürecinde hücrelerin morfolojik özellikleri yakından izlenmiş, hücrelerin heterojen olması ve elde edilen uPKH sayılarının/kolonilerinin kısıtlı olması nedeniyle hücre kabından sayılmadan toplanan/kaldırılan hücrelere yönelik akım sitometrik ve moleküler incelemeler tüm deney gruplarında yapılamamıştır. MKH'lerde YP sürecinin başlamasını takiben, erken dönemlerden (7. gün ve sonrası) itibaren önemli metabolik değişiklikler olduğu gözlenmiştir. MT ile boyanan hücrelerin floresans yoğunluğuna göre değerlendirilmesi sonucu, hem YP'lerde hem de MKH'lerde MT parlak ve dim olmak üzere 2 farklı popülasyon olduğu görülmüştür. MKH'ler, belirli bir molekül ifadesine göre zenginleştirilmeden standart koşullarda kültür edildiğinde, beklenildiği gibi, homojen olmayıp heterojen popülasyonlara sahiptirler. Farklı köklülük dereceleri gösteren ve belki de kısmen

farklılaşmaya yönelmiş hücreler bulunduğu için mitokondri yoğunluklarının farklı olduğu düşünülmüştür. Yeniden programlanmakta olan hücrelerde de farklı mitokondri yoğunluğu içeren hücre gruplarının olması, YP'nin bu erken aşamasında, henüz uPKH gelişmemiş olduğunu, hücrelerde bu süreçte beklenen MET-EMT (mezenkimalden epitele geçiş-epitelden mezenkimala geçiş)'nin farklı aşamalarının MT analizlerine yansması olabileceğini düşündürmüştür. MT boyanma derecesini yansıtan ortalama MFI değerleri ve hücrelerin MT ifade derecesine göre analizleri sonucunda, MT ifadesinin MKH'ler ve YP'nin 7. gününde benzer olduğu görülmüştür. Hücrelerin ROS seviyelerine (% değerler) bakıldığında ise hem MKH'lerin, hem de YP'nin 7. günündeki hücrelerin tamamına yakınında (>%95) ROS aktivitesi bulunduğunun görülmesi, metabolik aktivitesi olan her hücrede reaktif oksijen radikallerinin varlığını ve hücrenin farklılaşma durumuna göre hücre ROS seviyelerinde artış olduğunu hatırlatmıştır. Köklülüğü daha yüksek olan hücrelerin mitokondri aktivitesinin daha düşük, ROS üretiminin daha az olması ve mitokondriyal metabolizmanın yerini glikolitik metabolizmanın alması beklenmektedir.

Hücrelerde ROS üretimine neden olan etkenler; ekzojen (UV ışığı, iyonlaştırıcı radyasyon, farmasötikler, vb.) ve endojen kaynaklar (Mitokondrilerdeki elektron taşıma zinciri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-NADPH oksidazlar, peroksizomlar, endoplazmik retikulum, vb.) olmak üzere 2 grupta toplanabilmektedir. Hücrelerde ROS'un zararlı etki göstermemesi için dengede tutulmasını ince ayarlayan antioksidatif mekanizmalar (örn. Glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) vb.) işlemektedir. Bu nedenle, seviyelere bağlı olarak ROS, farklı transkripsiyon faktörlerini, enzimleri ve/veya başka proteinleri etkilemekte, sinyal yollarını tetiklemektedir. Yüksek seviyelerde ROS, makromoleküllerin geri dönüşümsüz olarak hasar görmesine neden olmaktadır. Yine seviyelere bağlı olarak ROS'un, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel fonksiyonlar üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir (258).

Erken dönem yeniden programlama sürecinde edinilen en belirgin bulgu, hücre başına ROS seviyelerinin yansması olan ROS parlaklığında (floresans yoğunluğu=MFI değerleri) saptanan azalmadır. Bununla uyumlu olarak, olumsuz koşullara maruz bırakılan kültürlerde hücrelerin ROS ifadelerinde artma gözlenmesi

de hücrelerin farklılaşmaya yönelmiş olduğunu düşündürmüştür. YP'nin 7. günündeki hücrelerin MT yoğunluğunda azalma olmamış olsa da, mitokondri aktivitesinin göstergelerinden biri olarak değerlendirilebilecek olan ROS parlaklığının azalmış olması, hücrelerin mitokondriyal metabolizmasının yavaşladığını akla getirmiştir. YP sürecinde henüz mitokondri yoğunluğu azalmadan bile hücrelerde olan metabolik değişimlerin etkisiyle ROS üretiminin azaltılarak farklılaşma sürecinin baskılandığı şeklinde değerlendirilmiştir. Hücrelerin ROS ifade dereceleri (% değerleri), hem MKH hem de YP hücrelerde oldukça yüksek olarak saptanmıştır. Yine de, bu ROS pozitif popülasyon içerisinde farklı yoğunlukta boyanma gösteren hücre popülasyonları incelenmiştir. Edinilen bulgular, hücrelerin yaklaşık yarısının YP sürecine yönelmiş olabileceğini akla getirmiştir. Nitekim YP'nin 7. gününde değerlendirilen ALDH ölçümlerinde ise MKH'lere oranla uPKH'lerde ALDH pozitif hücre oranının daha yüksek olduğu görülmüş ve bu durum, YP başlatılması ile birlikte hücrelerin bir kısmının köklülüğe doğru geçişini desteklediğini düşündürmüştür.

Uyarım/YP sürecinin ilerleyen günlerinde de aynı belirteçler (ROS, MT ve ALDH) için akım sitometrik değerlendirmeler yapılmıştır. Ölçümlerde genellikle, hücre popülasyonu oldukça dağınık bir görünüm sergilemiş, ayrıca tüm analizler için yeterli sayıda hücre eldesinde problem yaşanmıştır. uPKH kültürlerinde, YP süreci başlatılmasını takiben başlangıç hücrelerin çok düşük bir oranının (<%0.1-2) uPKH kolonisi geliştirebildiği, verimin çok düşük olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, YP sürecinin erken aşamasında, değişik zaman aralıklarında yapılan incelemelerde, farklılaşma ve köklülüğün farklı aşamasında hücreler olması (MKH'ler, MKH'lerden MET-EMT sürecinde gelişmeye başlayan epiteloid morfolojide hücreler, uPKH'ya ilerleyen hücreler, farklılaşan hücreler) nedeniyle akım sitometri analizlerinde oldukça dağınık görünümler elde edilmiş, kapı alınmasında zorluk yaşanmış, ayrıca seçilen tüm zaman noktalarında bütün analizler aynı örneklerde yapılamamıştır.

Çalışmamızın YP'nin erken aşamalarında elde edilen bulgular, YP sürecinin başlamasını takiben, MKH'lerin tipik belirteci olan CD29 ifadesini kaybettiklerini, pluripotentlik belirteçlerinin protein düzeyinde (akım sitometri), çok küçük bir hücre popülasyonu hariç pozitifleşmediğini, buna karşın moleküler düzeyde bakıldığında önemli bir kısım genlerin düşük düzeyde de olsa ifade edilmeye başladığını (Oct4,

Sox2, Rex1, Klf4, TERT, DNMT3a, CDH1), tüm bu aşamalar esnasında hücrelerde metabolik değişimler olduğunu göstermiştir. YP aşamasında yaşanan teknik zorluklar (yeniden programlanan hücre miktarlarında yetersizlik, farklılaşma basamaklarında/heterojen hücreler olması) nedeniyle akım sitometri ile metabolik değişimlerin aşama aşama değerlendirilmesi kolay olmamıştır.

Yapılan çalışmalarda, uPKH üretim ve farklılaştırma aşamalarında mitokondrielerin gelişimsel plastisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (259). Ayrıca, farklılaşmış hücrelerin de metabolik profilinde çeşitlilikler olduğu ve bu durumun yeniden programlanma etkinliğini değiştireceği belirtilmektedir (257). Bu bulgular ışığında, yeniden programlanan aynı hücreler üzerinde farklı koşullarda yapılacak metabolik profillemenin önemi ortaya çıkmaktadır. uPKH eldesindeki verim düşüklüğü, ar-ge ve klinik uygulamaların gelişimine en büyük engeldir. Bu nedenle, kültür koşulları değiştirildiğinde oluşacak metabolik değişikliklerin bilinmesinin optimal koşulların belirlenmesine katkı sağlayacağı düşünülerek bu çalışmada, beslenme periyodunun (E8 besiyeri ile standart günlük ve standart dışı üç günde bir besleme) ve besiyeri formunun değiştirilmesi (flex besiyerleri ile standart üç günde bir besleme) gibi olumsuz ya da farklı koşullara maruz bırakılan ortamlarda hücrelerin mitokondriyal morfoloji ve parametre değişimleri ile köklülük seviyeleri incelenmiştir. Beslenme aralığının açılması ile oluşturulan olumsuz koşullarda ROS ifade seviyelerinin (floresans) arttığı gözlenmiş, ayrıca alternatif flex besiyeri ile besleme sonrasında da benzer sonuçlar alınmıştır. Hücrelerin E8 flex ortamında ROS ifadesinin artmış olması hücrelerin kısmen farklılaşmaya yönelmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, erken ve geç pasajlar da karşılaştırılmıştır. uPKH'lerin pasaj ilerledikçe pluripotentlik özelliklerinin daha iyi ortaya çıktığı/embriyonik kök hücreler ile daha çok benzerlik gösterdiği bilinmektedir (10, 260). Bu durum ile uyumlu olarak, çalışmamızda ROS ifade düzeyinin geç pasajlarda daha düşük olduğu görülmüştür. Tüm bu bulgular pluripotentliğe yönelme veya pluripotentlik aşamasında hücrelerin ROS ifade seviyelerinin azaldığını, bunun da azalmış mitokondri aktivitesi ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Farklı koşullarda tekrarlanan bu deneyler, ROS analizlerinin hücrelerin metabolik durumunu göstermede oldukça erken ve güvenilir bir gösterge

olduğunu düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar, uPKH bankalamada etkin olabilecek kalite konuları ile yorum yapmaya yönelik ön-deney niteliğindedir, paralel gruplarla ve farklı parametrelerin incelenmesiyle tekrar çalışmalarına ihtiyaç vardır.

YP sürecinde, hücrelerin çoğunluğu kısmi programlanmış olup sadece küçük bir oranı tam programlananları oluşturmaktadır. Baskın popülasyon, kısmi programlanmış, ara formdaki (intermediate) uPKH'lerdir (partial iPSCs-PariPSCs). Bununla ilgili olarak, yeniden programlamada bir kontrol noktası (checkpoint) kısıtlamasından bahsedilmektedir (261). 2012 yılında yapılan bir çalışmada, tam programlanmamış hücrelerde de, başlangıç hücre belirteçlerinin kaybolması, pluripotenslik ifadelerinin arttığı, histon modifikasyon durumlarında değişiklikler, EKH benzeri morfoloji kazanımı ve hatta teratom oluşturabilme özelliğinin görülebildiği (262); ancak 2017 yılındaki çalışmada, kısmi programlanmış olarak ifade edilen hücrelerin morfolojik olarak EKH benzerliği göstermiş olsa da (PariPSCs) teratom oluşturmadığı, TRA1-60 ifadesinin olmadığı, ayrıca ekzojen Yamanaka faktörlerinin ifadesinin kaybolmadığı bildirilmiştir (11).

Çalışmamızda, belirli pasajlarda seçilen ve rutin besleme periyodu değiştirilen uPKH'lerde beklenen bulgular; iyi koloni olarak ifade edilen (iyi programlanmış olarak varsayılan) hücrelerin (ileri pasajlar/günlük beslenen kültürler/morfolojik olarak ideal koloni olarak gözlenenler) mitokondri aktivitelerinin, başlangıç hücreler olan MKH'lere ve kısmi programlanmış/farklılaşmaya yönelmiş hücrelere göre daha düşük bulunması ve mitokondriyal parametrelerin immatür hücrelerle uyumlu olmasıdır. Bu bulgular, kök hücrelerin karakteristiği olarak kabul görmeye başlamış olan mitokondriyal aktiviteye göre glikolizin daha baskın olması durumuna işaret etmektedir. Hücrelerin özellikle hipoksik koşullarda, TCA ve oksidatif fosforilasyon yerine glikolize yöneldiği bilinmektedir. Ancak kök hücrelerde, normoksik koşullarda da glikolizin daha baskın olduğu ileri sürülmektedir (kanseri hücrelerinde görülen Warburg etkisi gibi (263)). Çalışmamız normoksik koşullarda yapılmıştır. Literatürde var olan hücre metabolizma karşılaştırmaları ile ilgili çalışmalarda, çoğunlukla EKH veya uPKH ile somatik hücreler (genellikle fibroblastlar) karşılaştırılmıştır. Bizim başlangıç hücremiz ise erişkin somatik hücre değil, somatik bir kök hücre olan MKH'dir. Bu durumda MKH ile uPKH karşılaştırılmasında, fibroblast kıyasında

olduğu kadar çarpıcı bir farklılık beklenmemektedir. Multipotent kök hücre grubunda yer alan MKH'lerin de enerji metabolizması olarak glikolizi tercih ettiği bilinmektedir (264, 265). Bununla birlikte çalışmamızda, en belirgin ROS ifadelerinde olmak üzere metabolik değişimler saptanmış, MKH'lerle karşılaştırıldığında yeniden programlanmakta olan ve çeşitli pasajlardaki uPKH'lerde mitokondri aktivitesini yansıtan ROS parlaklığının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Eritrositler hariç tüm canlı hücreler mitokondri bulundurur ve ROS aktivitesine sahiptir. Bu nedenle deneylerde hücrelerin >%90-99'unda akım sitometri ile MT ve ROS pozitifliği saptanmıştır. Hücreler arasında mitokondri kütlesinin ve ROS aktivite farklılığının gösterilmesi için MT ve ROS floresans değerleri incelenmiş, hücrelerin bu iki parametre yönünden parlak, dim veya dim/negatif boyanma özellikleri değerlendirilmiştir. Bu analizlerde tipik olarak hücrelerin köklülüğü arttıkça ve uPKH özellikleri ortaya çıktıkça ROS parlaklığında azalma, bazı incelemelerde MT parlaklığında da azalma gözlenmiş ve mitokondriyal metabolizmanın baskılanması olarak yorumlanmıştır. Bu durum, hem YP aşamasında MKH'lerle kıyaslandığında, hem de iyi, kötü kolonilerin değerlendirilmesinde gözlenmiştir. Ayrıca, erken ve geç pasajların karşılaştırılmasında da geç pasajlarda, uPKH özelliklerinin daha tipik olmasıyla birlikte MT ve ROS parlaklığındaki azalma dikkat çekmiştir. Buna karşın yine de, aynı örnekten elde edilen klonlarda bile hem yüzey belirteçlerinin düzeylerinde hem de mitokondriyal parametrelerde farklılıklar gözlenmiştir.

Mitokondriyal fonksiyonların değerlendirilmesinde otofaji de önemli yer tutmaktadır. Selektif otofaji/mitofaji, defektif mitokondrilerin lizozomal eliminasyonunda rol oynamaktadır (266). Mitokondriyal ağda yüksek bir plastisite vardır ve bu durum füzyon ve fzyon arasındaki denge ile ilişkilidir. Bu dengenin düzenlenmesi ile pluripotent hücrelerin yaşamı, idamesi sağlanabilir. Somatik hücrelerin yeniden programlanması esnasında genetik ve epigenetik olarak da yoğun yeniden modelleme olmakta, bu da mitokondri özelliklerini etkilemektedir. MitoTracker Green ile yapılan öncü çalışmalar, aktif mitokondrilerin uPKH kolonilerinin kenar kısımlarında daha yoğun olduğunu göstermiştir. Bu alanlar, farklılaşma alanları olarak değerlendirilmektedir. Bu durum, kolonilerin merkezindeki immatür hücrelerin daha düşük mitokondriyal kitleye sahip olduğunu düşündürmüştür. Yeniden programlanma ile gözlenen bu azalmanın da mitofaji benzeri olaylarla ilgili

olabileceği ileri sürülmüştür (267). Otofajiyi tetikleyen rapamisin ile YP etkinliğinin arttığı gösterilmesi de bu hipotez ile uyumlu bulunmuştur (268). Çalışmamızda yapılan EM incelemelerinde YP aşamasında olan hücrelerde ve ileri pasajlarda otofaji gösterilmiş olması bu bulguları desteklemektedir. Ayrıca, füzyon/fisyon dengesinin de mitokondriyal dinamik üzerine etkisinin aydınlatılması gerekmektedir. Bildirilen mitokondriyal değişimler pluripotentlik durumunda geçici bir dönemde mevcuttur, somatik hücreye doğru farklılaşma ile değişim gözlenmektedir.

Mitokondrilerin hücre için enerji üretimi yanında redoks dengesinin korunmasında da rolü vardır (266). Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyonun son ürünü olarak üretilen ROS, toksik olup DNA, proteinler ve lipidlerde oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu durumu etkisizleştirmek için antioksidan enzimler devreye girmektedir. Denge bozulursa oksidatif stres meydana gelmekte, yaşlanma sürecine benzer hücre hasarı ortaya çıkmaktadır. PKH'ler redoks denge bozukluğuna karşı oldukça hassastır ve oksidatif olarak modifiye protein, lipid, DNA seviyeleri düşüktür. Uzun yaşam ve proliferasyon kapasitesini korumak için PKH'lerin stresten korunma mekanizmaları gelişmiştir ve redoks durumu kuvvetle kısıtlanmıştır (269). Böylelikle genomik kararlılık sağlanmaktadır. ROS'u dengelemek için antioksidan enzimler yüksektir ve oksidasyon minimal tutulmaktadır. PKH metabolomunda doymamış metabolitler yüksek orandadır, oksijenasyon ve hidrojenasyon reaksiyonlarına fazla duyarlıdır. Böylelikle, artmış metabolik oksidasyona hızla cevap verilir, farklılaşma programları başlatılır (kimyasal plastisite) (270). Mitokondriyal solunumun azaltılması ile istenmeyen ROS oluşumu azaltılmaktadır. Ayrıca pentoz fosfat yolağı (pentose phosphate pathway, PPP) oksidatif yoluyla antioksidan enzimlerin aktivitesi için gerekli olan redüktan faktör, NADPH sağlanmış olur. PKH'de glikoliz ile bir taraftan biyokütle (nükleotit, aminoasit, lipid) öncüleri sağlanmakta, ayrıca hücreler oksidatif stresten korunmuş olmaktadır.

Morfolojik incelemelerimizde, YP faktörlerinin, MET'in (271) de tetikleyicisi konumunda olduğuna dair bulgular (epiteloid görünüm) edinilmiştir. Elektron mikroskopi çalışmalarımızda ise bir örnekten alınan çok sayıda kesit incelenmeye çalışılmış ve hücrelerin filopod yapısından itibaren özellikle mitokondrinin ince yapı

özellikleri üzerinde durulmuştur. Hücre çapının genel olarak 11-17 mikron aralığında değiştiği MKH'lerde mitokondri boyutu 0,2-0,8 aralığında ölçülmüştür. 4-22 mikron olabildiği gözlenen uPKH'lerde mitokondri çapının ise 0,1-0,7 arasında değiştiği gözlenmiştir. MKH'lerde ve uPKH'lerde en çok yuvarlak olmak üzere oval ve uzamış mitokondri yapısı gözlenmiştir. YP'nin 18. ve 22. gününde, MKH'lerde gözlenmeyen dallı mitokondri yapısına rastlanmıştır. Stres durumu ile ilişkilendirilen şapkalı mitokondri (1 adet) yapısı ise, aslında hücreler için bir çeşit stres durumu olan YP sürecinin 18. günündeki hücrelerde görülmüştür. MKH'lerde mitokondri yerleşimi dağınık veya perisitoplazmik; erken pasaj (p6 ve p8) uPKH'lerde perinükleer yerleşimli; yeniden programlanan ve ileri pasaj (p22 ve p27) hücrelerde ise dağınık olarak gözlenmiştir. Krista yapısına göre tübüler mitokondri yalnızca p27 kolonilerde gözlenmiş, p6 ve p8 uPKH'lerde krista yapısı boyuna, MKH'ler ve uyarımın 22. günündeki hücrelerde ise enine dizilim göstermiştir. 22. günde ayrıca trabeküler krista yapısı da dikkat çekmiştir. Örnek kesitlerine diğer organellerle ilişki açısından bakıldığında, mitokondrilerin, MKH'lerde GER sisternaları arasında, YP'nin 18. günündeki hücrelerde, vakuoller arasında (dağınık) ve p6 uPKH'lerde otofajik vakuol etrafında tespit edilmesi, fikir verici olmuştur. Filopod denilen hücre çıkıntıları daha ziyade MKH'lerde ve YP sürecindeki hücrelerde görülmüştür. İncelenen kesit alanlarında mitokondri adet miktarı açısından bakıldığında MKH'lerde ortalama 22, yeniden programlanan hücrelerde ortalama 21, erken ve geç pasaj ayırt etmeksizin uPKH'lerde 19 olarak sayılabilmektedir.

Literatürde, genel olarak pluripotent hücrelerde mitokondrilerin küresel, oval ve olgun hücrelerdekine göre daha küçük olduğu, genellikle çekirdek etrafında (perinükleer) yerleşim gösterdiği, kristaların iyi gelişmemiş olduğu ve elektron yoğunluğunun az olduğu bildirilmiştir (260). uPKH'lerin mitokondriyal morfoloji yönünden EKH'ler ile kıyaslanmasında, immatür hücrelerde beklenen perinükleer yerleşim, küresel/oval mitokondri, kristaların azlığı gibi tipik bulgular EKH'lerde olduğu kadar uPKH'lerde belirgin bulunmamış, uPKH'lerin bir bakıma EKH ile olgun fibroblastlar arasında karma (uzamış ve globüler mitokondri yapısı) mitokondriyal fenotipik özelliklere sahip olduğu ileri sürülmüştür (257). uPKH'lerin özelliklerinin belirlenmesi için histomorfometrik analizlerin gerektiği üzerinde durulmaktadır. Ayrıca farklı uPKH hatları arasında yöntemlere göre değişen metabolik profiller elde

edilmiştir. Biz de çalışmamızda, MKH ile erken ve geç pasaj uPKH'lerin mitokondrilerinin EM incelenmesinde; yerleşim yerleri, morfolojik özellikleri, boyanma ve krista yapılarına göre immatür özellikte olanları değerlendirirken ayrıca farklı besleme periyodlarına maruz bırakıldığında farklılaşma veya otofaji gibi istenmeyen durumlara yönelme ile ilişkilendirilmek üzere aynı şekilde parametre değerlendirmeleri yapmaya çalıştık.

Çalışmamızda ayrıca, hücrelerin mitokondriyal aktivite ve köklülük özelliğinin gösterilmesi için ALDH ifadeleri akım sitometrik olarak incelenmiştir. ALDH enzimleri endojen ve ekzojen aldehitleri detoksifiye etmektedir. ALDH'nin çeşitli izoenzimleri vardır. ALDH1A1 embriyonal dokuda ve erişkin kök hücrelerde ifade edilmektedir (217). Akım sitometride ALDH ifadesinin yüksekliği, kök ve öncü hücrelerin seçilmesinde kullanılmaktadır. Köklülüğü yüksek olanlarda, ALDH parlak ifade eden hücrelerin zengin olduğu gösterilmiştir. Esasen, farklı izoenzimlere sahip olan ALDH değerlendirilmesinde en uygunu, ALDH aktivitesinin tayinidir. Bu yöntemle, ALDH1A1 dışında diğer izoenzimler hakkında da fikir edinilir; hücre çoğalması/kendini yenileme, farklılaşma, oksidatif stres cevabı gibi biyolojik fonksiyonlarla yakından ilgilidir. Birçok primitif kök hücre popülasyonunda ALDH1A1'den daha çok ALDH1A3 ifadesinin belirgin olduğu ileri sürülmektedir. Çalışmamızda YP sürecinde, erken ve geç pasaj uPKH'lerde, besleme periyodu ve besiyeri formu değişikliği yapılan uPKH'lerde akım sitometrik olarak ALDH düzeylerine bakılmıştır. Deneilerin bir kısmında, MT ve ROS parlaklığının daha düşük olduğu daha immatür hücre tiplerini içeren kültürlerde, ALDH düzeylerindeki yükseklik veya ALDH parlak ifade eden hücre popülasyonlarındaki artış, dikkat çekmiştir. Besleme periyodu değiştirilerek her gün beslenen iyi koloniler ile üç günde bir beslenen kötü koloniler arasındaki ALDH düzeyi karşılaştırmasında hem oransal hem de görsel akım sitometri dağılımları bilgi verici olmuş ve beklenildiği gibi kötü olarak ifade ettiğimiz kolonilerde köklülük seviyesinin azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, E8 flex ile beslenen hücreler için yapılan çalışmalarda istatistiksel analiz sonuçlarının anlamlı çıkmaması ilk olarak deney sayısı yetersizliğini düşündürmüştü, ayrıca test edilecek hücrelerin sayılmadan (toplandığı hücre kabı ile eşleştirilen oransal hesaba göre) işlemlere tabi tutulmasının da etken olmuş olabileceği düşüncesiyle hücre sayıları açısından yeniden optimizasyon

yapılmasının fayda sağlayacağı kanısına varılmıştır. Erken ve geç pasajların karşılaştırılmasında ise pluripotentliğin belirginleştiği geç pasaj hücrelerinde mitokondri yoğunluğu ve ROS düzeylerinde azalma gözlenmekle birlikte ALDH düzeylerinde veya parlaklığında köklülüğü düşündürecek şekilde bir artma gözlenmemiştir. Dikkati çeken bir bulgu, erken ve geç pasajların kontrol hücrelerinde de gözlenen floresans parlaklığındaki farklılıklardır. Bu durum teknik bir duruma işaret edebileceği gibi ALDH1 seviyesinin ölçüldüğü deneylerimizin ALDH aktivitesini yansıtmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamız kapsamında, uPKH karakterizasyonuna yönelik gerçekleştirilmiş olan RT-PCR analizlerinde, negatif kontrol olarak multipotent kök hücre olan MKH'ler baz alınmış ve test edilen (pluripotent olan veya pluripotentlik yönünde programlanmaya başlayan) hücrelerin pluripotentlik belirteçlerinde kabul edilebilir seviyede artış olduğu görülmüştür. Grafiklerde, özellikle DNMT3a ve TERT ifadelerindeki belirgin yükseklik (kat farkı= 8-12) dikkat çekmektedir. Chan ve ark. (126) tarafından yapılan çalışmada, i-uPKH karakterizasyonu için, hücrelerin tamamen yeniden programlanmasının bir göstergesi olarak, DNMT3b'nin ifade seviyesine bakılması önerilmiştir. DNA metiltransferaz genlerinden DNMT3a, somatik hücrelerin yeniden programlama sürecinde pluripotentlik genlerinin yeniden metilasyonunda DNMT3b ile birlikte rol almaktadır (272). Tamamen yeniden programlanmış durumu ayırt etmek için, DNMT3b'nin yanı sıra TRA-1-60 ve Rex1'in ifadesinin kullanılabilmesi belirtilmiştir. Analizlerimizde, Rex1 ifade düzeyleri de belirgin yükseklikte bulunmuştur. Telomeraz enziminin aktifliği ve telomer uzunluğunu ifade eden TERT geni, hücrelerin sonsuz bölünme yeteneği kazanmasında ve kendini yenileme sürecinde uPKH'ler için kritik bir belirteç olarak değerlendirilmektedir (273). Farklı telomer uzunlukları dolayısıyla uPKH'ler heterojenlik gösterebilmektedir (274).

Pluripotentlik faktörleri (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) ile indüklenen hücrelerde YP sürecinin başlangıcında ilk olarak somatik hücre belirteçlerinde azalma, ardından sırayla, hücre çoğalmasında (proliferasyon) artma, oksidatif fosforilasyondan glikolitik metabolizmaya değişim ve MET geçişi olmaktadır (275). Takiben pluripotentlik belirteçlerinde artma olmaktadır. Çalışmamızın YP'nin erken

aşamalarının test edildiği kısımda somatik belirteçler kaybolmasına rağmen Oct4 ifadesi çok düşük seviyelerde bulunmuştur (<2 kat). Bu bulgu, hücrelerin pluripotentliğe geçişinin (yeniden programlanmasının) çok düşük oranda hücrede gerçekleşebileceğini, verimin çok düşük olduğunu desteklemektedir. Genel olarak çalışmalarda uPKH karakterizasyonu, tam programlanmış hücrelerin çoğaltılması sonrası >5. pasajda yapılmaktadır. Çalışmamızda da YP aşaması tamamlandığında ve >5 olan farklı pasajlarda yapılan analizlerde Oct4 ifadesinin yüksek olduğu görülmüştür.

Deneysel devam ederken uPKH'lerin yüzey belirteçlerine göre karakterizasyonlarının yapıldığı süreçlerde de akım sitometriden faydalanılmış, beklenildiği gibi MKH'ler için ayırt edici bir belirteç olan ve uPKH'ler için negatif kontrol olarak değerlendirilen CD29 düzeyleri, %2'nin altında bulunmuştur. uPKH'ler için ayırt edici olan ve ifade düzeylerinin yüksek olması beklenen SSEA-4 ve Oct4 seviyelerinin kabul edilebilir aralıkta olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm uPKH'lerde SSEA-4 erken belirteci için değerler %95'in altına düşmezken, olumsuz koşul süreçlerinde olan p8 uPKH'lerde Oct4 düzeyinin düşük olması (%70,9) dikkat çekmekte ve iyi karakterize uPKH olarak ifade edilebilmesi için yüzey belirteci seviyesinin %85'in altına düşmemesi tercih edilmektedir. Literatür bilgisinden (276) yorumlandığı üzere özellikle viral yöntem ile programlanmış olan uPKH'lerin viral genlerin kaybolmasının gerçekleştiği ileri pasajlarda daha karakterize (tam programlanmış) olmaları beklenmektedir. Subjektif olabilen erken ve geç pasaj tanımlamaları (hangi pasaja kadar erken?/hangi pasaj sonrası geç?) ayrıca düşünülmelidir. Bir başka açıdan bakıldığında, i-uPKH'lerin, akım sitometrik ölçümlerde heterojen yan dağılım (Side Scatter, SSC) sergilediği görülmüştür. uPKH'ler, oldukça yüksek SSC seviyeleri arasında dalgalanmaktadır. Literatürde, yüksek SSC gösterenlerin, düşük SSC gösterenlere göre genellikle pluripotenslik belirteçlerinin daha hâkim olduğu belirtilmektedir (277).

1998'de Thomson ve ark. (278) tarafından pluripotent kök hücreler (EKH) ilk kez tanımlandığında, hücre kültür sisteminin bileşenleri; DMEM, serum, bFGF, Glutamin, BME, fare MEF olarak tanımlanmıştır. Günümüze gelindiğinde, halen net standart yoktur çünkü kültür sistemleri laboratuvar ve proje bağımlı olarak

değişmektedir. Kültür sistemine karar verirken, elde edilen hücrelerle ne yapılacağına yanısıra, maliyet etkinliği, kullanım kolaylığı, ölçeklenebilirlik, GMP uyumu, kararlılığın artırılması, belirlenmiş/tanımlanmış olma durumu (“besiyerinin içinde neler var ve çalışmamızı nasıl etkileyecek?” soruları açısından) düşünülmesi gereken diğer parametrelerdir. Örneğin, besiyeri konusundaki güncel ilgi odaklarını düşündüğümüzde, günlük yerine esnek besleme periyoduna izin veren besiyeri (flex) tercih edilmeye başlandığı görülmektedir. Bu besiyeri rahat program yapma ve düşük maliyet gibi avantajlar sunarken bu süreçteki çevresel değişiklikler ve etkiler endişe vermektedir. Çünkü bu besiyerlerinde kararlı ya da yavaş yavaş salınan FGF kullanılmakta ve böylece belirli günleri kapsayan bir program yapılarak haftada beslenme sayısı azaltılmaktadır. Besiyeri her gün değiştirilmediğinde atıklar birikerek kültürün asidifiye olmasına neden olmaktadır. 2016 yılında Jacobs ve arkadaşları (279) tarafından yapılan yayında, hücrelerin saldırdığı laktik asitin oluşturduğu asiditenin doğrudan genomik kararsızlığın nedeni olduğu vurgulanmıştır. Laboratuvarımızda flex besiyeri ile yaptığımız ön çalışmalarda, düzgün koloni morfolojileri ve hızlı üretim avantajları hissedilmiş ancak metabolik parametreler standart kültür koşullarında elde edilen bulgulardan farklılık göstermiştir. Ayrıca yüzey belirteci değerlendirmelerinde, ileri pasaj uPKH’lerdeki Oct4 düşüklüğü, hücrelerin farklılaşmaya yöneldiğini düşündürürken, deneylerimizde test edilen uPKH’lerin p20’lere kadar E8 besiyeri ile beslenmiş olması durumunun da göz önünde bulundurulması gerektiğini hatırlatmıştır.

Elde edilen metabolik/mitokondriyal bulgular doğrultusunda yapılacak ileri araştırmalarda, glikoz metabolizması ile ilişkili gen ifadelerine bakılması, glikolizin ilk aşamasında hız kısıtlayıcı enzim olan heksokinaz ifadesi ve glikoliz-TCA arasındaki ilişki hakkında fikir vermek üzere pirüvat dehidrojenaz enzim kompleksinin incelenmesi, ayrıca oksijen tüketim hızı, intraselüler ATP, laktat üretimi ve düzenleyici enzim düzeylerinin belirlenmesi ile programlanmanın farklı aşamalarının metabolizmalarına yönelik detaylı çalışmalar planlanabilecektir (257).

Değerlendirilen tüm çalışmalarımız için belirtmek gerekir ki, söz konusu *in vitro* metabolik parametreler olduğunda, hücrelerin doğal/*in vivo* metabolizmasını etkileyebilecek tüm faktörlerin dikkatle değerlendirilmesi gerekmektedir. Metabolik

parametreler dinamikdir. Örneğin, uPKH'ler özelinde, bizim çalışmamıza yönelik düşünüldüğünde, dondurulmuş hücreleri çözme aşamasında kullanılan ROCK inhibitörünün, kök hücre fenotipinin korunmasını sağlarken metabolizma üzerindeki etkilerinin henüz tam olarak bilinmiyor ve araştırılıyor olduğu unutulmamalıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmacılar arasında alış verişi yapılan hücre hatları, laboratuvarlar arası işbirliğini sağlayan, bir çeşit geleneksel-bilimsel para birimi olarak kabul edilebilir. Bankacılıkta hücre işlemlerindeki teknik zorluk ve yüksek maliyet (örneğin, bankacılık için tüm personel, tesisler, ürün ile kalite ve karakterizasyon testleri ve genel masraflar hesaba katıldığında, araştırma amaçlı bankalamaya yönelik bir hücre hattı için gerekli bütçe 60 bin pound ve klinik amaçlı banka için bir hücre hattının maliyeti 1 milyon pounda tekabül etmektedir) düşünüldüğünde, sürdürülebilirlik için devamlı kurumsal bir sübvansiyon gereksinimi ortadadır (189). Maddi anlamda kendi kendini destekleyen uPKH bankacılığını gerçekleştirmek için hücre kültüründe verimlilik artışına yönelik ileri teknolojiler başta olmak üzere önemli gelişmeler gerekmektedir. Sonuçta, araştırma ve ilaç geliştirme için ciddi bir girdi sağlayacak olan uPKH kaynaklarının en iyi şekilde kullanılması ve kök hücre bankacılığı alanında şimdiye kadar geliştirilen deneyim ve uzmanlığa dayanarak uPKH alanında da ortak standartların oluşturulması yönünde çağrılar açılmaya devam etmektedir.

İşletmeci/endüstriyel bakış açısı katılmış, kök hücre bilgi ve araştırma tecrübesiyle hazırlanmış, alanında ilk olan bu tez çalışmasıyla;

- Dünyada hem bilimsel hem endüstriyel alanda önemi artan ve ülkemizde oluşturulması gereksinim olarak görülen uPKH bankasına yönelik önemli bir bilgi birikimi edinilmiştir.
- Ülkemizde henüz bulunmayan bir uPKH bankası için belirlenmeye çalışılan gereksinimler doğrultusunda literatür, standart, rehber ve örnek incelemeleri sonucunda örnek bir sistem modeli için bilimsel ve yazınsal araştırmaya dayalı bileşenler önerilmiştir.
- Tıbbın en güncel ve en iddialı alanlarından olan ve gelişmiş ülkelerde yeni başlatılmakta olan uPKH bankacılığı alanında, ülkemizin eş zamanlı olarak var olması için, bu alana yönelik gereksinimlerin ülkemizdeki yasal düzenlemeler ve yönetmeliklerle uyumluluğu da değerlendirilmiş ve gereken değişikliklerin yapılması konusunda ilgili kamu birimleri ile iletişim kurulmuştur.

- Deneysel bulgular;
 - YP sürecinde standart koşullarda ve üç günde bir besleme yapılarak oluşturulan olumsuz koşullarda, metabolik aktivite hakkında önemli fikir veren mitokondriyal parametrelerin yararlı olduğunu, bunlar arasında özellikle ROS ifade düzeylerinin hücrelerin pluripotentiğe gidiş veya pluripotentiğe durumu ile azaldığını, bu durumun azalmış mitokondri aktivitesini yansıtabileceğini göstermiştir.
 - Erken ve geç pasajların karşılaştırılmasında, pluripotent özelliklerin belirginleştiği geç pasajlarda, ROS ifade düzeylerinin daha belirgin olmak üzere mitokondri yoğunluğunun azaldığını, ALDH düzeylerinde ise farklı örneklerde değişken sonuçlar elde edildiğini göstermiştir.
 - Ayrıca, dünyada birçok araştırmacı tarafından kullanıldığı bilirse de ulusal uPKH bankasında kullanım için tercih edilmeden önce Flex besiyeri ile beslenen hücrelerle yapılan değerlendirmelere yönelik test tekrarlarının artırılmasının fayda sağlayacağı sonucuna ulaşılmıştır (tez çalışmaları kapsamında değerlendirilen çalışmalar, yalnızca numune olarak sunulan sınırlı miktardaki besiyeri ile yapılabilmektedir).

Sonuçlar, metabolik/mitokondriyal parametrelerin bankalama sürecinde uPKH'ler ile ilgili kalite konularında erken ve kolay tespitte yönelik uygun bir yaklaşım olabileceği ön görüşümü destekleyici açıdan olumlu bulunmuştur. Hücre ROS ifadelerindeki değişiklikleri yansıtmak üzere hücre kültür supernatantlarında, ileride kurulabilecek otomatize sistemde kullanım için de pratik olabilecek ROS ölçümleri ile uPKH kültürlerinin sık ve yakın takibi yapılarak kalitesi hakkında fikir edinilebileceği düşünülmüştür.

Öneriler / Devam Eden ve Gelecek Çalışmalar

Edinilen kazanımlarla devam edilecek/planlanan ileri çalışmalar:

- Ankara Kalkınma Ajansı tarafından kabul edilmiş/desteklenecek mproje kapsamında, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Bankası (uPKÖK)

oluşturulmasına yönelik fizibilite çalışması yapılacaktır (Onaylanmış 1 yıllık proje - sözleşme aşamasında).

- **Ufuk2020 - Çok Uluslu Araştırma ve İnovasyon İş Birliği kapsamında - Nörodejeneratif Hastalık Araştırmaları Ortak Programı (JPND) “Nörodejeneratif Hastalıklar için Kişiselleştirilmiş Tıp Araştırmaları” başlıklı JPCOFUND-2 ERA-NET Cofund 2019 Projesi için Widening Programı- “NMS on a Chip” projesinde konsorsiyum ortağı olunan projede, araştırma amaçlı uPKH Banka kalitesinde hücre üretimi yapılacaktır. Proje ile edinilmesi beklenen tecrübenin uPKH bankacılığının uluslararası açılımı yönünden önemi büyüktür.**
- **COST Proje Başvuruları (Ekim 2020’de revize başvurular yapılacaktır).**
 - Amerika, Asya ve Avrupa’dan katılan 50 üyeden oluşan COREdinate ekibi ile - Proje Başlığı: “CorEuStem: The European Network for Stem Cell Core Facilities”.
 - BBMRI-ERIC kalite sorumlusunun yürütücü olduğu ekip ile - Proje Başlığı: “GSPbmr: Good Standardization Practise for Biomedical Research”.
- Ayrıca, uPKH kolonilerinin günlük mikroskopik incelemelerinden arşivlenen fotoğrafların derlenerek uPKH Atlası niteliğinde sunulması planlanmaktadır. Benzeri bir çalışma, Dr. Lyn Healy ve ekibi tarafından hazırlanmıştır (280).

COVID-19 pandemisi ile savaşılan ve ilaç/aşı araştırmalarının kritik öneme sahip olduğu, içinde bulunduğumuz bu zorlu günlerde, özellikle ilaç araştırma bulgularının test edilmesine yönelik model olarak sunulacak kaliteli uPKH hatlarının sürece katkı sağlayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Yaşadığımız süreç, uPKH’lerin keşif hikâyesini Dr. Yamanaka’dan dinlediğimde kurduğum cümlemi yeniden hatırlattı; **“Zaruretler keşif doğurur!”**

7. KAYNAKLAR

1. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009;137(1):13-7.
2. Huang CY, Liu CL, Ting CY, Chiu YT, Cheng YC, Nicholson MW, et al. Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):87.
3. Luong MX, Smith KP, Crook JM, Stacey G. Biobanks for Pluripotent Stem Cells. *Human Stem Cell Manual*2012. p. 105-25.
4. Bayart E, Cohen-Haguenaer O. Technological overview of iPSC induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther*. 2013;13(2):73-92.
5. Rao MS, Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(10):3061-8.
6. Hübscher D, Rebs S, Haupt L, Borchert T, Guessoum CI, Treu F, et al. A High-Throughput Method as a Diagnostic Tool for HIV Detection in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Generated by Different Reprogramming Methods. *Stem cells international*. 2019;2019.
7. iscbi.org [Internet]. UK: International Stem Cell Banking Initiative (ISCB) [2019; cited 14.06.2020]. Available from: <https://www.iscbi.org/>.
8. hPSCreg.eu [Internet]. The Human Pluripotent Stem Cell Registry (hPSCreg), [2007; 11.05.2020]. <https://hpscereg.eu/>
9. Ntai A, Baronchelli S, La Spada A, Moles A, Guffanti A, De Blasio P, et al. A Review of Research-Grade Human Induced Pluripotent Stem Cells Qualification and Biobanking Processes. *Biopreserv Biobank*. 2017;15(4):384-92.
10. Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res*. 2012;22(1):168-77.
11. Park SJ, Lee SA, Prasain N, Bae D, Kang H, Ha T, et al. Metabolome Profiling of Partial and Fully Reprogrammed Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2017;26(10):734-42.
12. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2004;18(6):827-42.
13. Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5(11):873-8.
14. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull*. 2011;98:117-26.
15. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.

16. Menon S, Shailendra S, Renda A, Longaker M, Quarto N. An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1).
17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
18. Williams LA, Davis-Dusenbery BN, Eggan KC. SnapShot: directed differentiation of pluripotent stem cells. *Cell.* 2012;149(5):1174- e1.
19. International Stem Cell Banking I. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev.* 2009;5(4):301-14.
20. Vellón L, Martín AG. Stem Cell Biobanks for Research. *Dilemata.* 2011(7):1-16.
21. Ilic D, Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells.* 2017;35(1):17-25.
22. Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: fraternal or identical twins? *Mol Ther.* 2011;19(4):635-8.
23. Daniels BR, Hale CM, Khatau SB, Kusuma S, Dobrowsky TM, Gerecht S, et al. Differences in the microrheology of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biophys J.* 2010;99(11):3563-70.
24. El Hokayem J, Cukier HN, Dykxhoorn DM. Blood Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, Challenges and the Road Ahead. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2016;6(5).
25. Efthymiou AG, Rao M, Lowenthal J. Banking of Pluripotent Stem Cells: Issues and Opportunities from the NIH Perspective. *Stem Cell Banking. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine* 2014. p. 77-93.
26. nobelprize.org [Internet]. The Nobel Foundation. The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2012. [12.04.2020]. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/press-release/>.
27. Shi Y. Induced pluripotent stem cells, new tools for drug discovery and new hope for stem cell therapies. *Curr Mol Pharmacol.* 2009;2(1):15-8.
28. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J.* 2014;33(5):409-17.
29. Cossu G, Birchall M, Brown T, De Coppi P, Culme-Seymour E, Gibbon S, et al. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. *Lancet.* 2018;391(10123):883-910.
30. Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(3):170-82.

31. Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.* 2015;95(1):4-13.
32. Taylor CJ, Bolton EM, Bradley JA. Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366(1575):2312-22.
33. Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell.* 2012;11(2):147-52.
34. Redekop WK, Mladsi D. The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. *Value Health.* 2013;16(6 Suppl):S4-9.
35. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin. *Science.* 2007;318(5858):1920-3.
36. Ilic D, Polak J. Stem cell based therapy--where are we going? *Lancet.* 2012;379(9819):877-8.
37. Garber K. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):890-1.
38. Kimbrel EA, Lanza R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(10):681-92.
39. the-scientist.com [Internet]. Media Group, USA. Increasing Number of iPSC Cell Therapies Tested in Clinical Trials. [28.11.2018; 07.06.2020]. <https://www.the-scientist.com/news-opinion/increasing-number-of-ips-cell-therapies-in-clinical-trials--65150>.
40. Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, et al. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports.* 2014;2(3):337-50.
41. the-scientist.com [Internet]. Media Group, USA. Japan Approves iPSC Cell Therapy Trial for Spinal Cord Injury. [18.02.2019; 09.06.2020]. <https://www.the-scientist.com/news-opinion/japan-approves-ips-cell-therapy-trial-for-spinal-cord-injury-65484>.
42. Cyranoski D. Woman is first to receive cornea made from “reprogrammed” stem cells. *Nature.* 2019.
43. Ishida M, Miyagawa S, Saito A, Fukushima S, Harada A, Ito E, et al. Transplantation of Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Is Superior to Somatic Stem Cell Therapy for Restoring Cardiac Function and Oxygen Consumption in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Transplantation.* 2019;103(2):291-8.
44. Tsuji O, Sugai K, Yamaguchi R, Tashiro S, Nagoshi N, Kohyama J, et al. Concise Review: Laying the Groundwork for a First-In-Human Study of an

- Induced Pluripotent Stem Cell-Based Intervention for Spinal Cord Injury. *Stem Cells*. 2019;37(1):6-13.
45. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013;499(7459):481-4.
 46. Kondo Y, Toyoda T, Inagaki N, Osafune K. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *J Diabetes Investig*. 2018;9(2):234-43.
 47. Mochida T, Ueno H, Yamazoe N, Hiyoshi H, Ito R, Matsumoto H, et al. Insulin-Deficient Diabetic Condition Upregulates Insulin Secreting Capacity of Human iPSC-Derived Pancreatic Endocrine Progenitor Cells After Implantation in Mice. *Diabetes*. 2020.
 48. Rim YA, Park N, Nam Y, Ju JH. Generation of induced-pluripotent stem cells using fibroblast-like synoviocytes isolated from joints of rheumatoid arthritis patients. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2016(116):e54072.
 49. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res*. 2014;24(9):1526-33.
 50. Yamanaka S, Takahashi K, Francisco S., editors. *The Stem-Cell Revolution Is Coming - Slowly*. The New York Times; 2017 [19.04.2020]. <https://mobile.nytimes.com/2017/01/16/science/shinya-yamanaka-stem-cells.html>.
 51. Kimbrel EA, Lanza R. Pluripotent stem cells: the last 10 years. *Regen Med*. 2016;11(8):831-47.
 52. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5856-61.
 53. Passier R, Orlova V, Mummery C. Complex Tissue and Disease Modeling using hiPSCs. *Cell Stem Cell*. 2016;18(3):309-21.
 54. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature cell biology*. 2016;18(3):246-54.
 55. Wiegand C, Banerjee I. Recent advances in the applications of iPSC technology. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;60:250-8.
 56. Kim HS, Bernitz JM, Lee DF, Lemischka IR. Genomic editing tools to model human diseases with isogenic pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014;23(22):2673-86.
 57. Morrison M. Making Cells Worthwhile: Calculations of Value in a European Consortium for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. *Science as Culture*. 2018;28(1):46-69.
 58. Suh W. A new era of disease modeling and drug discovery using induced pluripotent stem cells. *Archives of pharmacal research*. 2017;40(1):1-12.

59. Balkan A, Balkan M. Hayvan Çalışmalarında Etik, Laboratuvar Standardizasyonu ve Hayvan Bakımı ile İlgili Yasal Zorunluluklar/Legal Requirements Involving Ethics in Animal Research, Laboratory Standardisation, and Animal Care. *Turk Toraks Dergisi*. 2013;14:6.
60. Pistollato F, Bremer-Hoffmann S, Healy L, Young L, Stacey G. Standardization of pluripotent stem cell cultures for toxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(2):239-57.
61. Schmitt S, Kynast K, Schirmacher P, Herpel E. Challenges for quality management in implementation, maintenance, and sustainability of research tissue biobanks. *Virchows Arch*. 2016;468(1):93-9.
62. European Commission. Embryonic Stem cell-based Novel Alternative Testing Strategies (ESNATS). [Internet]. 2014 [14.06.2020]. <https://cordis.europa.eu/project/id/201619/reporting>.
63. UK Research and Innovation. Stem Cells for Safer Medicine. [Internet]. 2014 [14.06.2020]. <https://gtr.ukri.org/projects?ref=100607>.
64. European Commission. Stem Cells for Relevant Efficient Extended and Normalized Toxicology (SCR&TOX). [Internet]. 2019 [14.06.2020]. <https://cordis.europa.eu/project/id/266753>.
65. European Commission. Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT-1). [Internet]. 2013 [14.06.2020]. <http://www.seurat-1.eu/>.
66. Hamazaki T, El Rouby N, Fredette NC, Santostefano KE, Terada N. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cell Research in the Era of Precision Medicine. *Stem Cells*. 2017;35(3):545-50.
67. Focosi D, Pistello M. Effect of Induced Pluripotent Stem Cell Technology in Blood Banking. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):269-74.
68. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1038-46.
69. Tobita M, Konomi K, Torashima Y, Kimura K, Taoka M, Kaminota M. Japan's challenges of translational regenerative medicine: Act on the safety of regenerative medicine. *Regen Ther*. 2016;4:78-81.
70. RIKEN Center for Developmental Biology [Internet]. "First donor iPSC-derived RPE cell transplantation in AMD patient". [04.04.2017;12.05.2020]. http://www.cdb.riken.jp/en/wp-content/uploads/sites/2/2017/07/pdfnews_170404_2rev.pdf
71. The Japan Times Online [Internet]. First serious adverse reaction to iPSC-derived retinal cell transplant reported [17 January 2018; 12.06.2020] <https://www.japantimes.co.jp/news/2018/01/17/national/science-health/first-serious-reaction-ips-derived-retinal-cell-transplant-reported-kobe/#.XuceqkUzY2w>.

72. Akabayashi A, Nakazawa E, Jecker NS. The world's first clinical trial for an aplastic anemia patient with thrombocytopenia administering platelets generated from autologous iPSC cells. *Int J Hematol.* 2019;109(2):239-40.
73. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci.* 2018;15(1):36-45.
74. Nagoshi N, Tsuji O, Nakamura M, Okano H. Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells. *Regenerative therapy.* 2019;11:75-80.
75. clinicaltrials.gov. [Internet] iPSC, [2020; 12.06.2020] <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=ipsc&cntry=&state=&city=&dist=>
76. 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(5):861-72.
77. Aasen T, Izpisua Belmonte JC. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2010;5(2):371-82.
78. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science.* 2008;321(5889):699-702.
79. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1276-84.
80. Raab S, Klingenstein M, Liebau S, Linta L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* 2014;2014:768391.
81. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2010;7(1):64-77.
82. Drozd AM, Walczak MP, Piaskowski S, Stoczynska-Fidelus E, Rieske P, Grzela DP. Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:122.
83. Vuoristo S, Virtanen I, Takkunen M, Palgi J, Kikkawa Y, Rousselle P, et al. Laminin isoforms in human embryonic stem cells: synthesis, receptor usage and growth support. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2622-33.
84. Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, Van Den Brink S, Van Laake L, et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via $\alpha V\beta 5$ integrin. *Stem cells.* 2008;26(9):2257-65.

85. Healy L, Young L, Stacey GN. Stem cell banks: preserving cell lines, maintaining genetic integrity, and advancing research. *Methods Mol Biol.* 2011;767:15-27.
86. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008;451(7175):141-6.
87. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):101-6.
88. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell.* 2008;2(1):10-2.
89. Valamehr B, Abujarour R, Robinson M, Le T, Robbins D, Shoemaker D, et al. A novel platform to enable the high-throughput derivation and characterization of feeder-free human iPSCs. *Sci Rep.* 2012;2:213.
90. 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(5858):1917-20.
91. Verma RS. Recent Advances in Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) based Therapeutics. *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics.* 2017;3(3).
92. Kato A, Sakai Y, Shioda T, Kondo T, Nakanishi M, Nagai Y. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells.* 1996;1(6):569-79.
93. 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. *Proceedings of the Japan Academy, Series B.* 2009;85(8):348-62.
94. Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, et al. Comparison between Sendai virus and adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol.* 2008;80(3):373-82.
95. Malik N, Rao MS. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol.* 2013;997:23-33.
96. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1269-75.
97. Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.* 2009;6(11):805-8.
98. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell.* 2009;5(5):491-503.

99. Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(1):71-9.
100. Noggle S, Fung HL, Gore A, Martinez H, Satriani KC, Prosser R, et al. Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*. 2011;478(7367):70-5.
101. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):651-5.
102. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):150-61.
103. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(3):237-41.
104. Millman JR, Tan JH, Colton CK. The effects of low oxygen on self-renewal and differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14(6):694-700.
105. Lin K, Xiao AZ. Quality control towards the application of induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;46:164-9.
106. Adler S, Allsopp, T., Bremer, S., Buzanska, L., Drake, R., Frandsen, U., ... & Healy, L. . hESC Technology for Toxicology and Drug Development: Summary of Current Status and Recommendations for Best Practice and Standardization. The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. 2007.
107. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(14):8012-7.
108. Diaferia GR, Cardano M, Cattaneo M, Spinelli CC, Dessi SS, DeBlasio P, et al. The science of stem cell biobanking: investing in the future. *J Cell Physiol*. 2012;227(1):14-9.
109. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Narva E, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 2011;471(7336):58-62.
110. Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):63-7.
111. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(6):595-605.
112. Ellis J, Bruneau BG, Keller G, Lemischka IR, Nagy A, Rossant J, et al. Alternative induced pluripotent stem cell characterization criteria for in vitro applications. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):198-9; author reply 202.

113. Rosner M, Schipany K, Hengstschläger M. The decision on the “optimal” human pluripotent stem cell. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(5):553-9.
114. Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat*. 2002;200(Pt 3):249-58.
115. Andrews PW, Baker D, Benvenisty N, Miranda B, Bruce K, Brustle O, et al. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI). *Regen Med*. 2015;10(2 Suppl):1-44.
116. Pamies D, Bal-Price A, Simeonov A, Tagle D, Allen D, Gerhold D, et al. Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models. *ALTEX*. 2017;34(1):95-132.
117. Katkov, II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, et al. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2006;53(2):194-205.
118. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem cells*. 2006;24(11):2549-56.
119. Holm F, Strom S, Inzunza J, Baker D, Stromberg AM, Rozell B, et al. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1271-9.
120. The California Institute for Regenerative Medicine (CIRM). Human iPS Cell Banking Workshop. 2010.
121. Lisowski P, Kannan P, Mlody B, Prigione A. Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. *EMBO Rep*. 2018;19(5).
122. Folmes CD, Nelson TJ, Terzic A. Energy metabolism in nuclear reprogramming. *Biomark Med*. 2011;5(6):715-29.
123. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(4):243-56.
124. Melton D. ‘Stemness’: definitions, criteria, and standards. *Essentials of stem cell biology*: Elsevier; 2014. p. 7-17.
125. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab*. 2013;18(3):325-32.
126. Chan EM, Ratanasirintrao S, Park IH, Manos PD, Loh YH, Huo H, et al. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(11):1033-7.
127. Lee MR, Prasain N, Chae HD, Kim YJ, Mantel C, Yoder MC, et al. Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes

- induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells*. 2013;31(4):666-81.
128. Teslaa T, Teitell MA. Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *EMBO J*. 2015;34(2):138-53.
129. Negoro T, Okura H, Matsuyama A. Induced Pluripotent Stem Cells: Global Research Trends. *Biores Open Access*. 2017;6(1):63-73.
130. Morita Y, Okura H, Matsuyama A. Patent Application Trends of Induced Pluripotent Stem Cell Technologies in the United States, Japanese, and European Applications. *Biores Open Access*. 2019;8(1):45-58.
131. Moradi S, Mahdizadeh H, Saric T, Kim J, Harati J, Shahsavarani H, et al. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):341.
132. Haridhasapavalan KK, Raina K, Dey C, Adhikari P, Thummer RP. An Insight into Reprogramming Barriers to iPSC Generation. *Stem cell reviews and reports*. 2020;16(1):56-81.
133. McKernan R, Watt FM. What is the point of large-scale collections of human induced pluripotent stem cells? *Nat Biotechnol*. 2013;31(10):875-7.
134. Steichen C, Hannoun Z, Luce E, Hauet T, Dubart-Kupperschmitt A. Genomic integrity of human induced pluripotent stem cells: Reprogramming, differentiation and applications. *World J Stem Cells*. 2019;11(10):729-47.
135. Zhong B, Watts KL, Gori JL, Wohlfahrt ME, Enssle J, Adair JE, et al. Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes. *Mol Ther*. 2011;19(9):1667-75.
136. International Stem Cell I, Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011;29(12):1132-44.
137. Bai Q, Ramirez JM, Becker F, Pantesco V, Lavabre-Bertrand T, Hovatta O, et al. Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2015;24(5):653-62.
138. Diaferia GR, Conti L, Redaelli S, Cattaneo M, Mutti C, DeBlasio P, et al. Systematic chromosomal analysis of cultured mouse neural stem cell lines. *Stem Cells Dev*. 2011;20(8):1411-23.
139. Bai H, Chen K, Gao YX, Arzigian M, Xie YL, Malcosky C, et al. Bcl-xL enhances single-cell survival and expansion of human embryonic stem cells without affecting self-renewal. *Stem Cell Res*. 2012;8(1):26-37.
140. Kaindl J, Meiser I, Majer J, Sommer A, Krach F, Katsen-Globa A, et al. Zooming in on Cryopreservation of hiPSCs and Neural Derivatives: A Dual-Center Study Using Adherent Vitrification. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(3):247-59.

141. Chen KG, Mallon BS, McKay RD, Robey PG. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2014;14(1):13-26.
142. Stewart MH, Bosse M, Chadwick K, Menendez P, Bendall SC, Bhatia M. Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment. *Nat Methods*. 2006;3(10):807-15.
143. Serra M, Brito C, Correia C, Alves PM. Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends Biotechnol*. 2012;30(6):350-9.
144. Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell*. 2013;13(2):149-59.
145. Malchenko S, Galat V, Seftor EA, Vanin EF, Costa FF, Seftor RE, et al. Cancer hallmarks in induced pluripotent cells: new insights. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):390-3.
146. Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature medicine*. 2013;19(8):998.
147. Doss MX, Sachinidis A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*. 2019;8(5).
148. Azuma K, Yamanaka S. Recent policies that support clinical application of induced pluripotent stem cell-based regenerative therapies. *Regen Ther*. 2016;4:36-47.
149. Belmonte JCI, Ellis J, Hochedlinger K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells and reprogramming: seeing the science through the hype. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(12):878-83.
150. Müller H, Dagher G, Loibner M, Stumptner C, Kungl P, Zatloukal K. Biobanks for life sciences and personalized medicine: importance of standardization, biosafety, biosecurity, and data management. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;65:45-51.
151. Kinkorova J. Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation: Overview. *EPMA J*. 2015;7:4.
152. Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biol*. 2015;13(6):e1002165.
153. Lippi G, Betsou F, Cadamuro J, Cornes M, Fleischhacker M, Fruekilde P, et al. Preanalytical challenges - time for solutions. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(7):974-81.
154. Stacey G. 15 Fundamental Issues for Cell-Line Banks in Biotechnology and Regulatory Affairs. 2004.
155. iclac.org. [Internet]. Database. International Cell Line Authentication Committee (ICLAC). [2019; 04.05.2020]. <http://iclac.org>.
156. Haslacher H, Bayer M, Fiegl H, Gerner M, Hofer P, Korb M, et al. Quality management at the national biobanking level - establishing a culture of

- mutual trust and support: the BBMRI.at example. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(12):e301-e5.
157. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH Topic Q5D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. 1998.
 158. Central Drug Standard Control Organization (CDSCO). Guidance Document No. Stem Cell And Cell Based Products (SCCPs)/SPS/2013-001 Version: 004, Dec 30th 2013, India, Ministry Of Health & Family Welfare, GoI.
 159. Knezevic I, Stacey G, Petricciani J, Sheets R, Substrates WHOSGoC. Evaluation of cell substrates for the production of biologicals: Revision of WHO recommendations. Report of the WHO Study Group on Cell Substrates for the Production of Biologicals, 22-23 April 2009, Bethesda, USA. *Biologicals*. 2010;38(1):162-9.
 160. Healy LE, Ludwig TE, Choo A. International banking: checks, deposits, and withdrawals. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):305-6.
 161. Parks A. , Editor. 10 ideas changing the world right now [Internet]. *TIME*. [12.03.2009; 13.03.2020]. http://content.time.com/time/specials/packages/article/0,28804,1884779_1884782_1884766,00.html.
 162. Zika E, Paci D, Braun A, RijKers-Defrasne S, Deschênes M, Fortier I, et al. Biobanks in Europe: prospects for harmonisation and networking. Joint Research Centre (Seville site); 2010.
 163. bionique.com [Internet]. Bionique® Testing Laboratories, Inc., Creating a certified working cell bank for important cell lines in your research program [11.10.2019]. <https://www.bionique.com/mycoplasma-resources/technical-articles/certified-working-cell-bank.html>.
 164. Von Versen R, Monig HJ, Salai M, Bettin D. Quality issues in tissue banking: quality management systems - a review. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(3):181-92.
 165. Simeon-Dubach D, Zeisberger SM, Hoerstrup SP. Quality Assurance in Biobanking for Pre-Clinical Research. *Transfus Med Hemother*. 2016;43(5):353-7.
 166. Thailand Bioresource Research Center (TBRC),. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), NSTDA, Thailand. [6th Feb, 2018; 04.12.2019]. [http://nvi.go.th/index.php/files/large/49cbb7cbfd1dfb0, .](http://nvi.go.th/index.php/files/large/49cbb7cbfd1dfb0,)
 167. Ranasinghe S, Pichler H, Eder J. Report on Data Quality in Biobanks: Problems, Issues, State-of-the-Art. arXiv preprint arXiv:181210423. 2018.
 168. Davis E, Hampson K, Bray C, Dixon K, Ollier W, Yuille M. Selection and Implementation of the ISO9001 Standard to Support Biobanking Research Infrastructure Development. *Biopreserv Biobank*. 2012;10(2):162-7.
 169. Organization WH. Laboratory quality management system: handbook: World Health Organization; 2011.

170. Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *Altern Lab Anim.* 2004;32(5):467-72.
171. iso.org. [Internet]. International Organization for Standardization (ISO), [2020; 10.08.2018], <https://www.iso.org/about-us.html>.
172. Martins A, Lima N, Sampaio P. A standard proposal for biological resources centres. *International Journal of Quality & Reliability Management.* 2017;34(2):147-62.
173. ISO I. 20387: 2018 Biotechnology, Biobanking, General Requirements for Biobanking. Geneva: International Organization for Standardization. 2018.
174. Carter A, Betsou F. Quality assurance in cancer biobanking. *Biopreserv Biobank.* 2011;9(2):157-63.
175. Grizzle WE, Gunter EW, Sexton KC, Bell WC. Quality management of biorepositories. *Biopreserv Biobank.* 2015;13(3):183-94.
176. Ozerskaya S. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers. OECD, 2007, 115 p. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2008;44(5):559-60.
177. Campbell LD, Betsou F, Garcia DL, Giri JG, Pitt KE, Pugh RS, et al. Development of the ISBER best practices for repositories: Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. *Biopreservation and biobanking.* 2012;10(2):232-3.
178. Biological ISf, Repositories E. Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. *Cell Preservation Technology.* 2008;6(1):3-58.
179. Campbell LD, Astrin JJ, DeSouza Y, Giri J, Patel AA, Rawley-Payne M, et al. The 2018 revision of the ISBER best practices: summary of changes and the editorial team's development process. *Biopreservation and biobanking.* 2018;16(1):3-6.
180. Betsou F, Sobel ME. The ISBER Biorepository proficiency testing program: two successful years already, and new features to come. *Biopreserv Biobank.* 2013;11(4):255-6.
181. European Marine Biological Research Infrastructure Cluster (EMBRIC). Bosschaerts Marleen, Belgian Federal Science Policy Office. EMBRIC General Assembly on 11-14 September 2017. The future ISO standard for management systems and quality of biobanks. [Internet]. 2017 [02.12.2019]. http://www.embric.eu/sites/default/files/5_MarleenBosschaertsNew%20bio%20bank%20standard.pdf.
182. Food&Drug Administration. Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations. [Internet]. 2018 [11.06.2020]. <https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations>.
183. Food&Drug Administration. Nonclinical Laboratories Inspected under Good Laboratory Practices. [Internet]. 2020 [11.06.2020].

<https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-references/nonclinical-laboratories-inspected-under-good-laboratory-practices>.

184. Erbilgin, Y., İşeri U., S. A. , Khodhzaev, K., & Haryanyan, G., (2016). Biyobankamada Protokol ve Kalite Kılavuzu . İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
185. Tuncer, F. N. , (2017). Biyobankamada Etik Unsurlar. Biyobankalarda Etik ve Yasal Düzenlemeler Kılavuzu (pp.1-11), İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri.
186. Hacettepe Üniversitesi Biyoetik Merkezi (HÜBAM) ve Biyolojik Kaynak Bankası ve Genombilim Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜBİGEM). Araştırma Biyobankacılığı Etik Rehberi. [Internet], 2014, [19.05.2020]http://www.hugen.hacettepe.edu.tr/etk_biyobankaciliketikrehberi.pdf.
187. International Organization for Standardization. ISO 20387:2018 Biotechnology – Biobanking – general requirements for biobanking. Geneva: ISO; 2018.
188. Webster A, Eriksson L. Governance-by-standards in the field of stem cells: managing uncertainty in the world of “basic innovation”. *New genetics and society*. 2008;27(2):99-111.
189. Stacey G. Stem Cell Banking: A Global View. *Methods Mol Biol*. 2017;1590:3-10.
190. Meskus M. *Craft in Biomedical Research: The iPS Cell Technology and the Future of Stem Cell Science*: Springer; 2018.
191. Ekerdt BL, Fuentes CM, Lei Y, Adil MM, Ramasubramanian A, Segalman RA, et al. Thermoreversible Hyaluronic Acid-PNIPAAm Hydrogel Systems for 3D Stem Cell Culture. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(12):e1800225.
192. Isenet biobanking.com [Internet]. Italy. Quality of stem cell lines for scientific research. [2020; 25.11.2019]. <https://www.isenetbiobanking.com/stem-cell-services/quality-stem-cell-lines-scientific-research#content>.
193. International Cell Line Authentication Committee (ICLAC). Guide to Human Cell Line Authentication. [Internet] 2014 [22.06.2020]. https://iclac.org/wp-content/uploads/Authentication-SOP_09-Jan-2014.pdf.
194. Ali S, Mahmood A. Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures common contaminants detection and elimination. *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*. 2017;2(2).
195. Papp B, Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res*. 2011;21(3):486-501.
196. Lund RJ, Narva E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):732-44.

197. RegMednet.net [Internet]. UKSCB. Release of Human Embryonic Stem Cell Lines Suitable for the Manufacture of Advanced Therapies. [March 2,2017; 31.12.2019] <https://www.regmednet.com/users/33275-uk-stem-cell-bank/posts/15348-release-of-human-embryonic-stem-cell-lines-suitable-for-the-manufacture-of-advanced-therapies>.
198. O'Rourke PP, Abelman M, Heffernan KG. Centralized banks for human embryonic stem cells: a worthwhile challenge. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):307-12.
199. Stem-cell-forum.org [Internet]. International Stem Cell Forum (ISCF). [2010; 01.05.2020]. <https://stemcellforum.org/>. ISCF.
200. isscr.org [Internet]. International Society for Stem Cell Research (ISSCR). [2019; 01.05.2020]. www.isscr.org.
201. Bell J, Bordag N, Borry P, Bovenberg J, Dagher G, Grewal J, et al. Governing Stem Cells: Regenerative Medicine in Europe-The Vision and Recommendations From the EUCeLLEX Project. 2018.
202. McKernan R, Watt FM. What is the point of large-scale collections of human induced pluripotent stem cells? *Nature biotechnology*. 2013;31(10):875.
203. Morrison M. Infrastructural expectations: exploring the promise of international large-scale induced pluripotent stem cell banks. *New Genetics and Society*. 2017;36(1):66-83.
204. stemdb.org. [Internet]. Stem Database, StemDB, [01.05.2020]. <http://www.stemdb.org/>
205. cells.ebisc.org [Internet]. EBISC. iPSC Cell Line Catalog. [2020; 23.10.2019] <https://cells.ebisc.org>.
206. Okur FV, Cevher I, Ozdemir C, Kocaeve C, Cetinkaya DU. Osteopetrotic induced pluripotent stem cells derived from patients with different disease-associated mutations by non-integrating reprogramming methods. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):211.
207. titck.gov [Internet]. TC Sağlık Bakanlığı. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). Klinik Araştırmalar Etik Kurul. [2020; 01.05.2020]. <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/84?page=7>.
208. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunda Olması Gereken Asgari Bilgiler. Versiyon: 2 [Internet]. [06.03.2017; 2020] <https://www.titck.gov.tr/duyuru/tum-klinik-arastirmatarafklarinin-dikkatine-27122018173719>.
209. tse.org [Internet]. Türk Standartları Enstitüsü. [19.03.2020; 18.06.2020]. <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/StandardAra.aspx>.
210. Kolarik WJ. *Creating quality: concepts, systems, strategies, and tools*: McGraw-Hill New York; 1995.
211. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. 2011;8(5):424-9.

212. Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*. 2014;141(22):4206-18.
213. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(2):247-54.
214. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced protocols in oxidative stress II*: Springer; 2010. p. 57-72.
215. Spence MT, Johnson ID. *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2010.
216. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of “stemness”. *Experimental hematology*. 2004;32(7):585-98.
217. Moreb JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Current stem cell research & therapy*. 2008;3(4):237-46.
218. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
219. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1021-46.
220. Braam SR, Denning C, Matsa E, Young LE, Passier R, Mummery CL. Feeder-free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1435-43.
221. Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM, Palecek SP. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Prog*. 2009;25(1):20-31.
222. Amit M, Chebath J, Margulets V, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, et al. Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2010;6(2):248-59.
223. Tsutsui H, Valamehr B, Hindoyan A, Qiao R, Ding X, Guo S, et al. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nat Commun*. 2011;2:167.
224. Chen KG, Mallon BS, Hamilton RS, Kozhich OA, Park K, Hoepfner DJ, et al. Non-colony type monolayer culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 2012;9(3):237-48.
225. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013;499(7459):481-4.
226. Avior Y, Biancotti JC, Benvenisty N. TeratoScore: Assessing the Differentiation Potential of Human Pluripotent Stem Cells by Quantitative Expression Analysis of Teratomas. *Stem Cell Reports*. 2015;4(6):967-74.

227. TeratoScore Web-Resource [Internet]. The Hebrew University of Jerusalem. [01.05.2020]. <http://benvenisty.huji.ac.il/teratoscore.php>.
228. Vaught J, Abayomi A, Peakman T, Watson P, Matzke L, Moore H. Critical issues in international biobanking. *Clin Chem*. 2014;60(11):1368-74.
229. Şahin O. İstatistiksel Proses Kontrolünde Proses Yeterlilik Analizi Ve Tekstil Sanayiinde Uygulama. *Atatürk Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*. 2013;27(2):253-71.
230. Downey P, Peakman TC. Design and implementation of a high-throughput biological sample processing facility using modern manufacturing principles. *Int J Epidemiol*. 2008;37 Suppl 1:i46-50.
231. Williams DJ, Thomas RJ, Hourd PC, Chandra A, Ratcliffe E, Liu Y, et al. Precision manufacturing for clinical-quality regenerative medicines. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2012;370(1973):3924-49.
232. Shariatzadeh M, Chandra A, Wilson SL, McCall MJ, Morizur L, Lesueur L, et al. Distributed automated manufacturing of pluripotent stem cell products. *Int J Adv Manuf Technol*. 2020;106(3):1085-103.
233. Lowenthal J, Lipnick S, Rao M, Hull SC. Specimen collection for induced pluripotent stem cell research: harmonizing the approach to informed consent. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(5):409-21.
234. McCaughey T, Chen CY, De Smit E, Rees G, Fenwick E, Kearns LS, et al. Participant understanding and recall of informed consent for induced pluripotent stem cell biobanking. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(3):449-56.
235. Lomax GP, Hull SC, Isasi R. The DISCUSS Project: Revised Points to Consider for the Derivation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines From Previously Collected Research Specimens. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(2):123-9.
236. crtnet.ca [Internet]. Canadian Tissue Repository Network (CTRNet). Standard Operating Procedures. [01.05.2020]. <https://www.crtnet.ca/resources/operating-procedures>.
237. Tan HK, Toh CX, Ma D, Yang B, Liu TM, Lu J, et al. Human finger-prick induced pluripotent stem cells facilitate the development of stem cell banking. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(5):586-98.
238. Li D, Wang L, Hou J, Shen Q, Chen Q, Wang X, et al. Optimized Approaches for Generation of Integration-free iPSCs from Human Urine-Derived Cells with Small Molecules and Autologous Feeder. *Stem Cell Reports*. 2016;6(5):717-28.
239. Rao M, Ahrlund-Richter L, Kaufman DS. Concise review: Cord blood banking, transplantation and induced pluripotent stem cell: success and opportunities. *Stem Cells*. 2012;30(1):55-60.
240. Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):58-63.

241. Avci-Adali M, Steinle H, Weber M, Behring A, Mau-Holzmann U, Wendel H, et al. Improving the Footprint-Free iPSC Generation by Nonintegrative Self-Replicating RNA-Based Reprogramming. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*. 2020;68(S 01):DGTHG-V115.
242. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(8):990-2.
243. Antosiewicz-Bourget J, Teng M, Thomson JA. Chemically defined conditions for human iPSC cell derivation and culture. *Nat Methods*. 2011;8(5):424-9.
244. Group H. Statement on Policies and Practices Governing Data and Materials Sharing and Intellectual Property in Stem Cell Science.
245. TÜBA. Ulusal Kök Hücre Politikaları Çalıştay Raporu. 2014.
246. Rim YA, Park N, Nam Y, Ham DS, Kim JW, Ha HY, et al. Recent progress of national banking project on homozygous HLA-typed induced pluripotent stem cells in South Korea. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(3):e1531-e6.
247. Prescott C. The business of exploiting induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366(1575):2323-8.
248. Secreto FJ, Li X, Smith AJ, Bruinsma ES, Perales-Clemente E, Oommen S, et al. Quantification of Etoposide Hypersensitivity: A Sensitive, Functional Method for Assessing Pluripotent Stem Cell Quality. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(10):1829-39.
249. Challenges of Ensuring Reproducibility and Rigor in hPSC Research and Realizing Their Potential in Clinical Applications. In: Technologies S, editor. *Nature Research Round Table*2019.
250. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsell-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2011;29(4):313-4.
251. Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, Afzal V, Alasoo K, Ashford S, et al. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature*. 2017;546(7658):370-5.
252. Kato R, Matsumoto M, Sasaki H, Joto R, Okada M, Ikeda Y, et al. Parametric analysis of colony morphology of non-labelled live human pluripotent stem cells for cell quality control. *Sci Rep*. 2016;6:34009.
253. Muller FJ, Schuldt BM, Williams R, Mason D, Altun G, Papapetrou EP, et al. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods*. 2011;8(4):315-7.
254. Goedde HW, Agarwal DP. Pharmacogenetics of aldehyde dehydrogenase (ALDH). *Pharmacol Ther*. 1990;45(3):345-71.
255. Perales-Clemente E, Cook AN, Evans JM, Roellinger S, Secreto F, Emmanuele V, et al. Natural underlying mtDNA heteroplasmy as a potential source of intra-person hiPSC variability. *EMBO J*. 2016;35(18):1979-90.

256. Paull D, Sevilla A, Zhou H, Hahn AK, Kim H, Napolitano C, et al. Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells. *Nat Methods*. 2015;12(9):885-92.
257. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One*. 2011;6(6):e20914.
258. Milkovic L, Cipak Gasparovic A, Cindric M, Mouthuy P-A, Zarkovic N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*. 2019;8(8):793.
259. Suhr ST, Chang EA, Tjong J, Alcasid N, Perkins GA, Goissis MD, et al. Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS One*. 2010;5(11):e14095.
260. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):111-23.
261. Lee MR, Mantel C, Lee SA, Moon SH, Broxmeyer HE. MiR-31/SDHA Axis Regulates Reprogramming Efficiency through Mitochondrial Metabolism. *Stem Cell Reports*. 2016;7(1):1-10.
262. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):589-95.
263. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*. 1927;8(6):519-30.
264. Schop D, Janssen FW, van Rijn LD, Fernandes H, Bloem RM, de Bruijn JD, et al. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(8):1877-86.
265. Shum LC, White NS, Mills BN, Bentley KL, Eliseev RA. Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev*. 2016;25(2):114-22.
266. Bukowiecki R, Adjaye J, Prigione A. Mitochondrial function in pluripotent stem cells and cellular reprogramming. *Gerontology*. 2014;60(2):174-82.
267. Menendez JA, Vellon L, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Vazquez-Martin A. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle*. 2011;10(21):3658-77.
268. Chen T, Shen L, Yu J, Wan H, Guo A, Chen J, et al. Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell*. 2011;10(5):908-11.
269. Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(4):721-33.

270. Yanes O, Clark J, Wong DM, Patti GJ, Sanchez-Ruiz A, Benton HP, et al. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol.* 2010;6(6):411-7.
271. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2010;7(1):51-63.
272. Pawlak M, Jaenisch R. De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. *Genes Dev.* 2011;25(10):1035-40.
273. Allsopp R. Telomere length and iPSC re-programming: survival of the longest. *Cell Res.* 2012;22(4):614-5.
274. Wang F, Yin Y, Ye X, Liu K, Zhu H, Wang L, et al. Molecular insights into the heterogeneity of telomere reprogramming in induced pluripotent stem cells. *Cell research.* 2012;22(4):757-68.
275. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell.* 2010;7(1):51-63.
276. Griscelli F, Féraud O, Oudrhiri N, Gobbo E, Casal I, Chomel J-C, et al. Malignant Germ Cell-Like Tumors, Expressing Ki-1 Antigen (CD30), Are Revealed during in Vivo Differentiation of Partially Reprogrammed Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *The American journal of pathology.* 2012;180(5):2084-96.
277. Ramirez J-M, Bai Q, Péquignot M, Becker F, Kassambara A, Bouin A, et al. Side scatter intensity is highly heterogeneous in undifferentiated pluripotent stem cells and predicts clonogenic self-renewal. *Stem cells and development.* 2013;22(12):1851-60.
278. 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(5391):1145-7.
279. Jacobs K, Zambelli F, Mertzaniidou A, Smolders I, Geens M, Nguyen HT, et al. Higher-Density Culture in Human Embryonic Stem Cells Results in DNA Damage and Genome Instability. *Stem Cell Reports.* 2016;6(3):330-41.
280. Healy L, Ruban L. *Atlas of Human Pluripotent Stem Cells in Culture*: Springer; 2014.