

Duygu YAŞAR ŞİRİN¹, İbrahim YILMAZ^{2,3}, Numan KARAARSLAN⁴

¹Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

²T.C. Sağlık Bakanlığı, Dr. İsmail Fehmi Cümaloğlu Şehir Hastanesi, Farmakovijilans Birimi, Tekirdağ, Türkiye

³İstanbul Rumeli Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye

⁴Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

✉ dryilmazi@yahoo.com

Derleme / Review

Geliş tarihi: 14.05.2024

Kabul tarihi: 29.05.2024

İntervertebral Disk Dejenerasyonunda Tek Hücreli RNA Dizi Analizi

Single Cell RNA Sequencing Analysis in Intervertebral Disc Degeneration

ÖZ

Geçtiğimiz on yılda, tek hücreden RNA dizi analizi, hastalıkların mekanizmalarını araştıran biyolojik çalışmalarda devrim yaratmıştır. Bu tekniğinin değeri yöntemin; benzersiz hücre türlerini tanımlayabilmesi, alt popülasyonların belirlenebilmesi ve tüm bunları karakterize etme yeteneğine, koşullar nedeniyle değişen veya bozulan transkripsiyon paternini belirleyebilmesinden kaynaklanmaktadır. İntervertebral disk dejenerasyonu açısından bakıldığında dejenerasyonun birincil hedef hücreleri nükleus pulposus, annulus fibrosus, kırıkta, uç plaka hücreleri ve makrofajlardır ve patofizyoloji büyük ölçüde enflamasyon kaynaklıdır. Diskte yer alan hücre alt gruplarının tanımlanması, bunların fonksiyonel analizleri, çeşitli hücre tiplerinin farklılaşması ve gelişiminin ilerleyen bu teknoloji ile belirlenebilmesi, disk dejenerasyonu tedavisinde yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde önemli gelişmeleri tetiklemiştir. Bu derlemede tek hücreden RNA dizi analizi kullanarak intervertebral disk dejenerasyonunda çeşitli hücre tiplerinin popülasyonlarını ve özgül hücre-hücre etkileşimlerini tanımlayan çalışmalar incelenmiştir. Ayrıca, diskin dejenerasyonunda tek hücreden RNA dizi analizi için gelecek vaat eden birkaç araştırma yönünün altı çizilmiştir.

Anahtar Sözcükler: İntervertebral disk dejenerasyonu, Tek hücreli RNA dizilimi, Transkripsiyon faktörleri

ABSTRACT

Over the past decade, single-cell RNA-seq analysis has revolutionized biological studies investigating the mechanisms of diseases. The value of this technique depends on its ability to identify unique cell types, identify their subpopulations and characterize all of these, as well as its ability to determine the transcription pattern that changes or disrupted due to conditions. From the perspective of intervertebral disc degeneration, the primary target cells of degeneration are the nucleus pulposus, annulus fibrosus, cartilage, end plate cells and macrophages, and the pathophysiology is largely caused by inflammation. The identification of cell subgroups in the disc, their functional analysis, and the ability to determine the differentiation and development of various cell types with this advancing technology have triggered important developments in the identification of new therapeutic targets in the treatment of disc degeneration. In this review, studies describing the populations of various cell types and specific cell-cell interactions in intervertebral disc degeneration using single-cell RNA sequence analysis were examined. Additionally, several promising research directions for single-cell RNA-seq analysis in disc degeneration are highlighted.

Keywords: Intervertebral disc degeneration, Single cell RNA sequencing, Transcription factors

GİRİŞ

Ribonükleik asit (RNA)-sekans (Seq) analizi olarak da bilinen RNA dizileme analizi, gen ekspresyonunu ve transkriptom profilini incelemek için kullanılan bir yöntemdir (6). Mesajcı RNA (mRNA), kodlamayan RNA ve küçük RNA gibi RNA moleküllerinin türlerini ve miktarlarını belirlemek için bir numunede bulunan RNA moleküllerinin dizilenmesini içerir. Bu analiz, belirli bir biyolojik örnekte hangi genlerin aktif olduğuna, bunların nasıl düzenlendiğine ve ekspresyon seviyelerinin

farklı koşullar altında veya farklı hücre tiplerinde nasıl değiştiğine dair bilgiler sağlar. Tek hücreli RNA dizilimi (scRNA-seq) analizi ise tek hücre düzeyinde gen ifadesini incelemek için kullanılan bir tekniktir. Bir hücre popülasyonu için ortalama bir ekspresyon profili sağlayan geleneksel RNA dizilemesinden farklı olarak scRNA-seq, araştırmacıların heterojen bir popülasyon içindeki bireysel hücrelerin gen ekspresyon modellerini analiz etmesine olanak tanır. ScRNA-seq analizinde, tek tek hücreler izole edilir ve RNA'ları sekanslanır.

Bu, mevcut RNA moleküllerinin türleri ve miktarları da dâhil olmak üzere, her hücrenin gen ekspresyon profili hakkında ayrıntılı bilgi sağlar (6).

Araştırmacılar, binlerce hücrenin gen ekspresyon profillerini analiz ederek farklı hücre türlerini tanımlayabilir, popülasyonlar içindeki hücreden hücreye değişkenliği karakterize edebilir ve toplu analizlerde gözden kaçabilecek nadir hücre popülasyonlarını ortaya çıkarabilir. scRNA-seq analizi, hücrenel heterojenliği, gelişimsel süreçleri, hastalık mekanizmalarını ve doku mikro ortamlarını benzeri görülmemiş bir çözünürlükte anlamak için güçlü bir araçtır (6).

Moleküler farmakoloji, moleküler biyoloji, biyoinformatik, biyotıp, genetik, nörofarmakoloji, nörobiyoloji, farmakogenomik, onkoloji ve rejeneratif dâhil olmak üzere çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. scRNA-seq analizi, intervertebral disk (İVD) dejenerasyonu (İVDD)'nin fizyopatolojisi altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin bilgiler sağlayarak, dejeneratif sürecin anlaşılmasına potansiyel olarak katkıda bulunabilir. ScRNA-seq, İVDD'yi doğrudan teşhis edemese de araştırmacıların, İVD'de farklı hücre tipleri içindeki, dejenerasyonla ilişkili olabilecek gen ekspresyon profillerindeki değişiklikleri tanımlamasına yardımcı olabilir.

Bununla birlikte, İVDD tanısı tipik olarak klinik değerlendirme, görüntüleme teknikleri ve bazen de biyokimyasal belirteçlerin bir kombinasyonunu içerir. ScRNA-seq analizi değerli moleküler bilgiler sağlarken, şu anda klinik ortamlarda İVDD için bir teşhis aracı olarak kullanılmamaktadır. Bunun yerine, hastalık sürecine ilişkin anlayışımızı derinleştirecek ve gelecekteki teşhis ve tedavi için potansiyel yolları belirleyecek bir araştırma aracı olarak hizmet eder.

İVDD oluşum mekanizması disk hücrelerinin miktarındaki azalma ve hücrenel değişiklikleri içerir. İVDD konusundaki anlayışımız, nükleus pulpozus (NP)'nin transkriptom özelliklerinin incelenmesi veya yeni kondrositik hücrelerin tanımlanmasıyla geliştirilebilir. İVD hücrelerinin genetik bilgilerinin aydınlatılması, gelecekte lomber dejeneratif İVD hastalıklarına yönelik yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesinin önünü açabilir. scRNA-seq, tek hücre düzeyinde genom ve transkriptom dizilimi ve analizi gerçekleştiren yüksek verimli bir tekniktir (8).

scRNA-seq tekniği ile hücre alt popülasyonları tanımlanabilmekte ve hücrenel değişiklikler saptanabilmektedir. Bu nedenle nörofarmakolojik alanla ilişkili birçok branş araştırmalarında bu tekniğin önemi giderek artmaktadır. İVDD konusunda yapılan scRNA-seq analizleri, farklı moleküler ve hücrenel özgün özellikleri, fonksiyonel gruplamaları ve etkileşimleri tanımlamıştır.

Son çalışmalar, İVDD'deki NP, annulus fibrozus (AF), kırık plakası (CEP) hücreleri ve makrofajlar gibi hücrelerin heterojenliğini ve bunların biyolojik bileşimlerindeki farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Temel olarak İVD, NP, AF ve CEP hücrelerini içermektedir, ancak bu hücre tiplerinin alt sınıflandırması hala belirsizliğini korumaktadır. Benzerliklerine rağmen bu hücreler, hücre dışı matris (ECM), moleküler fenotipik özellikleri ve biyomekanik fonksiyonları açısından önemli ölçüde farklılık gösterir. Disk dejenerasyonunun altında yatan spesifik hücrenel ve moleküler süreçler geleneksel olarak akademik araştırmaların konusu olmuştur. NP, AF ve CEP hücrelerinin patofizyolojisini araştırmak için transkriptomik ve epigenomik analizler yaygın olarak kullanılmaktadır (9). Bununla

birlikte, dokunun tamamının incelendiği çalışmalarda, hücre türleri içindeki ve arasındaki değişikliklerin karmaşıklığı net olarak anlaşılammamaktadır. NP, AF ve CEP hücrelerindeki heterojenite ve karakterize edilmemiş hücre tipleri/belirteçleri scRNA-seq yöntemine uygulan bilimsel ilgiyi artırmıştır.

İVDD'deki birincil patolojik anormallikler AF'de ortaya çıkar ve NP herniasyonuna, enflamatuvar sitokin salınımına, sinir kökü ve omuriliğin sıkışmasına yol açar. NP'deki doku homeostazisini koruyan ana hücre tipi NP hücrelerdir. Bu nedenle, AF'nin tek hücreli analizleri, İVD'deki çeşitli hücre nişlerinin prospektif transkriptom profili hakkında fikir verebilmektedir. CEP sıklıkla göz ardı edilse de doku devamlılığının sağlanmasında hayati bir rol oynar.

Bu nedenle İVD homeostazisi ve İVDD ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır. CEP içindeki çeşitli hücre popülasyonları arasındaki etkileşimlerde tam olarak anlaşılammamıştır, çünkü çoğu çalışma yalnızca CEP'in kendisine odaklanmıştır ve diğer hücre türleri ile kurdukları iletişim ağlarında bilgi boşlukları bulunmaktadır.

Tüm bunlara ek olarak son çalışmalar makrofaj sayısı ile İVDD'nin şiddeti arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Çünkü makrofajlar NP'ye sızabilen tek enflamatuvar hücrelerdir. İVD'de makrofajların heterojenliğini anlamak, disk dejenerasyonunda enflamasyonun rolünü anlamamızı sağlayabilecektir. NP, AF, CEP hücrelerinin ve makrofajların gelişimlerini incelemek ve/veya ayrıca hücre heterojenliğini dinamik olarak analiz etmek için kullanılabilir yeni bir teknik olan ScRNA-seq'nin, bu derlemede anlatılması amaçlanmıştır.

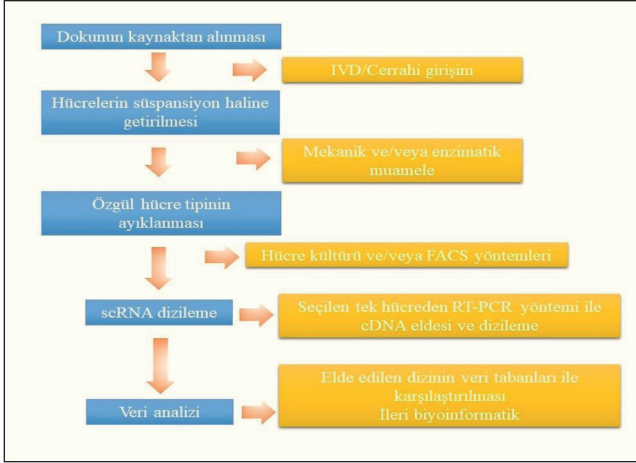
scRNA-seq teknolojisi

Proteom dizilemenin (PRO-seq) hızla gelişmesiyle birlikte, toplu RNA dizilimi (bRNA-seq) ve tek hücreli RNA dizilimi (scRNA-seq) teknolojileriyle çoklu omik analizler güncel araştırmaların odak noktası hâline geldi. Çok sayıda çalışma, proteinlerin İVDD'de önemli bir rol oynadığını göstermiştir (18,22).

Tang ve ark. 2009 yılında yaptığı çalışmada tek bir blastomer ve oositin transkriptomunu dizileyerek scRNA-seq alanında ilk önemli kavramsal ve teknik ilerlemeyi yayınlamışlardır (16). Dizileme teknolojilerinin ilerlemesiyle birlikte, bir hücreden dizi analizi, DNA, RNA dizisini ve bir hücreye ait epigenomik analizi kapsayan güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Dizileme teknolojileri arasında scRNA-seq en yaygın olarak kullanılanlardan birisidir. Bireysel hücrelerdeki transkriptomik varyasyonları tespit edebilir, farklı hücrelerdeki haberci RNA ekspresyon heterojenliğini açıklığa kavuşturabilir ve etkili amplifikasyon ve yüksek verimli sekanslama yoluyla örneğe dair çok kapsamlı veri toplayabilir.

Örnek boyutu seçiminde scRNA-seq teknolojisinin esnekliği hem küçük hem de büyük örnekler için geçerli olup, yeni fonksiyonel hücre alt gruplarının, terapötik hedeflerin ve hücre kaynaklarının ve fonksiyonlarının tanımlanmasında çok önemli olduğu kanıtlanmıştır. scRNA-seq prosesindeki birincil adımlar, tek bir hücrenin yakalanması ve izolasyonunu, hücre lizisini, ters transkripsiyonu, tamamlayıcı DNA (cDNA) amplifikasyonunu ve kütüphane hazırlanmasını içerir (21,24).

Bunlardan tek bir hücrenin yakalanması, ters transkripsiyon ve cDNA amplifikasyonu scRNA-seq'in en zorlu aşamalarıdır. Tek hücre izolasyonu ve yakalanması için yaygın yöntem-



Şekil 1: Omurlararası diskte tek hücreli RNA dizi analizi (scRNA-seq) için iş akışı (24).

ler arasında sınırlandırılmış seyreltme, floresansla aktifleşen hücre sınıflandırma (FACS), manyetik aktifleştirilmiş hücre sınıflandırma (MACS), mikroakışkan sistemler ve lazer mikrodiseksiyon yer alır. cDNA amplifikasyonu, kütüphane oluşturma ve hücre yakalama için çeşitli teknikler geliştirilmiş ve uygulanmıştır. scRNA-seq teknolojisi maliyetleri azaltmayı ve verimi artırmayı amaçlayan teknolojik ilerlemelerle birlikte gelişmeye devam etmektedir (Şekil 1).

Omik teknolojilerinin kullandığı veri tabanları bambaşka bir derlemenin konusu olmakla birlikte çalışmaların birçoğunda Hub genlerini taramak için makine öğrenimi (Machine learning; ML) algoritmaları kullanılmaktadır. Fonksiyon ve sinyal yollarını analiz etmek için Gen Ontolojisi (Gene Ontology; GO) ve Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; KEGG) veri tabanları kullanılarak analizler yapılmaktadır. Benzer şekilde hastalıkla ilişkili proteinleri belirleyebilmek için protein-protein etkileşimi (PPI) ağından faydalanılmaktadır. GO ve KEGG analizlerinde kullanılan platformlara örnek olarak OmicsBean (<http://www.omicsbean.cn/>) ve PPI için Cytoscape yazılımını (<https://cytoscape.org/>) kullanan STRING (<https://string-db.org/>) örnek olarak verilebilir.

scRNA-seq ve NP hücreleri

Sağlıklı bir diskte NP, NP hücreleri tarafından üretilen ECM bileşenlerinden oluşan oldukça sulu, jelatinimsi bir yapıdan oluşur. NP hücreleri embriyonun notokordundan kaynaklanır ve vücudun aksenal ve omurga stresine dayanma yeteneğinden çok önemli bir rol oynar (7,18).

İVDD sırasında hücre tipleri ve moleküllerdeki değişiklikleri anlamak için Ling ve ark. dejenerasyonun çeşitli aşamalarında insan disklerinden alınan NP inceledi (11). Bu çalışmada araştırmacılar altı tip NP hücresi (adesiv, endoplazmik retikulum stresi, fibrokartilajinöz, enflamatuvar yanıt ve CD70+ ve CD82+ NP progenitör hücreleri) ve beş tip bağışıklık hücresi (M1 ve M2 makrofajları, T hücreleri, nötrofiller ve miyeloid progenitörler) tanımlamışlardır. Disk dejenerasyonunun orta ve geç evrelerinde fibrokartilajinöz NP hücrelerinin oranının arttığını, metabolik homeostatik NP hücrelerinin ise erken evrede en fazla olduğunu bulmuşlardır. Veriler, NP hücrelerinin enflamatuvar faktörlerden etkilenebileceğini, çünkü çeşitli enflamatuvar yanıt NP hücrelerinin, derece II ile kar-

şılaştırıldığında derece IV'te arttığını, metabolik homeostatik NP hücrelerinin sayısının ise önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir (11). Yine bu çalışma M2 polarize makrofajların sayısı İVDD ilerlemesiyle önemli ölçüde azaldı. M2 polarize makrofajlarla karşılaştırıldığında, M1 polarize makrofajların fraksiyonu istikrarlı bir şekilde arttı; bu, makrofaj polarizasyonunun, İVDD gelişimindeki enflamatuvar kaskadı yoğunlaştırmada çok önemli olabileceğini göstermiştir.

Han ve ark., altı NP örneğini (normal kontrol, orta ve şiddetli dejenerasyon) scRNA-seq yöntemi ile inceledikleri çalışmalarında NP'de endotel, makrofaj ve kondrosit olmak üzere üç hücre soyunu belirledi (5). Araştırmaları öncelikle kondrosit soy grubuna odaklandı ve burada yedi alt tip tanımladılar: kırıkdağ progenitör hücreleri (CPC'ler), fibrokondrosit progenitörleri (FCP'ler), homeostatik kondrositler (HomC'ler) ve C1-4 olarak sınıflandırılan dört yeni popülasyon. Bu kondrosit alt kümelerinden üçünün İVDD süreciyle ilişkili olduğu bulundu. C1, dejeneratif hastalık örneklerinde en yaygın alt tipti. Bununla birlikte, İVDD ilerlemesiyle birlikte CPC'lerin oranı çarpıcı biçimde azaldı. C3 oranı şiddetli dejenerasyon grubunda orta dejenerasyon grubuna göre daha yüksekti ve yalnızca dejeneratif numunelerde tespit edildi. Özetle, araştırmada C1 ve C3'ü enflamatuvar yanıtın alt kümeleri olarak tanımlamışlardır. C2, ECM'nin düzenli yapısının korunmasına katkıda bulunan yüksek düzeyde proteoglikan ve tip II kolajeni eksprese eder. Fibroblastlara fenotipik benzerliği olan C4, ECM'nin yeniden şekillenmesine yardımcı olabilir. Ayrıca İVDD'deki kondrosit hücreleri ile diğer hücreler arasındaki potansiyel bağlantıları da gösterir (5).

Ancak yazarlar bu kondrosit tiplerinin farklılaşma yönünü belirtmemişlerdir; bu da gelecekte daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir.

ScRNA-seq'i kullanan Zhang ve ark., C1-C4, FCP'ler, CPC'ler ve HomC'ler olmak üzere yedi kondrosit alt kümesi tanımladı (23). Araştırmacılar bu çalışmalarında C1 alt kümesinin kemik büyümesinde ve anjiyogenezde rol oynayabileceğini ve C2 alt kümesinin ise ağırlıklı olarak ECM salgılanmasından sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Yalnızca dejeneratif disk dokusunda bulunan C3 alt kümesinde ise ECM'nin enflamatuvar bağışıklık tepkisi ve yeniden yapılanmasında rol oynayan genlerin yüksek düzeyde eksprese edildiği belirtilmiştir. C4 alt kümesi, kolajen homeostazisini korumak için gerekli genleri ifade ettiği ve bağışıklık tepkisine katkıda bulunduğu görülmüştür (23). Bu bilgiler NP hücrelerinin rolüne ilişkin anlayışımızı genişletmek ve belki de değiştirmekle birlikte, farklı çalışmalarda C1-C4 hücre alt grupları arasındaki fonksiyonel farklılıklar hâlâ daha fazla araştırmayı gerektirmektedir. Tu ve meslektaşları, değişen derecelerde dejenerasyona sahip sekiz İVDD hastasından toplanan NP üzerinde scRNA-seq gerçekleştirdiler (18).

Yüksek oranda eksprese edilen genleri analiz ederek ve önceki tek hücre çalışmalarını gözden geçirerek altı alt popülasyon belirlediler: adeziv, efektör, homeostatik, düzenleyici ve hipertrofik kondrosit benzeri NP hücreleri. Daha sonra hücre popülasyonlarının dağılımı ile dejenerasyon dereceleri arasındaki ilişkiyi araştırdılar. Derece II disklerde ana alt popülasyonun düzenleyici ve hipertrofik kondrosit benzeri NP hücreleri olduğunu, derece III ve IV disklerdeki ana alt popülasyonların ise efektör ve hipertrofik kondrosit benzeri NP hücrelerinden oluştuğunu gösterdiler. Derece V disklerde, fibroblastik ve yapışkan NP hücrelerinin ana popülasyo-

nu oluşturduğunu ve homeostatik NP hücrelerinin sayısının azaldığını belirlediler (18). Wang D. ve ark.nın yaptığı çalışmada İVD örneklerinde, NP hücreleri, AF hücreleri, bağışıklık hücreleri, endotelial progenitör, eritrositler ve MKI67+, MCAM+ ve CD24+ öncüsünün üç progenitör kümesi dahil olmak üzere sekiz hücre kümesi tanımlanmıştır. Bu hücre kümelerinin farklı dejenere İVD derecelerindeki oranı ve dağılımı gösterilmiştir. Ayrıca NP hücrelerinin kondrosite özgü ECM genlerden COL2A1, ACAN, COMP ve FMOD'un yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (19).

Çalışmalar İVDD'deki NP hücrelerinin alt popülasyonları arasında fonksiyonel ve biyolojik varyasyonların varlığını göstermektedir. Farklı hücre popülasyonlarının tanımlanması yanı sıra diskte dejenerasyon ile beraber izlenen patolojiler ile hangi genlerin ilişkisi olabileceğinin daha detaylı analizleri de yapılmaya başlanmıştır. Örnek vermek gerekirse daha yakın zamanda yayınlanan NP'de ossifikasyona neden olan genlerin araştırıldığı bir çalışmada TNF- α , CD74 ve CCL-3 genlerinin stromal hücrelerin ossifikasyon fenotipi ile ilişkili olduğu *in vitro* olarak belirlenmiştir (4).

Benzer şekilde lomber disk herniasyonunda gözlenen ferroptozise neden olan mekanizmaları araştıran bir çalışmada MYB geninin immün infiltrasyonun fazla olduğu dejenere NP'de, intakt NP'ye oranla artmış olduğu ve ferrotosisle ilişkili olduğu bulunmuştur (12). Çalışmaların yöneleceği bir diğer alanda İVDD tedavisinde kullanılabilir kök hücre gruplarının belirlenmesi olacaktır. Chen ve ark.nın bu bağlamda yaptıkları çalışmada mezenkimal kök hücre adayları scRNA-seq yöntemiyle değerlendirilmiştir (1).

scRNA-seq ve AF hücreleri

İntervertebral disk hastalıklarında AF yapısındaki bozulmaları içeren birincil patolojik değişiklikler doğrudan NP herniasyonuna ve sınır sıkışmasına yol açar. Sonuç olarak, İVDD tedavisindeki temel zorluk AF kusurlarının onarılmasında yatmaktadır. Bununla birlikte, AF çeşitli AF hücre tipleri nedeniyle çok heterojendir ve hem tüm bu farklı hücre tiplerini hem de uygun desteği sağlayabilecek ECM'i tek bir hücre tipi veya indükleyici bir ortam kullanarak eski hâline döndürmenin zor olduğu kanıtlanmıştır. Bu sorunları ele almak, belirli araştırma boşluklarının doldurulmasını gerektirmektedir. İlk olarak, AF hücrelerinin heterojenliğinin derinlemesine anlaşılması, indüksiyon yönteminin hedeflerini belirlemek için kritik öneme sahiptir. AF hücrelerinin heterojenliğine ilişkin daha fazla bilgi edinmek için Wang ve ark., fare AF'de scRNA-seq gerçekleştirerek 10 önemli hücre popülasyonunu belirlediler (20).

On ana AF hücre tipi genel olarak üç ana gruba ayrılabilir: progenitör hücreler, fibroblast benzeri hücreler ve kondrosit benzeri hücreler. AF hücre atlasının scRNA-seq ile kodunun çözülmesi, AF biyolojisi için sitolojik bir temel sağlar. Bu keşiften yola çıkarak Wang ve ark., AF kök hücrelerini fibrokondrosit benzeri AF hücrelerine farklılaşmaya teşvik edebilen, AF onarımı için umut vaat eden bir kompozit hidrojel geliştirdiler (20). Bununla birlikte, bu çalışmanın bir sınırlaması, fare verilerine dayanmasıdır ve farelerin İVD'si, insanlarınkine tam olarak uymayabilir.

Wang D. ve ark.nın insan İVD dokusunu kullanarak yaptığı çalışmada D1-D4 İVD'lere kıyasla D5 İVD'lerde NP hücrelerinin sayısı azalırken ve AF hücrelerinin sayısının arttığını göstermiştir. Ayrıca AF hücrelerinin COL1A1, CRTAC1, ASPN ve matris metaloproteinaz (MMP)-2 gibi kırırdağa özgül ECM

genlerini yüksek oranda eksprese ettiği belirlenmiştir. Yine bu çalışmada bağışıklık hücreleri tüm dejenere derecelerde CD74, SRGN, LAPTM5 ve HLA-DRA belirteçleriyle tanımlanmıştır ve endotelial progenitör hücrelerde daha önceki çalışmalarla tutarlı bir şekilde bulunmuştur. Birlikte ele alındığında bu çalışmanın sonuçları insan İVD'lerinin transkriptom durumunu tek hücre düzeyinde göstermiştir (19).

Şu anda literatürde AF hücreleri için COL1A1, COL4, LAM1 ve THY1 ve NP hücreleri için KRT8, KRT18, KRT19, CA12, ACAN, COL1A2, COL2A1, TIE2+ ve GD2+ dahil olmak üzere bir dizi İVD hücre biyobelirteçleri açıklanmaktadır (2,10). Benzer şekilde sağlıklı insan AF ile NP'nin çalışıldığı bir araştırmada SFRP1, BIRC5, CYTL1, ESM1 ve CCNB2 genlerinin özellikle AF hücrelerinde ve COL2A1, DSC3, COL9A3, COL11A1 ve ANGPTL7 genlerinin NP hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir (3).

scRNA-seq ve CEP hücreleri

CEP, İVD ile vertebral gövde arasındaki stresi dengelemek için kritik bir bileşendir ve vertebral kan damarları yoluyla elde edilen besin ve metabolitlerin taşınmasını sağlar (5). Küçük bir uç plak yaralanması bile çevredeki İVD'de baskı stresi dağılımının değişmesi, NP'deki intradiskal basıncın azalması ve AF'deki sıkışma stresinin artması gibi yapısal değişikliklere neden olabilir (7). Rade ve ark., geniş bir popülasyonda yaptıkları araştırma lomber diskin tüm seviyelerinde son plak defektleri ile disk dejenerasyonu arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermiştir (15). Bu nedenle CEP hasarı veya bozulması, disk dejenerasyonunun başlangıcında anahtar bir başlatıcı faktör olabilir. Ancak, CEP'te hücrel heterojenitenin değerlendirilmesi, CEP'ye odaklanan scRNA-seq çalışmalarının azlığı nedeniyle zordur. CEP'te immün infiltrasyon durumunu ve hücrel nişleri scRNA-seq kullanarak araştıran bir çalışmada CEP dokusunun önemli ölçüde hücreler arası heterojenlik sergileyen farklı hücre popülasyonları bulunduğunu belirledi ve saptadığı 13 hücre kümesini altı kategori altında sınıflandırdı.

Bunlar arasında NP mezenkimal kök/progenitör hücreler, mezenkimal kondrositler, stromal hücreler, düz kas hücreleri/perisitler, kan hücreleri ve endotel hücreleri yer alır. Bu altı kategori genel olarak kan hücreleri, kanla ilgili hücreler, makrofaj hücreleri ve mezenkimal kondrositler olarak sınıflandırılabilir (8). Yine bu çalışmada kan hücrelerinin, antijen işleme ve sunumunda ve T hücrelerinin, B hücrelerinin ve makrofaj hücrelerinin aktivasyonu, sitokin aracılı sinyalleme, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolu dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık hücresi ile ilgili işlemlerde rol oynadığı bulundu. CEP dokusunda bulunan kanla ilgili hücreler arasında düz kas hücreleri, kan hücreleri ve endotel hücreleri yer almaktadır. Düz kas hücreleri, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)-protein kinaz B sinyal yolu üzerinden kas kasılmasına, anjiyogenez düzenlenmesine ve damar gelişiminin düzenlenmesine katıldığı gösterildi (8).

Dolayısı ile bu çalışma NP ve AF'ye besin difüzyonunu sağlayan CEP, dokudaki kan damarları, kanla ilgili hücrelerin ve sitokinlerin AF ve NP dejenerasyonunu modüle etmek için nasıl birlikte çalışabileceğinin de altını çizmiştir. CEP'teki mezenkimal kondrositlerde; homeostatik, efektör ve düzenleyici mezenkimal kondrositler olmak üzere üç grupta sınıflandırılmıştır. Homeostatik kondrositler öncelikle kemikleşme ve kollajen bağlanma süreçlerine katılmaktadır. Düzenleyici

kondrositler esas olarak uyarılara ve kontrollü tepkilere yanıt vermekte ve efektör kondrositler ise büyük ölçüde metabolik süreçlere katılmaktadır. Makrofaj hücreleriyle ilgili olarak hem sağlıklı hem de dejeneratif CEP dokuları öncelikle mast hücrelerini ve M0 makrofaj hücrelerini içermekte olup, M1 ve M2 makrofajları CEP dokularında çok nadir gözlenmektedir (8).

ScRNA-seq ve bağışıklık hücreleri

İVDD radiküler sırt ve boyun ağrısının başlıca nedenlerinden biridir, ancak ağrı her zaman yapısal disk dejenerasyonuyla ilişkili değildir. Bu nedenle ağrı muhtemelen, bağışıklık hücrelerinin yapısal eksiklik bölgesine göç etmesiyle tetiklenen, halka şeklindeki çatlaklardan NP materyalinin sızması veya hasar görmesi sonucu ortaya çıkan ikincil bir olaydır. İVDD'nin karakterizasyonu CD68 makrofajlarının, CD4 ve CD8 T hücrelerinin ve nötrofillerin infiltrasyonunu içermektedir. Ağrı aynı zamanda bu bağışıklık hücrelerinin kan damarlarına ve sinir liflerine yayılmasıyla da ilişkilidir.

NP, AF ve bağışıklık hücreleri (makrofajlar, T hücreleri ve nötrofiller dahil), tümör nekroz faktörü-alfa, interlökin-1 alfa/beta (IL-1 α / β), IL-6, IL-17, IL-8, IL-2, IL-4, IL-10 ve interferon-gama gibi nörojenik faktörler ve sitokinler salgılar. Bu faktörler diskojenik ağrıya ve disk hücrelerindeki patolojik süreçlere katkıda bulunur. Dejeneratif İVDD'de kontrol gruplarına göre daha yüksek miktarda düzenleyici T hücreleri (Tregs) ve makrofaj infiltrasyonu olduğu bildirilmiştir (11). Çalışmalar makrofaj birikiminin İVDD ilerlemesi ile belirgin şekilde arttığını göstermektedir (11).

NP, AF ve uç plaka dahil olmak üzere yapısal anormalliklere sahip dejeneratif İVD alanlarında CCR7+ ve CD163+ gibi çeşitli makrofaj belirteçlerinin düzeylerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (14). Diğer çalışmalar da Th17/Treg hücrelerini içeren bağışıklık tepkisinin kronik bel ağrısının atofizyolojisinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Th17/Treg oranındaki değişikliklerin yanı sıra, kronik bel ağrısı çeken bireylerde ayrıca daha yüksek sayıda anti-enflamatuar Treg görülmüştür (13).

İVDD'nin patolojik sürecinin, düzenleyici T hücrelerini ve çeşitli makrofaj türlerini çeken benzersiz bir bağışıklık mikro ortamı oluşturduğu varsayılmaktadır. Bu hücreler, transforme edici büyüme faktörü beta ve IL-10 gibi sitokinler aracılığıyla NP hücreleri, adipositler ve fibroblastlarla etkileşime girerek İVDD'deki patolojik değişiklikleri teşvik eder. Tu ve ark., NP'nin ayrıca makrofajları, T hücrelerini, miyeloid progenitör hücreleri ve nötrofilleri de kapsadığını gösterdi (18). Bağışıklık hücrelerinin, özellikle enflamatuar olduğu iyi bilinen M1 ve M2 makrofajlarının, disk dejenerasyonunun tüm aşamalarında rol oynadığını öne sürdüler. İlginç bir gözlem, M2 makrofaj kümelerinin oranının İVDD ilerlemesiyle birlikte azalması ve bunu M1 makrofajlarında bir artış eğiliminin takip etmesidir. Bu, makrofaj polarizasyonunun enflamatuar kaskatını artırmada çok önemli olabileceği anlamına gelir. İmmün hücreler arasındaki hücresel etkileşimlerin analizinde, NF- κ B, M1 ve M2 makrofajlarında belirgin bir şekilde eksprese edildiği ve NF- κ B'nin, bu hücrelerin NP içindeki polarizasyonu için de gerekli olduğunu ortaya koydu. Çeşitli makrofaj hücre tipleri ile NP progenitör hücre tipleri arasındaki yakın ilişkiler, ScRNA-seq yöntemi ile belirlenmiştir (11).

Özetle, ScRNA-seq NP hücre kümelerindeki bağışıklık hücrelerinin ekspresyon modellerini ortaya çıkarabilmektedir, dolayısıyla İVDD tedavisine yön verebilecektir.

SONUÇ ve PERSPEKTİF

ScRNA-seq teknolojisinin sürekli kullanımı, hücre heterojenesinin belirlenmesine ve dolayısıyla İVDD için tedavi hedeflerinin belirlenmesine önemli ölçüde yardımcı olabilir. Bu teknik aynı zamanda NP, AF ve CEP hücreleri, makrofajlar ve diğer bağışıklık hücreleri arasındaki soy veya gelişimsel ilişkilerin izlenmesinde de etkili olabilir. Çok yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada Autophagy-related gene 9A (ATG9A) geninin İVDD'de potansiyel bir diagnostik belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (17). Teknik NP, AF, CEP hücrelerinin, makrofajların ve diğer bağışıklık hücrelerinin İVDD'deki rollerini daha da aydınlatacak ve yeni alt popülasyonların, farklılaşmanın ve dinamik süreçlerin incelenmesini kolaylaştıracaktır. ScRNA-seq teknolojisi şu anda genomik, transkriptomik ve epigenomik çalışmaları kapsasa da İVDD araştırmalarında genomik ve epigenomik analizlerin uygulanması hâlâ nadirdir. Hücrelerin işlevsel durumu, DNA, RNA ve proteinler de dahil olmak üzere birçok molekülün karmaşık bir şekilde düzenlenmesiyle belirlenir. Bu nedenle, hücresel "kimliği" tam olarak anlamak için, tek bir hücrenin birden fazla omik özelliğini aynı anda yakalamak çok önemlidir.

Tek hücreli çoklu omik yaklaşımlar, çeşitli omik düzeylerinde tek hücrelerin genomlarının, transkriptomlarının, epigenomlarının ve proteomlarının yüksek verimli analizlerini gerçekleştirebilir. Genomik, epigenetik modifikasyon ve gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyi açıklayarak bu yöntemler, daha büyük bir popülasyondaki bireysel hücrelerin davranış ve fonksiyonlarının ve bunların bir bütün olarak organizmayla ilişkilerinin derinlemesine analizi için yeni bakış açıları sağlayabilir. Bu analiz, temel araştırma ve hassas tıpta artan önem kazanacak ve İVDD tedavisinde daha fazla ilerlemeye yol açacaktır.

KAYNAKLAR

1. Chen J, Qi F, Li G, Deng Q, Zhang C, Li X, Zhang Y: Identification of the hub genes involved in stem cell treatment for intervertebral disc degeneration: A conjoint analysis of single-cell and machine learning. *Stem Cells Int* 2023;7055264, 2023
2. Cherif H, Mannarino M, Pacis AS, Ragoussis J, Rabau O, Ouellet JA, Haglund L: Single-Cell RNA-Seq analysis of cells from degenerating and non-degenerating intervertebral discs from the same individual reveals new biomarkers for intervertebral disc degeneration. *Int J Mol Sci* 23:3993, 2022
3. Fernandes LM, Khan NM, Trochez CM, Duan M, Diaz-Hernandez ME, Presciutti SM, Gibson G, Drissi H: Single-cell RNA-seq identifies unique transcriptional landscapes of human nucleus pulposus and annulus fibrosus cells. *Sci Rep* 10(1):15263, 2020
4. Guo S, Yan M, Li X, Zhang S, Liu Z, Li K, Liu P, Liu Y, Sun G, Fu Q: Singlecell RNA-seq analysis reveals that immune cells induce human nucleus pulposus ossification and degeneration. *Front Immunol* 14:1224627, 2023

5. Han S, Zhang Y, Zhang X, Zhang H, Meng S, Kong M, Liu X and Ma X: Single-Cell RNA sequencing of the nucleus pulposus reveals chondrocyte differentiation and regulation in intervertebral disc degeneration. *Front Cell Dev Biol* 10:824771, 2022
6. Hrdlickova R, Toloue M, Tian B: RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8: 10.1002/wrna.1364, 2017
7. Hu X, Wang Z, Zhang H, Cui P, Li Y, Chen X, Kong C, Wang W, Lu S: Single-cell sequencing: New insights for intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother* 165:115224, 2023
8. Jovic D, Liang X, Zeng H, Lin L, Xu F, Luo Y: Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clin Transl Med* 12:e694, 2022
9. Li W, Zhang S, Zhao Y, Wang D, Shi Q, Ding Z, Wang Y, Gao B, Yan M: Revealing the key MSCs niches and pathogenic genes in influencing CEP homeostasis: A conjoint analysis of single-cell and WGCNA. *Front Immunol* 13:933721, 2022
10. Li Z, Ye D, Dai L, Xu Y, Wu H, Luo W, Liu Y, Yao X, Wang P, Miao H, Xu J, Liang W: Single-cell RNA sequencing reveals the difference in human normal and degenerative nucleus pulposus tissue profiles and cellular interactions. *Front Cell Dev Biol* 10:910626, 2022
11. Ling Z, Liu Y, Wang Z, Zhang Z, Chen B, Yang J, Zeng B, Gao Y, Jiang C, Huang Y, Zou X, Wang X and Wei F: Single-cell RNA-Seq analysis reveals macrophage involved in the progression of human intervertebral disc degeneration. *Front Cell Dev Biol* 9:833420, 2022
12. Lu Z, Zheng Z: Integrated analysis of single-cell and bulk RNA sequencing data identifies the characteristics of ferroptosis in lumbar disc herniation. *Funct Integr Genomics* 23(3):289, 2023
13. Luchting B, Rachinger-Adam B, Zeitler J, Egenberger L, Möhnle P, Kreth S, Azad SC: Disrupted TH17/Treg balance in patients with chronic low back pain. *PLoS One* 9(8):e104883, 2014
14. Proto JD, Doran AC, Gusarova G, Yurdagul A, Sozen E, Subramanian M, Islam MN, Rymond CC, Du J, Hook J, Kuriakose G, Bhattacharya J, Tabas I: Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution. *Immunity* 49:666-677, 2018
15. Rade M, Määttä JH, Freidin MB, Airaksinen O, Karppinen J, Williams FMK: Vertebral endplate defect as initiating factor in intervertebral disc degeneration: Strong association between endplate defect and disc degeneration in the general population. *Spine (Phila Pa 1976)* 43(6):412-419, 2018
16. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA: mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 6:377-382, 2009
17. Tang X, Lin S, Luo H, Wang L, Zhong J, Xiong J, Lv H, Zhou F, Wan Z, Cao K: ATG9A as a potential diagnostic marker of intervertebral disc degeneration: Inferences from experiments and bioinformatics analysis incorporating sc-RNA-seq data. *Gene* 897:148084, 2024
18. Tu J, Li W, Yang S, Yang P, Yan Q, Wang S, Lai K, Bai X, Wu C, Ding W, Cooper-White J, Diwan A, Yang C, Yang H, Zou J: Single-cell transcriptome profiling reveals multicellular ecosystem of nucleus pulposus during degeneration progression. *Adv Sci (Weinh)* 9(3):e2103631, 2022
19. Wang D, Zhang LZ, Huang W, Cao S, Xie L, Chen Y, Li H, Wang L, Chen X, Yang JR: Single-cell transcriptomics reveals heterogeneity and intercellular crosstalk in human intervertebral disc degeneration. *iScience* 26(5):106692, 2023
20. Wang J, Huang Y, Huang L, Shi K, Wang J, Zhu C, Li L, Zhang L, Feng G, Liu L, Song Y: Novel biomarkers of intervertebral disc cells and evidence of stem cells in the intervertebral disc. *Osteoarthritis Cartilage* 29(3):389-401, 2021
21. Wang T, Wang L, Zhang L, Long Y, Zhang Y, Hou Z: Single-cell RNA sequencing in orthopedic research. *Bone Res* 11(1):10, 2023
22. Yang X, Lu Y, Zhou H, Jiang HT, Chu L: Integrated proteome sequencing, bulk RNA sequencing and single-cell RNA sequencing to identify potential biomarkers in different grades of intervertebral disc degeneration. *Front Cell Dev Biol* 11:1136777, 2023
23. Zhang Y, Han S, Kong M, Tu Q, Zhang L, Ma X: Single-cell RNA-seq analysis identifies unique chondrocyte subsets and reveals involvement of ferroptosis in human intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 29(9):1324-1334, 2021
24. Zhao YD, Huang YC, Lin JL, Li WS: Intervertebral disc progenitors: Lessons learned from single-cell RNA sequencing and the role in intervertebral disc regeneration. *Bioengineering* 10:713, 2023