

Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar

*Arş.Gör. İrem MATUR**
*Prof.Dr. Suna SOLMAZ**

1. Kök Hücre Tanımı

Kök hücre basitçe düşünüldüğünde yaşamın kaynağıdır. Patolojinin öncülerinden Dr. Rudolph Virchow'un dediği gibi "Her hücre bir hücreden meydana gelir". Bu zincirin en başında da döllenmiş ovum (zigot) bulunur. Bu oluşum, canlılardaki en yetkin farklanma kapasitesine sahip (totipotent) olan hücredir ve kısa süre içinde önce embriyo, daha sonra da tüm dokuların oluşmasına öncülük eder¹.

Zigot, uterusu tam bir gebelik ürünü verebilirken (totipotent), daha ileri aşamada bulunan hücrelerin potansiyelleri azalmıştır. Morula hücreleri bir embriyonun her bölümünü teşkil edebilirler, bu nedenle totipotent olarak kabul edilmektedirler. Ardından gelen blastokist hücreleri, fetusu oluşturan yaklaşık 200 çeşit hücreye farklılaşma (pluripotent) şeklinde sınırlanırlar. İmplantasyon sonrası endoderm, ektoderm ve mezoderme farklılaşan hücreler multipotent karakter kazanıp ancak bu tabakalardan birine ait hücreleri oluşturur ve de gametlerin unipotent öncü hücrelerini meydana getirir (Tablo-1).

Blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan hücreler embriyonik kök hücreler olarak adlandırılırlar. Embriyoya ait ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarına ve bunların ileride oluşturacakları organ sistemlerine ait tüm yapılara farklılaşma özelliğine sahip pluripotent hücrelerdir. Fötustan itibaren çocukluk dönemi de dahil olmak üzere gelişmekte olan organizmada ve hatta yetişkinde belirli bazı bölgelerde yetişkin kök hücreler (dokuya özgü kök hücreler) bulunur ki bunlar gerektiğinde çoğalabilen ve sınırlı sayıda hücreye farklılaşabilen hücrelerdir^{1,2,8,18}.

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ADANA

Tablo-I: Kök hücre tipleri, farklanma etkinlikleri ve farklanma yönleri.

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklanma Etkinliği	Farklanma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyo ve embriyo dışı dokular
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyo gövdesi (Tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri:

2.1. Farklanma (Plastisite):

Farklanma, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklanma sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matris proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin kombine etkisiyle başarılan karmaşık olaylar bütünüdür.

Farklanmaya giren hücre, bir yandan bölünmeyi durdururken bir yandan da çevresinden gelen sinyallere yanıt vermeye hazırlanır. Bunun için genellikle enzim-bağımlı yüzey reseptörleri, hücre içi reseptörler ve aktivasyon yolları ortaya çıkararak hücrede bazı olayların başlamasını tetikler. Örneğin, Eiraku et al.³ bir nöronal kök hücrenin, notch sinyalizasyonu varlığında glia prekürsörlerine farklandığını göstermiştir. Notch sinyalizasyon reseptörü eksprese eden hücre, ligandı olan DNER isimli transmembran proteini ile etkileşime girerse, glia hücresi oluşumu indüklenmektedir.^{1,3}

Bazı hücrelerde HIV virüsüyle de farklanma uyarılabilir. Cotter et al. HIV

proteini ile osteojenik farklanma tanımlamıştır.⁴ Buna karşın bazı onkogen ürünleri farklanmayı geriye çevirebilir; bu yolla yetişkin bir hücre pluripotent özellik kazanıp malign tümör hücresine dönüşebilir. Kütanöz Kaposi's Sarcoma, insan herpesvirüs 8'in yol açtığı bir tümör dokusudur ve AIDS olduğuna işaret hastalıklardan biridir.⁵

2.1.1. İleri Farklanma:

Bir hücre için ileri farklanma süreci, genellikle o hücrenin çoğalma sürecinin bittiği noktadan başlar. Dolayısıyla her iki süreç genellikle aynı zamanda meydana gelmez. Söz konusu hücre, çoğalma sürecinde önce yeterli sayıya ulaşır, sonra çoğalma (yani kendini yenileme süreci) ile ilgili hücre yüzey ve hücre içi yolaklar genellikle kapatılır ve farklanma ile ilgili mekanizmalar devreye girer. Bu süreçte hücre, bölünme döngüsünden kalıcı veya geçici olarak çıkar ve G0 fazına girer.¹

2.1.2. Yönlendirilmiş Farklanma:

Laboratuvar ortamında, kök hücrelerin belli bir çizgide farklanmasının sağlanması ya da yönlendirilmiş farklanma; ya belli kimyasal ve fiziksel koşulların yerine getirilmesi ile ya da doğrudan hücrenin genetik programının değiştirilmesiyle başarılır. Örneğin; yetişkin bir kök hücresinin yağ hücresine farklanması için kültür ortamına belli dozlarda deksametazon, indometazin, izobutil metilksantin ve insülin gibi doğal hormon ve yapay kimyasal maddeler eklenir. Bu maddelerin in vivo ortamda kök hücrelerin yağ hücresine dönüşümünü uyarıp uyarmadıkları bilinmese de, in vitro ortamda genellikle birkaç haftada bu yolla elde edilen yağ hücreleri in vivo karşılıklarıyla kıyaslanacak düzeyde olgunlaşırlar. Benzer şekilde kültür ortamına deksametazon, askorbik asit ve β -gliserofosfat eklendiğinde de osteojenik farklanma sağlanır.⁶

2.1.3. Geriye Farklanma ve Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

İn vitro farklanmanın bir başka yolu, viral ya da plazmid gibi çeşitli vektörler kullanarak genetik yeniden programlama yapmaktır. Uyarılmış pluripotent kök

hücreler bu şekilde elde edilirler. Somatik hücreler, çeşitli viral veya non-viral vektörler kullanılarak Oct3/4, Sox2, klf4, c-Myc ve benzeri embriyonik kök hücrelerine özgü genleri aktif hale getirerek geriye farklanma sağlarlar.⁷

2.1.4. Ara Farklanma:

Ara farklanma, bir yönde farklanmış hücrenin bir başka hücreye doğru farklanmasıdır. Salamanderin gözünde gerçekleşen Wolf onarımı olayında, gözdeki merceğin çıkarılmasıyla iris hücreleri lensi oluşturmak üzere farklanırlar. Buna benzer örnekler ile çoğu zaman karşılaşılması için ara farklanma kavramı hala tartışmaya açıktır. Ancak patolojide metaplazi ya da öteye farklanma kavramı, bir ara farklanma modeli olarak kabul edilebilir. Metaplazide, mide epitel hücrelerinin bazılarının veya kök hücrelerin bağırsak epitel hücrelerine dönüşmesi (intestinal metaplazi) bir ara farklanma modeli olarak kabul edilebilir.¹

2.2. Kendini Yenileme:

Kök hücrelerinin genel özelliklerinden biri de kendini yenileme özelliğidir. Kök hücre, yaşamı boyunca kendi kopyasını alacak şekilde, özelleşme olmaksızın çoğalmakta ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşmektedir. Kök hücreler bölünmeler esnasında bir yandan öncü hücreye farklanacak hücreyi üretirken bir yandan da kendi yedeğini almaktadırlar. (Kök hücre + Öncü hücre) Bu olay *asimetrik hücre bölünmesi* sonucu oluşur ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar. Drosophila yumurtalıklarında, asimetrik bölünme görülmektedir.^{1,8}

Asimetrik hücre bölünmesi, hem hücre içi hem de hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesini gerektirir. Farklı mikroçevrelerde bulunan hücrelerin kaderleri de farklı olmaktadır. Nişi oluşturan hücre dışı matriks bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri kök hücrelerin sayısını kontrol eder. Örneğin Drosophila ovariumunda kök hücrelerin bölünme eksenini niş tarafından belirlenir; mitoz mekiği nişe dik açıyla konumlanır. Böylece nişe yakın taraftaki hücre, kök hücre özelliğini korurken uzaktakiler farklanır.

Hücre içindeki asimetri, bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA'nın

yavru hücrelerden sadece birisine aktarılmasıyla başarılır. Bazı çalışmalar DNA'nın da asimetrik dağıldığını göstermektedir. Bölünmenin sonunda orijinal DNA, yavru hücrelerden birisine giderek kararlanma geçirir, öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücrede yeni DNA sentezi gerçekleşir. Bu mekanizma sayesinde kök hücreler, yeni sentezlenen DNA'da meydana gelebilecek ve birikim ortaya çıkaracak olan mutasyonlardan korunmakta ve her zaman aynı genoma sahip hücreler olarak bozulmadan kalabilmektedir.¹

Her ne kadar kök hücre havuzunu sabit tutabilmek için asimetrik hücre bölünmesi gerekli ise de embriyonun gelişim sürecinde ve doku onarımında gerekli olan yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için *simetrik hücre bölünmesi* de gerçekleşmelidir. Özellikle doku işlevlerinin harabiyet durumlarında bu mekanizmayla kök hücrelerin öncü hücrelere dönüşerek kısa zamanda onarımı garanti altına alır. (Öncü hücre + Öncü hücre) Bununla birlikte kök hücreler de simetrik olarak bölünerek yeni kök hücreler oluşturur. (Kök hücre + Kök hücre)^{1,8}

Hücrelerin bölünme kapasitelerini kromozomların uç kısmında bulunan, *telomer* denilen DNA zincirleri belirler. Telomerler ne kadar uzunsa, hücreler o kadar çok bölünebilirler. Telomerlerin uzun kalmasını sağlayan telomeraz enziminin aktivitesi, kök hücrelerde çok fazladır, bu nedenle çok sayıda bölünme kapasitesine sahiptirler.⁸

2.3. Köklülük:

Köklülük terimi, kök hücreleri diğer hücrelerden ayırt eden hücresel ve moleküler özellikleri tanımlamak için kullanılır. Kök hücrelerin imzası olarak kabul edilen bu özellikler, özgün gen ifadeleri veya transkripsiyon sonrası bir dizi değişimler olup bunlar sayesinde kök hücreler farklanmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar.

Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan belirteçler kullanılarak kök hücre tipi belirlenebilir. Bu belirteçlerden birçoğu farklanma kümeleri (*Clusters of differentiation*, CD) olarak bir başlık altında toplanmıştır. Örneğin;

hematopoetik kök hücreler için en yaygın CD belirteçleri CD33 ve CD45; mezenkimal kök hücreler için ise CD29, CD79, CD10⁵'tir. Farklanma kümeleri dışında, transkripsiyon faktörleri, enzimler veya büyüme faktörleri de belirteçler arasında sayılmaktadır.¹

3. Kök Hücre Türleri:

3.1. Embriyonik Kök Hücre:

İnsan embriyonik kök hücre araştırmaları, son yıllarda gerek toplumlarda gerekse bilim çevrelerinde yoğun ilgi uyandıran bir konudur. Bu durum özellikle çeşitli hastalıklarla mücadelede taşıdıkları yüksek potansiyelden ve insan blastokistlerinden elde edilmelerinin taşıdığı etik boyuttan kaynaklanmaktadır.

Evans ve Kaufman¹¹, 1981'de erken fare embriyosundan embriyonik kök hücre elde etmeyi başarmışlardır. Bu çalışma sonrası, Thomson et al.¹² 1998'de, ilk kez insan embriyonik kök hücre dizilerini laboratuvarında üretmişlerdir. Önceleri bu hücreler, in vitro fertilizasyon yöntemlerinde üreme amaçlı olarak ortaya çıkmış olsalar da daha sonra deneysel araştırmalarda kullanılmak üzere bağışlanmışlardır. 2007 yılında, aynı çalışmacılar, genetik olarak reprogramlama ile bazı özelleşmiş erişkin kök hücrelerden, kök hücre benzeri hücrelerin oluşumuna izin veren özel şartları belirlemiş ve bu hücrelere uyarılmış pluripotent kök hücreler adını vermişlerdir.¹³

Embriyonik kök hücreleri, iki çok önemli özelliğe sahiptirler ve bu özellikler sayesinde rejeneratif tıbbın odak noktası haline gelmişlerdir:

- Kendini yenileme süreci ile farklılaşmaksızın proliferere olma becerisi,
- Farklılaşma için indüklendiklerinde özelleşmiş hücre türleri oluşturma potansiyeli.¹⁴

3.1.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Eldesi:

Embriyonik kök hücrelerin eldesinde genel olarak iki teknik kullanılır: İmmünocerrahi ile izolasyon ve Mekanik izolasyon.¹⁵

- İmmünocerrahi ile izolasyon:

- Zona pellusida (ZP) uzaklaştırılır. (Pronaz gibi ajanlar ile)

- Embriyo anti-insan/anti-fare serumu ile inkübe edilir.
- Blastokist, antikorun yıkanmasından sonra uygun ortama alınır ve trofoblastlar uzaklaşınca kadar beklenir.
- İç hücre kitlesi, embriyonik fibroblast tabakası üzerine alınarak kültüre edilir.

Mekanik izolasyon:

- ZP uzaklaştırılır.
- Trofoblastlar iğne ucu ile disekte edilir.
- Fibroblast tabakası üzerine alınır.

Ayrıca, *somatik hücre çekirdek transferi* yolu ile de embriyonik kök hücre elde edilebilmektedir. Somatik hücre (farklılaşmış erişkin vücut hücresi) çekirdek transferi yönteminde, sırasıyla;

- Somatik bir hücreden alınan çekirdek, çekirdeği çıkarılmış olan bir yumurta hücresine aktarılır.
- Oluşturulan bu yeni hücre fertilize edilerek laboratuvar şartlarında blastokist aşamasına getirilir.
- Tercihe göre;
- Blastokistin iç hücre kitlesinden hücresel tedavilerde kullanılmak üzere kişiye-özel embriyonik kök hücre dizileri oluşturulur. (*Tedaviye yönelik klonlama*)
- Blastokist uterusu yerleştirilir ve bir kopya canlı dünyaya gelir. (*Üreme amaçlı klonlama*)

Tedavi amaçlı kopyalama yönteminde, alıcı ile embriyonik kök hücrelerden elde edilecek dokular arasındaki olası uyumsuzluğu gidermek amaçlanmış olsa da, mayoz sırasında homolog rekombinasyon nedeniyle, türetilen kök hücre ile vericinin DNA'sı tam olarak aynı olmayacaktır. Bunun için partenogenez yöntemi uygulandığında sperm etkisi ortadan kalkacaktır. Partenogenez, herhangi bir sperm etkisi olmaksızın, elektriksel veya kimyasal yolla oositin aktive edildiği, fertilizasyonun taklit edilmesi yöntemidir.¹

Dolly, somatik bir hücrenin embriyonik hale yeniden programlanabileceğini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Dolly örneğinde, verici fibroblastları ve klon arasında genetik farklılık yoktur ancak hücrenin epigenetik durumu farklılık taşımaktadır. Bugün için genetik kopya insanların üretimi dünya genelinde etik olarak kabul görmemektedir.^{1,16}

3.1.2. Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü

Embriyonik kök hücreler, izolasyondan sonra besleyici tabaka varlığında çoğaltılır. EKH'ler başta dağılık sonra birbirleri ile temas eden koloniler şeklinde çoğalmaktadırlar.

Kültür için gerekli besleyici ortam; bazal medium (DMEM), fetal sıgır serumu, non-esansiyel amino asit, sodyum piruvat, β -merkaptotanol, L-glutamin, penisilin/streptomisin ve *lösemi inhibe edici faktör (LIF)*'den oluşmaktadır. (LIF, IL-6 ailesinden bir sitokin olup, fare EKH'lerinin farklılaşmasını önlediği keşfedilmiştir.)¹⁵

İnsan embriyonik kök hücreleri, her 6-7 günde bir subkültüre edilir ve mekanik ya da enzimatik ayrıştırma ile elde edilen küçük kümeler fare embriyonik fibroblast ve fibroblast büyüme faktörü (FEF+bFGF) ya da matrigel üzerine alınır.²

3.1.3. Embriyonik Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

- Damla metodu
- Direkt olarak farklılaşmayı sağlayıcı kültür ortamına transfer

Damla metodu daha çok fare embriyonik kök hücreleri için kullanılır. LIF çıkartılan medyum kullanılır. Her damlaya yaklaşık 5000 hücre transfer edilir. İnsan embriyonik kök hücrelerinde ise manuel olarak kolonilerin parçalanması sonucu elde edilen hücre grupları direkt olarak farklılaşmayı sağlayıcı kültür ortamına konulurlar.

Farklanma için çeşitli doğal veya yapay maddeler kullanılır. Örneğin; embriyonik kök hücrelerin, retinoik asit varlığında nöral diferensiyasyon gösterdiğini rapor edilmiştir.¹⁷

3.1.4. Embriyonik Kök Hücrelerin Kullanım Alanları ve Beklentiler

Teorik olarak embriyonik kök hücrelerin kullanıldığı temel araştırma konuları arasında; insan gelişimi, toksikoloji ve transplantasyon tıbbı sayılabilir.

Bununla birlikte, embriyonik kök hücreler ile ilgili yapılan çalışmalar, bu hücrelerin yakın gelecekte tedavisi şu anda mümkün olmayan birçok hastalık için umut vaad ettiğini göstermektedir. Böylece kendini yenileme ve onarım kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıklar tedavi edilebilecektir. Bunlar arasında Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, kaza sonucu oluşan felçler ve nöronların yitilmesiyle gelişen diğer hastalıklar, kalp kası yetmezliği, osteoartrit, kemik-kıkırdak kayıpları, kanser ve bağışıklık sistemi hastalıkları ve şeker hastalığı sayılabilir.^{1,2}

3.1.5. Embriyonik Kök Hücrelerin Kullanımı Kısıtlayan Nedenler

EKH'lerin medikal olarak kullanımını kısıtlayan birkaç faktör vardır. Bunlar:

- Hayvan bazlı malzeme ve besleyici tabaka:

İnsan embriyonik kök hücrelerin farklılaşmamış basamakta devamlı kültürü, hayvan bazlı malzeme ve besleyici tabakayı gerektirir. Bu da patojen cross-transferi riskini doğurur.

- Öngörülemeyen şekilde farklılaşma ve immün red:

İnsan embriyonik kök hücreleri yüksek genomik instabilite gösterirler ve uzun dönem gelişmeden sonra öngörülemeyen şekilde farklılaşabilirler. Farklılaşmış EKH'ler immün redde neden olabilecek moleküller ekspresyone edebilirler.

- Hastadaki uygun bölgeye yerleştirilmesi ve uygun fonksiyona adaptasyonunun sağlanması konusundaki sorunlar:

Kontrollü bir şekilde çoğaltılıp spesifik bir hücre tipine farklılaştırılan hücrelerin hastadaki uygun bölgeye nasıl yerleştirileceği, uygun fonksiyona adapte olmalarının nasıl sağlanacağı terapi öncesi üstesinden gelinmesi gereken sorunlardır.

Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA), alt lomber hasarlı on paraplejik

hastada spinal kord onarımı için iEKH kaynaklı nöronların kullanılacağı araştırmalara onay vermiştir. Bizim ülkemizde ise, T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2006'da yayınladığı genelgeyle çalışmalar durdurulmuştur.¹

3.2. Kordon Kanı

Gebelik boyunca anneyle bebek arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini sağlayan göbek kordonundaki kana kordon kanı denir. İçerisinde erişkin kanında gördüğümüz eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücrelerine ilaveten erişkin kanından daha yüksek çoğunlukta kök hücreler de bulunur. Eski yıllarda atılan kordon kanı artık tedavi amacıyla kullanılabilen ya da özel koşullarda dondurularak saklanabilmektedir.

Bugün için tıbben kabul gören tek kullanım alanı, kan ve bağışıklık sistemi hastalıklarıdır.

Kordon kanı az hacimde (yaklaşık 100ml) olduğu için içerdiği toplam hematopoetik kök hücre miktarı da kemik iliği ya da büyüme faktörü ile uyarılmış periferik kandan elde edilenden daha azdır. Bu nedenle, şimdiye kadar çoğunlukla çocuklara uygulanmıştır. Ancak son dönemde birkaç bebekten alınan kanın tek bir hastaya da uygulanabildiği fark edilince erişkinlerde de kullanılabilir hale gelmiştir.

Tüm dünyada şu an için en çok kullanıldığı durum, kök hücre nakli tedavisi gereken ancak aile bireyleri arasında veya uygun donör bulunamayan hastaların tedavisi amacıyla kullanımdır.¹

3.2.1. Kordon Kanı ile Kök Hücre Nakli

1989 yılında ilk kordon kanı nakli ile tedavi edilen Fanconi aplastik anemi olgusu yayınlanmış ve hasta 20 yıldır sağlıklı bir şekilde hayatına devam etmektedir.

Ülkemizde ilk defa 1995 yılında Ankara ve Hacettepe Üniversitelerinin ortak çalışmaları ile talasemili bir hastaya nakil yapılmış ancak rejeksiyon gerçekleşmiş. Bugüne kadar kardeşler arası toplam 10, akraba dışı ise 27 adet kordon kanı nakli yapılmıştır.^{1,20}

3.2.2. Kordon Kanı Kullanımının Avantajları

- Daha uzun telomer ve yüksek proliferatif kapasiteye sahip kök hücre içeriği
- Başka bir insanda immünolojik olarak kolay uyum göstermesi
- Verici için zahmet oluşturmaması
- Dondurulup saklanabilmesi

3.2.3. Kordon Kanı Seçeneğinin Gerekli Olduğu Durumlar

Aile içinde, İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) tam uygun veya en fazla 1 antijen uyumsuz bir verici, kemik iliği/periferik kök hücre ideal vericisidir. Bu özelliklere sahip biri bulunmadığı takdirde, akraba dışı vericiler devreye girmektedir. Akralar arası nakillerde 1 antijen uyumsuzluğuna tolerans gösterebilirken akraba dışı verici araştırmalarında hem HLA-A, -B, -C'den oluşan Class 1, hem de HLA-DRB1 bölgelerinin yüksek çözünürlükte tiplendirilmesinde alel düzeyinde uyum sağlanmalıdır. Aksi takdirde bir alel uyumsuzluğunda *Graft versus host hastalığı* (GVHH) sıklığı artmakta, birden fazla alel uyumsuzluğunda ise tam uygun olanlarla kıyaslandığında yaşam süresi kısalmaktadır. Eğer hastanın primer hastalığı acil transplantı gerektirmiyor ve/veya hastanın HLA tipi çok nadir görülen özelliklere sahip değilse alel düzeyinde uygunluk gösteren bir kemik iliği vericisi öncelikle araştırılmalıdır. Fakat böyle bir verici belirli bir süre içinde bulunamıyorsa, 1 veya 2 (hatta bazen 3) antijen uyumsuz kordon kanı seçeneği araştırılır.¹

3.3. Erişkin Kök Hücre

Erişkin kök hücreleri doku ya da organlarda bulunan, kendini kopyalama özelliğine sahip, dokudaki bazı ya da tüm özelleşmiş hücrelere dönüşebilen, farklanmamış hücrelerdir. Erişkin tip kök hücreler dokularda nadir bulunurlar. Birincil görevleri buldukları dokuda hücre ölümü veya doku hasarı meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir etmektir. Buldukları ortama göre farklı davranışlar sergilerler. Örneğin; hematopoetik kök hücreler olgunlaşmış kan hücrelerine dönüşmek üzere kemik iliği tarafından sürekli üretilirler. Bu hücrelerin en önemli görevleri kan hücrelerini yenilemektir. Bunun tersine ince

bağırsaktaki kök hücreler sabittir (sürekli üretilmezler) ve fiziksel olarak oluşturdukları olgun hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Kök hücresi içerdiği bildirilen erişkin organ ve doku listesine her gün bir yenisi eklenmektedir. Bunlar arasında kemik iliği, periferik kan, beyin, spinal kord, dış kökü, kan damarları, çizgili kas, derinin epitel tabakası, sindirim sistemi, kornea, retina, karaciğer ve pankreas bulunmaktadır.^{1,18}

3.3.1. Hematopoetik Kök Hücre

Kemik iliğinde; hematopoetik, endotelyal ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır. Hematopoetik kök hücreler kan hücrelerini, endotelyal kök hücreler damarları, mezenkimal kök hücreler ise kemik, kıkırdak, kas, sinir gibi farklı yapıları oluşturmaktadır. Doktorlar 40 yıldır donörün kemik iliğinden (genelde kalça kemiği), anestezi altında iğne yardımı ile kemik iliği hücreleri elde etmektedirler. Bu hücrelerin her 100.000 de biri uzun vadede kan elemanlarını oluşturan kök hücrelerdir. Diğerleri stromal hücreler, stromal kök hücreler, kan progenitör hücreleri ve matür beyaz ve kırmızı hücrelerdir.¹⁸

Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri, hücre siklusunun G0 evresinde sessiz olarak kalmaları, yapışmaları, proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya gitmeleri, dolaşıma girmeleri gibi süreçler kemik iliğindeki özel mikroçevrelerde sağlanır. *Niş* adı verilen bu bölgede, kemik iliğine özgü hücreler olan osteoblastlar, osteoklastlar, stromal hücreler, hücre dışı matris bileşenleri, moleküller, faktörler, sitonkinler vardır ve bunlar arasındaki etkileşimler ile hematopoetik kök hücre fonksiyonları ve hematopoezin sabit kalması sağlanır. (Tablo-2 ve Tablo-3)^{1,18}

Tablo-II. Hematopoezde rolü olan büyüme faktörleri ve interlökinler

Eritropoez	Epo, IL-3, TPO
Granülopoez	G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF ve IL-6
Lenfosit Yapımı ve Olgunlaşması	IL-7, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, FL, SC, IL-13, IL-6
Monosit Yapımı	M-CSF, GM-CSF, IL-3
Eosinofil Yapımı	IL-5, IL-3, GM-CSF, SCF
Mast Hücre Yapımı	IL-3, SCF

Tablo-III. Hematopoezde rol alan sitokinler:

Koloni-Stimüle Edici Faktörler: Eritropoietin (EPO) Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF) Granülosit Makrofaj-Stimulan Faktör (GM-CSF) Monosit/Makrofaj-Stimulan Faktör (M-CSF) İnterlökin-3 ve 5 (IL-3 ve IL-5) Trombopoietin (TPO)	Hematopoetik Aktiviteye Sahip Olan İnterlökinler: İnterlökin-1 (IL-1) İnterlökin-10 (IL-10) İnterlökin-2 (IL-2) İnterlökin-12 (IL-12) İnterlökin-4 (IL-4) İnterlökin-17 (IL-17) İnterlökin-7 (IL-7) İnterlökin-20 (IL-20) İnterlökin-9 (IL-9)
Ko-Stimülator Sitokinler: Kök Hücre Faktörü (Stem Cell Factor, SCF) Flt-3 Ligand (FL)	Baskılayıcı Aktivitesi Olan Sitokinler: Kemokinler İnterferonlar Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF-alfa) Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF-beta)

Bu hematopoetik büyüme faktörleri, interlökinler ve farklı sitokinlerin etkileri altında hematopoetik kök hücreler, nişlerinde bölünme ve farklılaşmaya başlarlar.^{1,18}

3.3.2. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler erişkin kök hücre tipidir. Bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilirler. İlk kez 1976 da Friedenstein tanımlamıştır. Bu çalışmacı, fetal buzağı serumu kullanarak kemik iliği kültürü yaptığında adhezyon yeteneği olan fibroblasta benzer hücre kolonilerinin olduğunu ve bunların yağ ve kemik hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduğunu rapor etmiştir.

Bu hücrelere aynı zamanda, *mezenkimal stromal hücreler* ya da *multipotent mezenkimal stromal hücreler* de denilmektedir. Plastiğe yapışma, stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyeli gibi özellikleri, hücrelerin mezenkimal kök hücre (MKH) olarak tanımlanmasını sağlarlar.^{1,8,19}

Mezenkimal kök hücrelerin en çok bulunduğu yer kemik iliğidir. Yaklaşık 2-100/1x10⁶ MKH/mononükleer hücre oranında bulunurlar. Kemik iliği dışında, kemik/periost, kas dokusu, diş pulpası, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, periferik kanda bulunmaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin, osteoblastik, kondrojenik ve adipojenik hatlar gibi mezenkimal kökenli dokular dışında, son yıllarda nöronal ya da kardiyomyojenik hatlar gibi mezenkimal kökenli olmayan dokuların hücre hatlarına da farklanabildikleri gösterilmiştir.²¹

Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokulardan bağımsız plastik kültür kaplarına yapışabilme, fibroblast benzeri morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşma ve bazı yüzey işaretleri (%95'ten fazla oranda CD105, CD73, CD90 işaretleri) taşımaları gibi ortak özellikleri vardır ancak farklanma potansiyeli ve fonksiyonel özelliklerinde köken alınan doku tipine göre bazı farklılıklar olabilmektedir. Bu nedenle spesifik bir bölgenin tedavisi için o bölgeden kök hücre almak doğru olacaktır. Ayrıca, kemik iliğinde bile çok az sayıda vardır ve adheziv özellikleri nedeniyle buldukları dokudan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar vardır. Klinik uygulamalarda ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere in vitro çoğaltılmalıdır. İn vitro çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücrelerdir ve kültürde proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini korumaktadırlar. Laboratuvarında çoğaltılan MKH'ler ışık ve faz kontrast mikroskopta incelendiğinde iğ şekilli olduğu ve fibroblast benzeri topluluklar oluşturdukları bilinmektedir.

Mezenkimal kök hücreler, çeşitli özellikleri sayesinde dokuda meydana gelen hasarın tamirine katkı sağlamaktadırlar. Bu özellikler arasında, hasarlı hücre ile füzyon yeteneğine sahip olmaları, biyoaktif maddeler ve çözünür faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokin gibi) salgılamaları, migrasyon özellikleri sayesinde dokuya ulaşabilmeleri ve immünmodülatör, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve anjiyogenik etki sağlamaları sayılabilir. Kök hücrelerin nişlerinden çıkıp hasarlı bölgeye göç etmelerini ise hasarlı bölgeden salınan stromal kökenli faktör-1 (SDF-1), monosit kemoatraktan protein (MCP-1) gibi çözünür faktörler sağlamaktadır.^{1,18,19,21,22}

3.3.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro kültürleri

- MKH'ler kültüre bırakıldıklarında plastik kabın tabanına yapışırlar.
- Çoğalan hücreler %0.25 tripsin-EDTA ile kaldırılarak yeni kültür

kaplarına ekim yapılır.

- 3 güne bir taze vasat eklenir.
- İstenilen sayıya ulaşıncaya kadar devam eder, yedekleme için dondurulabilir.
- 24-48 saat içinde yapışmayan hücreler uzaklaştırılır.

Ancak hatırdaki tutulmalıdır ki, pasaj sayısının artmasıyla birlikte fazla manipule edilmiş hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkmakta ve bunların hücrelerin in vivo durumundan sapmalara yol açabileceği bilinmektedir. İlerleyen pasajlarda sitogenetik bozukluk, telomer kısalması, aktin birikmesi ve tutunmanın azalması gibi durumlar görülmekte olduğundan, 3'ten fazla pasajlamamak daha doğru olacaktır^{1,21,22}.

3.3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünolojik Profili

Mezenkimal kök hücreler, immünolojik reaksiyonları hem arttırıcı hem de baskılayıcı yeteneğe sahiptir. Bir otokrin interferon-gamma (IFN- gamma) bağımlı yolak aracılığıyla antijen sunan hücre olarak görev yaparak immünolojik reaksiyonları arttırıcı etki yaparlar. Bununla birlikte, eğer INF-gamma seviyesi belirli bir düzeyin üzerine çıkarsa, bu durumda antijen sunumu direkt olarak baskılanır ve immünolojik reaksiyona baskılayıcı etki yaparlar. İmmün aktivitedeki bu düzenlenmenin, mezenkimal kök hücrelerin yabancı antijenlere karşı korunmayı sağlamakla birlikte, aşırı immün cevabın yol açtığı hasarın sınırlandırılması için de olduğu düşünülmektedir. Ayrıca hücrelerin yüzeyinde HLA-DR ve ko-stimülatör molekül ekspresyonları yoktur ve immünsupresif HLA-G ekspresyonuna sahiplerdir.

İmmün reaksiyondan kaçabildikleri için in vivo kullanımda doku grubu uyumu şart değildir. Bu da, terapötik amaçla kullanımda avantaj sağlamaktadır.^{1,21,22}

3.3.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dezavantajları

Mezenkimal kök hücreler, çok geniş bir yelpazede kullanım potansiyeline sahip olmalarının yanında, in vitro uzun süren manipulasyona ihtiyaç

duymaları, bu in vitro uygulamaların hücrelerde oluşturabileceği değişiklikler, ilerleyen pasajlarda yaşlanma belirtileri göstermeleri, immünmodülatör etkinin istenilen yönde olmama riski taşımaları gibi dezavantajları vardır. Bununla birlikte, terapötik uygulamalar için ideal hücre dozu, verilmiş şekli, zamanı ve yeri gibi konuların henüz açıklığa kavuşmamış olması kullanımlarını kısıtlamaktadır.^{1,22}

3.4. Kanser Kök Hücreleri:

Çeşitli kanser hücresi tiplerinde, hücrelerin, kök hücrelerde de bulunan yüzey belirteçlerine sahip oldukları gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin kök hücreler ile olan benzerlikleri, onlardan köken alıp almadığını düşündürmektedir.

Kanser kök hücreleri ve normal kök hücreler arasındaki benzerlikler; asimetrik hücre bölünmesi özelliği göstermeleri, kendini yenileme için kullanılan Wnt, Sonic Hedgehog (SHH), Notch gibi ortak sinyal yollarına sahip olmaları, benzer transkripsiyon faktörleri (Oct-4, Nanog, Sox2, Nodal, Klf4 gibi) eksprese etmeleri, ilaçlara karşı direnç göstermeleri, metastaz ve belirli bir bölgeye yerleşme ile ilgili ortak yüzey reseptörlerine (CXCR4, CD133, c-kit, c-met) sahip olmaları şeklinde özetlenebilir.

Kök hücrelerin kendini yenileme ve asimetrik bölünme özellikleri, kanser hücresindeki telomeraz aktivitesindeki artışla birleşince sonsuz kez bölünme durumu ortaya çıkar. Hücrelerin malign karakter kazanıp göç etmeleri (metastaz), apoptozu engellemeleri, hücre zarındaki taşıyıcı mekanizmaları değiştirmeleri ve tutunmadan büyüebilmeleri gibi nitelikler belirginleşir ki bunlar kanser tümör hücrelerinin de özellikleridir.

Bunların yanı sıra özellikle embriyonik kök hücrelerde varlığı bilinen bazı hücre sinyal yollarının ve bunlarda rol alan proteinlerin bazı kanser türlerindeki aşırı düzeye eriştiği veya bozulduğu ortaya çıkarılmıştır.^{1,9,10}

4. Parkinson Hastalığı, Diabetes Mellitus ve Kök Hücre Tedavileri

Parkinson hastalığı hareketlerde yavaşlama, kaslarda sertlik ve tremor ile karakterize nörodejeneratif bir bozukluktur. Substantia nigradaki dopaminerjik

nöronların ilerleyici şekilde dejenerasyonu ve sonuçta putamen ve kaudat çekirdeklerdeki dopamin seviyesinde azalma olur. Genelde farmakolojik olarak dopamin yerine konur.

Yapılan çalışmalarda, insan mezensefalonundan elde edilen dopaminerjik hücrelerin implante edildiği hastaların yaşayabildiği, striatal dopamin yetersizliğini restore ettikleri ve hastalığa ilişkin motor semptomların azaldığı görülmüştür. (özellikle bradikinezi ve rijiditede)

Ancak genel olarak allogreftlerdeki sorun immün rejeksiyondur. Bazılarında da diskinezi gelişmektedir. Bu konu ile ilgili olarak, dopaminerjik nöronlarla birlikte serotonerjik nöronların da transplantasyona katıldığı ve bu greftlerin diskineziye yol açtığı düşünülmektedir ve hücresele tedavi için çalışmalar hala sürüyor.^{1,23}

Tip I diabetes mellitus, insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün mekanizmalarla harap olması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Günümüzde diabetik nefropati nedeniyle böbrek nakli yapılan hastalara eş zamanlı olarak pankreas nakli de yapılmaktadır. Ancak verici azlığı ve uzun süre bağışıklığı baskılayan ilaçların kullanımı gibi zorlukları vardır.

Tip I diabet hastalığının, kök hücre tedavisi ile ilgili olarak iki strateji geliştirilmiştir. Birincisi, pankreas kaynaklı ya da pankreas dışı (karaciğer, kemik iliği) kaynaklı kök hücrelerden beta hücreleri elde edilmesidir. Avantajlı görünse de ne kadar beta hücrelerine benzerse, otoimmünite nedeniyle ortadan kaldırılma riski o kadar fazla olacağından beklenen sonuç elde edilemeyebilir. İkinci yol ise, uygun şekilde çoğaltılabilen hücrelere insülin üretimi yapacak şekilde gen transferi yapılmasıdır. Böylelikle otoimmün saldırıya maruz kalmayan hücrelerden insülin üretimi sağlanacaktır. Ancak bu konu ile ilgili çalışmalar yeterli değildir ve araştırmalar hala devam etmektedir.¹

5. Kök Hücre Araştırmalarında Etik ve Yasal Düzenlemeler:

Her ülkenin tedavi ve araştırma amaçlı kök hücre uygulamalarına yasal ve ahlaki yaklaşımı farklılık göstermektedir. Canlılığın başlangıcının tanımı tüm

dinlerde aynı değildir. Tüm dünyada, insan klonlamanın (üreme amaçlı klonlama) yasaklanması konusunda ortak bir görüş bulunurken, tedavi amaçlı kullanım açısından farklı görüşler kabul edilmektedir.

- İrlanda'nın bu konudaki görüşü, doğmamış çocuğun yaşama hakkı annenininki ile eşit olduğu yönündedir.
- Almanya ve Avusturya, implante edilmeyen yumurta hücresinin in vitro fertilizasyonu yasaklanmıştır.
- İsveç ve Finlandiya'da ise bağışlanan embriyolar, implantasyon için kullanılmadıkları takdirde deneysel amaçla kullanılabilir.
- İngiltere'de belirli konular (özellikle tıpta üreme mekanizmalarına yönelik ya da genetik araştırmalarda ve kromozom anomalilerinin tanısında) ile yapılan çalışmalarda esneklik sağlanmıştır.

Ülkemizde ise, tüp bebek uygulamaları yıllardır yapılmakta ancak embriyonik kök hücre çalışmaları yasaklanmış durumdadır. Tüm dünyada kök hücre teknolojilerindeki hızlı ilerlemeler nedeniyle, bu konunun, ülkemizdeki ilgili alanların uzmanları tarafından tartışılıp bazı kural ve düzenlemelerin gerçekleştirilmesi, hatta sürekli olarak yasal bir kurul tarafından takip edilmesi gerekmektedir. Böyle bir düzenleme, tıp alanındaki olumlu gelişmelere katılmamızı sağlayacaktır.¹

Kaynaklar

1. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. 1, Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi, 2009.
2. Özel HB, Ozan E, Dabak Ö. Embriyonik kök hücreler. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 2008; 28: 333-341.
3. Eiraku M, Tohgo A, Ono K et al. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. Nat. Neurosci, 2005; 8(7): 873-880.
4. Cotter EJ, Ip HSM, Powderly WG et al. Mechanism of HIV protein induced modulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. BMC Musculoskelet Disord, 2008; 9: 33-44.
5. Mutlu AD, Cavallin LE, Vincent L et al. In vivo growth-restricted and reversible malignancy induced by Human Herpesvirus-8/ KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. Cancer Cell, 2007; 11(3): 245-258.
6. Wang X, Moutsoglou D. Osteogenic and adipogenic differentiation potential of an immortalized fibroblast-like cell line derived from porcine peripheral blood. In Vitro Cell Dev Biol-Animal, 2009; 45: 584-591.
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 2007; 131: 1-12.

8. Sağsöz H, Ketani MA. Kök hücreler. Dicle Üniv Vet Fak Derg, 2008; 1(2): 29-33.
9. Öktem G, Uslu S, Uysal A et al. Kanser kök hücresi ve Notch yolağında umut veren ortak embriyonik dönem inhibisyonu. Cerrahpasa J Med, 2009; 40: 23-27.
10. Wend P, Holland JD, Zeibold U et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. Semin Cell Dev Biol, 2010; 21(8): 855-863.
11. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 1981; 292:154-156.
12. Thomson JA, Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 1998; 282: 1145-1147.
13. Yu J, Vodyanik MA, Otto K et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 2007; 318: 1917-1920.
14. Türkşen K. İnsan embriyonik kök hücreleri izolasyon, idame ve farklılaşma (diferansiyasyon). 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. Antalya-Türkiye, 9 Kasım 2006: 9-15.
15. Vatanserver HS. Embriyonik kök hücreler. Sağlıkta Birikim Dergisi, 2009; 1 (5): 25-44.
16. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature, 1996; 380:64-66.
17. Kim M, Habiba A, Doherty JM et al. Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. Developmental Biology, 2009; 328: 456-471.
18. NIH Stem Cell Information Home Page. Erişim: <http://stemcells.nih.gov/index>, 2011. Erişim tarihi: 10.09.2011.
19. Odorico J, Zhang S, Pedersen R. Human embryonic stem cells. 1st. Ed., New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2005, 81-97.
20. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med, 1989; 321(17): 1174-1178.
21. Rastegar et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. World J Stem Cells, 2010; 2(4): 67-80.
22. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Communication and Signaling, 2011; 9(12): 1-14.
23. Kim HJ. Stem cell potential in Parkinson's disease and molecular factors for the generation of dopamine neurons. Biochimica et Biophysica Acta, 2010; 1812(1):1-11.

Yazışma Adresi :

Arş. Gör. İrem MATUR
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
01330 Balcalı/ADANA

Tel: 0 322 338 60 60 / 3493
E-mail: iremmatur@gmail.com