

THD 2008

Türk Hematoloji Derneği'nin
Eğitim Çalışmalarından

MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KURSU

12 Ekim 2008

Çeşme, İZMİR

Kurs Kitabı

www.thd.org.tr



İçindekiler

- 5 BİLİMSEL PROGRAM**
- 7 MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLARI VE ÜRETİMİ**
Ercüment Ovalı
- 11 MEZANKİMAL KÖK HÜCRELERİN TANIMLANMASI ve FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ**
Mustafa Yılmaz
- 14 MEZANKİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMUNREGULATUAR FONKSİYONLARI**
Ferit Avcu
- 17 HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE**
Gülsan Türköz Sucak
- 21 KAS-İSKELET SİSTEMİ HASTALIKLARINDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI**
Ali Uğur Ural
- 24 GASTROENTEROLOJİK HASTALIKLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI**
Murat Kantarcıoğlu, Sait Bağcı
- 26 NÖROLOJİK HASTALIKLARDA MKH KULLANIMI**
Ayhan Attar
- 27 KARDİAK VE VASKÜLER HASTALIKLARDA MKH KULLANIMI**
Mustafa Özbaran
- 28 İNFERTİLİTE VE MKH**
Erkut Attar



MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KURSU

Bilimsel Program

12 Ekim 2008, Pazar

Açılış Konuşmaları

Muhit ÖZCAN (Türk Hematoloji Derneği Bşk.)

Osman İLHAN (Kök Hücre Biyolojisi ve Araştırmaları Bilimsel AK. Bşk.)

1. Oturum

Oturum Başkanı: *Osman İLHAN*

MKH kaynakları ve elde edilmesi

Ercüment OVALI

MKH tanımlanması, fenotipik özellikleri

Mustafa YILMAZ

MKH'lerin immünregülatuar fonksiyonları

Ferit AVCU

2. Oturum

Oturum Başkanı: *Serdar Bedii OMAV*

Hematolojik hastalıklarda MKH kullanımı

Gülsan SUCAK TÜRKÖZ

Kas-iskelet sistemi hastalıklarında MKH kullanımı

Ali Uğur URAL

Gastroenterolojik hastalıklarda MKH kullanımı

Sait BAĞCI

3. Oturum

Oturum Başkanı: *Zafer GÜLBAŞ*

Nörolojik hastalıklarda MKH kullanımı

Ayhan ATTAR

Kardiak ve vasküler hastalıklarda MKH kullanımı

Mustafa ÖZBARAN

İnfertilite ve MKH

Erkut ATTAR



MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLARI ve ÜRETİMİ

Ercüment Ovalı

Karadeniz Teknik Üniversitesi ATİ Tek. Proje Koordinatörü,
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Trabzon

Mezenkimal kök hücre ve kaynakları

1970'lerde Friedenstein ve arkadaşlarının fibroblast kolonisi yapan ünit (CFU-F) olarak tanımladığı nonhematopoetik kemik iliği progenitörleri olan mezenkimal kök hücreler (MKH) bugün özellikle immünoregulator özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlaç Hücre - Cell Drug kapsamına almıştır (1).

Memeli kemik iliği mikro çevresi kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen birçok farklı elementten oluşur. Bu elementlerden biride mezenkimal hücreler olup kas, kan, vasküler ve ürogenital sistemi oluşturan mezodermal orijinli primordial hücrelerdir. Bugün mezenkimal hücrelerin hematopoetik karakterli olmayan bir grubunun, mezenkimal ve mezenkimal dışı hücreleri oluşturan kök hücreler olduğu saptanmış olup bu hücrelere mezenkimal kök hücreler adı verilmektedir. Kemik iliğinde her 10.000-100.000 tek çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu hesaplanmaktadır (Bu oran kordon kanında 1/10⁸e kadar düşebilmektedir). Çocuklarda 29 CFU /1 milyon tek çekirdekli hücre oranı varken ileri yaşlarda bu oran 3.2CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar inmektedir (2). Bu hücrelerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür (3). Bugün MKH'ler bir çok farklı dokulardan

- Kemik iliği
- Kemik trabeküler dokusu
- Kordon kanı
- Placenta, Wharton jeli
- Amnion mayi,
- Yağ dokusu,
- Tendonlar,
- Snovyal membran,
- Karaciğer,
- Dışten elde edilebilmektedir.

MKH'ler homojen bir topluluk olmayıp içerisinde değişik kök hücreleri barındırmaktadır. Multipotent erişkin progenitör hücreler (MAPC) ve multilineage uyarılabilir kök hücre (MİAMİ) ve çok küçük embriyonik hücre benzeri kök hücreler (VSEL) bunlardan en ilginç olanlardır. Bu hücrelerin klasik MKH ve hemapoetik kök hücrenin öncülü olduğu düşünülmektedir. Önemli olan bir bulguda MKH sayısının yaşla ters orantılı olarak değiştiğidir. Yapılan araştırmalar fetal MKH'lerin sadece sayısal açıdan değil erişkin kök hücrelerden doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immünolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir (4,5). Ancak MKH laboratuvarında farklılaştırılması-üretimi ile bu farklılıklar kaldırabilmektedir.

MKH'nin elde edilmesi

Kliniğe yansıyacak bir araştırma için elde edilecek hematopoetik veya mezenkimal kök hücreler için 4 temel kaynak söz konusudur:

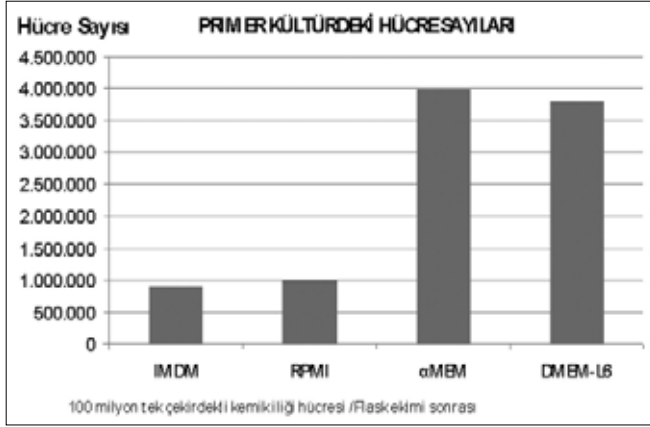
- 1- Kemik iliği
- 2- Kordon kanı
- 3- Periferik kan
- 4- Yağ dokusu (burada tartışılmayacaktır)

İlk üç kaynaktan elde edilecek hücrelerin toplanmasında periferik kan için G-CSF ile indüksiyon sonrası aferezis yöntemi tercih edilirken, kemik iliği ve kordon kanı için, kaynağından direk alım yöntemi kullanılmaktadır. Burada birinci soru; hücrelerin alınmasında kullanılacak antikoagülan madde ne olmalıdır? Önerilen iki temel madde vardır:

- 1- ACD veya CPD içeren solüsyonlar (sitrat ve dekstroz içeren solüsyonlar)
- 2- Prezervatifsiz heparin

Klasik heparin bu anlamda hücreler için toksik davrandığından tercih edilmemektedir. Ancak 10Ü/ml dozunda klasik heparin (10 cc ürün için 100Ü Grekli olacak olup ülkemizdeki heparinler 5000Ü/ml dozundadır buda 20µl heparin anlamına gelecektir). alım ile kullanım arasındaki süre 24 saatten





Grafik 1. Kullanılan mediumların primer kültür üzerine etkisi (ATİ teknoloji-yayınlanmamış veri)

kısa sürdüğünde kullanılabilir. İkinci soru ise; hücreler kaynağından alındıktan sonra nasıl izole edilmelidir? Bunun için 4 temel yöntem vardır:

- 1- Dansite gradient yöntemi ile izolasyon
- 2- Basit sentrifügasyon ile izolasyon
- 3- Pozitif seleksiyon ± Negatif seleksiyon

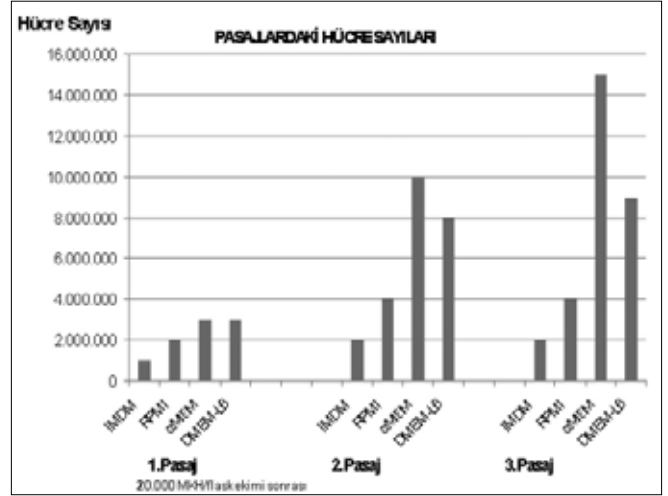
Dansite gradient yöntemi ile izolasyonda kullanılan maddelerin toksisite olasılıkları nedeniyle kullanımı tartışma konusudur. ABD bu amaçla ficol, percoll kullanımı çoğu kez kabul edilmekle birlikte AB kabul etmemekte - tartışmaktadır, izolasyonda antikor kullanımı ile CFU-F üretimini 950 kez artırabilmek mümkündür, ancak hücrelerin pozitif veya negatif seleksiyonla izolasyonunda da antikor kullanımı da tartışmalıdır. Bu amaçla kullanılan STRO-1, CD49a gibi antikorların CD34 gibi klinik derecede (Clinical grade) olmaması, kullanımını engellemekte ve üretim maliyetini artırmaktadır (1). Bu nedenle en çok tercih edilen yöntem basit sentrifügasyon yöntemidir. Pür sentrifügasyon yönteminde ürün bufy-coat tabakasından izole edilirken bir miktar eritrosit ürün içerisine karışabilmektedir. Bu karışmanın kök hücreyi olumsuz etkilemediği gibi kültürünü de desteklediği bilinmektedir (6).

MKH Üretilmesi

Bugün MKH üretiminde değişik protokoller kullanılmaktadır. Temel teknik plastiğe yapışma özelliği gösteren Kemik iliği mononükleer hücrelerinin 5-7 günde yaptıkları kolonilerin 14. gün toplanarak yeniden pasajlanmasıdır.

Üretimde önerilen hücre yoğunluğu

Bu teknikte temel nokta hücrelerin düşük yoğunlukta kültüre edilmeleridir (2500-2.5hücre/cm²). Ancak klinik amaçlı, yüksek sayıda üretime ihtiyaç olan durumlarda düşük yoğunluklarda üretim, gereken oranda üretilecek yüzeyin büyüklüğü nedeniyle sorun yaratmaktadır. Bu nedenle klinik üretimler için 1000 hücre /cm² oranı AB tarafından kabul edilen standarttır.



Grafik 2. Kullanılan mediumların pasajlar üzerine etkisi (ATİ teknoloji-yayınlanmamış veri)

Üretimde önerilen yüzeyler

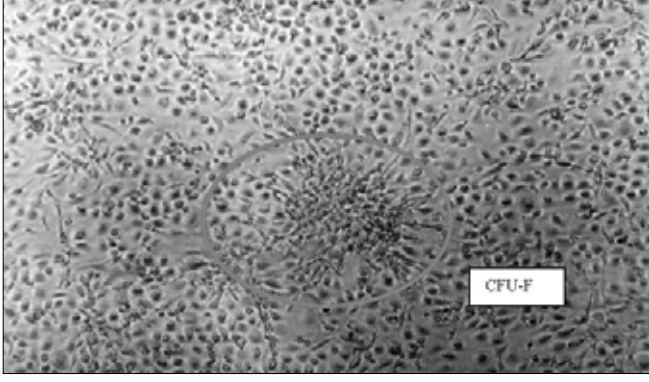
Plastiğe yapışma hücre üretiminde son derece önemli olduğundan kullanılan hücre kültür kaplarının plastik özellikleri önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada Falcon, Costar, Nunc, Greiner hücre kültür plastik şişeleri karşılaştırılmış en iyi sonucun Falcon ikinci sırada ise Costar kültür şişelerinde olduğu rapor edilmektedir (7).

Üretim için önerilen medium içeriği

En sık kullanılan medium alfa-MEM(Minimum essential medium) ve DMEM-LG(Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose) olup, %10 Fetal kalf serum veya AB pozitif serum ile desteklenirler(1,5,8) Bu metotla hücreler 38 defa ikiye katlanabilirler. Bizim bulgularımız alfa-MEM'in üretim için en ideal seçim olduğunu göstermektedir (Grafik 1 ve 2). Bu bulgu Sotiroulou PA, ve ark. bulgusu ile benzerdir (7). Ancak kullanılacak serum içeriklerinde Sensebe L, FCS verilerinin daha iyi olduğunu ifade etmekteyse de bizim verilerimiz otolog serumun FCS'den daha iyi olduğunu göstermektedir (9). Bu noktada yapılan çalışmalar aktive platelet zengin plazmanın MKH üretiminde daha etkili olacağına işaret etmektedir (10). Ancak klinik amaçlı üretimlerde AB bu amaçla test edilmiş FCS kullanımına izin vermekte ise de Viral-prion protein açısından emniyeti ve MKH'lerin üretim esnasında yabancı antijenik stimuluslarla uyarılmamış olmasının getireceği avantajlar nedeniyle Otolog veya insan kaynaklı serum kullanmanın, tartışılmazlığı açıktır. Bu günlerde çok çalışılan bir konuda serumsuz medianın geliştirilmesi olup henüz böyle bir media elde edilememiştir.

Üretimde detach-kaldırma amaçlı kullanılacak enzimler:

MKH üretimi primer kültür (F0) ve tekrarlayan pasajlardan oluşur (F1,2 vb) Pasajlar esnasında Detach-hücreleri yerinden kaldırma işleminin en klasik elemanı EDTA-Tripsin karışımıdır. AB de bu amaçla tanımlanmış (Klinik grade) tripsin-



Resim 1. CFU-Fibroblast (12)

ler mevcutsa da bu tripsinlerin hayvan kaynaklı olması hala önemli sorundur. Bu amaçla her üretim laboratuvarı klinikte emniyetli olabilecek metotlar geliştirmekte olup ATİ Teknolojide kendine ait bir yöntem kullanmaktadır.

Üretim basamakları

Invitro üretim esnasında 3 safha ile karşılaşılır (5).

- Yavaş üreme dönemi (4 gün): Hücrelerin ilk ekildikleri F0 döneminde geçirdikleri süredir.
- Hızlı üreme dönemi: F1-15 arası pasaj dönemi olup ikiye katlanma zamanı 30 saat olup toplam 15 pasaj hücreler hızla çoğalırlar.
- Duraklama dönemi: Hızlı üreme döneminden sonra hücreler duraklar ve ikiye katlanma zamanları 16 güne uzar ve bu durumda 4-5 pasaj daha yavaşta olsa çoğala bilirler)

MKH üretiminde bir çok faktör rol oynamaktadır. PDGF, EGF, TGF beta, İnsulin like growth faktörün MKH gelişiminde özellikle önemlidir. Alfa interfeon ve IL-4 ise inhibitör faktör olarak rol oynamaktadır (6). Ancak üretimi indüklemek için kullanılacak bu sitokinlerin HLA ekspresyonları ve MKH'lerin farklılaşma kapasitelerine yaptıkları etkilerin klinik sonuçlara katkısı tartışılır düzeydedir ve sorun yaratabilir (7).

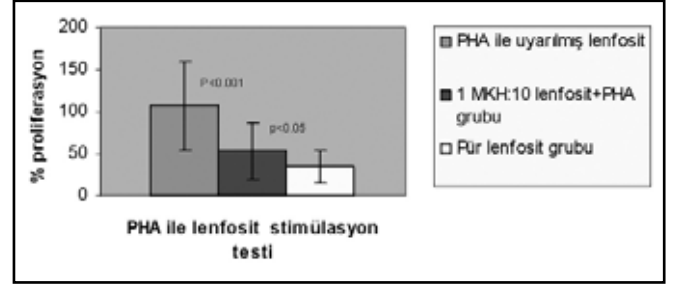
Klinik amaçlı MKH üretiminde genellikle hücreler F0'dan sonra 2 veya 3 kez pasajlanırlar. Artan pasaj sayısı hücre sayısını artırmakla birlikte uzayan kültürle birlikte hücrelerin transformasyon riskinin artması önemli bir sorundur ve klinik amaçlı üretimlerde 6-8 haftadan uzun kültür süresi önerilmemektedir (1,11)

Klinik MKH üretiminde kalite kontrol

Klinik amaçlı MKH üretiminde AB kabul ettiği zorunlu test

1- Üretim öncesi Kalite kontrol testleri

- Serolojik testler: Donörden üretimden 2 ay önce ve üretim öncesi hücreler alındığında HbS-Ag, Anti-Hbc IgM, HCV, HIV1,2, VDRL
- Canlı Hücre sayısı: Değişik yöntemler kullanılmakta ise de altın standart trypan blue dye exlution testidir.



Grafik 3. Üretilen MKH'lerin invitro etkinlik analizi(13)

- Mikrobiyolojik analiz: Aerop ve anerop kültürler ilk 24 saat 7. ve 14. gün analizlerine göre yapılır
- Fenotipik analiz (opsiyonel): Bu konunun ayrıntıları, M.Yılmazın sunusu içinde yer aldığından burada tartışılmamıştır.

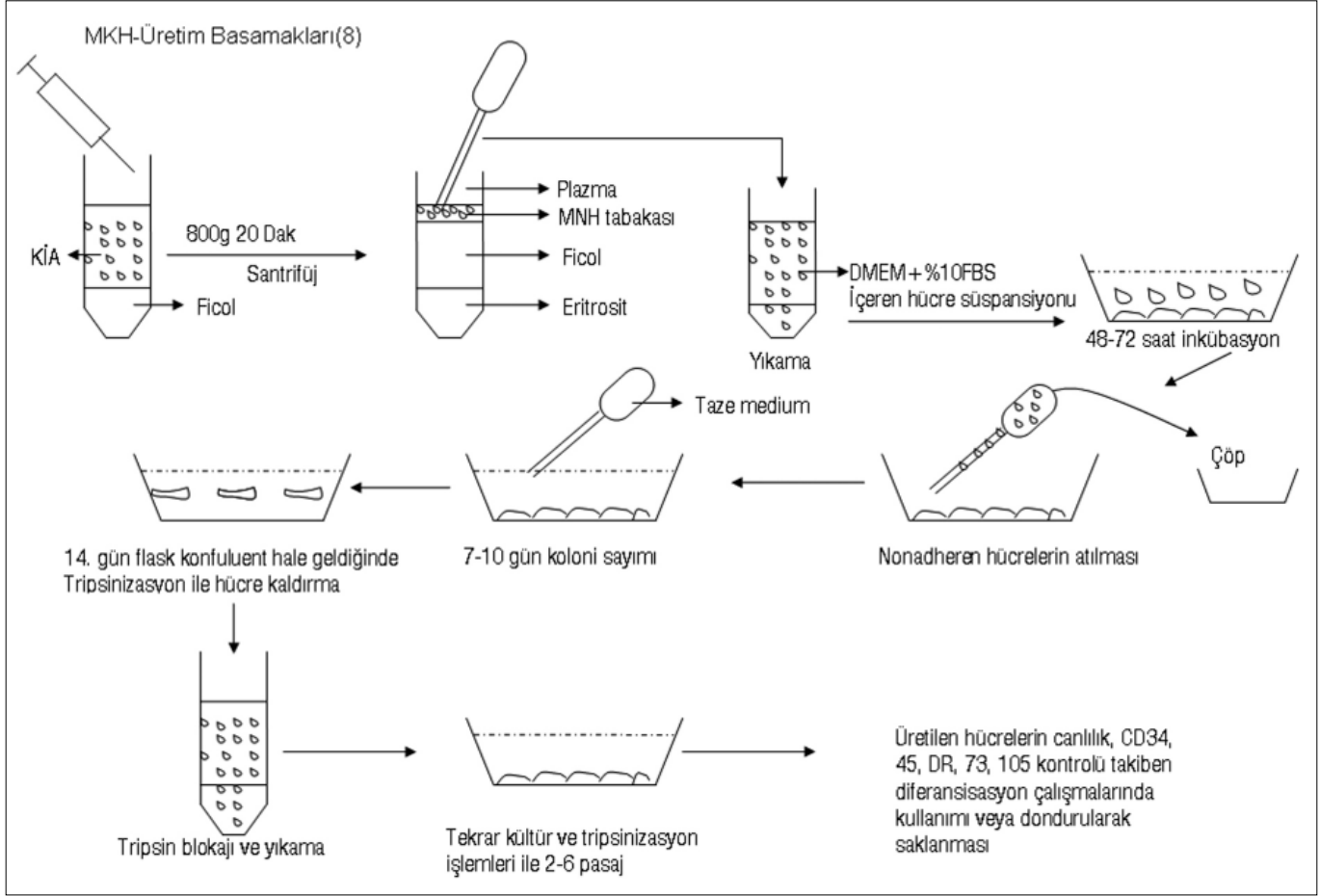
2- Pasaj araları Kalite kontrol testleri

- CFU-F (F0 sonrası, Resim 1)
- Canlı hücre sayısı
- Fenotipik analiz(opsiyonel)

3- Üretim sonu kalite kontrol testleri

- Canlı Hücre sayısı
- Mikrobiyolojik analiz
- Fenotipik analiz
- Tümörojenite analizi: Bu gün için henüz net bir konsensus sağlanmamakla birlikte her ülke kendi standardını belirlemektedir. Bu gün AB'de Telomeraz ekspresyonu, karyotipik değişiklik takibi, immortalite testi, immün hasarlı farelerde tümör oluşum testi kullanılan teknikler olup. ATİ teknoloji olarak bizler Telomeraz ekspresyonu, immortalizasyon testi (Know-How olduğundan burada açıklamayacaktır) ve major karyotipik değişiklik analizi (Know-How olduğundan burada açıklamayacaktır) rutin olarak uygulanmaktadır. Fransa da hızlı olması nedeniyle telomeraz ekspresyonu kabul edilmiş bir metot olarak uygulanmaktadır.
- Endotoksin düzeyi
- Stabilite analizleri: Üreticinin, ürettiği hücrelerin transfer şartları da dahil değişik koşullarda hücrelerin ne süre ile canlı ve fonksiyonel kaldığını kanıtlanması lazımdır.
- Etkinlik analizleri:
 - Kullanım öncesi: Üretilen MKH'lerin klinik amacına yönelik olarak immüno-supresif (Mixt lenfosit kültürü, mitojenle uyarılmış lenfosit kültürlerinde lenfosit proliferasyonunu durdurması bu amaçla en sık kullanılan yöntemdir Grafik 3) ve/veya diğer tür hücrelere dönüşüm (diferansiasyon) yeteneği kanıtlanmalıdır.
 - Klinik kullanım sonrası: Üretilen MKH'leri kullanan hastaların uygulama, erken ve geç takipleri (AB'ye göre 2 yıllık izlemeleri) yapılarak rapor edilmelidir.





Kaynaklar

- Sensebe L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-Med Mat Eng.* 18:3-10:2008.
- Baxter ME, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith J Ed, Fairbairn LJ and Bellantuono I, Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion, *Stem Cells* 22 :675-682:2004
- Giordino A, Galderesi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patients bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 211:27-35:2007.
- Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica.* 90:1017-1026:2005.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications. *Fol Histochemica Cytobiologica.* 44:215-230:2006.
- Klug AC, Jordan CT(eds). *Hematopoietic stem cell protocols.* Humana Pres Totowa, New Jersey. 2002
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24:462-471:2006.
- Karaöz E, Ovalı E. *Kök Hücreler.* Atı Teknoloji yayın no:1. Trabzon. 2004.
- Yılmaz M, Ovalı E, Akdoğan E, Durmuş A, Sonmez M, Dikmen T, Omay SB. Autologous serum is more effective than fetal bovine serum on proliferation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Saudi Med J.*29(2):306-9:2008.
- Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells.* 25:1270-1278:2007.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65:3035-9:2005.
- Yılmaz M, Tekelioğlu Y, Dikmen T, Sönmez M, Akdoğan E, Kartı S, Ovalı E. Mezenkimal kök hücrenin immunofenotipik ve histolojik özellikleri: KTÜ deneyimi XXX Ulusal hematoloji kongresi İstanbul. Abs no: 32: 2003.
- Sucak G, Koç Yener, Arat M, Ünal A, Tanyeli A, Ertürk M, Omay SB, Ovalı E. GVHD kontrolünde Mezenkimal Hücrenin olası rolü: Türkiye verileri. 5. Ulusal Kemik iliği Transplantasyon Kongresi Konuşma metinleri ve Bildiri Kitabı. Antalya 2008. Poster no:12 S:197:2008.

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN TANIMLANMASI ve FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

Mustafa Yılmaz

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Trabzon

Kemik iliğinde non-hematopoietik kök hücrelerin varlığı 130 yıl önce Alman patolog Cohnheim tarafından ile sürülmüş olmakla birlikte, bu hücreler ilk olarak 1976 yılında Friedenstein tarafından tanımlanmışlardır. Friedenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik hücreleri ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir (1). Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yapısından köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen non-hematopoietik multipotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır (2-6). Günümüzde bu hücreler genel olarak mezenkimal tip hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmışlardır.

Mezenkimal kök hücreler; başlıca kemik iliğinde bulunan kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent progenitor hücrelerdir. Kemik iliği, her 10.000 çekirdekli hücreye karşın 1 mezenkimal kök hücre içerir (7). Kemik iliğinden izole edilen ve kültür ortamına ekilen mezenkimal kök hücreler, hızlı plastik adezyon yeteneği ile yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahiptirler. Kültür ortamlarında morfolojik olarak incelendiklerinde fusiform şekilli, fibroblast benzeri görünüm arz ederler. İmmunofenotipik özellikleri itibarıyla CD34, CD45, HLA DR ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermezler, buna karşın CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) gibi non-hematopoietik hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler. Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT) mezenkimal kök hücreler için 3 tanımlayıcı özellik önermektedir. (1) Standart kültür ortamında plastiğe yapışabilmeleri, (2) CD105, CD73 ve CD90 taşınmaları, ancak CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR taşımamaları, (3) İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri (8-9).

Mezenkimal kök hücrelerin yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip olmaları doku mühendisliği için ideal aday olmalarına neden olmuştur. Ayrıca engraftmanı hız-

landırıcı ve immunomodulator etkilerinin keşfi kemik iliği transplantasyonunda klinik kullanıma girmelerine olanak sağlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin başta hematopoietik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere bir çok alanda klinik kullanım potansiyeline sahip olmaları bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin morfolojik özellikleri

Mezenkimal kök hücre morfolojileri, ışık veya faz kontrast mikroskopi ile incelendiğinde iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oldukları gözlenmiştir. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları nükleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetric olmasına karşın bu hücrelerde simetric olmalarıdır (9).

Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri ile ilgili çalışmalar genellikle primer hücreden ziyade kültürde çoğaltılmış hücrelerde araştırılmıştır. Primer mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları; endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer fenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir (10). Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücreler CD45, CD34, CD14, CD11 gibi hematopoietik belirteçleri ve CD80, CD86, CD40 gibi ko-stimülatör molekülleri eksprese etmezler. Mezenkimal kök hücre için tipik olarak kabul edilen belirteçler CD105 (SH2) ve CD73 (SH3/4)'dür. Fibroblast yüzey markeri olan STRO-1 mezenkimal kök hücreler tarafından da eksprese edilmektedir. Ayrıca mezenkimal kök hücreler CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1) taşırlar (Tablo 1). Farklı dokulardan elde edilen hücreler genel olarak benzer fenotipik özelliklere sahip olmakla birlikte bazı farklılıklar da göze çarpmaktadır. Örneğin, yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler yüzeyinde CD49d taşıırken, CD106 taşımamaktadır; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler de ise aksine CD49d negatif, CD106 pozitifdir. Erişkin



Tablo 1. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri

Antijen	CD numarası	Ekspresyon
Hematopoietik kök hücre belirteci	CD34	Negatif
Leukocyte common antigen	CD45	Negatif
LPS reseptör	CD14	Negatif
T lenfosit belirteci	CD3	Negatif
B lenfosit belirteci	CD19	Negatif
HLA-DR		Negatif
Lewis X	CD15	Negatif
T6	CD1a	Negatif
Endoglin (SH2)	CD105	Pozitif
5' terminal nükleotidaz (SH3)	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
Thy-1	CD90	Pozitif
Büyüme faktörü ve sitokin reseptörleri		
Interleukin-1 reseptör	CD121	Pozitif
Interleukin-2 reseptör	CD25	Negatif
Interleukin-3 reseptör	CD123	Pozitif
Interleukin-4 reseptör	CD124	Pozitif
Interleukin-6 reseptör	CD126	Pozitif
Interleukin-7 reseptör	CD127	Pozitif
Interferon γ reseptör	CDw119	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif
Fibroblast büyüme faktör reseptör		Pozitif
Platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör	CD140a	Pozitif
Transferrin reseptörü	CD71	Pozitif

mezenkimal kök hücrelerin hücre yüzeyinde HLA sınıf I antijenlerini zayıf eksprese ettikleri, HLA sınıf II antijenlerini taşımadıkları, ancak hücre yüzeyinde taşınmayan HLA sınıf II antijenlerin stoplazmada bulunduğu saptanmıştır (11). Mezenkimal kök hücrelerin ko-stimülatör molekülleri ve HLA sınıf II antijenleri eksprese etmemeleri gibi özellikleri graft versus host hastalığı tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamıştır (12). Fetal karaciğer kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ise HLA sınıf II antijenleri hem hücre yüzeyinde hemde intrastoplazmik olarak içermedikleri gösterilmiştir (13). Bu bulgular MKH antijen ekspresyonunun fetal yaşamdan erişkin yaşama geçişte değiştiğini düşündürmektedir.

Mezenkimal kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler bir çok adezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar (Tablo 2). Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kollojene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi ve L-Selektindir (14).

Tablo 2. Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları adezyon molekülleri

Adezyon molekülü	CD numarası	Ekspresyon
ALCAM	CD166	Pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif
E-Selektin	CD62E	Negatif
P-Selektin	CD62P	Negatif
L-Selektin	CD62L	Pozitif
VCAM	CD106	Pozitif
Hyaluronate Reseptör	CD44	Pozitif
NCAM	CD56	Pozitif
LFA-3	CD58	Pozitif
LFA-1 α	CD11a	Negatif
LFA-1 β	CD18	Negatif
Cadherin 5	CD144	Negatif
PECAM-1	CD31	Negatif
VLA- α 1	CD49a	Pozitif
VLA- α 2	CD49b	Pozitif
VLA- α 3	CD49c	Pozitif
VLA- α 4	CD49d	Negatif
VLA- β	CD29	Pozitif
Beta 4 integrin	CD104	Pozitif

ALCAM	: Activated leukocyte cell adhesion molecule
ICAM	: Intercellular adhesion molecule
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule
VLA	: Very late antigen
LFA	: Lymphocyte function-associated antigen-1
PECAM	: Platelet endothelial cell adhesion molecule
NCAM	: Neural cell adhesion molecule

Mezenkimal kök hücrelerin sitokin, kemokin ve ekstraselüler matris proteinlerini sentezleme yeteneği vardır. Sekrete ettikleri başlıca sitokinler Interleukin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Flt-3 ligand ve stem cell faktör'dür (SCF). Ayrıca kültür ortamlarına IL-1 alfa ilave edildiğinde granulocyte-colony stimulating faktör (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) sekrete etme yeteneği kazanırlar. Mezenkimal kök hücrelerin GM-CSF, G-CSF, SCF ve IL-6 salgılaya yetenekleri, allojeneik ve otolog hematopoietik kök hücre nakillerinde hematopoietik kök hücrelerin yerleşim, çoğalma ve farklılaşmalarına katkı sağlayarak nötrofil ve trombosit engraftmanını hızlandırıcı etki gösterdiği düşünülmektedir.



Kaynaklar

1. Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4:267-74.
2. Bianco P, Costantini M, Dearden LC and Bonucci E: Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol.* 1988; 68:401-3.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
4. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM and Johnstone B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80:1745-57.
5. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-4.
6. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA and Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-9.
7. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-49.
8. Ural AU. Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları (Yetişkin). *Türkiye Klinikleri J Hem Onc.* 2008, 1:62-66.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-7.
10. Karaöz E., Ovalı E. Kök Hücreler. 1. Baskı, ATİ Teknoloji A.Ş., Trabzon, 2004; s:92-93.
11. Haynesworth SE, Baber MA and Caplan AI: Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13:69-80.
12. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007; 262:509-25.
13. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-86.
14. Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:239-45.
15. Verfaillie CM: Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* 1998; 15: 2609-12.



MEZANKİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMUNREGULATUVAR FONKSİYONLARI

Ferit Avcu

GATA Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

Multipotent mezankimal stromal hücreler olarak da isimlendirilen mezankimal kök hücreler (MKH) erişkin kemik iliğinde bulunan, *in vivo* veya *in vitro* kas, kemik, yağ veya kıkırdak gibi dokulara farklılaşabilen hücrelerdir. MKH'ler doku hasarında tamir yeteneğine sahiptir ve bu yetenekleri nedeni ile tedavide kullanılabilir. MKH'lerin immunbiyolojisi de ilginç olarak diğer dokulara göre değişkenlik göstermektedir. *In vitro* çalışmalar, allojeneik lenfositlerin MKH'lere karşı çoğalma yanıtının düşük olduğunu desteklemektedir. MKH'lerin allo-antijen ve mitojenlere karşı oluşan T-lenfosit uyarısını ve sitotoksik T-lenfosit oluşumunu baskılayarak, dendritik hücre (DH) oluşumunu engelleyerek immun baskılayıcı etki göstermektedir. *In vivo* olarak ise immun düzenleyici etkisi kanıtlanmış olup, graft versus host hastalığı, organ allograft rejeksiyonunun önlenmesi ve otoimmun hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Diğer bir özelliği ise immun sistemden kaçabilme yeteneğine sahip olmasıdır ve bu özellikleri nedeni ile allojeneik nakile uygun olabileceği vurgulanmaktadır.

MKH'ler ile T ve doğal öldürücü (NK) lenfositler arasındaki etkileşimler

MKH'ler özellikle T lenfosit cevabını ve baskılayarak immun yeniden düzenlemede katkıda bulunmaktadır. Gerçekte allojeneik reaksiyonları baskılayıcı kapasitesi mevcut olan MKH'ler, doğal öldürücü (NK) lenfositler ve T lenfositlerin doğal immun cevaplarına karşı etkisizdirler. MKH'ler birinci basamak insan lökosit antijenlerini (HLA-I) çok düşük oranda ifade ederken HLA-II'leri, FAS ligand ve ko-stimulatör (CD80, CD86, CD40 veya CD40L) molekülleri ifade etmezler. Bu nedenle T-lenfosit aktivasyonunu tetikleyici rolleri yoktur. Ko-stimulasyonun yetersiz olduğu durumlarda eksojen ko-stimulatör ilavesi ile T-lenfositler uyarılarak çoğalması sağlanabilir. Ancak CD28 uyarısı sağlayan antikor varlığında HLA uygun olmayan lenfositlerin kültüre edildiği ortama MKH ilavesi sonucu T lenfositlerin uyarılmadığı gözlenmiştir. MKH'ler allojeneik olarak uyarılmış T lenfositleri baskılayıcı ve CD4+CD25+ T lenfositlerin çoğalmasını engelleyici

yeteneğe sahiptir ve bu etkilerini prostaglandin E2 (PGE2), transforme büyüme faktörü- β (TGF- β), interlökin-10 (IL-10), hepatosit büyüme faktörü (HGF) sekresyonu aracılığı ile gerçekleştirmektedirler.

MKH'ler ile HLA arasındaki etkileşimler

MKH'ler daha önce de bahsedildiği gibi birinci basamak insan lökosit antijenlerini (HLA-I) çok düşük oranda ifade etmektedir. Fetal kaynaklı MKH'lerde ise ifade oranları çok daha düşüktür. HLA-II'leri ise ifade etmezler. Ancak MKH lizatlarında Western blot tekniği ile HLA-II'ler saptanmaktadır. Bu durum MKH'lerde HLA-II'lerin hücre içinde bulunduğunu, hücre yüzeyinde ise ifade edilmediğini göstermektedir. Fetal karaciğer hücrelerinden elde edilen MKH'lerde ise HLA-II'ler hem hücre içinde bulunmamakta hem de hücre yüzeyinde ifade edilmemektedir. IFN- γ ile inkübasyon sonucunda ikinci günde hücre içinde, bir hafta sonra ise hücre yüzeyinde ifade edilmektedir. IFN- γ ile inkübe edilen MKH'ler HLA-II'leri ifade etseler bile *in vitro* olarak alloreaktif T lenfositler tarafından tanınmazlar. MKH'lerin kemik, kıkırdak, kas ya da yağ dokusuna farklılaşması durumunda da HLA-I ifadeleri mevcut olup, HLA-II antijenlerini ifade etmezler. Ancak MKH'lerin immunkompetan alıcıya allojeneik nakli ile ilgili *in vivo* bilgiler çok kısıtlıdır. Bu nedenle *in vitro* veriler MKH'lerin immun sistemden kaçtığını destekler iken, sağlam immun sisteme sahip bir alıcının MKH'leri tanıyıp tanımadığı sorusunun cevabı tam olarak bilinmemektedir.

Klasik olmayan HLA-I molekülü olan HLA-G, ilk defa sitotrofoblastlarda keşfedilmiştir ve annenin fetusa karşı immun toleransında önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı dokulardaki ifadesi çok kısıtlıdır ve düşük polimorfizm göstermektedir. HLA-G'nin yedi alt grubu (HLA-G 1-7) olup, bugüne kadar üç ayrı HLA-G reseptörü keşfedilmiştir. Bunlar; öldürücü immunglobulin benzeri reseptör (KIR2DL4/ CD158d), lökosit immunglobulin benzeri reseptör (LILRB1/ILT-2/CD85j) ve LILRB2/ILT-4/CD85d reseptördür. KIR2DL4 reseptörü sadece NK lenfositlerde, ILT-4 myeloid hücrelerde, ILT-2 ise monositlerde DH'lerde, T, B ve NK lenfositlerde ifade edilmekte-



dir. MKH'lerin immün hücreler üzerine baskılayıcı etkisine HLA-G iştirak etmektedir. HLA-G'nin NK lenfosit ve sitotoksik T lenfosit aracılıklı lizisi, allojeneik T lenfosit çoğalmasını, DH maturasyonunu engellediği rapor edilmiştir. Özellikle MKH'lerden ifade ve sekrete edilen HLA-G5, NK lenfositlerin litik aktivitesini ve IFN- γ sekresyonunu baskılamakta, allojeneik T lenfosit çoğalmasını engellemekte, mikroçevrenin alloreaksiyonunda rolü olan IL-10 sekresyonunu artırmakta ve CD4+CD25^{high}FOXP3+ regülatör T lenfositlerin çoğalmasını sağlamaktadır.

MKH'lerin dendritik hücreler üzerine olan etkileri

GM-CSF, TNF- α , ve SCF varlığında kültüre edilen CD34+ progenitor hücreler DH'lere dönüşebilmektedir. CD34+ progenitor hücreler CD1a+ Langerhans' hücrelerine dönüşebilmekte ve bu hücreler içindeki CD14+ CD1a- öncül ara hücrelerin CD14- CD1a+ şeklinde dönüşümü ile DH'leri içermektedirler. MKH'lerin varlığında ise CD14- CD1a+ şeklinde dönüşümü engellenerek DH farklılaşması baskılanmakta, ayrıca HLA-DR ifadesi ve CD40, CD80, CD83, CD86 gibi kostimülatör moleküllerin ifadesi kuvvetli şekilde baskılanmaktadır. IL-4 ve GM-CSF uyarısı ile CD14+ monositlerden elde edilen DH'ler de MKH'lerin varlığında kuvvetli şekilde baskılanarak CD80, CD83, CD86 ve HLA-DR ifadeleri azalmaktadır. Ayrıca MKH'ler CD40 ligand tarafından sağlanan olgunlaşmamış DH aktivasyonunu engellemektedir.

MKH'ler DH tarafından sağlanan fonsiyonel işlevleri de engellemektedir. Olgunlaşmamış DH tarafından gerçekleşen T lenosit uyarısını MKH'lerinin önemli ölçüde engellediği belirtilmiştir. Monositler ve CD14+ öncül hücrelerinden türetilen DH'lerin oluşturduğu T lenfosit uyarısı da ortamda MKH varlığında belirgin azalmaktadır. CD40 ligand aktivasyonu ile monositlerden ve CD34+ progenitor hücrelerden türetilen DH'ler IL-10 ve IL-12 oluşumunu kuvvetli şekilde baskılamaktadır. MKH varlığında monositlerden türetilen DH'lerin TNF- α oluşturmalarında da belirgin azalma olmaktadır.

MKH'lerin DH fonksiyonları ve farklılaşmasını nasıl engellediğinin mekanizması ise tam olarak bilinmemektedir. Etki mekanizması ile ilişkin çalışmalarda, IL-6 ve M-CSF'ün rol oynadığı saptanmıştır. IL-6 ve M-CSF nötralize eden antikorların eklenmesi ile CD14 ifadesinde belirgin azalma olduğu gözlenmiş, ancak CD1a ifadesinde beklenen azalma gözlenmemiştir. Bu nedenle IL-6 and M-CSF'e ek olarak başka faktörlerin de rolü olabileceği bildirilmiştir.

MKH'lerin immünmodülatör etkileri

Gerçek etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen MKH'lerin immünmodülatör etkilerinin olması immün tedavide önem arz etmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi MKH'ler immün baskılayıcı etki göstermekte ve spesifik

olmayan mitojenler ya da mikst lenfosit kültürü ile uyarılmış T lenfosit alloreaktivitesini baskılamaktadırlar. MKH'lerin hafızaya alınmış antijenlerin oluşturduğu lenfosit cevabını ise baskılayıp baskılamadığı tartışmalıdır. Hem doğal hem de hatırlayıcı T lenfositlere karşı MKH'lerin T lenfosit baskılayıcı etkisinin var olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum immünolojik bir kısıtlamaya sebep olmamaktadır. Bu etki, ya MKH'lerin otolog uyarısı veya lenfositler ile etkileşimi ya da diğer etkileşimler sonucu gerçekleşmektedir. Bu özellikleri nedeni ile allojeneik kök hücre nakillerinde kullanılacak MKH'lerin sadece hematopoetik kök hücre donöründen elde edilmesinin gerekli olmadığı düşüncesini desteklemektedir.

MKH'lerin immün baskılayıcı etkisi doza bağımlı gerçekleşmektedir. Mikst lenfosit kültürüne MKH'lerin yüksek dozda uygulanması lenfosit çoğalmasını baskılamakta, düşük dozda uygulandığı zaman ilginç olarak artırmaktadır. MKH'ler ile karşılaşan T lenfositler apoptotik ve anerjik olmamaktadır. Çünkü ortamdan MKH'ler uzaklaştırıldığı zaman T lenfositler tekrar uyarılabilmektedir.

MKH'ler fitohemaglütinin ile uyarılmış lenfositlerde CD4+ aktivasyon belirteçlerini, CD25, CD38 ve CD69 ifadelerini azaltmaktadır. Düzenleyici T lenfositleri ise artırmaktadırlar. Aslında T lenfosit uyarısı üzerine MKH'lerin baskılayıcı etkisi farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Mesela MKH'ler mikst lenfosit kültüründe IL-2'nin transkripsiyonunu ve solubl IL-2 reseptörlerini artırırken, fitohemaglütinin ile uyarılmış lenfositlerin varlığında azaltmaktadır. T lenfositlerin baskılanması muhtemel olarak IL-2 sekresyonundan önce oluşmaktadır. Konkanavalin-A tarafından uyarılan T lenfositleri MKH'ler baskılamaktadır. Ancak IL-2 ilavesi ile MKH'lerin T lenfosit uyarısını baskılayıcı etkisi azalmaktadır. Bu etkilere ilave olarak, aktive olmuş dendritik hücrelerin ilave edilmesi TNF- α sekresyonunu azaltırken, IL-10 sekresyonunu artırmaktadır. Efektör T lenfositler ve NK lenfositler MKH'ler ile birlikte kültür ortamına konulduğunda IFN- γ ' da azalma, IL-4 sekresyonunda ise artma oluşmaktadır. Mikst lenfosit kültürlerinde MKH'lerin kinetiğine bağlı olarak IL-10 sekresyonunun artışına veya azalmasına sebep olmaktadır.

MKH'lerin *in vitro* oluşan bu değişkenlikleri, kısmen immün baskılayıcı etkileri ile açıklanabilir. İmmün baskılayıcı etkileri tam olarak açıklanamamış olsa da bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. MKH'ler ile lenfositler arasındaki etkileşim sonucu oluşan, daha önce de belirtilen bazı solubl faktörler aracılık etmektedir. Bunun kanıtı ise; insan MKH'leri ve lenfositlerin kültüre edildiği ortamdan elde edilen süpernatantlarla baskılayıcı etki oluşur iken, sadece lenfositlerin kültüre edildiği ortamdan elde edilen süpernatantlar ile alloreaktif etkinin oluşmamasıdır. Ancak farelerden elde edilen MKH'ler ile alloreaktif etkinin oluşması için sadece hücreler arası etkileşime ihtiyaç duymaktadır. Etkileşimden sorumlu



en önemli solubl faktörler ise HGF ve TGF- β 'dir. MKH'lerin varlığında ortama HGF ve TGF- β antikorlu eklendiğinde lenfositlerin baskılanmasının engellenmesi bu etkiyi kanıtlamaktadır.

Bir çalışmada MKH'lerin oluşturduğu PGE2'nin lenfosit çoğalmasını baskıladığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada MKH'ler tarafından indoleamin 2,3-dioksijenaz aracılıklı triptofan'ın kynurenine dönüşümünün engellenmesi T lenfositleri baskılayıcı etki oluşturmaktadır. Ancak tüm bu çalışmalarla ilişkili olarak başka bir çalışmada MKH'ler tarafından oluşan IL-10, TGF- β , PGE2 ve indoleamin 2,3-dioksijenaz aracılıklı triptofan'ın baskılanması ile immun baskılayıcı etkinin oluşmadığı vurgulanmaktadır.

Tüm bu çelişkili sonuçlardan; MKH'lerin *in vitro* çalışmalarda farklı tekniklerle elde edilmesi, farklı uyarıların uygulanması, farklı kültür ortamlarının kullanılması, uygulama miktarlarının değişkenliği, kinetikleri, çalışmada farklı lenfosit gruplarının kullanılması sorumlu tutulmakta, bu değişiklikler farklı kemokin ve sitokin sekresyonlarına sebep olmaktadır. Diğer önemli sorun da MKH'leri tam olarak tanımlayan kendine özgü belirtecinin ya da belirteç grubunun olmamasıdır. Bu sorunlar en aza indirildiği zaman MKH'lerin immunomodulator etkileri daha da iyi anlaşılacaktır.

Kaynaklar

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815-1822.
2. Le Blanc K, Ringde'n O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood and Marrow Transplant* 2005; 11:321-334.
3. Krampera M, et al. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Op Pharmacol* 2006; 6:435-441.
4. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papatichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24:74-85.
5. Le Blanc K, Ringde'n O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience (Review). *J Intern Med* 2007; 262: 509-525.
6. Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1106:272-278.
7. Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica* 2007; 92:872-877.
8. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2007; 110: 91-100.
9. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007; 28:219-226.
10. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110:3499-3506.
11. Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1106:272-278.
12. Nasef A, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007; 84:231-237.
13. Selmani Z, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008; 26:212-222.
14. Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med*.2008; 3:531-546.
15. Keating A. How do mesenchymal stromal cells suppress T cells? *Cell Stem Cell*. 2008; 2:106-108.



HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE

Gülsan SUCAK TÜRKÖZ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı ve Kök Hücre Nakli Birimi, Ankara

Mezanşimal kök hücre (MKH) tedavileri bugüne kadar diğer tedavi yöntemleri ile yeterli sonuç alınmayan pek çok değişik hastalığın tedavisinde gelecek vaat eden bir biyolojik tedavi yöntemidir. MKH'nin kolay elde edilebilirliği, kültürlerde çoğaltılabilmesinin mümkün olması, multipotansiyel özellikleri ve farklı dokulara yönelmesi(migrasyon) bu tedavi yöntemini cazip hale getirmiştir. Mezanşimal kök hücrelerin kendisini-yenileme (self-renewal) potansiyelinin kanıtlanamamıştır. Ayrıca kültürde sınırsız olarak üretilmemesi, hematopoetik kök hücreler gibi in-vivo koşullarda repopulasyonlarını gösterebilecek bir yöntem bulunmaması ve kültür ortamından elde edilen MKH'nin in vivo progenitörlerinin fenotipik olarak tam eşdeğeri olmadığı için MKH yerine mezanşimal stroma hücresi terimini öneren araştırmacılar da vardır (1,2).

Mezanşimal kök hücreler Owen ve Friedensteinin 1960 lar-daki öncü çalışmaları ile ilk kez gündeme gelmiştir(3). 1980 ve 90'lı yıllarda ise Kaplan'ın araştırmaları konuya ilgiyi arttırmıştır(4). Haynesworth ve ark ise MKH'nin kemik, kıkırdak doku, tendon, ligaman, kemik iliği stroması, yağ dokusu, kas ve bağ dokusuna farklılaşma özelliğine dikkati çekmiştir(5)

Fenotip

Genel kabul gören bir fenotipik tanımlama yoktur CD 73, CD 90 ve CD 105, CD 166 ve CD 44 (+), CD 45 (-) hücreler olarak genel bir tanımlama yapılabilirse de Stro-1 ve VCAM -1 (+) liğinin multipotent özellikler açısından daha önemli olduğunu öne sürenler de vardır (2). International Society for Cellular Therapy (ISCT) MKH in tanısında/tanımlanmasında standart oluşturabilmek amacıyla bir kılavuz önermiştir. Buna göre

- hücre kültürlerinde plastiğe yapışma özelliği,
- İn- vitro koşullarda yağ, kemik ve kıkırdak dokusuna farklılaşma potansiyeli taşıması
- CD 105, CD 73, CD 90 (+), CD45,CD34,CD14, CD19, HLA-DR pozitifliğinin % 2' nin altında olması şeklinde tanımlanmıştır (6).

Biyoloji

Multipotent/progenitör kök hücreler olup kemik iliği, plazenta, yağ dokusu, kordon kanı ve karaciğerde bulunur ve bu dokularda endotele yakın bir yerleşim gösterirler. Bunun dışında periodontal ligament, saç follikülü, amniotik sıvı, synovial sıvı, tendon ve akciğerlerde buldukları bilinmektedir (2). Bugüne kadar sıklıkla kemik iliği aspirasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Daha yaygın kullanım halinde MHC bariyerlerini geçebildikleri düşünülürse elde edilmesi görece daha kolay olan amniyotik sıvı, plazenta, liposuction operasyonlarında çıkartılan yağ dokusu gibi kullanılmadıkları takdirde imha edilecek, atılacak dokuların kullanılması söz konusu olabilir. Elde edildikten sonra çoğaltıldıklarında mezodermal kökenli kondrosit, adiposit ve osteositlere farklılaşabilirler.

MKH in etki mekanizmaları ve tedavide kullanıma potansiyelleri

Tedavide önemli olan özellikleri *doku onarımı* ve *rejenerasyon* potansiyelleri, *immunosupresif* ve *migratuar* (gezici) özellikleridir. İntravenöz infüzyon sonrası genellikle kemik iliğine yönelir ve burada yerleşme eğilimi gösterirler ise de eğer inflamasyonun bulunduğu bir bölge/doku varsa bu bölgeye de yerleşebilirler (7).

Burada **homing** önemli bir özelliktir. Hücrelerin gidip yerleştikleri (engrafman), ve fonksiyonel etkilerini gösterdikleri dokuyu tanımlamaktadır. MKH'nin hareketleri, kemokinlerin az yoğun olduğu bölgeden daha yoğun olduğu bölgeye doğrudur. İnflamasyon bölgesinde artmış kemokin düzeyleri MKH'i buldukları bölgeye çekerler. CD44 gibi bazı yüzey antijenleri ise endotele tutunmaları ve endoteli geçmelerinde görev alır (2).

MKH'nin tam olarak tanımlanamamış immunsupresif etkileri vardır. Bu etkilerini genellikle T hücre fonksiyonlarını baskılamak suretiyle gösterirler. MKH'de sadece MHC I antijenleri bulunur. MHC II antijenleri yoktur. Hayvanlarda immunsupresif gerektirmeksizin Majör histocompatibilite (MHC)



bariyerlerine aşarak nakledilebilme avantajına sahiptirler. Bu MKH'in tedavide kullanımlarını kolaylaştıracak bir faktör olup, akraba dışı gönüllü vericilerden alınarak çoğaltılan MKH'in dondurulması ve ihtiyaç halinde kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. In vitro çalışmalar MKH'in immün düzenleyici etkilerini Dendritik hücreler, Natural Killer (NK) hücreleri, T ve B hücreleri üzerinde göstermektedir. Monositik Dendritik hücrelerin çoğalmasını ve olgunlaşmasını ve bu hücrelerden salınan proinflatuar sitokinleri baskılar. Öte yandan olgun plasmositoid dendritik hücrelerden (DC2) B hücre aktivasyonunu baskılayan ve Regülatuar T hücrelerini uyaran IL-10 salınımını arttırır (8).

Mezansimal kök hücrelerin mezodermal dokulara dönüşebildiği bilinmekle beraber plastisiteli sayesinde invitro koşullarda nöron gibi ekdodermal, hepatosit gibi endodermal dokulara dönüşümü de sağlanabilmiştir. Kolay elde edilebilirliği, yüksek çoğaltılabilme potansiyeli ve moleküler biyoloji mühendisliği ile çeşitli değişikliklerin yapılabilmesi bu hücrelerin doku onarımı ve yenilenmesinde kullanılabilmesini sağlamaktadır. Preklinik çalışmalarda beyin, myocard, karaciğer ve eklem hasarının onarabildikleri gösterilmiştir (2).

Kalb, merkezi sinir sistemi, pankreas, böbrek, gastrointestinal sistem ve karaciğer hastalıklarında ve solid organ nakillerinde kullanılmaları gündemde olup bu konularda hayvan deneyleri ve faz I-II çalışmaları yürütülmektedir (9)

Hematolojik uygulamalar

1. MKHler engraftmanı hızlandırmaktadır. MKH in-vivo ve in-vitro olarak hematopoetik hücrelerin çoğalmasını sağlarlar. Bu özellik, klinik uygulamada hematopoetik kök hücre sayılarının artması ve engraftmanın hızlanması gibi bir sonuç doğurmaktadır. Bu etkilerini büyük ölçüde salgıladıkları çeşitli sitokinler ile sağlamaktadırlar. MKH'in engraftmanı hızlandırmasına dair klinik çalışmaların öncülüğünü Koç ve arkadaşları yapmıştır. Bu çalışmada yüksek doz kemoterapi sonrası otolog kök hücre desteği yapılan meme kanserli olgularda hematopoetik kök hücrelerle eş zamanlı MKH infüzyonunun kan hücrelerinin engraftmanını hızlandırdığını ve infüzyon sırasında ve sonrasında MKH infüzyonuna bağlı hiçbir yan etki görülmediğini göstermişlerdir (10). Le Blanc ve arkadaşları allojeneik kemik iliği, periferik kök hücre veya kordon kanı nakli yapılan 7 olguyu rapor ettikleri bir pilot çalışmada MKH infüzyonunun nötrofil ve platelet engraftmanını hızlandırdığını gösterdiler (11). Aplastik anemi gibi allojeneik kök hücre nakli sonrası primer ya da sekonder engraftman yetmezliğinin görece olarak daha sık görüldüğü olgularda MKHler engraftmanı arttırmaktadır (12-14). Lee ve arkadaşları da babasından haploidentik KHN yaptıkları akut lösemili bir hastalarında, eş zamanlı MKH infüzyonu ile hızlı bir engraftman sağladıklarını, akut

ya da kronik GVHH görülmediğini bildirdiler (15). Leiden Üniversitesi transplant merkezinden Ball ve ark. aile içi bireylerden haploidentik KHN yaptıkları olgularda %15 lere varan primer graft yetmezliği olması nedeni ile 14 pediatrik allojeneik kök hücre nakli hastasında MKH ile eş zamanlı haploidentik hematopoetik kök hücre nakli yaptılar. Olguların tamamında kalıcı engraftman olduğu gibi MKH infüzyonuna bağlı yan etki gözlemediler (16). Talasemilerde aplastik anemi ve haploidentik KHN gibi engraftman yetmezliği riski görece yüksek olgulardır, Bu bakımdan eş zamanlı HSC /MKH uygulamaları Talasemi Majör lü hastalarda ve aynı şekilde engraftmanın daha geç ve güç olduğu kordon kanı transplantlarında ümit vaat edebilir. MKH'in engraftman üzerindeki olumlu etkilerinin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Kemik iliğine yerleşebilirlerse de (homing), asıl etkilerinin hematopoetik kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında rol oynayan sitokinlerin salgılanması ve hematopoetik hücrelerin kemik iliğine yerleşmesini arttırmak suretiyle olduğu öne sürülmektedir (7, 8).

2. Tedavi ilişkili doku hasarlarında doku onarımını sağlarlar.

MKH'in allojeneik kök hücre nakline bağlı doku toksitesi gelişen hastalarda doku onarımını sağladıkları gösterilmiştir. Ringden ve ark 10 olguluk serilerinde allojeneik kök hücre nakli sonrası hemorajik sistit, pnömediastinum ve peritonit gibi doku/organ toksitesi gelişen hastalarında ortalama 1×10^6 /kg MKH infüzyonu ile doku onarımını sağlamış ve bu yan etkilerin iyileşmesini sağlamışlardır. Bu olgulardan hemorajik sistiti olan bir olguda sistitin iyileşmesinden sonra hasta mesanesinde donör hematopoetik kök hücre (HKH) DNA sını saptamışlardır (17)

3. Graft versus host hastalığı (GVHH) : GVHH tedavisinde

kullanılan steroid, anti -metabolit ve T hücre baskılayıcı ajanların ortak hedefi T hücreleridir. Bu tedaviler sonrasında ortaya çıkan immunosupresif etkiler sonucunda fırsatçı enfeksiyonlar, graft rejeksiyonu ve relaps riskinin artması ve osteonekroz gibi yan etkiler yol görülebilmektedir. Allojeneik hücrelerin lösemi üzerindeki immunolojik etkisini (graft versus lösemi-GVL-) feda etmeksizin gerçekleştirilecek bir immunosupresyon, GVHH tedavisinde önemli bir gelişme sağlayacaktır. Fare modellerinde, tümü ile MHC uyumsuz nakil yapılan farelere 1×10^6 MKH /fare verildiğinde GVHH'ni önlemek mümkün olmuştur (18). Lazarus ve ark aile içi vericiden allojeneik kök hücre nakli yapılan hastalarda yaptıkları faz I çalışmada MKH ve hematopoetik kök hücrelerin eş zamanlı naklinin mümkün ve güvenli olduğunu gösterdiler (19). MKH tedavisi ile iyileşen GVHH ile ilgili ilk olgu sunumu Le Blanc ve ark. tarafından bildirilmiştir. Şiddetli karaciğer ve intestinal GVHH olan 9 yaşında akut lenfoblastik lösemi (ALL)'li bir hasta annesinden alınan MKHler ile tedavi



edilmiştir (20). Daha sonra ise Ringden ve ark steroide dirençli GVHH olan 8 olgularından 6 sını MKH tedavisi ile iyileştirdiler (21). EBMT adına bir grup araştırmacı, ikinci basamak tedaviye dirençli Grade III-IV GVHH olan 40 olguda uygulanan MKH tedavi sonuçlarını bildirdiler. Bu çalışmada hastalara 1-5 doz MKH infüzyonu uygulanmış ve % 68 yanıt oranı bildirilmiştir (22). Sunulan 40 olguda da MKH na bağlı bir yan etki görülmemiş ve ektopik doku oluşumu görülmediği gibi, cilt karaciğer ve barsaklarda GVHH na bağlı gelişen doku hasarında da düzelme gözlenmiştir. Osiris Therapeutics'in desteği ile yürütülen faz II klinik çalışmada ise ABD den 16 transplant merkezi katılmış ve allojeneik kök hücre nakli sonrası Grade II-IV aGVHH gelişen 18-65 yaşları arasındaki 32 hastaya standart tedavi olan steroidlere ek olarak erişkin MKH 3 gün ara ile iki doz halinde verilmiştir. Yanıt için 31 hasta değerlendirilmiş ve 29 (%94) hasta yanıt vermiştir. Bu yanıtlardan 23/31 (%74) tam yanıtıdır. Bu sonuç tek başına steroid tedavisi ile elde edilen % 35 lik tam yanıt oranının (historik kontrol) yaklaşık iki katıdır (23). MKH tedavisine yanıt alınan hastalarda, yanıt vermeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı bir sağkalım avantajı gözlenmiştir. Steroide dirençli Grade III-IV aGVHH olan pediatrik 12 olgunun dâhil edildiği çalışmalarında hastaların tamamında en az bir organ sisteminde yanıt gözlediklerini bildirdiler. 7/12 olguda ise (% 58) tam yanıt sağlanmıştır. Bu hasta grubunda en iyi yanıt Grade III-IV **intestinal GVHH olgularında** gözlenmiştir. Ortanca 229 günlük takipte hastaların % 42 si hayatta olup, hayattaki hastaların tümü tam yanıt veren hastalardır. MKH infüzyonuna bağlı toksisite görülmemiştir (24). Ülkemizde de değişik transplant merkezlerinde allojeneik kök hücre nakli olmuş steroid tedavisine dirençli 6 akut 3 kronik graft versus host hastalığı olgusu MKH ler ile tedavi edilmiştir. 1-3 uygulamada ortanca 0.54×10^6 MKH/kg ($0.06-1 \times 10^6$) intravenöz olarak infüze edilmiştir. Olguların %12,5 inde tam yanıt % 75 inde kısmi yanıt elde edilmiş, toplam yanıt oranı % 87,5 olarak bildirilmiştir. Bu olguların hiç birisinde mezanşimal kök hücre infüzyonuna bağlı yan etki saptanmamıştı (25). Le Blanc ve arkadaşları Mayıs 2008de steroide dirençli aGVHH olan 55 olguda MKH tedavisi sonuçlarını yayınladılar. 30 hastada tam, 9 hastada ise kısmi yanıt elde ettiler. İnfüzyondan bir yıl sonra transplant ilişkili mortalite yanıt veren hastalarda %37 vermeyenlerde ise %72 idi ($p=0.002$). İki yılın sonunda sağkalım yanıt veren olgularda %53 iken vermeyenlerde %16 olarak bulunmuştur (26). Bu çalışmada da MKH infüzyonuna bağlı herhangi bir yan etki görülmemiştir.

MKH uygulamalarında optimal doz, zamanlama, infüzyon sayısı, donöre ait özellikler, kültür koşulları ve optimal sonuç elde edilmesi için gerekli diğer parametreler tam olarak belirlenmiş değildir. GVHH önlenmesinde de hayvan deneylerinde etkisi gösterilmemiştir, insanda çalışma sonuçları beklenmektedir.

Komplikasyonlar (kaygılar ve potansiyel tehlikeler)

- 1. Enfeksiyöz riskler: Mezanşimal hücre kültürlerinde** genellikle %10-20 fetal calf serumu kullanılmaktadır. Pritonlar ve tanımlanmamış zoonozlar ile bulaş riski oluşturmaktadır.
- 2. İmmun yanıt oluşturabilir.** Bu bakımdan fetal calf serumu alternatif olarak taze donmuş plazma ve plateletler, platelet çözüntüsü [human platelet lysate (hPL)] gibi insan kaynaklı medyumlar önerilmektedir (27). hPL nin alloantijen kaynaklı lenfosit proliferasyonunu daha etkin bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (28).
- 3. Transformasyon (dönüşüm) riski: Kültür ortamında** çoğaltılan mezanşimal kök hücrelerin dönüşüm göstermesi mümkündür. Bu kaygılar fare mezanşimal kök hücre deneylerinden kaynaklanmaktadır. Uzun süreli kültürlerde fare MKH'nin kromozom anormalliklerini biriktirdiği ve buna bağlı olarak malign (sarkoma) dönüşüm gösterebildiği bildirilmiştir (29) İnsanda MKH davranışlarının benzer bir özellik gösterdiğine, geç dönem pasajlarda kromozom anormalliklerinin biriktiğine dair bir kanıt olmamakla beraber (30) beraber kötücül dönüşüm kaygıları tümü ile ortadan kalkmamıştır.
- 4. Latent tümörlerin büyümesi:** MKH'in var olan bir latent tümörün büyümesine yol açabileceği kaygısı, kolon, over kanseri, Kaposi sarkomu ve melanom gibi tümörlerin hayvan modellerinde tümör stromasına yerleştiğinin ve tümör nekrozu ve anjiogenezi arttırmak sureti ile tümörün büyümesine yol açtığından gösterilmesinden kaynaklanmıştır (31, 32).

Yukarıda bahsedilen bu riskler, MKH'in iyi üretim uygulamaları (GMP) koşullarında üretilmesi ve hastalara verilmesinden önce fenotipik fonksiyonel, mikrobiyolojik ve genetik özelliklerinin kontrol edilmesi zorunluluğunu doğurmaktadır.



Kaynaklar

1. Horwitz EM ve ark. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement Cytotherapy. 2005; 7: 393–395
2. Brooke G ve ark. Therapeutic application of mesenchymal stromal cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007;18: 846–858.
3. Owen M ve Friedenstien AJ. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors *Ciba Found Symp* 1988;136: 42–60
4. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9 641–650.
5. Haynesworth ve ark. Characterization of cells with oostogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13: 81–88
6. Dominici M ve ark Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317
7. Le Blanc K & Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience *J Intern Med* 2007; 262: 509–525.
8. Pelagiadis I ve ark. Biologic characteristics of mesenchymal stromal cells and their clinical applications in pediatric patients *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30: 301–309
9. www.osiristx.com
10. Koç Ö ve ark. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous- blood stem cells and culture expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy *J Clin Oncol* 2000; 18: 307–316.
11. Le Blanc K ve ark Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells *Leukemia* 2007; 21: 1733–1738.
12. Fang B ve ark. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia *Pediatr Transplant*. 2008 Jul 30. [elektronik ön- basım].
13. Weber-Mzell D ve ark. Durable remission following a third allogeneic stem cell transplantation in a patient with repeatedly relapsing SAA. The importance of stroma cells for sustained engraftment? *Pediatr Transplant* 2007 May; 11(3):332–5.
14. Foillard L ve ark. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia*. 2003 Feb; 17(2):474–6.
15. Lee St ve ark Treatment of high risk acute myelogenous leukemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T- cell depleted hematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol*. 202; 118: 1128–1131.
16. Ball LM ve ark Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007 Oct 1; 110(7): 2764–7.
17. Ringden O ve ark Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon *Leukemia* 2007; 21: 2271–2276.
18. Chung ve ark. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft versus host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation *Int J Hematol* 2004; 80: 370–376.
19. Lazarus HM ve ark Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11(5):389–98.
20. Le Blanc K ve ark. Treatment of severe acute graft versus host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells *Lancet* 2004; 363: 1439–41.
21. Ringden O ve ark Mesenchymal stem cells for treatment of therapy resistant graft versus host disease.. *Transplantation* 2006; 81: 1390–1397.
22. Horwitz ME ve ark. Mesenchymal stromal cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 53–57.
23. Kebriai P ve ark Phase II Trial of Prochymal™ (Ex-vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells) and Corticosteroids as primary treatment for Acute Graft-Vs-Host Disease (aGVHD), www.osiristx.com
24. Prasad VK ve ark. Use of Mesenchymal Stem Cells (Prochymal™) to Treat Pediatric Patients with Severe (Grade III-IV) acute Graft Versus Host Disease Refractory to Steroid and Other Agents. www.osiristx.com
25. Sucak G ve ark. GVHH kontrolünde mezaşimal kök hücrenin olası rolü: Türkiye verileri, 5. Ulusal kemik iliği Transplantasyonu ve kök hücre tedavileri kongresi poster no 12 6–9 Mart 2008 Antalya-Türkiye
26. Le Blanc ve ark. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study *Lancet*. 2008 May 10; 371(9624):1579–86.
27. Lepperdinger ve ark Controversial issue: Is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell based therapies? *Exp Gerontol* 2008; baskıda
28. Bernardo ME ve ark Optimisation of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute *J Cell Physiol* 2007; (211): 121–130.
29. Miura ve ark. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006; 24 1095–1103.
30. Bernardo ME ve ark. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long term in-vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67: 9142–9149.
31. Lazennec G ve Jorgensen C. Adult multipotentent stromal cells and Cancer: Risk or benefit 2008; *Stem Cells* baskıda
32. Zhu ve ark. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 267–274.



KAS-İSKELET SİSTEMİ HASTALIKLARINDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI

Ali Uğur Ural

GATA Hematoloji Bilim Dalı, Tıbbi ve Laboratuvar Araştırma Merkezi, Ankara

Mezankimal kök hücreler (MKH) kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücreler olarak tanımlanmış olup, mezodermal kökenli olan yağ hücreleri, osteoblastlar, kondrositler, tenositler, iskelet miyositleri ve visseral stroma hücrelerine farklılaşabilirler (1). İlave olarak MKH'ler ektodermal (nöron gibi) ve endodermal (hepatosit gibi) doku hücrelerine de farklılaşabilir ve bu halleriyle embriyonik kök hücreleri taklit ederler. MKH'ler erişkin kemik iliğinde seyrek olarak bulunurlar (1/10⁵) ve diferansiye olmadan 40 jenerasyon kadar proliferere olabirler (2).

Herhangi bir dokunun tamir edilebilmesi sadece tamiri gerçekleştiren hücreleri değil, aynı zamanda aktarılan MKH'lerin proliferere olabileceği ve özel büyüme faktörleri ve sitokinlerle etkileşebileceği yeterli bir yapıya da (scaffold) ihtiyaç gösterir. Böylece rejeneratif tıp, hücre biyolojisi, yaşayan hücrelerle dokuları yenilemek için cerrahi ve doku mühendisliğini, biyomatrikslere ve sinyal moleküllerini de birleştiren bir disiplindir. Böylece hücre tedavi işlemlerinin başarılı olabilmesinde hücreler ve taşıyıcı yapılar arasındaki etkileşim, matriks yüzeyindeki hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, olgunlaşma, diferansiyasyon ve ekstraselüler matriks tamamı önemli rol oynayan faktörler arasındadır (3).

Kemik tamiri

MKH'lerin osteosit ve kondrosite in vitro olarak farklılaşabileceğinin gösterilmesi ile, MKH'ler in vivo doku tamirinde kullanılmaya başlamıştır. Birçok hayvan modelinde MKHler segmental kemik defektinin giderilmesinde başarı ile kullanılmıştır. Hidroksiapatit matrislerine yüklenmiş MKH'ler, köpek segmental kemik defektinin giderilmesinde kullanılmıştır (4). Osteogenesis imperfekta'lı çocuklara kemik iliği hücrelerinin infüze edilmesiyle hücreler herhangi bir yan etki gözlenmeksizin engraft olmuşlar, aynı zamanda ortalama osteoblast sayısı 3 ay sonra artış göstermiş, yeni lamellar kemik oluşumu izlenmiştir. Bu çocuklarda kırık sıklığı azalmış ve vücut büyüme hızı artmıştır (5). Diğer hayvan çalışmalarına

göre de kemik, kırık veya tendonun rejenerasyonu veya lokal tamirinde MKH uygulanmasının en uygun yolunun in situ enjeksiyon veya implant olduğu gösterilmiştir (6).

Ortopedi ile ilgili uygulamalarda MKH'lerin taşıyıcısı olarak şimdilerde doğal veya sentetik biyomateryaller kullanılmaya başlamıştır. Bu konudaki önemli ilerleme, gözenekli olmayan biyolojik olarak inert materyallerden (seramik veya titanyum), gözenekli, rezorbe olabilen ve osteokonduktif biyomateryallere (hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat) geçmiştir (7). Hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat seramiklerden yapılmış hücre-matriks kompozitlerine yüklenmiş otolog MKH'ler in vivo olarak başarı ile kullanılmış ve başka metodlarla düzeltilememiş kritik segmental kemik defektlerinin giderilmesinde kullanılmıştır. Biyolojik olarak vücutta yıkılabilir polimerler içerisinde poly-L-lactide-co-glycolide (PLGA) en uygunu bulunmuştur (8). Birçok çalışma da insanlarda bu yaklaşımın etkinliğini göstermiştir. İn vitro koşullarda ekspansiyon edilmiş otolog kemik iliği-kaynaklı MKH'lerle yüklenmiş gözenekli seramik scaffold'lar büyük kemik defektleri olan 3 hastaya başarı ile implante edilmiştir (9). Bir mandibula defekti, biyomateryaller, hastanın kemik iliği ve büyüme faktörleri kullanılarak heterotopik kemik indüksiyonu ile başarıyla tamir edilmiştir (10). Sonuç olarak, kemik defektlerinin tamirinde etkili yaklaşım, daha önceden hastanın kemik iliğinde alınmış ve uygun kültür şartlarında in vitro koşullarda proliferere edilmiş MKH'lerin yüklendiği gözenekli hücre-matriks kompozitlerinin lokal implantasyonu olarak gözükmektedir (11).

Kıkırdak tamiri

Hayvan modellerinde eklem kıkırdak defektlerinin giderilmesinde çeşitli taşıyıcı matrikslerin yardımıyla MKH'ler kullanılmıştır. Keçi kemik iliğinden allojeneik olarak alınan MKH'ler hyaluronan taşıyıcı ile birlikte, medial menisektomi ve anterior crucial ligament rezeksiyonundan sonra keçilerin dizlerine verilmiştir. Kontrol hayvanlarla karşılaştırıldıklarında, MKH uygulananlarda menisküs rejenerasyonu gözlenmiştir. İlave olarak bu hayvanlarda, kemik rezorbsiyonu



nunda, subkondrol kemik remodeling'inde, osteofit formasyonunda ve kırıkta yıkımında belirgin bir azalma ile eklem yüzeyinin daha iyi korunması gözlenmiştir (12).

Yapılan bir çalışmada bir tavşanın eklem kırıktağındaki tam-kalınlık defekt, tip I kollajen jel içine yüklenen otolog MKH'lerin transplantasyonu ile tamamen düzeltilmiştir (13). Sentetik polimerlerden PLGA eklem kırıktağı defektlerinin giderilmesinde ümit vadeden bir materyal olarak bulunmuştur. Bunun yanında üç boyutlu matriksler ve scaffold'lar içindeki kemik iliği MKH'leri, sitokinler ve rekombinant insan kemik morfogenetik protein-2 (rhBMP-2) varlığında *in vivo* olarak kırıktağı diferansiyasyonu göstermişlerdir. Rejenere olan hücreleri, biyoaktif matriksleri ve osteoindüktif büyüme faktörlerini birleştiren bu yaklaşım, eklem kırıktağı defektlerinin tedavisinde etkili bir yaklaşım olarak gözükmemektedir (14). İnsan çalışması olarak, osteoartritli 12 hastanın dizine, medial femoral kondiline tibial osteotomi esnasında otolog kemik iliği-kökenli MKH'ler verilmiştir. Hasta grubunda artroskopik ve histolojik grade'leme skorları daha iyi olduğu halde kontrol grubu ile klinik düzelme açısından bir fark bulunamamıştır (15). Buna rağmen, bu çalışma MKH'lerin kırıktağı tamirinde etkinliğini ve güvenilirliğini göstermesi açısından önemlidir, bu da inflamatuvar reaksiyonlara bağlı artrit bulguları azaltmada MKH'lerin rejenerasyon ve immunoregülatuar etkileri açısından önem kazanmaktadır.

MKH'ler rat modelinde intervertebral disk rejenerasyonunda da başarılı bulunmuştur. Floresan boya ile işaretli MKH'ler lokal enjeksiyondan 7 ve 14. günlerde azaldığı halde 28 günde %100 viabilite gösterdikleri halde başlangıçta verildiği sayıda ışımaya başlamışlardır. Bu da MKH'leri halen

canlı ve rat intervertebral disk aralığında proliferasyon gösteren en önemli delil olmuştur (16).

Tendon ve iskelet kası tamiri

Tendon tamirinde MKH'lerin lokal enjeksiyonunun etkinliğini değerlendirmek üzere bir takım çalışmalar yapılmıştır. Tip I kollajen içinde verilen otolog MKH'ler tendon tamiri yapmışlar, ancak vakaların yaklaşık %30'unda ektopik kemik oluşumu gözlenmiştir (17). Bunun yanında eksojen olarak kullanılan GDF-5, GDF-6, ve GDF-7 gibi büyüme/farklılaştırma faktörlerinin de doku rejenerasyonunu artırdıkları gösterilmiştir (11). Ayrıca, hücre-kollajen oranının 20 kat kadar azaltılması (0.8'den 0.004M hücre/mg kollajen) ile kültür ortamında hücre canlılığının düzeldiği, tamir yöresinde ektopik kemik oluşumunun ortadan kalktığı ve tedavi sonrası 12. haftada histolojik görünümün düzeldiği gösterilmiştir (18).

MKH'lerin iskelet, düz ve kalp kası hücrelerine de farklılaşabildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu konu özellikle, hayvan myokard infarktüsü modellerinde ve insan çalışmalarında kemik iliği mononükleer hücrelerinin ve MKH'lerin kardiyomiyosite dönüştüğü ve anjiogenezisi indüklediği gösterilmiştir. MKH'lerin kardiyomiyozite olan farklılaşması farklı bir başlıkta anlatılacağı için burada bahsedilmeyecektir.

Musküler distrofi ve diğer miyopatiler gibi konjenital iskelet kas defektlerinin de teorik olarak kas yapısı ve fonksiyonunu yerine koymada MKH aktarımından faydalanacakları bilinmektedir. İnsan sinovial membran kökenli MKH'lerin, Duchenne musküler distrofisi olan mdx fare modelinde fonksiyonel satellit hücrelerin uzun süre idame ettirilmesinde ve miyofiberlere katkıda bulunduğu gösterilmiştir (19).

Kaynaklar

1. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* 22(5):823-831, 2004.
2. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893):41-49, 2002.
3. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5(1):32-45, 2003.
4. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85-A(10):1927-1935, 2003.
5. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5(3):309-313, 1999.
6. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 17(6):900-908, 1999.
7. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol* 28:165-172, 2003.
8. El-Amin SF, Attawia M, Lu HH, Shah AK, Chang R, Hickok NJ. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. *J Orthop Res* 20:20-28, 2002.
9. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344:385-386, 2001.



10. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364:766-770, 2004.
11. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39:678-683, 2006.
12. Murphy JM, Kavalkovitch KW, Fink D, Barry FP. Regeneration of meniscal tissue and protection of articular cartilage by injection of mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 8(Suppl B):S25, 2000.
13. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI. Mesenchymal cell-based repair of large, full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579-592, 1994.
14. Girotto D, Urbani S, Brun P, Reiner D, Barbucci R, Abatangelo G. Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on the three dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials* 24:3265-3275, 2003.
15. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10:199-206, 2002.
16. Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, Page P, Wahba GM, Lotz JC, Berven S.B Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 32(3):430-434, 2004.
17. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 21:420-431, 2003.
18. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Sklenka AM, Butler DL. Effects of cell-to-collagen ratio in mesenchymal stem cell-seeded implants on tendon repair biomechanics and histology. *Tissue Eng* 11:448-457, 2005.
19. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*. 2003 Mar 17;160(6):909-18.



GASTROENTEROLOJİK HASTALIKLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI

Murat Kantarcıoğlu, Sait Bağcı

GATA Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara

Karaciğer hastalıklarında kök hücre tedavisi

Mitolojide yer alan hikayeye göre Zeus, gökten ateşi çalıp insanlara veren Prometheus'u cezalandırmak için, onu Olympus dağında (bu gün Antalya bölgesinde yer alan toroslar-da) bir kayaya bağlar ve bir kartalı her gün Prometheus'un karaciğerinden bir parça yemesi için görevlendirir. Kartal her gün aynı saatte gelir ve Prometheus'un karaciğerinin bir parçasını yer. Ancak bu işlem hiçbir zaman sonlanmaz. Çünkü her gün karaciğer kendini yenilemekte ve kartalın yediği kısmı yerine koymaktadır. Bu mitolojik hikaye bize, milattan önce bile karaciğerin kendini rejenerere edebilen bir organ olduğunun bilindiği yönünde kuvvetli bir delil sunmaktadır. Artık günümüzde karaciğerin bu rejenerasyon yeteneğinin kendi dokusunda yer alan progenitör/kök hücrelerce sağlandığı yolunda önemli kanıtlara sahibiz. Nitekim Kuwahara ve ark., hızlı hücre döngüsü olan dokulara uygulanan "birikim bölgelerini etiketleme" (Label Retention Assays) yöntemini, aslında yavaş bir hücre döngüsü olan fare karaciğerine uygulayarak 4 adet kök hücre yuvası (hepatic stem cell niches) görüntülemeyi başarmışlardır (1). Burada tespit edilen kök hücre bölgelerinin, sırasıyla proksimal bilier ağaçta Hering kanalında, intra lobüler safra kanallarında, periduktal "null" - boş mono-nükleer hücrelerde ve peribilier hepatositlerde olması nedeniyle yazar, tek bir tip yerine birçok tipe farklılaşabilen, yani fleksibl bir rejeneratif sistemi oluşturan kök hücrelerin varlığını vurgulamaktadır.

Ekstra-hepatik yerleşimli, özellikle de kemik iliğinde yer alan kök hücrelerin hepatositlere diferansiye olabilmeye yeteneklerinin var olup olmadığı yakın geçmişte bir çok araştırmacı tarafından merak edilmiş ve bu konuda gerçekleştirilen bir çok hayvan deneyi olumlu sonuçlar vermiştir. İnsanda böyle bir durumun varlığını araştırmak amacıyla 2000 yılında Alison ve ark. ve ayrıca Theise ve ark. tarafından, erkek donörlerden alınan iliklerle terapötik kemik iliği transplantasyonu yapılmış kadın hastaların karaciğer biyopsilerinde Y kromozomu taşıyan hepatositler gösterilmiştir (2, 3).

Kronik karaciğer harabiyeti sonucunda fibrozis ve siroz oluşumu ile sonlanmış durumlarda tedavi amacıyla kemik iliğinde yer alan kök hücrelerden yararlanmaya yönelik ilk insan çalışması ise Terai ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve 2006 yılında yayınlanmıştır (4). Araştırmacılar tarafından bu makalede, karaciğer sirozu olan, total bilirubin değerleri 3 mg/dl den az, platelet sayıları 50000/ml den fazla, diagnostik görüntüleme ile hepatosellüler karsinom tespit edilmiş 9 karaciğer sirozlu hastaya, periferik venöz yoldan, kendi kemik iliklerinden alınan mononükleer hücreler infüze edilmiş ve hastaların karaciğer fonksiyonlarında istatistiksel yönden anlamlı düzelme olduğu, karaciğer hepatosit rejenerasyonunun arttığı, karaciğerdeki fibrozisin iyileştiği, 6 ay sonra ortalama serum albümin ve total protein miktarlarının anlamlı seviyede arttığı ve hastaların hiç birinde belirgin yan etki görülmediği rapor edilmiştir.

Metabolik karaciğer hastalıkları için çıkış yolları, biraz farklı bir cephe gibi durmaktadır. Özellikle intrensek genetik defektlerden kaynaklanan ve karaciğer başta olmak üzere, enzim defektleri nedeniyle bütün metabolizmayı etkileyebilen hastalıklarda etkin ve kalıcı bir tedavi metodu arayışları halen devam etmektedir. Bu tip hastalıklarda karaciğer mikro-mimarisinin restorasyonu amaçlı olog mezenkimal kök hücre nakli, kalıcı çözüm sağlamayabilir. Mevcut enzim defektlerinin tamiri açısından genetik yönden sağlam bireylerden allojenik mezenkimal kök hücre uygulanması belki de gelecekteki ana tedavi yollarından birini oluşturabilecektir. İnsana allojenik mezenkimal kök hücre naklinin güvenliği konusunda oldukça çarpıcı bir araştırma 2006 yılında yayınlanmıştır (5). Bu makalede Liu ve ark. tarafından insan gönüllülere rhesus maymunundan ve kendi kemik iliklerinden alınıp ex vivo ekspansiyon edilmiş mezenkimal kök hücrelerin infüze edildiği ve yapılan klinik ve biyokimyasal takiplerde hiçbir yan etki görülmediği bildirilmiştir. Bu konu halen daha bir çok klinik çalışma ile aydınlatılmaya muhtaç olmakla beraber umut vericidir.



Gastrointestinal kanala ait hastalıklarda kök hücre tedavisi

Okamoto ve ark., 2002 yılında yayınladıkları bir makalede; erkek donörlerden alınan iliklerle terapötik kemik iliği transplantasyonu yapılmış 4 kadın hastaya, endikasyonları nedeniyle yapılan üst ve alt GIS endoskopik incelemeleri sırasında, özefagus, mide, ince barsak ve kolon biyopsileri yapıldığını ve Y kromozomu taşıyan, intestinal epiteliferansiye olmuş hücrelerin gösterildiğini ve yapılan histokimyasal çalışmalarla bu hücrelerin ürediklerini ve re-popüle olduklarını bildirmişlerdir (6). Görüldüğü gibi kemik iliği ile nakledilen kök hücreler kemoterapi nedeniyle hasarlanan intestinal kanal mukozasında onarıcı bir işlev

gerçekleştirebilirler ve mikro mimarinin yeniden oluşturulmasında büyük önem arz edebilirler. Cassinotti ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, tedaviye refrakter Crohn hastalığı olan 4 hastaya CD 34 hücre seleksiyonu yapılmaksızın periferden mobilize edilerek toplanan otolog hematopoietik kök hücrelerin verildiği rapor edilmiştir (7). Yazar tarafından bu hastaların $\frac{3}{4}$ 'ünde ortalama 16.5 aylık bir takipten sonra bütün ilaçların kesilmesine rağmen klinik ve endoskopik remisyona ulaşıldığı ve etkilenen hastaların tamamında fistüllerin kapandığı rapor edilmiştir. Yakın gelecekte inflamatuvar barsak hastalıklarında kök hücre tedavisi uygulanması rutin tedavi seçenekleri arasına girmeye aday gibi görünmektedir.

Kaynaklar

1. Kuwahara R et al. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008;47(6):1810-2.
2. Alison MR et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
3. Theise ND et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
4. Terai S et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298.
5. Liu L et al. Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. *Stem Cells and Development* 2006;15:349-357.
6. Okamoto R et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nature Medicine* 2002;8:1011-1017.
7. Cassinotti A et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut* 2008;57:211-217.



NÖROLOJİK HASTALIKLARDA MKH KULLANIMI

Ayhan Attar



KARDİAK VE VASKÜLER HASTALIKLARDA MKH KULLANIMI

Mustafa Özbaran



İNFERTİLİTE ve MKH

Erkut Attar



