

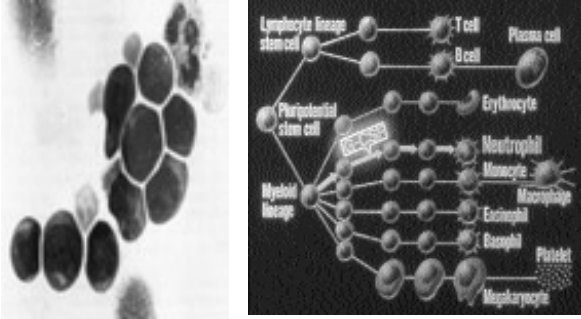
# Kök Hücre Kaynağı ve Seçimi

Ali ÜNAL, İsmail SARI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı

## GİRİŞ

Kemik iliği (Kİ) kaynaklı hematopoetik kök hücreler, Hem allojenik hem de otolog transplantasyonda en önemli hücre kaynağı olarak kabul edilmiş ve son yıllara kadar transplantasyonlarda öncelikle kullanılmıştır.



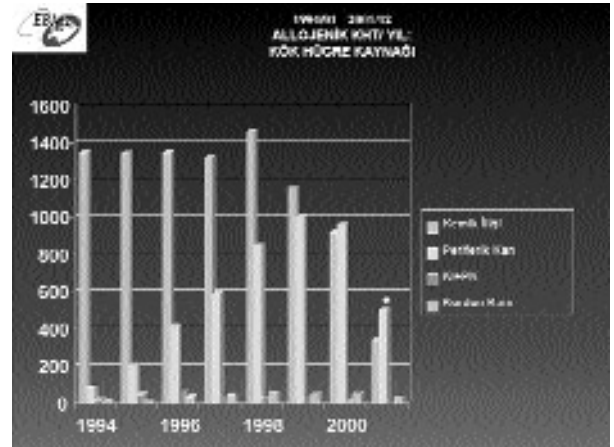
Otolog kemik iliği transplantasyonu ise ilk ve en büyük seri olarak 1978'de Appelbaum ve ark. tarafından yayınlanmıştır (1). Bu tarihten itibaren Otolog Kemik İliği Transplantasyonu (OKİT) özellikle relaps lenfoma tedavisinde artarak kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte, otolog ilik graftındaki düşük hematopoetik kapasite ve post-transplant sitopeninin uzaması nedeniyle araştırmacılar, alternatif kök hücre kaynakları aramaya yönelmiştir.

Kemoterapi ile mobilize edilen periferik kan kök hücreleri (PKKH)'nin hematopoezi yeniden oluşturma yeteneği 1980'lerde gösterilmiştir. Ancak bu işlemin otolog Kİ hücrelerine kıyasla engraftman süresi açısından belirgin bir avantaja sahip olmadığı görülmüştür. Fakat, hematopoetik büyüme faktörlerinin kullanılmaya başlanması ve bu

sayede daha fazla sayıda PKKH toplanması ile otolog transplantasyon sonrası hızlı bir şekilde Kİ yapılanması mümkün hale gelmiştir. Ayrıca, post-transplant bakımdaki gelişmeler ve PKKH kullanımı, transplant ilişkili toksisite ve mortalitenin azalmasını sağlamıştır.

PKKH'lerin kemik iliğine karşı diğer bir avantajı da transplantasyon işleminin daha kolay hale gelmesini sağlayan büyük miktarlarda hücrenin toplanması, artırılması ve hücrelerin belirli kısımlarının çoğaltılabilmesidir.

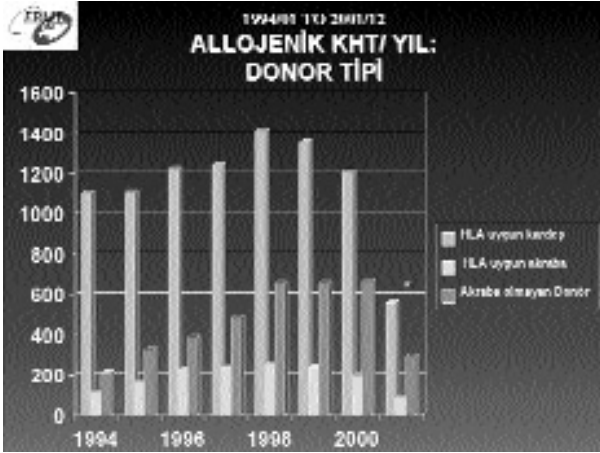
Sonuç olarak OPKKHT, OKİT'nun yerini almıştır.



Otolog transplantasyondaki başarılı sonuçlar görüldükten sonra, PKKH, allojenik transplantasyonda da kullanılmaya başlanmıştır. PKKH içeriğinin kemik iliğine göre yaklaşık on kat daha fazla T-lenfosit içeriyor olması, graft versus host hastalığının (GVHH) şiddeti ve insidansını artıracakını düşündürmüştü, ancak yapılan araştırmalarda akut

GVHH oluşması üzerinde Kemik iliğinden yapılan nakillere göre anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir.

Bununla birlikte kronik GVHH insidansının artabileceği kanaatle PKKH kullanımı, özellikle ak-raba olmayan transplantasyon alanında, iyi planlanmış çalışmalarla sınırlandırılmıştır.



Diğer bir güncel hematopoetik kök hücre kaynağı da, kesin olarak istenilen hücre sayısı eşliğine ulaşabilmeyi sağlayan ve uzun dönem engraftman sağlama yeteneğine sahip olan kordon kanıdır.

Sonuç olarak, otolog nakillerde kök hücre kaynağı olarak Kİ ve PKKH, Allojenik nakillerde ise Kİ, PKKH ve kordon kanı kullanılabilir. Alternatif kaynaklar olan sitokinlerle stimüle edilerek çoğaltılan Kİ veya otolog kordon kanı günümüzde henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Otolog ve kordon kanı nakillerinde, kök hücrenin yeniden geri verilmesi işlemi (reinfüzyon) öncesinde yüksek doz kemoterapi uygulanabilmesi için, toplanan kök hücrelerin mutlak kriyoprezervasyon =dondurma işlemine alınması gerekmektedir.

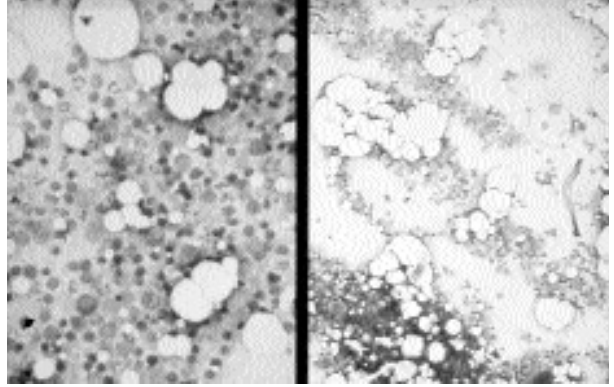
Kan ve kemik iliği progenitör hücre toplanması, işlenmesi, ve transplantasyon uygulamalarında belirli standartlar konmuş ve bu standartlar Birleşik Akreditasyon Komitesi (Joint Accreditation Committee of ISHAGE-Europe) ve EBMT tarafından yayınlanmıştır.

## KÖK HÜCRE KAYNAKLARI

### Kemik İliği

Kemik iliği, heterojen yapıda hematopoetik hücre grubundan oluşur. Bunların bir kısmını progenitor (kök) hücreler oluşturmaktadır. Standart olarak, kök hücre transplantasyonu, herhangi bir işleme tabi tutulmamış -diğer hücrelerle karışık halde bulunan- kemik iliği hücrelerinin verilmesi ile

gerçekleştirilmektedir (2-4). Allojenik transplantasyonda, donör ve alıcı arasındaki uyumsuzluk arttıkça Graft-versus-Host hastalığı (GVHH) gibi ciddi yan etkilerin ortaya çıktığı bilinmektedir. T hücre sayısını azaltma girişimleri ise GVHH şiddetini ve sıklığını azaltmakla birlikte, engraftman yetersizliğine neden olabilmektedir (5,6).



Başarılı kemik iliği nakli için yeterli sayıda hücrenin elde edilmesi ve büyük miktarlarda ( $6 \times 10^8$  mononükleer hücre (MNH)/kg) hücre verilmesi gerekmektedir (9).

Relaps oranını azaltmak için, lösemik veya diğer malign hücrelerden arındırma (purgıng) yöntemleri uygulanmaktadır. Purgıng işlemi, pozitif seleksiyon (CD34 seçimi) veya negatif seleksiyon (tümör hücresinin arındırılması) gibi farklı yöntemlerle yapılabilir. Non-Hodgkin lenfomada (NHL) B-hücrelere karşı kullanılan anti-CD 20 antikoru ile invivo ve invitro arındırma yapılabilir (7-8).

### Periferik Kan

Periferik kan kök hücre transplantasyonunda, yeterli sayıda hücre elde etmek daha kolay olduğu gibi graft yetersizliği ve relaps oranı daha düşüktür. CD34+ hematopoetik kök hücreler, kemoterapi ve/veya büyüme faktörü ile mobilize edilen periferik kandan toplanabilir. Mobilize edilmeyen periferik kan çok az miktarda (yaklaşık % 0.15) CD34+ mono nükleer hücre (MNH) içerir. Fakat, kısa süreli kemoterapi veya kemoterapi + büyüme faktörü kombinasyonu ya da tek başına büyüme faktörü verilerek CD34+ hücrelerin yüzdesi artırılabilir (10-14).

PKKH mobilizasyonu, kemik iliği ve periferik kandaki çoğalma yeteneğine sahip progenitör hücrelerin varlığına bağlıdır. Periferik kandaki MNH'lerin (PBMNC) az bir kısmını kök hücreler oluşturmaktadır. Hem mobilize CD34+ hücreler, hem de CFU-GM içeren MNH'ler, lökoferez ile toplanabilir



(17-18).

PKKH, alıcıya nakledilmeden önce yeterli sayıyı elde etmek in vitro çoğaltma sistemleri de kullanılabilir, ancak etkinliği ve bu şekilde yapılan transplantasyonların başarısı halen tartışmalıdır.

Periferik kan kullanımının bir avantajı da; özellikle lenfoma ve solid tümörlerde ve remisyonadaki lösemik hastalarda, kemik iliğine göre daha az oranda maliğin hücre içermesidir (15, 16).

### Kordon Kanı

Erişkin kemik iliğinin aksine, göbük kordon kanından alınan saflaştırılmış progenitör hücreler, büyüme faktörü verilmesene bile klonojenik matürasyona uğrarlar. Broxmeyer ve ark. ve diğer bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda, hem term



hem de preterm göbük kordon kanının erişkin periferik kanı ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla sayıda progenitör hücre içerdiği gösterilmiştir (19).

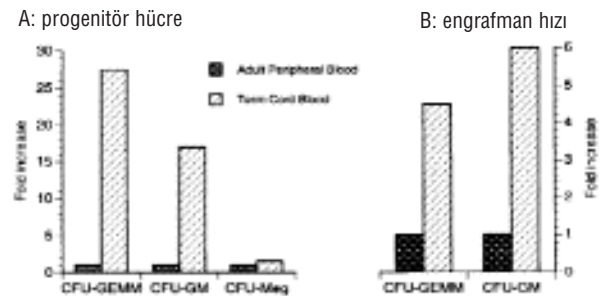
CFU-GM sayısı ve CFU-GM çoğalma hızı, kordon kanında anlamlı olarak daha yüksektir. Yine, "Kloni Oluşturan Ünit - Granulosit, Eritroid, Monosit, Megakaryosit" (CFU-GEMM)'in sayısının ve CFU-GEMM çoğalma hızının erişkin periferik kanı ile karşılaştırıldığında, kordon kanında daha yüksek olduğu gözlenmiştir (20-27).

İlk kordon kanı transplantasyonu, 1988 yılında Fanconi Anemili bir hastaya yapılmıştır. Yeterli hematopoetik kök hücreye sahip kordon kanı toplanarak, HLA uyumlu kordon kanından hastaya transplant yapılmış ve kür elde edilmiştir. Bu olgu sonrasında kordon kanı toplama, kordon kanı bankacılığı ve transplantasyon sayısı hızla artmıştır.

Donörlerin çoğu HLA uyumlu olmakla birlikte 1, 2 veya 3 HLA antijeni farklı donörlerle dahi başarılı transplantlar bildirilmiştir. Kordon kanı bankalarının tüm dünyada hızlıca yayılmasıyla HLA uygun veya kısmi uygun donörlerden 1000'in üzerinde başarılı transplantasyon gerçekleştirilmiştir.

Kordon kanı transplantasyon sayısının artması, allojenik transplantasyon için büyük kordon kanı bankalarının kurulmasına ve bunun sonucunda akraba ilişkili olmayan transplantasyon sayısının artmasına neden olmuştur. Bu durum, kordon kanı toplama, işleme ve depolama işlemlerine belirli bir standardizasyon getirilmesi gerekliliğini de ortaya çıkarmıştır (28).

Başlangı çalışmalarından çıkan ilk sonuçlar, kordon kanı transplantasyonunun kemik iliği transplantasyonuna iyi bir alternatif olduğunu göstermiştir. Çocuklarda malign ve malign olmayan hastalıklardaki sonuçlar oldukça iyidir. Vakaların %80'inde engrafman gözlenmiştir. Ortalama recovery süresi nötrofiller (PMN) için 22 gün, trombositler için 48 gündür. Engrafman hızı, verilen



Şekil: Kordon kanı ve erişkin periferik kanda bulunan progenitör hücre sayısı (A) ve engrafman hızının (B) karşılaştırılması.

hücre sayısı ile ilişkilidir. En az  $3 \times 10^7$  mononükleer hücre/kg alan hastalardaki nötrofil ve trombosit engraftmanı, bu sayıdan daha az hücre alan hastalara göre daha iyidir. Bu nedenle, toplanan hücre sayısının  $1 \times 10^7$ /kg veya  $CD34^+$  hücre sayısının  $2 \times 10^5$ 'den az olduğu durumlarda kordon kanı kullanılmalıdır.

HLA uyumlu kordon kanı transplantasyonu yapılan hastalarda GVHH oranı daha azdır. GVHH oranı ve şiddetinin az olması; donör ve alıcının genç yaşta olmasına, donör hücreleri daha önceden enfeksiyöz ajanlarla karşılaşmadığı için bu hücrelerin immunizasyon ve aktivasyonunun olmamasına, kordon kanındaki lenfosit sayısının az olmasına, kontamine anne hücrelerinin immun-supresif etkisine ve doğumda immunolojik fonksiyonların immatür olmasına bağlanmaktadır.

Akraba ilişkili olmayan veya HLA uygun olmayan akrabalardan yapılan kordon kanı transplantasyonunda, akut GVHH insidansı ve şiddetinin az olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte net sonuçların ortaya çıkması için daha fazla karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

### Fetal Karaciğer

Fetüs gelişimi sırasında, karaciğer fizyolojik olarak hematopoetik dokunun bir parçasıdır. Gebeliğin ikinci ayından yedinci ayna kadar olan süre içerisinde ve ideal olarak lenfopoezin başlangıcından önce fetal karaciğer transplantasyon için kullanılabilir. Konjenital immün yetmezliği olan çocuklarda görüldüğü gibi fetal karaciğer hem lenfopoetik hem de hematopoetik sistemin yeniden yapılandırılmasında oldukça başarılıdır (29-30).

### Mezenkimal Kök Hücre

Kemik iliği stromasının yeniden yapılandırılması ve dolaşıma kök hücrelerin salınmasını sağlayan "Mezenkimal kök hücre" olarak adlandırılan bir progenitör hücre grubunun varlığı bilinmektedir (31). Mezenkimal kök hücreler aynı zamanda kondrosit, osteoblast ve myeloblast gibi diğer Mezenkimal organ sistemlerinin prekürsör hücreleridir (32).

Kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilen ilk klinik çalışmalar osteogenesis imperfekta tanısı almış çocukların tedavisi için yapılmıştır. Ayrıca kalp kası hücresi ve endotel gibi özelleşmiş doku üretiminde de Mezenkimal kök hücrelerden yararlanılmaktadır.

### KAYNAKLAR

1. Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB. Successful engraftment of

cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52: 85-95.

2. Thomas ED, Storb R. Technique for human marrow grafting. *Blood* 1970; 36: 507-515.
3. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone marrow transplantation. *N Eng J Med* 1975; 292: 832-843.
4. Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL. A guide to bone marrow transplantation. Berlin, New York: Springer Verlag, 1988.
5. Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B et al. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. *Transplantation* 1987; 43: 842-847.
6. Sandell L, Johnson G, Przepiorka D et al. Phenotype and function of T-cells associated with marrow graft failure and rejection. In: Martelli MF, Grignani F, Reisner Y, eds. T-Cell Depletion in Allogeneic Bone Marrow Transplantation. Sereno Symposia Review No. 13, New York: Raven Press, 1988; 49-56.
7. Anderson KC, Barut BA, Ritz J et al. Monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation therapy for multiple myeloma. *Blood* 1991; 77: 712-720.
8. Foon KA, Tood RF III. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68: 1-31.
9. Areman EM, Deeg HJ, Sacher RA. Bone Marrow and Stem Cell Processing: A Manual of Current Techniques. Philadelphia: F.A. Davis & Co., 1992.
10. Bender JG, Unverzagt K, Walker DE et al. Phenotypic analysis and characterization of  $CD34^+$  cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70: 10-18.
11. Juttner CA, To LB, Haylock DN et al. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukemia produce prompt but incomplete hematopoietic reconstitution after high dose melphelan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol* 1985; 61: 739-745.
12. Lopez M, Mortel O, Pouillart P et al. Infusion of autologous peripheral blood nucleated cells hastens hematological recovery after high dose chemotherapy and autologous transplantation of bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 44-45.
13. Campos L, Bastion Y, Roubi N et al. Peripheral blood stem cells harvested after chemotherapy and GM-CSF for treatment intensification in patients with advanced lymphoproliferative diseases. *Leukemia* 1993; 7: 1409-1415.
14. Siena S, Bregni M, Brando B et al. Circulation of  $CD34^+$  hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 74: 1905-1914.
15. Körbling M, Burke P, Braine H et al. Successful engraftment of blood-derived normal hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1981; 9: 684-690.

16. Sharp JG, Armitage J, Crouse D et al. Are occult tumor cells present in peripheral stem cell harvests of candidates for autologous transplantation? In: Dicke KA, Spitzer G, Jagannath S et al., eds. *Autologous Bone Marrow Transplantation: Proceedings of the Fourth International Symposium*, 1989; 693-696.
17. McNiece JK, Stewart FM, Deacon DM et al. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 1989; 74: 609-612.
18. Russell NH, Hunter A, Rogers S et al. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet* 1993; 341: 1482.
19. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas GW, Friedman H, Cooper S, Hangoc G, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA. Human Umbilical cord blood: A clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning* 1980; 8: 76.
20. Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong GG, Clark SC, Nathan DG. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity.
21. Haneline LS, Marshall KP, Clapp DW. The highest concentration of primitive hematopoietic progenitor cells in cord blood is found in extremely premature infants. *Pediatr Res* 1996; 39: 820.
22. Christensen RD, Harper TE, Rothstein G. Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm neonates.
23. Olson T, Levine R, Mazur E, Wright D, Salvado A. Megakaryocytes and megakaryocyte progenitors in human cord blood. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 14: 241.
24. Deutsch VR, Olson TA, Nagler A, Slavin S, Levine RF, Eldor A. The response of cord blood megakaryocyte progenitors to IL-3, IL-6 and aplastic canine serum varies with gestational age. *Br J Hematol* 1995; 89:8.
25. Broxmeyer H, Douglas G, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Amy M, Thomas L, Boyse E. Human Umbilical cord blood: A clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828.
26. Broxmeyer H, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro R, Graves V, Yoder M, Wagner J, Vadhan-Raj S, Benninger L, Rubinstein P, Broun E. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4109.
27. Christensen R. Circulating hematopoietic progenitor cells in neonates. *J Pediatr* 1987; 110: 622.
28. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; 81: 1679-1690.
29. O'Reilly RJ, Pollack MS, Kapoor N et al. Fetal liver transplantation in man and animals. In: Gale RP, ed. *Recent advances in Bone Marrow transplantation*. New York: Alan R. Liss, 1983; 799-830.
30. Touraine JL. Transplantation of both fetal liver and thymus in severe combined immunodeficiencies: interaction between donor's and recipient's cells. In: Lucarelli G, Flidner TM, Gale RP, eds. *Fetal Liver Transplantation*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980; 276-283.
31. Sandmaier BM, Storb R, Kinley J et al. Evidence of allogeneic stromal engraftment in the bone marrow using canine mesenchymal stem cells. *Blood* 1998; 92: 116a.
32. Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 318-3.