

## Laboratuarda Kök Hücre

Prof.Dr.Ercüment Ovalı  
KT-Atı Teknoloji

Önümüzdeki on yıl hücre tedavilerinin çok konuulacağı bir dönem olacaktır. Özellikle kök hücrelerin yoğun rejenerasyon ve differansiyasyon kapasitesinin ortaya çıkması doku mühendisliği ve hücresele tedavilerde bu hücrelerin uzun süre ilk tercih edilecek hücreler olacağına işaret etmektedir.

Bugün kök hücreler somatik  germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma yetenekleri açısından klasifiye edilmektedirler. Totipotente hücreler, zigote evresindeki, 8 hücrelik blastomer aşamasındaki hücreler olup, bunlar pluripotente hücrelerin tüm yeteneklerine sahipken, farklı olarak plasental organelleri ve trofoblastları da yapan hücrelerdir. Pluripotente hücreler, mezodermal (kemik ,kas, kan, kıkırdak vb), ektodermal (nöron, deri, sa vb) ve endodermal hücrelere (hepatosit, pankreatik beta hücreleri, GIS hücreleri) dönüşme yeteneği olan hücrelerdir. Multipotente kök hücreler ise sadece bir germ yaprağına ait hücreleri yapabilen hücrelerdir.

Bugün için bir hücrenin kök hücre tanımına uyabilmesi için  temel kriteri yerine getirmesi gereklidir (1):

- Kendini yenileyebilme
- Farklı hücrelere dnebilme
- İn vivo Őartlarda uygulandığı dokuyu fonksiyonel olarak destekleyebilme

Bu kriterlere uyan bugün için tanımlanmış kök hücre tipleri: (1,2)

- Embriyonik kök hücreler
- Non-embriyonik kök hücreler

- Erişkin kök hücreler (somatik kök hücreler)
  - Hematopoetik kök hücre
    - Kemik iliği kaynaklı kök hücreler
    - Periferik kan kaynaklı kök hücreler
  - § Stromal kök hücreler
    - MKH: Mezenkimal kök hücre
    - MAPC: Multipotent erişkin kök hücresi,
    - MIAMI: Erişkin kemik iliği kaynaklı indüklenebilir multilineage hücre
    - HBMSC: İnsan kemik iliği multipotent kök hücresi
  - § Organ spesifik kök hücreler
- Fetüs kök hücreleri
- Kadavradan elde edilen kök hücreler
- Göbek kordonu veya plasental kök hücreler
- Parteneod hücreler
- Dedifferansiyasyon ile herhangi bir hücre kök hücre haline gelen hücreler

Bugün reperatif ve rejeneratif tıp olarak tanımlanan bir alanda embriyonel, fetal, kadavra hücrelerinin allogeneik oluşları, özellikle embriyonel hücrelerde gösterilen teratom oluşturma riskleri ve bazı etik sorunları beraberlerinde taşımaları nedeniyle klinik uygulamalarda son derece kısıtlı kullanılırken; dedifferansiyasyon ile elde edilen kök hücreler ile parteneot hücreler sadece hayvan modellerinde çalışılmaktadır. Otolog organ spesifik kök hücrelerin üretim zorluğu ve amaçlanan hedefler için yeterli sayıya

elde edilememesi nedeniyle kliniğe yansması çok azdır. MAPC, MİAMİ ve HBMSC ise üretimleri zor, zaman alıcı ve çok fazla manuplasyon gerektirdikleri için henüz klinikte yeterli uygulama alanı bulamamışlardır. Bu alanda kliniğe en çok yansıyan hücreler otolog hematopoetik ve klasik mezenkimal kök hücrelerdir. Bu nedenle bu yazıda sadece reperatif tıpta kullanılmak üzere üretim yapılacak olan hematopoetik kök hücreler ve özellikle mezenkimal hücreleri izolasyon ve üretim tekniklerinden bahsedilecektir.

### **Reperatif amaçlı kök hücre izolasyonu:**

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

- 1- Kemik iliği
- 2- Periferik kan
- 3- Kordon kanı

Her 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. 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

4- Negatif seleksiyon

Dansite gradient yöntemi ile izolasyonda kullanılan maddelerin toksisite olasılıkları nedeniyle kullanımı tartışma konusu iken, hücrelerin pozitif veya negatif seleksiyonla izolasyonunda da antikor kullanımı tartışmalıdır. 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 (3).

İzolasyon sonrası yapılması gereken kalite kontrol testleri ise:

a- Hücre sayımı

b- Canlılık

c- Morfolojik analiz

d- İmmüfenotipleme: En sık kullanılan tanımlama panelleri aşağıda özetlenmiştir.

i. Hematopoetik kök hücre için: CD45, CD34, CD38, CD13, CD33, CD14, CD3, CD133

ii. Klasik MKH için: CD45(-), CD34(-), CD13(+), CD14(-), CD31(-), CD73(+), CD105(+), CD44(+), CD29(+), CD90(+), CD166(+), Stro-1(+), HLA-DR(-)

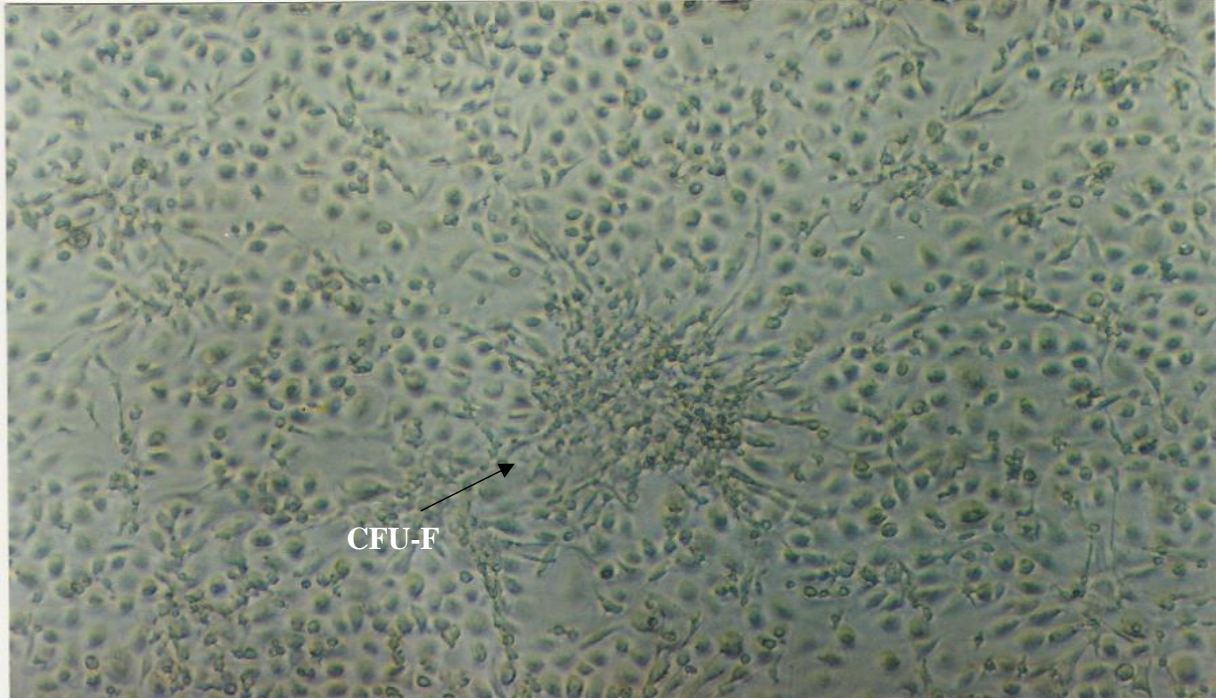
e- Koloni sayımı:

i. Hematopoetik kök hücre için: CFU-Mix (Elde edilen kök hücrelerin IL-3, SCF, GM-CSF, Eritropoetin varlığında yarı katı

ortamda inkübasyonunu takiben 14. günde yapılan koloni değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir).

- ii. MKH için: CFU-F (MKH üretiminde yer alan ilk kültür işleminin 7. günü flask tabanında oluşan fibroblast benzeri kolonilerin sayımı ile yapılır) (Resim-1).

f- Aerop ve anaerop kültür



Resim -1 : MKH kültürünün 8. günü CFU-F örneği

## **Reperatif amaçlı hücrelerin üretimi:**

**Kültür öncesi hazırlık:** MKH'nin periferik kandan ve umbilikal kord kanında kemik iliğine göre oldukça az olması nedeniyle bu kaynaklardan elde edilmesi daha zordur. Bu nedenle MKH üretimini etkileyen monositlerin önceden elimine edilmesi önerilmektedir (4). Bu işlem için mezenkimal hücrelerin adhezyon yüzeyi olarak kullanılacak plastik flask veya plate'in human albumin veya daha iyisi otolog serum (OS) ile kaplanması önerilmektedir. (Bu işlem monositlerin plastik üzerine adezyon yeteneğini azaltacaktır). Kaplama işleminde flaskın yüzeyini tamamen kapatacak kadar human albumin/otolog serum flask içine konduktan sonra oda sıcaklığında flask 60 dakika inkübe edilir. Takiben flask içindeki albumin/serumun fazlası dışarı alınır ve kullanıma kadar +4°C'de yarı kapalı olarak saklamaya alınarak, kurutulur. Bu aşamadan sonra, monosit ve myelosit içeriği azaltılmak istenen mononuklear hücre süspansiyonu 12-18 saat süre ile +37°C'de bekletildikten sonra supernatan toplanır ve atılır. Takiben MKH kültür işlemine yeni kültür vasatı desteğinde devam edilir. Bu işlemlerle MKH kültürü yapılacak mononuklear hücre süspansiyonunda var olan monositlerin %50'sinden kurtulmak mümkün olacaktır. Ayrıca flaskın serum ile kaplama işlemi kültürün ilerleyen günlerinde MKH hücrenin gelişimini de olumlu etkileyecektir. Bu yöntem, kemik iliğinden hücre izolasyonunda da önerilmektedir. Böylece monositler gibi myeloid seri hücrelerinin de kemik iliği mononuklear hücrelerinden uzaklaştırılması sağlanarak bu işlemin kemik iliği kaynaklı MKH gelişimine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

**MKH kültür şartları:** MKH üretimi için bugün değişik besi yerleri kullanılmaktadır.

Bunlar:

- 1-  $\alpha$  MEM (minimum essential eagle's media)
- 2- Düşük glukozlu DMEM-LG (Dubelco's modifiye eagle media)
- 3- RPMI 1640
- 4- IMDM

Bu besi yerlerinden en popüler olanları DMEM ve  $\alpha$  MEM'dir. Bu besi yerleri %10-40 oranında değişen oranlarda Fetal calf serum(FCS) ile desteklenmektedir. Lot numaraları MKH için onaylanmış FCS içeren hazır besi yerlerine en iyi örnek ise MesenCult (Stem cell Technologies) besi yeridir. Ancak insan çalışmaları için FCS kullanımının sorunlu olması nedeniyle otolog serum veya bu amaçla üretilen serumsuz besi yerlerinin kullanılması önerilmektedir (örneğin UltraCulture, Cambrex-USA ve serum yerine destek olarak UltraserG, Pall Biosepra-France karışımı bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır).

**MKH kültür işlemi (şekil-1):**  $1 \times 10^4$ -  $0.5 \times 10^6$  /cm<sup>2</sup> MNH ilk kültür işlemi için önerilen hücre yoğunluğudur (5). Biz genellikle %10 otolog serum içeren RPMI 1640 içinde bu kültürleri yapmaktayız ve FCS içeren ortama göre verilerimiz daha fazla sayıda, daha yüksek farklılaşma potansiyeline sahip MKH elde edebildiğimizi göstermektedir (6). F0, yani ilk kültür döneminde hücreler 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub> basıncı altında kültüre alınırlar. Bu dönemde kemik iliği kaynaklı MNH kültürlerinde 3 günde bir, kordon kanı kaynaklı MNH kültürlerinde 7 günde bir media değişimi önerilmektedir. Genellikle 7-10. günlerde CFU-F oluşur. Kemik iliği kaynaklı MNH kültüründe MKH görünümlü işsi hücreler 14. günde kültür flaskının %80'ini kaplarken, kordon kanı

örneklerinde bu süre 20 güne kadar uzamaktadır. Bu aşamadan sonra hücrelerin tripsinizasyon ile yerinden kaldırılması ve takiben F1 pasajı için yeniden ekilmesi gereklidir. F0 pasajından sonraki pasajlarda hücrelerin yoğunluğu MKH'nin gelişimi ve farklılaşma kapasitelerinin korunabilmesi için oldukça önemlidir. Bu dönemden sonra santimetrekare yüzey başına 10 hücreden daha fazla hücre ekilmemesi önerilmektedir. F0 sonrası pasajlarda hücre çoğalması belirgin olarak artacak ve 3-4 günde bir yeni pasaj gerekecektir. İnsan çalışmaları için kullanılacak hücrelerin pasaja alınmasında tripsinizasyon kullanımı oldukça sorunlu olması nedeniyle farklı detach yöntemlerinin her laboratuvarca geliştirilmesi ve valide edilmesi bu noktada gereklidir.

F3 pasajı sonrası insan çalışmaları için en uygun pasaj hücreleri olduğu düşünülmektedir (resim-2). F0 pasajından sonra hücrelerin gelişimini hızlandırmak için F0 pasajında elde edilen ilk 3 gündeki supernatan sıvısının (media değiştirmek üzere atılan eski sıvı) steril filtrasyon sonrası diğer pasajlarda %10-15 oranında kullanılması halinde MKH gelişiminin daha iyi olabileceği rapor edilmektedir (1). Özellikle CFU-F düşük örneklerde bu önerilmektedir.

Son yıllarda geliştirilen bir diğer kök hücre ise MİAMİ, hücreleri olup bu hücreler klasik MKH üretiminden farklı olarak MNH'ler fibronektin ile kaplanmış flasklarda 1000-1500 hücre/cm<sup>2</sup> konsantrasyonda F0 da %5 FCS, takibeden pasajlarda % 2 FBS içeren media ile %3 O<sub>2</sub> altında kültüre edilerek üretilmektedir. Özellikle bu hücrelerin üretiminde MAPC'dan farklı olarak (+) seleksiyon yapılmaması ve bir dizi sitokine ihtiyaç göstermemesi nedeniyle insan çalışmalarında önemli ölçüde kullanıma uygun bir hücre gibi durmaktadır. MİAMİ hücrelerinin klasik MKH'den farklı olarak, ikiye katlanma sürelerinin kısa olması, telomer uzunluklarını yitirmemeleri, embriyonel kök hücreler gibi Oct-4, Rex-1 genlerini içermesi ve her 3 germ yaprağına dönüşüm gösterebilmeleri



nedeniyle araştırmalara konu olacak bir hücre gibi durmaktadır . Bu anlamda Yoon ve ark (7) tanımladığı hBMSC'ler ise benzer ancak farklı metotlarla üretilen potansiyel olarak klinik uygulamalarda yer alabilecek hücrelerdir. Bu metoda fibronektin kaplı plastik yüzeylerde  $5 \times 10^6$  hücre %17 FCS varlığında F0'da %5 CO<sub>2</sub> basıncında kültüre edildikten sonra en az 2 pasaja alınmış, pasajlarda  $1 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> aynı besi yeri koşullarında 4-6 gün inkübe edildikten sonra hücreler %60 konfluent hale geldiğinde yeni pasaja geçilmiş ve son aşamada limiting dilution yöntemi ile tek hücrelerden klonlar üretilmiştir. En hızlı üreyen klonlar izole edilerek incelendiğinde bu hücrelerin 120 kez ikiye katlanmalarına rağmen telomer boylarının kısalmadığı ve her 3 germ yaprağına dönüşüm gösterdiğini rapor edilmiştir. (Tablo-1'de MAPC, MIAMI ve HBMSC özellikleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur).

Hücre tipi	(-)immünfenotipik markırlar	(+)immünfenotipik markırlar	Embriyonel hücre transkripsiyon faktörleri	Telomeraz aktivitesi
hMAPC	CD10, 31, 34, 36, 45, 106, 117, HLA-DR, Class I HLA	CD13, 49, 44, 90	Fare dizilerinde var ancak insan dizilerinde bilinmiyor	Pozitif
MIAMI	CD34, 45, 56, 117, HLA-DR	CD10, 29, 44, 90, 103	Oct-4, Rex-1	Pozitif
hMBSC	CD13, 29, 31, 34, 44, 45, 73, 133, HLA-DR, Class I HLA	CD90w, CD105w CD117w	Oct-4 negatif	Pozitif

Tablo-1 MKH alt gruplarının karşılaştırmalı özellikleri(1)

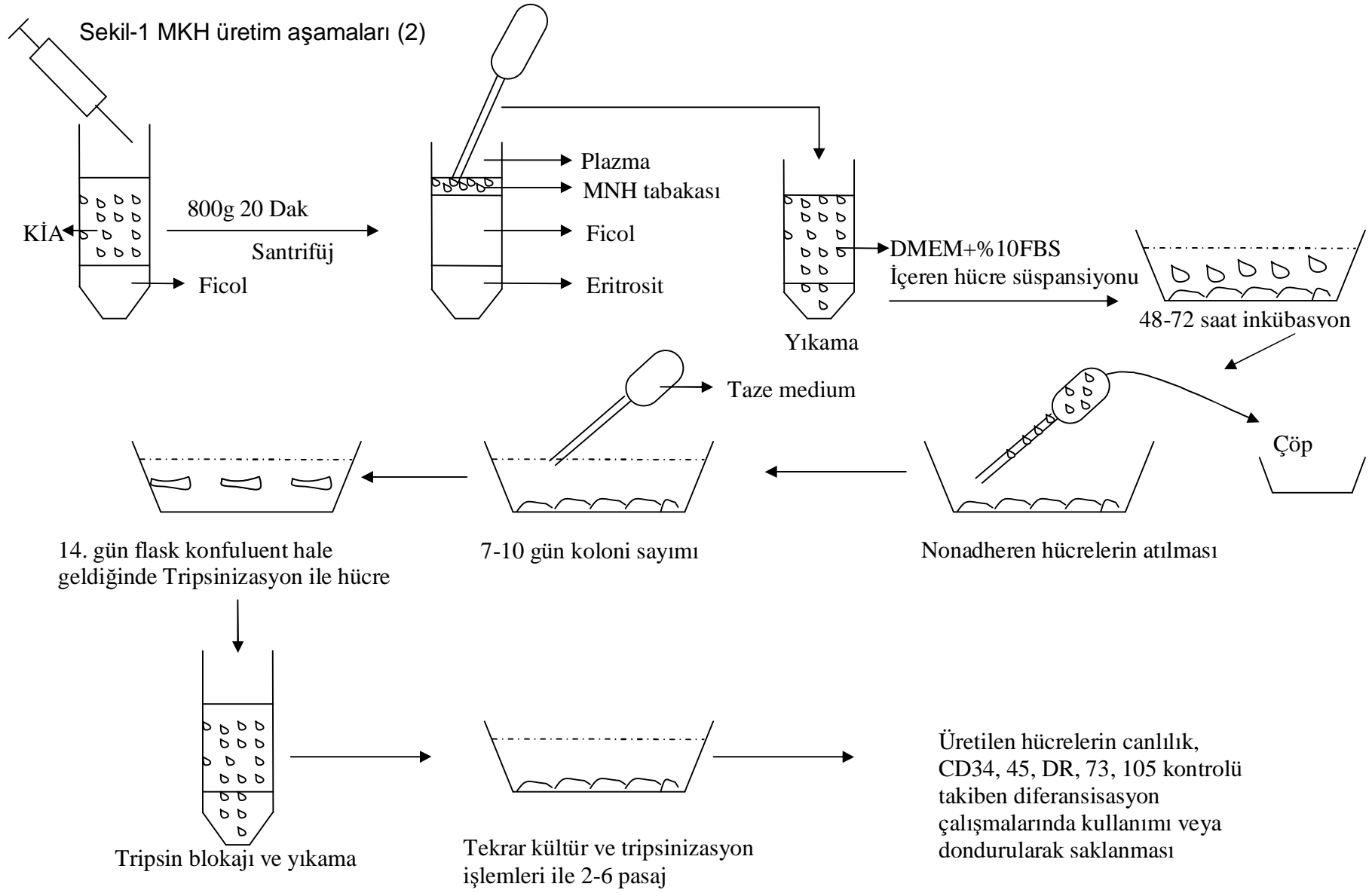
Görüldüğü gibi MKH ve MKH alt gruplarının üretiminde henüz tam bir standart mevcut değildir ancak netleşen noktalar şu şekilde özetlenebilir:

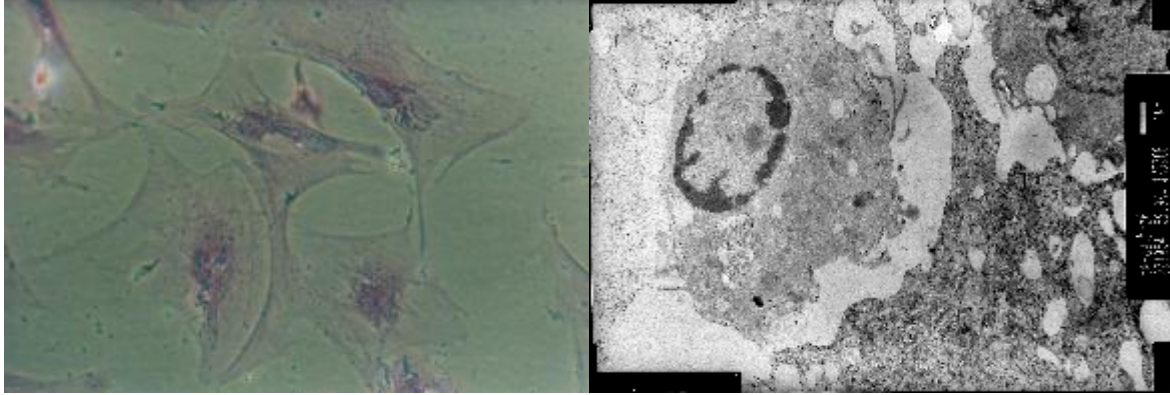
1-En sık kullanılan besi yeri DMEM-LG olup genellikle %10-20 FCS veya OS kullanımı önerilmektedir

2- Kültüre edilen hücre dansitesi son derece önemli olup fibronektin ile kaplanmamış ortamlarda F0 dan sonraki pasajlarda düşük dansitede hücre kullanımı 1000hücre/cm<sup>2</sup> tercih edilmelidir. Fibronektin ile kaplı yüzeylerde üretimlerde bu oranın 10.000hücre/cm<sup>2</sup> ye artırılabilceği görülmektedir.

3- Kültür esnasında fibronektin ile kaplanmış yüzeylerin varlığı önemli gibi durmaktadır ancak insan uygulamaları için kullanılacak fibronektinin seçimi iyi yapılmalıdır.

4- Pasaj sayısı arttıkça hücrelerin saflığı artmaktadır bu nedenle 3-6 pasajdan önce çalışma yapılmamalıdır. Özellikle 3-6 pasajdan sonra yapılacak dilüsyon ile tek bir hücreden üretilcek MKH alt klonlarından en hızlı çoğalma yeteneğine sahip hücrelerin çalışmalar için kullanılması önerilmektedir.





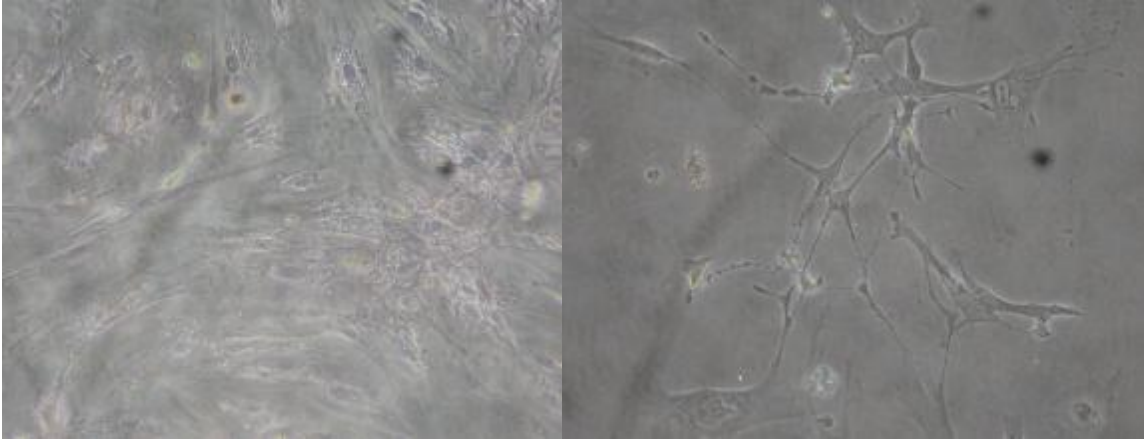
Resim-2. F3 pasajı sonrası MKH'lerin Trikróm boyasında ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik görüntüleri ( 2,6)

#### Üretilen MKH'lerin kalite kontrolü:

- a. Hücre sayımı: Hücre sayım kameraları ile yapılır (Thoma lamı, Neugot chamber vb).
- b. Canlılık: En sık Tripan – Blue ile canlılık bakılmaktadır. Çalışmalar için %95'in üzerinde canlılık varlığı önerilmektedir.
- c. Morfolojik analiz: Özellikle içsi hücrelerin varlığı tercih edilirken poligonal hücreler farklılaşmaya başlamış hücreler olarak değerlendirilir. Ancak hBMSC'ler yuvarlak yüksek hücre sitoplazma oranına sahip 15-20µm'lik hücrelerdir.
- d. İmmünfenotipleme: En sık kullanılan tanımlama panelleri aşağıda özetlenmiştir.

CD45, CD34, CD13, CD14, CD31, CD73, CD105, CD44, CD29, CD90, CD166, Stro-1, HLA-DR.

- e. Akım sitometrik DNA piloidi analizi: Özellikle hipodiploidi veya hiperdiploidi kültür esnasında major DNA içerik değişiminin varlığını test etmek için yapılmaktadır.
- f. Farklılaşma yeteneğinin ölçümü: Adiposit, kartilaj, düz kas, nöron, endotelyal farklılaşma çalışmaları üretilen hücrenin her üç germ yaprağına ait farklılaşma yeteneğinin tespiti için önerilmektedir.
- g. Aerop ve anaerop kültür: İnsan uygulamalarında 14 günlük kültür süreç takibi zorunludur.
- h. Diğer: Özellikle telomer uzunluğu ve telomeraz enzim aktivitesinin tayini hücrelerin yeteneklerinin takibi açısından önerilmektedir.



Resim-3. Farklılaşma öncesi MKH ve nöronal farklılaşma çalışması sonrası multipolar nöron görünümlü hücreler (E. Ovalı'nın arşivinden)

Kaynakça:

- 1-Montaya FU, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. J Biosci. Bioeng. 100:12-27:2005
- 2- Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. Atı Teknoloji yayın no:1. Trabzon. 2004.
- 3- Klug AC, Jordan CT(eds). Hematopoietic stem cell protocols. Humana Press Totowa, New Jersey. 2002
- 4-Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells. 22:625-634:2004.
- 5- Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow derived mesenchymal stem cells. Leuk. Lymph. 46:1531-1544:2005
- 6- 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
- 7- Yoon YS, Wecker A, Hetd L et al . Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. J. Clin. Invest. 115:326-338:2005.