

HÜCRE TABAKALARI İLE DOKU ÜRETİMİ



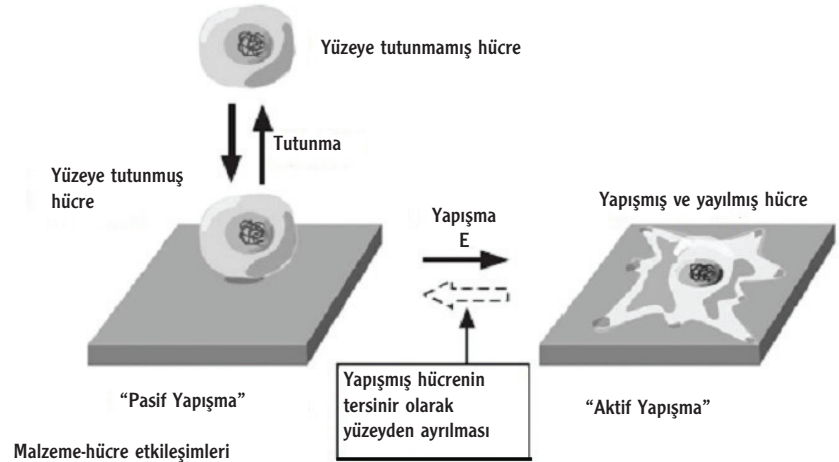
Vücudumuzdaki hasarlı ya da kayıp organ ve dokuların onarımı ya da yeniden yapılandırılmasını hedefleyen doku mühendisliği, heyecan verici yaklaşımlarıyla yakın bir gelecekte insanlığın yaşam kalitesinin artırılmasına damgasını vuracağı benziyor. İşte bu yaklaşımların en sonucusu, sıcaklığa duyarlı doku kültür kaplarında hücreleri tabaka halinde üretmek ve bu tabakaları uygun düzende birleştirerek doku oluşumunu gerçekleştirmek. Mesane, kalp dokusu, diş çevre dokusu ve göz yüzeyleri, hücre tabakalarının başarılı uygulama alanları.

Doku mühendisliğinde çeşitli yaklaşımlar var. Doku hasarının küçük olduğu durumda, hastanın kendisinden ya da uygun bir vericiden izole edilen sağlıklı hücreler, hasarlı bölgeye doğrudan veya kapsüller içerisinde enjekte edilerek doku onarımı sağlanıyor. Küçük hasar durumundaki diğer bir yaklaşım ise, doku oluşumunu tetikleyen maddelerin, örneğin büyüme ve farklılaştırma faktörlerinin hasarlı bölgeye gönderilmesi. Ancak, bu yaklaşımların her ikisi de ciddi kayıp veya hasar durumlarında çözüm olmaktan uzaklar. Bu durumda, doku mühendisliğinin üçüncü ve en çarpıcı yaklaşımı ortaya çıkıyor. Sağlıklı hücreler, gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç-boyutlu bir iskelet üzerine yerleştiriliyor. İskelet, çoğunlukla bozulan yapıda bir polimerden üretiliyor ve doku hasarına uygun biçimde, bilgisayar teknolojisine dayalı tekniklerle şekillendiriliyor. Ayrıca, hücre üremesini ve işlevlerini gerçekleştir-

mek üzere uygun faktörlerle zenginleştiriliyor. Hücreler, iskelet üzerinde üreyip doku oluşumunu gerçekleştirirken, iskelet de parçalanıp yok oluyor. Doku oluşumunda en son yaklaşım, tek hücreler yerine hücre tabakalarından doku oluşturmak. Bilindiği gibi, vücudumuzdaki organlar üç farklı hücre tabakasının gelişimiyle oluşmuş durumda: endoderm, mezoderm ve ektoderm. Organ oluşumunda bu üç tabaka birbirleriyle etkileşim halinde. İlk olarak, Tokyo Kadınlar Tıp Üniversitesi'nden Okano ve grubu tarafından 2004 yılında öne sürülen "hücre tabaka mühendisliği"nin temeli de, yukarıdaki bu kuramsal bilgiye dayanıyor.

Doku hücrelerinin bir malzemeye etkileşiminde üç durum söz konusu. Bunlardan ilki, hücrelerin yüzeye etkileşmediği, böylece hücre yapışmasının ve üremesinin gerçekleşmediği durum. Böyle malzemeler doku üretiminde kullanılamaz. İkincisi, malzemeye hü-

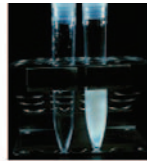
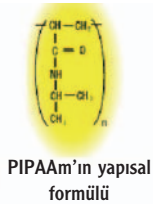
reler arasında fizikokimyasal etkileşimlerin olduğu ve bunun sonucunda da geri dönüşümlü (tersinir) hücre yapışmasının (pasif yapışma) gerçekleştiği durum. Son tür etkileşim ise "aktif hücre yapışması". Pasif yapışma sonrasında gerçekleşen bu olayda, hücreler malzeme yüzeyine yapışır, yayılır ve ürerler. Bu yüzeylerden hücreleri koparmak için, tripsin ve dispaz gibi protein zincirlerini kıran (proteolitik) enzimler kullanmak gerekir. Bu enzimler, hücre yapışma moleküllerini ve hücreler arasındaki matrisi (ECM) hücrelerden ayırırlar. Sonuç olarak, işlem sonrasında tek tek hücreler elde edilir. Tabaka halinde hücre üretebilmek için, araştırmacılar proteolitik enzimleri kullanmadan hücreleri malzeme yüzeyinden kaldıracabilecek yöntemleri aramışlar ve sıcaklık-duyarlı polimerlerin özelliklerini bu yönde kullanmanın mümkün olabileceğini göstermişler. Biyolojik ortamda parçalanıp yok olan "biyo-





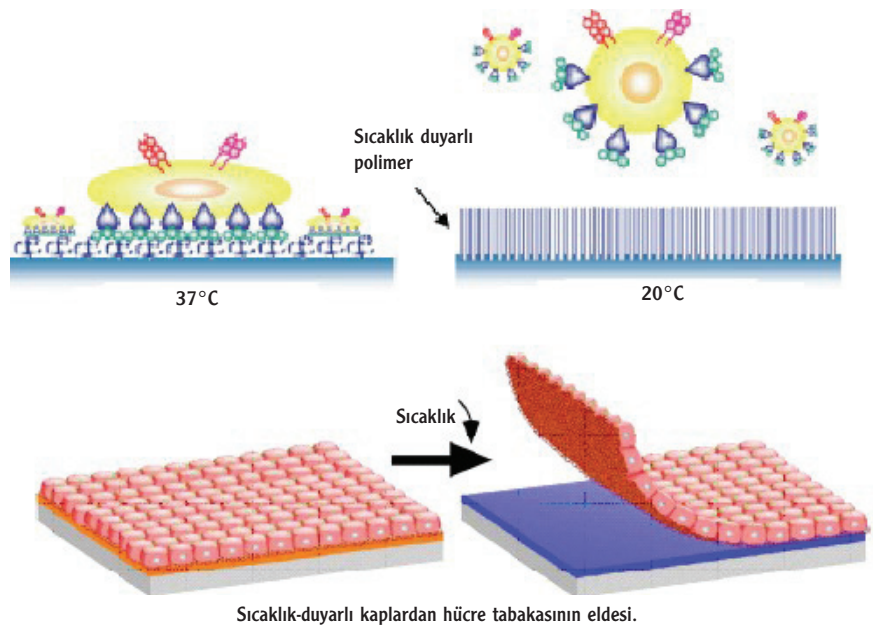
bozunur polimerler” birinci nesil doku mühendisliği için anahtar rol oynarken, ikinci nesil doku mühendisliği için, hücrelerin tabaka halinde üretimini sağlayan “sıcaklık-duyarlı polimerler” anahtar rol oynuyor.

Araştırmacılar, sıcaklık-duyarlı polimerler arasında en çok kullanılan poli (N-izopropil akrilamid)’i seçmişler. Poli (N-izopropil akrilamid), en düşük kritik çözünme sıcaklığı (LCST) olan 32°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda, yapıdaki suyu kaybederek büzülür. 32°C’nin altındaki sıcaklıklarda yapıya tekrar su alarak şişme özelliği gösterir. “Biyonano yüzey teknolojisi” kullanılarak, organik malzemelerin yüzeyine elektron bombardımanı ile herhangi bir polimeri kaplamak mümkündür. Bu teknolojiyle polimer, nanometre kalınlığında ve pürüzsüz bir şekilde plastik malzemeler üzerine kaplanabilir. Okano ve grubu, bu teknolojiyi kullanarak, polistiren doku kültür kaplarının yüzeyine poli(N-izopropil akrilamid)’i kaplamışlar. 20 nanometre kalınlığındaki bu polimer tabakası, ortam sıcaklığının değiştirilmesiyle hücrelerin kap yüzeyine yapışmasına ve yüzeyden kopmasına izin veriyor. 37°C’de, yani pek çok hücrenin üreyebildiği sıcaklıkta, kültür kabının yüzeyi hidrofobiktir; yani su moleküllerini iter. Bu sıcaklıkta hücreler yüzeye yapışır, yayılır ve çoğalır. Hücre üremesi tamamlandığında, yani kap yü-



Sulu çözelti içerisinde PIPAAm’in sıcaklıkla çözünürlük/çözünmezlik değişimi

32°C’nin altında çözünür 32°C’nin üstünde çözünmez



zeyinin tamamı hücrelerle kaplandığında sıcaklık 32°C’nin altına düşürülür ve yüzey hidrofilik (suyu seven) hale gelir. Böylelikle, şişen yüzey üzerinden herhangi bir enzime gerek duyulmadan hücreler kalkar. Hücre-hücre bağlantıları ve hücreler arasında birikmiş matris (ECM) bozulmadığından, hücreler tabaka halinde elde edilir. Canlı olan bu hücre tabakası, diğer bir kültür kabına ya da vücut içerisindeki doku yüzeyine aktarılabilir. Ayrıca, hücre tabakaları birbiri üzerine yerleştirilerek 3-boyutlu yapı halinde de elde edilebilirler. Bu yöntem, farklı hücre tabakalarını birleştirerek yeni bir organ oluşturmaya izin veren şu andaki tek yöntem.

Klinik Uygulamalar

Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarından kaldırılan epidermal hücre tabakaları, bu konudaki ilk klinik uygulamadır. Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında hazırlanan insan epidermal hücre tabakaları daha az kırılabilir olup, dispaz enzimiyle yüzeyden kaldırılan benzeri hücre tabakalarına göre, yaralara çok daha iyi yapışma özelliği göstermiş durumdadır.

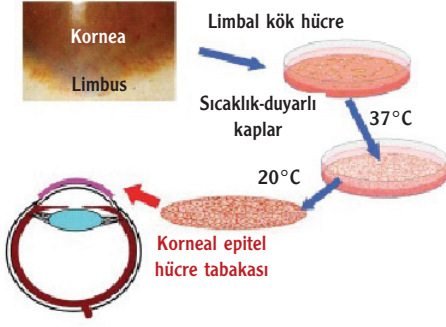
Göz Yüzeyinin Oluşturulması

Hücre tabakaları, göz yüzeyinin yeniden yapılanmasında da kullanılıyor. Kornea’daki (saydam tabaka) epitel kök hücreleri, kornea ve konjunktiva (göz zarı) arasındaki sınırdadır, yani limbus’ta yerleşmiş durumdadır. Alkali yanıkları

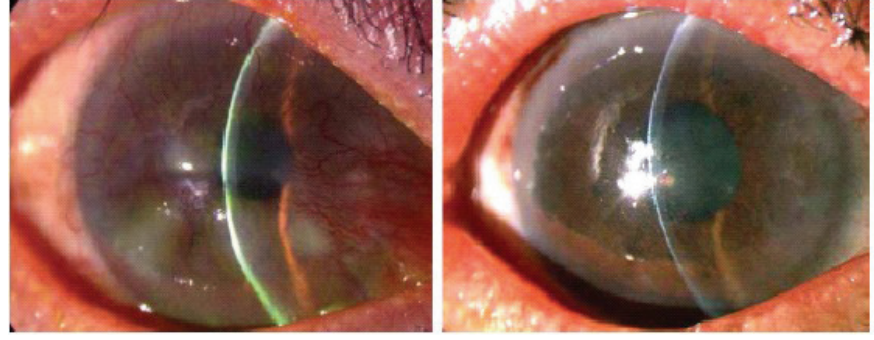
gibi göz travmaları ve Stevens-Johnson sendromu gibi ağrılı göz hastalıkları, limbus’ta kök hücre eksikliği nedeniyle kornea’da opaklaşmaya ve görüntü kaybına neden olurlar. Bu durumda kornea nakli gerekir. Ancak, verici bulmak en önemli sorun. Doku mühendisliğinin ürettiği çözüm, limbus kök hücrelerini izole etmek ve sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında, 37°C’de çoğaltmaktır. Oluşan kornea epitel hücre tabakaları, sıcaklık 20°C’ye düşürüldüğünde kap yüzeyinden kolaylıkla ayrılıyor. Bu tabakalar şeffaf ve dikiş gereksizdir korneaya kolaylıkla yapışıyor. Tek bir hasta için 2x2 mm boyutlarında doku parçası yeterli olmuş ve tüm vakalarda kornea tabakasının naklinden sonra, görüşün anlamlı bir biçimde berraklaştığı görülmüş durumda. Tek bir vericinin gözünden alınan kök hücreleriyle hazırlanan hücre tabakalarının 20’den fazla hasta için yeterli olacağı umuluyor. Araştırmacılar halen kornea endotel hücre tabakaları ve retina (ağtabaka) pigmentli epitel hücre tabakalarının, hayvanlara nakli üzerinde çalışmaktadırlar. Başarı sağlandığı takdirde, optik şeffaflık açısından sorun yaratan biyobozunur polimer iskeletlerin, göz dokusu yapılanmasında kullanımına gerek kalmayacaktır.

Diş Çevresinin Yeniden Yapılandırılması

“Periodontal ligament”; dişi diş yuvasına tespit eden kollajen liflerden oluşmuş bağ dokusu. Geniş anlamda



Kornea epitel hücre tabaka nakli



Kornea rejenerasyonu; korneal epitel hücre tabakası nakli yapılan hastanın, nakilden önce (solda) ve sonra (sağda) çekilmiş fotoğrafları

dişi saran ve ona destek sağlayan çevre doku ve oluşumların tümü, “periodontium” olarak adlandırıyor. Diş çevresindeki (periodontal) hastalıklar, eskiden beri bilinen yaygın hastalıklar. Bunlar periodontium’un iltihaplanması, nefesin pis kokması ve diş kayıpları gibi acı verici şikayetlere neden olur. Geleneksel tedavi yöntemleriyse, diş çevresindeki dokunun yeniden yapılandırılması için yetersiz kalıyor. Hücre tabaka mühendisliği, bu sorunların çözümü için diş eti çevresine uygulanmış bulunuyor. Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında insan periodontal ligament hücre tabakaları üretildi ve sıçanlara nakledildi. Çalışmada boşluk içerisine yapışmış fibriller ve diş kökünü çevreleyen ince kemik tabakaya benzeyen hücresel içerikli doku benzeri periodontal ligament tanımlandı. Oluşan fibriller doğal periodontal ligament fibrillerin aynısıydı. Ulaşılan sonuçlar, bu tekniğin diş çevresinin yapılandırılmasında yararlı olabileceğini gösteriyor.

Mesane Oluşturulması

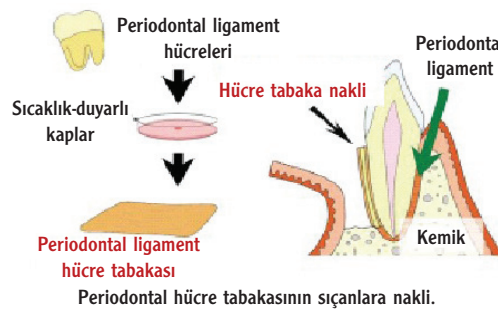
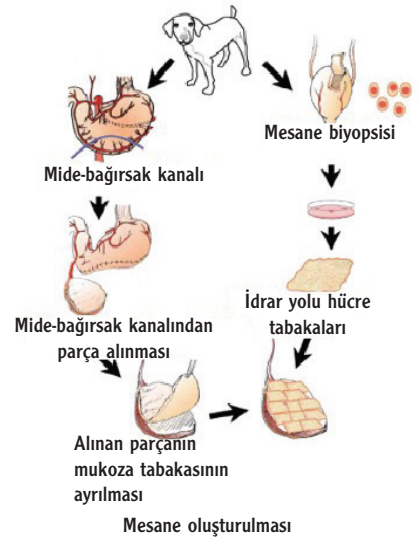
Taş oluşması, böbreklerden idrar kanalı (üretra) dış deliğine kadar uzanan idrar yollarını içine alan sistemin enfeksiyonu ve elektrolit dengesizliği gibi durumlar, mesane içinde ciddi sorunlara neden olur. Mide-bağırsak kanalı mukozasından alınmış bir parça doku ve kültürde çoğaltılmış idrar yolu hücre tabakaları kullanılarak yeni bir mesane oluşturulmaya çalışılmış bulunuyor. Bir köpeğe uygulanan bu yöntemde, mide-bağırsak kanalı mukozasından alınan parçanın içindeki tabaka (mukoza), sıcaklık-duyarlı kültür kapla-

rında üretilen idrar yolu hücre tabakalarıyla yenilendi. Çalışmada, idrar yolu hücreleri kültürlendi ve sıcaklığın azalmasıyla bu kaplardan bozulmamış halde elde edildi. Bozulmamış sağlam idrar yolu hücre tabakaları, daha sonra mukoza tabakası çıkartılmış doku parçacıkları içerisine yerleştirildi. Bu hücre tabakalarının, herhangi başka bir işleme gerek duyulmadan, mukozası alınmış dokulara kendiliğinden yapıştıkları gözlemlendi. Daha sonra, köpeğe yeniden yerleştirilen yeni mesane, üç hafta sonra incelendiğinde doğal idrar yolu hücreleriyle aynı epitel doku hücrelerinin olduğu gözlemlendi. Bu ürolojik çalışmada, sıcaklık-duyarlı kültür kaplarından elde edilen hücre tabakalarının, cerrahi olarak yeniden doku oluşumu için son derece uygun oldukları sonucuna varıldı.

Kalp Yamaları

İki boyutlu hücre tabakasıyla yapılan çalışmalara ek olarak, üç boyutlu hücre tabakalarının ele alındığı kalp dokusu mühendisliği de başarıyla uygulanmış durumda. Zayıflamış kalbin onarılmasında hücre nakli, yakın zamanda çalışılan yöntemlerden biri. Bu yönetime ek olarak, kalp kası hücre tabakaları biraraya getirilerek, üç boyutlu yamalar elde edildi. Kalp dokusu mühendisliğinin, doku destek malze-

mesi olarak kullanılan biyobozunur polimerle uygulaması da var. Bununla birlikte, doku iskelelerinin bükülmez ve hacimli özellikleri, kalp kası hücrelerinin dinamik atımlarına engel olmakta. Kalp kası hücre tabakalarının biraraya getirilmesi sonucu oluşan üç boyutlu kalp yamalarının eşzamanlı olarak attığı gözlemlenmiş bulunuyor.



Periodontal hücre tabakasının sıçanlara nakli.

Yeni doğan sıçanda kalp kası hücresi tabakaları, sıcaklığın azaltılması sonucu sıcaklık-duyarlı kültür kaplarından elde edildi ve daha sonra bunlar kalp üzerine gömülerek yama yapıldı. Biraraya getirilen dört kas hücresi tabakasının attığı, gözle görülmüş bir sonuç.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Tuğrul Tolga Demirtaş
Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği ve
Biyomühendislik Bölümü.

Kaynaklar
www.cellseed.com
Masayuki Yamoto end Teruo Okano. Cell Sheet Engineering Volume 7. Issue 5. May 2004, Pages 42-47. Materials Today.
Akihiko Kikuchi, Teruo Okano. Nanostructured designs of biomedical materials: application of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. J. Controlled Release.