

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA GÖRÜLEN RENAL
HASARIN TAMİRİNDE KÖK HÜCRELERİN ROLÜ**

**Uzmanlık Tezi
Dr. Türkan METE**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şehsuvar ERTÜRK**

ANKARA - 2004

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi boyunca yetişmemde emeği geçen başta Prof. Dr. Bülent Erbay olmak üzere İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine, tezimin hazırlanmasında sonsuz desteği olan tez danışmanım Prof. Dr. Şehsuvar Ertürk'e, laboratuvarında geçirdiğimiz günler boyunca yanımda olan ve bana yol gösteren Prof. Dr. Arzu Ensari'ye, çalışmamıza verdikleri destek için başta Prof. Dr. Oktay Karatan olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Diyaliz Transplantasyon Araştırma ve Geliştirme Derneğine, tez konusunun seçiminden yazım aşamasına kadar her adımda bana yardımcı olan Doç. Dr. Kenan Keven'e, Uz. Dr. Şule Şengül'e, olguların toplanmasında yardımcı olan Uz. Dr. Murat Üre'ye, tezimin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan Prof. Dr. Işınsu Kuzu ve tüm immünpatoloji çalışanlarına, hayatım boyunca yanımda olup bana destek olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç	1-2
Genel Bilgiler	3-23
Hastalar ve Yöntem	24-26
Bulgular	27-35
Tartışma	36-41
Özet	42-43
Summary	44-45
Kaynaklar	46-50

GİRİŞ VE AMAÇ

1954 yılında yapılan ilk böbrek transplantasyonundan bu yana, işlevlerini yitiren organların replasmanı artık deneysel bir teknik değil, her yıl binlerce hasta için yaşam kurtarıcı bir tedavi şekli haline gelmiştir (1). Ancak, onarıcı bir tedavi olarak transplantasyonun rutin uygulanması iki önemli engelle karşılaşmaktadır. Birincisi; greft rejeksiyonunun engellenmesi için alıcı yaşam boyu immünsüpresyon tedavisi almalıdır. İmmünsupresif ilaçların uzun süreli kullanılması, yaşamı tehdit eden infeksiyonlar, hepatik toksisite, böbrek yetmezliği ve kanser gibi ciddi yan etkilerle ilişkilidir. İkincisi; transplantasyon için gerekli mevcut organ ve dokular, ihtiyacı karşılamakta belirgin derecede yetersizdir. Günümüzde Amerika Birleşik Devletler'inde transplantasyon için bekleyen 78 000'den fazla hasta olduğu ve bekleme listesi her yıl yaklaşık %3 oranında artmaya devam ettiği halde, 2000 yılında sadece 5984 kadavra donör kaydedilmiştir. Türk Nefroloji Derneği'nin verilerine göre ise 2002 yılında 549 hastaya böbrek transplantasyonu yapılmış, bu hastaların 198'i kadavra donörden greft böbrek almıştır (2). Bu durum dünya çapında daha etkin organ bağış programlarının gelişmesi ile biraz düzelmiş olmasına karşın, alternatif kaynaklara gereksinim olduğu tartışmasıdır.

Doku mühendisliğindeki ilerlemeler, yapay organların (kalp) ve yapısal organların (kemik, kıkırdak) geliştirilmesine neden olmuştur. Bununla beraber, bu strateji daha kompleks fizyolojik fonksiyonları olan dokuların replasmanı için uygun değildir. Türler arası transplantasyon (xenotransplantasyon), daha geniş uygulama aralığına sahip olmakla birlikte, türler arası immünolojik bariyerlerin aşamadığı kanıtlanmıştır. Ek olarak, alıcılara zoonozların geçme riski bu yaklaşımın bütün güvenilirliğini azaltmaktadır.

Kök hücre teknolojisi, son yıllarda klasik donör bağımlı transplantasyona en umut verici alternatiftir. Bu hücreler iki genel özelliği paylaşır: Kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği. Kök hücrelerin bu eşsiz özellikleri, transplantasyon için organ ve dokular meydana getirmekte kullanılabilir (3). Kök hücre araştırmalarının, kardiyovasküler, nörojeneratif hastalıklar, kanser, diabetes mellitus ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde bir devrim yaratacağı düşünülmektedir (4).

Blastosistin iç hücre kitlesinden kaynaklanan embriyonik kök hücreler, in vivo bütün hücre nesillerine diferansiye olabilmektedir. Bu hücrelerin in vitro ortamda kardiyomiyositlere, nöronal ve pankreatik hücrelere diferansiye olabildikleri gösterilmiştir. Ancak embriyonik kök hücrelerin tedavi amaçlı kullanımları önünde çeşitli engeller bulunmaktadır (tümörojeniteleri, immün supresif tedavi gereksinimi, etik kaygılar gibi).

Kök hücreler, insanın yaşamı boyunca çeşitli organ ve dokularda var olmaya devam eder. Yetişkin dokularda bulunan kök hücrelere, 'adult kök hücreler' denmektedir. Son yıllara kadar adult kök hücrelerin sadece orjin aldıkları dokunun hücrelerine diferansiye olabildiği düşünülmekte iken, yeni çalışmalar farklı hücre nesillerine de diferansiye olabildiklerini göstermektedir. Bu olaya 'plastisite' denmektedir. Özellikle kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin plastisite özelliğinin, hasarlı dokuların onarımını etkileyebileceği ve rejeneratif tıp için yeni yollar sağlayabileceği öne sürülmüştür.

Çeşitli çalışmalarda kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin böbreğin tübüler, mesenşimal ve glomeruler hücrelerine diferansiye olabildiği öne sürülmüştür. Akut tübüler nekrozu takiben tübüler rejenerasyona, kronik renal transplant rejeksiyonunda mezenşimal hücrelere, renal hasar olmaksızın glomeruler hücre döngüsüne katkıda bulunabildikleri gösterilmiştir.

Bu çalışmada amaç, renal transplant hastalarında farklı nedenlerle meydana gelmiş renal hasarın tamirinde extrarenal hücrelerin (muhtemelen kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin) rolü olup olmadığını araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Kök hücreler ilk kez 1945'de, ikiz inekler arasında yaşam boyu kan chimerismi olduğunu bulan Owen tarafından deneysel olarak gösterilmiştir (5).

Bilim adamları ve klinisyenler, takip eden yıllarda kök hücrelere ilişkin yoğun çalışmalar yürütmüşler ve yeni buluşların ortaya çıkmasını sağlayacak iki keşifte bulunmuşlardır: Ian Wilmut ve Keith Campbell hayvan klonlamayı, Jamie Thomson ve çalışma grubu, pluripotent insan embriyonik kök hücrelerinin derivasyonlarını bulmuşlardır. Birinci çalışmada, Wilmut ve arkadaşları, Dolly isimli bir koyunu klonlayarak adult bir hücre nucleusunun, nucleusu olmayan fertilize bir oositi tekrar programlayabileceğini göstermişler ve böylece ebebeynine genetik olarak identik olan bir koyun yaratılmıştır. İkinci çalışma ile de, birçok hastalığın hücre bazlı tedavisi için olası hücre kaynağı sunulmuştur (6).

EMBRYONİK KÖK HÜCRELER

Fertilize oosit (zigot), bir embriyo ve plasentayı oluşturan hücreleri (blastomerler) meydana getirir. Bu blastomerler totipotent'tir; bütün bir canlı organizmayı oluşturma potansiyeline sahiptirler. Zigot, sekiz hücreli aşamaya (morula) kadar totipotentlik özelliğini muhafaza eder. Daha sonra bu totipotent hücreler özelleşmeye başlar ve blastosist'i oluşturur. Blastosist, bir dış tabaka (trophoektoderm) ve 'iç hücre kitlesi' denen bir hücre kümesinden oluşur. Trophoektoderm plasentayı oluştururken, iç hücre kitlesinden embriyo gelişir. Embriyonik kök hücreler, blastosist'in iç hücre kitlesinden kaynaklanır ve pluripotent'tir; üç germ tabakasından kaynaklanan dokulara diferansiye olabilir (7). Embriyonik kök hücrelerin pluripotent doğasını test eden laboratuvar bazlı kriterler üç deney tipini içermektedir:

Testlerden biri; bir blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücrelerin diğer bir blastosistin kavitesine enjekte edilmesi ile yapılmıştır. Embriyoların 'kombinasyonları' psödopregnan dişi bir farenin uterusuna yerleştirildikten sonra oluşan soy chimeriktir. Chimerik yavru, hem donör embriyonik kök hücrelerinden, hem de alıcı blastosistden kaynaklanan hücrelerden oluşan doku ve organlar içermektedir (8).

Embriyonik kök hücrelerin pluripotensini belirlemek için ikinci bir metod; hücreleri, dokunun reddedilmemesi için genetik olarak identik veya immün yetmezliği olan adult farelerin cilt altına veya böbrek kapsülüne enjekte etmektir. Alıcı hayvanda, enjekte edilen embriyonik hücreler teratokarsinomalar denilen multiselüler kitlelere diferansiye olurlar. Teratokarsinomalar, diferansiye ve andiferansiye hücre tiplerinin bir karışımını içeren kompleks tümörlerdir. Bu andiferansiye hücre tiplerine embriyonal karsinoma (kök) hücreleri denir ve pluripotenttir. Mikroskop altında incelendiğinde bu tümörlerin embriyonun tüm germ tabakalarına ait hücreler (endoderm, mezoderm, ektoderm) içerdikleri gözlenir (epitelyal hücreler, düz kas tabakaları, iskelet veya kalp kası, nöral doku, kıkırdak veya kemik dokusu ve saç dokusu).

Embriyonal karsinoma (kök) hücreleri, izole edilip, diferansiye olma kapasitelerini kaybetmeksizin kültürde yetiştirilebilirler. Yapılan bir çalışmada, kahverengi fareden kaynaklanan embriyonal karsinoma hücreleri, bir albinodan elde edilen blastosiste yerleştirildiğinde, taşıyıcı anneden doğan yavrular kahverengi ve beyaz bulunmuştur. Kök hücreler chimeras oluşturmuş ve en aşikar olarak ciltteki melanositlerde olmak üzere bütün somatik dokulara katkıda bulunmuştur (9).

Pluripotensi göstermek için üçüncü bir teknik de; fare embriyonik kök hücrelerin in vitro olarak spontan diferansiyasyonuna izin vermek veya diferansiyasyonlarını özel yollara yönlendirmektir. İlk durum sıklıkla besleyici tabaka değiştirilerek veya büyüme ortamından lösemi inhibitör faktör (LIF)'ün çekilmesi ile sağlanır (kültürlenmiş embriyonik kök hücreleri, andiferansiye pluripotent durumda tutmak için bu hücreler hem intrensek olarak transkripsiyon faktör Oct 4 sunmalı, hem de LIF'den ekstrensek sinyal almalıdır.) LIF eksikliğinde kültürlenmiş embriyonik kök hücreler spontan olarak diferansiye olup kalp kası hücreleri, kan adacıkları, nöronlar, pigmente hücreler, makrofajlar, epitel hücreleri veya adipositleri içeren birçok hücre tipini oluşturdukları embriyo benzeri cisimlere agrege olurlar. Embriyonik cisimler birçok yönden hayvanlarda oluşan teratomlara benzerler. Embriyonun üç germ yaprağından köken alan diferansiye veya kısmen diferansiye olmuş hücre tiplerini içermektedirler (8).

Murin embriyonik kök hücrelerini izole etmek için kullanılan teknikler, in vitro fertilizasyon ile elde edilen pre-implantasyon aşamasındaki embriyolardan insan

embriyonik kök hücre dizilerini meydana çıkarmak için kullanılmış ve insan embriyonik kök hücrelerinin murin embriyonik kök hücre dizileri ile bazı temel özellikleri paylaştığı ortaya konmuştur (Oct 4 ekspresyonu, telomeraz aktivitesi ve immün yetmezlikli farede üç primer germ tabakasından kaynaklanan hücreler içeren teratokarsinomalar oluşturma gibi). Ancak farklılıklar da bulunmaktadır. Fare embriyonik kök hücrelerin aksine, insan hücreleri esas olarak kistik embryoid cisimler oluşturur ve fare embriyonik kök hücre dizilerinde olmayan proteoglikanlar (TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM-2) ve evre spesifik antijenlere (SSEA-3, SSEA-4) sahiptirler (7). İnsan embriyonik kök hücreleri, murin embriyonik kök hücrelerinin aksine daha yavaş büyür ve sferik koloniler oluşturmaya meyillidir (10).

Murin ve insan embriyonik kök hücreleri arasındaki önemli bir farklılık, in vitro ortamda kendi kendilerini yenilemeleri ile ilgilidir. Murin embriyonik kök hücreleri, rekombinan LIF içeren (LIF, murin embriyonik kök hücre üzerindeki gp 130 reseptörüne bağlanarak STAT 3'ü aktive eder) embriyonik fibroblastlı besleyici tabakada andiferansiye durumda kalır ve pluripotent özelliğini muhafaza eder. Embriyonik kök hücre üzerindeki STAT 3'ün inaktivasyonu hücrenin diferansiyasyonuna neden olur. Farklı olarak, fare embriyonik fibroblastları içeren besi yerinde kültüre edilen insan embriyonik kök hücrelerin diferansiyasyonunu inhibe etmekte LIF yetersizdir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin andiferansiye bir durumda kendi kendini yenilemesini sağlayan sinyaller hala açık değildir (7).

Embriyonik Kök Hücrelerin Diferansiyasyon Potansiyeli

Embriyonik kök hücrelerin in vitro diferansiyasyonunu sağlamak, gelişimin mekanizmalarını detaylı araştırmak ve doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için spesifik hücre tiplerini meydana getirmekte temel oluşturur (5).

İnsan embriyonik kök hücrelerin in vitro diferansiyasyon potansiyeli , büyük ölçüde murin embriyonik kök hücrelerinkine benzemektedir. Bu hücrelerin spesifik hücre tiplerine yeterli ölçüde diferansiyasyonlarını yönlendirmek için standartize bir metod henüz geliştirilememiştir. Esas amaç, potansiyel tedavi edici değeri olan doku tiplerini meydana getirmek üzerine odaklanmıştır. Bunlar arasında, kardiyak hastalıkların ve infarktların tedavisi için kardiyomyositler , Parkinson veya multipl

skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için nöronal ve glial hücreler ve diabetes mellitusun tedavisi için insülin üreten pankreatik hücreler sayılabilir (7).

Embriyonik kök hücre kaynaklı kardiyomiyosit diferansiyasyonu

Rejeneratif kapasitesi az veya hiç olmayan ve bu nedenle yetmezliğe eğilimli bir doku olan kalp kası, embriyonik kök hücre kaynaklı hücre tedavisi için özellikle çekici bir hedeftir. Yapılan çalışmalarda in vitro murin embriyonik kök hücrelerinden gelişen kardiyomiyositlerin; karakteristik sarkomerik yapılar oluşturduğu, kardiyak gen ürünlerini ve membrana bağlı kanalları eksprese ettiği ve iyonik akımlar ile bu hücrelerin kontraktibilitesinin tetiklendiği gözlenmiştir (11). Bu hücrelerin elektrofizyolojik analizi, primer miyokard hücrelerinin tipik özelliklerine benzer bulunmuştur (12).

Embriyonik kök hücre kaynaklı nöronal hücre differansiyasyonu:

İn vitro fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin, beyinde bulunan üç major hücre tipine (nöronlar (dopaminerjik, GABAerjik, serotoninerjik, glutaminerjik, kolinerjik), astrositler ve oligodendrositlere) diferansiye olabildiği gen ekspresyon ve elektrofizyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir (13).

Yapılan çalışmalarda, fare embriyonik kök hücrelerinin Parkinson hastalığının bir rat modelinde dopaminerjik nöronlara diferansiye olarak iyileşmeyi hızlandırdığı, bir insan demiyelizasyon hastalığı olan Pelizaeus-Merzbacher hastalığının rat modeline transplante edildiklerinde ise aksonların remiyelizasyonunu sağladığı gözlenmiştir (14,15).

Embriyonik kök hücre kaynaklı Pankreatik diferansiyasyon:

Embriyonik kök hücrelerin diferansiyasyonu, hem embriyonal hem de adult β hücreleri için tipik sekretuar granüller içeren, insülin eksprese eden hücrelerin oluşumuna neden olmuştur. Bu hücrelerin diabetik farelere transplantasyonu kan glukoz düzeylerini normalize etmiştir (16).

Doku Onarımında Embriyonik Kök Hücrelerin Kullanılması Önündeki Engeller

Verilen örnekler, çeşitli hastalıkların tedavisinde rejeneratif bir kaynak olarak embriyonik kök hücre kaynaklı hücrelerin kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu tip uygulamalardan önce çözülmesi gereken önemli problemler bulunmaktadır. Bu sorunlar aşağıda sıralanmıştır.

1.) Hücrelerin pür popülasyonunu elde etmek

Embriyonik kök hücrelerin extrauterin yerlere transplante edildiklerinde teratomlar veya teratokarsinomlar oluşturdukları bilinmektedir. Embriyonik kök hücreler, sınırsız proliferasyon kapasitesi, klonal çoğalma, kontakt inhibisyonun olmaması gibi kanser hücresinin birçok özelliğine sahiptir.

İnsan embriyonik kök hücrelerinin potansiyel tümorojenitesi nedeni ile kök hücre kültürlerinden spesifik hücre tiplerinin pür popülasyonlarını üretmek ve çoğaltmak ve andiferansiye hücreleri uzaklaştırmak gereklidir (17).

2.) Dokuya integrasyon ve fonksiyon

İn vitro diferansiyasyon protokolleri ile embriyonik kök hücrelerden üretilen hücrelerin alıcı dokuya integre olup, hasarlı hücrelerin tüm fonksiyonlarını yerine getirip getirmeyeceği önemli bir sorudur. Embriyonik kök hücre kaynaklı kardiyak, nöral ve pankreatik hücrelerin transplantasyonunu takiben spesifik fonksiyon gördüklerini bildiren yayınlara rağmen, fonksiyonlarının tamamen normal olduğu henüz söylenememektedir.

3.) Greft rejeksiyonu

İnsan embriyonik kök hücreler üzerinde major histocompatibility complex class-I (MHC-1) sunusu düşük düzeydedir ancak hücrenin in vitro veya in vivo diferansiyasyonu ile artmaktadır. Doku rejenerasyonu için insan embriyonik kök hücre kaynaklı hücrelerin kullanımı sırasında donör ve alıcı arasında immünolojik uyumsuzluk olması durumunda greft dokunun rejeksiyonuna neden olan immün reaksiyonlar görülebilir (7).

4.) Etik sorunlar

Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesinin kültüre edilmesi ile elde edilmektedir. Blastosist ise in vitro fertilizasyon ile oluşturulmuş ancak kullanılmamış bir insan embriyosundan veya abortusa uğramış fetustan elde

edilmektedir. Embriyonik kök hücreleri bu elde etme metodu sıklıkla blastosistin bozulmasını gerektirir, bu da insan embriyosunun etik ve hukuki durumu hakkında sorular ve tartışmalara yol açabilecek bir konudur (5).

ADULT KÖK HÜCRELER

Yıllardır araştırmacılar, neden bazı organlar kendi dokusunu tamir edebilme ve hücrelerini yenileyebilme yeteneğine sahipken, bazılarının bunu yapamadığını anlamaya çalışmışlardır. Araştırmalar sonucu, çeşitli dokularda adult kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Günümüzde, kök hücrelerin daha önce düşünülenenden daha fazla doku ve organda bulunduğu tespit edilmiştir. Yetişkinlerde kemik iliği, pankreas, beyin, iskelet kası, retina gibi bir çok organda bu hücrelerin varlığı gösterilmiştir (7). Günümüzdeki genel düşünce, henüz gösterilememiş olsa bile bütün yetişkin organların kök hücreler içerdiği yönündedir (18).

Tüm kök hücreler gibi adult kök hücreler de iki temel özelliğe sahiptir. Birincisi, organizmanın yaşamı boyunca kendi kendini yenileyebilme, yani proliferasyon yeteneği ile kendisinin identik kopyalarını yapabilmektedir. İkincisi, özelleşmiş morfolojileri ve fonksiyonları olan olgun hücre tiplerini oluşturabilmektedir. Böylece, doku hasarı veya fizyolojik hücre döngüsünde ait oldukları dokunun spesifik hücrelerine diferansiye olmakta ve homeostazisin sürdürülmesini sağlamaktadırlar (19). Örneğin; cilt kök hücreleri epidermin reepitelizasyonunu sağlarken, ince barsak kriptlerinde lokalize olan kök hücreler fırça kenarlı enterositlere, goblet hücrelerine, paneth hücrelerine diferansiye olmaktadır (8).

Bu hücreler, çevresel hasarlardan korundukları spesifik bir niş'te lokalizedirler. Örneğin, cilt kök hücreleri kıl follikülünde lokalizedir ve sıklıkla bunları UV ışıdan koruyan pigment hücreleri ile çevrelenmişlerdir. Benzer olarak kornea kök hücreleri, pigment hücreleri ile çevrelenmiş iyi vaskülarize bir alan olan limbusta lokalizedir. Bu nişler muhtemelen adult kök hücrelerin diğer hücrelerle ilişkide olmasına imkan tanımakta ve aynı zamanda adult kök hücrelerin hızlı hücre siklusuna girmesini önleyen faktörler üretmektedirler (kök hücrelerin in vitro kültüre edildiğinde hızlı hücre bölünmesi göstermeleri, nişte hızlı hücre siklusunu önleyen faktörlerin

olduğunu düşündürmektedir) Kök hücrelerin oldukça yavaş bölünmesi, onları DNA hasarından korumaktadır (18).

Kök hücreler bazı yüzey işaretleyicilerine (marker) sahiptirler. Hematopoetik kök hücreler için CD34, cilt kök hücreleri için $\alpha 6$ integrin, nöral kök hücreler için CD133 yüzey markerı olarak sayılabilir. Kök hücre araştırmalarının önemli amaçlarından birisi, sadece kök hücrelerde eksprese edilen bütün proteinleri tespit etmektir (18).

Adult Kök Hücre Plastisitesi

Yakın zamana kadar, erişkin dokulardaki kök hücrelerin normalde, köken aldıkları dokudan farklı bir dokunun özelleşmiş hücre tiplerini oluşturabilecekleri düşünülemezken, yeni çalışmalar bu hücrelerin multipotent olduklarını ve farklı hücre nesillerine diferansiye olabildiklerini öne sürmektedir (9). Bu olaya 'plastisite' denmektedir (19). Yetişkin kemik iliği, beyin, iskelet kası, karaciğer, pankreas ve cilt dokusunun, köken aldıkları dokununkinden farklı hücre tiplerine diferansiye olma kapasitesine sahip kök hücreler içerdikleri gösterilmiştir. Örneğin; kemik iliği transplantasyonunda infüze edilen hematopoetik kök hücrelerin iskelet kası myoblastları, endotel hücresi, hepatositler, bilier kanal epiteli, cilt epiteli, barsak ve nöroektoderm kaynaklı hücrelere katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Kemik iliği kaynaklı hücrelerin, kalbe enjekte edildiklerinde kardiyak myoblast fenotipi kazandıkları, nöral kök hücrelerin hematopoetik sistemi oluşturabildiği de gösterilmiştir. Adult kök hücrelerin plastisitesinden sorumlu olan olası mekanizmalar henüz bilinmemektedir (20).

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin plastisitesi

Kemik iliği, yaşam boyunca dolaşımdaki kan hücrelerini sürekli olarak yerine koyan hematopoetik kök hücrelerin bir rezervuarı olarak kabul edilmiştir. Hematopoetik kök hücreler, kendi kendini yenileme ve çeşitli hematopoetik hücre nesillerine diferansiye olma yeteneğine sahip olan doku spesifik kök hücre olarak tanımlanmıştır. Ancak, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin böyle sınırlı bir diferansiyasyon potansiyelinin olduğu görüşü, 1976'da Friedenshtein'in kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin hem in vitro ve hem de in vivo koşullarda, kondrositler ve

osteoblastlar gibi bağ dokusu hücrelerini meydana getirebildiklerini göstermesi ile değişmiştir (21). Son yıllarda yapılan çalışmalar, yetişkin kemik iliğinin çeşitli kök hücre populasyonları içerdiğini göstermiştir. Bunlar hematopoetik kök hücreler, kemik iliği stromal kök hücreleri (mezenşimal kök hücreler) ve multipotent adult progenitor hücrelerdir (22).

Hematopoetik kök hücreler

Hematopoetik kök hücreleri tanımlamak için altın standart, kemik iliği baskılanmış bir konakta hematopoetik sistemi yeniden oluşturma yetenekleridir. Çünkü hematopoetik sistemin yeniden oluşturulması, transplante edilen hematopoetik kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini ve tüm matür kan hücresi tiplerine diferansiye olmasını gerektirir.

Hematopoetik sistem, organize hiyerarşik bir sistem olarak kabul edilmiştir. Multipotent kök hücrelerden, yönlendirilmiş progenitör hücreler, bunlardan da nihayetinde terminal diferansiye hücreleri meydana getirecek olan nesil sınırlı prekürsör hücreler gelişmektedir. Ancak günümüzde, hematopoetik kök hücrelerin de dahil olduğu adult kök hücrelerin farklı dokuya ve hatta farklı germ tabakasına ait hücre nesillerine diferansiye olmasına izin veren plastisiteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hiyerarşik bakış açısı artık yeterli görünmemektedir.

Hematopoetik kök hücrelerin de dahil olduğu kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin plastisitesini (gerçekten solid organların spesifik hücrelerine diferansiye olabildiğini) kanıtlamak için çeşitli koşullar gereklidir:

Bunlardan birincisi; solid organa integre olan egzojen (donör) kaynaklı hücrenin orjini, hücrenin işaretlenmesi ile dökümente edilmelidir. Günümüzde, en yaygın olarak kullanılan donör spesifik markerlar Y kromozomu (cinsiyet uygunsuz transplantasyonlarda) ve transgenlerdir. İkincisi; egzojen hücrenin, solid dokunun morfolojik olarak bir parçası olduğu gösterilmelidir. Üçüncüsü ve en önemlisi; donör kaynaklı hücrenin, hem solid organa spesifik proteinleri eksprese etmesi hem de spesifik organ fonksiyonunu göstermesi ile organın fonksiyonunu edindiği gösterilmelidir. İmmünohistokimya, immünoflüoresan ve hücre tipine spesifik fonksiyonel değerlendirme, donör kaynaklı diferansiye hücreleri tespit etmekte kullanılmaktadır (19,23).

İnsanda dejeneratif bir kas hastalığı olan Duchene muscular distrofisinin murindeki karşılığına sahip olan distrofin +/- dişi farelere, erkek wild-tip farelerden elde edilen pürifiye hematopoetik kök hücrelerin transplantasyonu yapılmış. Alıcı farelerde distrofin eksprese eden donör kaynaklı kas lifleri saptanmıştır (24). Lagasse ve çalışma grubu ise bu kas liflerinin fonksiyonel olduğunu göstermiştir.

Letal dozda irradiate edilmiş dişi farelere, erkek donörlerden kemik iliği kaynaklı kök hücre (CD34+, Lin(-)) transplantasyonu yapıldığında, aşık bir karaciğer hasarı olmadığı halde alıcının hepatositlerinin %2.2'sinin donör kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu hepatositlerin hem Y kromozomu hem de albümin messenger RNA (mRNA)'sına sahip oldukları gösterilerek erkek kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin matür hepatositlere diferansiye oldukları doğrulanmıştır (25).

Deneysel olarak meydana getirilen miyokard infarktüsü modelinde farelere, yeşil florösan proteini (GFP) eksprese eden ve Y kromozomu taşıyan Lin(-), ckit(+) kök hücreler, intravenöz olarak veya hasarlı miyokardın çevresine direkt olarak enjekte edilmiş. Rejenere olan miyokardda, kalp kası için karakteristik olan connexin 43'ü eksprese eden donör kaynaklı hücreler tespit edilmiş ve miyokard fonksiyonunda düzelme saptanmıştır (26).

Gunsilius ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kronik miyeloid lösemi hastasının kalp damarlarını döşeyen endotel hücrelerinde t(9,22) kromozomal translokasyonunun olduğu gösterilmiştir (27). Ayrıca, karaciğer transplant alıcılarının, portal ve hepatik venlerinde alıcı kaynaklı endotel hücrelerinin olduğu gözlenmiştir (28).

Çalışmalar yetişkin kemik iliğinde, 'anjioblast' denen endotel hücre prekürsörlerinin olduğunu göstermektedir. Uygun koşullarda bu hücreler, vascular endothelial growth faktör (VEGF), basic fibroblast growth faktör (bFGF), faktör VIII ve von Willebrand faktör eksprese eden endotel hücreleri oluşturabilmektedir. Bu endotel hücre prekürsörlerinin hematopoetik kök hücrelerle ortak bir kök hücreden mi yoksa farklı bir doku spesifik kök hücreden mi kaynaklandığı bilinmemektedir (22).

Mezey ve arkadaşları, homozigot PU.1 mutant dişi farelere (PU.1, hematopoetik nesillerin üretilebilmesi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü), erkek wild-tip donörlerden kemik iliği transplantasyonu yapmış ve alıcıların santral

sinir sistemindeki hücrelerin %4.6'sının Y kromozom pozitif olduğunu ve Y kromozom pozitif hücrelerin %2.3'nün nöronal markerlar NeuN ve nöron spesifik enolase eksprese ettiklerini göstermiştir (29).

Krause ve arkadaşları, hematopoetik kök hücrelerin multifonksiyonel diferansiyasyon yeteneklerine dair in vivo kanıtlar sağlamış ve hücrelerin, hematopoetik hücrelere olduğu kadar, karaciğer, akciğer, cilt, gastrointestinal kanal'ın epitel hücrelerine diferansiye olabildiklerini göstermiştir (30).

Mezenşimal kök hücreler

Mezenşimal kök hücreleri, ilk kez, kemik iliği kaynaklı hücrelerin, fetal dana serumu içeren besi yerinde kültüre edildiklerinde yapışık fibroblast benzeri hücre kolonileri oluşturduklarını ve bunların da kemik ve kıkırdak dokusuna diferansiye olduklarını gösteren Fidensthein tanımlamıştır.

Mezenşimal kök hücreler, plastiğe yapışma ve monoklonal antikolar (SH2 ve SH4 veya Stro1) ile reaksiyona girme özellikleri temel alınarak pürifiye edilebilir. İmmünofenotipik analizleri, bu hücrelerin, CD34, CD45, HLA-DR (hematopoetik kök hücre markerı), CD14 (monosit/makrofaj), CD31 (endotel hücresi) ve CD11a (lenfosit) eksprese etmediğini, CD44, CDw90, KDR, Flt-1, düşük düzeyde β 2 mikroglobulin, yüksek düzeyde CD13 ve CD49b eksprese ettiğini göstermiştir (22,31).

Verfaillie ve arkadaşları'nın çalışmasında, mezenşimal kök hücrelerin kültür koşullarında osteoblast, kondroblast, adiposit, iskelet kası ve stromal hücre benzeri hücrelere diferansiye olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca diferansiye durumda endotel hücre markerı eksprese etmeyen mezenşimal kök hücrelerin, uygun kültür koşullarında CD34, vWF, CD36, Tek, VEGF reseptörü KDR ve FLt-1 eksprese eden endotel hücrelerine diferansiye olabildiği de gösterilmiştir (31).

İnsan mezenşimal kök hücrelerinin rat beynine direk uygulandığında veya periferel dolaşıma enjeksiyonunu takiben beyine integre olduğu, mezenşimal kök hücrelere özgü markerlarını kaybetmeye başladığı ve bir kısmının nöron ve astrosit fenotipi edinmeye başladığı tespit edilmiştir (32).

Multipotent adult progenitor hücreler :

İnsan ve rodent kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücrelerin kültürü sırasında 'multipotent adult progenitor hücreler' adı verilen nadir bir hücrenin varlığı gösterilmiştir. Bu hücreler, 70-150 populasyon doubling'den daha uzun süre gelişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda sadece mezenşimal hücrelere değil nöroektoderm ve endoderm kaynaklı hücrelere de diferansiye olabildikleri gösterilmiştir.

Verfaillie ve arkadaşlarının çalışması ile, fare kas ve beyin dokusunda da multipotent adult progenitor hücrelerin var olduğu ve fare ve insan kemik iliği kaynaklı multipotent adult progenitor hücreler ile genotipik ve fenotipik olarak identik oldukları gösterilmiştir (CD13(+), Flk1, ckit(-), CD44(-), CD45(-), MHC class I(-), MHC class II(-)).

Kas, beyin ve kemik iliğinden elde edilen multipotent adult progenitor hücrelerin kültürlerine 14 gün boyunca VEGF-B uygulandığında, hücrelerin %90'dan fazlasının, endotelial diferansiyasyonla uyumlu olarak CD31 ve vWF eksprese ettiği gözlenmiştir. Bu hücre kültürlerine bFGF uygulandığında ise, hücrelerin astrosit ve nöronların morfolojik ve fenotipik özelliklerini kazandığı tespit edilmiştir.

FGF4 ve HGF içeren kültür koşullarında kas, beyin ve kemik iliği kaynaklı multipotent adult progenitor hücrelerin %50-60'nın hepatosit-benzeri hücrelere diferansiye oldukları gösterilmiştir. Oluşan bu hücrelerin %50-60'ı albümin, CK18 ve HNF-1 için pozitif boyanmıştır (20,33). Ayrıca bu hücrelerin üre ve albumin sekrete ettikleri, fenobarbital ile indüklenebilen sitokrom p450 enzimlerine sahip oldukları, glikojen depoladıkları da gözlenmiştir. Böylece, multipotent adult progenitor hücrelerin hepatositlerin morfolojik, fenotipik ve fonksiyonel özelliklerine sahip olan hücrelere diferansiye olabildikleri gösterilmiştir (34).

Multipotent adult progenitor hücrelerin geniş diferansiyasyon potansiyeli in vivo ortamda da gösterilmiştir. Hücrelerinde β galaktosidaz eksprese eden ROSA 26 farelerinden elde edilen multipotent adult progenitor hücreler, murin blastosistlerine enjekte edildiğinde meydana gelen chimerik yavruların, beyin, akciğer, miyokard, karaciğer, barsak ve böbreklerinin de dahil olduğu hemen hemen bütün somatik dokularında β galaktosidaz eksprese eden hücreler bulunmuştur (23).

Subletal olarak irradiate edilmiş immün yetmezlikli fareye multipotent adult progenitor hücrelerin intravenöz uygulanmasından sonra bu hücrelerin değişik derecelerde, hematopoetik hücrelere, karaciğer, akciğer ve barsaktaki epitel hücrelerine diferansiye olduğu tespit edilmiştir (23).

Beyin, kas ve kemik iliğinin, multipotent adult progenitor hücreler içerdikleri gösterilmiş olmasına rağmen, henüz vücudun diğer dokularının bu hücrelere sahip olup olmadıkları bilinmemektedir.

Karaciğer Kök Hücreleri

Normalde sessiz bir organ olmasına rağmen, normal yetişkin karaciğeri cerrahi rezeksiyonu veya hasarı takiben tamamıyla iyileşebilmektedir. Ancak, hepatositlerin büyük kısmının harap olduğu veya hepatotoksinlere veya karsinojenlere maruziyet sonucu büyüme siklusuna girmelerinin engellendiği durumlarda bir karaciğer kök hücresinin aktive olarak 'oval hücreleri' meydana getirdiği öne sürülmektedir. Bu hücreler prolifer olmakta ve hepatositler ve bilier epitel hücrelerine diferansiye olmaktadır. Oval hücrelerin terminal safra kanalikülleri olan Herring kanallarında lokalize oldukları düşünülmektedir (35). Rat oval hücrelerinde tespit edilen hücre yüzey markerı OV6'nın insan oval hücrelerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir (36). Ayrıca bu hücreler, CD34, Thy-1, c-kit ve flt-3 gibi hematopoetik kök hücrelerde de bulunan markerlar eksprese etmektedir (37). Bu nedenle oval hücrelerin kemik iliği kök hücrelerinden kaynaklanan bir hücre popülasyonu olabileceğini düşünen Peterson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar ile oval hücrelerin bir kısmının kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden kaynaklandığı gösterilmiştir (38,39).

Karaciğer oval hücrelerinin, hepatosit ve bilier epitel hücrelerinden başka, insülin ve glukagon üreten pankreatik hücrelere ve kardiyomiyositlere de diferansiye olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (9).

Beyin Kök Hücreleri

Yetişkinde, beyinin subventriküler bölgesinde bulunan nöral kök hücreler, astrositler, oligodendrositler veya nöronları meydana getirme yeteneğine sahiptirler.

Belirgin derecede replikasyon potansiyeline sahip olan bu hücreler, insanda post-mortem beyin dokusundan izole edilebilmektedir (21).

Yapılan çalışmalarda adult nöral kök hücrelerin sanıldığından daha geniş bir diferansiyasyon potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir.

Bjornson ve arkadaşlarının çalışmasında, fare ön beyninden elde edilen, β galaktosidaz eksprese eden nöral kök hücreler, subletal dozda irradiate edilmiş farelere sistemik olarak enjekte edilmiş, nöral kök hücrelerin alıcının hematopoetik sistemine engraft olduğu ve kan hücreleri ürettiği görülmüştür (40).

ROSA 26 farelerinden elde edilen β galaktosidaz-pozitif nöral kök hücreler, civciv embriyosunun amniyotik kavitesine enjekte edildiğinde, oluşan chimerik yavruların, karaciğer, böbrek, iskelet kası, akciğer, barsak, kalp gibi çeşitli dokularında β galaktosidaz-pozitif hücreler bulunmuştur (41).

İskelet Kası Kök Hücreleri

Yetişkin iskelet kası, 'satellit hücreler' veya 'miyoblastlar'denen bir miyojenik prekürsör hücre popülasyonu içermektedir. Bu hücreler, kendi kendini yenileme ve fizyolojik ve patofizyolojik uyarılara yanıt olarak miyojenik diferansiyasyona uğrama yeteneğine sahiptir.

Murry ve arkadaşlarının çalışması ile satellit hücrelerin, kalbe enjekte edildiklerinde yavaş kasılan kas liflerine diferansiye oldukları ve kalp fonksiyonunu düzelttikleri gösterilmiştir (42).

Satellit hücrelerin plastisitesini değerlendirmek için adult farelerden elde edilen hücreler kültüre edilip, irradiate farenin retroorbital sinüsüne enjekte edildikten 6 hafta sonra donör kaynaklı B ve T lenfositler, granülositler ve makrofajlar gösterilmiştir (43).

Pankreatik Kök Hücreler

Pankreatik progenitor hücreler, pankreasın ductal epitalinde lokalizedir. Bu hücreler, glukagon üreten α , insülin üreten β , pankreatik polipeptit üreten γ ve somatostatin üreten δ hücrelerine diferansiye olma kapasitesine sahiptirler. Ayrıca bu pankreatik progenitor hücrelerin karaciğer hücrelerine de diferansiye olabildiği gösterilmiştir.

Cilt Kök Hücreleri

Cilt kök hücrelerinin kıl follikülünün ‘yumru’ denen kısmında lokalize oldukları düşünülmektedir. Dermal papilladan gelen stimulusla rejenere olan folliküle katılabileceği gibi, yaralanma veya yanık gibi durumlarda epidermiste hasar oluştuğunda epidermisin reepitelizasyonu sağlamaktadır (8).

İn vitro ortamda yapılan çalışmalar, cilt kök hücrelerinin nöron, glial hücre, iskelet kası ve adipositlere diferansiye olabildiğini göstermiştir (9).

KÖK HÜCRE PLASTİSİTESİNİN OLASI MEKANİZMALARI

Kök hücre plastisitesi için ilk açıklama; farklı organlarda multipl doku spesifik kök hücreler olabilir. Örneğin kasta CD45(+) hematopoetik elemanların var olması, kas hücrelerinin hematopoetik hücrelere diferansiyasyonunu kısmen açıklayabilir. Kemik iliğinde hematopoetik kök hücreler, mezenşimal kök hücreler ve multipotent adult progenitor hücreler, endotel hücre prekürsörleri gibi birden fazla kök hücrenin olması bu hipotezi desteklemektedir.

İkinci açıklama; uygun koşullar sağlandığında, doku spesifik kök hücreler, diğer dokulara ait spesifik hücrelere diferansiye olmak üzere yeniden programlanabilir. Bu fenomene ‘transdiferansiyasyon’ denmektedir. Preklinik veriler bu hipotezi desteklemektedir.

Üçüncü açıklama; embriyonik kök hücrelere benzer özelliklere sahip primitif bir kök hücre, doku spesifik kök hücreler içinde var olmaya devam edebilir ve uygun mikroçevre etkisiyle bir çok doku spesifik hücreye diferansiye olabilir. Örneğin, kas, beyin ve kemik iliğinde var olduğu gösterilen multipotent adult progenitor hücreler, embriyonik kök hücrelerle ilişkili olabilir. Fare kemik iliği, kas veya beyin dokusundan elde edilen multipotent adult progenitor hücreler, fare embriyonik kök hücreleri gibi gelişebilmek için LIF’in varlığına ihtiyaç duymaktadır. İnsanda bulunan multipotent adult progenitor hücreler ise, insan embriyonik kök hücrelerine benzer olarak LIF’e ihtiyaç duymaz. Kemik iliği, kas ve beyinden elde edilen multipotent adult progenitor hücreler, embriyonik kök hücrelerin undiferansiye durumda kalabilmesi için gerekli olan transkripsiyon faktörleri Rex 1 ve Oct 4 ‘ü eksprese etmektedir. Embriyonik kök hücreler gibi, fare kemik iliği kaynaklı multipotent adult progenitor hücrelerin, fare blastosistine enjekte edildiklerinde

bütün somatik hücre tiplerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Multipotent adult progenitor hücrelerin özelliklerini araştırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Dördüncü açıklama; solid-organa spesifik diferansiye bir hücrenin, kök hücrenin özelliklerine benzer özellikleri kazandığı ve periferel kan yoluyla ulaştığı başka bir dokunun spesifik hücrelerine diferansiye olduğudur (dediferansiyasyon ve rediferansiyasyon). Örneğin, in vivo ortamda, epidermal hücrelerin, recombinant human epidermal growth factor'e yanıt olarak kök hücrelere dediferansiye olduğu bildirilmiştir.

Öne sürülen bu olası modellerin hiçbirisi, kök hücre plastisitesinin altında yatan mekanizmalarını tam olarak açıklayamamaktadır (19,20).

BÖBREKTE KÖK HÜCRELER:

Böbrek, embriyolojik olarak üreterik tomurcuk ve metanefrogenik mezenşimden gelişmektedir. Bu iki progenitor yapıdan, yetişkin böbreğindeki 26'dan fazla farklı hücre tipi meydana gelmektedir. Üreterik tomurcuk, toplayıcı kanalın epitelyal hücrelerinin prekürsörlerini içerirken, renal mezenşim, nefronun kalan epiteli, endotel hücreleri ve stroma hücrelerinin prekürsörlerini içerir.

Tek bir metanefrik mezenşim hücresinin nefronun tüm epitelyal hücrelerini (toplayıcı kanal haricinde) oluşturabilmesi, embriyolojik gelişim sırasında böbreğin epitelyal kök hücreler içerdiğini göstermektedir. Embriyonik renal epitelyal kök hücrelerin diğer hücre tiplerini oluşturup oluşturamayacağını belirlemek için yapılan laboratuvar çalışmaları bu hücrelerin miyofibroblastlar, düz kas ve endotelyal hücrelere diferansiye olabildiğini göstermiştir.

Günümüzde bu kök hücrelerin yetişkin böbreğinde de olup olmadığı bilinmemekle beraber, diğer organlarda yapılan çalışmalar bunun mümkün olabileceğini göstermektedir. Yetişkin böbreğinde kök hücrelerin tanımlanması ve lokalizasyonuna yönelik çalışmalar devam etmektedir (18).

RENAL HASARIN TAMİRİNDE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ROLÜ

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, farklı hücre nesillerine diferansiye olabilme yeteneğinin keşfedilmesinin ardından, bu hücrelerin hasarlı dokuların

onarımına ve normal dokuların hücre döngüsüne katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır.

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, böbreğin epitel, endotel ve mezenşimal hücrelerini içeren çeşitli kompartmanlarının onarımında da rol oynadığı öne sürülmüş ve bunu göstermek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (44,45).

Akut tübüler nekrozu takiben tübüler rejenerasyona kemik iliği kaynaklı hücrelerin katkıda bulunup bulunmadığını araştıran Rosenberg ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kadın donörlerden transplantasyon yapılmış ve transplantasyon sonrası takiplerinde akut tübüler nekroz gelişmiş olan iki erkek hastadan elde edilen böbrek biyopsi örnekleri incelenmiştir. Bu çalışmada, erkek donörden transplantasyon yapılmış bir erkek hastadan elde edilen böbrek biyopsi örneği pozitif kontrol, minimal değişiklik hastalığı olan bir kadın hastadan elde edilen böbrek biyopsi örneği negatif kontrol olarak kullanılmış. Ek olarak, kadın donörlerden transplantasyon yapılmış, takiplerinde serum kreatinin düzeylerinde yükselme nedeni ile renal biyopsi yapılmış ancak akut tübüler nekroz saptanmamış olan iki erkek hasta da çalışmaya dahil edilmiştir. Böbrek biyopsi örnekleri, renal tubuler epitel hücrelerini (sitoketain pozitif) ve lökositleri (CD45 pozitif) tanımlamak için immünohistokimyasal olarak incelenmiş, Y kromozomu içeren hücreleri saptamak için ise florösan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanmıştır. Pozitif kontrol vakasından elde edilen böbrek biyopsisi örneğinde tübüler hücrelerin yaklaşık %40'ında Y kromozomu saptanırken, negatif kontrol vakasında Y kromozomu taşıyan hücre saptanmamıştır. Kadın donörden böbrek almış ve akut tübüler nekroz gelişmiş olan erkek hastaların böbrek biyopsilerinin incelenmesi sonucu tübüllerin %1'inde, Y kromozomu içeren tübüler epitel hücreleri (morfolojileri ile , sitokeratin için pozitif, CD45 için negatif boyanmaları ile tanınmışlar) saptadıkları halde, kadın donörden böbrek almış ancak akut tübüler nekroz saptanmamış iki erkek hastanın böbrek biyopsilerinde ise Y kromozomu taşıyan tübüler epitel hücre saptanmamışlardır. Bu klinik gözlemlerden yola çıkarak, böbrek dışı hücrelerin (muhtemelen kemik iliği kaynaklı), akut tübüler nekrozu takiben rejeneratif yanıtta katkıda bulunabildiği, ancak bu hücrelerin transplante böbreğin normal hücre döngüsüne katkıda bulunmadığı sonucu çıkarılmıştır (46).

Poulsom ve arkadaşları, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin renal dokunun onarımı ve hücre döngüsüne katkıda bulunup bulunmadığını araştırmak için erkek donörden kemik iliği transplantı almış olan dişi farelerin böbreklerini ve kadın donörden transplantasyon yapılmış ve çeşitli nedenlerle greft hasarı gelişmiş olan erkek hastaların böbrek biyopsi örneklerini incelemişlerdir. Böbrekteki tübüler epitel hücrelerinin kaynağını belirlemek amacı ile, Y kromozomu için in situ hibridizasyon ve tübüler epitel hücreleri tanımlamak için immünohistokimyasal incelemeyi kombine olarak yapmışlardır. Erkek fareden kemik iliği transplantasyonu yapılmış olan dişi farelerde, transplantasyondan 13 hafta sonra, kortikal tübüler epitel hücrelerinin %7.9'unun Y kromozomu içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca, glomerullerde Y kromozomu içeren ve vimentin için pozitif boyanan hücreler de tespit edilmiş ve podosit oldukları düşünülmüştür. Kadın donörlerden renal allograft almış ve çeşitli nedenlerle greft hasarı gelişmiş olan erkek hastaların renal biyopsi örnekleri incelendiğinde değişen oranlarda (% 2.4- % 6.8) Y kromozom pozitif kortikal tübüler epitel hücresi tespit edilmiştir. Aynı zamanda greft böbrekte, tek tük Y kromozom-pozitif endotel hücreleri de gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, hem histolojik olarak normal olan fare böbreklerinde hem de çeşitli nedenlerden dolayı hasarlanmış olan insan transplant böbreklerinde kemik iliği kaynaklı hücrelerin varlığı belirtilmiştir. Bu veriler, kemik iliği kaynaklı hücrelerin, renal epitelin normal döngüsüne ve hasar sonrası onarımına katkıda bulunduğunu göstermektedir (47).

Akut böbrek yetmezliğinin yaygın bir nedeni olan iskemi-reperfüzyon hasarının iyileşme dönemini inceleyen Lin ve arkadaşları, hematopoetik kök hücrelerin, renal tübüler epitel hücrelerinin rejenerasyonuna katkıda bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Hücrelerinde yapısal olarak β galaktosidaz sunan erkek Rosa 26 farelerinden elde edilen hematopoetik kök hücreler, irradiate edilmiş ve ardından iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş olan dişi, transgenik olmayan (hücrelerinde β galaktosidaz eksprese etmeyen) farelere transplante edilmiş. Hematopoetik kök hücre transplantasyonundan dört hafta sonra, x-gal boyama ile alıcıların böbreklerinde β galaktosidaz-pozitif renal tübüler hücreler saptanmış, erkeklerde bulunan Sry geni için PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) analizi ve Y kromozomu için florösan in situ hibridizasyon yöntemi uygulanarak bu hücrelerin erkek donör kaynaklı hücreler oldukları doğrulanmıştır. β galaktosidaz-pozitif hücreler en fazla,

iskemik hasardan en fazla etkilenen yer olan proksimal tübüllerde gözlenmiştir. Böylece, hematopoetik kök hücrelerin iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası renal tübüler hücrelere diferansiye olabileceği gösterilmiştir (48).

Kemik iliği ablasyonunu takiben kök hücrelerin kaybının, renal iskemi sonrası kan üre azotu düzeylerinde daha fazla artışa yol açtığını, kemik iliği ablasyonu sonrası kök hücre infüzyonunun bu etkiyi azalttığını gözleyen Krause ve arkadaşları, geçici renal iskemi ile yetişkin fare kemik iliğinden Lin(-) Sca-1(+) hücrelerin dolaşıma geçmeye başladığını ve renal tübülün hasarlı bölgelerine göç ettiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmada; altı C57BL/6J fare, subletal dozda irradiasyonu takiben salin (kontrol fareler, n=2) veya Rosa26 farelerinden elde edilen kemik iliği kaynaklı Lin(-) Sca1(+) c-kit(+) hücreleri (n=4) almıştır. Rosa 26 fareleri, hücrelerinde β galaktosidaz aktivitesi göstermektedir. Kemik iliği transplantasyonundan 3 ve 12 hafta sonra bir kontrol fare ve iki transplantasyon uygulanmış farenin böbrekleri β galaktosidaz aktivitesi açısından değerlendirilmiş. Kontrol farelerin böbreklerinde ne 3 ne de 12 hafta sonra β galaktosidaz aktivitesi gösteren hücre saptanmazken, kemik iliği transplantasyonu uygulanan farelerin böbreklerinde transplantasyondan 12 hafta sonra β galaktosidaz-pozitif hücreler bulunmuş ve tübüllerin yaklaşık %2-5'inin kemik iliği kaynaklı epitel hücreleri içerdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada glomerullerde veya arterlerde β galaktosidaz-pozitif hücreler saptanmamıştır. Sonuçlar, kemik iliği kaynaklı hücrelerin normal tübüler epitel hücre döngüsünde rol oynadığını düşündürmektedir (49).

Remuzzi ve arkadaşları ise akut tübüler nekrozda görülen tübüler rejenerasyona kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücrelerin değil mezenşimal kök hücrelerin katkıda bulunduğunu öne sürmüştür. Çalışmalarında antikanser bir ajan olan sisplatin tarafından indüklenen renal hasar modelini kullanmışlardır. Erkek kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler, sisplatin uygulanmış ve ciddi tübüler hasar gelişmiş dişi farelere enjekte edilmiştir. Alıcı farelerin böbreklerinde Y kromozomu taşıyan tübüler epitel hücrelerin gösterilmesiyle, mezenşimal kök hücrelerin hasarlı böbreğe engraft olduğu ve tübüler epitel hücrelerine diferansiye olduğu tespit edilmiştir. Mezenşimal kök hücre uygulanan farelerin renal fonksiyonunun sadece salin uygulanan kontrol grubuna göre daha hızlı düzeldiği görülmüştür. Hematopoetik kök hücrelerin renal hasara karşı aynı koruyucu etkiyi gösterip

göstermediğini değerlendirmek için erkek farelerden elde edilen pürifiye edilmiş hematopoetik kök hücreler sisplatin uygulanmış dişi farelerin bir grubuna enjekte edilmiş. Alıcı farelerin renal fonksiyonlarında anlamlı düzelme gözlenmemiş ve bu farelerin böbrekleri incelendiğinde ciddi derecede hasarlanmış tübüllerde az sayıda Y kromozomu içeren tübüler epitel hücreleri görülmüştür. Bu sonuçlar, mezenşimal kök hücrelerin renotropik özelliğe sahip olduğunu ve insanlarda akut böbrek yetmezliğinin tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (50).

Kronik renal transplant rejeksiyonunun temel özelliği olan doku remodelinginde rol oynayan mezenşimal hücrelerin orjinini araştıran bir çalışmada, kadın donörlerden allograft almış 6 erkek hasta, erkek donörlerden allograft almış 4 erkek hasta incelenmiştir. Mezenşimal hücreleri tanımlamak için immünohistokimyasal inceleme, Y kromozomu taşıyan hücreleri belirlemek için in situ hibridizasyon metodları uygulanmıştır. Kadın donörlerden greft almış olan 6 erkek hastadan elde edilen renal biyopsi materyallerinin incelenmesi sonucu; neointimadaki mezenşimal hücrelerin ortalama 34 ± 16 'sının, adventisyadaki mezenşimal hücrelerin ortalama 38 ± 12 'sinin, intertisyumdaki bu tip hücrelerin 30 ± 7 'sinin Y kromozomu içerdiği gösterilmiş ve bu hücrelerin alıcı kaynaklı olduğuna karar verilmiştir. Erkek donörlerden allograft almış olan kadın hastaların renal biyopsi örnekleri incelendiğinde; neointimadaki mezenşimal hücrelerin 24 ± 15 'inin, adventisyadaki mezenşimal hücrelerin 33 ± 9 'nun, intertisyumdaki mezenşimal hücrelerin ise 23 ± 8 'nin Y kromozomu içerdiği tespit edilmiştir. Bu hücreler donör kaynaklı mezenşimal hücreler olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma, kronik rejeksiyon gelişmiş olan renal allograftların neointima, adventisya ve tübülointertisyal kompartmanlarını alıcı kaynaklı mezenşimal hücrelerin infiltre ettiğini göstermiştir (51).

Imasawa ve arkadaşları, letal olarak irradiate edilen C57B/6J farelere, hücrelerinde yeşil florösan proteini (green fluorescent protein:GFP) geni taşıyan transgenik farelerden elde ettiği GFP-pozitif kemik iliği hücrelerini transplante etmiştir. Alıcı farelerin böbreklerini inceleyen araştırmacılar, glomerullerde, periglomerüler alanda ve intertisyumda GFP-pozitif hücreler bulmuşlardır. Bu GFP-pozitif hücrelerin, makrofaj veya lenfosit spesifik markerlar eksprese etmediği, ancak desmin eksprese ettiği, anjiotensin II'ye yanıt olarak kontrakte oldukları tespit

edilmiştir. Çalışmanın sonucu, kemik iliği hücrelerinin glomeruler hücrelerin döngüsüne katkıda bulunabildiğini düşündürmektedir (52).

Benzer sonuçlar, İto ve arkadaşlarının çalışması ile de elde edilmiştir. Bu çalışmada, GFP geni taşıyan transgenik ratlardan elde edilen GFP-pozitif kemik iliği kaynaklı hücreler, letal olarak irradiate edilmiş olan normal ratlara (GFP geni taşımayan) transplante edilmiş. Kemik iliği transplantasyonu yapılmış olan ratların böbrekleri incelendiğinde renal intertisyumda çok sayıda GFP-pozitif hücrelerin var olduğu gözlenmiştir. Bu GFP-pozitif hücrelerin, lökosit ve makrofaj markerları eksprese etmeyip, bir mezenşimal hücre markerı olan vimentin eksprese ettikleri tespit edilmiştir. İntertisyumun aksine, az sayıda GFP-pozitif hücrenin glomerullerde lokalize olduğu da gözlenmiştir. Kemik iliği kaynaklı hücrelerin glomeruler remodelinge katkıda bulunup bulunmadığını araştırmak amacı ile, kemik iliği transplantasyonu uygulanmış olan ratlarda anti-Thy1 antikor aracılı glomerulonefrit (Thy1 nefriti) geliştirilmiştir. Thy1 nefritinde mezenşiolizis ve bunu takiben glomeruler hücre sayısında artış meydana gelmektedir. Meydana gelen glomeruler remodeling orijinal yapıyı 8 hafta içinde restore etmektedir. Thy1 nefritinin indüksiyonundan 7 hafta sonra, glomerullerdeki GFP-pozitif hücrelerin sayısında dramatik bir artış gözlenmiştir. Bu hücrelerin yarısının bir makrofaj markerı olan CD45 ve ED1 eksprese ettiği, dolayısıyla glomerulleri infiltre eden kemik iliği kaynaklı makrofajlar oldukları düşünülmüştür. Thy1 nefritinin indüksiyonundan 8 hafta sonra intraglomeruler GFP-pozitif hücrelerin sayısı, hala yüksek olmaya devam ederken, bu hücrelerin %70'nin CD45(-) ve hemen hemen hepsinin ED1(-) olduğu tespit edilmiştir. İntraglomeruler GFP-pozitif hücrelerin büyük kısmının, bir rat mezenşimal hücre markerı olan Thy1 antijeni eksprese ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar, kemik iliğinin glomeruler rejenerasyon olayı boyunca, mezenşimal hücreler için bir rezervuar görevi gördüğünü düşündürmüştür. Bu çalışmada GFP-pozitif kemik iliği kaynaklı intertisyel ve mezenşimal hücreler tanımlanmıştır ancak GFP-pozitif endotel ve epitel hücreleri saptanmamıştır. Buradan yola çıkarak, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin terminal fenotipinin, in vivo mikroçevre tarafından regüle edildiği düşünülmüştür (53).

Cornacchia ve arkadaşları, diffüz glomeruloskleroz ve glomeruler hipertrofiye sahip ROP(Os/+) farelerin mezenşial hücrelerinin (glomerulün vasküler düz kas

hücreleri) sklerozan bir fenotip gösterdiklerini bulmuştur. Araştırmacılar, şayet sklerozis fenotipi mezenşial hücre progenitorleri ile taşınıyorsa ve mezenşial hücre progenitorleri de kemik iliğinden kaynaklanıyorsa, glomerulosklerozlu bir hayvandan normal alıcıya kemik iliği transplantasyonu yapıldığı takdirde alıcının böbreklerinde glomeruloskleroz gelişeceğini öne sürmüşlerdir. Os/+ farelerden normal glomerullere sahip ROP(+/+) farelere kemik iliği transplantasyonu yapılmıştır. Takipte alıcıların glomerullerinde ekstraselüler matrikste artış ve hipertrofi geliştiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, glomeruler mezenşial hücre progenitorlerinin kemik iliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir (54).

Yakın zamana kadar transplante organın endotel hücrelerinin, transplantasyondan sonra da donör orjinli olmaya devam ettiğine inanılmaktaydı. Lagaaij ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 12 renal transplant vakasından alınan biyopsi örneklerini inceleyerek, alıcı orjinli endotel hücrelerinin varlığını araştırmıştır. Çalışmada MHC class-I antijenleri ve ABO kan grubu antijenlerini belirlemek için immünohistokimyasal inceleme, X ve Y kromozomları için in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, renal allografttaki kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerinin bir kısmının, alıcının MHC antijenlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu gözlem, ABO kan grubu antijenleri için immünohistokimya ve X-Y kromozomları için in situ hibridizasyon yöntemlerini kullanarak da doğrulanmıştır. Alıcı kaynaklı endotel hücreleri, esas olarak rejeksiyon (özellikle vasküler rejeksiyon) gelişmiş olan hastaların greftlerinde gösterilmiştir. Rejeksiyon gelişmemiş olan hastaların greftlerinde alıcı kaynaklı endotel hücreleri az oranda bulunmuştur. Bu sonuçlar, vasküler rejeksiyon ile hasarlanmış olan endotelin, alıcı kaynaklı endotel hücreleri tarafından onarıldığını düşündürmektedir (55).

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, böbreğin epitel, mezenşimal ve glomeruler hücrelerinin turnoverına ve onarımına katkıda bulunabildiğini gösteren bu çalışmalar, gelecekte kök hücrelerin renal hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (45).

HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışmaya, 1990-2004 yılları arasında böbrek transplantasyonu yapılmış, izlemleri sırasında greft fonksiyonlarında bozulma (kan üre azotu ve kreatinin düzeylerinde yükselme) saptanması nedeni ile greft böbrek biyopsisi uygulanmış olan ve biyopsi preparatlarına ulaşılabilen onbir hastaya ait biyopsi materyali ve bir hastaya ait greft nefrektomi materyali dahil edildi. Ayrıca, çalışma grubuna dahil edilen hastalardan birine ait greft nefrektomi materyali de incelemeye alındı.

Erkek donörlerden transplantasyon yapılmış olan iki erkek hastadan elde edilen böbrek biyopsi örnekleri çalışmanın pozitif kontrol grubunu, kadın donörlerden transplantasyon yapılmış olan iki kadın hastadan elde edilen biyopsi örnekleri de çalışmanın negatif kontrol grubunu oluşturdu. Kadın donörden böbrek almış olan erkek hastalardan (yedi hasta) ve erkek donörden böbrek almış olan kadın hastadan (bir hasta) elde edilen böbrek biyopsisi örnekleri çalışma grubunu oluşturdu.

Tablo 1: Çalışmaya alınan hastaların renal biyopsi sonuçları ve donör özellikleri (PK; pozitif kontrol, NK; negatif kontrol, N; nefrektomi)

Hasta	Yaş	Patoloji	Cinsiyet (Donör/Alıcı)
1	24	Akut rejeksiyon (PK)	Erkek/Erkek
2	25	Minimal glomeruler mezenşial genişleme (PK)	Erkek/Erkek
3	37	Kronik rejeksiyon-akut pyelonefrit bulguları (NK)	Kadın/Kadın
4	21	Akut tübüler nekroz (NK)	Kadın/Kadın
5	16	Belirgin siklosporin toksisitesi	Kadın/Erkek
6	22	Kronik rejeksiyon ve takrolimus toksisitesi	Kadın/Erkek
7	31	Akut tübüler nekroz	Kadın/Erkek
8	17	Fokal segmental glomeruloskleroz ile uyumlu bulgular ve akut rejeksiyon bulguları	Erkek/Kadın
9 (N)	25	Kronik rejeksiyon	Kadın/Erkek
10	32	Kronik rejeksiyon ve belirgin siklosporin etkisi	Kadın/Erkek
11	26	Kronik rejeksiyon ve kronik siklosporin etkisi	Kadın/Erkek
11 (N)	28	Kronik rejeksiyon ve iskemik hasar	Kadın/Erkek
12	38	Akut rejeksiyon	Kadın/Erkek

Histopatolojik İnceleme

Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan tüm olgulara ait iğne biyopsilerinin parafin bloklarından pol-Lysin kaplı lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Eksplant yapılan iki olguya ait operasyon materyalinin parafin bloklarından ise küçük ve yeterli doku elde edilmesi amacıyla 'doku array' yöntemiyle yeni bloklar hazırlanarak benzer şekilde kesitler alındı.

Tüm olgulardan hazırlanan kesitlere rutin deparafinizasyon işleminden sonra kokteyl XY prob kullanılarak kromojenik in situ hibridizasyon yöntemi uygulandı.

Kromojenik in situ hibridizasyon yöntemi (CISH)

Deparafinizasyon: Böbrek biyopsilerine ait parafin kesitler 37 C°'de bir gece bekletildi ve 60 C°'de 2 saat inkübe edildi. Kesitler, üç ayrı %100 ksilen içeren kaplarda 10'ar dakika bekletildi daha sonra %100, %85, %75 etanollerden her birinde 5'er dakika bekletilerek hidrate edildi ve distile suya alındı.

CISH enzimatik 'pretreatment' işlemi: Kesitler distile suda 5 dakika yıkandıktan sonra 25 dakika 0.2 M HCl'de bekletildi. 2 X SSC/%0.05 Tween 20 yıkama solüsyonunda yıkandıktan sonra 80 C°'de 2 X SSC (salin sodyum sitrat) içinde 25 dakika tutuldu. Ardından, kesitler üzerine içinde 0.05 mg/ml Proteinaz K bulunduran TEN solusyonu damlatıldı ve 37C°'de 12 dakika bekletildi. %4 formaldehid bulunan PBS solüsyonuna alınıp 10 dakika tutuldu. %70 formamid solüsyonunda 74 C°'de 5 dakika bekletilerek denatüre edildi. Kesitler %70, %85, %100 etanollerde 2'şer dakika bekletilerek dehidrate edildi.

CISH hibridizasyon işlemi: Kesitler oda sıcaklığında kuruduktan sonra üzerlerine kokteyl XY probu (Zymed Laboratuvarı, SP.T-Light probe cocktail) eklendi. 90 C°'de 10 dakika tutularak DNA denatürasyonu sağlandı, ardından 42 C°'de gece boyu inkübe edildi.

Preparatlar, 42 C°'de 2 X SSC'de 20 dakika bekletildi. Ardından %50 formamid içinde 10 dakika yıkandı. 42 C°'de 2 X SSC'de 5 dakika yıkandı.

CISH 'detection' işlemi: Preparatlar metanol içinde % 3 lük H₂O₂'de 10 dakika tutuldu. PBS içinde 6 dakika yıkandı. Oda sıcaklığında preparatlar üzerine reaktan A (CAS-Block), 2-3 damla damlatıldı ve 10 dakika tutuldu. Reaktan B (AP-anti-DIG) ve C (HRP-Streptavidin)'den birer damla preaparatların üzerine damlatıldı ve 30

dakika bekletildi. Daha sonra PBS/Tween 20'de yıkandı. Ardından preparatlar üzerine substrat-chromogen solüsyonu (DAB) eklendi ve 30 dakika bekletildi. Musluk suyu ile yıkanan preparatlar üzerine Fast Red eklendi ve 35 dakika bekletildi. Preparatlar yaklaşık 8 saniye hematoksilende tutuldu ve ardından Reaktan F (Clearmount) eklenerek 60 C° etüvde 1.5-2 saat tutuldu.

Mikroskopik Değerlendirme:

Preparatlar ışık mikroskobu ile X100'lük büyütmede incelenmeye başlandı. Hücre nucleuslarında bulunan Y kromozomu DAB boyasını tutarak kahverengi (ve daha büyük) görülürken, X kromozomu Fast Red boyası ile kırmızı (ve daha küçük) olarak izlendi. Renal hücreler, ışık mikroskobu ile rahatça değerlendirilebildi (tübül epiteli, endotel hücreleri, mesenşimal hücreler, inflamatuvar hücreler gibi). Böylece donör kaynaklı greft böbreklerde alıcı kaynaklı renal hücrelerin olup olmadığı değerlendirilmeye başlandı. Her preparatta 100 tübül epitel hücresi, 100 tübülointertisyel mezenşim hücresi ve 100 endotel hücresi sayıldı.

BULGULAR

Erkek donörlerden transplantasyon yapılmış ve izlemleri sırasında greft fonksiyonlarında bozulma saptanması nedeni ile greft böbrek biyopsisi yapılmış olan iki erkek hasta çalışmanın pozitif kontrol grubunu oluşturdu. Bu hastalardan elde edilen biyopsi örneklerinin histopatolojik değerlendirmeleri akut rejeksiyon (hasta 1) ve minimal glomeruler mezenşial genişleme (hasta 2) ile uyumlu bulunmuştu. Renal biyopsi örneklerine CISH protokolünün uygulanmasının ardından yapılan incelemede tübül epitel hücreleri, mezenşimal hücreler, endotel hücrelerini içeren renal hücrelerin ve infiltratif lenfositler seri hücrelerinin XY kromozom yapısına sahip oldukları gözlemlendi. Ancak, hücrelerin bir kısmında (%1-2) sadece X kromozomunun görülmesi, bir kısmında ise (%1-5) her iki kromozoma ait dotların da görülebilmesi, parafin bloklardan doku kesitleri hazırlanırken 4 µm'lik ince kesitler alınması sırasında hücre nucleuslarının bazı bölümlerinin kaybedilmesine bağlandı.

Kadın donörlerden transplantasyon yapılmış olan kadın hastalardan elde edilen renal biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi kronik rejeksiyon (hasta 3) ve akut tübüler nekroz (hasta 4) ile uyumlu bulunmuştu. CISH protokolünün uygulanmasını takiben yapılan incelemede renal hücrelerin hiçbirinde Y kromozomu görülmedi. Tübüler epitel, mezenşimal, endotelial hücrelerde ve infiltratif lenfositler seri hücrelerinde XX kromozom yapısı izlendi. Benzer şekilde hücrelerin bir kısmında (%1-2) sadece X kromozom sinyali izlenirken, bir kısmında (%1-2) ise kromozoma ait dot izlenmedi.

Çalışma grubunu oluşturan hastalar

Kadın donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 8 ay sonra greft fonksiyonlarında bozulma saptanması nedeni ile greft böbrek biyopsisi uygulanmış olan erkek hastaya (hasta 5) ait biyopsi örneğinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucu siklosporin toksitesi ile uyumlu bulundu. Biyopsi kesitleri CISH protokolü uygulandıktan sonra yeniden değerlendirildi. Tübül epitel hücrelerinin %60'ının XX kromozom yapısında olduğu gözlenirken, hücrelerin %5'inde X kromozomuna ait tek dot izlendi. Tübül hücrelerinin %28'inde ise kromozom yapısı gözlenemedi. Bu durum yukarıda belirtildiği gibi parsiyel örnekleme nedeni ile hücre nucleusunun bir

kısının kaybedilmesine bağlandı. Tübül epitel hücrelerinin %8'inin ise XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu tespit edildi. Aynı kesit üzerinde tübülointertisyel kompartmandaki mezenşimal hücrelerin değerlendirilmesi sonucu ise, bu hücrelerin %75'nin XX kromozom yapısında olduğu (donör kaynaklı), %4 kadarında kromozoma ait dot gözlenmediği, %21'nin ise XY kromozom yapısına sahip olduğu (alıcı kaynaklı) gözlemlendi. Endotel hücrelerinin değerlendirilmesi sonucu, bu hücrelerin %86'sı XX kromozomu yapısında (donör kaynaklı) olduğu halde, endotel hücrelerinin %6 kadarının XY kromozomu yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu görüldü. İnceleme sırasında dokuda anlamlı bir iltihabi hücre infiltrasyonu görülmedi. Ancak izlenen az sayıda lenfositler seri hücrelerinin alıcı kaynaklı olduğu (XY kromozomu yapısında) gözlemlendi.

Kadın donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 7 yıl sonra yapılan greft böbrek biyopsisi sonucu şiddetli kronik rejeksiyon (Banff grade IIIa) ve kronik tacrolimus toksisitesi olarak bulunmuş olan erkek hastadan (Hasta 6) elde edilen biyopsi örneği CISH yöntemi uygulanarak incelendi. Histopatolojik değerlendirmede belirgin tübüler atrofi gözlemlendi. Tübül epitel hücrelerinin %90 XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) olduğu, bu hücrelerin %4'nün ise XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu izlendi. İntertisyumda belirgin bağ dokusu gelişimi mevcuttu. Mezenşimal hücrelerin %48'i XX kromozomuna ait dotlara sahipken, %6'sının sadece X kromozomuna ait dot içerdiği gözlemlendi. Mezenşimal hücrelerin %46'sı ise XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) idi. Endotel hücrelerin değerlendirilmesi sonucu, hücrelerin %3'nün XY kromozomları içerdiği görüldü. Bu hastada da saptanmış bir akut rejeksiyon bulunmamakta idi.

Kadın donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 1 ay sonra yapılan greft böbrek biyopsisi sonucu akut tübüler nekroz ile uyumlu bulunmuş olan erkek hastaya (Hasta 7) ait biyopsi örneği çalışmaya dahil edildi. Biyopsi materyalinin histopatolojik incelemesi sırasında özellikle proksimal tübülüsü etkileyen nekrotik sahalar ve belirgin epitelyal hiperplazi gösteren rejeneratif tübülüsler gözlemlendi. Biyopsi örneği CISH yöntemi ile incelenmeye başlandı. Tübül epitel hücrelerinin %80'i XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) iken, hücrelerin %3'ü XY kromozomunu yapısında (alıcı kaynaklı) idi. Tübüler hücrelerin %6 kadarı sadece X kromozomu içermekteydi. %11'inde ise her iki dot da izlenemedi.

Tübülointertisyel alanın histopatolojik değerlendirilmesi sonucu, çok az kollajenize saha dikkati çekti. Bu alanın CISH yöntemi ile değerlendirilmesi ile, mezenşimal hücrelerin %90'nının XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) olduğu görüldü. Bu hücrelerin %5'kadarında sadece X kromozomuna ait dot izlendi. Mezenşimal hücrelerin %5'inin ise XY kromozomu yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu gözlemlendi. Endotel hücrelerinin %1'i XY kromozomu içermekteydi. İntertisyumda izlenen çok az sayıdaki iltihabi hücreler XY kromozom yapısındaydı.

Erkek donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 4 yıl sonra greft fonksiyonlarında bozulma nedeni ile greft böbrek biyopsisi uygulanmış olan kadın hastaya (Hasta 8) ait biyopsi örneği incelenmeye alındı. Biyopsi örneğinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucu nüks fokal segmental glomeruloskleroz ve şiddetli akut rejeksiyon (Banff IIa) ile uyumlu bulundu. Biyopsi örneğinin CISH yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu, tübül epitel hücrelerinin %95'inin XY kromozom yapısında olduğu (donör kaynaklı), %2'sinin ise XX kromozom yapısında olduğu (alıcı kaynaklı) görüldü. Tübülointertisyel mesafedeki mezenşimal hücrelerin ise %30'unun XX kromozom yapısında (alıcı kaynaklı), %70'nin ise XY kromozom yapısında (donör kaynaklı) olduğu gözlemlendi. Tübülointertisyel bölgede gözlenen lenfoid hücre infiltratları ise alıcı kaynaklı (XX kromozom yapısında) idi. Endotel hücrelerin değerlendirilmesi sonucu %1'nin XX kromozomu içerdiği görüldü. Akut rejeksiyon nedeni ile OKT3 tedavisi uygulanan hastanın tedavi sonrası kreatinin düzeyi 1.7'e kadar geriledi (akut rejeksiyon öncesi bazal kreatinin düzeyi 1.2mg/dl). Bu hastanın da öncesine ait akut rejeksiyonu bulunmamakta idi.

Kadın donörden transplantasyon yapılmış ve transplantasyondan 1 yıl sonra greft fonksiyonlarında hızlı bozulma ile renal replasman tedavisine dönmüş olan erkek hastaya ait greft nefrektomi (Hasta 9) materyalinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucu kronik rejeksiyon (Banff grade II) ile uyumlu bulundu. Kesitin CISH yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda tübül epitel hücrelerinin %75'nin XX kromozom yapısında (donör kaynaklı), %14'nün ise XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu görüldü. Hücrelerin %10'nunda sadece X kromozomuna ait dot izlendi. Değerlendirme sırasında belirgin tübülitis gözlemlendi. İnfiltratif lenfositler seri hücreleri XY kromozom yapısında idi. Tübülointertisyel kompartmandaki mezenşimal hücrelerin sadece %24'ü XX kromozom yapısı (donör

kaynaklı) göstermekte iken, %75'nin XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu görüldü. İntertisyumda görülen lenfositler seri hücreleri alıcı kaynaklı (XY kromozomlu) hücrelerdi. Endotel hücrelerinin değerlendirilmesi ile hücrelerin %8'nin XY kromozomu taşıdığı (alıcı kaynaklı) gözlemlendi. Endotel hücrelerinin %86'sı XX kromozomu yapısındaydı. Hücrelerin %1'inde sadece X kromozomuna ait dot izlendi.

Kadın donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 3 yıl sonra greft fonksiyonlarında bozulma nedeni ile greft böbrek biyopsisi yapılmış olan erkek hastaya (Hasta 10) ait biyopsi örneği çalışmaya alındı. Histopatolojik değerlendirme sonucu kronik rejeksiyon (Banff grade IIa) ve belirgin kronik siklosporin etkisi tespit edildi. CISH protokolünün uygulanmasından sonra yapılan değerlendirmede, tübül epitel hücrelerinin %84'ü XX kromozomu (donör kaynaklı) taşımakta iken, hücrelerin %11'i XY kromozomu (alıcı kaynaklı) yapısındaydı. Tübül hücrelerinin %1'inde sadece X kromozomuna ait dot görüldü. Tübülointertisyel kompartmandaki mezenşimal hücrelerin % 57'sinin XX kromozomu yapısında (donör kaynaklı), %36'sının ise XY kromozomu yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu izlendi. Mezenşimal hücrelerin %6'sında sadece X kromozomuna ait dot görüldü. Endotel hücrelerinin %5'i XY kromozomu yapısında (alıcı kaynaklı) idi. Hastada önceki dönemde saptanmış akut rejeksiyon bulunmamakta idi.

Kadın donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 7 yıl sonra greft fonksiyonlarında bozulma nedeni ile greft böbrek biyopsisi yapılmış olan erkek hastaya (Hasta 11) ait biyopsi örneği değerlendirildi. Histopatolojik inceleme sonucu kronik rejeksiyon (Banff grade II) ve kronik siklosporin etkisi ile uyumlu bulundu. CISH protokolü uygulandıktan sonra yapılan değerlendirme sonucunda; tübül epitel hücrelerinin %70'i XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) iken, %9'u XY kromozom yapısındaydı (alıcı kaynaklı). Hücrelerin %12'sinde sadece X kromozomuna ait dot görüldü. Tübül hücrelerin %9'unda kromozomlara ait dotlar görülmedi. Tübülointertisyel mezenşimal hücrelerin %95'i XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) izlenirken, %5'i XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) idi. İntertisyumda izlenen infiltratif lenfositler seri hücreleri alıcı kaynaklıydı (XY kromozom yapısında). Endotel hücrelerinin %14'ü XY kromozomu yapısındaydı. Damar lümeni içinde gözlenen hematopoetik hücreler alıcı kaynaklıydı (XY

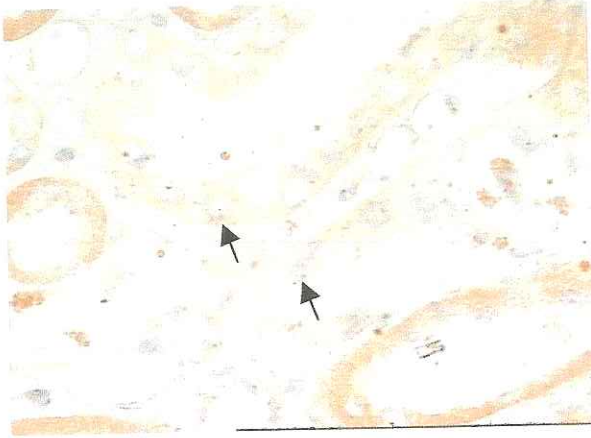
kromozomlu). Hasta biyopsi sonrasında ciddi greft disfonksiyonu nedeniyle kronik hemodiyaliz programına alındı.

Aynı hastanın greft biyopsisinden 2 yıl sonra (transplantasyondan 9 yıl sonra) yapılan greft nefrektomi materyali de incelemeye dahil edildi. Histopatolojik değerlendirme sonucu kronik rejeksiyon ve infarkt ile karakterli, iskemik hasar gösteren böbrek dokusu ile uyumluydu. CISH protokolü uygulandıktan sonra yapılan değerlendirme sonucu; tübül epitel hücrelerinin %10'u XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) olduğu halde %76'sının XY kromozom yapısında (alıcı kaynaklı) olduğu gözlemlendi. Tübül epitel hücrelerinin %7'sinde sadece X kromozomuna ait dot izlendi. Tübülointerstisyel mezenşim hücrelerinin sadece %14'ü XX kromozom yapısında (donör kaynaklı) iken, %83'ü XY kromozom yapısında olduğu tespit edildi. Mezenşimal hücrelerin %2'sinde sadece X kromozomuna ait dot görüldü. Endotel hücrelerinin %42'si XX kromozom yapısında, %53'ü ise XY kromozom yapısındaydı. Endotel hücrelerinin %5'inde her iki kromozoma ait dot da görülmedi. İntertisyumda görülen infiltratif lenfoplazmositer hücrelerin XY kromozom yapısında olduğu gözlemlendi.

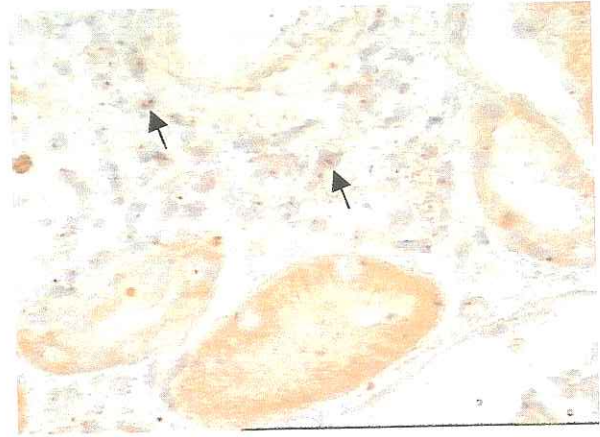
Kadın donörden transplantasyon yapılmış, transplantasyondan 1 yıl sonra greft fonksiyonunda bozulma nedeni ile greft böbrek biyopsisi uygulanmış olan erkek hastaya (Hasta 12) ait biyopsi örneği değerlendirildi. Histopatolojik olarak bulgular akut rejeksiyon ile uyumluydu. CISH yöntemi uygulandıktan sonra biyopsi örneği değerlendirildi. Tübül epitel hücrelerinin büyük kısmının XX kromozom yapısında olduğu gözlemlendi. XY kromozomu taşıyan tübül epitel hücresi görülmedi. Ancak tübülleri infiltre eden lenfositler seri hücreleri XY kromozom yapısındaydı. Mezenşimal ve endotel hücrelerinin XX veya sadece X kromozomuna ait dotlar taşıdığı görüldü. XY kromozomlu (alıcı kaynaklı) mezenşimal hücre veya endotel hücresi izlenmedi. Bu vakada izlenen farklı sonuç, doku kesitinin çok küçük olmasına ve buna bağlı olarak yeterince tübül epitel, mezenşimal ve endotelial hücrenin değerlendirilememesine bağlandı.

Tablo 2: Çalışma grubunu oluşturan hastaların özellikleri ve alıcı kaynaklı hücrelerin oranı

Hasta	Cinsiyet (donör/alıcı)	Transplantasyondan biyopsiye kadar geçen süre (gün)	Biyopsi sırasındaki serum kreatinin düzeyi (mg/dl)	Patoloji	Alıcı kaynaklı hücre (%)		
					Tübül epitel hücreleri	Mezenşimal hücre	Endotel hücreleri
5	Kadın/Erkek	231	1.8	Belirgin siklosporin toksisitesi	% 8	% 21	% 6
6	Kadın/Erkek	2735	4.0	Kronik rejeksiyon (Banff grade III a) ve takrolimus toksisitesi	% 4	% 46	% 3
7	Kadın/Erkek	30	1.6	Akut tübüler nekroz	% 3	% 5	% 1
8	Erkek/Kadın	1184	7.1	FSGS ile uyumlu bulgular ve akut rejeksiyon bulguları	% 2	% 30	% 1
9 (N)	Kadın/Erkek	422	15	Kronik rejeksiyon	% 14	% 75	% 8
10	Kadın/Erkek	1043	6.8	Kronik rejeksiyon (Banff grade II a) ve belirgin siklosporin etkisi	% 11	% 36	% 5
11	Kadın/Erkek	2555	6.6	Kronik rejeksiyon (Banff grade II) ve kronik siklosporin etkisi	% 9	% 5	% 14
11 (N)	Kadın/Erkek	3285	10	Kronik rejeksiyon ve infarkt ile karakterli renal eksplantasyon materyali	% 76	% 83	% 53
12	Kadın/Erkek	327	2.7	Akut rejeksiyon	% 0	% 0	% 0



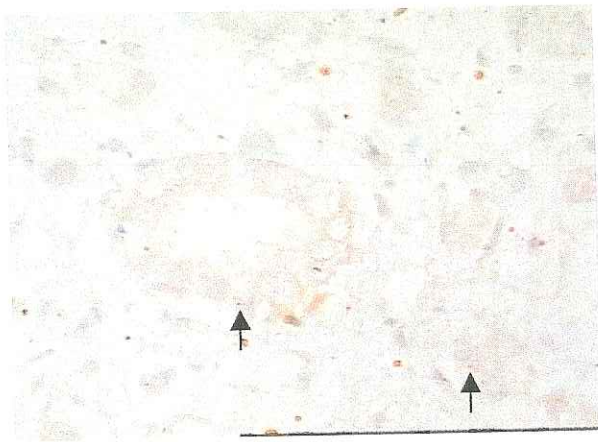
Şekil 1



Şekil 2

Şekil 1: Erkek donörden transplantasyon yapılmış erkek hastaya ait biyopsi örneği (pozitif kontrol). Tübül epitel hücrelerin ve mezenşimal hücrelerin XY kromozom yapısında olduğu görülmektedir.

Şekil 2: Aynı hastaya ait biyopsi örneğinde mezenşimal ve tübüler hücrelerin XY kromozom yapısında olduğu görülmektedir.



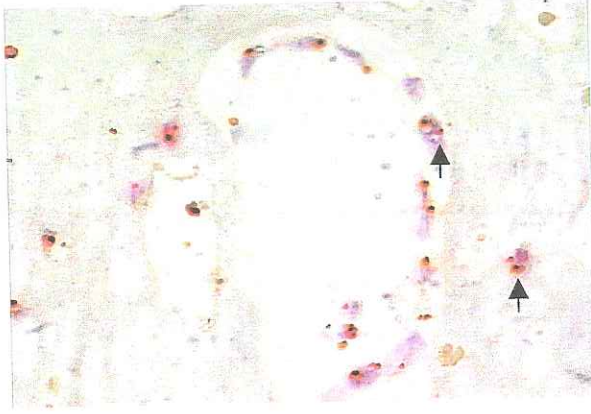
Şekil 3



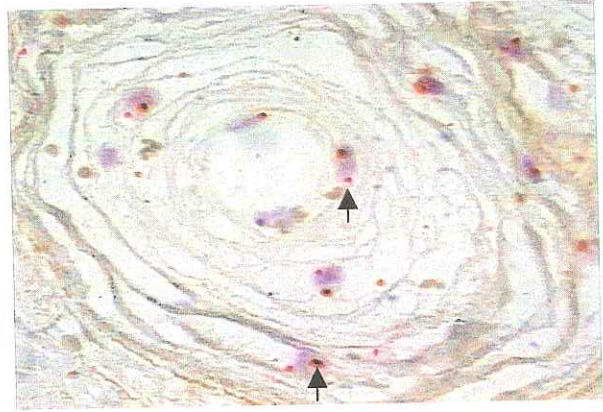
Şekil 4

Şekil 3 : Kadın donörden transplantasyon yapılmış kadın hastaya ait biyopsi örneği (hasta 4). Tübül epitel hücreleri ve mezenşimal hücrelerin XX kromozom yapısında olduğu görülmektedir.

Şekil 4 : Aynı hastaya ait biyopsi örneğinde tübüler ve mezenşimal hücreler XX kromozom yapısında görülmektedir.



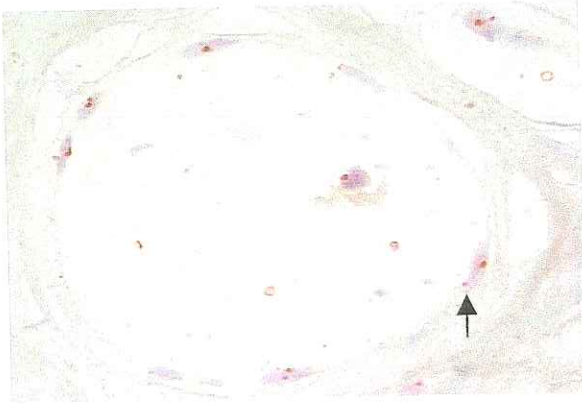
Şekil 5



Şekil 6

Şekil 5 : Kadın donörden transplantasyon yapılmış olan erkek hastanın (Hasta 11 N) nefrektomi materyalinde XY kromozom yapısında tübül epitel hücreleri ve mezenşimal hücreler görülmektedir.

Şekil 6 : Aynı hastaya ait biyopsi örneğinde alıcı kaynaklı XY kromozomlu endotel hücreleri ve mezenşimal hücreleri görülmektedir.



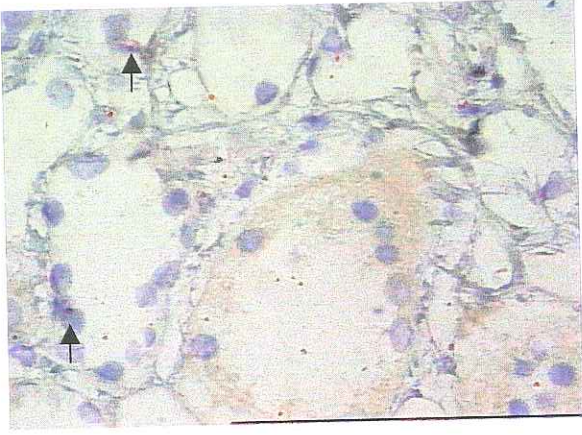
Şekil 7



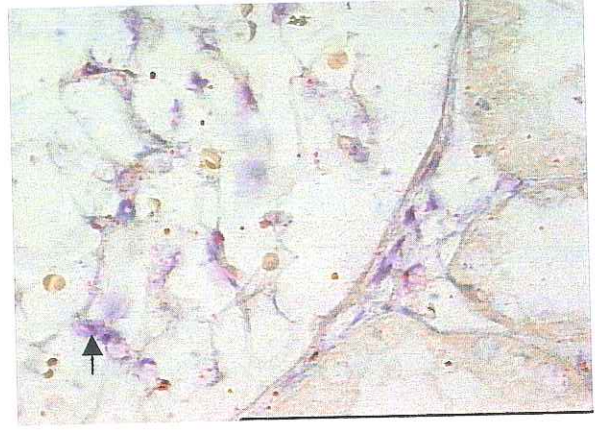
Şekil 8

Şekil 7 : Kadın donörden transplantasyon yapılmış erkek hastanın (hasta 11 N) greft böbrek incelemesinde Y kromozomu içeren tübüler epitel hücreleri görülmektedir.

Şekil 8: Aynı hastanın biyopsi örneğinde inflamatuvar hücre infiltratları görülmektedir. Bu hücreler XY kromozomu içermektedir.



Şekil 9



Şekil 10

Şekil 9 : Kadın donörden transplantasyon yapılmış erkek hastaya (hasta 5) ait biyopsi örneğinde XX kromozumlu (donör kaynaklı) tübül epitel hücrelerinin yanında XY kromozumlu (alıcı kaynaklı) tübül epitel hücreleri görülmektedir.

Şekil 10: Aynı hastanın biyopsi örneğinde glomerulde bulunan mezenşimal hücrelerin XY kromozom yapısında olduğu görülmektedir.

TARTIŞMA

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin farklı hücre nesillerine diferansiye olabildiğinin gösterilmesinin ardından, hasarlı doku ve organların onarımında rol oynayan olaylar ve onarımdan sorumlu olan hücrelerin kaynağı yeniden incelenmeye başlanmıştır.

Çalışmamızda, kadın donörlerden transplantasyon yapılmış ve çeşitli nedenlerle greft hasarı gelişmiş erkek hastalardan elde edilen böbrek biyopsi örneklerinde Y kromozomu, erkek donörden transplantasyon yapılmış kadın hastadan elde edilen böbrek biyopsi örneğinde XX kromozomu içeren renal tübüler, mezenşimal ve endotelial hücrelerin varlığı, alıcı kaynaklı hücrelerin renal hasarın tamirinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız CISH yöntemi, incelediğimiz doku kesitindeki tüm hücrelerin kromozomal yapısını değerlendirmeye izin verdiği gibi, ışık mikroskobu ile inceleme yapabilme imkanı da sağlamıştır. Extrarenal hücrelerin renal hücrelere diferansiye olup olmadığını araştırmak amacı ile bu yöntem ilk kez bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Bu sayede, farklı greft hasarı modellerinde tübüler, mezenşimal ve endotelial hücrelerin kaynağı araştırılabilmektedir. Bu yöntem, ışık mikroskobisi ile histopatolojik değerlendirme imkanı sağlaması, hücreleri tanımlanması için immünohistokimyasal değerlendirme gereksinimini ortadan kaldırması, aynı kesitte bulunan tüm hücrelerin kromozom yapısını değerlendirme imkanı sağlaması nedeni ile daha önce literatürdeki benzer çalışmalarda kullanılan florösan in situ hibridizasyon yöntemine (FISH) göre daha üstün gözükmektedir.

Kadın donörlerden transplantasyon yapılmış ve akut tübüler nekroz gelişmiş iki erkek hastanın biyopsi örneklerini inceleyen Rosenberg ve arkadaşları, tübüllerin %1'inde Y kromozomu taşıyan epitel hücreleri olduğunu göstermiştir. Ancak kadın donörden böbrek almış, greft fonksiyonlarında bozulma nedeni ile yapılan renal biyopsi sonucu siklosporin toksisitesi ve kronik rejeksiyon saptanmış olan iki erkek hastanın böbrek biyopsilerinde Y kromozomu taşıyan alıcı kaynaklı tübül epitel hücresi gözlememişlerdir (46). Poulsom ve arkadaşları ise, benzer şekilde kadın donörlerden transplantasyon yapılmış, ancak çeşitli nedenlere bağlı greft fonksiyonları bozulmuş olan hastalardan elde ettiği biyopsi örneklerinde, renal

tübüler epitel hücrelerinin %2.4-6.8 oranında alıcı kaynaklı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın farelerle yapılan kolunda ise, erkek fareden kemik iliği transplantasyonu yapılan dişi farelerin böbreklerinde belirgin bir hasar olmadığı halde tübüler epitel hücrelerin % 7.9'nun Y kromozomu taşıdığı tespit edilmiştir. Bu bulgudan yola çıkarak kemik iliği kaynaklı hücrelerin böbreğin sadece hasarlandığı durumlarda değil, normal hücre döngüsünde de rol aldığı düşünülmüştür (47). Bu çalışmalarda esas olarak alıcı kaynaklı tübül epitel hücrelerinin varlığı araştırılmış, alıcı kaynaklı mezenşimal, glomeruler, endotelial hücrelerin olup olmadığı değerlendirilmemiştir. İki çalışma arasında alıcı kaynaklı hücrelerin böbreğin normal hücre döngüsüne katılıp katılmadığı konusunda görüş ayrılığı vardır. Çalışmamızın sonuçları Poulsom ve arkadaşlarının bulgularını doğrulamaktadır. Kadın donörden transplantasyon yapılmış ve çeşitli nedenlerle greft hasarı gelişmiş olan erkek hastalar ve erkek donörden transplantasyon yapılmış ve greft hasarı gelişmiş olan kadın hastadan elde edilen biyopsi örneklerinde değişen oranlarda alıcı kaynaklı tübül epitel hücresi tespit edilmiştir. Rosenberg ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak ise siklosporin toksisitesi veya kronik rejeksiyonu olan hastalarda da (Hasta 12 hariç) alıcı kaynaklı tübül hücreleri izlenmiştir. Ek olarak ciddi renal hasarın olmadığı durumlarda bile alıcı kaynaklı tübül epitel hücreleri, mezenşimal hücreler ve endotelial hücrelerin var olduğu gözlenmiştir. Greft fonksiyonlarında bozulma nedeni ile transplantasyondan 8 ay (Hasta 5) ve 1 ay (Hasta 7) sonra yapılan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi sonucu siklosporin toksisitesi ve hafif akut tübüler nekroz ile uyumlu bulunan hastalara ait biyopsi örneklerinin CISH yöntemi ile incelenmesi sonucu; sırasıyla tübül epitel hücrelerinin %3-8'nin, intertisyumdaki mezenşimal hücrelerin %5-21'nin, endotel hücrelerinin %1-6'sının alıcı kaynaklı olduğu saptanmıştır. Bu gözlem, alıcı kaynaklı hücrelerin renal dokunun normal hücresel döngüsüne katkıda bulunabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır. Benzer olarak Mengel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada protokol biyopsi uygulamalarından elde ettikleri renal dokuda tübüler epitel hücrelerinin transplant sonrası 8. günde chimerism oluşturabildiklerini göstermişlerdir (56). Ancak çalışmalarında renal fonksiyon ve chimeric yapı arasında net bir korelasyon ortaya koyamamışlardır. Bu bulgu alıcı kaynaklı hücrelerin posttransplant erken dönemden başlayarak değişik derecelerde allogreft içinde hücresel döngüye

katıldığını göstermektedir. Bu döngüye katılımın nedeni ve klinik önemi ise halen net olarak bilinmemektedir.

Son yıllarda solit organ nakli sonrasında alıcı kaynaklı hücre varlığının ortaya konması ile bir başka tartışma ortaya çıkmaktadır. Bu da alıcının erkek ve donörün kadın olduğu durumda saptanan Y kromozom'lu hücrelerin gerçekten alıcı kaynaklı mı yoksa donöre ait önceki doğum (erkek çocuk) veya abortuslar (erkek fetus) nedeni ile ortaya çıkan chimerism sonucu mu olduğudur. Yapılan çalışmalarda erkek çocuk ve erkek fetus abortus sonucunda da kadında chimeric yapı olabileceği belirtilmektedir (57). Çalışmamızda kadın donörden transplantasyon yapılmış iki kadın hastaya (Hasta 3 ve 4) ait böbrek biyopsi örneklerini inceledik. Her iki donör de transplant öncesinde erkek çocuğa sahipti ve bir transplant alıcısı (Hasta 3) ek olarak transplant öncesinde erkek çocuk sahibiydi. Her iki olguda da yapılan incelemede CISH yöntemi ile Y kromozomu böbrek dokusunda gösterilemedi. Dolayısı ile renal dokuda chimeric yapı oluşumu ile daha önceki (erkek) doğumların ilişkisi saptanmadı.

Kadın donörlerden transplantasyon yapılmış, kronik rejeksiyon gelişmiş erkek hastaların böbrek biyopsilerini inceleyen Grimm ve arkadaşları, neointima, adventisya ve intertisyumda Y kromozomu taşıyan alıcı kaynaklı mezenşimal hücrelerin varlığını göstermiştir. Bu çalışmada neointimada 34 ± 16 , adventisyada 38 ± 12 , intertisyumda 30 ± 7 oranında alıcı kaynaklı hücre olduğu gösterilmiştir (51). Çalışmamızda cinsiyet uygunsuz transplantasyon yapılmış, izlemleri sırasında kronik rejeksiyon gelişmiş olan 3 hastaya ait böbrek biyopsi örneği ve 1 hastaya ait greft nefrektomi materyali değerlendirilmiştir. Ek olarak biyopsi materyali incelenen bu hastalardan birine ait olan greft nefrektomi materyali de incelemeye dahil edilmiştir. Tübülointertisyel kompartmandaki mezenşimal hücreler değerlendirildiğinde bu hücrelerin önemli bir kısmının alıcı kaynaklı olduğu görülmüştür. Kronik rejeksiyonlu iki hastaya (Hasta 6 ve 10) ait böbrek biyopsi örneğinde sırasıyla 46 ve 36 oranında alıcı kaynaklı mezenşimal hücre varlığı saptanmıştır. Bu sonuçlar Grimm ve arkadaşlarının çalışmasının bulguları ile uyumlu bulunmuştur. Bununla beraber, transplantasyondan 7 yıl sonra yapılan greft böbrek biyopsisi sonucu kronik rejeksiyon ile uyumlu bulunmuş olan hastanın (Hasta 11) tübülointertisyel kompartmandaki mezenşimal hücrelerinin 5 'nin alıcı kaynaklı

(XY yapısında) olduğu görülmüş ancak aynı hastaya biyopsiden 2 yıl sonra yapılan greft nefrektomi materyalinin değerlendirilmesi sonucu mezenşimal hücrelerin %83'nün alıcı kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde cinsiyet uygunsuz transplantasyon yapılmış ve transplantasyondan 1 yıl sonra greft fonksiyonları bozulmuş olan hastaya (Hasta 9) ait greft nefrektomi materyalinin değerlendirilmesi sonucunda ise mezenşimal hücrelerin %75'nin alıcı kaynaklı (XY kromozom yapısında) olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, kronik rejeksiyonun seyri sırasında alıcı kaynaklı mezenşimal hücrelerin zamanla donör kaynaklı olanların yerini aldığını düşündürmektedir. Çalışmamızda, kronik rejeksiyonu olmayan hastalardan elde edilen biyopsi örneklerinde de değişen oranlarda alıcı kaynaklı mezenşimal hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Cinsiyet uygunsuz transplantasyon yapılmış ve greft böbrek biyopsisi 'belirgin siklosporin etkisi' ile uyumlu bulunmuş olan hastanın (Hasta 5) tübülointertisyel mezenşimal hücrelerinin %21'inin alıcı kaynaklı olduğu gözlemlendiği gibi, intertisyumda belirgin fibrozis izlenen başka bir hasta (Hasta 8)'nin mezenşimal hücrelerinin %30'nun alıcı kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Kronik ciddi intertisyum hasarının olmadığı akut tübüler nekrozlu bir hastada (Hasta 7) ise %5 oranında alıcı kaynaklı mezenşimal hücreler izlenmiştir. Bu bulgu extrarenal hücrelerin böbreğin mezenşimal hücre döngüsüne de katkıda bulunabildiğini düşündürmektedir.

Yakın zamana kadar transplante edilen organın endotel hücrelerinin transplantasyondan sonra donör kaynaklı olmaya devam ettiğine inanılmaktayken, Lagaaj ve arkadaşlarının çalışması ile bu görüş değişmiştir. On iki renal transplant hastasından elde edilen biyopsi örneklerinin incelendiği bu çalışma ile allogreftlerde alıcı kaynaklı endotel hücrelerinin varlığı gösterilmiştir. Bu hücreler esas olarak vasküler rejeksiyonu olan hastalarda saptanmıştır. Araştırmacılar, vasküler rejeksiyon ile hasarlanan endotel hücrelerinin, alıcı kaynaklı endotel hücreleri tarafından onarıldığını öne sürmüştür (55). Çalışmamızda çeşitli greft hasarı modellerinde alıcı kaynaklı endotel hücrelerinin varlığı gösterilmiştir. Siklosporin toksisitesi ile uyumlu bulgular gösteren greft biyopsisinde %6, akut tübüler nekroz izlenen biyopsi örneğinde %1, fokal segmental glomeruloskleroz ve akut rejeksiyon tespit edilen biyopsi örneğinde ise %1 oranında alıcı kaynaklı endotel hücresi

görülmüştür. Kronik rejeksiyon izlenen greft biyopsi ve nefrektomi örneklerinde ise %5-53 oranında alıcı kaynaklı endotel hücresi izlenmiştir.

Böbrekte görülen alıcı kaynaklı hücrelerin kaynağının, kemik iliği kaynaklı kök hücreler olabileceği görüşü son yıllarda yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Kemik iliğinin tahrip edilmesini takiben kök hücre kaybının, renal iskemi sonrası kan üre azotu düzeylerinde daha fazla artışa yol açtığı, kök hücre infüzyonu ile ise bu etkinin azaldığının gözlenmesi bu görüşü desteklemektedir. Hücrelerinde β galaktosidaz sunan erkek Rosa 26 farelerinden elde edilen hematopoetik kök hücreler, irradiate edilmiş ve ardından böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş olan dişi, transgenik olmayan farelere transplante edilmiş ve bir süre sonra alıcının böbrek tübüllerinde β galaktosidaz sunan ve Y kromozomu taşıyan epitel hücreleri saptanmıştır (48). Benzer bir çalışmada, geçici renal iskeminin yetişkin fare kemik iliğinden Lin (-) Sca 1 (+) hücrelerin dolaşıma geçip, renal tübülün hasarlı bölgelerine göç etmesine yol açtığı gösterilmiştir (49). Remuzzi ve arkadaşları ise sisplatin tarafından indüklenen akut tübüler nekrozun iyileşmesinin, mezenşimal kök hücre infüzyonu ile hızlandığını, ancak hematopoetik kök hücre infüzyonu ile benzer bir etki elde edilemediğini öne sürmüşlerdir (50). Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, böbrek hasarının onarımına katkıda bulunan extrarenal hücrelerin kemik iliği kaynaklı kök hücreler olduğunu desteklemektedir.

Kemik iliği kaynaklı hücrelerin glomeruler hücrelere diferansiye olup olmadığını araştırmak amacı ile hücrelerinde GFP (yeşil florösan protein) geni taşıyan transgenik farelerden, transgenik olmayan farelere kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve alıcı farelerin böbreklerinde GFP-pozitif, desmin sunan, anjiotensin II'ye yanıt olarak kasılan hücreler gözlenmiştir (51,52). Sonuçlar, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin glomeruler hücre döngüsüne de katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Kemik iliği veya böbrek transplantasyonunu takiben gözlemlenen bu bulguların nativ böbrekler için de geçerli olduğu kabul edilmektedir.

Sonuç olarak renal allogreft ile alıcı arasında muhtemel kök hücre aracılıklı bir dinamik etkileşim bulunmakta ve her ne kadar allogreft hasar-alıcı kaynaklı hücre ilişkisinde bir paralellik dikkati çekse de bazı ciddi hasar taşımayan allogreft böbrek dokusunda değişik kompartmanlarda alıcı kaynaklı hücre varlığı da saptanmaktadır.

Bu durum normal fonksiyonel renal allogreftin hücresel döngüsüne alıcı kök hücrelerin katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ancak halen normal fonksiyonel grefte bu katkının zaman içerisindeki boyutu ve bunun olumlu ve kritik bir katkı olup olmadığını saptamak için daha çok çalışmalara ihtiyaç vardır. Hasarlanma sonrasında ortaya çıkan katkı ise doku bütünlüğü ve fonksiyonel integrasyonun kaybı sonrasında hücresel bazda yapılan katkının çok da anlamlı olamayabileceğini göstermektedir. Gelecekte, otolog kemik iliği kaynaklı kök hücreler, nativ böbrek hastalıklarının tedavisinde uygulanabilecek ve böbrek transplantasyonu tedavisine alternatif oluşturabilecek gibi görünmesine rağmen bu konu halen üzerinde yoğun olarak çalışmalar gerektirmektedir.

ÖZET

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin farklı hücre nesillerine diferansiye olabilme özelliğinin keşfedilmesinin ardından, hasarlı doku ve organların onarımında rol oynayan olaylar ve onarımdan sorumlu olan hücrelerin kaynağı yeniden incelenmeye başlanmıştır. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, kronik renal transplant rejeksiyonunda böbreğin mezenşimal hücrelerine, akut tübüler nekrozu takiben tübüler hücre rejenerasyonuna, deneysel glomeruler hastalık modelinde glomeruler hücre remodelingine katkıda bulunabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, akut rejeksiyon, akut tübüler nekroz, kronik rejeksiyon ve kalsinörin toksisitesi gibi allogreft fonksiyonlarında bozulmaya yol açan çeşitli durumlarda renal allogreftin vasküler, intertisyel ve mezenşial kompartmanlarında alıcı kaynaklı hücrelerin varlığını araştırmaktır.

Çalışmaya 1990-2004 yılları arasında böbrek transplantasyonu yapılmış oniki hasta dahil edildi. Cinsiyet uygunsuz transplantasyon yapılmış ve allogreft biyopsisi veya allogreft nefrektomisi uygulanmış olan sekiz hasta, erkek donörlerden transplantasyon yapılmış iki erkek hasta (pozitif kontrol) ve kadın donörlerden transplantasyon yapılmış iki kadın hasta (negatif kontrol) değerlendirildi.

Greft böbreklerde alıcı kaynaklı tübüler, mezenşimal ve endotelial hücrelerin varlığını araştırmak amacıyla renal biyopsi örnekleri kromojenik in situ hibridizasyon yöntemi (CISH) ile incelendi. Çalışma grubunu oluşturan hastaların histopatolojik değerlendirilmeleri sonucu; iki hastada akut rejeksiyon, dört hastada kronik rejeksiyon (bu hastalardan biri takrolimus toksisitesine, ikisi siklosporin toksisitesine de sahipti), bir hastada akut tübüler nekroz ve bir hastada siklosporin toksisitesi tespit edildi.

Kadın donörlerden transplantasyon yapılmış erkek hastalardan ve erkek donörden transplantasyon yapılmış kadın hastadan elde edilen böbrek biyopsisi örneklerinde değişen oranlarda alıcı kaynaklı tübüler (%2-76), mezenşimal (%5-83) ve endotelial hücreler (%1-53) bulundu.

Ciddi veya hafif derecede hasarlanmış greft böbreklerde alıcı kaynaklı renal hücrelerin varlığı extrarenal (muhtemelen kemik iliği kaynaklı) hücrelerin böbreğin onarımına katkıda bulunduğunu ve aynı zamanda allogreftte belirgin bir hasar

olmaksızın normal hücre döngüsüne de katkıda bulunduğunu gösterir. Bu bulgular, gelecekte kök hücrelerin renal hastalıkların tedavisinde bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir, ancak altta yatan mekanizmaları anlayabilmek için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: böbrek, kök hücre, mezenşimal hücreler, transplantasyon, tubuler hücreler

SUMMARY

After discovering the characteristics of bone marrow stem cells that they can differentiate to various cell lineages, the events which play role in repair of damaged tissues and organs and the source of the cells which are responsible of repairing them were re-examined. It was reported that bone marrow stem cells may contribute to renal mesenchymal cells in chronic transplant rejection, acute tubular necrosis followed by tubular cell regeneration, glomerular cell remodelling in experimental glomerular illness model. The purpose of this study was to search whether the presence of recipient originated cells in renal allograft tissue of vascular, interstitial and mesangial compartments in several types of allograft dysfunction such as acute rejection, acute tubular necrosis, chronic rejection and calcineurin toxicity.

A total of twelve patients, who had transplantation between 1990-2004, were enrolled to the study. Eight patients with sex mismatched transplantation and having allograft biopsy or allograft nephrectomy, two male patients who received transplantation from male donors (positive control), and two female patients who received transplantation from female donors (negative control) were evaluated. Among them, there were seven male patients who received transplantation from female donors and one female patient who received transplantation from male donor.

The renal biopsy samples were examined with chromogenic in situ hybridization (CISH) method to search if any of the tubular, mesenchymal, and endothelial cells in graft kidneys were derived from the recipient. In sex mismatched study patients, two acute rejection, four chronic rejection (one also had tacrolimus toxicity and two other also had cyclosporin toxicity), one acute tubular necrosis and one cyclosporin toxicity.

We found various percentage of tubular (2-76%), mesenchymal (5-83%) and endothelial cells (1-53%) with recipient-derived in renal biopsy samples obtained from male patients who received transplantation from female donors and from female patient who received transplantaion from male donor.

The existence of recipient-derived renal cells in severe damaged and slightly damaged graft kidneys show that extrarenal (probably bone marrow-derived) cells contribute to repair of kidney and also they may get involved to normal functional

allograft tissue structure without contributing the repair process. These findings give an idea that in the future, stem cell may have a contributing role in kidney diseases, however, further studies are needed to clarify these mechanisms.

Key words: kidney, stem cell, mesenchymal cells, transplantation, tubular cell.

KAYNAKLAR

1. Peter A. Andrews Renal transplantation (British Medical Journal 2002;324:530-534)
2. Türkiye 2002 yılı Ulusal Hemodiyaliz, Transplantasyon ve Nefroloji Kayıt Sistemi (Registry) Raporu (2002; 24-28)
3. Dominguez-Bendala, C.Ricordi Stem cells and their clinical application (Transplantation Proceedings, 2002;34,1372-1375)
4. Malcolm R. Alison, R. Poulson, Stuart Forbes An introduction to stem cells (Journal of Pathology 2002;197:419-423)
5. C.Cogle, S.Guthrie, R.Sanders, W.Allen, E. Scott, B.Petersen An Overview of stem cell research and regulatory issues (Mayo Clinic Proceedings .2003;78:993-1003)
6. R.Lowell-Badge The future for stem cell research (Nature 2001, vol:414, 88-97)
7. J. Czyz, C.Wiese, A.Rolletschek, P.Blyszczuk, M.Cross, A.Wobus Potential of embryonic and adult stem cells in vitro (Journal of Biological Chemistry 2003, vol:384, 1391-1409)
8. E. Fuchs, J.Segre Stem cells:A new lease on life (Cell 2000, vol:100,143-155)
9. R.Passier, C.Mummery Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair (Cardiovascular research (2003) 53: 324-335)
10. A. Bishop, L.Buttery, J.Polak Embryonic stem cells (Journal of pathology 2002;197:424-429)
11. Boheler, Czyz, Tweedie, Yang, Anisimov, Wobus Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes (Circulation Research 2002 91:189-201)
12. Hescheler, Fleischmann, Lentini, Maltsev, Rohwedel, Wobus, Addicks Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis (Cardiovascular Research 1997 36:149-162)
13. Carpenter, Inokuma, Denham, Mujtaba, Chiu, Rao Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells (Experimental Neurology 2001 172:383-397)

14. Kim, Auerbach, Rodriguez-Gomez, Velasco, Gavin, Lumelsky, Lee, Nguyen, Sanchez-Pernatue, Bankiewicz Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease (Nature 2002, 418:50-56)
15. Brüstle, Jones, Learish, Karam, Choudhary, Wiestler, Duncan, McKay Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants (Science 285, 754-756)
16. Blyszczuk, Czyz, Kania, Wagner, Roll, Onge, Wobus Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells (Proceedings of the national academy of sciences USA 2003 100:998-1003)
17. Strom, Field, Ruediger Allogeneic stem cells, clinical transplantation and origins of regenerative medicine (Current Opinion in Immunology 2002, 14:601-605)
18. Qais Al-Awqati, Juan Oliver Stem cells in the kidney (Kidney International 2002 vol:61 387-395)
19. Körbling, Estrov Adult stem cells for tissue repair- A new therapeutic concept? (The New England Journal of Medicine 2003;349:570-82)
20. Jiang, Vaessen, Lenvik, Blackstad, Reyes, Verfaillie Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain (Experimental Hematology 2002 30: 896-904)
21. Poulson, Alison, Forbes, Wright Adult stem cell plasticity (Journal of Pathology 2002; 197:441-456)
22. Tao, Ma Evidence for transdifferentiation of human bone marrow derived stem cells: recent progress and controversies (Pathology 2003; 35,6-13)
23. Herzog, Chai, Krause Plasticity of marrow derived stem cells (Blood 2003; vol:102no:10 3483-3493)
24. Gussoni, Soneoka, Strickland Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation (Nature 1999; 401:390-4)
25. Theise, Badve, Saxena, Henegariu, Sell, Crawford, Krause Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation induced myeloablation (Hepatology 2000;31;235-240)

26. Orlic, Kajstura, Chimenti Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium (Nature 2001;410:701-5)
27. Gunsilius, Duba, Petzer Evidence from a leukemia model for maintenance of vascular endothelium by bone marrow-derived endothelial cells (Lancet 2000;355:1688-1691)
28. Gao, McAlister, Williams Repopulation of liver endothelium by bone marrow-derived cells (Lancet 2001;357:932-933)
29. Mezey, Chandros, Harta, Maki, McKercher Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow (Science 2000;290:1779-1782)
30. Krause, Theise, Collector, Henagariu, Hwang, Gardner, Sharkis Multi-organ, Multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell (Cell 2001 vol:105; 369-377)
31. Reyes, Lund, Lenvik, Aguiar, Koodie, Verfaillie Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells (Blood 2001 vol:98 no:9; 2615-2625)
32. Azizi, Stokes, Augelli, DiGirolamo, Prockop Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats (Proceedings of the national academy of sciences USA 1998;95:3908-3913)
33. Jiang, Balkrishna, Jahagirdar, Reinhardt, Schwartz, Kene, Verfaillie Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow (Nature 2002 vol:418; 41-49)
34. Schwartz, Reyes, Koodie, Jiang, Blackstad, Lund, Lenvik, Verfaillie .Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells (The Journal Clinical Investigation 2002 109:1291-1302)
35. Strain, Crosby Hepatic stem cells (Gut 2000;46:743-745)
36. Roskams, De Vos, Eyken, Myazaki, Van Damme, Desmet Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man (Journal of hepatology 1998; 29:455-463)
37. Crosby, Kelly, Strain Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium (Gastroenterology, 2001; 120:534-544)

38. Petersen, Bowen, Patrene, Mars, Sullivan, Murase, Boggs, Goff Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells (Science 1999 vol:284; 1168-1170)
39. Petersen Hepatic 'stem' cells: Coming full circle (Blood cells, molecules and diseases 2001; 27 :590-600)
40. Bjornson, Rietze, Reynolds, Magli, Vesconi Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo (Science 1999; 283:534-537)
41. Clarke, Johansson, Wilbertz Generalized potential of adult neural stem cells (Science 2000; 288:1660-1663)
42. Murry, Wiseman, Schwartz, Hauschka Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis (The Journal Clinical Investigation 1996; 98:2512-2523)
43. Jackson, Goodell Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle (Proceedings of the national academy of sciences USA 1999; 96:14482-14486)
44. Poulson Does bone marrow contain renal precursor cells? (Nephron Exp Nephrol 2003; 93:e53-e57)
45. Imai, Ito Can bone marrow differentiate into renal cells? (Pediatric Nephrology 2002 17; 790-794)
46. Gupta, Verfaillie, Chmielewski, Kim, Rosenberg A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure (Kidney International 2002 vol:62 1285-1290)
47. Poulson, Forbes, Hodivala-Dilke, Ryan, Wyles, Alison, Wright Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration (Journal of Pathology 2001; 195:229-235)
48. Lin, Cordes, Linheng Li, Hood, Couser, Igarashi Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice (Journal of American Society of Nephrology 2003; 14:1188-1199)
49. Kale, Karihaloo, Clark, Kashgarian, Krause, Cantley Bone marrow stem cells contribute to repair of ischemically injured renal tubule (The Journal of Clinical Investigation 2003; 112:42-49)

50. Morigi, Imberti, Zoja, Corna, Alison, Remuzzi Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure (Journal of American Society of Nephrology 2004; 15:1794-1804)
51. Grimm, Nickerson, Jeffery, Rashmin, Savani, Gough Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal allograft rejection (The New England Journal of Medicine 2001 vol:345,no:2; 93-97)
52. Imasawa, Utsunomiya, Kawamura, Zhong, Nagassawa The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells (Journal of American Society of Nephrology 2001;12:1401-1409)
53. Ito, Susuki, Imai, Okabe, Hori Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling (Journal of American Society of Nephrology 2001; 12:2625-2635)
54. Cornacchia, Fornoni, Plati, Thomas, Wang, Striker Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow derived mesangial cell progenitors (The Journal of Clinical Investigation 2001 108:1649-1656)
55. Lagaaij, Cramer-Knijnenburg, Kemenade, Brujin Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection (The Lancet 2001 Vol:357;33-37)
56. Mengel, Jonigk, Marwedel, Kleeberger, Bredt, Bock, Lehmann, Gwinner, Haller, Kreipe Tubular chimerism occurs regularly in renal allografts and is not correlated to outcome (Journal of the American Society of Nephrology; 15:978-986, 2004)
57. Cadavid, rugeles, Pena, Sanchez, Garcia, Botero, Castaneda, Ossa Cell microchimerism in patients with recurrent spontaneous abortion (Early pregnancy; 3(3):199-203, 1997)