

## BÖLÜM 23

# ÜROLOJİ'DE KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Mithat EKŞİ<sup>1</sup>

Doku mühendisliği; hastalık veya travmatik süreçlerden kaynaklanan hasarın ardından doku işlevini geri kazandırmak ya da geliştirmek amacıyla biyomühendislik, malzeme bilimleri ve yaşam bilimlerini kullanan disiplinler arası bir alandır. Doku mühendisliğiyle elde edilen ürünler yapısal (kemik ve kırık), salgısal (karaciğer, pankreas), bariyer (cilt), biyokimyasal ve transport sağlamak gibi amaçlarla kullanılabilir. Bu alanda elde edilen veriler klinik uygulamaların yanı sıra, etkinlik ve toksikoloji için ilaç testleri sırasında ve doku gelişimi ve morfogenez üzerine yapılan temel çalışmaları içerir. Rejeneratif tıp terimi genellikle doku mühendisliği ile eş anlamlı olarak kullanılır fakat rejeneratif tıp sıklıkla kök hücrelerin hücre kaynağı olarak kullanılmasını ima etmektedir. Doku mühendisliğinin genel prensipleri, değiştirilecek dokuya işlevsel, yapısal ve mekanik olarak eşit veya ondan daha iyi olan üç boyutlu canlı yapı oluşturmak için canlı hücrelerin doğal/sentetik bir destek veya iskele ile birleştirilmesini içerir. Böyle bir yapının geliştirilmesi, dört anahtar materyalin dikkatli bir şekilde seçilmesini gerektirir; iskele, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks ve hücreler.

Doku mühendisliği alanında belirgin ilerlemeler kaydedilmekle birlikte, organ ve doku replasmanı için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Optimal hücre kaynağı, iskele tasarım ve in vitro biyoreaktörler, vaskülarize doku ve organlar oluşturmak için mikrofabrikasyon teknolojisinin kullanımı ve geliştirilmesi hala araştırılmaktadır. Kök hücre araştırmalarında multipotent ya da pluripotent kök hücre kullanımıyla ilgili birçok gelişme sağlanmakla birlikte bu hücrelerin kullanımıyla ilgili etik, yasal ve sosyal kısıtlılıklar devam etmektedir.

## GİRİŞ

Kür elde edilemeyen son dönem hastalık ya da doku kayıplarında organ transplantasyonu ya da yapay transplantasyonlar başarılı bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Organ transplantasyonu, organ sıkıntısı ve yaşam boyu immunsupresyon

<sup>1</sup> Uzm. Dr. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
xxxx@gmail.com

gerekliliği ve sonrasında gelişecek ciddi komplikasyonlarla ilişkilidir. Doku mühendisliği, bu sorunları çözmek için hızla genişleyen bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır ve rejeneratif tıbbın önemli bir bileşenidir. Doku mühendisliği, hastalık veya travmatik süreçlerden kaynaklanan hasarın ardından doku işlevlerini geri yükleyecek, koruyacak ve geliştirecek biyolojik sistemlerin oluşturulmasında doku mühendisliği, malzeme bilimi ve yaşam bilimlerinin ilke ve yöntemlerini kullanan multidisipliner bir yaklaşımdır.(1-3) Doku mühendisliğinin genel ilkeleri, canlı hücrelerin, değiştirilecek dokuya işlevsel, yapısal ve mekanik olarak eşit veya ondan daha iyi olan üç boyutlu bir canlı yapı oluşturmak için biyolojik olarak parçalanabilen doğal ya da sentetik bir destek veya iskele ile birleştirilmesini içerir. (4) Böyle bir yapı için 4 anahtar nokta vardır: iskele, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks (ekstrasellüler matriks (ECM)) ve kök hücreler. (1-5) İskele malzemeleri, hücrelerin organizasyonunu, büyümesini ve farklılaşmasını yönlendiren üç boyutlu doku yapılarıdır. İskele; biyouyumlu ve spesifik hücre popülasyonu için hem beslenme hem de biyolojik ihtiyaçları karşılayacak şekilde tasarlanmalıdır. (6) Büyüme faktörleri, hücre reseptörleri bağlayabilen ve dokunun farklılaşmasına ve/veya proliferasyonuna izin veren veya önleyici hücre tepkileri üretebilen çözümler peptitlerdir.(7) Yapı içinde hücrenin adezyonu, büyümesi ve farklılaşması için uygun koşulların sağlanması ise ECM tarafından pH, sıcaklık, oksijen düzeyi ve mekanik kuvvetler gibi çevresel faktörlerin kontrol edilmesiyle sağlanır. (5) Son olarak, canlı ve yaşayabilir bir yapının oluşturulması nonimmünojenik, proliferasyonu iyi, hasadı kolay ve birçok hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerin varlığına bağlıdır.(8) İleri düzeyli son dönem organ yetmezliği durumlarında veya kültürde sınırlı proliferatif kapasitesi olan hücrelerin varlığında doğrudan hasadın mümkün olmaması sebebiyle kök hücreler alternatif hücre kaynakları oluşturmaktadır.(9,10)

## **DOKU MÜHENDİSLİĞİNİN TARİHÇESİ**

Rejeneratif tıp kavramı ilk olarak 1933 yılında, fare tümör hücrelerinin biyouyumlu bir polimer zar içerisinde geliştirilerek civciv embriyolarının karın boşluğuna implante edilmesiyle ortaya çıktı.(11) Birkaç dekat sonrasında, Chick ve ark. yenidoğan sıçan pankreatik beta hücrelerinin sentetik kılcal damarlar üzerinde kültürlenip ortam ile perfüze edildiklerinde glukoz konstranstrasyonuna cevap olarak insülin salgıladıklarını bildirdi.(12) Geliştirilen ilk doku bazlı tedaviler ise cilt greftleriydi. Ardından allogreft cilt bankacılığını mümkün kılan hücreleri ve dokuları koruyan teknikler ortaya çıktı ve bu ciltler kullanıma hazır bir ürün haline geldi. İlk kez 1962 yılında sentetik deri grefti ile hasarlı dokunun

yer değiştirilmesi bildirildi fakat ilk başarılı cilt ürünleri 1980'li yılların başında üretildi. Sıklıkla modern anlamda doku mühendisliğinin miladı olarak bu tarih kabul edilmekle birlikte 1987 yılında doku mühendisliği tanımı gerçek anlamına kavuşacaktı.

Howard Green ve ark., Harvard Tıp Fakültesi'nde hastadan biyopsi ile elde ettikleri ciltten epidermis geliştirme teknikleri ile ilk cilt ürünlerini elde ettiler. İzole edilen keratinositlerin fare mezenkimal hücrelerinin besleyici tabakası ile ortak kültüre edilerek çoğaltılabileceğini ve böylece haftalar içerisinde binlerce kat fazla doku elde edilebileceğini gösterdiler.(13-15) Bu teknolojik kırılma, Genzyme (Cambridge, MA) tarafından pazarlanan ilk hücre tabanlı doku mühendisliği ürünü Epicel'e yol açtı. Epicel, geleneksel otogrefleme teknikleriyle tedavi edilmek için yeterli miktarda deriye sahip olmayan katastrofik yanma yaralanmalarından sonra mevcut yaraları kapatma amacıyla kullanılan otolog keratinosit tabakalarından oluşur. 1980'li yılların başında, Boston Teknoloji Merkez'i'nde görevli yanık cerrahı Burke ve ark. ve Massachusetts Institute of Technology'de görevli makine mühendisi Ioannis Yannas tarafından, geniş yanık hasarı olan hastalar için kollajen iskelelerine ekilen fibroblastlar ile başarılı bir şekilde yapay deri üretildi. (16) Çapraz bağlanmış ve kontrollü dondurularak kurutma yoluyla gözenekli bir matrise dönüştürülen sığır tip 1 kollajen ve köpekbalığı kondroitin 6 sülfat karışımından oluşan bu ürün Integra Life Sciences (Plainsboro, NJ) tarafından Dermal Rejenerasyon Şablonu adı altında piyasaya sürülmüştür. Hasarın dermisin derinliklerine kadar uzandığı ciddi yanık yaralarını kapatmak için kullanılan ürün, geçici epiderm benzeri bir bariyer görevi görmektedir. Yine doku mühendisliğinin erken dönemlerinde, MIT'deki Eugene Bell ve ark. hem dermisi hem de epidermisi yeniden oluşturan kompozit bir cilt ürünü geliştirdiler.(17) Dermis, ilk olarak dermal fibroblastlara sahip kollajen jelin tohumlanmasıyla elde edilir ve bu da jelin büzülmesine ve bir neodermis oluşmasına sebep olur. Keratinositler, başlangıçta kültür ortamına batırılır ve daha sonra keratinize tabakanın farklılaşmasını ve oluşumunu indüklemek için hava sıvı ara yüzüne maruz bırakılarak üretim prosedüründe bir noktada neodermin tepesinde büyütülür. Tüm işlem yaklaşık 3 hafta sürer ve kullanıma hazır olma potansiyeli sağlayan, ancak allojenik cilt değişiminin yapılabileceği yenidoğandan sünet derisinden elde edilen allojenik hücreler kullanılır. Allogreft teknik sebebiyle konağın bir süre sonra dokuyu reddedeceği ve yalnızca geçici teminat sağlaması beklenir. Bu teknolojiye dayanan mevcut ürün, Organogenesis (Canton, MA) tarafından pazarlanan Apligraf, venöz bacak ülserleri ve diyabetik ayak ülserlerinde konağın yara iyileşme tepkisini uyarmak için kullanılır. Benzer deri yapıları trandermal taşıma ve kimyasal

aşındırıcı özelliklerini ölçmek amacıyla in vitro testlerde de kullanılır. 1990'lü yıllarda, bu ürünler ve doku mühendisliğindeki diğer ürünlerin birçoğu başarıyla ticarileştirildi. Bu erken başarılar büyük bir coşku ve merak uyandırdı ve birçok araştırma laboratuvarı, vücuttaki hemen hemen her dokuya doku mühendisliği uygulamaya başladılar. Birkaç yeni şirket bazı önde gelen otörlerin 15 yıl önce tahmin ettiği gibi karmaşık vücut kısımlarını üretebilmek amacıyla büyük bir çabayla bu işe yöneldi. (18) Hücreler ve matrisin basit bir şekilde birleştirilmesi cilt ve kıkırdak için işe yaradı çünkü bu dokular geniş vaskülarizasyon ve diğer önemli doku işlemlerini gerektirmiyordu. Ayrıca keratinositleri büyütme ve ayırt etme için gerekli teknolojiler, bu ürünler için ihtiyaç duyulan hücreleri yeterli şekilde tedarik etmeyi mümkün kılmıştı. Fakat diğer dokular için bu avantajlar geçerli değildi. Doku mühendisliği ilerleyen süreçte, aynı otörler tarafından belirtildiği üzere, işlevsel damar temini sağlama, 3 boyutlu dokudaki farklı hücre tiplerinin karmaşık düzenini kontrol etme ve bu dokuları yapabilmek için gerekli kalitatif ve kantitatif hücre kaynaklarının belirlenmesi gibi ciddi engeller ile karşılaşacaktı.(19)

## **DOKU MÜHENDİSLİĞİNİN TEMELLERİ**

Doku mühendisliğinde temel yaklaşımlar üçe ayrılabilir; yerine koyma, doku indüklenme ve doku yönlendirme.(1) Yerine koyma yaklaşımları esasen tüm organın replasmanını tariflerken, doku yönlendirme bir organın eksik veya hasarlı olan kısımlarının ex vivo yapılarla değiştirilmesini içerir. Doku indükleyici yaklaşımlar ise plazmid vektörleri veya büyüme faktörleri aracılığıyla DNA iletimini sağlayarak gen terapisini sağlar ve bu sayede kendi kendine onarmayı kolaylaştırır.

Hasarlı dokuların etkili ve uzun süreli onarımını sağlamak için bir dizi kriter yerine getirilmelidir;

- 1) Defekti onarmak için yeterli sayıda hücre üretilmelidir.
- 2) Hücreler ihtiyaç duyulan çeşitlere ayrılabilirdir.
- 3) Hücreler uygun yapısal destek (iskeleler) kullanmalı ve ECM üretmelidir.
- 4) Üretilen hücreler yapısal ve mekanik olarak doğal hücreler ile uyumlu olmalıdır.
- 5) Hücreler doğal hücreler ile bütünleşebilmeli ve immünolojik olarak kabul edilmelidir.
- 6) Minimal düzeyde biyolojik riskler içermelidir.(9)

Doku mühendisliğinde kullanılan hücrelerin kaynağı otolog (hastadan), allojenik (immünolojik olarak özdeş olmayan başka bir insandan) veya ksenojenik (farklı bir tür donörden) elde edilebilir.(5) Otolog hücreler, immünolojik komplikasyon riski açısından en düşük riske sahip oldukları için bu grup içerisinde mü-

kemmel bir kaynak oluşturmaktadır. Ancak otolog kök hücreler genel kullanım ve maliyet açısından uygun değildir.(1) Bununla birlikte allojenik kök hücreler, tek düzeliğin sağlanması, prosedürün standardizasyonu, kalite kontrol ve maliyet etkinliği açısından otojenik kök hücrelere göre avantajlıdır.(1) Elde edilen bu kök hücreler, olgun hücrelere, yetişkin kök hücrelere, somatik kök hücrelere, embriyonik kök hücrelere, totipotent kök hücrelerine ve hatta zigotlara dönüşebilir.(4) Olgun hücrelerin kullanımını sınırlı proliferasyon ve farklılaşma potansiyelleri sebebiyle kısıtlıdır. Erişkin kök hücreleri belirli bölgelerde bulunur ve deri, kemik ve kan gibi dokuların bütünlüğünü korumada önemlidir.(9) Memelilerde yirminin üzerinde somatik kök hücre tariflenmiştir. Kemik iliğinde, kanda, korneada, retinada, diş pulpasında, karaciğer, deri, gastrointestinal sistemde veya pankreas gibi dokularda bulunabilirler. Embriyonik kök hücreler implante olmamış blastokistin iç hücre kütesinden elde edilirler.(20) Sınırsız farklılaşma ve kendi kendine yenilenme yeteğine sahip, farklılaşmamış ve olgunlaşmamış kök hücrelerdir.(21)

Hücre iskeleleri; hücre ekleri veya göç, biyokimyasal faktörlerin saklanması ve salınımı, yeterli miktarda besin sağlanması, atıkların arınması için gözenekli ortam veya mekanik sertlik/esneklik gibi temel amaçlardan herhangi birine hizmet edebilir. Doku mühendisliğinde kullanılan, özellikle kollajen bazlı malzemeler ve poliaktik, poliglikolik ve polikaprolakton polimer ailesi olarak kullanılan sentetik biyomateriyallerin birçoğu, halihazırda biyolojik olarak emilebilir suturler olarak modern tıpta kullanılmaktadır. Bu materyaller başlangıçta yasal onaylı olmaları sebebiyle ilgi çekici olarak gözükmekle birlikte hidrolitik biyobozunma sonrasında ortama salınabilen ve toksik etki gösteren asit sebebiyle optimal olmaktan çok uzaktırlar. Diğer sentetik malzemeler, enjekte edilebilirlik, şeffaflık ve optimum gözeneklilik ve emilim oranları gibi özelleştirilebilir özelliklerle tasarlanmıştır. Mevcut ECM malzemelerini kullanan doğal iskeleler, protein bazlı materyaller (örneğin kollajen, fibrin) ve polisakkarit bazlı materyaller (örneğin kitosan, aljinat, glikozaminoglikanlar, hyalüronik asit) dahil olmak üzere, halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Parçalanma oranlarını azaltmak için bunlar ve diğer malzemelerle çapraz bağlama ajanları (örneğin gluteraldehit, suda çözünür karbodiimid) kullanılabilir. Her ne kadar doğal maddelerle biyoyoumluluk mükemmel olsa da bazı durumlar potansiyel immunojeniklik ile ilgili sorunlar devam etmektedir. Son dönemde, atılan donör dokusunun işlenmesinden elde edilen hücreleştirilmiş doku matrislerinin kullanımına olan ilgi artmıştır. Bir doku mühendisliği iskelesinin üretilmesine yönelik bu yaklaşım, dünyada ilk kez tamamen mühendislik ile elde edilen trakeanın nakledilmesi ve kalp, karaciğer ve akciğer dokusunda hızlı ilerlemelerle sonuçlandı.(22–25)

Doku mühendisliğinde kullanılan yapılarla ilgili bir başka husus, çözünebilir

büyüme ve farklılaşma faktörleri ve mekanik faktörlerin varlığı gibi dış ortamda bulunan kimyasal ve mekanik uyaranların varlığıdır. Sıkça uygulanan kimyasal faktörler arasında kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF veya FGF-2), vasküler endotel büyüme faktörü (VEFG) ve transformasyon büyüme faktörü (TGF-B) vardır. Bunlar esas olarak çözülebilir faktörler olmasına rağmen, iskele imalatı sırasında ECM'ye dahil edilebilirler. İn vivo olarak doğal ECM'nin yapısal fonksiyonları dışındaki en temel fonksiyonlarından biri, ECM'ye bağlı hücrelere büyüme faktörlerini bağlamak, tutmak ve sunmaktadır. Biyolojik olarak çözünen ECM'lerin ömrünü uzatmak amacıyla bozunur parçacıkların enkapsülasyonu, faktörlerin ekspresyonu amacıyla transfekte edilmiş hücrelerin kullanımı ve iskele malzemesinin kendisine kimyasal konjugasyon gibi teknikler kullanılabilir. İmplantasyon tekniklerinden önce tüm bileşenlerin rastgele birbirlerine karıştırılarak yapılan çalışmalar başarısızlıklarla doludur. Bu yöntemde özellikle vasküler ağ oluşmasıyla ilgili eksiklikler ürünlerin kısa ömürlü olmasına sebep olmaktadır. 3 boyutlu yazıcıların geliştirilmesi sonrasında bazı dokular ve organlar birebir baskılanmaya başlandı. Son dönemde, termal duyarlı bir jel matrisinde hassas hücre katmanlarının yazılabilmesi için yeni bir yazıcı mekanizması tariflendi. Bu yöntemde örneğin, kan damarlarını kaplayan endotel hücreleri, bir dizi istiflenmiş halka halinde basılmıştır. Kuluçkalandığı zaman, bunlar bir iskeleye kaynayabilmiş ve bu kontrollü entegrasyon ile vasküler ağ oluşturmak mümkün olmuştur.(26,27)

## **KÖK HÜCRELERİN VE MATERYALLERİN KOMBİNASYONU**

Hücreleri ve iskeleleri kullanan doku mühendisliği yaklaşımları iki kategoriye ayrılabilir; açık ve kapalı sistemler. Bu iki sistem ekilen hücrelerin immun sisteme maruz kalıp kalmamasına göre ayırt edilir.

### **Açık Sistemler**

Bu sistemde hücreler oldukça gözenekli, üç boyutlu bir iskele içerisinde hareketleştirilir. İskele, sentetik veya doğal malzemelerden veya bunların kombinasyonlarından oluşabilir. İdeal olarak, bu iskele, hücrelere uygun bir büyüme ortamı, optimum oksijen ve besin taşıma özellikleri, mekanik bütünlük ve uygun bir bozunma hızı sağlar. İskele kullanımı üç boyutlu bir ortam sağlar ve hücreleri kendi kendine birleştirme ve doku mikro ortamı ile ilişkili çeşitli bileşenlerin oluşturulmasını sağlamak için yeterli zaman sağlayacak şekilde yakınlaştırır. Hücreler, hücre dışı matris moleküllerini biriktirdikçe malzeme bozunur. Doku mühendisliği için kullanılan malzemeler ya polilaktik asit, poliglukolik asit, polilaktik-glikolik asit (PLGA), polipropilenfumarat gibi sentetik biyobozunur malzemelerdir ya

da hidroksiapatit, kalsiyum karbonat, kollajen veya aljinat gibi doğal maddelerdir. Doğal materyaller tipik olarak hücre yapışması için daha elverişlidir fakat sentetik materyallerin bozunma hızı, mekanik özellikleri, gözenekli yapıları gibi özellikleri daha iyi kontrol edilebilir. Açık doku mühendisliği sistemleri, kemik, kırık, kan damarları, kardiyak, düz kas, pankreas, karaciğer, diş, retina ve cilt gibi dokuları ikame amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Doku mühendisliği ile elde edilen cilt ya da yara örtüsü veya kırık ürünleri en gelişmiş alanlardır. Örneğin, tip 1 kollajenden oluşan doğal bir iskelede yaşayan insan dermiş hücrelerinden oluşan bir deri ikamesi diyabetik ayak ülseri için kullanılmak üzere FDA onayı almıştır.

### **Kapalı Sistemler**

Açık doku mühendisliği sistemleriyle ilişkili ana zorluklardan biri, implante edilmiş hücrelerle ilişkili potansiyel immünolojik sorunlardır. Kapalı sistemler, konağın immünolojik bileşenleri için bir bariyer sağlayan polimerik matrisler içerisindeki hücreleri hareketsizleştirerek bu sınırlamanın üstesinden gelmeyi amaçlamaktadır. Örneğin, hücreler besin maddelerine ve oksijene geçirgen olan ve bağışıklık hücrelerine, antikorlara ve bağışıklık sisteminin diğer bileşenlerine bir bariyer sağlayabilen yarı geçirgen zarlar içerisinde hareketsizleştirilebilir. Ayrıca implantlar hastaya implante edilebilir veya ekstrakortikal cihazlar olarak kullanılabilirler. Kapalı doku mühendisliği sistemleri özellikle diyabet, karaciğer yetmezliği ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmıştır. Örneğin embriyonik kök hücresinden türetilen Beta hücreleri insüline cevap verebilir veya etki alanı üreten nöronlar, reddedilme korkusu olmadan kliniklerde kullanılabilir. Ek olarak, kapalı sistemler konağı polimerik bariyer içindeki hücreleri sınırlandırdığı için potansiyel olarak tümörojenik hücrelere karşı korur. Günümüzde, materyal biyouyumluluğu, moleküler ağırlık kesilmesi ve bağışıklık sisteminin nakledilen hücreler tarafından dökülen antijenlere reaksiyonu gibi mühendislik ve biyolojik sınırlamalar, bu sistemlerin yaygın klinik uygulamalardan korunmasını sağlayan zorluklardan bazılarıdır.

### **DOKU MÜHENDİSLİĞİ'NDE BİYOREAKTÖRLERİN VE MEKANİK UYARILARIN ROLÜ**

Liu ve ark. tarafından MSC ve CD34 hücre kombinasyonunun inflamasyon ve skarlaşma üzerine olan etkisi kontrol grubuyla birlikte çalışılmıştır. MSC ve CD34 hücreleri ekilen poli-oktane-diokso-sitrat (POC) materyali atimik erkek ratlara ekilmiş ve kontrol grubu olarak da hücre ekilimi olmayan POC grubu kullanılmıştır. Postoperatif dönemde insan spesifik globülin antikorları kullanılarak operasyon sahasında MSC ve CD34 proliferasyonu gösterilmiştir ve kontrol grubuna

göre proinflamatuvar belirteçlerde belirgin azalma saptanmıştır. Bulgular, hücre ekilimi olan biyomateryallerdeki çoğaldıkları gösterilen bu hücrelerin inflamasyon cevabını ve skarlaşmayı modifiye edebileceğini ve anjiogenezi uyarabileceğini göstermektedir.(28)

## **Güncel Gelişmeler**

Doku mühendisliği alanında kök hücre kullanımı başlıca deri, kan damarları, kırık, kalp dokusu, karaciğer, pankreas ve sinir dokusu olmak üzere birçok dokuda çalışılmaktadır.(29)

Deri kusurları için öncelikle epidermal ve dermal yapılar kullanılır.(1) Elde edilen dermal fibroblastlar in vitro olarak genişletilir ve bir biyoreaktör sisteminde kültürlenmeden önce poliaktik veya poliglikolik asit iskelesine tohumlanır.(30) Dermal tabakanın birden fazla keratinosit tabakası ile kaplanmasıyla çok katmanlı yapı üretilir. Bu greftlerin ömrü, aşılınmış kök hücre popülasyonuna bağlıdır. (29) Neovaskülarizasyonu desteklemek amacıyla ilave endotel progenitör hücreleri veya anjioblastlar kullanılabilir.(31)

Kırık dokunun vaskülarite açısından zayıf olması sebebiyle iskemiye duyarlı hücrelerden bu dokuyu daha dirençli hale getirir. Otolog hücre ürünleri bu doku grubu için etkili bir şekilde kullanılmakla birlikte, alternatif olarak hem yetişkin kök hücreler, hem de ESC'ler, hasarlı kemik, kırık ve tendonun onarımı için uygun hücrelere farklılaşma potansiyeli açısından araştırılmaktadır.(32,33)

Kardiyomyositlerin düşük proliferatif potansiyeli, kardiyak dokunun komplike yapısı ve iletkenlik özellikleri sebebiyle bu alandaki çalışmalar kısıtlı kalmıştır. İlk olarak Kehat ve ark., insan ESC'lerinden tekrarlanabilir kardiyomyosit farklılaştırma sisteminin üretilmesini tarif etmiştir.(34) Miyokard infarktını çevreleyen kardiyak duvara kemik iliği kök hücrelerinin enjeksiyonu sonrasında miyokardiyal rejenerasyon gözlenmiştir. (35)

Günümüzde son dönem karaciğer yetmezliğinin tedavisinde karaciğer transplantasyonu tek başarılı tedavi yöntemidir. Donör karaciğer oranlarındaki belirgin kısıtlılık sebebiyle doku mühendisliği başta olmak üzere alternatif kaynakların ihtiyacını göstermektedir. İnsan yetişkin hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler gibi çeşitli kök hücre türlerinin hepatositlere farklılaşabildikleri gösterilmiştir.

Diabetes mellitus, potansiyel kök hücrelerden insülin üreten hücreler üretilmesi ve diyabetik hastanın pankreasına implante edilmesiyle tedavi edilebilir.(36)

ESC'lerin beyin hastalıklarının tedavisindeki potansiyel etkileri araştırılmaktadır. Ma ve ark., üç boyutlu bir kollajen jel üzerinde kök hücrelerden türetilmiş



fonksiyonel sinaps ve nöronal ağ oluşumunu göstermiştir.(37) Mezenkimal kök hücreler, güçlü proliferatif kapasiteleri, kolay elde edilmesi ve genetik değişikliklere önemli ölçüde toleransı sebebiyle ölü nöral hücreleri değiştirmek için idealdir. (38)

Doku mühendisliği ve kök hücre çalışmaları Üroloji alanında sıklıkla çalışılmıştır. Üreteral defektlerin tamirinde, stres inkontinans tedavisinde, erektil disfonksiyon ve corpus cavernosum hastalıklarında, üretral rekonstrüksiyon ve infertilite alanlarında genişçe çalışılmıştır.

Üretral rekonstrüksiyon için kullanılan doku mühendisliği ürünlerinin ciddi problemlerinden biri bu dokunun vaskularizasyonudur. Guan ve ark. hücre temelli genetik strateji kullanarak üretral greftin vaskularitesini geliştirmeyi hedeflemiştir. İnsan VEGF'nin retrovirüs transduksiyonu ile ürotelyal hücrelere aktarıldığı çalışmada kontrol grubuna kıyasla VEGF ile modifiye edilen hücrelerde üretral duvarda ve ürotelyum formasyonunda daha iyi neovaskularizasyon oranları saptanmıştır.(39)

Üroloji alanında doku mühendisliği ve kök hücrelerle ilgili bazı önemli gelişmeler Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1: Doku mühendisliği ve üroloji alanındaki önemli gelişmeler	
1953 Moore(40)	Üriner sistem rekonstrüksiyonu amacıyla gastrointestinal sistem yerine sentetik biyomateryallerin kullanımı
1963 Becker(41)	Teorik olarak mezenkimal kök hücrelerin multipotent kök hücre kaynağı olarak tanımlanması
1970 Friedenstein(42)	Mezenkimal kök hücrelerinin rejeneratif amaçlarla laboratuvar ortamında çalışılması
1993 Atala(43)	Üriner sistem rekonstrüksiyonu amacıyla doku mühendisliği ürünlerinin hayvan modellerinde çalışılması
1993 Atala(43)	Ürolojik biyomateryaller üzerine doğal mesaneden izole edilen düz kas ve ürotelyum hücrelerinin ekilimi ve "hücre ekilim" yaklaşımlarının tanımlanması
2004 Zhang(44) 2006 Drewa(45) 2006 Atala	Hücre ekimli biyomateryallerin fareler, köpekler, domuzlar ve insanlar ile çalışılması
2011 Davis(46)	Asellüler çözülebilir biyomateryallerin üriner sistem içerisine implantasyonu
2012 Sullivan	Çözülebilir polimer ve ksenotik ekstrasellüler matriks, otolog hücre hatlarının ve destek büyüme faktörlerinin 3D formatında oluşturulması
2016 Moon (47)	3D teknolojisi ve biyoyazılımlarla iskelelerin hazırlanması

## **Etik ve Teknik Konular**

Kök hücre araştırmalarında üç ana araştırma programı vardır. 1) Erişkin kök hücreleri üzerine araştırma. 2) İn vitro fertilizasyon yoluyla üretilen atılan embriyolardan ESC'lerin araştırılması. 3) Terapötik klonlama yoluyla elde edilen ESC'ler üzerinde yapılan araştırmalar.

İnsan yetişkin kök hücreleri ile ilgili çok kısıtlı etik tartışmalar sürmektedir. Diğer taraftan, insan ESC'leri büyük etik problemlerle karşı karşıyadır. Mezenkimal, hematopoetik, nöral, kas ve hepatik kök hücreler gibi birçok otolog yetişkin kök hücre bağışıklıkla uyumlu ve ESC'lerin aksine etik kaygılarla ilişkili değildirler. Bu sebeple bu yetişkin kök hücreler sıklıkla çalışılmaktadır.

Yetişkin kök hücrelerin aksine, ESC'ler doku kültüründe süresiz olarak yetiştirilebilir. (21) Genetik uyumsuzluk nedeniyle bağışıklık reddi riski artar ve bu da ömür boyu yüksek dozda immunosüpresan tedavi gerektirir. Etik ve dini kaygılara ek olarak bu immünolojik problem ESC'ler ile ilgili en büyük problemi oluşturmaktadır. Bu sorun, araştırmacıları, hücre yüzeyinde histouyumlu proteinler yaparak evrensel bir donör hücrenin oluşturulmasını araştırmaya ve böylece hücrelerin antijenitesini azaltmaya yönlendirdi. Bu gelişme nükleer transfer teknolojisinin ya da "terapötik klonlamanın" kalbidir. Ancak, teknolojinin kendine özgü eksiklikleri vardır. Düşük verimlilik oranına sahiptir ve bu da çok sayıda oosit gerektirir. (48) Farklılaşmayı kontrol edememesi, ESC büyümesi, farklılaşması ve mühendislik dokularındaki uygulamalarının daha iyi anlaşılmasını gerektirir. Ayrıca in vitro kültür sistemlerinde terapötik klonlama protokolleri, bu teknolojinin hücre terapisi için kullanımını düşünmeden önce optimize edilmelidir. (48)

Dünya çapında ESC'lerin kullanımı ile ilgili yasalar daha ılımlı yasaların bulunduğu Birleşik Krallık ve daha kısıtlayıcı yasaların bulunduğu Amerika Birleşik Devletleri ve ESC kullanımını tamamen yasaklayan Almanya, Avusturya, İrlanda ve Fransa gibi ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir.

## **Sınırlamalar**

Doku mühendisliği ve kök hücre kullanımıyla ilgili en büyük kısıtlamalar dokuların oksijenizasyonunu ve beslenmesini sağlamak ve implante edilmiş yapıardan metabolik artıkları temizlemek için gerekli kılcal damar ağını tasarlamaktır. (1,3,29) Vasküler gelişime izin vermek için minimum çapı 10 um olan tübüler bir sistem oluşturulması, özellikle 2 ila 3 metreküpten daha büyük bir hacme sahip çok katmanlı katı organ yapıları için önemlidir. (1,3) Alternatif olarak bu dokular omentum gibi iyi vaskülerize yapılara implante edilebilir.

İkibinli yılların başında doku mühendisliği şirketleri de dahil olmak üzere, umduklarını bulamayan yatırımcılar sektörde düşüşe yol açan yüksek riskli girişimleri finanse etmeyi bıraktılar.(49) 2004 yılında yapılan bir araştırma, cilt, kırık ve diğer yapısal uygulamalardaki aktivitenin %50'den fazla azaldığını ve yaklaşık 800 tam zamanlı çalışanın işini kaybettiğini ortaya koydu.(50) Kök hücre firmalarındaki artışla birlikte bu çalışanların bir kısmı işe geri dönmüş ve bu sayede geçici bir diriliş sağlanmış olsa da, 2008 yılından itibaren yeni başlangıçlı işlerin finanse edilmesi çok sınırlı kalmıştır. Mesane, kornea ve bronş tüpleri gibi bazı alanlarda önemli gelişmeler yaşanmasına rağmen, yıllarca süren araştırmalara rağmen, kan damarları, kalp ve karaciğer gibi dokular klinik olarak kabul edilebilir çözümler sunmaktan uzaktır. Doku mühendisliğinin son 30 yıllık macerası sırasında geliştirilen moleküler ve hücre biyoloji, mikro ve nanosistem mühendislikleri alanlarında gelişmeler büyük ölçüde temel sorunu çözme eğiliminde olan ve her zaman klinik sorunları hedeflemeyen bilim insanları ve mühendisler tarafından geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu teknolojilerden bazıları, 2002 yılından itibaren yılda yaklaşık %25 oranında büyüyen ve 3 milyar doların üzerinde bir pazar oluşturan moleküler teşhislerin gelişmesine yol açmıştır.(51,52) Sonuç olarak doku mühendisleri, enerjilerini gerçek bir etkiye sahip ve klinik problemleri çözmeye odaklı projeler için harcamalıdır.

### ***Doku Mühendisliği ve Kök Hücre Tedavilerinin Geleceği***

Optimal hücre kaynağı, optimal iskenenin tasarımı ve in vitro biyoreaktörler, mikrofabrikasyon teknolojisinin kullanımı ve geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Uygun bir multipotent veya pluripotent kök hücrenin araştırılması ve kullanılması, ortaya çıkan bir kavramdır. Kök hücre araştırmalarının birçok alanı ve bunların potansiyel klinik uygulamaları tartışmalarla ilişkilidir. Bu sebeple etik, yasal ve sosyal konuları detaylıca irdelemek ve tartışmak gereklidir. Bu alandaki birçok teknik soru halen cevaplanmamıştır ve bu amaçla cerrahlar, mühendisler, kimyagerler ve biyologların yakın disiplinler arası iş birliği gerekmektedir.

### **KAYNAKLAR**

1. Knight MAF, Evans GRD. Tissue engineering: Progress and challenges. Vol. 114, Plastic and Reconstructive Surgery. 2004.
2. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction. In: Annals of Thoracic Surgery. 2001. p. 577-91.
3. Shieh SJ, Vacanti JP. State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building. Surgery. 2005;137(1):1-7.
4. Stock UA, Vacanti JP. Tissue Engineering: Current State and Prospects. Annu Rev Med. 2001;52(1):443-51.
5. Naughton GK. From lab bench to market: Critical issues in tissue engineering. In: Annals of the

- New York Academy of Sciences. 2002. p. 372–85.
6. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical applications. Vol. 28, *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*. 2003. p. 165–72.
  7. Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM. Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(11):1427–37.
  8. Koh CJ, Atala A, Trounson A. Therapeutic cloning and tissue engineering\nNuclear transfer in human medicine and animal breeding. *Curr Top Dev Biol*. 2004;60(1):1–15.
  9. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LDK. Stem cells: Sources and applications. Vol. 27, *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*. 2002. p. 227–32.
  10. Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: Concepts for clinical application. Vol. 7, *Rejuvenation Research*. 2004. p. 15–31.
  11. Bisceglie V. Über die antineoplastische Immunität - I. Mitteilung. Heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühnerembryonen. *Z Krebsforsch*. 1934;40(1):122–40.
  12. Chick W, Like A, Lauris V. Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science* (80- ). 1975;187(4179):847–9.
  13. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. Grafting of Burns With Cultured Epithelium Prepared From Autologous Epidermal Cells. *Lancet*. 1981;317(8211):75–8.
  14. Rheinwatd JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinized colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331–43.
  15. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(11):5665–8.
  16. Burke JF, Yannas O V, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 1981;194(4):413–27.
  17. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* (80- ). 1981;211(4486):1052–4.
  18. Langer R, Vacanti JP. Artificial organs. *Sci Am*. 1995;273(3):130–3.
  19. Khademhosseini A, Vacanti JP, Langer R. Progress in tissue. *Sci Am*. 2009;300(5):64–71.
  20. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80- ). 1998;282(5391):1145–7.
  21. McKay R. Stem cells - Hype and hope. Vol. 406, *Nature*. 2000. p. 361–4.
  22. Bader A, Macchiarini P. Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach. *J Cell Mol Med*. 2010;14(7):1877–89.
  23. Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: The matrix reloaded. *Tissue Eng - Part A*. 2010;16(8):2581–91.
  24. Fang NT, Xie SZ, Wang SM, Gao HY, Wu CG, Pan LF. Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(8):696–702.
  25. Hilbert SL, Yanagida R, Souza J, Wolfinbarger L, Jones AL, Krueger P, et al. Prototype anionic detergent technique used to decellularize allograft valve conduits evaluated in the right ventricular outflow tract in sheep. In: *Journal of Heart Valve Disease*. 2004. p. 831–40.
  26. Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272(2):497–502.
  27. Wilson WC, Boland T. Cell and organ printing 1: Protein and cell printers. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272(2):491–6.
  28. Liu JS, Bury MI, Fuller NJ, Sturm RM, Ahmad N, Sharma AK. Bone Marrow Stem/Progenitor Cells Attenuate the Inflammatory Milieu Following Substitution Urethroplasty. *Sci Rep*. 2016

- Oct;6:35638.
29. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. Vol. 414, Nature. 2001. p. 118–21.
  30. Kern A, Liu K, Mansbridge J. Modification of fibroblast  $\gamma$ -interferon responses by extracellular matrix. *J Invest Dermatol.* 2001;117(1):112–8.
  31. Hughes GC, Annex BH. Angiogenic therapy for coronary artery and peripheral arterial disease. Vol. 3, *Expert Review of Cardiovascular Therapy.* 2005. p. 521–35.
  32. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplant.* 2004;13(5):595–600.
  33. Cohen I, Robinson D, Melamed E, Nevo Z. Use of a novel joint-simulating culture system to grow organized ex-vivo three-dimensional cartilage-like constructs from embryonic epiphyseal cells. *Iowa Orthop J.* 2005;25:102–7.
  34. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001;108(3):407–14.
  35. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410(6829):701–5.
  36. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes.* 2004;53(7):1721–32.
  37. Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, O’Shaughnessy TJ, Maric D, Lin HJ, et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Exp Neurol.* 2004;190(2):276–88.
  38. Risbud M V, Shapiro IM, Vaccaro AR, Albert TJ. Stem cell regeneration of the nucleus pulposus. *Spine J.* 2004;4(6 SUPPL.):S348–53.
  39. Guan Y, Ou L, Hu G, Wang H, Xu Y, Chen J, et al. Tissue engineering of urethra using human vascular endothelial growth factor gene-modified bladder urothelial cells. *Artif Organs.* 2008 Feb;32(2):91–9.
  40. Moore T. an Artificial Bladder. *Lancet.* 1953 Jun;261(6772):1176–8.
  41. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963 Feb;197(4866):452–4.
  42. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS, Maureen Owen. *Cell Tissue Kinet* [Internet]. 1970 Oct;3(4):393–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063>
  43. Atala A, Freeman MR, Vacanti JP, Shepard J, Retik AB. Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. *J Urol.* 1993 Aug;150(2 SUPPL.):608–12.
  44. Zhang Y, Kropp BP, Lin HK, Cowan R, Cheng EY. Bladder Regeneration with Cell-Seeded Small Intestinal Submucosa. *Tissue Eng.* 2004;10(1–2):181–7.
  45. Drewa T, Sir J, Czajkowski R, Wozniak A. Scaffold seeded with cells is essential in urothelium regeneration and tissue remodeling in vivo after bladder augmentation using in vitro engineered graft. *Transplant Proc.* 2006;38(1):133–5.
  46. Davis NF, Mooney R, Callanan A, Flood HD, McGloughlin TM. Augmentation cystoplasty and extracellular matrix scaffolds: An ex vivo comparative study with autogenous detubularised ileum. *PLoS One.* 2011;6(5):e20323.
  47. Moon KH, Ko IK, Yoo JJ, Atala A. Kidney diseases and tissue engineering. *Methods.* 2016 Apr;99:112–9.
  48. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, et al. Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst. *Science (80- ).* 2004;303(5664):1669–74.
  49. Mansbridge JN. Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine. Vol. 20, *Current Opinion in Biotechnology.* 2009. p. 563–7.

## *Güncel Üroloji Çalışmaları II*

50. Lysaght MJ, Hazlehurst AL. Tissue Engineering: The End of the Beginning. *Tissue Eng.* 2004;10(1-2):309-20.
51. Ross JS, Ginsburg GS. The integration of molecular diagnostics with therapeutics: Implications for drug development and pathology practice. Vol. 119, *American Journal of Clinical Pathology.* 2003. p. 26-36.
52. Ross JS, Ginsburg GS. Integrating diagnostics and therapeutics: Revolutionizing drug discovery and patient care. Vol. 7, *Drug Discovery Today.* 2002. p. 859-64.