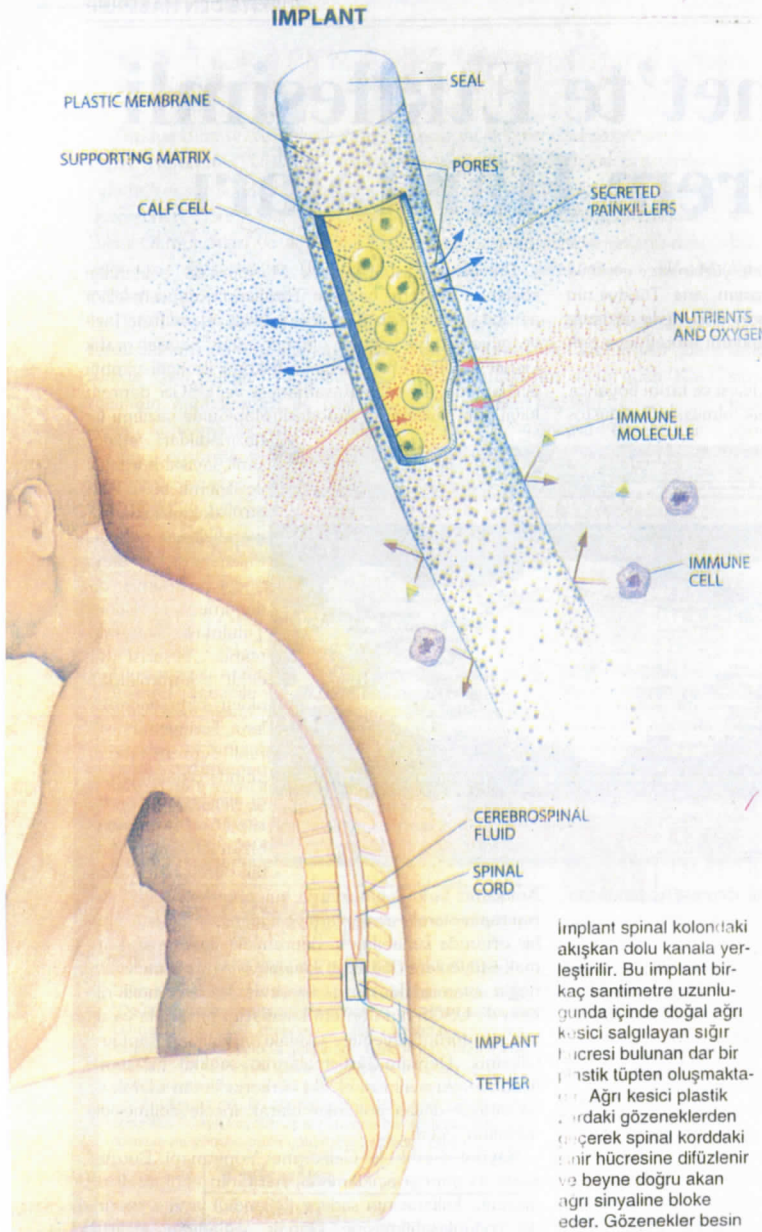




Doç.Dr.Adil Denizli
Hacettepe Üni.Kimya Böl.
Biyokimya ABD

Ahmet Gürzumar
Hacettepe Üni.
Biyomühendislik ABD

İmplant spinal kordtaki akışkan dolu kanala yerleştirilir. Bu implant birkaç santimetre uzunluğunda içinde doğal ağrı kesici salgılayan sığır hücreleri bulunan dar bir plastik tüpten oluşmaktadır. Ağrı kesici plastik tüpteki gözeneklerden geçerek spinal korddaki sığır hücrelerine difüze olur ve beyne doğru akan ağrı sinyaliyle bloke eder. Gözenekler besin maddeleri ve oksijenin implantı girmesine izin verir.

Sağlıklı hücreleri, bağışıklık sistemi tepkilerinden koruma amacı ile plastik membran (zar) içine almak, çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni bir yaklaşımdır.

Sürekli ve şiddetli ağrıları olan bir hasta, 1994 yılında, yeni bir tedavi yönteminin üzerinde uygulanması için gönüllü olmuştur. Hastanın ağrılarını içinde ağrı kesici maddeler salgılayan sığır hücrelerinin bulunduğu 5 santimetre uzunluğunda, tel inceliğinde kapalı bir tüpün cerrahi müdahale ile hastanın omurgasına yerleştirilerek giderilmeye çalışıldı. Çalışmadaki hedef hücrelerinin mikro gözenekli kapsül içine alınarak hem omurilik sıvısında bulunan oksijen ve gerekli besin maddelerinden faydalanabilmesi, hem de diğer büyük molekül ve hücreyi yabancı cisim olarak algılayabilecek antikorlar gibi bağışıklık sisteminin etkisinden korumak idi. Hücrelerin analjezik maddeleri salgılaması ile ağrı sinyallerinin beynine ulaşması da engellenecekti.

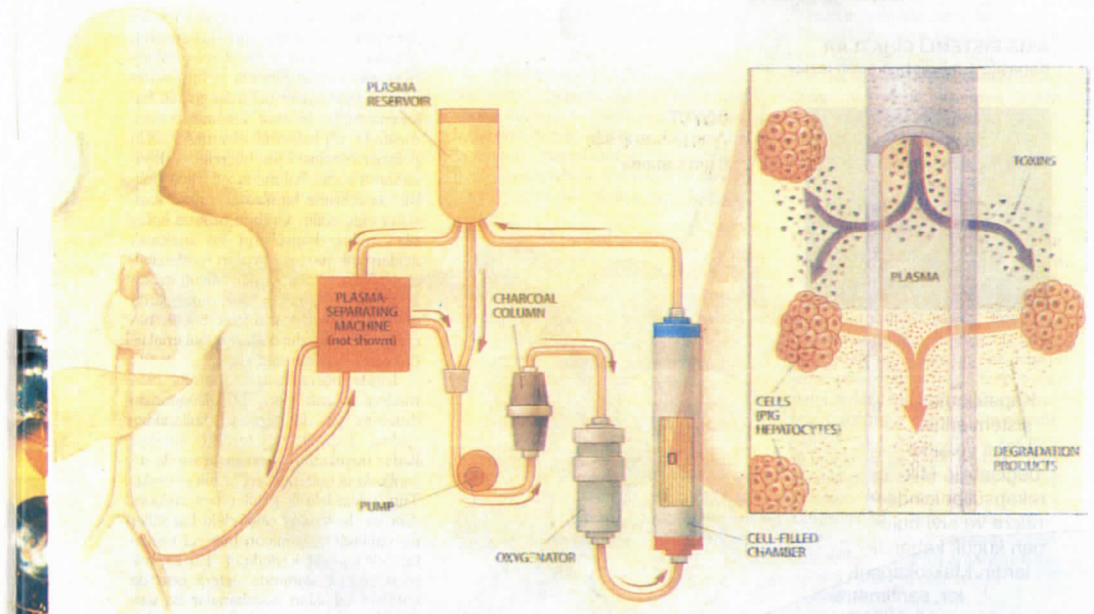
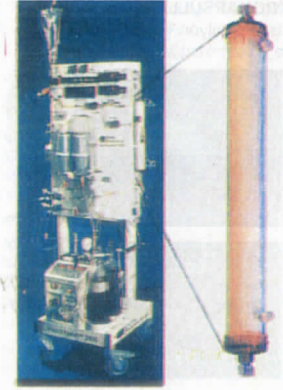
Bu öncü çalışmanın sonuçlarının başarılı olması bilim çevrelerinde ve kamuoyunda hedeflenenenden çok daha büyük ve yitimsiz bir etki yarattı. Bu itici gücün etkisiyle hücrelerin, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere, koruyucu membran içine alınmasını kapsayan ayrıntılı hayvan deneyleri başlatıldı ve geçen beş yıl yöntemin başarısını kanıtladı. Bu da hemofili, anemi, büyüme geriliği (cücelik) ve Parkinson gibi hastalıklar için çalışmaların başlamasını sağladı. Pankreasın kandaki glikoz derişimini düzenleyen insülin hormonunun salgılanmasını durdurması ile ortaya çıkan şeker hastalığının da pankreas islet hücrelerinin nakli ile kalıcı ve etkili olarak tedavi edilebileceği fikri de değerlendirilmeye alındı.

Tedavi çoğunlukla kapsül içine alınan sağlam hücrelerin vücudun ilgili bölgesine yerleştirilmesi şeklinde baslatılrsa da karaciğer islevlerinin düzeltilmesi için di-

Hücrelerle Tedavi

ÜMIT VEREN KARACİĞER-DESTEK SİSTEMİ

Kapsülleme sistemlerinin tamamının vücut içine yerleştirilmesi gerekmez. Karaciğer destek sistemleri vücut dışında da çalışabilir. Bu amaçla geliştirilen cihaz yanda ve aşağıda gösterilmiştir. Bu sistemde kan hastadan alınır, plazma bazı toksinlerin uzaklaştırılması için odun kömürü klonuna gönderilir. Daha sonra oksijenatör aracılığıyla plazma oksijenlendirilir. Daha sonra plazma domuz karaciğer hücreleri ile çevrelenmiş (hepatositler) gözenekli tüplere gönderilir. Toksinler plazmadan hücrelere difüze olur. Hücreler bu zehirleri zararsız ürünlere dönüştürür. Temizlenmiş plazma kolonu terkeder, kan hücreleri ile birleştirilerek tekrar hastaya verilir.



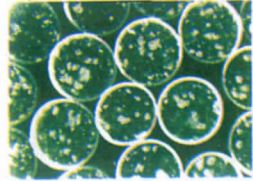
yalız makinasına benzer bir cihaza ihtiyaç duyulmaktadır. Yukarıda da bahsedildiği gibi yöntemin dayandığı nokta, vücutta tedavi için yerleştirilen hücreleri bağışıklık sisteminin plastik memb-

ranların yardımı ile korumaktır. Hücre nakli ancak kişinin ya da tek yumurta ikizinin hücreleri kullandığı durumlarda bağışıklık sistemi açısından sorunsuz bir şekilde gerçekleşebilir.

Aksi durumlarda ki çoğu zaman verici olarak sağlıklı kişiler tercih edilir, hücrelerin bağışıklık sisteminin korunması şarttır. Bağışıklık sisteminin baskılayan ilaçların kullanımı da bir seçenektir.

MİKROKAPSÜLLER

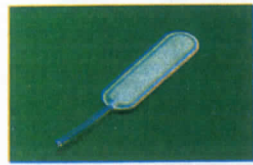
Kapasite 1.000-5.000 hücre
boyut 500 µm çapında



BOYUT
500 µm çapında.

MAKROKAPSÜLLER

Kapasite 1 milyon - 100 milyon hücre



BOYUT
5 cm x 1 cm x 500 µm



BOYUT
5-7 cm x 800 µm

AKIŞ-SİSTEMLİ CİHAZLAR

Kapasite 1 milyar hücreden fazla



BOYUT
7 cm'lik hazne tüp:
6 µm çapında

Kapsülleme sistemlerinin boyut ve şekli değişebilir. Mikrokapsüller içinde hücre ve sıvı bulunan küçük kabarcıklardır. Makrokapsüller, santimetre uzunluğunda olup hücre ve destek matriksinin önceden yüklendiği sistemlerdir.

Ancak böbrek yetmezliği, enfeksiyon ve hatta kansere varan yan etkileri sebebiyle fazla kullanılamamaktadır. Ayrıca bu ilaçlar hayvan hücrelerinin kullanılmasına olanak tanımamaktadır. Hayvan hücrelerinin kullanılabilmesi ile hücre kaynağı sorunu büyük ölçüde aşılabileceğinden membran-kapsüllerin önemi iyice artmıştır. Bu cihazların bir diğer yararlı özelliği de kan-beyin engeli aşmak için kullanılabilirlerdir.

Günümüzde çok çeşitli kapsül biçimleri olsa da hepsinin temel bileşenleri aynıdır, hücreler, taşıyıcı matriks ve gözenekli membran. Önemli olan nokta ise hücrelerin yaşamaları sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmeleri için kan damarlarına en fazla 500 mikrometre mesafede olmaları gerekliliğidir. Vasküler tüpler (damar tüpleri) ilk olarak denenmiş olanlardır. Sıçanlarda diabet tedavisinde denenmiş sistem kanın dolaşım sisteminden alınıp vücut dışında damar şeklindeki tüplerden geçilmesi esasına dayanıyordu. Tübin gözenekli duvarının içinde bulunan hücreler gerekli oksijeni ve besin maddelerini alırken, salgılarını da kan içine yapabiliyorlardı. Ancak sistemi implant olarak yerleştirmenin cerrahi operasyona ihtiyaç duyması ve bunun yanı sıra iç kanama tehlikesi yaratması vücut dışı uygulamaların cazibesini arttırmıştır.

1970'lerin sonlarına doğru, vasküler sistemlerin dezavantajları düşünülerek geliştirilen mikro kapsülleme tekniği 500 mikrometre çapında, polimerlerde kaplı, içinde hücre bulunan çözelti baloncuklarının üretimi esasına dayanmaktadır. Bir baloncuk elektriksel yükü polimer çözeltisi içine hücreler yerleştirdikten sonra baloncuk zıt yüklü polimer çözeltisine bırakılarak mikro kapsüller elde edilir. Üretimi hızlı ve kolay olan mikro kapsüllerin ise mekanik açıdan çok hassas olmaları (patlayabilmeleri), istenildiği zaman vücuttan kolayca çıkarılmamaları, bazı durumlarda etkili olabilmeleri için çok büyük hacimlere ihtiyaç duymaları uygulamalarda sorunlar çıkarmaktadır.

İçinde hücre taşıyıcı matriks olan madeni bozuk para büyüklüğündeki disklerin ya da tüplerin kullanıldığı makro kapsülleme tekniği simdiye kadar uygulanan teknikler arasında insanlarda uygulaması en pratik olanıdır. Tüp şeklindeki kapsüller bes milyon, disk ya da tabaka şeklindeki kapsüller ise yaklaşık yüz milyon hücreyi taşıyabilecek kapasitelere sahiptirler. Bu kapasiteler çoğu kullanımda yeterli olsa da yetersiz kaldıkları uygulamalar da vardır. Kapsül boyutunu belli bir orandan fazla büyütme ise kanıma ve tasıma engelleyecek şekilde fibrosis'e sebep olur. Sant. mikro ve makro kapsül üretiminde membranın gözenek aralığı, molekül ağırlığı, 50 bine kadar olan moleküllerin geçişine izin verecek şek-

Hedef Hastalık	Genetik Ürün	Kullanımı
Amyotrofik Lateral sklerosis (ALS)	Nörotropik faktör nöronları (sinir hücreleri) ölümünden koruyan protein	Spindeki sıvı dolu kanala yerleştiriliyor. Fazı geçti, insan üzerinde denemeler devam ediyor.
Huntington hastalığı	Nörotropik faktör	Beyin boşluğuna yerleştiriliyor. İnsan denemeleri devam ediyor.
Parkinson	Nörotropik faktör, dopamin salgılayan nöronları koruyan protein	Beyine yerleştirilecek, (hayvan deneyleri devam ediyor).
Anemi (kansızlık)	Eritropoietin, kırmızı kan hücrelerinin üretimini başlatan protein	Deri altına yerleştirilecek (insan olmayan deneklerde denemeler devam ediyor).
Hemofili	Faktör VII ya da faktör IX, kan pıhtılaşmasında önemli proteinler	Deri altı implantlar, köpeklerde çalışmalar devam ediyor.
Cücelik	İnsan büyüme hormonu, büyümeyi sağlayan protein	Domuzlarda deri altı implant çalışmaları devam ediyor.
Tip II diabet	Glucagonlike peptid-1, insülin salınımı başlatan protein	Deri altı implant çalışmaları devam ediyor.

kilde ayarlanır. Bu şekilde hem bağırsık sistemi hücrelerinin kapsülü içine geçişi engellenir, hem de besin maddelerinin içeriye doğru akışı sağlanır.

1980'lerin sonlarına kadar biyohibrid cihazlarda direkt olarak dokulardan alınan hücreler kullanılmaktaydı, ancak büyük hayvanlarda ve insanlarda bu hücrelerin kullanımı, hücre kaynaklarının güvenilirliği açısından sakıncalar içerdiğinden 1990'larda hücre line'ları kullanılmaya başlanmıştır. Sıçan adrenai tümöründen izole edilen PC-12 Line'ının dopamin salgılama özelliği, Parkinson hastalığının tedavisinde, bağırsık sistemi tepkisi sebebi ile kullanılsa da ilerisi için umut vaat edilmektedir. Bölünme yeteneklerinin sonsuz

olması bu hücrelerin en büyük farkı ve artısıdır. Sonsuz bölünme özelliği hakkında akla ilk gelen olumsuzluk olan taşıyıcı kapsülün parçalanması ile tümör oluşumu, özellikle farklı türler arasında düşük bir olasılıktır. Biyohibrid cihazlarda genetik olarak modifiye edilmiş hücreler de kullanılabilir.

Tarafımızca yürütülen çalışmalarda ise mikrokapsüllere alternatif olarak biyolojik olarak modifiye edilmiş polimerik mikrokürelerin üzerine karaciğer hücreleri "hepatositler" tutturularak; yapay karaciğer destek sistemi olarak kullanılması planlanmıştır. Bu amaçla polimerik mikrokürelerin yüzeylerine hücre yapışmasını arttırmak amacıyla hücre yapıştırma özelliği olan kollajen

ve fibronektin proteinleri kimyasal olarak bağlanmıştır ve sonraki basamakta sıçan karaciğerinden elde edilen hepatositlerin yapışması sağlanmıştır. Yapılan in-vitro karaciğer fonksiyon testlerinde de bu sistemin üre ve protein sentezi gibi metabolik aktivitelerinin iyi olduğu görülmüştür.

İnsanlar üzerinde yürütülen çalışmalar her ne kadar uzun bir geçmişe sahip olmasa da araştırmalara yön verebilecek sonuçlara ulaşmaya başlanmıştır. Amyotrofik lateral sklerosis (ALS), şeker hastalığı ve karaciğer yetmezliği olan hastalar üzerinde yapılan araştırmalarda kullanılan hücrelerin kapsül içinde sağlıklı bir şekilde yaşadığı görüldü, ancak beklenen iyileşmenin gerçekleşmemesi, kullanılan hücreler üzerinde daha ayrıntılı çalışmalar yapılmasını gerektirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca genetik iyileştirmelerin gerekliliği ve önemi de ortaya çıkmıştır. Çizelge 1'de bazı hastalıkların tedavisi amacıyla genetik değişime uğratılmış ve kapsül içine yerleştirilmiş hücrelerin insan dahil farklı canlılar üzerindeki deneme çalışmaları devam etmektedir. Kapsül içine yerleştirilmiş hücreler tedavi edici proteini istenilen (yerleştirildiği) bölgede salarak spesifik tedaviyi sağlamaktadır. Genetik alandaki bilgi birikiminin artması hücre taşıyan bu sistemlerin değişik hastalıkların tedavisi amacıyla kullanımında başarıyı getirecektir.

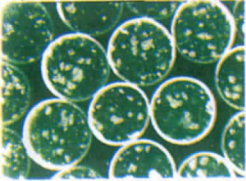
Kaynakça

1. Lysaght, M.J., Aebischer, P., Scientific American, s.76-82 Nisan 1999.
2. Dixit, V., Piskin, E., Arthur, M., Denizli, A., Tuncel, A., Denkbaş, E., Gitnick, G., Cell Transplantation, 1 (1992) 391.
3. Denizli, A., Piskin, E., Dixit, V., Arthur, M., Gitnick, G., int. J. Artificial Organs, 18 (1995) 90.

Polimerik mikrokürelere tutunan hepatosit hücreleri.

MİKROKAPSÜLLER

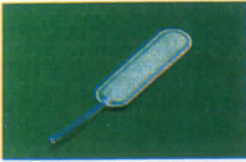
Kapasite 1.000-5.000 hücre
boyut 500 µm çapında



BOYUT
500 µm çapında.

MAKROKAPSÜLLER

Kapasite 1 milyon - 100 milyon hücre



BOYUT
5 cm x 1 cm x 500 µm



BOYUT
5-7 cm x 800 µm

AKIŞ-SİSTEMLİ CİHAZLAR.

Kapasite 1 milyar hücreden fazla



BOYUT
7 cm'lik hazne tüp:
6 µm çapında

Kapsülleme sistemlerinin boyut ve şekli değişebilir. Mikro-kapsüller içinde hücre ve sıvı bulunan küçük kabarcıklardır. Makrokapsüller, santimetre uzunluğunda olup hücre ve destek matrisinin önceden yüklendiği sistemlerdir.

Ancak böbrek yetmezliği, enfeksiyon ve hatta kansere varan yan etkileri sebebiyle fazla kullanılamamaktadır. Ayrıca bu ilaçlar hayvan hücrelerinin kullanılmasına olanak tanımamaktadır. Hayvan hücrelerinin kullanılabilmesi ile hücre kaynağı sorunu büyük ölçüde aşılabileceğinden membran-kapsüllerin önemi iyice artmıştır. Bu cihazların bir diğer yararlı özelliği de kan-beyin engeli aşmak için kullanılabilmeleridir.

Günümüzde çok çeşitli kapsül biçimleri olsa da hepsinin temel bileşenleri aynıdır, hücreler, taşıyıcı matris ve gözenekli membran. Önemli olan nokta ise hücrelerin yaşamaları sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmeleri için kan damarlarına en fazla 500 mikrometre mesafede olmaları gerekliliğidir. Vasküler tüpler (damar tüpleri) ilk olarak denenmiş olanlardır. Sıçanlarda diabet tedavisinde denenmiş sistem kanın dolaşım sisteminden alınıp vücut dışında damar şeklindeki tüplerden geçirilmesi esasına dayanıyordu. Tübin gözenekli duvarının içinde bulunan hücreler gerekli oksijeni ve besin maddelerini alırken, salgılarını da kan içine yapabiliyorlardı. Ancak sistemi implant olarak yerleştirmenin cerrahi operasyona ihtiyaç duyması ve bunun yanı sıra iç kanama tehlikesi yaratması vücut dışı uygulamaların cazibesini arttırmıştır.

1970'lerin sonlarına doğru, vasküler sistemlerin dezavantajları düşünülerek geliştirilen mikro kapsülleme tekniği 500 mikrometre çapında, polimerlerde kaplı, içinde hücre bulunan çözelti baloncuklarının üretimi esasına dayanmaktadır. Bir baloncuk elektriksel yükü polimer çözeltisi içine hücreler yerleştirdikten sonra baloncuk zıt yüklü polimer çözeltisine bırakılarak mikro kapsüller elde edilir. Üretimi hızlı ve kolay olan mikro kapsüllerin ise mekanik açıdan çok hassas olmaları (patlayabilmeleri), istenildiği zaman vücuttan kolayca çıkarılmamaları, bazı durumlarda etkili olabilmeleri için çok büyük hacimlere ihtiyaç duymaları uygulamalarda sorunlar çıkarmaktadır.

İçinde hücre taşıyıcı matris olan madeni bozuk para büyüklüğündeki disklerin ya da tüplerin kullanıldığı makro kapsülleme tekniği simdiye kadar uygulanan teknikler arasında insanlarda uygulaması en pratik olanıdır. Tüp şeklindeki kapsüller bes milyon, disk ya da tabaka şeklindeki kapsüller ise yaklaşık yüz milyon hücreyi taşıyabilecek kapasitelere sahiptir. Bu kapasiteler çoğu kullanımda yeterli olsa da yetersiz kaldıkları uygulamalar da vardır. Kapsül boyutunu belli bir orandan fazla büyütme ise kanıma ve tasımmı engelleyecek şekilde fibrosis'e sebep olur. Sant. mikro ve makro kapsül üretiminde membranın gözenek aralığı, molekül ağırlığı, 50 bine kadar olan moleküllerin geçişine izin verecek şe-

Hedef Hastalık	Genetik Ürün	Kullanımı
Amyotrofik Lateral sklerosis (ALS)	Nörotropik faktör nöronları (sinir hücreleri) ölümünden koruyan protein	Spindeki sıvı dolu kanala yerleştiriliyor. Fazı geçti, insan üzerinde denemeler devam ediyor.
Huntington hastalığı	Nörotropik faktör	Beyin boşluğuna yerleştiriliyor. İnsan denemeleri devam ediyor.
Parkinson	Nörotropik faktör, dopamin salgılayan nöronları koruyan protein	Beyine yerleştirilecek. (hayvan deneyleri devam ediyor).
Anemi (kansızlık)	Eritropoietin, kırmızı kan hücrelerinin üretimini başlatan protein	Deri altına yerleştirilecek (insan olmayan deneklerde denemeler devam ediyor).
Hemofili	Faktör VII ya da faktör IX, kan pıhtılaşmasında önemli proteinler	Deri altı implantlar, köpeklerde çalışmalar devam ediyor.
Cücelik	İnsan büyüme hormonu, büyümeyi sağlayan protein	Domuzlarda deri altı implant çalışmaları devam ediyor.
Tip II diabet	Glucagonlike peptid-1, insülin salınımı başlatan protein	Deri altı implant çalışmaları devam ediyor.

kilde ayarlanır. Bu şekilde hem bağırsık sistemi hücrelerinin kapsül içine geçişi engellenir, hem de besin maddelerinin içeriye doğru akışı sağlanır.

1980'lerin sonlarına kadar biyohibrid cihazlarda direkt olarak dokulardan alınan hücreler kullanılmaktaydı, ancak büyük hayvanlarda ve insanlarda bu hücrelerin kullanımı, hücre kaynaklarının güvenilirliği açısından sakıncalar içerdiğinden 1990'larda hücre line'ları kullanılmaya başlanmıştır. Sıçan adrenal tümöründen izole edilen PC-12 Line'nin dopamin salgılama özelliği, Parkinson hastalığının tedavisinde, bağırsık sistemi tepkisi sebebi ile kullanılsa da ilerisi için umut vaat edilmektedir. Bölümüne yeteneklerinin sonsuz

olması bu hücrelerin en büyük farkı ve artısıdır. Sonsuz bölünme özelliği hakkında akla ilk gelen olumsuzluk olan taşıyıcı kapsülün parçalanması ile tümör oluşumu, özellikle farklı türler arasında düşük bir olasılıktır. Biyohibrid cihazlarda genetik olarak modifiye edilmiş hücreler de kullanılabilir.

Tarafımızca yürütülen çalışmalarda ise mikrokapsüllere alternatif olarak biyolojik olarak modifiye edilmiş polimerik mikrokürelerin üzerine karaciğer hücreleri "hepatositler" tutturularak; yapay karaciğer destek sistemi olarak kullanılması planlanmıştır. Bu amaçla polimerik mikrokürelerin yüzeylerine hücre yapışmasını arttırmak amacıyla hücre yapıştırma özelliği olan kollajen

ve fibronektin proteinleri kimyasal olarak bağlanmış ve sonraki basamakta sıçan karaciğerinden elde edilen hepatositlerin yapışması sağlanmıştır. Yapılan in-vitro karaciğer fonksiyon testlerinde de bu sistemin üre ve protein sentezi gibi metabolik aktivitelerinin iyi olduğu görülmüştür.

İnsanlar üzerinde yürütülen çalışmalar her ne kadar uzun bir geçmişe sahip olmasa da araştırmalara yön verebilecek sonuçlara ulaşmaya başlanmıştır. Amyotrofik lateral sklerosis (ALS), şeker hastalığı ve karaciğer yetmezliği olan hastalar üzerinde yapılan araştırmalarda kullanılan hücrelerin kapsül içinde sağlıklı bir şekilde yaşadığı görüldü, ancak beklenen iyileşmenin gerçekleşmemesi, kullanılan hücreler üzerinde daha ayrıntılı çalışmalar yapılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Ayrıca genetik iyileştirmelerin gerekliliği ve önemi de ortaya çıkmıştır. Çizelge 1'de bazı hastalıkların tedavisi amacıyla genetik değişime uğratılmış ve kapsül içine yerleştirilmiş hücreler tedavi edici proteini istenilen (yerleştirildiği) bölgede salarak spesifik tedaviyi sağlamaktadır. Genetik alandaki bilgi birikiminin artması hücre taşıyan bu sistemlerin değişik hastalıkların tedavisi amacıyla kullanımında başarıyı getirecektir.

Kaynakça

1. Lysaght, M.J., Aebischer, P., Scientific American, s.76-82 Nisan 1999.
2. Dixit, V., Piskin, E., Arthur, M., Denizli, A., Tuncel, A., Denkbaş, E., Gitnick, G., Cell Transplantation, 1 (1992) 391.
3. Denizli, A., Piskin, E., Dixit, V., Arthur, M., Gitnick, G., int. J.Artificial Organs, 18 (1995) 90.

Polimerik mikrokürelere tutunan hepatosit hücreleri.