



SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARINDA KÖK HÜCRE

STEM CELLS IN CYTOTOXICITY STUDIES

Aysun ÖKÇESİZ^{1*}, Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT²

¹Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. 38039
Melikgazi/KAYSERİ

²Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı 06100,
Sıhhiye/ANKARA

ÖZ

Amaç: Kök hücreler; sınırsız çoğalabilen, kendilerini yenileyebilen, bütün doku ve organları meydana getiren ana hücrelerdir. Farklı hücrelere dönüşebilme özelliğine sahip olan kök hücreler, hasarlı dokuyu tamir edebilme yeteneğine sahiptirler. Bu amaçla, kök hücreler, hücre temelli terapötik stratejileri geliştirmek için kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Bu yönde yapılan araştırmalarla kök hücre tedavisinin, kansere karşı korunma ve tedavisinde kullanılması oldukça umut vericidir. Bu nedenle, 21. yüzyılın en ilgi çeken alanlarından biri haline almıştır.

Sonuç ve Tartışma: Bu derlemede, sitotoksiste çalışmalarında kök hücrelerin olası fonksiyonel rolünü özetlemek amaçlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: kanser; kök hücre; sitotoksiste

ABSTRACT

Objective: Stem cells; are the main cells that make up all the tissues and organs. They can reproduce themselves, which can multiply indefinitely. The stem cells, which can turn into different cells, have the ability to repair damaged tissue. Stem cells are being extensively explored to develop cell-based therapeutic strategies. It is very promising to use stem cell therapy in the prevention and treatment of cancer with the researches carried out in this direction. For this reason, stem cell studies have become one of the most interesting areas of the 21st century.

Result and Discussion: In this review, it is aimed to summarize the possible functional role of stem cells in cytotoxicity studies.

Keywords: cancer; cytotoxicity; stem cell

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Aysun ÖKÇESİZ
e-posta: aysunokcesiz@gmail.com

GİRİŞ

Kök Hücre

Kök hücreler; kendilerini yenileyebilme, başka hücrelere dönüşebilme, sınırsız çoğalabilme hasarlı dokuyu onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücrelerdir [1] ve vücudumuzdaki bütün doku ve organları oluştururlar [2]. Her yeni bilgi kök hücre tanımında ve özelliklerinde farklılıklar oluşturmaya başlasa da bugün kabul edilen birkaç temel ölçüt kök hücrelerin tanımlanmasına zemin oluşturmaktadır.

Kök hücrelerin temel özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Kendini yenileme özelliği (self-renewal),
- Farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potency),
- Klon oluşturma yeteneği (clonality) [1].

Kendini Yenileme Özelliği (Self-Renewal)

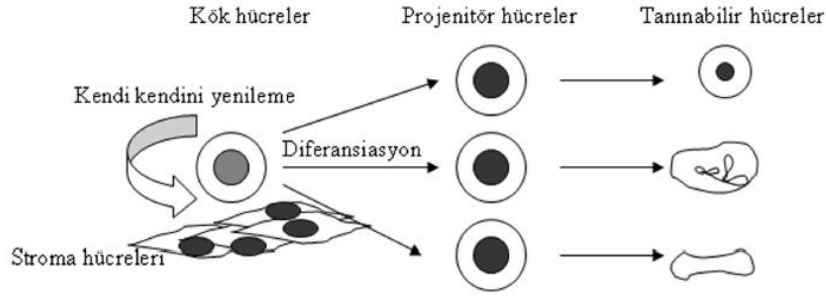
Dokularda devamlılığını sağlamak amacıyla kök hücreler bölünürler ve bölünmeleri yeni kök hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu olay kök hücrenin kendini yenilemesi olarak adlandırılır. Bu bölünmelerde kök hücre asimetric ve simetric bölünmeler geçirir. Sonuçta oluşan iki hücreden biri ana kök hücreyle aynı özellikteyken diğeri bölünmeye devam ederek farklılaşır [3,4]. Asimetric hücre bölünmesi, hücrenin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki dengenin sağlanması açısından hücre kaderinde önemli bir yere sahiptir. İç ve dış faktörlerin denetimi altında asimetric hücre bölünmesi gerçekleşir [5,6]. Simetric bölünme doku onarımı, doku hacmi genişlemesi ve embriyonun gelişim sürecindeki yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için gereklidir. Bu durumda kök hücreler öncü hücrelere dönüşerek devreye girerler. Çok sayıda bölünme kapasitesine sahiptirler [7,8]. Dokudaki kök hücrelerin devamlılığını farklılaşmadan kalan kök hücreler sağlar. Kendini yenileme mekanizmasında bir bozukluğun meydana gelmesi, organizmada gelişimsel geriliğe ve kansere neden olabilir. Kök hücrelerdeki kendini yenileme mekanizmasının anlaşılmasıyla kanser ve yaşlanmanın nedenleri açıklanabilir [9].

Farklı Hücrelere Farklılaşma Yetkinliği (Potency)

Kök hücrenin özelleşmiş bir hücreye farklılaşabilme kapasitesini tanımlamada pluripotensi (çoklu yetkin olma) veya farklılaşma zenginliği kavramları kullanılmaktadır. Pluripotensi, kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliktir. Kök hücreler potensi özelliklerine göre bir hiyerarşi oluşturmaktadırlar. Kök hücrelerden bir kısmı sadece belirli bir hücreye farklılaşabilme özelliği gösterirken, bazıları tüm organizmayı oluşturabilir [10].

Kök Hücre – Projenitör Hücre

Projenitör hücreler, bir veya daha fazla hücre dizilerini oluşturmak için farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücreler süresiz olarak bölünüp çoğalamazlar. Bir projenitör hücrenin kök hücreye göre çeşitlenmesi daha sınırlıdır. Bununla birlikte, tıpta kullanımları mevcuttur. Bu hücreler, kök hücreler ile olgun, işlevsel hücreler arasındaki aşamada yer alan hücrelerdir [11].



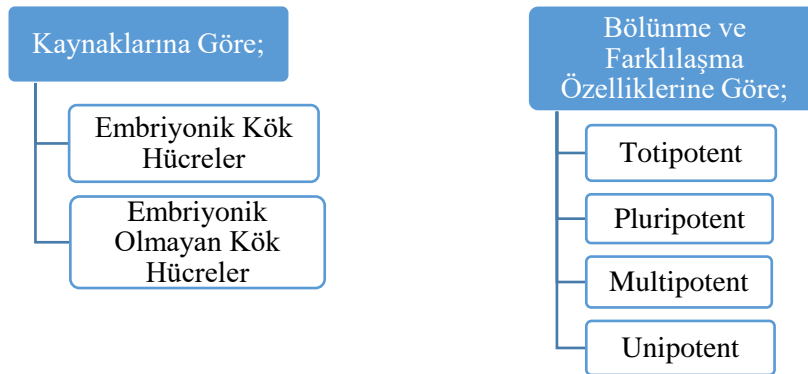
Şekil 1. Tanınabilir hücrelerin oluşum aşaması [12]. diferansiasyon=farklılaşma

Klon Oluşturma Yeteneği (Clonality)

Kök hücrelerin diğer bir temel özelliği klon oluşturma yeteneği taşımalarıdır. ‘‘Klon’’ kelime anlamı olarak birbirine benzeyen hücrelerin oluşturduğu birliktelik şeklinde düşünülebilir. Bölünerek kendi klonunu oluşturan kök hücre, önceki diğer klonlardan şekilsel ve fizyolojik özellikleriyle ayrılır [13].

Kök Hücre Sınıflandırılması

Kök hücre sınıflandırılması, aşağıda özetlendiği şekilde kaynaklarına göre olabileceği gibi, bölünme ve farklılaşma özellikleri dikkate alınarak da yapılabilir (Şekil 2).



Şekil 2. Kök hücre sınıflandırılması

Kaynaklarına Göre Kök Hücreler

1) Embriyonik Kök Hücreler:

Bu hücreler, blastosist aşamasındaki embriyonun (4-5 günlük) iç hücre kitlesinde yer alan, pluripotent karakterdeki yani gelişim sırasında embriyoya ait üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm,

ektoderm) ve bu tabakalardan köken alan farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetkinliğinde olan hücrelerdir. Farklılaşmadan sınırsız bölünebilme kapasitesinde olan embriyonik kök hücrelerin in vitro koşullarda çoğalabilmeleri için uygun kültür ortamının sağlanması gerekmektedir [3,14].

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Kök hücre araştırmalarında devrim niteliğindeki bir gelişme sayesinde yetişkin hücrelerin embriyonik kök hücreler gibi davranan hücrelere "yeniden programlanabileceği" Nobel Ödüllü araştırmayla gösterilmiştir. Normalde pluripotent olmayan bir hücrenin dış uyaranlar ile DNA'sında bazı genlerin aktive edilmesiyle oluşan hücrelere "uyarılmış pluripotent kök hücreler" denir. Bu hücreler, birçok yönüyle normal bir pluripotent kök hücre gibidir [15,16]. Bununla birlikte, hücre tedavisinde bu hücrelerin kullanımı şu anda teoriktir. Teknoloji çok yenidir ve yeniden programlama süreci henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bilim insanları bu hücreleri güvenli ve verimli bir şekilde üretmenin yollarını aramaktadır.

Embriyonik Kök Hücrelerde Etik

Embriyonik kök hücreler, yeni tedaviler için umut yaratmıştır, ancak araştırmalardaki kullanımı konusundaki tartışmalar sürmektedir. Araştırmalardaki etik tartışmalar, embriyoların kullanımı, erişkin kök hücre araştırma etiği, bilim adamlarının sorumluluğu, hayvanların deneylerde kullanılması ve dinlerin konuya yaklaşımı ekseninde devam etmektedir [17,18]. Embriyonik kök hücre araştırmaları, ülkeler arasında farklı şekillerde ele alındığı için bu konudaki düzenlemeler de değişkenlik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), 27 Nisan 2010 tarihinde yaptığı duyuruda, insan embriyonik kök hücrelerinden en çok kullanılan hatların da dahil olduğu 13 ek kök hücre hattının, federal finansman için uygun olduğunu belirtmiştir [19].

2) Embriyonik Olmayan Kök Hücreler:

Embriyonik olmayan kök hücrelerin kapasitesiteleri daha sınırlıdır. Bu hücrelerin kendilerini ihtiyaç doğrultusunda yenileyebilmelerinin yanı sıra, erişkin dokularda bulunan öncül ve özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme özellikleri vardır. Embriyonik olmayan yetişkin kök hücreler sınıfına giren multipotent özellikteki hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler en çok çalışılan hücrelerdir. Unipotent özellikteki diğer yetişkin kök hücreler ise kas ve iskelet sistemi, kalp ve damar sistemi, sinir sistemi, sindirim sistemi, epitel doku, testis ve ovaryum kök hücreleridir [1,20].

Bölünme ve Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler

Totipotent Kök Hücreler:

Döllenen sonra, embriyonik kök hücreler, üç germ tabakasının yanı sıra ekstra embriyonik dokuları veya plasental hücreleri oluşturma yeteneğini korurlar ve totipotent olarak adlandırılırlar. Tüm organizmayı meydana getirebilecek DNA miktarına ve özelliğine sahip olan totipotent kök hücreler, insandaki tüm hücreleri, ekstra embriyonik membranları ve plasentayı oluşturabilecek

potansiyeldedirler [9, 21, 22]. Fertilize yumurta (totipotent), iç hücre kütlelerinde embriyonik kök hücreleri bulunduran 300 hücreli bir yapı olan blastosisti oluşturur. Embriyonik kök hücreler, pluripotenttir ve bu nedenle vücudumuzda multipotentten unipotent'e uzanan erişkin kök hücreler de dahil olmak üzere tüm hücre tiplerine dönüşebilir [23].

Pluripotent Kök Hücreler:

Embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kaynaklı kök hücrelere pluripotent kök hücreler denir. Blastosistin iç hücre kitlesini oluşturan bu hücreler organizmada bulunan tüm hücrelere farklılaşabilirler. Blastosist safhasındaki daha özel olan bu hücreler kendi kendini yenileme ve üç germ tabakasına ayrılma yeteneğini korur. Ancak ekstra embriyonik dokular veya plasental hücreler oluşturmazlar [24, 21, 22].

Multipotent Kök Hücreler:

Bu hücreler yalnızca belirli hücreleri oluşturabilir. Örneğin, kan gibi mezodermal bir dokudan alınan multipotent kök hücreler kan hücrelerini oluşturabilir, ancak sinir hücreleri (ektoderm) veya karaciğer hücreleri (endoderm) gibi farklı hücrelere farklılaşamazlar [25].

Unipotent Kök Hücreler:

Bu hücreler ise; tek bir hücre türünün hücrelerini oluşturma yeteneğine sahiptir, ancak kendi kendini yenileme özelliğine sahip olması kök hücre sınıfına girmesini gerektirir. Örnek olarak kas kök hücreleri verilebilir [26].

Sitotoksiste Yöntemleri

1. Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler
2. Membran Geçirgenlik Testleri
 - 2.1. Nötral Kırmızısı Testi
 - 2.2. Tripan Mavisi Yöntemi
3. Alamar Mavisi Yöntemi
4. Sülförödamın B (SRB) Yöntemi
5. Laktat Dehidrojenaz (LDH) Yöntemi
6. Kristal Viyole Yöntemi

1. Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler

(MTT, MTS, XTT, WST-1)

3,4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, genellikle hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Öncelikli olarak mitokondrilerde bulunan dehidrojenazların aktivitesini hızlı bir şekilde ölçer. Prolifere olan hücrelerin tetrazolyum ile formazan ürünleri oluşturması esasına dayanır ve meydana gelen renk değişimi absorpsiyon ölçümü ile değerlendirilir. Hücre

canlılığı kaybolduğunda mitokondriyal fonksiyon ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunu formazana çevirebilme yeteneği azalır. Birçok hücrede hücre sayısı ile orantılı bir şekilde formazan miktarı değişir ve bu miktar değişimiyle hücre canlılığı tespit edilir [9, 27]. Tetrazolyum türlerini karşılaştırmak istersek en iyi alternatif 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2*H*-tetrazolyum, monosodyum tuzu (WST-1) gibi görünmektedir, diğer tuzlara göre daha verimli tüketilmekte ve daha hızlı renk değişimi göstermektedir. 2,3-*bis*[2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil]-2*H*-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) kullanımında ise XTT'nin hücreler tarafından yavaş indirildiği ve ekstra faktörlerin ilave edilmesi gerekebileceği göz ardı edilmemelidir. MTT kültür ortamında çözünemediğinden ek olarak indirgenme ürünlerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerin kullanılması gereklidir [27].

1.1 Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Sitotoksosite Yöntemlerinde Kök Hücrenin Yeri

Formazana dayalı testlerden biri olan MTT testi kullanılarak yapılan bir çalışmada, fare spermatogonial kök hücrelerinde grafen oksidin doza bağlı sitotoksosite ve genotoksitesisi ilk kez incelenmiştir. MTT sonuçlarına göre, hücre sayısı, yüksek konsantrasyonda (100 ve 400 µg/ml) grafen oksit ile muamele edilmiş numunelerde, muamele edilmemiş hücrelere kıyasla azalmıştır. Çalışmanın sonucunda, yüksek konsantrasyon grafenin spermatogonial kök hücrelere toksik olabileceği fakat bu toksisitenin grafen nanomalzemelerinin yüzey modifikasyonu ile azaltılabileceği kaydedilmiştir. Mevcut çalışma, genetik materyali yavrulara aktaran germ hücreleri üretmekten sorumlu olan spermatogonial kök hücrelerin nanoparçacıklar gibi toksik maddelere karşı çok hassas olduğunu dile getirmektedir. Bununla birlikte, grafen nanomalzemelerin biyotıp ve endüstride giderek daha fazla kullanıldığı bilinmektedir [28].

Hücre canlılığının MTT ile değerlendirildiği bir diğer araştırmada, ortopedik cerrahide biyolojik olarak parçalanabilen implant malzemelerinde kullanılmakta olan magnezyum bazlı alaşımlar ile çalışılmıştır. Bu çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilir Mg-Zn-Ca alaşımlarının adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinde sitotoksitesileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda Mg-Zn₂-Ca alaşımı biyomedikal cihazlarda kullanılabilecek iyi bir aday olarak tavsiye edilmiştir [29].

Burnett ve arkadaşları, sülforafanın kanser kök hücrelerini öldürerek üçlü negatif meme kanserine karşı taksanların antikanser etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Sülforafan, başta turpgillerden türetilen bir izotiyosiyanat olup kanser önleme ajanı olarak kapsamlı şekilde incelenmiştir. Son zamanlarda, sülforafanın, birkaç kanser türünde kanser kök hücrelerini yok ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada hücre canlılığı MTS yöntemi ile değerlendirilmiş ve meme kanser kök hücreleri ile çalışılmıştır. Sülforafanın, taksanla uyarılan aldehit dehidrogenazın hücre çoğalmasını durdurduğu sonucuna varılmıştır. Dosetaksel ve sülforafan kombinasyonunun tümör oluşumunu önemli ölçüde azalttığı ve sülforafanın meme kanserinin yayılmasının önlenmesinde ve ortadan kaldırılmasında yarar sağladığı gösterilmiştir

[30]. Sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerde çeşitli nanokarbon nanotüplerin WST-1 testi kullanılarak sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Karbon nanotüpler, biyolojik ortamlarda mezenkimal kök hücrelerde sitotoksik etkilere neden oldukları için polimerik sürfaktan ile modifiye edilirler. Bu çalışmada, çeşitli pluronik F-68 kaplanmış çok duvarlı karbon nanotüplerle çalışılmıştır. 24 saat sonrasında hücre canlılığında değişiklik görülmemiştir, ancak maruziyet uzadıkça (48-72 saate ulaşınca) toksisitenin artabileceği bildirilmiştir. Bu çalışma, uygun polimer kaplamanın, kök hücrelerin biyolojik kaderini değiştirmeden çok duvarlı karbon nanotüplerinin akut toksisitesini azaltabileceğini önermektedir [31].

2. Membran Geçirgenlik Testleri

Zarı aşabilen bir boya sayesinde hücre zarı geçirgenliği, kolay bir şekilde belirlenebilmektedir. Bu yöntemin dayandığı temellerden biri canlılığı sonlanmaya yakın olan hücrenin, hücre zarı geçirgenliğinin artmış olmasıdır. Canlı ve ölü hücreler boyanın hücre zarını geçip geçememesine göre belirlenmektedir. Bu yöntemde kullanılan iki tip boyadan biri olan vital boyalar, canlı hücreye aktif transportla taşınırlar. En sık kullanılan vital boyaya nötral kırmızısı örnek verilebilir. Non-vital boyalardan olan tripan mavisi ise hücre canlılığı sona erdiğinde hücrenin içine girmektedir [32].

2.1 Nötral Kırmızısı Testi

Nötral kırmızısı yönteminin prensibi, nötral kırmızısı boyasının canlı ve sağlıklı hücrelerin lizozomlarında birikmesine dayanır. Bu yöntem hızlı ve kolorimetriktir. Hücrenin bütünlüğünün bozulduğu durumlarda, hücre zarı veya daha hassas olan lizozom zarının hasar görmesi durumunda, nötral kırmızı boyası hücreye girip bağlanamaz ve böylece kolorimetrik bir azalma yaşanır. Bu şekilde, canlı sağlam hücreler ile hasarlı ölü hücreleri ayırt edebilmek mümkün olmaktadır [33].

2.1.1 Nötral Kırmızısı Testinde Kök Hücrenin Yeri

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinde arsenik ve kurşunun sitotoksik ve genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sitotoksik etki nötral kırmızısı, genotoksik etki ise comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda hücrelerin büyümesi, artan arsenik konsantrasyonu ve maruziyet süresi ile azalmıştır. Mevcut çalışma hem arsenik hem de kurşunun bu kök hücreler üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir, ancak arseniğin kurşun ile karşılaştırıldığında daha zararlı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [34].

2.2 Tripan Mavisi Yöntemi

Tripan mavisi negatif yüklüdür. Eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girmez. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Tripan mavisi ile çalışırken dikkat edilmesi gereken nokta, hücreler tripan mavisi boyasında belirtilen süreden daha uzun kalırsa canlı hücrelerin de maviye boyandığıdır [35].

2.2.1 Tripan Mavisi Yönteminde Kök Hücrenin Yeri

Kuskov ve arkadaşları, non-steroidal, anti-inflamatuvar ilaçlar için taşıyıcı olarak amfililik poli-*N*-vinilpirolidon nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksosite ve *in vivo* akut toksisitesini değerlendirmişlerdir. Hücre canlılığı, sitotoksosite parametresi olarak seçilmiş ve bu çalışma tripan mavisi testinin yanı sıra MTT kullanılarak belirlenmiştir. Embriyonik kök hücre kaynaklı fibroblast ve karaciğer kanseri hücrelerindeki (HepG2) sitotoksosite testleri sonucunda aynı konsantrasyonda bulunan serbest indometazine kıyasla indometazin yüklü polimerik nanopartiküllerin daha hassas ve yüksek performanslı olduğu bildirilmiştir [36].

3. Alamar Mavisi Yöntemi

Alamar Mavisi Yöntemi'nin aktif bileşeni olan resazurin, hücre zarından geçebilen, toksik olmayan, mavi renkli olan, floresan özelliği bulunmayan bir bileşiktir. Hücre içine girdikten sonra, kuvvetli kırmızı floresan veren resofurine indirgenir. Floresan özelliği nedeni ile önemli bir duyarlılığa sahiptir. Alamar mavisi yönteminin hassasiyet ve performansının, MTT testine göre yüksek olduğu bildirilmiştir [27, 37, 38].

3.1 Alamar Mavisi Yönteminde Kök Hücrenin Yeri

Hücre canlılığına alamar mavisi testi ile bakılan bir çalışmada, antiseptiklerin adipoz kaynaklı kök hücrelere olan etkisi araştırılmıştır. Adipoz kökenli kök hücre canlılığı, 5 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda antiseptik ile muamele edildikten sonra ölçülmüştür. Ayrıca, bu hücrelerin çoğalması, adipojenik farklılaşma ve apoptoz ve nekroz üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Mafenid asetatin adipoz kaynaklı kök hücre toksisitesinin düşük olduğu bulunmuş ve yağ dokusu yaralarının tedavisinde uygulanabilir bir antiseptik olduğu bildirilmiştir [39].

4. Sülfrodamin B Yöntemi

Sülfrodamin B (SRB), hücre çoğalmasının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan bir sitotoksosite yöntemidir. SRB, renkli bir boya olup aminoksanten yapısındadır. Sülfrodamin B yöntemi; SRB'nin sitokiyometrik olarak temel aminoasitlere bağlanmasıyla, boyanmış hücrelerden elde edilen boya miktarı ile doğrudan total protein kütlesi ve bu şekilde hücre sayısı hakkında bilgi veren kolorimetrik bir yöntemdir [40].

4.1 Sülfrodamin B Yönteminde Kök Hücrenin Yeri

Salinomisin ve salinomisin sodyumun insan meme kanseri kök hücresi ile meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırmalı değerlendirildiği bir çalışmada SRB yöntemi kullanılmıştır [41]. Kanatlı hayvanlarda ve diğer hayvanlarda yaygın olarak antikoksidiyal bir ilaç olarak kullanılan salinomisinin kanser kök hücrelerinin spesifik bir inhibitörü olarak hareket ettiği

gösterilmiştir. Serbest salinomisin ve sodyum formunun inhibitör etkisinin kanser kök hücrelerinde kanser hücrelerine göre daha kuvvetli olduğu bildirilmiştir [41].

5. Laktat Dehidrojenaz Yöntemi

Hücre ölümüyle ilgili diğer bir parametre ise, hücre zarı bütünlüğünün, ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik enzim aktivitesinin ölçülmesiyle değerlendirilmesidir. Tüm hücrelerde bulunan sabit sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrojenaz (LDH), hücre plazma membranı hasar gördüğünde hücre kültürü süpernatantına kolaylıkla salınabilmektedir. Sonuç, kolorimetrik ölçüm yöntemleriyle değerlendirilmektedir [32].

5.1 Laktat Dehidrojenaz Yönteminde Kök Hücrenin Yeri

İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde Bisfenol A (BPA) toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada hücre ölümü LDH ile ölçülmüş BPA'nın bu hücrelerde zamana ve doza bağlı lipid peroksidasyon nedeniyle sitotoksikite meydana getirdiği bildirilmiştir. BPA'ya maruz kalan mezenkimal kök hücrelerde, oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin doza bağlı artışı gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar, insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde BPA toksisitesinin, süper oksit dismutaz mimetik ile ön tedaviye tabi tutulmasıyla belirgin şekilde azaldığını kaydetmişlerdir [42]. Bir başka çalışmada ise; gümüş nanopartiküllerinin insan ovaryum kanser hücresi ve ovaryum kanser kök hücresine olan sitotoksik etkilerini değerlendirmiştir. Hücre canlılığı LDH ölçülerek değerlendirilmiş, gümüş nanopartiküllerle tedavinin hem ovaryum kanseri hücrelerinde hem de ovaryum kanser kök hücrelerinde ciddi sitotoksikite yarattığı gösterilmiştir [43]. Spermatogonial hücrelerin kültürü gelecekteki transplantasyon çalışmaları için oldukça önemlidir. Son zamanlarda, birçok araştırmacı kök hücrelerin aljinat kullanılarak kültürlenmesine odaklanmıştır. Bir çalışmada, aljinat hidrojellerinin tip A spermatogonial kök hücrelerinin 3 boyutlu kültürlerinde sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Safaştırma işleminden sonra, spermatogoniyal kök hücreler aljinat hidrojelleri içine kapsüllenmişlerdir. Hücrelerin canlılığı tripan mavisi ve LDH ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyonun hücre morfolojisi ve hücre canlılığını değiştirmedeği sonucuna ulaşılmıştır. Aljinatın antioksidan özelliklerinden dolayı kök hücrelere sitotoksik olmadığı kaydedilmiştir [44].

6. Kristal Viyole Yöntemi

Kristal viyole deneyi çoklu küme plakalarına yapışan hücrelerin relatif yoğunluğu hakkında kantitatif bilgi edinmek için yararlıdır. Kristal viyole solüsyonu, canlı hücrelerin DNA'sını lekelediğinden hücrenin canlılığı hakkında değerlendirme yapmamızı sağlar.

6.1 Kristal Viyole Yönteminde Kök Hücrenin Yeri

Fernandes ve arkadaşları, düşük seviyeli lazer tedavisinin kendiliğinden düşmüş insan süt dişi kök hücrelerine olan etkilerini araştırmıştır [45]. Düşük seviyeli lazer tedavi, çeşitli tipte hücrelerin

çoğalmasını uyarmaktadır; kendiliğinden düşmüş insan süt dişi kök hücrelerinin canlılığına ve proliferasyonuna lazer tedavisinin etkisi farklı yoğunluklarda uygulanarak değerlendirilmiştir. Bu araştırmada, sitotoksosite testlerinden SRB, MTT ve kristal viyole ile çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda, kullanılan enerji yoğunluklarında hücre canlılığı kaybı yaşanmadığı bildirilmiştir. Aksine, bu çalışmada kullanılan lazer tedavisinin, hücrelerin çoğalmasını uyardığı rapor edilmiştir. Mevcut sonuçlar, düşük seviyeli lazer tedavisinin farklı enerji yoğunluklarında kullanılmasının kendiliğinden düşmüş insan süt dişi kök hücrelerinin in vitro canlılığına ve çoğalmasına olumlu etkisini göstermektedir. Bu şekilde kök hücrelerin kullanılmasının doku mühendisliği adına yararlı bir araç olabileceği vurgulanmaktadır. Bu uygulamayı standartlaştırmak için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir [45].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kök hücre biyolojisinin gelişimi, rejeneratif tıpta ve klinik uygulamalarda devrim yaratmıştır. Kök hücrelerin insan sağlığına fayda sağlayacağı diğer önemli bir alan ise toksisite değerlendirmelerindeki kullanımlarıdır. Sağlık için büyük tehlike oluşturan ve uzun süreli maruziyeti olan çeşitli kimyasalların insanlar üzerindeki olumsuz etkilerini değerlendirmek için insan fizyolojisine dayanan güvenilir toksisite modellerine ihtiyaç duyulmaktadır [46]. Kök hücre kullanılarak yapılan toksisite testleri ise bu hücrelerin insan vücudunda birçok hücre ve dokuya farklılaşabilmeleri nedeniyle geleneksel toksisite testlerine geçerli bir alternatif oluşturmaktadır. Böylece, insan fizyolojisine oldukça benzer tek bir sistemde in vitro olarak hücre, embriyonik, gelişimsel ve reproduktif toksisiteyi değerlendirmek mümkün olmaktadır [47]. Toksisite testleri arasında, ilk aşama sitotoksosite testleridir. Bu testler sayesinde bir ksenobiyotiğin olası toksisitesi hakkında bilgi edinilir ve elde edilen verilerle sonrasında yapılmak istenen hayvan deneyleri ve klinik araştırmalar planlanır. Sitotoksosite testlerinden elde edilecek verilerin güvenilirliği büyük önem taşımaktadır [48]. Kök hücrelerle yapılan basit bir sitotoksosite testi bile, pluripotent özelliğinden dolayı somatik hücrelere kıyasla daha yüksek duyarlılık sağlamaktadır [47].

Derlememizde kök hücreler kullanılarak yapılan sitotoksosite çalışmalarına yer verilmiş, bu çalışmalarda kök hücrelerin somatik hücrelere kıyasla daha duyarlı olduğu bilgisini destekler sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bu alanda çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiş olmakla birlikte, farklı kök hücrelerin değerlendirildiği sitotoksosite çalışmalarının planlanması literatüre katkı sağlayacak, ileri toksikoloji çalışmalarında yol gösterici olacaktır. Sonuç olarak; günümüze kadar yapılan araştırmaların bulguları, kök hücrenin hem kanserleşmenin başlamasında hem de malignite derecesinin belirlenmesinde oldukça önemli rolü olduğunu göstermektedir. Kanser önlenmesinde ve kanser tedavisinde kök hücreler umut vaat etmekte, kök hücrelerle gerçekleştirilecek toksisite çalışmaları önem taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Desteği ve katkılarından dolayı değerli arkadaşım Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL'a teşekkürü borç bilirim.

KAYNAKLAR

1. Tekeli, S., Arısu Naghavi, E., Gökçe, B., Sır, G., Yiğittürk, G., Çavuşoğlu, T., Uyanıkgil Y. (2016). Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 1(2), 72-83.
2. Kıvanç, M., Öztürk, Ş., Gökalp, S., Özdemir, İ., Tuğlu, İ. (2015). Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler ve Uygulama Alanları. Cukurova Medical Journal, 40(3), 399-408.
3. Can, A. (2014). Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Kitabevi, Ankara, p. 327-426.
4. Ren, F., Wang, K., Zhang, T., Jiang, J., Nice, E. C., Huang, C. (2015). New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. General Subjects, 1850 (8), 1518 - 1526.
5. Can, A. (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. Turkish Journal of Haematology, 25, 57-59.
6. Gentry, S.N., Jackson, TL. (2013). A Mathematical Model of Cancer Stem Cell Driven Tumor Initiation: Implications of Niche Size and Loss of Homeostatic Regulatory Mechanisms. Plos One, 8(8), e71128.
7. Türkiye Bilimler Akademisi. (2009). Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara.
8. Sağsöz, H., Ketani, M.A. (2008). Kök hücreler. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 29-33.
9. Şahin, E. (2015). Resveratrol İle Muamele Edilmiş Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre Sitokinlerinin A549 Kanser Hücrelerine Etkilerinin Araştırılması (Doktora Tezi), Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
10. Bianco, P., Robey, P.G., Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. Cell Stem Cell, 2(4), 313-319.
11. Boston Children's Hospital Web site. (2017) Adult Stem Cells 101 Retrieved April 27, 2017, from <http://stemcell.childrenshospital.org/about-stem-cells/adult-somatic-stem-cells-101/what-are-progenitor-cells/>
12. Özkalemkaş, F. (Ekim, 2003). Nedir Bu Hematopoetik Kök Hücre? XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi III. Hematoloji İlk Basamak Kursu, 77-83.

13. Glauche, I., Bystrykh, L., Eaves, C., Roeder, I. (2013). Stem cell clonality-Theoretical concepts, experimental techniques, and clinical challenges. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(4), 232-240.
14. Kirschstein, RL. (2001). Stem cells: scientific progress and future research directions. National Institutes of Health, Washington: Department of Health and Human Services. Terese Winslow, p.5-10.
15. Euro Stem Cell Web site. (2016). Types of stem cells and their uses. Retrieved May 22, 2017, from <http://www.eurostemcell.org/types-stem-cells-and-their-uses>
16. Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
17. Euro Stem Cell Web site. Retrieved May 5, 2017, from <http://www.eurostemcell.org/embryonic-stem-cell-research-ethical-dilemma>
18. Şener, N. (2012). Kök Hücre Araştırmaları, Etik ve Yasal Tartışmalar. *Hukuk Gündemi*, 1, 54-57.
19. Washington Post Web site. (2010) Retrieved April 25, 2017, from <http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2010/04/27/AR2010042703360.html>
20. Ural, A.U. (2006). Hematopoetik Kök Hücre. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgical Medical Sciences*, 2(43), 5-10.
21. Menon, S., Shailendra, S., Renda, A., Longaker, M., Quarto, N. (2016). An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1.
22. Özel, H.B., Ozan, E., Dabak, Ö. (2008). Embriyonik Kök Hücreler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, 28, 333-341.
23. Harvard University Web site. (2014). Retrieved May 4, 2017, from <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2014/stem-cells-a-brief-history-and-outlook-2/>
24. Hui, H., Tang, Y., Hu, M., Zhao, X. (2011). Stem Cells: General Features and Characteristics, Gholamrezanezhad, A. (Ed.), *Stem Cells in Clinic and Research*, (pp. 3-20). INTECH Open Access Publisher.
25. Scadden, D.T., Raaijmakers, M.H. (2015). Overview of stem cells. UpToDate. Retrieved April 27, 2017, from <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-stem-cells>
26. Kalra, K., Tomar, P.C. (2014). Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7), 919-930.
27. Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Yanıkkaya Demirel, G. (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74-89.

28. Hashemi, E., Akhavan, O., Shamsara, M., Daliri, M., Dashtizad, M., Farmany, A. (2016). Synthesis and cyto-genotoxicity evaluation of graphene on micespermatogonial stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1(146), 770-776.
29. Fazel Anvari-Yazdi, A., Tahermanesh, K., Hadavi, SM., Talaei-Khozani, T., Razmkhah, M., Abes, SM., Mohtasebi, M.S. (2016). Cytotoxicity assessment of adipose-derived mesenchymal stem cells on synthesized biodegradable Mg-Zn-Ca alloys. *Materials Science and Engineering C*, 69, 584-597.
30. Burnett, J.P., Lim, G., Li, Y., Shah, R.B., Lim, R., Paholak, H.J., McDermott, S.P., Sun, L., Tsume, Y., Bai, S., Wicha, M.S., Sun, D., Zhang, T. (2017). Sulforaphane enhances the anticancer activity of taxanes against triple negative breast cancer by killing cancer stem cells. *Cancer Letters*, 394, 52-64.
31. Yao, M.Z., Hu, Y.L., Sheng, X.X., Lin, J., Ling, D., Gao, J.Q. (2016). Toxicity analysis of various Pluronic F-68-coated carbon nanotubes on mesenchymal stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, 250, 47-58.
32. Uzun, İ.H., Bayındır, F. (2011). Dental Materyallerin Biyouyumluluk Test Yöntemleri. *GÜ Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28(2), 115-122.
33. Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.
34. Ahmad, A., Shakoori, A.R. (2013). Cytotoxic and Genotoxic effects of Arsenic and Lead on Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (AMSCs). *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine*, 9(2), 29-36.
35. Freshney, R.I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd edition; Wiley-Liss, New York.
36. Kuskov, A.N., Kulikov, P.P., Goryachaya, A.V., Tzatzarakis, M.N., Docea, A.O., Velonia, K., Shtilman, M.I., Tsatsakis, A.M. (2017). Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity study. *Nanomedicine*, 13(3), 1021-1030.
37. Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamarblue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicology In Vitro*, 18, 703-710.
38. Kalkan, R. (2016). Sitotoksisite Analizleri Yakın Doğu Üniversitesi Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu, Lefkoşa, KKTC.
39. Kim, B.S., Ott, V., Boecker, A.H., Stromps, J.P., Paul, N.E., Alharbi, Z., Cakmak, E., Bernhagen, J., Bucala, R., Pallua, N. (2017). The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 139(3), 625-637.

40. Karaboğa Arslan, A.K. (2017). A-Chaconine ve A-Solanine'in Antikanserojen Etkilerinin RL95-2 Hücrelerinde Araştırılması (Doktora Tezi), Kayseri, Erciyes Üniversitesi.
41. Zhang, Y., Wang, X.Q., Wang, J.C, Zhang, X., Zhang, Q. (2011). A comparison study of the cytotoxicity of salinomycin and salinomycin sodium toward human breast cancer stem cells as well as breast cancer cells. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 20(4), 368-375.
42. Leem, Y., Oh, S., Kang, H.J., Kim, J.H., Yoon, J., Chang, J.S. (2016). BPA-toxicity via superoxide anion overload and a deficit in β -catenin signaling in human bone mesenchymal stem cells. *Environmental Toxicology*, 32(1), 344-352.
43. Choi, Y.J., Park, J.H., Han, J.W., Kim, E., Ja-Wook, O., Lee, S.Y., Kim, Y.J., Gurunathan, S. (2016). Differential Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles in Human Ovarian Cancer Cells and Ovarian Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2077(1-17).
44. Jalayeri, M., Pirnia, A., Najafabad, E.B., Varzi, A.M., Gholami, M. (2017). Evaluation of alginate hydrogel cytotoxicity on three-dimensional culture of type A spermatogonial stem cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 888-894.
45. Fernandes, A.P., Junqueira, M.A., Marques, N.C.T., Machado, M., Santos, CF., Oliveira, T.M., Sakai, V.T. (2016). Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Applied Oral Science*, 24(4), 332-337.
46. Liu, S., Yin, N., Faiola, F. (2017). Prospects and frontiers of stem cell toxicology. *Stem cells and Development*, 26(21), 1528-1539.
47. Yao, X., Yin, N., Faiola, F. (2016). Stem cell toxicology: a powerful tool to assess pollution effects on human health. *National Science Review*, 3(4), 430-450.
48. Tokur, O., Aksoy, A. (2017). *In Vitro* Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.