

Embriyonik Kök Hücreler

Tahir KARAŞAHİN

Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

Özet: Embriyonik kök hücre, embriyoda erken evrede bulunan totipotent kök hücreler olarak tanımlanırlar. Embriyonik kök hücreler, erken embriyonik dönemde inner cell mass (ICM) kısmından elde edilir ve *in vitro* olarak bütün somatik hücrelere dönüşebilme yeteneği vardır. Embriyonik kök hücreler sınırsız olarak çoğalabilme kabiliyetlerinden dolayı diyabet, miyokart enfarktüsü ve parkinson gibi hemen hemen bütün dejeneratif ve hasar görmüş dokuların yenilenmesinde kullanılabilir. Embriyonik kök hücreler, kök hücreler

Anahtar Kelimeler: Embriyonik kök hücreler, kök hücreler

Embryonic Stem Cells

Summary: Embryonic stem cells are determined as totipotent stem cells at the early stages of embryos. Embryonic stem cells are harvested from the inner cell mass (ICM) of the early embryo, and they can proliferate indefinitely *in vitro* while retaining their ability to differentiate into all somatic cells. Embryonic stem cells could potentially revolutionize medicine by providing an unlimited renewable source of cells capable of replacing or repairing tissues that have been damaged in almost all degenerative diseases such as diabetes, myocardial infarction and Parkinson's disease.

Key Words: Embryonic stem cells, stem cells.

Giriş

In vitro olarak çok sayıda hücre serilerine farklılaşma kapasitesine sahip pluripotent olan embriyonik kök hücrelerinin izolasyonu rejeneratif tıp alanında büyük heyecan ve ümit uyandırmaktadır. Çeşitli sebeplerden dolayı farklı hücre hatlarını çalışmaya yönelik yöntem ve protokoller gelişmektedir. İstenen hücre hattı yönünde farklılaşmayı sağlayabilmek için özel büyüme faktörü kombinasyonları, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matris sistemleri denenmektedir. Bilimsel engellerin üstesinden gelindikten sonra embriyonik kök hücre araştırmaları konusunda daha iyi sonuçlar alınabilecektir (36). Embriyonik kök hücreler üzerinde sürdürülen temel bilimsel araştırmalar, bu hücrelerin yakın gelecekte klinikte tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığın tedavisinde etkin rol oynayacaklarını göstermektedir. Özellikle, kendini yenileme ve onarım kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıklar tedavi edilebilecektir. Örneğin, embriyonik kök hücreler yanıklardaki doku kayıpları ve diyabete bağlı iyileşmeyen yaralar gibi belli klinik olgularda yaygın olarak kullanılabilir. Aynı zamanda embriyonik kök hücreler; Parkinson hastalığı, tip 1 diyabet, romatoid artrit ve miyokart enfarktüsü gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde ilaç toksisitesinin araştırılmasında ve erken embriyonik gelişim çalışmalarında önemli ilerlemeler sağlayacaktır (29, 32, 35, 36).

1. Kök Hücre (Stem Cell)

Kök hücreler, kendini yenileme özelliğine sahip olup vücut ve laboratuvar ortamlarında, uygun sinyaller aldıklarında, birçok özelleşmiş hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir (2, 11, 15, 38). Kök hücre, "fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve heterojen üreme potansiyeli olan hücre" olarak tanımlanmaktadır (38). Başka bir tanıma göre kök hücre; "bölünerek kendini yenileyen (self-renewal), sayılarını devamlı sabit tutan, kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş, görev yapan organları oluşturan ve farklılaşma yeteneğinde olan primitif nitelikteki hücredir" (3, 15, 21). Kök hücre çalışmaları, 1960'larda hematopoetik kök hücre keşfi ile başlamıştır. Bunu stromal kök hücrelerin (mezenkimal hücreler) bulunması takip etmiştir. 1990'lı yıllarda bilim adamları memeli beyninde, sinir kök hücrelerini tespit etmişlerdir. Daha sonraki yıllarda ise epidermis, karaciğer ve diğer birçok organlarda kök hücrelerin varlığı, bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Yetişkin kök hücreleri, kordon kanından elde edilen kök hücreler ve embriyonik kök hücreler, günümüzde bilinen üç temel kök hücre kaynaklarıdır. Kök hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler, kaynaklandıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle uyarıldıklarında, çok farklı özelleşmiş doku hücrelerine de dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (15, 38).

1.1. Kök Hücrelerin Özellikleri

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlayabilmek için 5 adet ölçüt vardır (37, 40). Bunlar;

1- Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin uzun süre bölünebilmelerini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda bulunan telomer adı verilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (TTAGGG). Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar.

2- Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilir.

3- Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelere kaynaklık edebilirler ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun en iyi örneğini döllenmiş yumurta hücresinde görebiliriz.

4- Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler. Buna en iyi örnek, olarak hematopoetik kök hücrelerde, karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.

5- Kök hücreler, *in vivo* şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilirler. Buna en iyi örnek, embriyonik veya erişkin kök hücrelerinin (nöral, mezankimal) blastosiste enjekte edildiklerinde farklı hücre tiplerine kaynaklık edebilmeleridir (37, 40).

1.2. Kök Hücre Tipleri

Kök hücreler temelde üç tipe ayrılmıştır. Bunlar; Totipotent kök hücreler, Pluripotent kök hücreler ve Multipotent kök hücrelerdir. Erken embriyonik dönemdeki kök hücrelerinin bölünme kapasiteleri çok yüksektir. Bu hücreler aynı bölünme potansiyelini kendinden sonra gelen hücrelere aktarırlar ve onlarında bölünme kapasiteleri oldukça yüksektir. Gelişimin daha geç dönemindeki hücrelerde ise bölünme potansiyelleri azalmaya başlar. Bu hücrelerde ise çoğalma asimetric olarak gerçekleşir, kendinden sonra gelen hücrelerin çoğalma kapasiteleri iyice zorlaşır (3, 15, 21, 38).

1.2.1. Totipotent Kök Hücreler: Bu hücreler; embriyo, embriyo sonrası bütün doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları veren, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlerde gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Erken embriyo dönemde 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir (3, 15, 21, 38).

1.2.2. Pluripotent Kök Hücreler: Organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir. Embriyoda blastosistin iç hücre kitesindeki hücreler (embriyoblastlar), endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine farklılaşabilirler. Embriyonel kök hücreleri blastosistin iç hücre kitesinden elde edilirler ve pluripotenttirler (10). Embriyonel kök hücreler yüksek seviyede telomerase aktivitesi içerirler, hücre replikasyonu ile aktivasyonda azalma gözlenmez. Bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler (3, 15, 21, 38).

1.2.3. Multipotent Kök Hücreler: Multipotansiyel kök hücre ve bu hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış bulunan hücrelerdir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal hayat), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur ve erişkin kök hücrelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Kemik iliği kök hücreleri en iyi örnektir. Biraz daha özelleşmiş bu hücrelere multipotent hücreler denir (3, 15, 21, 38).

2. Embriyonik Kök Hücre Tarihi

Embriyonik kök hücreleri ilk kez birbirinden bağımsız iki çalışma grubu; Evans ve Kaufman (9) Martin (18) 1981 yılında, 3.5 günlük fare blastosistleri iç hücre kitesinden sürekli olarak farklılaşmadan çoğalan embriyonik kök hücreleri elde etmeyi başardılar (9, 10).

İlk primordial germ hücre serileri ise Matsui ve ark. (19) tarafından 1991 yılında farelerde elde edilmiş ve bunu diğer canlılarda yapılan çalışmalar izlemiştir. Sığır embriyolarının pluripotentliği Cibelli ve ark. (7), Stice ve ark. (31), Van Stekelenburg-Hamers ve ark. (39) tarafından tespit edilmiştir. İnek embriyolarının totipotentliği ise Sims ve First (26) tarafından 1994 yılında ispat edilmesine rağmen ilk inek embriyonik kök hücre serileri 2001 yılında Mitalipova ve arkadaşları tarafından üretilmiştir (20). Sığır embriyolarından embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesinin biraz problemli olduğu söylenmektedir (42).

Thomson ve ark. (35) 1998 yılında, *in vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemiyle elde edilmiş ve ailelerin izniyle araştırma amaçlı olarak bağışlanmış olan taze veya dondurulmuş embriyolardan faydalanmıştır. Blastosist aşamasına kadar kültüre edilmiş insan embriyolarından 14 adet iç hücre kitesi izole edilmiş ve bunlardan 5 adet embriyonik kök hücre serisi elde edilebilmiştir. Bu serilerden dört tanesi 5-6 aylık daimi farklılaşma özelliğine sahip olarak

inkübe edilerek çoğaltılmış ve inkübasyon sonrası dondurulmuştur (6, 15, 22, 35). Elde edilen insan embriyonik kök hücre serilerinin yüksek düzeyde telomeraz enzim aktivitesine sahip olduğu ve her üç germ tabakasına (ektoderm, mezoderm ve endoderm) ait türevleri oluşturma potansiyellerini sürdürdüğü görülmüştür (35). Thomson ve ark. (35), embriyonik kök hücrelerinin özelliklerini 3 bölümde toplamışlardır;

1. Gömülme öncesindeki veya preimplantasyon evresindeki embriyodan elde edilmeleri.
2. Uzun süreli inkübasyon ortamında farklılaşmadan çoğalabilme özelliklerinin olması.
3. Uzun süre kültürde tutulduktan sonra bile, her üç embriyonik germ tabakasının türevlerini kararlı bir şekilde oluşturabilme yeteneğinin bulunmasıdır.

Telomerleri uzun olduğu için embriyonik kök hücrelerinin çoğalma kapasiteleri çok daha fazladır ve uzun süre bölünmeye devam edebilirler. Uygun laboratuvar şartlarında 2 yıl yaşayabilirler (11, 33). Genel olarak embriyonik kök hücre uygulamaları daha çok kemirgen, tavşan, domuz ve insanlarda yapıla gelmiştir (8, 9, 10, 18, 34).

3. Embriyonik Kök Hücre

Kök hücre tipleri arasında yer alan embriyonik kök hücreler, canlı organizmada bulunan her çeşit hücre ve dokuya dönüşebilme kapasitesi nedeniyle, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında önemle üzerinde durulan bir kök hücre grubudur (2, 11, 15). Embriyonik kök hücreler, implantasyon öncesi erken gelişim döneminde, blastosist aşamasına ulaşmış embriyolardan elde edilirler. Bu aşamadaki bir embriyo iki farklı hücre tipinden oluşur. Dış kısımda bulunan ve trofektoderm adı verilen hücreler implantasyon sonrası plasenta yapısını oluşturmaktadırlar. İç kısımda bir kitle halinde bulunan inner cell mass (ICM) hücreleri ise fetal yapıyı oluştururlar. Embriyonik kök hücreler iç kısımdaki bu hücrelerin özel immünolojik ve mekanik yöntemler kullanılarak ayrıştırılması sonrasında özel besi yeri ve büyüme faktörü içeren ortamlarda inkübasyonu ile elde edilmektedirler (9, 18). Embriyonik kök hücreler pluripotent hücreler olup, uygun sinyallerle uyarıldıklarında vücutta yaklaşık 200 hücre tipine dönüşebilme kapasitesine sahiptirler (2). Embriyonik kök hücreleri çok önemli iki özelliği sayesinde rejeneratif tıbbın odak noktası haline gelmişlerdir: 1-Kendini yenileme süreci ile farklılaşmaksızın proliferere olma becerisi. 2-Farklılaşma için indüklendiklerinde özelleşmiş hücre türleri oluşturma potansiyeli (27, 36).

3.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Embriyonik kök hücreler, çeşitli türlerde benzer yöntemler kullanılarak blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilmişlerdir. Farede ya blastosistin tamamı ya da buradan izole edilen iç hücre kitlesi, kültür ortamına alınarak çoğaltılmaktadır. Blastosist iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücre elde edilmesi mekanik veya immün cerrahi izolasyon yöntemiyle yapılmaktadır (24, 29).

3.1.1. İmmün Cerrahi Yöntem: İmmün cerrahi izolasyonda blastosist zona pellusidası pronaz enzimiyle eritilir, 20 dakika anti-insan serum antikor ile sonrada 30 dakika kobay komplemanı ile muamele edilir. Sonra fare veya insan embriyosu insan veya fareye karşı geliştirilmiş serum antikorlarıyla inkübe edilmektedir. Antikoron blastosist içine geçişi, trofoblast hücrelerinin hücre-hücre bağlantılarıyla engellenmekte ve iç hücre kitlesine antikor teması olmamaktadır. Antikor yıkandıktan sonra blastosist kompleman içeren solüsyon içerisine alınarak hücre lizisi belirgin hale gelinceye kadar inkübe edilir. İnaktive olmuş iç hücre kitlesi, mitotik olarak inaktive edilmiş fare embriyonik fibroblastları (feeder tabakası) üzerinde kültür yapılır (24, 29). Son zamanlarda, destek hücresi yerine başkalaşımı engellemek üzere lösemi inhibitör faktör (LIF) kullanılmaktadır. Fare embriyonal kök hücrelerinin aksine insan lösemi inhibitör faktör, embriyonel kök hücrelerinin farklılaşmasını engellemez. Kültür ortamından lösemi inhibitör faktör veya besleyici tabaka uzaklaştırıldığı zaman, embriyonel kök hücreler sıvı kültürlerde, spontan olarak farklılaşmaya başlar ve "embriyoit body" lerini oluştururlar. Oluşan bu hücre topluluğu küre şeklinde olup, üç germ tabakasının hepsini içerir. Mezodermal ve ektodermal prokürserler birkaç gün içerisinde oluşurken, endodermal hücre tipleri embriyoit cisimciklerin kaviteyona uğradığı, kistik görünüm aldığı 10 günlük sürede oluşurlar (5, 13, 30, 38, 41).

3.1.2. Mekanik İzolasyon: Mekanik izolasyonda embriyonik kök hücre dizileri kültürdeki blastosistlerin direkt mekanik diseksiyonu ve trofoblast tabakasının iğne ile kısmi uzaklaştırılması veya zonatsız embriyoların doğrudan mitotik olarak inaktive edilmiş fibroblast hücreleri üzerine yerleştirilmesiyle elde edilmektedir. Trofoblast hücreleri uzaklaştırılmadığında veya kısmen çıkarıldığında iç hücre kitlesi trofoblastlarla birlikte tek tabaka halinde büyür. İç hücre kitlesi yeterli büyüklüğe ulaştığında, ayrılarak kültüre edilir. Fibroblastlar üzerinde çoğalan embriyonik kök hücre kolonileri, iki-üç günde bir pasajlama yapılarak yeni kültür pleytlerine ekim yapılır. Elde edilen embriyonik kök hücre-

ler, uygun kültür ortamında, farklılaşmadan çoğalabilir ve altı ay-bir yıl kadar pluripotent özelliklerini koruyabilir. Karyotip olarak normal olduğu gösterilmiş bu hücrelere embriyonik kök hücre dizileri adı verilir (24, 29). Primat embriyonik kök hücrelerini izole etmek için, antikor kullanılarak kompleman aracılı tahribatin gerçekleştirilmesiyle geride kalan sağlam iç hücre kitlesinin bu tabakadan ayrılması yöntemi kullanılır. Daha sonra, iç hücre kitlesi, gebelik ortasındaki fare fötuslarının kültürlenmesinden elde edilen fare embriyonik fibroblastlarının olduğu bir ortama alınarak, burada embriyonik kök hücre kolonilerinin çoğalması beklenir. Bu hücre tabakasına, besleyici hücre tabakası (feeder layer) denir ve bu hücreler bölünme ve çoğalma yönünden pasifize edilmişlerdir. Besleyici hücreler fenotip yönünden iyi tanımlanmamışlardır ve klasik erişkin doku fibroblastlarından farklıdır (5, 13, 30, 41). Fareye ait hücrelerin kültür kabının altını döşemesinin sebebi, öncelikle iç hücre kitlesinden alınan hücrelere bir tutunma yüzeyi sağlamaktır. Aynı zamanda, bu hücreler insan embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmadan çoğalmasını sağlayan bazı sinyallere kaynaklık etmektedir. Bu sinyaller (LIF, Wnt, FGF, TGFb/aktivin/nodal, P13K/AKT kinase, MAPK/ERK ve NFkb gibi) hedef hücrelerdeki (embriyonik kök hücre) reseptörlerine bağlanıp, hücre içi ikincil mesajlar vasıtasıyla kendini yenileme ya da pluripotentiğin devamını sağlayan bazı transkripsiyon faktörlerinin (Oct4, Nanog, Sox2 ve Foxd3 gibi) ekspresyonlarının devamını sağlamaktadır (5, 13, 30, 41). Hayvan hücreleriyle kültüre edilen embriyonik kök hücrelerinin tedavi amacıyla kullanılması, ksenogreftlerle eşdeğerdir. Bunun yanında, bu tür *in vitro* kültürleme ortamlarının, insanlara, viral ve enfeksiyon ajanları bulaştırması gibi bazı tehlikeleri de mevcuttur. Bu nedenle, embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesinde, fare fibroblastlarının kullanılmasına bazı alternatifler getirmek için çaba harcanmaktadır. Araştırmacılar, insan embriyonik kök hücrelerini, fare embriyonik fibroblast besleyici tabaka yerine, insan fötal ve erişkin fibroblast besleyici tabaka kullanarak uzun süre farklılaşmadan kültüre etmeyi başarmışlardır (23). Mouse embryonic fibroblast (MEF) kökenli matris materyallerinin, farklılaşmamış insan embriyonik kök hücrelerinin idamesi üzerinde rollerinin olabileceğinin anlaşılmasıyla, matrigel veya laminin kaplı plaklar gibi kolayca sterilize edilebilen besleyici tabakalar üzerine çalışmalar yapılmıştır. Fakat matrigelin kendisi hayvansal bir üründür ve komplikasyonlar arz eder (1, 36). Besleyici tabaka içeren iç hücre kitlesinden izole edilmiş hücreler birkaç gün içerisinde çoğalmaya ve kültür kabını doldurmaya başlar. Kültür kabı dolmaya başladığında embriyonik kök hücre

kolonileri, buldukları kültür ortamından dikkatli bir şekilde alınarak, birkaç adet yeni kültür kaplarına aktarılırlar. Bu hücrelerin yer değiştirme işlemi aylar boyunca ve pek çok defa tekrar edilir ve buna alt kültürleme denir. Her bir alt kültürleme dönüsü, bir geçiş olarak düşünülür. Altı ay veya daha uzun zaman sonra, başlangıçtaki 30–70 hücreli iç hücre kitlesinden milyonlarca embriyonik kök hücre elde edilerek sınırsız kök hücre kaynağı sağlanmış olur (27, 30, 40).

3.2. Embriyonik Kök Hücreleri Diğer Hücrelerden Ayıran Morfolojik, Genetik ve İmmünolojik Özellikleri

Embriyonik kök hücrelerin, diğer vücut hücrelerine kıyasla son derece yüksek bir çekirdek/sitoplazma hacim oranı mevcuttur. Çok belirgin bir pronükleus yapısı içerirler. Bu hücreler, destek hücreleri üzerindeki kültürleri sırasında üç boyutlu koloni oluştururlar. Embriyonik kök hücrelerin bir diğer önemli özelliği, kanser hücrelerine benzer sürekli bölünebilme özelliğine ve bu hücrelerden farklı olarak normal bir karyotip yapısına sahip olmalarıdır (14). Embriyonik kök hücreler, ayrıca ileri moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak tanımlanırlar. İmmünolojik olarak tanımlanabilmeleri için erken dönemde ekspresyon gösteren işaretçilerin (SSEA-1, 3, 4, TRA-1-60 ve 81 vb) veya gen ürünlerinin (OCT-4, Alkalın Fosfataz vb.) immünohistokimyasal yöntemler ile boyanması tekniği kullanılmaktadır (14).

4. Embriyonik Kök Hücrelerinin Kullanım Alanları

Embriyonik kök hücrelerinin *in vitro* ortamda özgün hücre serilerine farklılaşmasına dayanan gözlemler yapılmaktadır. Bu gözlemler sonucunda, bu hücreler; yeni ilaçlar için gen hedeflerinin tanımlanmasında kullanılabilecektir. Gelişimsel biyolojide teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanmasını sağlayacaktır. Gen tedavilerinde ve hücre esaslı tedavilerde kullanılmak üzere hücrelerin ve dokuların üretilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ilaç keşfi için faydalar umulmaktadır (4, 28, 29, 38).

Hücrelerin farklılaşması sırasında, kanser ve doğum kusurları gibi ciddi sağlık problemleri oluşmaktadır. Eğer hücre farklılaşmaları daha iyi anlaşılabilirse, hastalıklara yol açan sebepler ve bu sebeplerin giderilmesi konusunda çok önemli adımlar atılabilecektir. Yeni ilaçların geliştirilmesi safhasında, kök hücrelerden yola çıkılarak üretilen

dokular ilaçları test etmede kullanılabileceği belirtilmektedir. Örneğin sinir sistemi ile ilgili bir ilacın denenmesi için beyin dokusuna dönüştürülmüş kök hücreleri ya da kalp hastalıkları ilaçlarını test için kalp kası dokusu üretilebilir. Organ, doku veya kan nakli çalışmalarında, kök hücrelerinin önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (2). Embriyonik kök hücrelerinin Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve Avustralya başta olmak üzere birçok ülkede deneysel aşamaları tamamlanmış olup, hayvan uygulamaları yapılmaktadır (15). Son 20 yıldır dünyada kabul gören şekilde embriyonik kök hücreler; kemik iliği veya kandan elde edilen ve kan üretebilen hücrelerin naklinde, Akdeniz anemisinde, lösemi ve lenfoma gibi hastalıkların ve bazı kanser türlerinin tedavisinde başarılı bir şekilde uygulanma alanına sahiptir (3, 15). Embriyonik ve erişkin kök hücrelerinin sağlık bilimlerinde tedavi amacıyla, çok geniş uygulama alanlarına sahip olması beklenmektedir. Totipotent yönlenme özelliklerine sahip embriyonik kök hücreleri, *in vitro* şartlarda üretilebilmekte ve farklılaşmaları kontrol edilebilmektedir. Embriyonik kök hücre dizileri, yapay kültür ortamlarında ve laboratuvar şartlarında çoğalabilirler ve sınırsız olarak çoğaltılıp canlı tutulabilirler (4, 28, 29, 38). Son birkaç yıl içerisinde yapılan çalışmalarda, uygun kültür şartlarında ve uyarımlar varlığında embriyonik kök hücrelerinin miyosit (kas hücresi), adiposit (yağ hücresi), kondrosit (kıkırdak hücresi), osteosit (kemik hücresi), kan hücreleri ve damar endotel hücrelerine farklılaşabileceği gösterilmiştir (25, 35). Bu farklılaşmalar özgün biyolojik, immünolojik, biyokimyasal, elektro fizyolojik ve moleküler çalışmalarla test edilerek doğrulanmıştır. Embriyonik kök hücrelerinin *in vivo* tedavi potansiyeli, bu hücrelerin ölümcül dozda radyasyon almış farelere enjeksiyonu takiben, kayıp kemik iliği kök hücrelerinin yeniden yapımını sağlamaıyla gösterilmiştir (12). Embriyonik kök hücre uygulamaları; başta kalp kası ve sinir hücresi gibi oldukça iyi farklılaşmış ve yaşamsal önemi fazla olan hücreleri de oluşturma gücüne sahiptir. Embriyonik kök hücreleri bu özelliği ile; alzheimer, parkinson, tip 1 diyabet, merkezi sinir sistemi hastalıkları, osteoartrit ve miyokart enfarktüsü gibi hastalıklarda tedaviye yönelik umut vaat etmektedir. Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, embriyonik kök hücrelerden elde edilmiş nöron ve nöron öncü hücrelerinin, kardiyomyositlerin, mast hücrelerinin ve insülin salgılayan hücrelerin başarılı bir şekilde nakledilmiştir. Bu hücrelerin alıcı organizmasında fonksiyonlarına devam ettiği, dokuda yaşadığı ve bölgeye uyum sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4, 16, 28).

5. Türkiye ve Dünyada Etik Kurallar

Ülkelerin yasal düzenlemelerinde, kök hücre araştırmaları için birbirinden farklı yaklaşımlar gözlemlenmektedir. Kimi ülkeler, araştırmalar ile ilgili oldukça sınırlayıcı bir yaklaşım içerisinde iken kimi ülkeler de bu ülkelere göre daha az sınırlayıcı yasal düzenlemelere yer verilmiştir. Kök hücre araştırmalarını felsefi, hukuki ve etik açıdan tartışıldığı biyoetik gibi pek çok alanda embriyonik kök hücre araştırmaları ile erişkin kök hücre araştırmaları ayrımı önem taşımaktadır (17). Özellikle embriyondan elde edilen hücrelerin deneysel amaçlı kullanımı etik değerler açısından oldukça tartışmalı bir konudur.

Kök hücre çalışmaları başladığından bu yana çalışmaların büyük bir bölümü, deney hayvanlarında gerçekleştirilmesine karşın; etik araştırmaların merkezinde daha çok insanlar yer almış ve insanların yaşayabileceği olası sorunlara odaklanılmıştır. Bu durum, hayvanların bu araştırmadaki konumuna ilişkin yeterince duyarlı davranılmadığını düşündürmektedir (17).

Türk hukukunda kök hücre ile ilgili uygulamaları düzenleyen yasa düzeyinde bir düzenleme bulunmamaktadır. Ülkemizde erişkin kök hücre araştırmalarının yapılmasını düzenleyen herhangi bir yasal düzenleme bulunmadığı gibi, erişkin kök hücre araştırmalarını engelleyen herhangi bir düzenleme veya hüküm de mevcut değildir (17). Kök hücre araştırmaları konusunda, Sağlık Bakanlığının 2005 yılında yayımlanan bir Genelge ve 2006 yılında yayımladığı bir Kılavuz mevcuttur (17). Ülkemizde insan embriyonik kök hücre çalışmaları ise yasaklanmıştır (29).

6. Sonuç

Dünya genelinde, embriyonik kök hücreleri üzerine araştırma yapan laboratuvarların sayısı hızla artmakta olup, kök hücrelerin özelleşmiş değişik hücre serilerine farklılaşmasını sağlayan çok sayıda protokoller geliştirilmiştir.

Sonuç olarak, bunca ilerlemelere rağmen hala, embriyonik kök hücrelerle ilgili, çözümlenmesi gereken pek çok problem bulunmaktadır. Çözümü gereken öncelikli konular arasında; embriyonik kök hücrelerinin özelleşmiş doku hücrelerine farklılaşabilmeleri için gerekli optimum kültür ortamlarının belirlenmesi, çoğalma sırasında embriyonik kök hücrelerin teratom oluşturucu potansiyellerinin ortadan kaldırılması ve immün tolerans kaygılarının giderilmesi gelmektedir (15, 29).

Kaynaklar

1. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Elder J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 2004; 70:837-45.
2. Baran ÖP, Nergiz Y, Bahçeci S. Göbek kordonu kan ve stromal kökenli hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşması. *Dicle Tıp Dergisi*, 2007; 34:233-8.
3. Beksaç M, Çörtoğlu S, Kansu E, Öztürk M. Kök hücre araştırmalarında güncel kavramlar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 2004; sayı:7.
4. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Iacsson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci*, 2002; 99:2344-9.
5. Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, 2004; 23(43):7150-60.
6. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* Doi, 2008; 10.1016/j.stem.2007.12.013.
7. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Lond FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280(5367):1256-1258 (Abstract).
8. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med*, 2004; 8, 4:465-73.
9. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent tail cells from mouse embryos. *Nature*, 1981; 292:154-6.
10. Graves KH, Moreadith RW. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 1993; 36:424-33.
11. Güneş AM. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *Güncel Pediatri*, 2005; 36-42.
12. Hollands P. Differentiation of embryonic haematopoietic stem cells from mouse blastocyst growing in vitro. *Development*, 1987; 99: 69-76.
13. Hyslop LA, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cell extraembryonic lineages. *Stem Cells*, 2005; 23: 1035-43.
14. Kahraman S, Candan ZN. İnsan embriyonik kök hücreleri. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci*, 2006; 43:21-5.
15. Kansu E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *ANKEM Dergisi*, 2006; 20(ek-2):1-8.
16. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell derived inducing activity. *Neuron*, 2000; 1(28):31-40.
17. Kutlay N, Gül RTB, Güven T, Sert G, Gün M, Erzik C. Kök hücre araştırmalarının etik ve hukuk boyutuna ilişkin rapor. *Türkiye Biyoetik Derneği Kök Hücre Araştırmaları ve Uygulamaları Kurulu*, 2009.
18. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma. *Stem Cells*, 1981; 78(12):7634-8.
19. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992; 70(5): 841-847.
20. Mitalipova M, Beyhan Z, First NL. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. *Cloning*, 2001; 3 (2):59-67.
21. Moore KA, Ema H, Lemischka IR. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic. *Stem Cells Blood*, 1997; 89 (12) :4337-47.
22. Peura TT, Bosman A, Stojanov T. Derivation of human embryonic stem cell lines. *Therigenology*, 2007; 67:32-42.

23. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2003; 21:546-56.
24. Robson P, Stein P, Zhou B, Schultz RM, Baldwin HS. Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, 2001; 234:317-29.
25. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Dev Biol*, 1998; 95:13726-31.
26. Sims M, First NL. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc of the Natl Acad of Sci*, 1994; 91:6143-7.
27. Smith AG. Embryo derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Dev Biol*, 2001; 17:435-62.
28. Soria B, Roche E, Berna G, Leon Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000; 49:157-62.
29. Sökmensüer LK, 2007. Embriyonik kök hücreler ve tedavi amaçlı kullanımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38: 15-9.
30. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur Jour Cancer*, 2006; 42(9):1257-72.
31. Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Bio of Repro*, 1996; 54:100-110.
32. Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Murdoch A, Strachan T, Stojkovic M. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005; 23:306-14.
33. Şenel F. Kök hücreler. *Bilim ve Teknik Dergisi Şubat (eki)*, 2002; 1-15.
34. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker R, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Dev Biol*, 1995; 92:7844-8.
35. Thomson JA, Itskovitz EJ, Sharipo SS, Vakniz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282 (5391):1145-7.
36. Türkşen K. İnsan embriyonik kök hücreleri izolasyon, idame ve farklılaşma (diferensiyasyon). *Türk Hematoloji Derneği 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Bursu*, 2006; 9-15.
37. Ural AU. Kök hücreler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği Dergisi*, 2006; 5(3-4):140-5.
38. Ural AU. Embriyonel ve mezodermal kök hücreler, *Türk Hematoloji Derneği*. Erişim adresi: http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/29_04_2006_ali_ugur_ural_10-30_11-00.pdf 2006. Erişim tarihi: 27.06.2008.
39. Van Stekelenburg-Harmers AE, Van Achterberg TA, Rebel HG, Flechon JE, Campbell KH, Weima SM, Mummery CI. Isolation and characterization of permanent cell lines from inner cell mass cells of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 1995; 40(4):444-54.
40. Verfaillie CM, Pera MF, Landsrop PM. Stem Cells Hype and Reality, *Hematology Am Soc Hem Edu Program*, 2002; 369-91.
41. Wang G, Zhang Y, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, Meng S, Feng J, Miao C, Ding M, Li D, Deng H. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 330 (3):934-42.
42. Wang L, Duan E, Sung LY, Jeong BS, Yang X, Tian XC. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod*, 2005; DOI:10.1095.

Yazışma Adresi :

Vet. Hek. Tahir KARAŞAHİN
Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
06852 Mamak/ANKARA
Tel : 0312 865 11 96-239
Cep : 0530 542 54 11
Fax : 0312 865 11 12
E-mail: tahirkarasahin@gmail.com