

KÖK HÜCRE ÇALIŞMALARI VE TERAPÖTİK KLONLAMA

(Derleme)

Oktay YILMAZ¹

Mehmet UÇAR^{1*}

Stem cell researches and therapeutic cloning (A review)

SUMMARY

In this review, it was aimed to give information on both the stem cell researches and therapeutic cloning.

Stem cells are the cells which have self-renewal property and differentiation potential into other cell types. Cloning can be described as the process of propagating a set of particular piece of DNA, genes and cells or production of the genetically identical individuals. Self-renewal and differentiation potential of stem cells into other cells have been used to consider for therapeutic aids.

It is extremely clear that the cloning and stem cell technologies are important research subjects. Although all this progression, it is still needed much more studies on these subjects.

KEY WORDS: Stem cell, therapeutic cloning.

ÖZET

Bu derlemede kök hücre çalışmaları ve terapötik klonlama ile ilgili bilgilerin aktarılması amaçlandı.

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Klonlama da DNA parçalarının, genlerin ve hücrelerin ya da orijinalinin aynısı bireylerin üretimi olarak tanımlanabilmektedir. Kök hücrelerin kendilerini yenileme potansiyelleri ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmeleri, değişik kök hücre kaynaklarından elde edilebilen bu hücrelerin tedavide kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Klonlama ve kök hücre teknolojilerinin insan ve hayvan sağlığı açısından önemli araştırma konuları olduğu gayet açıktır. Bütün bu ilerlemelere rağmen bu konular hakkındaki araştırmaların daha da fazla yoğunlaşması gerekmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Kök hücre, terapötik klonlama.

GİRİŞ

Günümüze kadar olan süreçte klonlama ve kök hücre teknolojileri hakkındaki tüm gelişmelere, hem bilim çevreleri hem de sosyal kuruluşlar oldukça ilgi göstermişlerdir. Yapılan pek çok çalışma ve halen devam eden araştırmalar bu iki teknolojinin insan ve hayvan sağlığı açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuş durumdadır. Her iki teknoloji çoğu zaman birbirlerinden farklı gelişimler göstermiş olsalar da günümüzde birbirlerini tamamlayan bir hal almışlardır.

Ondokuzuncu yüzyıldan bu yana gelişim gösteren klonlama teknolojisindeki ilerlemeler devam ederken kök hücreler hakkındaki çalışmalar da aynı şekilde bir gelişim göstermiştir. Kök hücre araştırmalarının gelişim süreci memeli yumurtalarını

vücut dışında (in vitro ortamda) fertilize etme girişimleriyle 1878 yılında başlamıştır. 1959 yılında ise in vitro fertilizasyon ile ilk hayvan (tavşan) elde edilmesi (Trounson ve ark. 2000), 1960 yılında da farelerde şekillenen teratokarsinomların embriyonik germ hücrelerinden kaynaklandığının ortaya konulması (Friedrich ve ark. 1983) araştırmalara ivme kazandırmıştır.

Downing ve Battey (2004), implantasyonun son evresindeki fare embriyolarının pluripotent hücreler (her dokuya dönüşebilme özelliği olan hücreler) içerdiğinin tespit edilmiş olmasına rağmen, bu hücrelerin in vitro ortamda kültüre etme girişimlerinin başarısızlıkla sonuçlandığını belirtmektedirler. Embriyo gelişimi için hücre hatlarının kullanılması çalışmalarındaki in vitro sistemler in vivo koşullarda oluşturulan teratokarsinomlardan sağlanabilmektedir.

1. AKÜ, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, AFYONKARAHİSAR

*E-posta: mucar@aku.edu.tr

Bu teratokarsinom hücre hatlarının pluripotent embriyonik kök hücrelerle (EKH) pek çok morfolojik, biyokimyasal ve immünolojik özellikleri paylaştığı fakat kültüre edilme girişimlerinde transformasyona ve karyotipik değişikliklere uğradığının belirlendiği bildirilmektedir (Downing ve Battey 2004).

Teratokarsinom hücre hatları hakkında 1981 yılında kazanılan deneyimler neticesinde implantasyonun son evresindeki embriyoların ektopik bölgelere transferinin pluripotent kök hücreleri içeren teratomlara neden olduğu ortaya konulmuştur (Downing ve Battey 2004). Bunun sonrasında Evans ve Kaufman (1981) ile Martin (1981) blastosist safhasındaki fare embriyolarının iç hücre kitlesi (İHK)'nden pluripotent özellikteki bu EKH'leri elde ettiklerini ve kültürde çoğaltmayı başardıklarını belirtmektedirler. EKH'lerin blastosistler içerisine transferini takiben ilk kimerik canlılar elde edilerek, EKH'lerin yetişkin bir canlının bütün dokularını oluşturabileceği ortaya konulmuştur (Wobus 2001). İnsan blastosistlerinin İHK'nden insan EKH'lerinin elde edilmesi ve kültür ortamında çoğaltılmasının başarılması (Thomson ve ark. 1998), kök hücre teknolojisindeki araştırmaların embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler üzerinde yoğunlaşmasına sebep olmuştur.

1. KÖK HÜCRE TİPLERİ VE KAYNAKLARI

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olan, bu özelliklerini kendilerine özgü olan sinyaller vasıtasıyla gerçekleştiren hücrelerdir. Çoğu doku tipinin oluşumunu sağlayan prekürsör hücreler olan kök hücreler pek çok yetişkin memeli dokusunda tanımlanabilmektedir. Epitel ve kan gibi bazı dokularda normal hücre yaşlanma veya hasardan dolayı kaybolan hücrelerin tekrar yapılmasına katkı sağlamaktadırlar. Bununla birlikte, sınırlı bir hücre rejenerasyona sahip olan beyin ve pankreas gibi diğer yetişkin organlarda da bulunmaktadır (Odorico ve ark. 2001).

Totipotent kök hücreler, vücudun her hücre tipini oluşturabilen, tam olarak fonksiyonel bir organizmanın gelişimini sağlayabilen hücrelerdir (Chapman ve ark. 1999). Ayrıca memelilerde bir totipotent kök hücre, yani fertilize olmuş bir oosit, yaklaşık 200 özelleşmiş somatik hücre tipini içeren kompleks bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Wobus 2001). Pluripotent kök hücreler (blastosist safhasındaki embriyolarda) ise vücudun herhangi bir hücre tipini oluşturabilme potansiyeline sahip olan hücrelerdir (Whittaker 2005).

Bununla birlikte, erişkin organizmada multipotent kök hücre olarak adlandırılan, bazı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerin de bulunduğu bilinmektedir (Whittaker 2005). Kemik, kas, kıkırdak, yağ ile diğer bağ ve destek dokularını oluşturabilme kapasitesine sahip olan mezenşimal kök hücreler spesifik bir multipotent kök hücre tipidir (Chapman ve ark. 1999).

Unipotent kök hücreler (yetişkin dokularda) ise sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir (Whittaker 2005).

1. 1. Embriyonik kök hücreler

Blastosist İHK'nden oluşan EKH'ler, in vitro olarak sonsuz şekilde üreme potansiyeline sahip, normal ve dengeli bir karyotipte olan pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler in vivo ve in vitro ortamlarda üç germ tabakasından köken alan farklı hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler (Shufaro ve Reubinoff 2004).

EKH'ler transgenik hayvanların üretiminde kullanılan başlıca kaynaklardandır (Auerbach ve ark. 1996). Yetişkin dokulardaki kök hücreler tipik olarak sadece sınırlı sayıda hücre tipini şekillendirirken, EKH'ler hemen her hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler (Odorico ve ark. 2001).

Manüplasyona uğramamış blastosist safhasındaki embriyoda, İHK'ndeki kök hücreler gastrulasyon sırasında, vakit kaybetmeden üç embriyonik germ tabakasını meydana getirmeye yönelmektedirler (Odorico ve ark. 2001). EKH'ler ve embriyonik germ hücreleri sadece in vivo olarak gelişim göstermeyip, ayrıca in vitro ortamda da endodermal (pankreatik hücreler), ektodermal (deri, nöronlar) ve mezodermal (kan, kalp hücreleri, kıkırdak, endotelial hücreler, düz kas hücreleri) hücre tiplerine farklılaşabilmektedir (Wobus 2001, Koh ve Atala 2004). İHK hücreleri normal embriyonik çevreden uzaklaştırılıp uygun şartlar altında kültüre edildiklerinde sonsuz sayıda çoğalabilen hücrelere dönüşebilmektedir. Kültür içerisinde farklılaşmadan çoğalırken üç embriyonik germ tabakasını şekillendirebilecek farklılaşma potansiyelini de devam ettirmektedir İHK hücreleri, pluripotent fare, primat ve insan EKH'lerinin elde edildiği kaynak hücreler olarak değerlendirilmektedir (Odorico ve ark. 2001).

Fare EKH'ler, antikor/komplement reaksiyonu yardımıyla trofoektoderm lizisini içeren immünocerrahi metoduyla elde edilmektedir (Evans ve Kaufman 1981). İzole edilen İHK hücrelerinin, fare EKH'lerinin farklılaşmasının engellenmesi amacıyla bu hücreler fare embriyonik fibroblast (FEF) besleyici katmanıyla birlikte kültüre edilmektedir. Fare EKH'lerinin elde edilmesi ve kültürü hakkında yapılan çalışmalar sonrasında insan EKH'lerinin temini ve çoğaltılmasında mitozla bölünmeyen FEF'ların besleyici katman olarak kullanıldığı ve ilk kültür medyumun Dulbecco'nun, %20 oranında fetal sıçır serumu (FSS), 1 mM glutamin, 0.1 mM β-merkaptolan ve %1 oranında esansiyel olmayan amino asit ilavesiyle modifiye edilen Eagle medyum olduğu aktarılmaktadır (Moon ve ark. 2006).

Günümüzde immünocerrahi metodu, küçük ve belirsiz İHK hücreleri taşıyan blastosistlerin oluşumuna neden olmakta ve hayvan patojenleriyle kontaminasyon riski taşımaktadır. Bu nedenle parsiyal (Kim ve ark. 2005) ve tüm embriyo kültür metodları geliştirilmiştir (Moon ve ark. 2006). Tüm

embriyo metodu, blastosistin zona pellusidası olmadan, doğrudan besleyici bir katmana ekilmesini ifade eder. Parsiyal embriyo kültürü metodu ise küçük İHK hücrelerine sahip blastosistlerin kültürünü ifade etmektedir (Moon ve ark. 2006).

Kültürden elde edilen EKH'ler, ektodermal hücrelere diferensiyasyon olarak sinir hücrelerine; endodermal hücreler diferensiyasyon olarak pankreatik β hücreleri ve karaciğer epitel hücrelerine; mezodermal hücreler de kemik, kas, kan, kıkırdak hücreleri ile bağ ve destek dokularını oluşturabilmektedirler (Moon ve ark. 2006).

1.2. Yetişkin tip kök hücreler

Geçmişte pek çok dokunun, endojen bir kök hücreye sahip olmamasından dolayı zarar gördüğünde kendini rejenere etme yeteneğinin olmadığı düşünülmekteydi. Yapılan çalışmalarla pek çok yetişkin dokunun da rejeneratif onarım kapasitesine sahip olduğunun ortaya konulmasıyla, yetişkinlerdeki bazı dokuların da (deri, hematopoietik sistem, kemik ve karaciğer) yenilenme ve onarım yeteneklerinin kök veya progenitor hücrelerin varlığına işaret ettiği belirlenmiştir (Vats ve ark. 2005).

Yetişkin tip kök hücreler, dokularda az sayıda bulunan, spesifik bölgelerde lokalize olan, bireyin ömrü boyunca hayati önemde olan doku bütünlüğünün devamlılığını sağlayan hücrelerdir (Schwab ve ark. 2005). Organizmanın o anki yaşı ne olursa olsun dokularında bulunan kök hücreler, yetişkin kök hücreler olarak değerlendirilmektedir (Chapman ve ark. 1999). Multipotent bir kök hücre olan yetişkin kök hücreleri (Whittaker 2005), EKH'ler ve embriyonik germ hücreleriyle karşılaştırıldığında daha düşük pluripotensiyeye sahiptirler (Chapman ve ark. 1999). Bununla birlikte, yetişkin kök hücreler de sahip oldukları asimetrik hücre bölünme potansiyeliyle hemen hemen sınırsız bir şekilde kendilerini yenileme kabiliyetine sahiptirler. Diferensiyasyon durumundaki hücrelerle ortak bazı yüzey işaretlerine sahip olmalarından dolayı tanımlanabiliyorlar. Yetişkin kök hücreleri güçlü olmakla birlikte, klonojenik aktivite gibi fonksiyonel özelliklerine göre tespit edilebilmektedirler (Schwab ve ark. 2005).

Kök hücreler normal şartlar altında birbiri ardı sıra gerçekleşen bölünme ve farklılaşma safhalarından sonra ilgili dokunun hücrelerini oluşturan progenitor hücrelere dönüşürler. Yetişkin kök hücreler retina, akciğer, kalp kası, iskelet, kas, bağırsaklar, böbrek, dalak, kemik iliği, kan ve deri gibi dokuların oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (Grove ve ark. 2004).

Yetişkin kök hücreler üzerindeki en kapsamlı çalışmalar immun sistem ve kan yapımını sağlayan hematopoietik kök hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Masson ve ark. 2004). Hematopoietik progenitor hücre kaynağı olarak kemik iliği, periferik kan ve göbek kordonu kanı hayati öneme sahiptir (Cuneo ve ark. 2004). Kemik iliği, hematopoietik kök ve mezenşimal kök

hücrelerine diferensiyasyon olma potansiyeline sahip olan stromal hücrelerin yapımını da üstlenmektedir (Masson ve ark. 2004).

İlk olarak mezenşimal kök hücreler veya kemik iliği stromal hücreleri olarak bilinen fibroblast koloni formları 1974 yılında tanımlanmıştır (Vats ve ark. 2005). Bunu takiben 1999 yılında bu hücreler çoğalma faktörleri kullanılarak in vitro kültürlerde saflaştırılıp üretilerek osteoblast, kondrosit ve adipositler elde edilmiştir (Vats ve ark. 2005). Yapılan çalışmalarda mezenşimal kök hücrelerin kemik, kas ve diğer dokuların onarımı için mutlaka gerekli olduğu tespit edilmiştir (Chapman ve ark. 1999). Kemik iliği kaynaklı kök hücreler iskelet ve kalp kası, karaciğer, deri, bağırsak, akciğer, pankreas, böbrek ve merkezi sinir sistemine ait dokulara diferensiyasyon olabilmektedirler (Grove ve ark. 2004). Bununla birlikte, beyin gibi düşük rejeneratif potansiyele sahip dokularda da nöronal kök hücreler bulunmakta ve aktive olabilmektedirler (Wobus 2001).

Kemik iliğindeki hematopoietik kök hücreler nöronal, myojenik ve hepatik hücre tiplerine diferensiyasyon olabildikleri gibi sinir ve kas kök hücreleri de hematopoietik kök hücrelere dönüşebilmektedir. Dolayısıyla da yetişkin kök hücrelerin yüksek bir plastisiteye sahip oldukları ve gelişim ve diferensiyasyon potansiyellerinin de sınırlı olmadığı ileri sürülmektedir (Wobus 2001).

Olgun hematopoietik progenitor hücrelerin 1974 yılında göbek kordonu kanında bulunduğu ortaya konulmasından sonra yapılan çalışmalarda, bu kanın hematopoietik kök hücre bakımından oldukça zengin olduğu ve kemik iliği ile büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Mayani ve Lansdorp 1998).

Yetişkin kök hücreler yüksek farklılaşma potansiyeline sahip olmakla birlikte embriyonik ve fetal kök hücrelerininkine kadar yüksek çoğalma potansiyeline sahip değildirler. Üstelik çevresel faktörlere bağlı olarak oluşan DNA anomalileri ve genetik defektlere sahip olduklarından transplantasyon için uygun olmayabilmektedirler (Wobus 2001).

Embriyonik ve yetişkin kök hücreler dışında fetal dokulardan da kök hücreler elde edilebilmektedir (Lisker 2003). Mezenşimal kök hücreler fetal kan hücrelerinden elde edilmektedir. Bu hücreler, kültürde 20-40 pasaj sonunda kemik, kıkırdak, oligodentositler ve hematopoietik hücrelere farklılaşabilmektedirler. Bununla birlikte bu hücreler sadece gebeliğin ilk üç aylık periyodunda bulunmalarının yanı sıra fetal karaciğer epitel hücreleriyle ve kemik iliğindeki hematopoietik popülasyonlara da benzerlik göstermektedirler (Vats ve ark. 2005).

2. KLONLAMA

Klon ifadesi ilk olarak 1903 yılında Webber tarafından, tek bir atadan eşeysiz olarak üreyen organizmaların oluşturduğu kolonileri tanımlamak için kullanılmıştır. Klonlama bugünkü anlamıyla DNA

parçalarının, genlerin ve hücrelerin ya da orijinalinin aynı bireylerin üretimi olarak tanımlanabilmektedir (Lisker 2003).

Yetişkin bir omurgalıda doğal klonlama, sınırlı bir biçimde identikal ikizlerin formasyonu ile meydana gelmektedir. Yumurta sperm tarafından döllenmesiyle oluşan bir zigottan sağlanan embriyolar genetik olarak identiklidir (Rossant 1997).

2.1. Embriyonik hücre klonlaması

Hayvan klonlamaya ilgili büyük girişimler, yeni bir ekonomik eğilim dalgasının tarımla ilgili bilim dallarına yönelik araştırmaları maddi olarak desteklemeye başladığı 1980'li yıllara kadar ortaya çıkmamıştır (Bowring 2004).

Memelilerdeki ilk başarılı nükleus transferi, donör olarak embriyonik hücreleri kullanan Illmensee ve Hoppe (1981) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar erken embriyo hücre çekirdeklerinin enükle edilmiş zigotlara (1-hücreli embriyolar) transplantasyonu ile üç fare elde etmişlerdir. Willadsen (1986) ise alıcı (resipient) zigot yerine oositleri kullanarak olgun 8 blastomerli bir embriyodan alınan bir hücre nükleusu ile çok önemli bir buluş olan, ilk klonlanmış memeliyi, bir koyunu ürettiğini bildirmektedir. Birçok embriyologdan farklı olarak Willadsen farklılaşmanın ileri aşamasındaki hücrelerden klonlar üretmiştir (Bowring 2004). Willadsen'in çalışmaları önderliğinde, aynı prensibi kullanılmasıyla sığır ve domuz gibi diğer evcil türlerde de embriyonik hücre klonlamasından olan yavruların doğumu gerçekleştirilmiştir (Vajta ve Gjerris 2006).

2.2. Somatik hücre nükleer transferi (SHNT)

Yapılan pek çok çalışmada, donör nükleuslar için kaynak olarak embriyonik hücreler kullanılmıştır (Vajta ve Gjerris 2006). Bu yöntemle yapılan deneyler, erken dönemdeki embriyonik hücrelerin tamamen bir hayvanı şekillendirecek bütün potansiyele sahip olduğunun, yani totipotent olduğunu ispatlanması açısından bilimsel olarak oldukça önemlidir. Gelişim aşamaları ilerledikçe, hücreler özel hücre tiplerine farklılaşmaları yanında, tersine bir değişimle kısa bir süre içinde gelişiminin başladığı noktaya geri de dönebilmektedir. İlk kez amfibianlarda gerçekleştirilen nükleer transfer deneyleri sonucunda farklılaşma aşamasındaki olayların bir şekilde geri döndürülmesi halinde, farklılaşmanın ileri aşamasındaki yetişkin hücrelerden bile yeni canlıların üretilmesinin mümkün olduğu ortaya konmuştur (Rossant 1997).

Briggs ve King (1952), kurbağa yumurta nükleuslarının çıkartılması (enüklasyon) ve takiben farklı bir kurbağa blastomerinden alınan nükleusun, enükle edilen yumurtaya enjeksiyonuyla (nükleer transplantasyon) genetik olarak çekirdeği nakledilen kurbağa ile aynı özellikte kopya kurbağa yavruları üretmişlerdir. Daha sonra Gurdon (1962) ve Gurdon

ve ark. (1975) intestinal epitel hücresi ve keratinize deri epitel hücresi nükleuslarını da kurbağa klonlamada kullanmışlardır. Ayrıca buna benzer şekilde başka çalışmaların da gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Rossant 1997).

Fötal deri hücrelerinden 1995 yılında bir koyunun klonlanması ve iki kuzunun doğumunu (Campbell ve ark. 1996), 1996 yılında ergin dişi bir koyunun meme bezi epitel hücresinden klonlanan Dolly isimli kuzunun doğumu takip etmiştir (Wilmut ve ark. 1997). Dolly'nin, ergin meme bezi epitel hücresi nükleusları ve enükle edilmiş oositler arasındaki 247 başarılı füzyonun 29'unun (%12) blastosist safhasına kadar geliştirilmesi ve transfer edilen 29 blastosistin 1'inin gelişimine devam etmesiyle dünyaya geldiği belirtilmektedir (Wilmut ve ark. 1997).

2.3. Klonlamanın verimliliği

Klonlamanın verimlilik hedefi sağlıklı, fertil yavrular elde edilebilmesi olduğu için sağlıklı yavruların üretim oranının temel alınması gerekmektedir. Taşıyıcı annelere transfer edilen blastosistlerden gelişen orta dönemdeki fütüslerin oranına göre ya da nükleus transferi yapılan oositlerin tamamından gelişen canlı yavruların oranına göre hesaplama yapılmakta ve ilk yöntemle yapılan hesaplamada daha yüksek bir oran elde edilmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda nükleus transferinde kullanılan oositlerin sayıları bildirilmediği için bu yöntemle başarı oranının kesin olarak hesaplanması mümkün olmamaktadır. Klonlamadaki gerçek başarı oranı, nükleus transferi için manüple edilen oositlerin tamamından gelişen canlı yavruların sayısı dikkate alındığında oldukça düşüktür (Yanagimachi 2002).

3. KÖK HÜCRE TEDAVİSİ VE TERAPÖTİK KLONLAMA

Kök hücrelerin kendilerini yenileme potansiyeli ve farklı hücre tiplerine değişebilmesi (Odorico ve ark. 2001), farklı kök hücre kaynaklarından elde edilebilen bu hücrelerin tedavide kullanılabileceğini düşündürmüştür.

EKH'ler, diğer kaynaklardan elde edilen kök hücrelerle karşılaştırıldığında farklı hücre tiplerine diferensiyel olma yeteneklerinin daha güçlü olması nedeniyle, tedavisi zor olan pek çok hastalıkta kullanılabilecek hücre kaynaklarıdır. Bununla birlikte immünolojik ret olayı, EKH'lerle yapılan hücre tedavisi uygulanmasında da temel problemlerden biridir (Moon ve ark. 2006).

Dejeneratif hastalıklar ve yaralanmaların tedavisinde kök hücre tedavisinin muhtemel rolü hakkında yoğun tartışmalar yapılmaktadır (Whittaker 2005). Bununla birlikte, sınırlı sayıda hücre tiplerinin disfonksiyonu ve/veya yıkılmasından oluşan, pankreatik adacık hücrelerinin tahrip olduğu diabetes mellitus ve beyin özel bir bölgesindeki dopaminerjik nöronların yıkılmasından oluşan Parkinson hastalığı gibi hastalıklar EKH nakli ile

tedavi edilebilmektedir. Ayrıca hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, pluripotent veya fötal kök hücrelerin transplantasyonu ile diyabet, Parkinson hastalığı, travmatik medulla spinalis hasarı, Pürkinje hücre dejenerasyonu, karaciğer ve kalp yetmezliği, kas distrofisi ve osteogenesis imperfekta gibi çeşitli kronik hastalıkların başarılı bir şekilde tedavi edilebildiğini ortaya koymuştur (Odorico ve ark. 2001).

EKH'lerden üretilen kardiomyosit ve hepatositler toksikoloji açısından da ideal hücre popülasyonlarını sağlayabilmektedir. Bu hücreler kullanılarak hayvan modellerinin kullanıldığı tekniklerle tespit edilemeyen ilaçların toksisitesi de belirlenebilmektedir (Keller 2005).

Kemik iliğinden sağlanan progenitorler nekroz sonucu hasar gören kalp kasına göç ederek kalp fonksiyonlarını geliştirebilmektedir (Vats ve ark. 2005). Hematopoietik ve mezenşimal kök hücreler gibi kemik iliğinde bulunan somatik kök hücreler lösemi tedavisi ile iskelet rejenerasyon tedavilerinde klinik kullanım alanı bulmaktadır (Wobus 2001).

Göbek kordonu kanı kök hücreleri de farklı malign kan hastalıklarında alternatif bir tedavi seçeneği olup, en iyi sonuçlar akut lösemi, kemik iliği hipoplazisi, hemoglobinopatiler ve bazı immün yetersizliklerde elde edilmektedir (Cuneo ve ark. 2004).

İnsan EKH'lerinin elde edilmesi için insan embriyolarının parçalanması gerektiğinden Koh ve Atala (2004) EKH'ler üzerinde yapılan çalışmaların etik ve politik problemlere yol açabileceğine dikkat çekmişlerdir. Terapötik klonlama ise EKH üretiminde etik ve politik tartışmaları ortadan kaldıran alternatif bir yol olarak kabul edilmektedir.

Dolly'de kullanılan metot (terapötik klonlama) uygulanarak önce hastanın somatik hücrelerinin enüklasyon uygulanan insan yumurta hücreleriyle füzyona uğratılması, takiben kültüre edilmesiyle blastula aşamasına kadar gelişen embriyolardan alınacak olan EKH'lerin spesifik prekürsör hücrelere ve somatik hücrelere diferansiye oldukları gösterilmiştir. Bu yolla elde edilen hücreler, hastanın kendi genetik yapısına sahip olduğundan (mitokondriyal DNA hariç), immünolojik uyumsuzluk sorunu ortaya çıkmamaktadır (Wobus 2001).

Hwang ve ark. (2004), terapötik klonlama olarak adlandırılan somatik hücre nükleus transferi (SHNT) metodunu EKH'ler elde etmek amacıyla uygulamışlardır. Araştırmacılar 16 gönüllüden 242 oosit toplamış ve bu oositlerden metafaz II aşamasına ulaşan 176 oositi SHNT için değerlendirmişlerdir. Donörlerin kendi kumulus-oosit komplekslerinden izole ettikleri kumulus hücrelerini yine donörlerin kendi enüklasyon uygulanan oositleri ile füzyona tabi tutmuşlardır. Sığır SHNT yöntemindeki gibi füzyon ve aktivasyon arasında genetik saatin geriye programlanması için 2 saatlik bir süre beklemişlerdir. Bununla birlikte, spermin yapacağı aktivasyon etkisini çeşitli kimyasal, fiziksel ve mekanik ajanlarla sağlayarak normal karyotipe sahip ve somatik nükleer donör hücrelerle genetik olarak identikal

SHNT-insan embriyonik kök hücrelerini elde etmişlerdir.

SONUÇ

İstenilen özellikte, genetik olarak identikal bireylerin üretilmesine izin veren klonlama teknolojisi ile pek çok hastalığın tedavisinde bir çözüm olarak değerlendirilen kök hücre teknolojisinin insan ve hayvan sağlığı açısından günümüzün popüler araştırma konuları arasında olduğu gayet açıktır.

Kök hücre ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin farklılaşma özelliklerinin kontrol edilmesi, in vitro kültür işlemlerinde uygun ortamın sağlanması, elde edilen kök hücrelerin transplantasyonda kullanımı ve en önemlisi transplante edilen hücrelerin alıcı tarafından immün reaksiyonlar sonucu reddedilmesindeki mekanizmaların tam anlamıyla ortaya konulması gerekmektedir. İşte bu noktada, klonlama teknolojisi yardımıyla genetik olarak identikal, aynı karyotipte ve sonuçta alıcı tarafından immünolojik reaksiyonlarla reddedilmeyen kök hücrelerin üretilmesi ve kullanılması araştırmalara yeni bir boyut kazandırmıştır.

Bütün bu ilerlemelere rağmen daha sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için bu iki teknoloji üzerinde bilim adamlarının daha fazla yoğunlaşmasının gerektiği görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Auerbach R, Huang H. and Lu L (1996) Hematopoietic stem cells in the Mouse embryonic yolk sac. *Stem Cells*; 14: 269–280.
- Bowring F (2004) Therapeutic and reproductive cloning: a critique. *Soc Sci Med*; 58: 401–409.
- Briggs R. and King TJ (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Nat Acad Sci USA* 38, 455–463.
- Campbell KHS, McWhir JM, Ritchie WA. and Wilmut I (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*; 380: 64–66.
- Chapman R, Frankel MS, Garfinkel MS (1999) Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research. *Am Assoc Adv Sci Inst Civil Soc*; 34: 405–416
- Cuneo S, Rangel R, Ruvalcaba L, Chanona J, Batiza V, Bermudez A, Gallardo E, Muniz M (2004) Stem cells from umbilical cord blood as a source for future genetic and therapeutic uses in patients from IVF donation programs. *International Congress Series*; 1271: 167–170.
- Downing GJ. and Battey J (2004) Technical assessment of the first 20 years of research using Mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*; 22: 1168–1180.
- Evans MJ. and Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*; 292: 154–156.

- Friedrich TD, Regenass U, Stevens LC (1983) Mouse genital ridges in organ culture: the effects of temperature on maturation and experimental induction of teratocarcinogenesis. *Differentiation*; 24: 60–64.
- Grove JE, Bruscia E. and Krause DS (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cell*; 22: 487–500.
- Gurdon JB (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*; 10: 622–640.
- Gurdon, JB, Laskey, RA. and Reeves OR (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol*; 34: 93–112.
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB. and Moon SY (2004) Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*; 303: 1669–1674.
- Illmensee K. and Hoppe PC (1981) Nuclear transplantation in *mus musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*; 23: 9–18.
- Keller G (2005) Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new area in biology and medicine. *Gen Dev*; 19: 1129–1155.
- Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW. and Moon SY (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*; 23: 1228–1233.
- Koh CJ. and Atala A (2004) Therapeutic cloning applications for organ transplantation. *Trans Immunol*; 12: 193–201.
- Lisker R (2003) Ethical and Legal Issues in Therapeutic Cloning and the Study of Stem Cells. *Arch Med Res*; 34: 607–611.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early Mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78: 7634–7638.
- Masson S, Harrison DJ, Plevris JN. and Newsome PN (2004) Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. *Stem Cell*; 22: 897–907.
- Mayani H. and Lansdorp PM (1998) Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell*; 16: 153–165.
- Moon SY, Park YB, Kim DS, Oh SK. and Kim DW (2006) Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. *Mol Ther*; 13: 5–14.
- Odorico JS, Kaufman DS. and Thomson JA (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*; 19: 193–204.
- Rossant J (1997) The science of animal cloning In: National Bioethics Advisory Commission (NBAC). *Cloning Human Beings. Volume II: Commission Papers*, Rockville, MD: National Bioethics Advisory Commission (NBAC): B1-B21.
- Schwab KE, Chan RWS. and Gargett CE (2005) Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril*; 84: 1124–1130.
- Shufaro Y. and Reubinoff BE (2004) Therapeutic applications of embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obs Gyn*; 18: 909–927.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS. and Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 282: 1145–1147.
- Trounson AO, Gardner DK, Baker G, Barnes FL, Bongso A, Bourne H, Calderon I, Cohen J. and Dawson K (2000) *Handbook of in vitro fertilization*. Boca Raton, New York, Washington DC, CRC Press.
- Vajta G. and Gjerris M (2006) Science and technology of farm animal cloning: State of the art. *Anim Reprod Sci*; 92: 211–230.
- Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R. and Polak JM (2005) Stem cells. *Lancet*; 366: 592–602.
- Whittaker PA (2005) Therapeutic cloning: The ethical limits. *Toxic Appl Pharmacol* 270, 689–691.
- Willadsen SM (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*; 320: 63–65.
- Wilmut, I., Schnieke, AE., McWhir, J., Kind, AJ. and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*; 385: 810–813.
- Wobus AM (2001) Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspec Med*; 22: 149–164.
- Yanagimachi R (2002) Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol*; 187: 241–248.