

# Embriyonik Kök Hücreler

## Embryonic Stem Cells: Review

Dr. H. Banu ÖZEL,<sup>a</sup>  
Dr. Enver OZAN,<sup>a</sup>  
Dr. D. Özlem DABAK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD,  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ

Geliş Tarihi/Received: 06.04.2007  
Kabul Tarihi/Accepted: 21.06.2007

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. H. Banu ÖZEL  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji ABD, Elazığ  
TÜRKİYE/TURKEY  
banuuysal@yahoo.com

**ÖZET** Embriyonik kök hücreler memeli blastosistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen özel pluripotent hücrelerdir. Kendini yenileme ve her üç germ tabakasının da hücrelerine farklılaşabilme yetenekleri rejeneratif tıpta kullanılabilirlikleri umudunu doğurmuştur. İnsan embriyonik kök hücreleri bazı hastalıklarda transplantasyon tedavisi yönünden değerli olmalarına rağmen, çeşitli nedenlerle kullanımları sınırlıdır. Bu derlemede embriyonik kök hücrelerin genel özellikleri, elde edilme, transfer, çoğaltılma ve farklılaştırılma teknikleri özetlenmiştir. Ayrıca genetik alıcıyla uyumlu transplantlar elde edilmesinde kullanılan genetik manipülasyon yöntemleri irdelenmiştir. Kök hücre çalışmaları insan sağlığı için umut vaat eden çok önemli alanlardan biridir ancak klinik uygulamaların başlayabilmesi için daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Embriyonik kök hücreler; pluripotent kök hücreler

**ABSTRACT** Embryonic stem cells are unique pluripotent cells derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts. Their abilities of renewal and differentiate to cells of the three germ layers provided hope for their use in regenerative medicine. Although human embryonic stem cells are valuable for transplantation therapy of various diseases, some factors limit their clinical use. In this review, properties of embryonic stem cells and techniques for their derivation, propagation and differentiation are summarized. In addition, genetic manipulation methods to obtain transplants that are genetically compatible with the host are examined. Stem cell studies are among the most promising areas of research for human health; however, further studies are needed before clinical practice.

**Key Words:** Embryonic stem cells; pluripotent stem cells

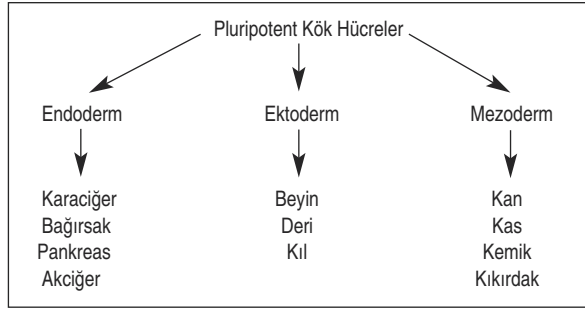
**Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008, 28:333-341**

**K**ök hücre (KH) biyolojisi günümüzde biyomedikal araştırmaların en heyecan verici alanlarından biridir ve bu teknolojinin rejeneratif tıpta uygulanmasına duyulan heves giderek artmaktadır.<sup>1</sup> KH'ler kendini yenileme ve bir ya da daha fazla özelleşmiş hücre tipine farklılaşma üzere 2 temel özelliğe sahiptirler.<sup>2,3</sup> KH'ler farklılaşabilme yeteneklerine göre sınıflandırılırlar.<sup>4</sup> Totipotent KH'ler embriyonun, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların kaynağını oluşturan hücrelerdir.<sup>5</sup> Pluripotent KH'ler 3 germ tabakasına; ektoderm (nöron, deri vs.), mezoderm (kas, kemik vs.) ve endoderm (hepatosit, pankreatik β hücresi vs.)'e farklılaşabilirlerken, multipotent KH'ler tek bir doku ya da germ tabakasının hücrelerine farklılaşabilen KH'lerdir.<sup>4</sup> Pluripotent KH'ler-

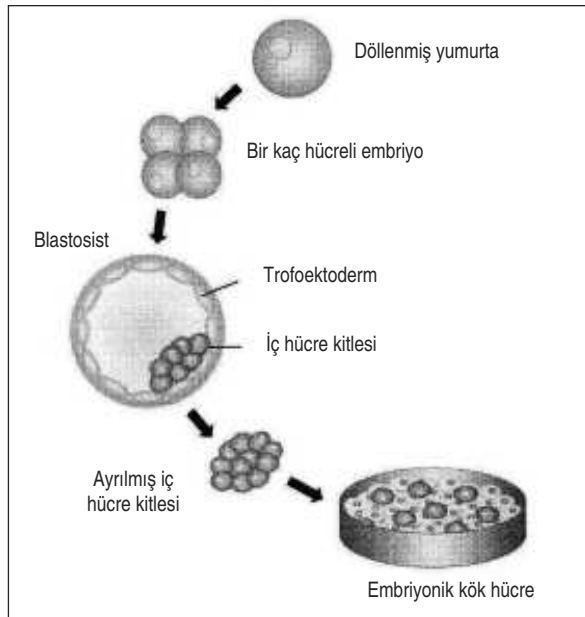
den gelişen doku ve organlar aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 1).

Embriyonik kök hücreler (EKH), memeli blastosistindeki iç hücre kitlesi (İHK)'nden elde edilen özel pluripotent hücrelerdir (Şekil 2).<sup>4,6</sup> Fertilizasyondan sonra içi sıvı dolu küre şeklindeki blastosist yapısı bir dış hücre tabakası bir de İHK'sinden oluşur. Dış hücrelerden trofoektoderm ve daha sonra da plasenta ve diğer destek dokular meydana gelir. İHK hücreleri ise vücuttaki tüm dokuları oluşturmaktadırlar ve bu nedenle pluripotenttirler.<sup>7</sup>

Diğer pluripotent hücre tipleri ise embriyonik karsinoma ve embriyonik germ hücre (EGH)'leridir.<sup>8-10</sup> Embriyonik karsinoma kök hücreleri (EKKH) kültürde yayılarak çoğalır ve ayrıca 3



ŞEKİL 1: Pluripotent kök hücrelerinden gelişen doku ve organlar.



ŞEKİL 2: İç hücre kitlesinden embriyonik kök hücrelerin elde edilmesi.

germ tabakasının türevlerini in vitro ya da in vivo teratokarsinoma oluşturarak meydana getirirler.<sup>11</sup> Araştırmacılar tümörlerden kültüre edilen hücre dizilerinin potansiyel değerini fark etmişlerdir. Bununla birlikte EKKH'leri sıklıkla kromozomal anomal taşımaları ve birçok doku tipine farklılaşma yeteneklerinin sınırlı olması gibi bazı dezavantajlara sahiptirler.<sup>12</sup> İnsan ve fare EGH nesilleri ise genital kabartılardaki primordial germ hücrelerinden fertilizasyondan sonraki 5.-9. haftalarda elde edilirler.<sup>10</sup>

## EKH'LERİN ÖZELLİKLERİ

Fare EKH'lerinin özellikleri, EKH özelliklerinin tanımlanmasında bir referans sağlar. Anahtar özellikler şunlardır; EKH'ler pluripotent hücre popülasyonundan elde edilmiş ve stabil olarak diploid olmalıdırlar. Primitif embriyonik durumunda sonsuz miktarda çoğaltılabilmeli ve kültürde uzamış pasajları takiben normal karyotiplerini korumalıdırlar. Greftten sonraki teratomalarda ve in vitro uygun koşullar altında 3 germ yaprağının çeşitli hücre tiplerine, alıcı blastosiste kolonize olduğunda da vücuttaki herhangi bir hücre tipine farklılaşabilmelidirler.<sup>12,13</sup>

EKH'lerin pluripotentliği geleneksel olarak 3 farklı yaklaşımla saptanır. Fare EKH'leri fare embriyolarına transfer edilirler, kimerik embriyonun tüm somatik dokularını oluştururlar. İkinci yaklaşım EKH'lerin in vivo 3 germ tabakasının da türevlerine farklılaştığının gösterilmesidir. İnsan EKH'leri immün yetersiz farelere enjekte edildiklerinde teratomaları oluştururlar. Üçüncü yaklaşım ise in vitro farklılaşma sırasında EKH pluripotentliğini ortaya koyar. Hem fare hem de insan EKH'lerinin farklılaşmalarına izin verildiklerinde embriyoid cisim (EC) denilen 3 boyutlu hücre agregatları oluşturabilirler ki bu EC'ler ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli doku türevlerini içerirler.<sup>14,15</sup>

## EKH MORFOLOJİSİ VE EKSPRESE ETTİKLERİ BELİRTEÇLER

Farklılaşmamış EKH'ler farklı morfolojileri ve memeli pluripotent hücrelerine özel, moleküler belirteçlerin ekspresyonuyla karakterizedirler. İnsan EKH'lerinde en sık kullanılan yüzey belirteçleri gli-

kolipid antijenler olan SSEA-3, SSEA-4 ve keratan sülfat; proteoglikanlar ise Tra 1-60 ve Tra 1-81'dir.<sup>16,17</sup> Yüzey belirteçlerine ek olarak bazı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu da EKH'lere ait bir özelliktir. Bunlardan Oct-4 en iyi bilinen ve en çok kullanılanıdır. Blastosist dönemindeki embriyonun İHK'de eksprese olur ve farklılaşma süreci boyunca azalır.<sup>18,19</sup> Daha sonra Nanog denilen bir homeoprotein de özellikle farklılaşmamış EKH'lerde varolduğu ve farede pluripotent İHK hücrelerinin oluşumu için gerekli olduğu bulunmuştur.<sup>20,21</sup> Farklılaşmamış fare EKH'leri SSEA -3 ve SSEA-4'ü eksprese etmezler, fakat laktoserisi glikolipid SSEA-1'i eksprese ederler.<sup>22,23</sup> Tra 1-61 ve Tra 1-81 de fare EKH'lerinde gözlenmemiştir.<sup>24</sup>

Fare ve insan EKH'leri arasında ayrıca bazı fenotipik farklılıklar da vardır.<sup>12</sup> Fare EKH'leri camısı görünümde, net olmayan sınırlarıyla yuvarlak koloniler halinde çoğalırlarken insan EKH'leri daha yassı ve kompakt olup sıklıkla hücre sınırları nettir.<sup>22,25</sup> İnsan EKH'leri fare EKH'lerine göre daha yavaş çoğalırlar. Fare EKH'lerinin popülasyonlarını 2 katına çıkarma süresi yaklaşık 12 saat iken insan EKH'leri yaklaşık 36 saatte 2 katına çıkarlar.<sup>26</sup>

İnsan ve fare EKH'lerinin in vitro kültür için gerektirdikleri arasında da farklılıklar bulunmaktadır. İnsan ve fare EKH'leri çoğalabilmeleri için fibroblast tabakaya ihtiyaç duyarlar. İnsan EKH'leri fare embriyonik fibroblast (FEF) besleyici tabakasında serum ya da temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth faktör= bFGF) ile desteklenmiş serum replasmanı varlığında çoğaltılabilirler.<sup>2</sup> Ancak insan EKH için ortamda bFGF varlığı henüz kesinlik kazanmamış tartışmalı bir konudur. Bazı araştırmacılar bFGF varlığında farklılaşma olmadan çoğalmanın olduğunu göstermiş iken bazı araştırmacılar ise bFGF eklenmesi ile bir değişiklik görmemişlerdir.<sup>27,28</sup>

## EKH'LERİN ELDE EDİLMESİ

İlk memeli EKH nesli fare blastosistinden 1981'de Evans ve Kaufman ve onlardan bağımsız olarak da Martin tarafından elde edilmiştir.<sup>29,30</sup> EKH'lerin elde edilme süreci blastosistin FEF'e yerleştirilmesi ve büyüyen filizlerin kurulan EKH nesline çoğal-

masını içerir. EKH'ler simetrik bölünmeyle sınırsız yenilenme yeteneğine sahiptirler. Aynı zamanda asimetric olarak bölünerek bir KH, bir de primitif germ tabakalarını temsil eden çeşitli tiplerde farklılaşmış hücreleri oluşturabilirler.<sup>31</sup>

İlk insan EKH nesli ise Thomson ve ark. tarafından 1998'de elde edilmiştir.<sup>22</sup> Ürettikleri 5 insan EKH nesli primat EKH'leri tanımlamak için önerilen kriterlere uygundur. Etik nedenlerle insan EKH'lerinin embriyonik gelişimle kimerik embriyoya dönüşme yetenekleri araştırılmamıştır.<sup>23</sup> Bu araştırmacılar EKH'leri infertilite tedavisi gören çiftlerin bağışladıkları artan blastosistlerden elde etmişlerdir. Metotları fare EKH'lerinin elde edildiği yöntemden çok farklı değildir. Trofoektodermin EKH tayinine engel olduğu düşüncesi ile bu tabaka immünocerrahi metotlarla uzaklaştırılmış ve İHK, FEF besleyici tabakası üzerine yerleştirilmiştir. Kısa bir yapışma ve çoğalma sürecinden sonra İHK'den büyüyen koloni ayrılmış ve bir başka besleyici hücre tabakası üzerine yerleştirilmiştir. Fare EKH protokolündeki kültür vasatı ya da kültür sistemiyle ilgili görüşlere bariz bir yenilik getirilmemiş olmasına rağmen yüksek oranda başarı sağlanmıştır.<sup>12</sup> Fare EKH kültüründen farklı olarak, insan EKH manipülasyonu daha hassas olduğundan bu hücreleri çoğaltmak daha zor bir süreçtir.<sup>22,25,32-37</sup>

İnsan EKH'leri 'somatik nükleer transfer' ya da klonlamayla da elde edilebilirler. Bu prosedür doğrudan alınan somatik bir hücrenin çekirdeğinin enükle edilmiş bir oosite transferine dayanır. Bu hücreler embriyonik gelişime başlarlar, İHK'deki embriyonik hücreler genetik olarak donörün dokularıyla uyumludurlar.<sup>38-41</sup>

## EKH TRANSFER TEKNİKLERİ

Her laboratuvar EKH pasajlamak için farklı metotlar kullanılabilir. Deneysel amaca yönelik olarak transfer tekniğinin seçimi değişebilmektedir.<sup>42</sup> Bazı araştırmacılar insan EKH'lerini mekanik olarak transfer ederlerken diğerleri kollagenaz, tripsin, dispaz gibi enzimlerle hücreleri transfer etmektedirler.<sup>22,25,32-37</sup> Mekanik transfer metodunda insan EKH kolonileri fiziksel olarak 150-200 hücrelik kümelere ayrılırlar. Bu tekniğin avantajı enzimin ol-

maması ve farklılaşmamış insan EKH'lerinin farklılaşmışlardan izole edilebilmesidir. Enzimatik transfer metodunda ise EKH'leri besleyici tabakadan ayırmak için enzim kullanılır. Koloniler besleyici tabakadan ayrıldıktan sonra transfer edilmek için küçük hücre kümelerine ayrılıp pipetle alınır. Hücre kümeleri büyüklük olarak farklılıklar gösterirler ve bazı durumlarda farklılaşmış ve farklılaşmamış hücreler birlikte transfer edilebilirler. Bu metot çok sayıda hücre gerektiren deneylerde kullanılır.<sup>42</sup>

### EKH'LERİN ÇOĞALMASI

Fare ve insan EKH'leri serum içeren medyunda, besleyici olarak FEF kullanılarak orijinal olarak türetilmişlerdir.<sup>22,29,30</sup> Ayrıca izolasyondan sonra besleyici tabaka varlığında rutin olarak çoğaltılmışlardır. EKH'ler, başlangıçta dağınık, daha sonra birbirleri ile temas eden koloniler şeklinde çoğalmaktadırlar. Fare ve insan EKH'lerinin pasajlanması birbirlerinden farklıdır. Fare EKH'leri normal olarak her 2-3 günde bir subkültüre edilip, koloniler tripsinle tek hücreler elde etmek için enzimatik olarak ayrıştırılırlar, hücreler daha sonra FEF üzerine yerleştirilirler. İnsan EKH'leri ise her 6-7 günde bir subkültüre edilir ve sıklıkla tek hücre yerine küçük kümeler halinde pasajlanırlar. Pasajlanacak küçük kolonilerin oluşumu ya mekanik ayrıştırma ya da kollagenaz, tripsin kullanılarak enzimatik ayrıştırma metodlarından biri uygulanarak gerçekleştirilir.<sup>4</sup> Kemirici EKH'leri lökomiya inhibitör faktör (LIF) varlığında ve bazı diziler için de FEF varlığında büyüdüklerinde farklılaşmadan kalırlar.<sup>43,44</sup> Oysa LIF insan EKH'leri üzerinde aynı etkiye sahip değildir. Bu hücreleri farklılaşmamış durumda tutmak için FEF besleyici tabakasında bFGF'nin de bulunması gerekir.<sup>29,30</sup> Ya da FEF içeren medyum ortamında matrigel ya da lamininin de bulunması gerekir.<sup>36</sup> LIF ya da besleyici hücreler çekildiğinde birçok tip EKH'ler implantasyon sonrası embriyonik dokulara benzeyen EC'lere spontan olarak farklılaşırlar.<sup>14,15,45</sup> LIF ya da besleyici hücrelerin çekilmesi süspansiyon kültürü ya da metil selüloz içeren medyuma ekme ile devam eder.<sup>34,46-48</sup>

LIF, IL-6 ailesinden bir sitokindir.<sup>49,50</sup> Fare EKH'lerinin farklılaşmasını önlediği keşfedilmiş-

tir.<sup>42,44</sup> LIF'in eklenmesi, besleyici tabaka olmadan fetal buzağı serumu varlığında EKH'lerin çoğaltılması ve korunması için yeterlidir ki bu da LIF'in EKH yenilenmesi için spesifik olarak gerekli özel bir ekstrinsik faktör olduğunu belirtmektedir.<sup>51,52</sup>

Bugüne kadar implantasyon öncesi ve implantasyon sonrası erken dönem embriyolarda pluripotent hücre popülasyonunun kurulması ve korunması için fonksiyonları gerekli olan sadece birkaç gen tanımlanmıştır.<sup>53</sup> Oct-3/4, Nanog, Sox2 ve FoxD3 gibi transkripsiyon faktörleri mevcuttur.<sup>54</sup> Bunlardan en iyi bilineni olan Oct-3/4, oositlerde, erken yarıklanma dönemindeki embriyoda, blastosistin İHK'de, primitif ektoderimde ve primordial germ hücrelerinde, hücrel pluripotentiğin korunmasındaki önemli rolünü gösterecek şekilde eksprese olur.<sup>55,56</sup> Oct-3/4 preimplantasyon gelişiminde pluripotent hücre popülasyonunun kurulmasında gereklidir. Fare EKH'lerinde Oct-3/4, transkripsiyon faktörü olarak hücrel pluripotentiğin korunmasında rol oynar. Oct-3/4 hasarlı embriyolar İHK'deki muhtemel kurucu hücreler pluripotentiği kazanmadığından dolayı fetal gelişimin başlamasında başarısızlığa uğramışlardır.<sup>57</sup>

### EKH'LERİN FARKLILAŞTIRILMASI

EKH'lerin potansiyelini kullanılacak duruma getirmek ve farklılaşma yollarını doku tamirindeki ihtiyaca göre kanalize etmek aktif araştırma alanlarından biridir.<sup>58</sup> Son çalışmalar fare EKH'lerinden in vitro nöronlar, glia hücreleri, nöronal KH'ler, Langerhans adacık hücreleri, hepatositler, osteoblastlar ve adipositlerin başarıyla elde edildiğini rapor etmektedirler.<sup>59</sup>

İnsan EKH'lerinin nöral farklılaşmasını çalışan birçok grup EKH'lerin spontan farklılaşmasını başlangıç noktası olarak kabul etmişler ve yüksek derecede saflaştırılmış nöral progenitor hücreleri izole edip kültüre etmişlerdir.<sup>60-62</sup> Bu progenitor hücreler süspansiyon kültüründe nörosferler şeklinde yaklaşık 25 kere popülasyonlarını katlarlar ve erken nöroektoderm belirteçleri olan nestin, polisyalize N-CAM, musashi ve Pax6 moleküllerini eksprese ederler. Nöral progenitor hücreler nöronlara, astrositlere, az miktarda da oligodendrosit be-

lirteçleri eksprese eden hücelere farklılaşırlar.<sup>61</sup> İn vitro elektrofizyolojik çalışmalar EKH-türevli nöronların nörotransmitterlere cevap verdiğini göstermiştir.<sup>60</sup> Daha önce retinoik asit ve sinir büyüme faktörünün fare EKH'lerinin ektodermal farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir.<sup>63</sup>

Yakın zamanda ise Green ve ark. bir başka ektodermal soy olan keratinositlerin, süspansiyon kültüründen sonra tek tabakalı hücre süspansiyonuna alınan insan EKH türevlerinden farklılaştığını göstermişlerdir.<sup>64</sup> Kaufman ve ark. EKH'lerini kemik iliği stroması veya yolk kesesi türevli hücre dizileriyle kültüre ederek kan hücresi progenitörlerini izole etmişler ve kan hücresi nesli belirteçlerinden CD34 ekspresyonunu monitörize etmişlerdir.<sup>65</sup> İnsan EKH'lerinin EC'ler içinde endotelial hücelere de farklılaştığı gösterilmiştir. EC oluşumunu takiben 13-15. günlerde endotel hücre belirteçlerinden CD31 (P-selektin) ve VE-cadherin transkriptleri ortaya çıkmıştır. İleri kültürlerde üretilen hücreler olgun endotel belirteci olan von Willebrand faktörü eksprese ederler. Ayrıca bu hücreler in vitro immün yetersiz farelere greft olarak uygulandıklarında veya in vivo yapay matrikslerde, kanal benzeri yapılar ve fonksiyonel mikrodamarlar oluşturmuşlardır.<sup>66</sup>

Spontan ya da bir kültür sisteminde farklılaşan insan EKH'lerden kalp kası da elde edilmiştir. Kehat ve ark. insan EC'lerinden kasılan kardiyomyositleri izole etmişler ve hücrelerin subsellüler gap junction dağılımı, miyofibriler organizasyonu ve elektriksel aktivitesi açısından fetal ya da neonatal kardiyositlerin özelliklerini taşıdıklarını göstermişlerdir.<sup>67</sup>

İnsan EKH'lerinin embriyonik endodermal nesillere farklılaştırılması daha zor olmuştur.<sup>24</sup> Asady ve ark. insan EC oluşumu sırasında, pankreatik nesil için karakteristik genlerin ortaya çıktığını, EC'deki hücrelerin anti-insülin antikolarıyla boyandığını göstermişlerdir.<sup>68</sup> Bir başka grup da insan EKH kültürlerinin çeşitli hepatosit belirteçleri eksprese eden hücelere farklılaştıklarını göstermişlerdir.<sup>69</sup>

İnsan hastalıklarına KH tabanlı başarılı bir tedavi geliştirmek için ilk adım ilgili hücre tipine

farklılaşabilen insan EKH'lerini çoğaltmak ve bu nesli karışık popülasyondan saflaştırmaktır. Kültürde gelişimin heterojen doğası ne yazık ki EKH türevlerinin transplantasyon çalışmalarında kullanılmasını engellemektedir.<sup>70</sup> Gerçekte insan pluripotent hücre nesilleri, ortama spesifik büyüme faktörlerinin eklenmesine rağmen geniş çok yönlü gen ekspresyon davranışına sahiptirler.<sup>71,72</sup> Ayrıca hemen hemen aynı büyüme faktörü bulunan bir ortamda belirli bir fenotipin gelişmesinde kültürden kültüre önemli çeşitlilikler gözlenebilir. Rölatif olarak homojen bir hücre popülasyonunun elde edilmesi sonuçta karmaşık hücre popülasyonundan yapılan seçime bağlıdır.<sup>70</sup> Bu amaçla birbirinden farklı çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Seçici bir belirtecin kullanılması veya farklılaşmış hücre türevlerinin normal bir fizyolojik yolla fonksiyon görebildiğinin test edilmesi gereklidir.<sup>70,73-75</sup> Aslında EKH'lerinden elde edilen birçok hücre tipinin, tam farklılaşmış ve fizyolojik olarak olgun fenotipte oldukları, ayrıca hem in vivo hem de in vitro ortamda normal fonksiyona sahip oldukları gösterilmiştir.<sup>72,76,77</sup> Fakat EKH kültürü tam farklılaşmış hücrelerle birlikte aynı zamanda multipotent progenitör hücreler de içerir.<sup>78</sup> Bu durumda embriyonik hücreler ve multipotent progenitör hücreler fonksiyonel olarak immatür olduklarından tüm EKH nesillerinin normal fizyolojik fonksiyonda hizmet edebileceği varsayılmaz. Ayrıca kemirici ve büyük hayvan hastalık modellerinde verimliliğin gösterilmesi gerekmektedir. Terapötik bir sonuç elde edebilmek için transplante edilmiş hücrelerin alıcı dokuya fonksiyonel şekilde integre olmaları önemlidir.<sup>70</sup>

İn vivo farklılaşma çalışmaları, tam farklılaşmamış EKH türevlerinin implantasyondan sonra reddedilmedikleri takdirde benign teratoma oluşturabildiklerini açıkça göstermiştir.<sup>22,29</sup> EKH'lerin mitoz sonrası tam farklılaşmasının sağlanması başarıldığında, farklılaşmamış KH popülasyonu azalacak ve böylelikle kontrolsüz tümör gelişimi ihtimali önenebilecektir. Neslin yönlendirilmiş şekilde farklılaştırılması için pozitif seleksiyon transgenlerin kullanılması, farklılaşmadan kalmış, proliferen olan KH popülasyonunun seçilmesiyle tümör oluşumu riskini de azaltacaktır.<sup>70</sup>

## EKH'LERİN GENETİK MANİPÜLASYONU

Solid organ nakillerinde immünsüpresif ilaçların kullanılması reddin önlenmesinde etkilidir. Günümüzde kullanılan immünsüpresif ilaçlar çeşitli komplikasyonlara neden olurlar. Bunun yerine EKH'ler immün reddi önlemek ya da azaltmak amacıyla genetik olarak manipüle edilebilirler.<sup>70</sup> Kullanılan bir potansiyel metot MHC I ve II moleküllerinin "knock-out" hale getirilmesidir.<sup>79</sup> Ayrıca yabancı MHC genlerini iptal etmenin yanında istenen MHC genleri de "knock-in" hale getirilebilir. Bu şekilde EKH türevli transplantlar alıcı tarafından "self" olarak kabul edilirler.<sup>80,81</sup>

Nükleer transfer teknolojisi transplante edilen hücrelerin reddini önlemede daha kesin bir sonuç verir. Bu teknik EKH'lerden elde edilen hücrelerin alıcıyla genetik olarak tam uyumunu sağlar. Burada hastanın normal somatik hücresinden çekirdek çıkartılır ve enükle edilmiş bir oosite enjekte edilir. Bu oositten gelişen blastosist hastayla genetik olarak uyumlu yeni EKH neslinin elde edilmesi için bir kaynak olur. Fakat insan oositlerinin zor elde edilmesi, nükleer transfer prosedürünün düşük verimliliği ve insan EKH hücrelerinin uzun popülasyon katlanma süresi, etik olarak önemsenmese bile bu yöntemin rutin klinik bir prosedür olarak uygulanmasını zorlaştırır.<sup>70</sup>

## EKH'LERİN KULLANIMINI KISITLAYAN NEDENLER

İnsan EKH'leri çeşitli hastalıkların tedavisinde transplantasyon terapisinin gelişmesi için potansiyel olarak değerlidirler fakat medikal olarak kullanımlarını kısıtlayan birkaç faktör vardır; insan EKH'lerinin farklılaşmamış basamakta devamlı kültürü hayvan bazlı malzeme ve besleyici tabakayı gerektirir. Bu da patojen cross-transferi riskini doğurur. İnsan EKH'leri yüksek genomik instabilite gösterirler ve uzun dönem gelişmeden sonra öngörülemez şekilde farklılaşabilirler. Farklılaşmış EKH'ler immün redde neden olabilecek moleküller eksprese edebilirler.<sup>31</sup> Ayrıca kontrollü bir şekilde çoğaltılıp, spesifik bir hücre tipine farklılaştırılan hücrelerin hastadaki uygun bölgeye nasıl yerleştirileceği, uygun fonksiyona adapte olmalarının na-

sıl sağlanacağı da hücre terapisini klinik olarak uygulamaya geçirmeden önce üstesinden gelinmesi gereken sorunlardandır.<sup>82</sup>

Teorik olarak insan EKH'leri birçok farklı amaç için kullanılabilirler. Temel araştırma konuları; insan gelişimi, toksikoloji ve transplantasyon tıbbıdır. İnsan EKH'lerine dayanan tedavilerden fayda görebilecek hastalıklar; Parkinson, diyabet, felç, artrit, multipl skleroz, kalp yetmezliği, hepatit, siroz, osteoporoz, spinal kord lezyonları ve yanıktır. İnsan EKH'leri teratokarsinomalarda, in vivo immün yetersiz farede ve doku kültüründe nöral, kardiyak, iskelet kası, pankreas ve karaciğer hücrelerini üretebilmesine rağmen hücre terapisinin kısa vadede geniş kullanım alanı bulacağını düşünmek yanlış olur.<sup>82</sup> Bugün EKH'lerin yasal olarak insanları tedavi amaçlı kullanımı dünyanın hiçbir yerinde yoktur.<sup>83</sup>

KH'ler için en iyi kaynağın insan embriyoları olduğu düşünülmektedir fakat hücrelerin elde edilme işlemi embriyonun yıkımını gerektirdiğinden EKH'lerin kullanımı etik açıdan problemlidir.<sup>84</sup> İki genel prensip embriyoların kullanımını yönlendirir; i) orantılılık (proportionality) prensibine göre embriyonun kullanılması önemli ve değerli bir amaca hizmet etmelidir.<sup>29</sup> ii) destek (subsidiarity) prensibine göre ise embriyolar üzerindeki araştırmalar eğer daha uygun bir alternatif yol yoksa yürütülmelidir.<sup>85</sup> Araştırmalar ilk olarak hayvan materyali üzerinde yapılmalıdır. Erişkin KH'ler EKH'lerden önce kullanılmalıdır. EKH kullanımı durumunda risk altındaki embriyolar sağlıklı embriyolara tercih edilmeli, araştırma amaçlı embriyo oluşturulmadan önce ise IVF çalışmalarından artan embriyolar kullanılmalıdır.<sup>86</sup>

Her ülkenin tedavi ve araştırma amaçlı tüp bebek ve KH uygulamalarına yasal ve ahlaki yaklaşımı farklılık göstermektedir. Ülkemizde EKH çalışmaları Sağlık Bakanlığı'nın 2006 yılında yayınladığı bir genelgeyle, konu üzerinde yasal düzenlemeler yapılana kadar durdurulmuştur.<sup>5,83</sup>

Yaşam döllenmeyle başlar, EKH araştırmaları embriyoyu parçalayan işlemlerle embriyonun yaşam hakkını elinden aldığı için etik kabul edilemez. Fakat KH çalışmaları, tıbbın insan sağlığına fayda-

lı olması için, en çok umut vaat eden araştırma alanlarından biridir. Bu nedenle KH araştırmalarını tamamen yasaklamak yerine, tüp bebek çalışmaları için in vitro olarak döllenmiş ve ihtiyaç fazlası olduğundan dondurulmuş embriyolar üzerinde belirlenen ve denetlenecek kurallar çerçevesinde yürütülmesine izin verilebilir.<sup>83</sup>

EKH çalışmaları sonucunda KH'lerin izolasyonu, çoğaltılması, farklılaştırılması ve çeşitli doku

tiplerinin oluşturulabilmesi için in vitro farklılaştırma sistemlerinin kurulması gibi temel konularda başarı elde edilmiştir. EKH'lerin genetik manipülasyon ile implantasyon için hasta dokularıyla uyumlu sınırsız doku kaynağı sağlayabilmesi KH araştırmalarının rejeneratif tıptaki önemini arttırmıştır. Ancak klinik uygulamaların başlayabilmesi için daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg* 2004;139:93-9.
2. Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:866-76.
3. Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol* 2002;197:424-9.
4. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005;100:12-27.
5. Kansu E. Kök hücre biyolojisinde güncel kavramlar. *Bilim ve Ütopya* 2007;151:11-17.
6. Landry DW, Zucker HA. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *J Clin Invest* 2004;114:1184-6.
7. Winkel GK, Pedersen RA. Fate of the inner cell mass in mouse embryos as studied by microinjection of lineage tracers. *Dev Biol* 1988;127:143-56.
8. Andrews PW, Bronson DL, Benham F, Strickland S, Knowles BB. A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *Int J Cancer* 1980;26:269-80.
9. Pera MF, Cooper S, Mills J, Parrington JM. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonic carcinoma cells. *Differentiation* 1989;42:10-23.
10. Shamblo MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13726-31.
11. Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, et al. Pluripotent embryonic carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1984;50:147-62.
12. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 1):5-10.
13. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005;19:1129-55.
14. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.
15. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000;6:88-95.
16. Andrews PW, Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonic carcinoma cells. *Hybridoma* 1984;3:347-61.
17. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20:329-37.
18. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95:379-91.
19. Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol Hum Reprod* 2005;11:173-81.
20. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113:643-55.
21. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113:631-42.
22. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
23. Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 1998;38:133-65.
24. Pera MF, Trounson AO. Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 2004;131:5515-25.
25. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
26. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000;227:271-8.
27. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 2004;229:259-74.
28. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002;369-91.
29. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-8.
30. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
31. Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2004;128:259-67.

32. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, et al. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUHES1, SNUHES2, and SNUHES3. *Stem Cells* 2005;23:211-9.
33. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, Moon SY, Roh SI, Kim CG, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003;69:2007-14.
34. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004;350:1353-6.
35. Heins N, Englund MC, Sjöblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:367-76.
36. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:971-4.
37. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003;18:1404-9.
38. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983;220:1300-2.
39. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996;380:64-66.
40. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
41. Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD. Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development. *ebioMed: J Regen Med* 2001;2:25-31.
42. Oh SK, Kim HS, Park YB, Seol HW, Kim YY, Cho MS, et al. Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:605-9.
43. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;336:688-90.
44. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-7.
45. Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000;85:645-51.
46. Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991;111:259-67.
47. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:862-9.
48. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1525-39.
49. Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* 1984;259:10978-82.
50. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 1987;6:3995-4002.
51. Nichols J, Evans EP, Smith AG. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 1990;110:1341-8.
52. Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 2001;26:137-48.
53. Pesce M, Anastasiadis K, Schöler HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 1999;165:144-52.
54. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007;17:42-9.
55. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994;166:259-67.
56. Schöler HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewold H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 1990;9:2185-95.
57. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372-6.
58. Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 2001;19:477-82.
59. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 2001;22:149-64.
60. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2001;172:383-97.
61. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:1134-40.
62. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001;913:201-5.
63. Schulz TC, Palmarini GM, Noggle SA, Weiler DA, Mitalipova MM, Condie BG. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci* 2003;4:27.
64. Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15625-30.
65. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10716-21.
66. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4391-6.
67. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-14.
68. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-7.
69. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003;12:1-11.
70. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
71. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11307-12.
72. Shambloot MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:113-8.
73. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:157-62.
74. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98:216-24.



75. Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 1998;8:971-4.
76. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168:342-57.
77. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation* 1991;48:173-82.
78. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 1996;59:89-102.
79. Grusby MJ, Auchincloss H Jr, Lee R, Johnson RS, Spencer JP, Zijlstra M, et al. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3913-7.
80. Westphal CH, Leder P. Transposon-generated 'knock-out' and 'knock-in' gene-targeting constructs for use in mice. *Curr Biol* 1997;7:530-3.
81. Hardy RR, Malissen B. Lymphocyte development. The (knock-) ins and outs of lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 1998;10:155-7.
82. de Wert G, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod* 2003;18:672-82.
83. Özçelik T. Embriyonik kök hücre araştırmalarının etik boyutu. *Bilim ve Ütopya* 2007;151:18-21.
84. Kahn J. Will stem cells create a market for human embryos? *J Androl* 2001;22:12.
85. de WG, Berghmans RL, Boer GJ, Andersen S, Brambati B, Carvalho AS, et al. Ethical guidance on human embryonic and fetal tissue transplantation: a European overview. *Med Health Care Philos* 2002;5:79-90.
86. Pennings G, Van Steirteghem A. The subsidiarity principle in the context of embryonic stem cell research. *Hum Reprod* 2004;19:1060-4.