

KÖK HÜCRELERİ ve KLONLAMA

Emin KANSU*

This article deals with stem cells and the process of cloning. The author first presents definitions of stem cells and then ways of producing embryonic stem cells. The second part of the article focuses on different variations of cloning: transplantation of nucleus, therapeutic cloning and finally reproduction of cloning.

KÖK HÜCRELERİ

Kök hücreler konusunda günümüzde son derece önemli araştırmalar yapılmaktadır. Organ veya doku transplantasyonunun tek tedavi seçeneği olduğu hastalıklarda verici teminindeki zorluk tedavi şansını engelleyen en önemli etmendir. Kök hücre araştırmaları istenildiği doğrultuda gelişirse hasta kişinin kendi somatik hücreleri ile hedeflenen doku hücreleri arasındaki füzyon ile doku tipi uyum sorunu olmayanlar arasında nakil için yeni bir kaynağı oluşturabilecektir. Ayrıca kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesi zayıf olan doku ve organların tedavisi amacıyla kullanımı önemli bir konu olarak gündemde bulunmaktadır. Buna erişkin tip diabetes mellitus, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalıkları örnek olarak verilmektedir.

Tanımlar

Kök Hücreler, bölünerek kendilerini yenileyen, kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş, görev yapan organları oluşturabilen ve farklılaşma yeteneğinde olan hücreler olarak tanımlanırlar. Çok yönde farklılaşabilen kök hücrelerin iki türü bilinmektedir :

a) Totipotent kök hücreler: Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Bu hücreler embryo , bütün embryo-sonrası doku ve organlar ile embryo-dışı membranları ve organları veren kök hücreleridir (**ŞEKİL-1 ve ŞEKİL-2**).

b) Pluripotent kök hücreler: Organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir (**ŞEKİL-1**).

* Prof.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel, Sonbahar 2002, Cilt: 8, Sayı: 3, s. 41-50.

Embriyo, üreme hücrelerinden yumurta ve spermin birleşmesi ile oluşan ve cenin gelişiminin ilk aşamasındaki hücre grubu olarak tanımlanır. (**ŞEKİL-2**).

Embriyonik kök hücre, embriyoda erken evrede bulunan totipotent kök hücrelerini ifade eder.

Erişkin kök hücresi, erişkin dokularda bulunabilen ve birçok hücreye dönüşebilen kök hücresidir.

Kan üreten (Hematopoietik) kök hücresi ise, kemik iliğinde, bebek göbek kordon kanında ve çevre kanında bulunan ve özel yöntemlerle erişkin de belli büyüme faktörlerinin yardımı ile üretilebilen ve kan hücrelerine dönüşebilen kök hücreleridir. Kanı oluşturan eritrositler, lökositler ve trombositler erişkin hayatta da devamlı olarak üretildikleri için kök hücrelerini insan kemik iliği veya çevresel kanından elde etmek kolay olmaktadır. Bu hücreler uzun yıllardan beri dünyada ve yurdumuzda lösemi ve diğer kan hastalıkları olan hastalara verilerek tedavide başarı ile kullanılmaktadırlar. Son yıllarda bazı araştırmalar kan üreten kök hücrelerinin uygun koşullarda kalp kası, sinir dokusu gibi alanlara da yerleşebilip hasar mevcutsa bu alanları normale çevirecek tamir edebileceğini göstermiştir. Ancak, insanda bu nitelikte kan üreten kök hücreleriyle kendini tamir etme kapasitesi sınırlı dokuların hastalıklarının tedavisinde başarılı olunamamıştır.

Embriyonik Kök Hücrelerin Elde Etme Yöntemleri:

Embriyonik kök hücreler farklı teknolojiler ile elde edilebilmektedir (**ŞEKİL-3**)

1. İn-vitro olarak döllenmiş ve ihtiyaç fazlası embriyolardan kök hücre eldesi:

Bu yöntemin ilk aşamaları tüp bebek yöntemi olarak da bilinen in vitro fertilizasyon (döllenme) işlemi ile aynıdır. Çocuksuz ailelerde onayları alındıktan sonra anne adayından elde edilen en az 7-9 yumurta hücresi baba adayının spermeleri ile laboratuvar koşullarında döllenir ve yine laboratuvar koşullarında gelişmesi için 3 gün beklenir. Elde edilen embriyolardan 2-3'ü anne rahimine (uterusa) yerleştirilir. Bu işlem başarılı bir gebeliğe yol açarsa daha önce hazırlanmış olan embriyolar artık gerekli değildir. Bu durumda embriyolar çiftlerin isteği doğrultusunda daha sonra kendileri için başka bir gebelik veya başka evli ve çocuksuz çiftlere bağışlanmak üzere veya kök hücre geliştirilmek üzere dondurulabilir. Bu işlemler sırasında ülkelerin kendi iç yasal ve etik düzenlemelerine uyulması gereklidir. Rahime yerleştirilmeye

hazır 3-5 günlük embriyolar sonsuz çoğalma ve tüm farklı (örneğin sinir,kas,deri,kalp vb) hücreleri geliştirme kapasitesileri nedeniyle yeni bir organizmaya aktararak tedavi amacıyla da kullanılabilirler. Embriyo, bakıldığında basit bir hücre yumağı halindedir. Küre şeklindeki bu oluşumun dış tabakası ilerde ceninin gelişmesi için gerekli olan plasentayı (eş) oluşturma, kürenin iç kısmındaki tabaka ise diğer tüm dokuları geliştirme kapasitesindedirler. Bu özelliklerinden dolayı iç tabaka hücrelerine biyolojide embriyonik kök hücreleri denilmektedir. Bu hücreler, ilk kez 1998'de A.B.Devletlerinde Wisconsin Üniversitesi'nde Dr. Thomson ve arkadaşları tarafından ayrıştırılıp laboratuvar ortamına aktarılmış ve in-vitro kültür şartlarında tek tipte hücre üreten hücre dizilerine dönüştürülebilmişlerdir.

2. İstemli sonlandırılan gebeliklerden embriyonel kök hücre eldesi: Anne ve babaların izni ile ilgili hekimlerce yasal ve sistemli olarak sonlandırılmış olan doğal gebeliklerden yine ebeveynlerin izni alınarak elde edilen embriyolardan da günümüzde kök hücreleri elde edilebilmektedir.

Her iki yöntemle elde edilen hücreler birbirine benzer görünüm ve özelliktedirler. Ancak etik açıdan her iki yöntemin değerlendirilmesi farklılıklar içermektedir. İlk yöntem uterus öncesi dönemdeki hücreler üzerinde yapılan işlemleri içermektedir. Diğer yöntemde ise rahime yerleşmiş olan embriyonun hücreleriyle yapılan işlemler uygulanmaktadır.

Kök hücre dizileri ise, embriyonik kök hücre özelliğinde veya yalnızca belirli bir özellikte görev yapacak olan hücreleri (örneğin sinir veya deri veya kas hücresi gibi) geliştirmeye doğru yönlendirilmiş ve laboratuvar şartlarında yani in-vitro uygun koşullar sağlandığında sonuza kadar çoğaltılabilen hücrelerdir.

KLONLAMA

Herhangi bir hücre veya genin laboratuvarında kendisiyle aynı olan kopyalama (özdeş) işleminin yapılması klonlama olarak tanımlanmaktadır.

Çekirdek Nakli ile Klonlama

Bu yöntemde hedef, çekirdeği çıkarılmış olan bir yumurta hücresine somatik bir hücre çekirdeğinin transferi ile yeni bir hücreden yapay bir embriyonun oluşturulmasıdır. Böyle bir embriyodan oluşturulan canlı somatik hücre elde edilen canlının klonu (özdeşi) olacaktır. Somatik hücre nükleer transferi adı verilen bu yöntem **ŞEKİL-4** de şematize edilmiştir.

Tedavi Amaçlı Klonlama (Terapötik Klonlama)

Terapötik klonlama, hastanın genetik yönden aynısı veya "özdeş"i olan klonlanmış blastositin hastaya verilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır. Blastosit, embriyonik hücre dizisinden kültür yapılarak elde edilmektedir. Blastosit içindeki iç-stem hücreleri sonsuza kadar bölünme özelliğine sahiptirler. Klonlanmış blastositten elde edilen stem hücreleri son derece primitif ancak mükemmel çok-yönlü farklılaşma yeteneklerine sahip totipotent hücrelerdir. Bu embriyonik hücreler hasta ile aynı genetik özelliklere sahip olduğu için doku-nakillerinde görülen immünolojik rejeksiyonlara neden olmazlar. Bu tür hücrelerin naklinin Parkinson Hastalığı gibi bazı nöro-dejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, miyokard infarktusu ve spinal kordonun kazalar sonucu ağır zedelenmelerinde kullanılabilmesi düşünülmektedir (ŞEKİL-5).

Terapötik klonlama, bireylerin gereksinim duyabileceği bazı hücreleri elde etme amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yaklaşım insan klonları elde etmeyi hedeflememektedir.

İnsanlarda embriyonik stem hücrelerinin kullanımı ile gerçekleşmesi planlanan terapötik klonlama çalışmalarına karşı bazı görüşler de mevcuttur. Bunlar arasında en önemlisi, terapötik klonlamada kullanılan embriyonik hücrelerin IVF ile geliştirilen ancak kullanım fazlası (artığı) olan insan embriyosunun yok edilmesiyle elde edilmiş olmasıdır. Bu nedenle son 2-3 yıldır araştırmacılar IVF fazlası embriyolar yerine normalde fertilize edilmiş embriyolardan elde edilecek klonlanmamış (noncloned) stem hücrelerinin, insanda kemik iliği, çevresel kan ve diğer dokularda bulunan erişkin stem hücreleri (adult stem cells) veya in-vitro kültür şartlarında normal insan hücrelerinin de-differensiasyonu ile elde edilebilecek embriyonik stem hücrelerinin kullanımını önermektedirler. Özellikle son önerilen yaklaşımı gerçekleştirmek ve çekirdekte bu amaçla tekrar-programlama (re-programming) işlemi başarabilecek girişimler henüz araştırılmaktadır. Böylece tartışılan bazı etik sorunlar da belki gelecek yıllarda kendiliğinden çözümlenebilecektir.

Bugün için bazı hastalıkların kesin tedavisi mümkün değildir. Bunun başlıca nedeni, hastalanan ve işlevini yitiren hücre, doku veya organın yenilenmemesidir. Bu durumlarda tıp çözümü olarak eksilen işlevlerini yerine koyma yöntemine başvurulmuştur. Bazı durumlarda bu yaklaşım son derece başarılı olurken bazen de imkanların ve tekniklerin kısıtlı olması nedeniyle daha etkin yöntemler yetersiz kalmaktadır. Örneğin, çocukluğunda şeker hastalığı tanısı alan bir kişinin temel sorunu pankreas hücrelerinin insülin üretilmemesidir. Çare olarak hasta ömür boyu insülin iğnesi kullanılarak yaşamını devam ettirebilmektedir. Oysa harap olan pankreas hücreleri embriyodan elde edilen kök hücreleri

yardımları ile tekrar oluşturulabilir. Elimizdeki ilk veriler daha çok hasta üzerinde geliştirildiği takdirde bu uygulama hem çok sayıdaki şeker hastasını her gün defalarca iğne uygulamaktan hem de insülin harcamalarından kurtaracaktır. Bu örnek, tedavi amacıyla yapılan pankreas adacık hücrelerinin klonlanmasının önemini göstermektedir.

Günümüzde hastalıklı dokuların yenilenmesini amaçlayan ve "Rejeneratif Tıp" adı verilen gelecekteki yeni yaklaşım modellerinde embriyonik stem hücreleri çok önemli bir potansiyele sahiptirler. Ancak, laboratuvarlarda ve tekniklerin uygulanmasındaki mevcut sorunlar ile klonlamanın teknolojik, hukuki, felsefi ve etik yönlerinin tartışılması günümüzde devam etmektedir.

Üreme Amaçlı Klonlama (Reproduktif Klonlama)

Bu uygulama Dolly'nin klonlanmasında olduğu gibi yumurta hücresinin çekirdek dışında kalan kısmının herhangi bir somatik hücre ile birleştirilerek tek hücre haline getirilmesi ve bu hücrenin rahime yerleştirilmesi yoluyla embriyo eldesine dayanır. Bu çalışmalar hayvanların koyun dahil bazı türlerinde başarılı sonuçlar vermiştir. İnsanın kendi özdeşlerinin oluşturulmasına yönelik klonlama etik olarak kabul edilmesi mümkün olmayan sonuçlar doğuracağından "üreme amaçlı klonlama" birçok ülkede yasaklanmıştır.

Doğada insanlarda, bitkilerde, hayvanlarda ve böceklerde zaten klonlar bulunmaktadır. İnsanlarda nadir de olsa doğan monozigotik ikizler veya tek-yumurta (identikal) ikizleri bir diğerrinin "klon"udur. İkiz kardeşler embriyo'nun erken dönemde bölünmesi sonucunda ikisi birbirinin aynı olan "klon"lar olarak doğmaktadır. Dünyada bugün sekiz milyon tek-yumurta ikizi bulunduğu veya diğerr bir deyişle sekiz milyon "insan klonu" olduğu düşünülebilir.

Klonlama girişimleri ve bu konudaki bilimsel çalışmalar 1979 yılından beri devam etmektedir. Önceleri fare, meyva sinekleri ve kurbağalar üzerinde yapılan çalışmalar bazı sorunlarına rağmen bilim adamlarına önemli deneyimler kazandırmıştır. 1980'lerin ortasından itibaren inekler ve koyunlarda başlatılan çalışmalar ve yeni tekniklerin geliştirilmesiyle, hücre siklusunun uygun zamanlamasına dikkat ederek yumurta hücresine genetik materyalin entegrasyonu daha etkin hale getirilebilmiştir.

1997 yılında İskoçya'da Edinburgh şehrindeki Roslin Enstitüsü'nde Dr.Ian Wilmut ve arkadaşları ilk kez Dolly adını verdikleri bir koyunu klonlamayı başarmışlardır. Wilmut ve ekibi altı-yaşında gebe koyundan elde ettikleri meme hücrelerini dondurmuşlar ve daha sonra çekirdeği

çıkarılmış yumurta ile füzyon yapmışlardır. Yumurta hücrelerinin bulunduğu Petri kutusuna akımı uygulayarak füzyonun oluşmasını sağlamışlardır. Elektrik akımı yumurtayı uyarılmış ve genetik materyalin hücre içine girmesine yardımcı olmuştur. Oluşan zigot embryo şeklinde büyümüş ve "anne görevi" yapacak olan bir koyuna implante edilmiştir. Sonuçta Temmuz 1997 tarihinde koyun klonu olarak Dolly doğmuştur.

Dolly'nin doğumundan sonra aynı tekniklerle sonra başka koyun klonları, inek, fare, keçi, domuz ve maymun klonları başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmalar somatik hücre çekirdek transferinin insanlar dahil olmak üzere memelilerde başarıyla uygulanabileceğini göstermiştir. Ancak, son iki yıldır konuyla çalışan bazı bilim adamları memelilerde izlenen gelişimsel, morfolojik ve fizyolojik bazı sorunlar nedeniyle insanlarda reproduktif klonlama girişimlerine karşı çıkmaktadırlar.

Memelilerin klonlanmasında ilk karşılaşılan problem doğuma ilerleyen yumurtaların düşük oranlarda ve sayıda olmasıdır. Bir klonlanmış hayvanın doğuma ulaşabilmesinde, yüz adet yumurta enüklüe olmalı ve bu yumurtalara verici (donör) somatik hücre çekirdekleri elektrofüzyon veya mikroinjeksiyon ile yerleştirilmelidir. Erişkin hücrelerden çekirdek transferi %1 etkinlik oranına sahiptir. Erişkin donör hücre çekirdeği kullanarak yapılan reproduktif memeli klonlanmasında bile en yüksek verimlilik oranı %3'ü geçmemektedir. İnsan reproduktif klonlanmasında izlenen bu düşük verimlilik oranları nedeniyle tek bir canlı çocuğun oluşturulması için çok fazla sayıda insan yumurtalarına gereksinim olduğu açıktır. İn-vitro fertilizasyon (IVF) işlemi yapan kadındoğum uzmanları da fazla sayıda yumurta almakta ve her müdahalede 10 ila 15 yumurta elde etmektedirler. IVF işleminin günümüzde giderek yaygınlaşması ve başarıyla uygulanması sayesinde reproduktif insan klonlamasına karşı görüşler belki zaman içinde zayıflayabilirler.

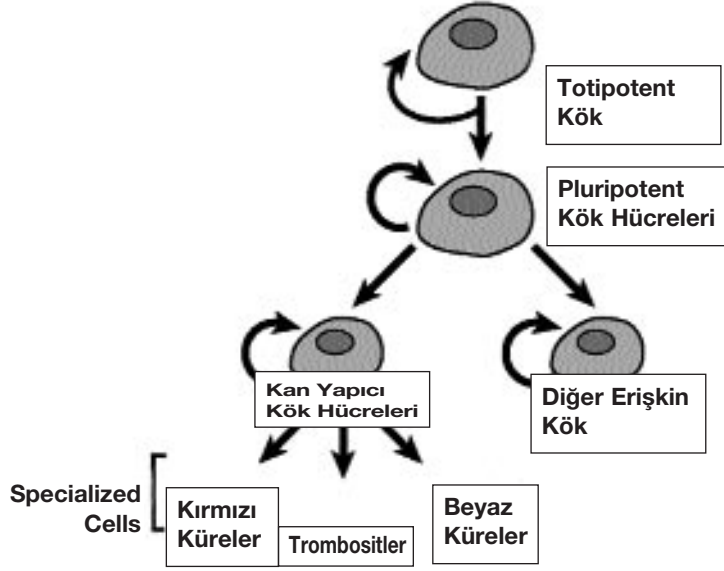
Son yıllarda reproduktif insan klonlamasına karşı en önemli bilimsel itirazların bir diğeri de somatik hücre transferi ile yaratılan değişik memelilerde önemli oranlarda gelişimsel anormalliklerin izlenmesidir. 2001 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan toplantılarda klonlanan memelilerin üçte birine yakın bir oranda özellikle iç organlarda, örneğin solunum, dolaşım ve sindirim organlarında gelişimsel anomalilerin bulunduğu bildirilmiştir. Benzer anormalliklerin de insan somatik hücre çekirdek transferi sonrası olabileceği endişesi önemle dile getirilmiştir.

Konuyla ilgili bilim adamları çekirdek transferi sonrasında tam olmayan ve tekrar programlanan (re-programmable) genleri belirleyebilmek amacıyla günümüzde bütün genomu tarayabilen moleküler bir tekniğin bulunmadığına dikkat çekmektedirler. Bu nedenle belirli ve ileri

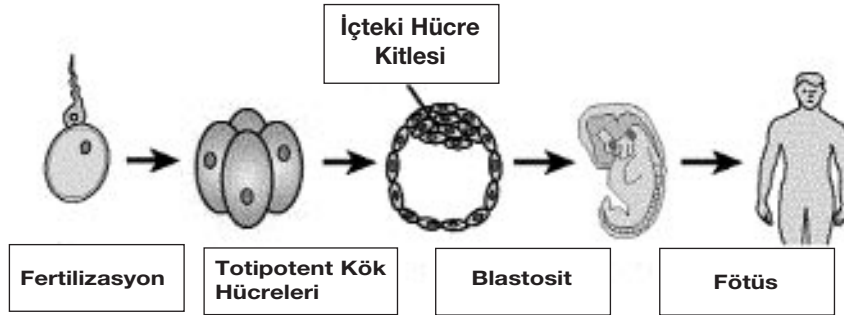
teknolojiler geliştirilmeden her ne kadar bazı savunucuları olsa da insanda reprodüktif klonlamanın (*reproductive cloning*) yapılması bilimsel yönden çok sakıncalı ve etik olarak kabul görmeyen bir yaklaşımdır.

Stem hücre araştırmalarındaki gelişmeler bu hücrelerin tedavi amacıyla kullanılabilceği ümidini vermesine rağmen halen sosyal, politik, ekonomik, hukukî, etik ve dinî yönden sorunlar çözümlenmiş değildir. Özellikle, Avrupa'da bu yeni sistem hücre tekniklerinin uygulanması ve klonlama gibi konularda ülkeler arasında görüş farklılıkları bulunmaktadır. Ülkelerin hukuki ve düzenleyici kuralları iki önemli etik soruyu gündeme getirmektedir. Birincisi, insan embriyolarının kullanımı ve üretilmesi insanların "onurunu" tehdit edebilir mi? İkinci soru da terapötik klonlamanın insan yumurta veya embriolarının ticarî satışına kadar gidebilecek bir süreci başlatıp başlatmadığıdır.

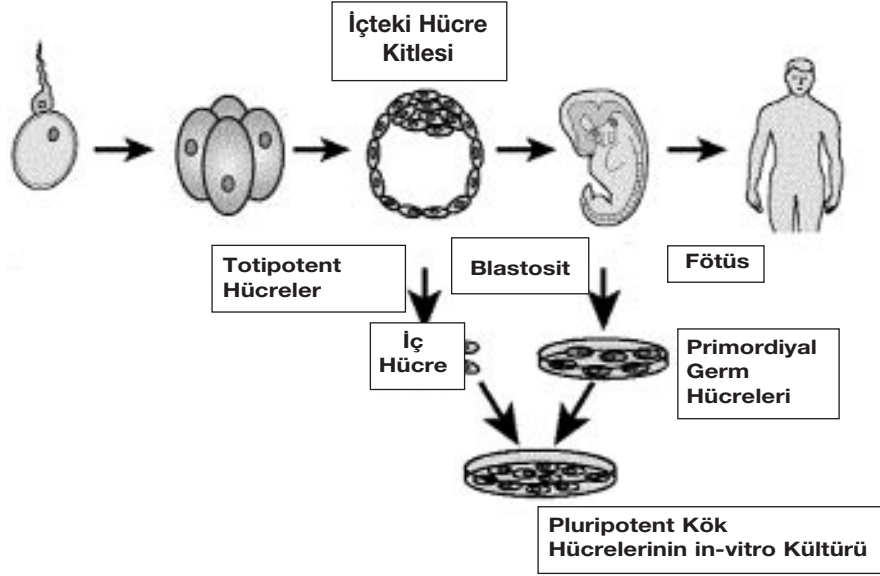
Klonlama tekniği yardımıyla verimli ve kaliteli hayvanların çoğaltılabilmesi, et kalitesi, süt verimi ile diğer tarım ve hayvancılık sektörü üretim alanlarında önümüzdeki yıllarda büyük bir araştırma ve ilgi alanı olacaktır.



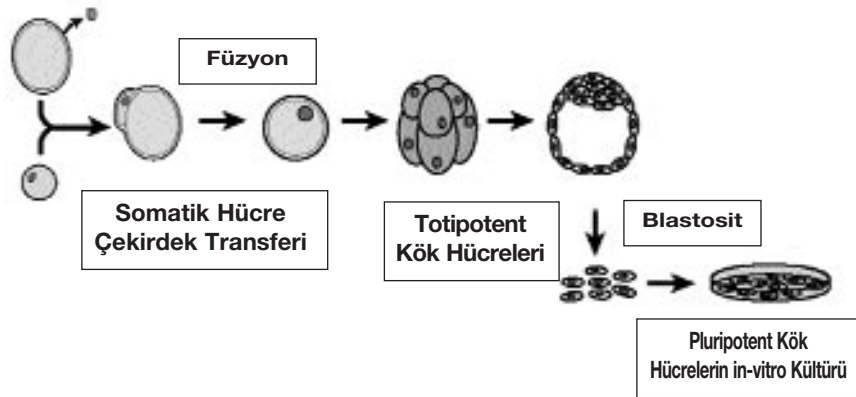
ŞEKİL-1: Kök Hücreleri



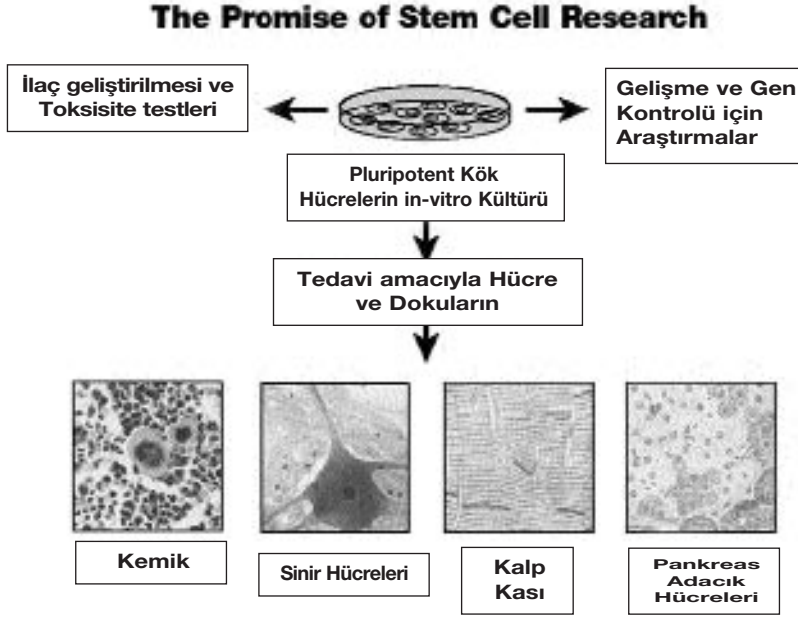
ŞEKİL-2: Normal Embryogenez ve Totipotent Kök Hücreleri



ŞEKİL-3: Embriyonik Kök Hücrelerinin Elde Edilme Yöntemleri



ŞEKİL-4: Somatik Hücre Çekirdek Transferi



ŞEKİL-5: Embriyonik ve Pluripotent Kök Hücrelerin Gelecekte Kullanım Alanları

Yararlanılan Kaynaklar :

1. Stice SL, Robl JM, Ponce de Leon FA, et al. "Cloning: New Breakthroughs Leading to Commercial Opportunities", *Theriogenology* 49:129-138, 1998.
2. Hill JR., "Human Reproductive Cloning: Premature Transfer of a Fledgling Agricultural Biotechnology into Human Infertility Clinics", *Cloning and Stem Cells*, Sayı 3, ss. 163-168.
3. Bryne JA, Gurdon JB. "Commentary on Human Cloning", *Differentiation*, Sayı 69, ss. 154-157.
4. Annas GJ., "Cloning and the US Congress", *New Engl J Med*, Sayı 346, 2002, ss. 1599-1602.
5. Weissman IL., "Stem Cells –Scientific, Medical and Political Issues", *New Engl Med*, Sayı 346, 2002, ss. 1576-1579.
6. Evers K., "European Perspectives on Therapeutic Cloning", *New Engl J Med*, Sayı 346, 2002, ss.1579-1582.
7. Jlang Y., Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al., "Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Marrow", *Nature* 20 Haziran 2002, ss. 1-9.
8. Korblyng M, Katz RL, Khanna A, et al., "Hepatocytes and Epithelial Cells of Donor Origin in Recipients of Peripheral Blood Stem Cells", *New Engl J Med*, Sayı 346, 2002, ss. 738-746.
9. Panel on Scientific and Medical Aspects of Human Reproductive Cloning. *Scientific and Medical Aspects of Human Reproductive Cloning*, Washington, D.C. National Academy Press, 2002.
10. Committee on the Biological and Biomedical Applications of Stem Cell Research. *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*. Washington, D.C. National Academy Press, 2002.