

# İnsan Embriyonik Kök Hücre Dizilerinin Elde Edilmesi, Tanımlanması ve Farklılaşma Potansiyellerinin Araştırılması

Necati FİNDIKLI, Semra KAHRAMAN, Oya AKÇIN, Zafer CANDAN, Semra SERTYEL

*İstanbul Memorial Hospital, Assisted Reproductive Techniques & Reproductive Genetics Centre, İstanbul, Turkey*

Received 28 February 2005; received in revised form 12 June 2005; accepted 20 June 2005

## Abstract

### Isolation, Characterization and *In Vitro* Differentiation of Human Embryonic Stem Cell Lines

Under suitable *in vitro* and *in vivo* conditions, human embryonic stem cells have the ability differentiate into all cell types in a human body. Therefore, it has been thought that they can play a very important therapeutic role in a variety of neurodegenerative and life-threatening disorders in the near future. To our knowledge, here we report the isolation, establishment and characterization of first human embryonic stem cell lines as well as their differentiation potential into variety of somatic cell types in Turkey. Twenty-six blastocyst-stage embryos donated for research were used for embryonic stem cell isolation. Blastocysts were processed either for immunosurgery or direct culture methods for inner cell mass isolation. In either case, apparent primary colonies after 7-10 days of culture were mechanically isolated and passaged into new plates. A total of 9 primary stem cell colonies were obtained. Seven of these cell lines were further expanded and tested for their karyotypes, cell surface antigens, alkaline phosphatase expression as well as their *in vitro* differentiation potential. Also, cells were cryopreserved by vitrification at certain passages and growth parameters were analyzed after thawing.

In conclusion, limited availability of stem cell lines as well as the limitations from the financial or ethical aspects restrict the number of research projects on human embryonic stem cells worldwide. Our results on establishment of new hESC lines can create additional potential sources for further worldwide and nationwide research on stem cells.

**Keywords:** blastocyst culture, embryonic stem cells, immunosurgery, *in vitro* differentiation

## Özet

İnsan embriyonik kök hücrelerinin, uygun *in vitro* ve *in vivo* şartlarda insan vücudunu oluşturan tüm somatik hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip olmaları bu hücrelerin yakın gelecekte ölümcül veya yaşamı olumsuz etkileyen birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, bilebildiğimiz kadarıyla ülkemizdeki ilk insan embriyonik kök hücre dizilerinin elde edilmesi, tanımlanması ve farklılaşma potansiyellerinin araştırılmasına ait bulgular sunulmaktadır.

Blastosist aşamasına ulaşmış 26 insan embriyosu embriyonik kök hücre izolasyonu için kullanıldı. Blastosistlerin iç hücre kütleli immünocerrahi veya doğrudan kültür teknikleri kullanılarak izole edildi. Her iki durumda da, 7-10 gün sonra gözlenen öncül hücre kolonileri mekanik yolla ayrıştırılarak yeni kültür kaplarına ekildi. İç hücre kütleli izolasyonu ve kültürü sonrası 9 (dokuz) farklı kök hücre dizisi elde edildi. Gelişimleri takip edilebilen 7 (yedi) kök hücre dizisi karyotipleri, yüzey antijenleri, alkalik fosfat ekspresyonu ve *in vitro* farklılaşma potansiyelleri bakımından incelendi. Ayrıca, hücreler belirli pasajlarda vitrifikasyon yöntemiyle donduruldu, tekrar çözüldükten sonra gelişim değerlendirmesi yapıldı.

Sonuç olarak, kullanılabilecek tanımlanmış embriyonik kök hücre sayısının sınırlı oluşu, elde edilme ve büyütülmelerinin yüksek maliyet gerektirmesi ve etik sorunlar dünya genelinde gerçekleştirilen insan embriyonik kök hücre çalışmaları sayısını sınırlandırmaktadır. Araştırmamızın neticesinde elde edilen insan embriyonik kök hücre (EKH) dizileri ulusal ve uluslararası araştırmalar için yeni ve potansiyel bir kaynak oluşturacaktır.

**Anahtar sözcükler:** blastosist kültürü, embriyonik kök hücre, immünocerrahi, *in vitro* farklılaşma

**Corresponding Author:** Dr. Necati Fındıklı

İstanbul Memorial Hastanesi

Yardımcı Üreme Teknikleri ve Üreme Genetiği Merkezi

Piyale Paşa Bulv. Okmeydanı-Şişli 80270 İstanbul, Türkiye

Phone : +90 212 210 66 66/3405

Fax : +90 212 210 71 40

E-mail : necatif@hotmail.com

## Giriş

İnsan embriyonik kök hücre dizilerinin ilk olarak 1998 yılında elde edilmesinden bu zamana kadar geçen süreçte daha fazla hücre dizisi oluşturmak ve tanımlamak amacıyla birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (1-6). Günümüzde, 200'e yakın insan embriyonik kök hücre dizisi elde edilmiş olmasına karşın bunların sadece bir kısmı Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından belirlenmiş kriterlere uymaktadır. Ayrıca, araştırma amaçlı örnek bulunmasındaki zorluk nedeni ile şimdiye kadar gerçekleştirilmiş birçok insan embriyonik kök hücre çalışması ve neticesinde elde edilen bulgular bu hücre dizilerini oluşturmuş sayılı araştırma grubuna aittir.

İnsan embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesinde ve tedavi amaçlı kullanılmasında karşılaşılan teknik ve etik sorunların dışında çözülmesi gereken diğer bir husus bağışıklık sistemi uyum problemidir. Hwang ve arkadaşlarının yakın zaman önce gerçekleştirdikleri çalışmada, bağışıklık sisteminin sebep olduğu verici hücre reddini engellemek için terapötik klonlama yöntemiyle kişiye özgü embriyonik kök hücre dizileri elde edilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir (7). Buna karşın, yöntemin etkinliğinin çok düşük olması ve etik açıdan ortaya çıkan problemler klinik alanda yöntemin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Hücre reddini önlemenin diğer bir yolu ise immünojenotipi belirlenmiş embriyonik kök hücre bankası oluşturularak alıcıların HLA profiline uygun embriyonik kök hücrelerinin bulunmasını kolaylaştırmaktır. (8). Bu noktadan hareketle, insan embriyonik kök hücrelerinin izolasyonu ve tanımlanması, sadece yapılan çalışmaların sayısını arttırabilmek yönünden değil, aynı zamanda kök hücre biyolojisi hakkındaki bilinmeyenlere ışık tutarak insanlık için son derece önemli olan alternatif hücre terapi yöntemlerinin geliştirilmesi yönünden de son derece önemlidir (9). Başlıca embriyoloji, onkoloji, toksikoloji ve farmakoloji gibi alanlarda yapılan çalışmalarda insan embriyonik kök hücrelerinin kullanılması, bu alanlarda ortaya çıkacak yeni tanı ve tedavi yöntemleri ile incelenen patoloji konusunda daha detaylı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada, Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) yöntemleri sırasında elde edilen ve tedavi amaçlı kullanıma uygun olmayıp araştırma amaçlı olarak bağışlanan insan embriyolarından yedi farklı insan embriyonik kök hücre dizisinin elde edilmesi ve elde edilen hücre dizilerinin embriyonik kök hücre olma özellikleri bakımından tanımlanması işlemlerinde elde edilen sonuçlar bildirilmektedir. İnsan embriyonik kök hücreleri aynı zamanda farklı somatik hücre tiplerine dönüşme potansiyelleri bakımından da değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Metot

Bu çalışma, Ocak 2003-Mayıs 2004 tarihlerinde İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Üreme Genetiği Merkezi'ne bağlı Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, embriyoloji laboratuvarında elde edilen ve embriyo kalitesi değerlendirme kriterlerine göre (10) embriyo transferi ve/veya dondurma/çözme işlemleri için uygun bulunmayan 26 adet blasto-

sist aşamasındaki embriyo kullanıldı. Çalışma, İstanbul Memorial Hastanesi Etik Kurulu'na da onaylandı ve embriyoların kök hücre elde etme amaçlı kullanımını öncesi çiftlerden, detaylı bilgilendirme sonrası yazılı onay formu alındı.

### Destek hücrelerin hazırlanması

Çalışmada destek hücresi olarak kullanılan fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF), 12-14 günlük gebe Balb/c farelerinden izole edilen fetusların mekanik ve enzimatik yöntemler ile ayrıştırılması yolu ile elde edildi. Elde edilen fibroblast hücreleri, yüksek glikozlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK), %10 FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 1mM L-glutamin (Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK), %1 penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK) ve 0.1 mM β-merkaptotanol (Sigma, St. Louis, USA) içeren kültür ortamında büyütüldü. Bu hücreler 2. ve 6. pasajlar arasında 3 saat boyunca 2 µg/ml Mitomisin-C içeren kültür ortamında inkübe edilerek mitotik aktiviteleri durduruldu. Mitotik inaktivasyon sonrası hücreler %0.1'lik jelatin (Sigma, St. Louis, USA) ile kaplanmış kültür kaplarına ekildi.

Çalışmada ayrıca insan kaynaklı destek hücresi olarak sünnet derisinden (prepusium) elde edilen fibroblast hücreleri kullanıldı. İnsan sünnet derisinden fibroblast hücrelerinin izolasyonu yapılırken ve destek hücre olarak hazırlanırken daha önce yayınlanmış yöntem (11) dikkate alındı.

### Blastosist evresindeki embriyodan iç hücre kütle (ICM) izolasyonu

Embriyonik kök hücre izolasyonu için kullanılan tüm blastosistler 10 U/ml pronaz (Sigma, St. Louis, USA) enzimi içeren embriyo kültür ortamında kısa süre bekletilerek, zona pellusida tabakasının erimesi sağlandı.

İmmünocerrahi yöntem uygulanırken daha önceden yayınlanmış olan yöntem (12) takip edildi. Anti-insan albümin antikor (Sigma, St. Louis, USA) ve Guinea Pig Complement (Accurate Chemical, New York, USA) kullanılarak trofoblastik hücreler parçalandı ve uzaklaştırıldı. ICM, çapı inceltirilmiş pastör pipeti ile birkaç kez pipetlenerek etrafındaki hücrelerden ve debriden uzaklaştırıldı. Temizlenmiş ICM kümeleri embriyonik kök hücre kültür ortamı içeren ve MEF hücreleriyle kaplanmış kültür kaplarına alındı ve 7-10 gün süre ile kültüre edildi.

Doğrudan kültür yönteminde ise zonası uzaklaştırılmış insan blastosistleri daha önceden hazırlanmış MEF hücreleriyle kaplı kültür kaplarına konuldu. Embriyonik kök hücre kültür ortamı her gün yenilendi ve kök hücre kolonilerine benzer koloniler görülene kadar hücrelerin ve kolonilerin morfolojisi kontrol edildi.

### Embriyonik kök hücre kültürü

Çalışmada kök hücre kültür ortamı olarak Ko-DMEM (Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco In-

vitrogen Corporation, Scotland, UK), %15 FBS (Hyclone, South Logan, USA), 2 mM L-glutamin (Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK), %1 penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK), %1 non-esansiyel aminoasit (Sigma, St.Louis, USA), 10 µg/ml β-merkaptotetanol (Sigma, St.Louis, USA), %1 insülin-transferin-selenyum kompleksi (Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK) ve 12 ng/ml insan recombinant "Leukemia Inhibitory Factor" den (LIF) (Chemicon; Temacula, USA) oluşan hücre kültür kokteyli kullanıldı. İlk sekiz pasajdan sonra LIF kültür ortamı kokteylden uzaklaştırıldı.

### Karyotipleme ve immünohistokimyasal analiz

Karyotipleme öncesi kök hücre kolonileri 0.1 µg/ml colcemid içeren kültür ortamında 3 saat boyunca 37°C'ta ve %6 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası koloniler mekanik olarak MEF destek hücrelerinden uzaklaştırıldı ve hücre kültür ortamı içeren 15 ml'lik falcon tüplerine kondu. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra supernatan uzaklaştırıldı ve pelet hipotonik solüsyon ile (0.075M KCl) tekrar süspansiyon edildi. Hücreler 17 dakika boyunca 37°C'ta inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası metanol/asetik asit (3:1) ile fikse edilerek G bantlaması yapıldı.

İmmünohistokimyasal analiz için, hücre kolonileri en az 15 dakika boyunca %4'lük paraformaldehid içeren PBS (Phosphate Buffered Saline; Gibco Invitrogen Corporation, Scotland, UK) solüsyonunda bekletilerek fikse edildi. Tanımlama için kullanılan SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 yüzey anti-jenlerine özel antikorlar ve alkalın fosfataz substratı için ticari olarak satılan kök hücre karakterizasyon kiti (Stem Cell Characterization Kit; Chemicon, Temacula, USA) kullanıldı. Analiz üretici firmanın kılavuzuna uyularak FITC-bağlı keçi anti-fare sekonder antikor (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) ve epifloresan mikroskop (BX50 Olympus, Japan) kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan diğer antikorlar, OCT-4, Nestin, Map2A&B ve kardiyak-spesifik Troponin I antikorları Chemicon firmasından temin edildi.

### Dondurma/çözme işlemleri

Vitrifikasyon işlemi daha önce yayınlanmış protokollerde (13,14) küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Koloniler kültür kaplarından mekanik olarak uzaklaştırıldıktan sonra öncelikle HEPES içeren ortama transfer edildi ve 1 dakika süreyle bekletilerek dengelendi. Dengelenen koloniler solüsyon I'e (%10 Dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma, St.Louis, USA) ve %10 Etilen Glikol [Sigma, St. Louis, USA] içeren) alındı ve 1 dakika bekletildikten sonra solüsyon II'ye (%20 DMSO, %20 Etilen Glikol, 0.3M Sükroz içeren) transfer edildi. Koloniler en fazla 30 saniye bu solüsyonda bekletilerek ağız pipeti ile toplandı ve daha önceden hazırlanmış hemistraw çubuğun uç kısmına transfer edildi.

Çözme işlemi ise dondurulmuş kolonilerin sırasıyla 0.2M ve 0.1M sükroz içeren kültür ortamında 1'er dakika, en son olarak da HEPES (Sigma, St.Louis, USA) içeren kültür ortamında 5 dakika inkübe edilmesi ile gerçekleştirildi. Koloni-

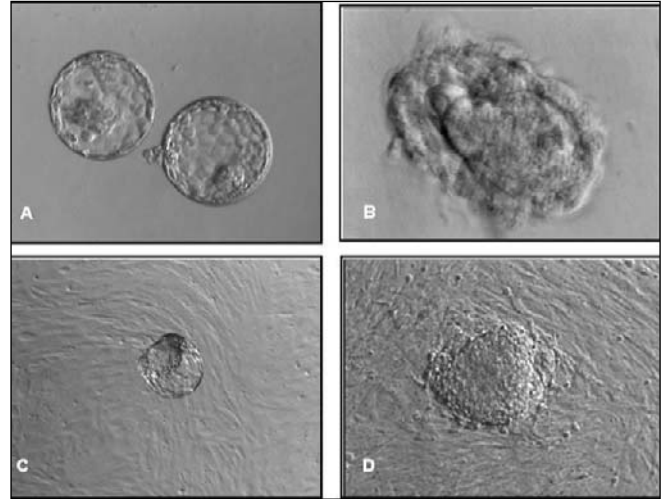
ler daha sonra embriyonik kök hücre kültür ortamı içeren destek hücresiyle kaplanmış kültür kaplarına transfer edildi.

### Sonuçlar

Çalışmanın ilk aşamasında, iç hücre kütlesi farklı özellikteki 20 insan blastosisti embriyonik kök hücre izolasyonu için seçildi (Resim 1A). Bu embriyolardan 15'inin immünocerrahi yöntemine uygun olduğu saptandı ve immünocerrahi yöntemi uygulandı. İşlem sonrası 12 adet hücre bütünlüğünü koruyan iç hücre kütlesi kümesi elde edildi (Resim 1B). Elde edilen ICM kümeleri mitomisin-C ile mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblast hücrelerinin üstüne konularak kültüre edildi.

İç hücre kütlelerinin kültüre edildiği dönem boyunca, 4 adet ICM kümesinden (4/12; %33.3) öncül kök hücre kolonilerine benzer koloniler gözlemlendi (Resim 1D). Bunlar NS-1, NS-2, NS-3 ve NS-4 olarak isimlendirildi ve mekanik olarak her 5-7 gün sonra yeni destek hücresi içeren kaplara pasajlandı. 3. pasajdan sonra, NS-1 ve NS-2 hücreleri kültürde spontan farklılaşmaya uğradığı için kaybedildi. Diğer iki hücre dizisi (NS-3 ve NS-4) ise başarılı şekilde donduruldu/çözüldü ve 40 pasajdan fazla destek hücresinin üstünde büyütülebildi. Hücreler kültüre edilirken her iki dizi için de belirli dönemlerde yapılan ölçümlerle benzer koloni büyüme hızı tespit edildi. Bu parametrelerin dondurulmayı takiben çözülüp tekrar kültüre edilen koloniler için de benzer olduğu saptandı.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise zonası uzaklaştırılmış 11 blastosiste doğrudan kültür tekniği uygulandı (Resim 1C).

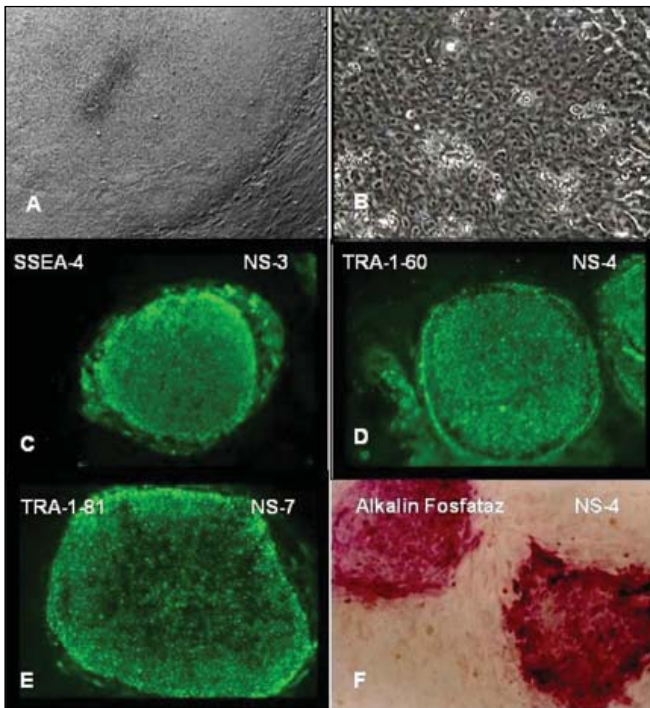


**Resim 1.**

- Pronaz ile muamele öncesi insan blastosist aşaması embriyo görüntüsü (200x büyütme);
- İmmünocerrahi işlemi sırasında guinea pig complement ile muamele sonrası lize olan trofektoderm hücreleri (400x büyütme);
- Pronaz ile muamele sonrası doğrudan kültür ortamına alınan blastosist aşaması embriyo (100x büyütme);
- Fare embriyonik fibroblast destek hücreleri üzerinde büyüyen primer kök hücre kolonisi (200x büyütme).

Bu blastosistlerden beşi, daha sonra YÜT siklusuna alınmış olgulardan elde edilen transferi ve dondurulması uygun olmayan embriyolardı. Bu blastosistlerin MEF hücreleri üzerindeki kültürü neticesinde sadece bir kaptan embriyonik kök hücre kolonisine benzer koloni gözlemlendi ve elde edilen bu dizi MİNE olarak isimlendirildi. Altı blastosist ise HLA tiplemesi için preimplantasyon genetik tanı (PGT) uygulanmış bir çiftten elde edildi. Embriyolar olabilecek tüm HLA uyumu ihtimali bakımından incelendikten sonra, hasta çocukla HLA uyumu göstermeyenler çiftten alınan yazılı izinle çalışma için kullanıldı. Bu blastosistlerin doğrudan kültür tekniğiyle büyütülmesi neticesinde 6 kaptan 4'ünde primer kök hücre kolonileri oluştu (%66.6). Elde edilen bu primer kök hücre dizileri NS-5, NS-6, NS-7 ve NS-8 olarak isimlendirildi. Hücreler daha önceden belirtilen şekilde büyütüldü, muhtelif aralıklarla vitrifikasyon uygulandı.

Tüm hücre dizilerine ait koloniler sınırları belirgin yuvarlak görümlü koloniler oluşturarak çoğalmayı sürdürdüler (Resim 2A). Mikroskopun yüksek büyütmelelerinde, daha evvel yayınlanmış çalışmalarla uyumlu olarak hücrelerin belirgin çekirdekçik yapısına sahip ve çekirdek/sitoplazma oranını yüksek olduğu gözlemlendi (Resim 2B). Çalışmada elde edilen hücre dizilerinin embriyonik kök hücrelerine spesifik yüzey antijenleri (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve OCT-4) ve alkalın fosfataz ekspresyonu gösterdikleri tespit edildi

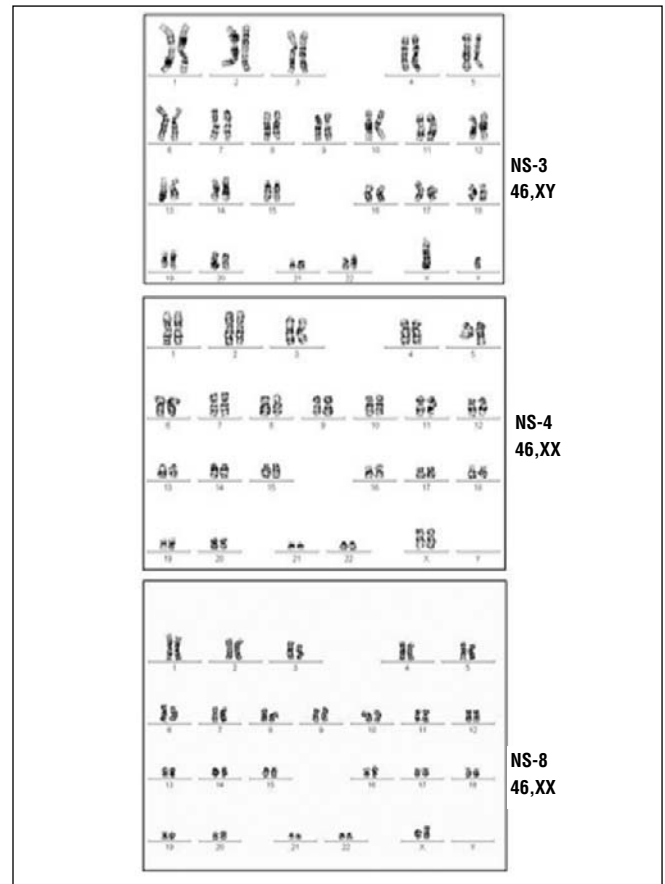


**Resim 2.**

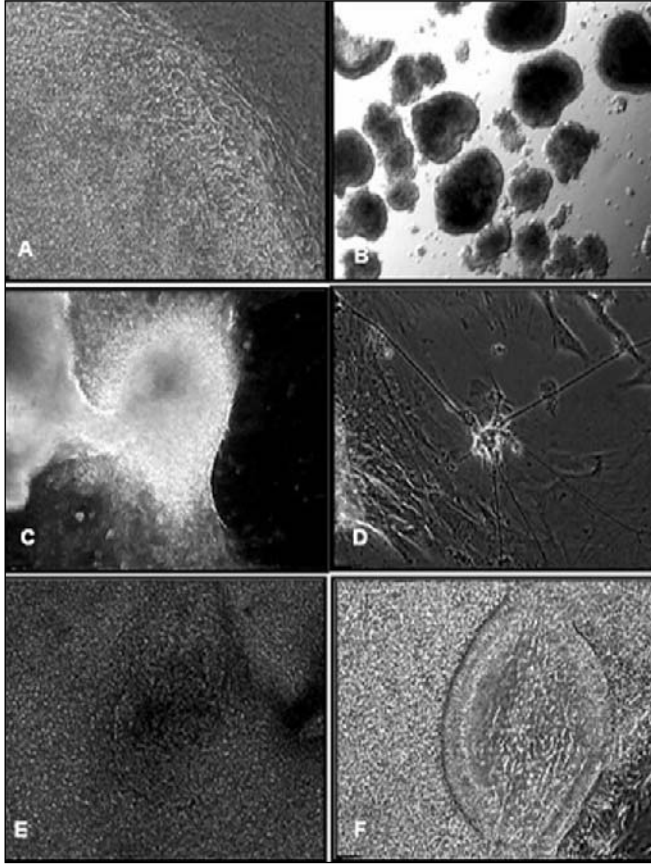
- Pasaj sonrası gelişimin 6. günündeki insan embriyonik kök hücre kesiti (40x büyütme);
- Yüksek büyütmede gözlenen yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip kök hücreler (400x büyütme);
- e) NS-3, NS-4 ve NS-7 dizilerine ait farklı yüzey antijen ekspresyonu görüntüleri (FITC, 40x büyütme).
- f) Alkalın fosfataz ekspresyonu (100x büyütme)

(Resim 2C-F). Tüm hücre dizilerinin ayrıca G bantlama sonucunda normal karyotipe sahip oldukları görüldü (Resim 3'te örnek olarak üç dizi karyotipi verilmiştir).

İnsan embriyonik kök hücreleri destek hücrelerinin olmadığı ve LIF içermeyen kültür ortamı ile süspansiyon olarak büyütülür ise kendiliğinden embriyoid cisimcik (embryoid body) adı verilen üç boyutlu hücre toplulukları oluşmaktadır ve üç germ yaprağına ait farklı hücre tiplerine dönüşebilmektedir (15). Bu amaçla çalışmada destek dokusunda büyütülen kök hücre kolonileri mekanik yöntemle destek dokudan uzaklaştırıldı ve sadece kök hücre kültür ortamı bulunan bakteri petri kaplarına konarak 7-10 gün süre ile kültüre edildi (Resim 4B). Oluşan üç boyutlu kistik embriyoid cisimcikler jelatin kaplı kaplara transfer edilerek 4 hafta boyunca büyümeleri ve farklılaşmaları kontrol edildi (Resim 4C). 4 hafta boyunca büyüyen embriyoid cisimciklerde nöral plak benzeri rozet yapıları ve farklılaşan nöronlar (Resim 4D), spontan kasılma (kontraksiyon) gösteren hücre toplulukları (Resim 4E), epitel hücreler (Resim 4F) ve endotel hücrelerine benzer hücreler gözlemlendi. Embroid cisimciklerdeki nöron-benzeri hücrelerin MAP2A&B ekspresyonuna sahip oldukları (Resim 5A) ve spontan kasılma gösteren hücre topluluklarının kardiyak-spesifik Troponin I ekspresyonu gösterdikleri (Resim 5B) immüno-sitokimyasal olarak tespit edildi.



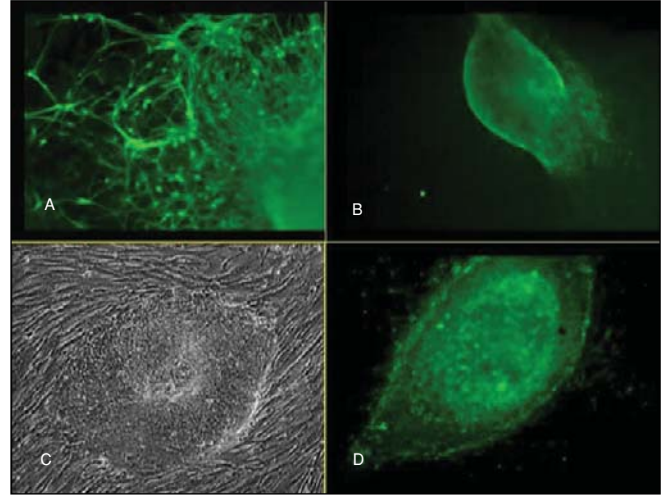
**Resim 3.** NS-3, NS-4 ve NS-8 insan embriyonik kök hücre dizilerine ait normal karyotip görüntüleri.



**Resim 4.**

- Destek hücresi üzerinde gelişimi devam eden farklılaşmamış insan embriyonik kök hücre kolonisi kesiti (100x büyütme);
- Mekanik yöntem kullanılarak destek hücresi üzerinden ayrılan ve süspansiyon şeklinde gelişimlerine devam eden embriyoid cisimcikler (40x büyütme);
- Jelatin kültür kabına ekimi yapılan ve farklılaşmaya devam eden EB yapısı (40x büyütme);
- Nöron-benzeri hücreler (100x büyütme);
- Spontan kontraksiyon gösteren hücreler (40x büyütme);
- Epitel-benzeri hücreler (40x büyütme).

Ayrıca, bu çalışmada oluşturulan EKH dizilerine ait koloniler, insan sünnet derisinden (prepusium) elde edilen stromal hücrelerin destek hücresi olarak kullanıldığı kültür kaplarında büyüebilmeleri yönünden de analiz edildiler. 15. pasajdan sonra NS-4, NS-5 ve MINE dizilerine ait farklılaşmamış koloniler mekanik olarak izole edildi ve daha önceden hazırlanmış sünnet derisi fibroblast hücrelerinin üzerine ekildi. Tüm koloniler 24 saat içinde destek hücrelerine tutundular ve gelişimlerine devam ettiler (Resim 5C). Sünnet derisi fibroblast hücreleri üzerinde büyütülen koloniler, MEF hücrelerinin destek dokusu olarak kullanıldığı EKH dizilerine ait koloniler ile karşılaştırıldığında, sünnet derisi fibroblast hücrelerinin büyüme yönüne doğru polarize olmalarından ötürü meydana gelen koloni morfolojisindeki değişiklik dışında, kolonilerin benzer büyüme özelliğine sahip oldukları ve kök hücre özelliklerini korudukları gözlemlendi. Ayrıca hücreler embriyonik kök hücreye özerk yüzey antijen ekspresyonlarını da korudular (Resim 5D).



**Resim 5.**

- In vitro* farklılaşma sonrası nöronal morfoloji gösteren hücrelerin MAP2A&B ekspresyonu (100x büyütme);
- In vitro* farklılaşma sonrası spontan kontraksiyon gösteren bölgenin Troponin I ile işaretlenmesi sonrası elde edilen görüntü (FITC, 40x büyütme);
- İnsan sünnet derisinden elde edilen fibroblastlardan oluşan destek hücre sistemi üzerinde büyüyen insan embriyonik kök hücre kolonisi (40x büyütme);
- c)'deki insan embriyonik kök hücrelerin ardışık pasajları sırasınca gözlenen SSEA-4 ekspresyonu (FITC, 40x büyütme).

## Tartışma

Parkinson, Alzheimer, enfarktüs, diyabet gibi ölümcül veya yaşam kalitesini düşüren pek çok hastalığın tedavisinde alternatif olarak kök hücre terapi yöntemleri denenmektedir. Özellikle yetişkin ve kordon kanı kök hücrelerinin kullanıldığı çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bununla birlikte, çalışmalarda belirli bir grupta olumlu sonuçlar alınmasına karşın henüz klinik kullanıma uygun, güvenli ve verimli bir tedavi metodu oluşturulamamıştır. Ototolog kaynaklı kök hücrelerin kullanılmasının embriyonik kök hücre izolasyonunda ve verici-alıcı konularında ortaya çıkan etik, yasal ve immünojenik sorunları kısmen azaltıyor olmasına karşın, birçok olguda elde edilen otolog kök hücre miktarı transplantasyon için yeterli olmamakta ve hücrelerin laboratuvar ortamında çoğaltılmasında büyük güçlüklerle karşılaşmaktadır.

Yetişkin kök hücre çalışmaları ortaya çıkan belirsizlikler ve bu hücrelerin sahip oldukları kısıtlı çoğalma ve farklılaşma özellikleri yetişkin kaynaklı kök hücrelerinin rutin klinikte kullanımının halen beklenen verimlilik derecesinden uzak olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, insan EKH izolasyonunun ve laboratuvar ortamında büyütülmesinin etik ve yasal boyutu dünya genelinde halen tartışılıyor olmasına karşın, insan embriyonik kök hücrelerinin kendini sürekli yenileme ve kültür ortamında farklılaşmaya uğramadan sürekli çoğalabilme özelliğine sahip olmaları bu hücreleri hücre-tabanlı tedavi yöntemlerinde kullanılabilecek uygun bir kaynak konumuna getirmiştir.

Bu noktadan hareketle, dünya genelinde var olan insan embriyonik kök hücre dizilerine yenilerinin eklenmesi, gelecekte hücrelerin potansiyel hücre terapi aracı olarak kullanılmasına yönelik yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalara hız kazandıracaktır. Ayrıca, terapötik klonlamanın teoride alıcı ile verici arasındaki HLA uyumsuzluğuna bir çare olabileceği gösterilse de bu sistemin başarı oranının çok düşük, teknik ve biyolojik doğrulamanın eksikliğiyle birlikte etik konuların da halen tartışılıyor oluşu yaklaşımın yakın gelecekte bir alternatif olamayacağına işaret etmektedir.

Blastosist aşamasındaki embriyolardan insan embriyonik kök hücresi elde edilmesindeki başarı oranının daha önceki çalışmaların sonuçlarıyla benzer şekilde büyük farklılıklar gösterdiği gözlemlendi. Çalışmada, embriyo transferi veya dondurma/çözme işlemi için seçilmeyerek çalışmaya dahil edilmiş blastosistlerden sadece iyi kalitede (A ve B kalitesinde) iç hücre kütesine sahip blastosistlerden embriyonik kök hücre izolasyonu gerçekleştirilebildi. Ayrıca HLA tiplemesi ile kombine olarak gerçekleştirilen PGT uygulaması sonrası transfer için uygun olmayan ve kök hücre elde edilmesi için ayrılan 6 adet iyi kalite iç hücre kütesi içeren blastosist aşaması embriyonun 4'ünden (%66.6) insan embriyonik kök hücre dizileri elde edildi. Embriyo sayısı sonuç çıkarabilmek için yeterli olmamasına karşın, ilk izlenimler başlangıç materyalinin kalitesinin çalışmalarda en önemli kriter olduğunu düşündürmektedir.

HLA tiplemesiyle kombine yapılan PGT uygulamaları, kordon kanından veya kemik iliğinden elde yetişkin kök hücrelerinin kullanımıyla birlikte belirli hastalıkların tedavisinde araç olarak kullanılmaktadır (16). İnfertil popülasyon ile karşılaştırıldığında HLA ile kombine gerçekleştirilen PGT uygulamalarında göreceli olarak yüksek kaliteli embriyolar elde edilmektedir (17). Bu nedenle, çalışılan embriyo sayısı çok az da olsa embriyo kalitesine bağlı olarak elde edilen yüksek verimlilik, tekniğin sadece yetişkin kök hücre elde edilmesi ve transplantasyonu amacıyla değil, HLA uyumlu embriyodan embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesi ve yakın gelecekte terapötik bir araç olarak kullanılabilmesine imkan sağlayabileceğini işaret etmektedir.

Son zamanlarda bazı gruplar doğrudan kültür yöntemiyle embriyonik kök hücre dizileri elde ettiklerini gösteren çalışmalarını yayınladılar (6,18,19) Bu çalışmada, materyal sayısı sınırlı olsa da, daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, doğrudan kültür yöntemi ile yapılan izolasyonun embriyonik kök hücre elde edilmesindeki başarıyı attığı gözlenmiştir (%26.6'ya karşı %45.5).

Günümüzde insan embriyonik kök hücrelerinin tedavi amacıyla kullanımındaki en önemli engellerden biri, elde edilmeleri ve büyütülmeleri sırasında kullanılan hayvan kaynaklı hücre ve substratlardır. Bu çalışmada ve dünya genelinde günümüze kadar elde edilen insan embriyonik kök hücreleri, kültüründe hayvan kaynaklı kültür ortamları kullanıldığından yakın gelecekte tedavi amaçlı kullanım için uygun olmayacaklardır. Bu nedenle embriyonik kök hücre çalışmaların-

daki temel amaçlardan biri insan embriyonik kök hücre kültüründe kullanılacak ve hayvansal madde ve ortamlar içermeyen bir kültür sistemi oluşturulmasıdır. Günümüze kadar gerçekleştirilen bazı çalışmalarda fare fibroblast hücrelerine alternatif olarak insan kaynaklı endometrial stromal, kemik iliği stromal, fetal kas ve deri hücrelerinin de destek hücresi olarak kullanılacağı gösterilmiştir (11,20-23). Embriyonik kök hücre kültürü sırasında kullanılan ve son zamanlarda dikkati çeken diğer bir yöntem ise destek dokusunun sistemden çıkarıldığı yöntemdir (24-26). Merkezimizde yürütmekte olduğumuz kök hücre çalışmalarına yol göstermesi açısından, elde edilmiş olan embriyonik kök hücre dizileri insan sünet derisi fibroblast hücreleri içeren destek hücre ortamında da test edilerek adı geçen destek hücre sisteminin embriyonik kök hücre gelişimini desteklediği gözlenmiştir. Dolayısı ile benzer hücre kültür sistemleri, insan embriyonik kök hücrelerinin yakın gelecekte tedavi amaçlı kullanılacağı bir sistem oluşturma yönünde imkan sağlamaktadırlar.

Tedavi amaçlı kullanım potansiyelleri yanında bu çalışmada oluşturulan yeni insan embriyonik kök hücre dizileri ve daha önce farklı gruplarca oluşturulmuş diziler, temel moleküler ve kök hücre biyolojisi gibi *in vitro* çalışmalar için potansiyel kaynak oluşturmaktadırlar. Toksikoloji ve yeni ilaç tasarımı/geliştirilmesi alanlarında insan embriyonik kök hücre kullanımına ilgi artmaktadır. Ayrıca PGT sonrası elde edilen, özerk genetik anomalisi veya genetik hastalığı olan embriyolardan elde edilebilecek kök hücre süşları genetik hastalıkları araştırmak adına çok değerli kaynak oluşturmaktadır (5).

İstanbul Memorial Hastanesi YÜT ve Üreme Genetiği Merkezi'nde gerçekleştirilen bu çalışma, embriyonik kök hücrelerinin blastosist evresindeki embriyolardan elde edilmesini, karakter tanımlamasını ve uzun dönem kültür ortamında kültüre edilmesini içeren ve bilebildiğimiz kadarıyla Türkiye'de yapılmış ilk çalışma olmasından dolayı önemlidir. Bazı ülkelerde, insan embriyosunun kök hücre kaynağı olarak kullanılması katı kurullarla düzenlenmiş olup birden fazla komite veya enstitü tarafından kontrol edilmektedir. Diğer taraftan, Almanya, Norveç ve İtalya gibi bazı ülkelerde embriyoların araştırma amaçlı kullanımı yasaklanmıştır. İngiltere'de ise embriyoların araştırma ve terapötik klonlama amaçlı kullanılmasına izin verilmektedir. Türkiye'de kök hücre araştırmaları hakkında yasal veya kamusal enstitülerce tanımlanmış ve kabul edilmiş özel düzenlemeler ve kılavuzlar henüz mevcut değildir. Gerek yetişkin gerekse embriyonik kaynaklı kök hücre araştırmalarını konu alan, bu makalede gerçekleştirilen çalışmaya benzer araştırmaların bilimsel ve sosyal ilgiyi temin edebileceği ve bunu takiben, Türkiye ve benzer diğer ülkelerdeki düzenleyici kurumların bu alanda yapılması gereken uygun düzenlemeleri ve kılavuz kurulları oluşturacağı düşünülmektedir.

## Teşekkür

Çalışmada bizlere sitogenetik analiz aşamasında yardımcı olan Sayın Asiye Gür'e ve verdikleri her türlü destek için tüm İstanbul Memorial Hastanesi YÜT ve Üreme Genetiği Merkezi çalışanlarına teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human Blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-1147.
2. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human Blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotech* 2000;18(4):399-404.
3. Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 2001;76(1):132-137.
4. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, Moon SY, Roh SI, Kim CG, Yoon HS. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003;69(6):2007-2014.
5. Pickering SJ, Braude PR, Patel M, Burns CJ, Trussler J, Bolton V, Minger S. Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. *Reprod Biomed Online* 2003;7(3):353-364.
6. Heins N, Englund MC, Sjoblom C, Dahl U, Tonning A, Bergh C, Lindahl A, Hanson C, Semb H. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(3):367-376.
7. 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, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned Blastocyst. *Science* 2004;303(5664):1669-1674.
8. Trounson A. Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(suppl. 1):58-63
9. Edwards RG. Stem cells today: A. Origin and potential of embryo stem cells. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(3):275-306.
10. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single embryo transfer. *Fertil Steril*. 2000;73(6):1155-1158.
11. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M, Ahrlund-Richter L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1404-1409.
12. Solter D and Knowles BB. Immunotherapy of mouse Blastocyst. *PNAS* 1975;72(12):5099-5102.
13. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2187-2194.
14. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, van Rosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech N. Vitrification of human Blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 2003;18(7):1504-1511.
15. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000;6(2):88-95.
16. Kuliev A and Verlinsky Y. Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of International Meeting, Cyprus, 27-28 March, 2004. *Reprod Biomed Online* 2004;9(2):205-209.
17. Kahraman S, Karlikaya G, Sertyel S, Karadayi H, Fındıklı N. Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing *Reprod Biomed Online* 2004;9(5):529-532.
18. Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M, Manor D, Itskovitz-Eldor J. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum Reprod* 2004;19(3):670-675.
19. Sjogren A, Hardarson T, Andersson K, Caisander G, Lundquist M, Wikland M, Semb H, Hamberger L. Human Blastocysts for the development of embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004; 9 (3): 326-329.
20. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature Biotech* 2002;20(9):933-936.
21. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 2003;68(6):2150-2156.
22. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*. 2003;21(2):131-142.
23. Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK, Roh SI, Yoon HS. Establishment and Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Lines on Human Feeder Cells Derived from Uterine Endometrium under Serum-Free Condition. *Biol Reprod* 2005;72(1):42-49.
24. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells in vitro. *Nature Biotech* 2001;19(10):971-974.
25. Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(1):79-88.
26. Koivisto H, Hyvarinen M, Stromberg AM, Inzunza J, Matilainen E, Mikkola M, Hovatta O, Teerijoki H. Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod Biomed Online* 2004;9(3):330-337.