

İnsan Kök Hücrelerin Dondurulması ve Yüzyıllarca Saklanması

Canlılık sıvı azot tankında -196 °C'de yıllarca muhafaza edilebiliyor.

Şimdilik tedavisi olmayan bir hastalığa yakalanmış ve ölümün eşğine gelmiş hastalar kendilerini dondurarak büyük sıvı azot tanklarının içinde yeniden hayata dönüş için bekliyorlar. Dünyada bununla ilgili hayat uzatma vakıfları çoktan kuruldu bile.

Önümüzdeki yıllarda kriyoprezervasyon teknolojisinin gelişmesi sayesinde hayat süresi uzayabilir ve daha kaliteli ve sağlıklı bir yaşam sürdürülebilir.



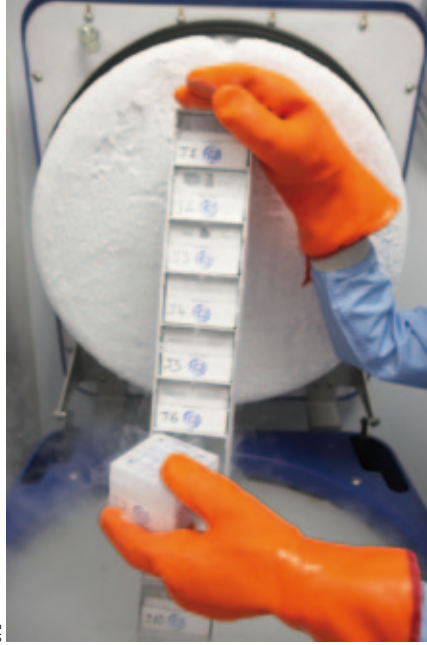
İnsan hücrelerinin, özellikle embriyoların ve kök hücrelerin kriyoprezervasyonu (dondurulması) yardımcı üreme teknikleri (yapay dölleme, IVF, mikroenjeksiyon) alanında çok önemli bir rol oynar. Kök hücreler bölünerek kendini yenileyebilen ve özelleşmiş fonksiyonel hücrelere dönüşebilme yeteneği olan farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücre tipleri arasında yer alan embriyonik kök hücreler, her çeşit hücre ve dokuya dönüşebilme kapasitesi nedeniyle doku mühendisliği ve yenileyici (rejeneratif) tıp alanında kullanılacak bir kök hücre grubudur. Embriyonik kök hücrelerin Dr. James Alexander Thomson ve arkadaşları tarafından 1998'de üretilmesiyle birlikte embriyonik kök hücre konusunda yeni bir dönem başladı. Günümüzde, insan embriyoları üzerine dondurma çalışmaları tüp bebek kliniklerinde artan ve bağışlanan embriyolarla yapılıyor. Embriyo potansiyel bir canlı olarak kabul edildiğinden bu hücrelerin araştırmada veya tedavide kullanımıyla ilgili etik sorunlar ortaya çıkabilir. Özellikle insan embriyonik kök hücreleri yeni ilaç tasarımı deneylerinde, ilaç toksisitelerinin araştırılmasında ve erken embriyonik gelişim çalışmalarında model olarak kullanılacak hücrelerdir. Normalde kendileri çoğalamayan sinir, kas veya kan hücrelerinden farklı olarak, kök hücreler bölünebilir ve çoğalabilirler. Laboratuvar şartlarında çoğalabilen kök

hücre popülasyonundan milyonlarca hücre ortaya çıkabilir. Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir (sinir hücresi gibi). Kök hücreler uygun ortamlarda sıvı azot buharı içerisinde $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulur, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de yüzyıllarca saklanabilir ve gerektiğinde bu hücreler çözülerek kullanılabilirler. Bugün dünyadaki tüp bebek merkezlerinde spermalar, yumurtalar, embriyolar, kök hücreler, ovaryum ve testis dokuları dondurularak saklanmakta ve istenildiği takdirde bu hücreler çözündürülerek kullanılmaktadır.

Embriyonik Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Döllenme, olgun dişi yumurta hücresi ile erkek üreme hücresi spermin birleşerek döllenmiş yumurtanın (zigot) meydana gelmesidir. Bu olay, dişilerin yumurta yolunda (fallop tüplerinde) gerçekleşir. Spermin yumurta hücresi ile buluşmasından sonra sperm, baş kısmındaki eritici enzimlerle yumurtanın zarlarını delerek sitoplazma içine girer. Bir sperm yumurta içine girdikten sonra yumurta zarının özelliğini değiştirerek başka spermaların yumurta içine girmesine izin vermez. Döllenmiş yumurta zigot, belirli zaman aralıklarında bölünmeye başlayarak önce iki hücreye sonra sırasıyla dört, sekiz, on altı, otuz iki (morula) ve son olarak 95-100 adet hücreye bölünür. Bu aşamadaki embriyoya blastokist adı verilir. Bir blastokistte iki tür hücre bulunur, en dıştaki hücre dizisine "trofoblast", en içteki hücre topluluğuna ise "iç hücre kitlesi" denir. Embriyonik kök hücreler (EKH) blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir ve bu hücreler vücuttaki dokuları meydana getiren yaklaşık 200 farklı hücre tipine dönüşebilirler. İnsan embriyonik kök hücreleri, sınırsız sayıda bölünebilir ve vücudumuzu meydana getiren tüm somatik hücrelere farklılaşabilme özelliği gösterirler. Bundan dolayı yeni ilaçların geliştirilmesi ve fonksiyonlarının yitirmiş, zedelenmiş do-

kuların yenilenmesi için insan embriyonik kök hücreleri önemli bir kaynaktır. Bu hücrelerin dondurularak saklanabilmeleri ve gerektiğinde çözülüp kullanılabilmeleri gerekir.



Kriyoprezervasyon yaşayan hücre ve dokuların dondurularak saklanması anlamına gelir. Doku ve hücre gibi biyolojik materyallerin dondurularak biyobankalarda saklanması, hem genetik materyalin korunması hem de hasarlı dokuların yenilenmesi bakımından önemlidir. Hücreleri düşük sıcaklıklarda zarar vermeden muhafaza edebilmek için bazı koruyucu moleküllerin kullanılması gerekir. Çok düşük sıcaklıklarda hücrenin içindeki su moleküllerinin donmasıyla oluşabilecek buz kristalleri hücrelerin bütünlüğünü bozar. Hücre içindeki buz kristallerinin oluşmasını önleyebilmek için kriyoprotektan denilen koruyucu bazı moleküller kullanılır. Kriyoprotektanlar hücre zarından içeri girebilmeli ve hücrede toksik etki yaratmamalıdır. Gliserol, dimethylsulfoxide (DMSO), etanediol ve propanediol bu amaçla kullanılan kriyoprotektanlardan bazılarıdır. Hücre kültüründe çoğaltılan birçok hücrenin dondurulmasında klasik yavaş dondurma yöntemi tercih edilir. Bu yöntemde hücreler DMSO adlı kriyopektan ile sıcaklık dakikada $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ düşürülerek

dondurulur. Hücrenin içindeki su dışarı çıkarken DMSO hücre içine girer. Böylelikle hücre dışına çıkan su donar ve hücre içinde buz kristallerinin oluşumu engellenmiş olur. Bu yavaş soğutma yöntemiyle dokuları ve organları meydana getiren somatik hücreler başarıyla dondurulabilir.

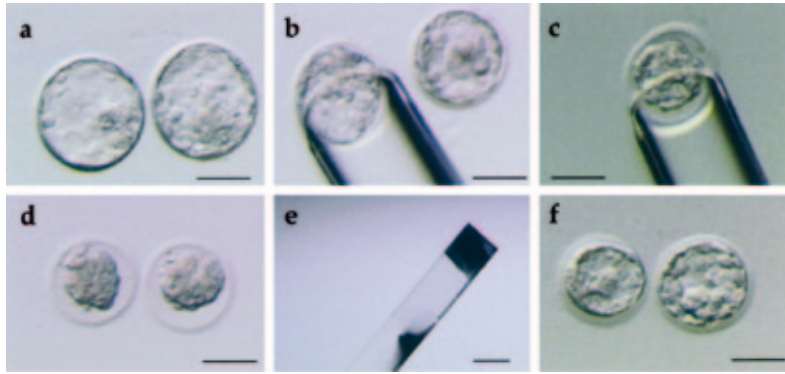
Embriyonik kök hücreler hücre kültüründe koloniler halinde ürer. Fare embriyonik kök hücreleri enzimatik reaksiyonlarla tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra %10 oranında DMSO'nun kullanıldığı ve sıcaklığın dakikada $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ düşürüldüğü yavaş dondurma tekniğiyle başarılı bir şekilde dondurulabiliyor. Birçok hastalığın tedavisi için büyük umutlar vaat eden insan embriyonik kök hücrelerinin dondurulup saklanması için yeni dondurma teknikleri de geliştirilmeye devam ediyor. Embriyonik kök hücrelerinin başarıyla dondurulup saklandığı yavaş dondurma yöntemi insan embriyonik kök hücrelerinde iyi sonuçlar vermiyor.

İnsan embriyonik kök hücreleri koloni halinde ürer. Ancak 100 hücreden daha küçük kolonilere bölündüklerinde etkili bir büyüme elde edilemez. Bu hücrelerin çoğaltılabilmeleri için hücrelerin birbirleriyle etkileşimleri oldukça önemlidir. Hücrelerin bu hassasiyeti dondurulmalarının başarısını da etkiler. Araştırmacılar insan embriyonik kök hücrelerinin saklanabilmeleri için farklı yöntemler deniyor. Bunun için embriyolarındaki dondurma yöntemleri kullanılmaya başlandı.

Embriyoların Dondurulması

İlk başarılı embriyo dondurma işlemi 1972 yılında fare embriyolarında gerçekleştirilmiş. Embriyoların dondurulma ve çözündürme işlemleri, embriyoların belirli kimyasal maddelerin içinde bir süre kalması, kimyasal maddelerle soğutulması ve -196 santigrat derecede sıvı azot içinde depolanması, çözüldükten sonra da soğutulmada kullanılan kimyasal maddelerin kök hücrelerden uzaklaştırılması adımlarını kapsar. Her iki iş-

lem de çok dikkatli yapılmalıdır. Hücre yapısının korunabilmesi için hücrelerin düşük hızda su kaybetmeleri ve buna bağlı olarak da yavaş soğutma yöntemiyle dondurulmaları sağlanır. Soğutma sırasında embriyo içindeki saf su katılaştır ve sonuçta hücreye göre daha yoğun bir hal alır. Ancak dondurulan hücrelerde buz kristalleri oluşur. Bu işlem çok ani olursa embriyolara zarar verebilir. Bu zararı engellemek için “seeding” adı verilen bir teknik ile buz kristalleri çok yavaş oluşturulur. Embriyoların dondurma-çözündürme sonrası canlılık oranları türler arasında (insan, inek ve fare embriyoları gibi) bazı farklılıklar gösterir. Buna neden olarak; dondurma ve çözündürme işlemlerinde uygulanan donma ve çözünme hızları, embriyoların büyüklükleri ve gelişim dönemleri, hücrelerin geçirenlik özellikleri ve dondurma işleminde kullanılan kimyasalların hücrelerde yaratacağı ozmotik değişiklikler ile toksisiteyi sayılabilir.



Embriyo dondurulması

- a) blastokist,
- b-c) blastokistin dondurma çubuğuna çekilmesi,
- d) donmuş blastokist,
- e) dondurma çubuğunda blastokist
- f) çözündürülmüş blastokist

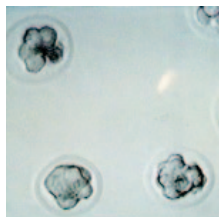
Embriyo dondurma işleminde embriyolar için yavaş dondurma (slow freezing), hızlı dondurma (rapid freezing) ve vitrifikasyon (camsı dondurma) teknikleri kullanılır. Bu tekniklerden vitrifikasyon yaygın olarak kullanılıyor. Vitrifikasyon, hücrelerin, dokuların ve organların düşük sıcaklıklarda hücre içerisinde tamamen vitröz ya da camsı bir durumun yaratılmasıyla dondurulmasını ifade eden bir terim olarak kullanılır. Vitrifikasyon ile embriyo dondurma yönteminde, buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitröz ya da camsı bir durum yaratılarak, hücrelerin, dokuların ve organların direkt olarak sıvı azot içerisinde daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanır. Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel ilke, hücrelerin dondurulmaları ve çözündürülmeleri sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyip, hücrelerin buz kristallerinden geçecekleri zararı önlemektir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre membranından geçebilen

başka bir deyişle nüfuz edebilen ve hücrelere ulaştığına zararlı olan kriyoprotektan maddelerle yer değiştirmesi hedeflenir. Embriyo ve kök hücre dondurulmasında hücrelerin yaşamını, dondurma işleminde kullanılan kimyasal maddeler, hücre soğutma oranları, hücre saklama son sıcaklığı ve embriyo çözündürme oranları gibi faktörler doğrudan etkiler.

Vitrifikasyon Tekniğiyle Embriyo ve Kök Hücrelerin Dondurulması

Bu yöntemde buz kristalleri hiç şekillenmez. Başarılı bir vitrifikasyon için, dondurma işleminde kullanılan kimyasalların yoğunluğunda bir artış gerekir. Bunun için de ya yüksek soğutma oranları ya da düşük sıcaklık derecelerinde yoğunluğu artıran ve buz kristallerinin oluşumunu baskılayan kimyasal karışımların kullanımı gerekir. Vitrifikasyonda, kriyoprotektanların dondurma işleminde buz kristallerinin oluşumunu baskılamaları en önemli unsurdur ve sıcaklık düştükçe, solüsyon tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçer. Bu fazdaki hücrelere vitrifiye olmuş hücreler denir.

Dünyada ilk defa, laboratuvarımızda fare embriyolarının vitrifikasyon tekniğiyle dondurulmasına yönelik bir teknik geliştirdik. Bu tekniğe, katı yüzey vitrifikasyon tekniği (Solid Surface Vitrification, SSV) adını verdik. Bu teknikte sıvı azot içerisinde kısmen batırılmış ve alüminyum folyoyla kaplanmış olan metal cismin üzerine yumurta (oositleri) veya embriyoları içeren 1-2 ml'lik embriyo dondurma solüsyonu (Etilen glikol, trehaloz ve poli vinil prolidon karışımı) damlatarak donma hızını daha da artırdık. Oysa diğer yöntemlerde solüsyonu taşıyan plastik çubuklar da soğutmakta ve dolayısıyla donma hızını kısmen de olsa olumsuz etkilemektedir. Laboratuvarımızda zigot dönemindeki fare embriyolarını katı yüzey vitrifikasyon tekniğiyle dondurup çözündürdükten sonra bu zigotlara mikroenjeksiyon yöntemiyle gen transferi yaptık ve gen transferi yapılmış bu zigotların taşıyıcı farelerin rahimlerine aktararak transgenik yavru fareler elde ettik. Geliştirdiğimiz bu yöntem kullanılarak çeşitli türdeki hayvanların yumurta ve embriyolarının yanı sıra insan embriyonik kök hücrelerinin de başarıyla dondurulduğu biliniyor. Embriyo dondurma çalışmalarında vitrifikasyon tekniği kullanıldığında, yavaş dondurma tekniğine kıyasla hücre kayıplarının daha az olduğunu da belirledik.



Dondurma solüsyonu içinde fare embriyoları

Dünyada ve laboratuvarımızda yapılan tüm bu çalışmalar, vitrifikasyonun embriyoların saklanması için uygun bir yöntem olduğunu ortaya koyuyor. İnsan embriyonik kök hücrelerinin saklanması için yavaş dondurma işlemiyle iyi sonuçlar elde edemeyen araştırmacılar, embriyolarda elde edilen iyi sonuçlara dayanarak vitrifikasyon uygulamalarına yöneldiler. Vitrifikasyon tekniğiyle yapılan çalışmalarda dondurulan insan embriyonik kök hücrelerinin çözündürülmesi sonunda %70-90 oranında canlılık elde etmek mümkün. Bugün insan embriyonik kök hücrelerinin daha büyük ölçeklerde dondurulup saklanabilmeleri için vitrifikasyon tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam ediyor.

Dondurulan Embriyoların Saklanması

Embriyo ve kök hücrelerin küçük hacimlerde saklanmasını sağlayan çeşitli aygıtlar vardır. Klasik dondurma teknikleriyle yapılan çalışmalarda embriyolar 0,5 veya 0,25 cc'lik dondurma çubuklarında saklanır. Ancak vitrifikasyon tekniğiyle yapılan embriyo dondurma çalışmalarında yöntemlere göre değişen embriyo saklama aygıtları kullanılır (kriovial gibi). Dondurma işleminde kullanılan sıvı azotun zaman zaman patojenik viral etkenleri taşıdığı biliniyor. Bu bakımdan filtre edilmiş sıvı azotun kullanılması gerekir. Embriyo ve kök hücreler düzgün etiketlenmiş olarak sıvı azot saklama kaplarına konulmalı, etiket üzerinde kök hücre veya embriyonun kime ait olduğu, gelişme safhaları ve dondurulma tarihleri hücre saklama çubukları üzerinde yazılı olmalıdır. Yazım işleminde sıvı azottan etkilenmeyen mürekkepler kullanılır ve böylece tüm embriyolar herhangi bir risk olmaksızın yıllarca sıvı azot tanklarında saklanabilir. Sıvı azot tanklarının üzerinde azot seviyesini gösterecek ve erken çözülme önleyecek alarm sistemleri bulunur.

Embriyo Dondurulması ve Uygulamaları

Dondurulup çözülerek transfer edilen insan embriyosundan ilk gebelik 1984 ve 1985 yıllarında Avustralyalı araştırmacılar tarafından elde edildi. Tüp bebek çalışmalarında insan embriyolarının dondurulma işleminin büyük önemi vardır. Tüp bebek uygulamalarında çoğul gebelik riskini en aza indirmek için en fazla 3 embriyo transfer

ediliyor. Ancak, alıcı annede sorunla karşılaşıldığında tüpte üretilen embriyoların saklanması gerekir. Anne adayına belli sayıda iyi kalitede embriyo transferi yapıldığında geriye kalan kaliteli embriyolar dondurularak daha sonraki denemeler için saklanabilir. İyi kalitedeki embriyolar dondurma ve çözme işlemlerinden sonra %75-90 canlılıklarını korurken kötü kalitedeki embriyoların yaşama oranları %20-30'lara düşer. İstatistiksel verilere göre dondurma ve çözme işlemlerinden sonra gebelik oranları %20-52 arasında değişmektedir. Oranların bu kadar geniş bir aralıkta yer almasının nedeni, uygulanan klinik ve laboratuvar protokolüne, hastanın yaşına, kısırlık sebebine, rahme aktarılan çözündürülmüş embriyonun kalitesi gibi kısıtlara dayanmaktadır. İlk embriyo transferinden sonra gebelik elde edilemezse, yeniden ilaç enjeksiyonu ve yumurta toplama işlemlerine gerek kalmadan, dondurulmuş embriyolar çözündürülerek anne rahmine tekrar yerleştirilebilir. Embriyo dondurma işlemi tüp bebek uygulamalarında başarı şansını arttıran bir işlem olarak da değerlendirilebilir. Çiftlerden izin belgesi alınarak dondurulan embriyolar Türkiye'de 1997 yılında yürürlüğe giren bir yasayla üç yıl boyunca sıvı nitrojen içerisinde saklanabiliyor.

Sonuç olarak, insan embriyonik kök hücre çalışmaları son zamanlarda hız kazanmıştır. Kök hücrelerin hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere farklılaştırılma ve transferleri üzerine projeler devam etmektedir. Embriyo ve kök hücrelerin dondurulmasına ilişkin çalışmaların ülkemiz açısından da büyük önem taşıdığı ortadadır. Bu hücre ve dokuların uygun kriyoprezervasyonunun gerçekleştirilmesi için buzsuz bir ortamın sağlanması ya da vitrifikasyon tekniğiyle dondurma işleminin uygulanması gerekir. Ancak kök hücrelerin dondurulup çözündürülmeleri sırasında farklılaştırılmaları gerekir.

Kaynaklar

Haydar Bağış, Tolga Akkoc, Cihan Taskin, Sezen Arat (2010): Comparison of different cryopreservation techniques: Higher survival and implantation rate of frozen-thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture. *Rep. Dom. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01570.x

Bagis H., Mercan Odaman H., Cetin S ve S. Sekmen "The Effect of Equilibration Time on Survival and Development Rates of Mouse Pronuclear-Stage Embryos Vitrified in Solid Surface (SSV) and Conventional Straws: In Vitro and In Vivo Evaluations," *Mol Reprod Dev.* 72 (2005): 494-501.

Yang PF, Hua TC, Wu J, Chang ZH, Tsung HC ve YL Cao, "Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling," *Cryo Lett* 27 (2006):361-368.

Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G ve AO Trounson, "Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method," *Hum Reprod.* 16 (2001): 2187-2194.

Li T, Zhou C, Liu C ve G. Zhuang G, "Bulk vitrification of human embryonic stem cells," *Hum Reprod.* 23 (2008): 358-364.

Zhou CQ, Mai QY ve GL Zhuang, "Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification," *Chin Med J.* 117 (2004): 1050-1055.

Li Y ve diğerleri, "Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells," *Fertil. and Steril.* 93: 3 (Şubat 2010): 999-1005.



1959'da doğan Prof. Dr. Haydar Bağış, 1987'de İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. 1990'da TÜBİTAK MAM'da ülkemizdeki ilk Transgen ve Deney Hayvanları Laboratuvarı'nı kurdu ve bu üniteye 20 yıl çalıştı. İlgili alanları, başta genetik, transgenetik ve klon hayvan üretim teknolojileri, embriyo ve sperma dondurma teknolojisi gibi konulardır. Dünyada ilk defa donmaya dirençli transgenik fare soylarını geliştirdi. Halen Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik öğretim üyesi olarak ve TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Bioteknoloji Enstitüsü'nde danışman olarak çalışıyor.