

Çekirdek Nakli ve Embriyon Bölme

Kalıtsal hastalıklardan bazıları, örneğin mukoviskidoz ve orak hücreli kan-sızlık, belli genlerin eksikliğine bağlı. Bu gibi hastalara, eksik olan geni nakle-derek iyileştirebileceğiz. Fakat gen nak-liyle tedavi yeni yeni başlıyor. Gen nak-li araştırmalarında en büyük engeller-den biri, genetik olarak özdeş, yani DNA'ları birbirinin tıpkısı olan, deney hayvanlarının bulunamayışı. Bilindiği gibi her bireyin DNA'sı, parmak izi gibi, kendine özgü. Her bireyin bir "genetik kartvizit"i var. Bir bireyin bütün hücre-leri aynı genetik kartvizite (aynı DNA'ya) sahip. Genetik kartvizit, adli tıpta çok işe yararken (babalık saptan-ması, bir kıldan ya da çok az kandan, spermden vb suçlunun bulunması), de-neysel tıpta bir engel oluşturuyor. Bu-nun nedeni şu: Deney hayvanlarında yapılan her deney bir kontrol grubuyla, yani deney yapılmamış hayvanlarla kar-şılaştırılır ve bu karşılaştırmaya dayanı-larak istatistiksel analiz yapılır. Deneyle varılan sonuçların rastlantıya bağlı olup olmadığı, ancak bu istatistik analizle an-lanabilir. İşte bu noktada genetik kar-tvizit, bilimin işini zorlaştırmakta. Şöyle ki, her bireyin farklı DNA'sı olduğun-dan, kontrol grubunda genetik özdeşlik sağlanamamakta; bu ise deneyin doğru-luk derecesini azaltmakta. Son birkaç yıla kadar deneysel tıbbın elinde gene-tik olarak özdeş (DNA'ları aynı) iki grup canlı vardı: Tek yumurta ikizleri, üçüz-leri vb. ve binlerce nesil sonra genetik yapıları birbirine çok benzer bir hal al-mış fareler. Son yıllarda bunlara genleri özdeş makak maymunları eklendi; bun-lara kısaca GÖMM. diyeceğiz. GÖMM yaratılmasına yeni yeni başlanıyor. GÖMM. deneysel tıpta genetik özdeşlik sağlama sorununu çözecek. Böylece hem daha az sayıda deney hayvanına ge-rek olacak, hem de deney sonuçları da-ha doğru olacak.

Doğada GÖMM yok (ikizler vb ha-riç). Bu nedenle deneysel tıbbın kendi

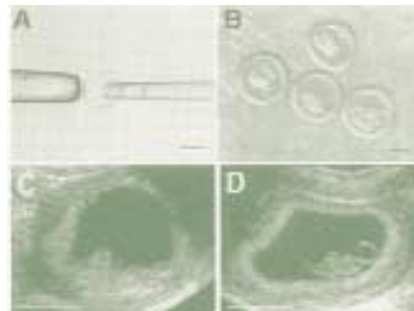


GÖMM'lerini yaratmak için araştırmala-ra başlamasına şaşmamak gerekir. GÖMM araştırmaları iki yönde geli-yor: Çekirdek nakli (nükleer transfer) ve embriyon bölme.

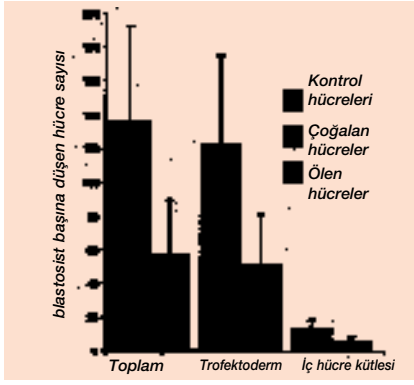
Embriyon bölmeyle GÖMM elde edilişi ilk kez A.W.S. Chan ve arkadaşla-rınca Science dergisinin 14 Ocak 2000 sayısında yayımlandı. Çekirdek nakliyse 1997'de başladığından, önce onu anlata-cağız. Nasıl bir insandan diğerine böb-rek, kemik iliği vb nakli yapılıyorsa, bir hücreden diğerine de çekirdek nakli ya-pılabiliyor.

İlk çekirdek nakli, 40 yıl önce kur-bağalarda yapılmıştı; fakat bunun arkası gelmedi. 1997'de ABD'de Oregon Sağ-lık Bilimleri Üniversitesi ve Oregon Maymun (Primat) Araştırma Merke-zi'nden Dr. Don Wolff yönetiminde Dr.

Richard Stouffer ve Dr John Ely, makak (rhesus) maymunlarında ilk çekirdek naklini gerçekleştirdi. Bunun için şöyle bir yöntem kullanıldı: Dişi maymunlara gonadotropin hormonu verilerek, ovü-lasyon (yumurtlama) uyarıldıktan sonra, bunların yumurtalıklarından ovum (yu-murta) alındı. Ovumun çekirdeği mikropipetlerle çıkarıldı, geriye ovumun zona pellucida denilen saydam zarı ve sitop-lazması kaldı. Bunu bir zeytinin çekir-değinin çıkartılması gibi düşünebilirsiniz. Bu çekirdeği çıkartılmış ovuma "çe-kirdek alıcı" diyelim. Şimdi bir de "çe-kirden verici" gerekecek. Çekirdek veri-ci olarak, bir başka dişi maymunun tüp-te döllenmiş ovumundan elde edilen embriyonun sıvı azotta dondurulmuş ya da taze hücreleri kullanıldı. Embriyo-nun erken dönem hücrelerine "blastomer" denir. [Embriyon, döllenmiş ovu-mun 2'ye, 4'e, 8'e ... bölünmesiyle, baş-lıca 3 evreden geçiyor: dut biçimi hücre yığını (morula), embriyon kesesi (blas-tosist) ve gastrula (bir kutbu eldiven parmağı gibi içeri çökmüş blastosist)] Tüp içinde döllenmiş ovumun oluştur-duğu 8 hücrelik embriyo alındı ve 8 blastomere ayrıldı. Her blastomer, çe-kirdeği çıkartılmış bir ovumun zona pel-lucidası, altına verildi. Sonra zayıf bir elektrik akımı verilerek kaynaşma sağ-landı. Böylece 8 blastomerle 8 çekirdek-siz ovumdan, 8 genetik olarak özdeş embriyon elde edildi. (Hatırlatalım ki bu 8 blastomerin hepsi aynı DNA'yı içe-rir). Genetik olarak özdeş embriyonlar sıvı azot içinde aylarca canlı olarak sak-lanabilir. Buzu çözülmüş embriyonlar 9 dişi maymunun döl yatağına, adet devri-nin uygun bir zamanında nakledildi. 9 maymundan 3'ünde gebelik oluştu; bir gebelik 30 gün sonra düşükle sonuçlan-dı. Diğer 2 gebelikten birer yavru may-mun doğdu; bu yavruların dişisine Neti ve erkekine Ditto adı verildi. Neti ve Ditto'nun DNA'sı tıpatıp aynı; yani bu iki yavru maymun genetik olarak özdeş.



Şekil 1- Embriyon bölme. A- İki blastomerin içi boş zona pellucida içine sokuluşu. B- Herbiri 2 blastomer taşıyan 4 embriyon, C- Plasentası normal, fetüsü gelişmemiş gebelik (ultrasonogra-fi), D- Tetra döl yatağı içinde (ultrasonografi)



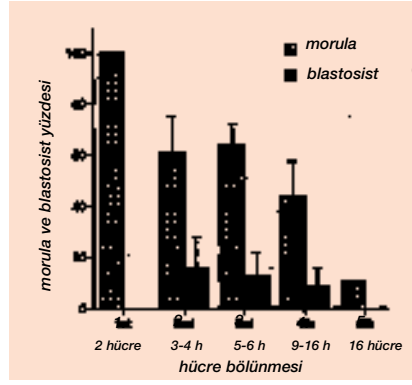
Şekil 3- Bölünmüş ebriyonda TE ve ICM sayısı kontrollere göre azalmıştır

Onları taşıyıcı anneleri emziriyor. Bu yavruların 20 yıl yaşayacakları tahmin ediliyor.

Oregon deneyleri tıpta yeni bir ufuk açtı. Bu deneylerin devamı gelecek. Amaç embriyonal kök hücreleri kullanarak (bunlar sonsuz bölünebilir), çok sayıda GÖMM elde etmek. Diğer hedefse, nakilden önce çekirdekte gen operasyonu yapmak; yani gen eklemek ya da gen çıkartmak; böylece transgenik (genleri değiştirilmiş) canlılar elde edilebilecek.

Çekirdek nakliyle 12'ye kadar GÖMM elde edilebilir; fakat deneyler için ikiz ya da üçüzlerin yeterli olduğu düşünülüyor.

Çekirdek nakli deneylerini, 1997'de İskoçya'da Ian Wilmut ve arkadaşlarınca gerçekleştirilen klonlama deneyiyle karıştırmamak gerek. Dr. Wilmut, kuzu Dolly'yi klonlama yoluyla elde etmişti. Çekirdek nakliyle, klonlama arasındaki fark şu: Klonlamada, bir erişkinin vücudundan alınan bir hücrenin çekirdeği, bir başka erişkinden alınan çekirdeği çıkartılmış ovuma naklediliyor ve döllenmiş ovum, taşıyıcı annenin döl yatağına konularak yavru doğurtuluyor. Bu yavru, çekirdek verici annenin kopyası. Çekirdek nakli yönteminde, çekirdek verici bir erişkinin vücut hücresi değil, embriyon hücreleri (blastomer) kullanılıyor. Ayrıca çekirdek naklinde amaç bir canlıyı kopyalamak değil, genetik olarak özdeş ikizler, üçüzler vb. yaratmak. Bu genleri aynı ikizler, üçüzler vb. hastalık modelleri oluşturmada, yaşlılığı geciktirme, kanser, AIDS, depresyon ve alkolizm araştırmalarında, kalıtsal hastalıkların anlaşılması ve tedavisinde kullanılacak. Nesli tükenmekte olan hayvanlar bu yöntemle çoğaltılabilir. İnsan embriyon hücreleriyle deney yapmak etik açıdan yasak olduğundan maymun seçil-

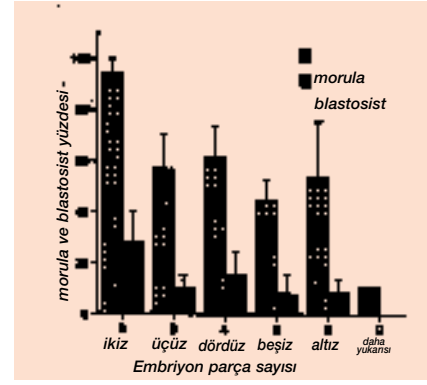


Şekil 4- 2, 4, 8, 16 hücreli embriyonlarda morula ve blastosist oranı

miştir. Ancak doğal olarak bu gibi deneylerin insanlarda da yapılması mümkün ve belki bir gün, insanlığın yararı için olmak şartıyla, insanda da çekirdek nakli kullanılabilir. Kuzu Dolly'nin doğumundan sonra sığır, fare ve keçilerde de klonlama yoluyla kopyalama başarıldı. Fakat klonlamanın can sıkıcı yönleri de var: Bir kere klonlamada fetüs ve yeni doğmuş ölümü çok sık. Sonra kopyalama yoluyla yaşlıların genç bir kopyasını oluşturma umudu söndü. 6 yaşında bir anneden kopyalanan kuzu Dolly 1 yaşında değil, 6+1= 7 yaşında. Dolly'nin yaşlı doğduğu, hücre çekirdeklerindeki telomerlerin kısalması olmasından anlaşıldı (kromozom uçlarındaki telomerler, yaş ilerledikçe kısalır).

Gerek klonlamada, gerekse çekirdek naklinde çekirdek, bir bireyden, sitoplazma ise başka bir bireyden geliyor, bu birleşme sonucu oluşan hücrenin çekirdeğindeki DNA ile sitoplazma mitokondrilerindeki DNA farklı bireylere ait. Bu iki yöntem ancak çekirdek DNA'sı bakımından özdeşlik sağlayabiliyor. Bu nedenle deneysel tıp hem çekirdek, hem de mitokondri DNA'sı bakımından özdeş bireyler yaratma gereği duydu. Bu da embriyon bölmeyle sağlandı.

Embriyon bölme de, ABD'de Oregon Bölgesel Maymun Araştırma Merkezi'nde başarıldı. Embriyon bölme şöyle yapıldı: Tüp içinde döllenmiş bir makak maymunu ovumu, 8 blastomerlik embriyon evresine kadar büyütüldü. Sonra mekanik yolla 8 blastomere bölündü. İçi boşaltılmış dört zona pellucida'nın (ovumun saydam zarı) herbiri içine 2 blastomer sokularak (şekil 1A), dördüz bir embriyon (şekil 1B) elde edildi. İki taşıyıcı anne maymunun herbirinin döl yatağına dördüz embriyon nakledildi. Her iki maymunda gebelik başladı. Bir gebelikte (şekil 1C) yalnız plasenta



Şekil 5- İkizlerden altızlara morula ve blastosist oranı

oluşturdu; fetüs gelişmedi. Diğer gebelikten Tetra adı verilen yavru doğdu (şekil 1D ve şekil 2). PCR yöntemiyle, gelişmeyen fetüsle Tetra'nın genetik olarak özdeş olduğu gösterildi.

Bu deneyde 107 makak maymunu embriyonundan 368 embriyon parçası oluşturuldu; 13 embriyon nakli sonucu 4 gebelik oluştu (gebelik oranı %31, tüp bebeklerde %53). 4 gebeliğin ikisi düşükle sonlandı; birinde yalnız plasenta büyüdü; birinden de Tetra doğdu.

Düşüklerin nedeni zona pellucida patlaması, mikro yöntemlerle hücrelerin rahatsız edilmesi ve küçük embriyondur. Embriyon hücreleri iki yönde gelişir: trofektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (ICM). Konfokal mikroskop ve 3 boyutlu incelemeyle blastosistde ortalama 6 ICM ve 51 TE bulundu (tüp bebekte bu sayılar 13 ve 122'dir). ICM ve TE sayısının azlığı ve apoptoz (programlı hücre ölümü) düşüğe yol açar (şekil 3). Apoptoz parçalanmış embriyonda ve özellikle ICM'de daha sık görülür. Deneyde kullanılan embriyonların morula ve blastosist oluşturmaları, 2 hücreli evreden 16 hücreli evreye kadar giderek azalır (şekil 4). Blastosist oluşması da ikizlerden altızlara doğru giderek azalır ve yedizlerde ve sonrasında sıfır olur (şekil 5). İkizlerde morula oluşturma oranı %94 ve blastosist oluşturma oranı %28'dir.

Embriyon bölme yöntemiyle, çekirdek ve sitoplazma DNA'sı bakımından özdeş ikizler, üçüzler vb. oluşturma yolu açılmış bulunuyor.

Selçuk Alsan

Kaynaklar:
Biol. Reprod. 57: 454-9, 1997
Science, 14 Ocak 2000
<http://www.cnn.com/TECH/9703/02/monkey.monkey>
http://augustachronicle.com/stories/011998/tec_124-6881_Shtml
http://www.accessscience.org/WN/SUA09_monkey397.html
<http://www.ohsu.edu/orpre/current/eti.htm>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/Query?Nb=m_d
http://www.house.gov/science/smith_3-5.html