

# Matične embrionalne stanice

---

**Tokić, Mirta**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:706169>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

**BIOLOŠKI ODSJEK**

# **MATIČNE EMBRIONALNE STANICE**

## **EMBRYONIC STEM CELLS**

**SEMINARSKI RAD**

Mirta Tokić

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2016.

## **POPIS KRATICA**

**bFGF** - basic fibroblast growth factor

**c-MYC** - myelocytomatosis oncogene

**DREAM** - downstream regulatory element antagonist modulator

**EB** - embryoid bodies

**ESC** - embryonic stem cell

**GSK3** - glycogen synthetase kinase 3

**H3K4me3** (primjer) - trimethylated histon H3 at lysine (K) 4

**hESC** - human embryonic stem cell

**hiPSC** - human induced pluripotent stem cell

**ICM** - inner cell mass

**iPSC** - induced pluripotent stem cell

**KLF4** - krüppel-like factor 4

**LIF** - fibroblast growth factor

**MEF** - mouse embryonic fibroblast

**MEK** - mitogen-activated protein kinase kinase

**mESC** - murine embryonic stem cell

**OCT4** - octamer-binding transcription factor 4

**PTM** - posttranslational modifications

**SCNT** - somatic cell nuclear transfer

**SNP** - single nucleotide polymorphism

**SOX2** - SRY-(sex determining region Y)-box 2

**TF** - transcription factor

**VEC** - vascular endothelial cells

**VSMC** - vascular smooth muscle cells

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	4
2. UZGOJ I RUKOVANJE MATIČNIM EMBRIONALNIM STANICAMA (ESC) <i>in vitro</i> .....	7
2.1. ODRŽAVANJE ESC.....	7
2.1.1. MIŠJE MATIČNE EMBRIONALNE STANICE (mESC).....	8
2.1.2. HUMANE MATIČNE EMBRIONALNE STANICE (hESC).....	8
2.2. DIFERENCIJACIJA ESC.....	9
3. OSOBINE MATIČNIH EMBRIONALNIH STANICA NA MOLEKULARNOJ RAZINI.....	10
3.1. EPIGENETIČKA PODLOGA.....	10
3.2. GENETIČKA PODLOGA.....	13
4. INDUCIRANE MATIČNE STANICE (iPSC).....	15
5. MOGUĆNOST PRIMJENE ES STANICA U MEDICINI.....	17
5.1. PRIMJER MOGUĆE PRIMJENE hESC U REGENERACIJI KOŽE.....	18
5.2. PRIMJER MOGUĆE PRIMJENE hESC U LIJEČENJU ISHEMIJE.....	19
6. LITERATURA.....	21
7. SAŽETAK.....	22
8. SUMMARY .....	23

## 1. UVOD

Matične embrionalne stanice (*embryonic stem cells*, ESC) dobivaju se izolacijom iz unutarnje mase stanica (*inner cell mass*, ICM), tj. embrioblasta, u stadiju blastociste za vrijeme rane embriogeneze (Sl. 1. A). Embrioblast je okružen stanicama trofoblasta (iz kojega se razvija placenta nakon implantacije) (Rippon i Bishop 2004). ESC imaju svojstvo pluripotentnosti, što znači da imaju sposobnost razvitka u gotovo bilo koju stanicu odraslog organizma. Osim toga, važno svojstvo matičnih stanica jest njihova samoobnovljivost: tijekom diobe, jedna stanica kćer kreće u diferencijaciju, a druga ponovno preuzima ulogu matične stanice (Biswas i Hutchins 2007). 1981. godine, objavljena su dva rada u kojima su po prvi put znanstvenici uspjeli uzgojiti i održavati mišje matične embrionalne stanice (*murine embryonic stem cells*, mESC), a prva uspostavljena kultura humanih embrionalnih matičnih stanica (*human embryonic stem cells*, hESC), tek godinama kasnije, 1998. godine (Rippon i Bishop 2004). Napredak u tehnikama uzgoja i manipulaciji matičnim stanicama koji su se razvili do danas omogućili su bolje razumijevanje rasta i razvoja (diferencijacije) embrija.

Brojna su se istraživanja bavila pitanjem kontrole i regulacije pluripotentnosti i diferencijacije tih stanica. Pronađen je velik broj molekula koje igraju ulogu u održavanju pluripotentnosti u ESC, među kojima se izdvajaju nekolicina njih koji su ključni u tom procesu. Njihova će količina (ovisno o razini ekspresije tih faktora) i međusoban omjer (jer uzajamno djeluju) odlučivati hoće li stanica krenuti u razvoj ili će se samo podijeliti i time samoobnoviti (Rippon i Bishop 2004), na što pak utječu vanjski signali i mikrookoliš (Biswas i Hutchins 2007).

Teoretski, ESC se mogu *in vitro* bezgranično dijeliti u nediferenciranom stanju, ali se trebaju uzgajati u posebnim uvjetima jer stanice zasađene *in vitro* imaju tendenciju diferencijacije. Kako bi se to spriječilo, u podlogu se dodaju ili hranidbeni sloj nemitotskih stanica, tzv. stanica hranilica (*feeder-layer*), koje izlučuju faktore koje ne dozvoljavaju diferencijaciju, ili dodatkom vanjskih faktora, citokina, seruma i slično (Biswas i Hutchins 2007).

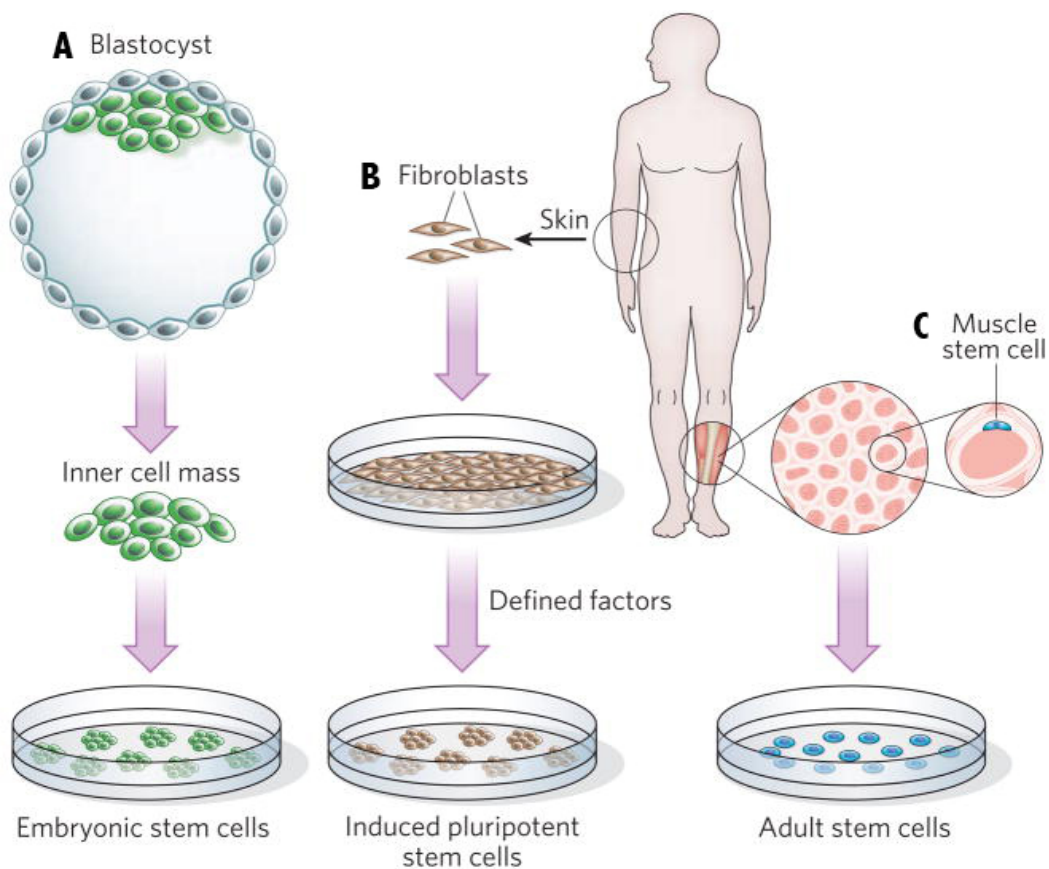
ESC često se primjenjuju u znanosti kao predmet istraživanja u razvojnoj biologiji (proučavanje genske pozadine rasta i razvoja embrija) (Rippon i Bishop 2004), a danas imaju sve veću primjenu i u genskim manipulacijama u kojima se ovim metodama dobivaju *knock-in* (insercija gena) i *knock-out* (delecija gena) transgenični miševi radi proučavanja uloge ili regulacije gena *in vivo*. Dodatno se još koriste u farmakološkim testiranjima (Rippon i Bishop 2004).

Ipak, najveću nadu predstavljaju u području medicine. U odraslom organizmu također postoje matične stanice (u koštanoj srži, koži, jetri, mozgu) za obnovu oštećenog tkiva (Sl. 1. C). Teoretski bi se te stanice mogle koristiti u liječenju tako da se biopsijom izoliraju iz pacijenta, diferenciraju *in vitro* i ponovo transplantiraju u pacijenta. Time bi se zaobišla potreba za imunosupresijom. No poteškoće kao što su izolacija stanica, ograničeni potencijal diferencijacije i slabi rast *in vitro* učinile su takvu terapiju gotovo nemogućom (Rippon i Bishop 2004), pa se zbog toga razvila ideja uvođenja ESC-a u medicinu. Međutim, onda se javilo etičko pitanje ispravnosti korištenja ljudskih embrija u svrhe znanstvenog istraživanja koji su bili potrebni za proučavanje svojstva ESC-a prije nego što bi se mogle uvesti u terapijske svrhe. Tome su se najviše protivile vjerske zajednice (Rippon i Bishop 2004).

Zakonodavstvo o korištenju embrija kao izvora ES stanica još uvijek je predmet rasprave i uvelike ovisi o dotičnoj državi. Inicijalno, hESC su bile derivirane od 'pričuvnih' embrija dobivenima *in vitro* oplodnjom, uz odobrenje roditelja. To se danas na globalnoj razini smatra najprihvatljivijim izvorom embrija za znanstvena istraživanja (Rippon i Bishop 2004).

Kao alternativa su danas razvijene mnoge tehnike dobivanja induciranih matičnih stanica (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) pri čemu se matične stanice dobivaju reprogramiranjem iz zrelih somatskih stanica (Sl. 1. B) (Takahashi i Yamanaka 2015).

Ovim se seminarskim radom ukratko opisuju glavne značajke i svojstva ESC-a na molekularnoj i staničnoj razini, načini uzgoja i kulture takvih stanica te pitanje moguće svakodnevne primjene u medicini u bliskoj budućnosti.



**Slika 1.** Prikaz podrijetla i izolacije matičnih stanica. A) Prikazana je izolacija ESC-a iz embrioblasta (ICM) koji je okružen trofoblastom (nije posebno naznačen). B) Opisana je izolacija somatskih stanica (fibroblasta) i njihovo reprogramiranje kako bi se dobile inducirane pluripotentne stanice (iPSC). C) Prikazana je izolacija matičnih stanica iz odraslog organizma, u ovom slučaju mišićnih. Sve tri vrste stanica mogu se uzgajati *in vitro* i teoretski primijeniti u terapijama. Preuzeto iz Lutolf i sur. (2009).

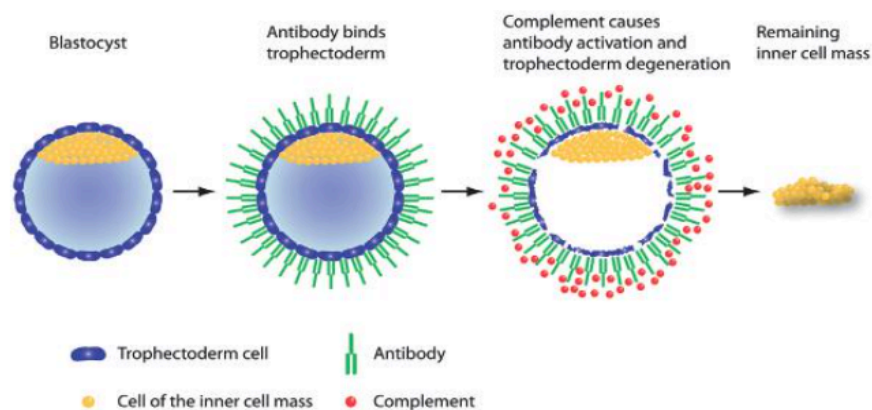
## 2. UZGOJ I RUKOVANJE MATIČNIM EMBRIONALNIM STANICAMA (ESC)

*in vitro*

### 2.1. ODRŽAVANJE ESC

Kao što je u uvodu već bilo napomenuto, ESC zahtijevaju posebne uvjete uzgoja kako ne bi došlo do diferencijacije. Hoće li stanice krenuti u proces diferencijacije ili će se proliferacijski dalje obnavljati, ovisi i regulirano je intrinzičnim faktorima, vanjskim signalima i mikrokolišem (Biswas i Hutchins 2007). Izolacija stanica iz embrioblasta obavlja se uglavnom tzv. imunokirurgijom (*immunosurgery*) (Sl. 2.). U ovoj se tehnici koriste antitijela koja se vežu samo na vanjski ovoj blastociste (trofoblast). Nakon izlaganja komplementima iz krvi (po sastavu proteini i dio imunološkog sustava), koji se vežu na navedena antitijela, dolazi do degradacije trofoblasta, pri čemu ICM ostaje intaktna.

Mnogi su se znanstvenici bavili određivanjem idealnog medija i uvjeta za uzgoj ESC-a. Danas zbog toga postoje već točno definirani vrsno specifični i linijsko specifični mediji za njihovo održavanje. U ovom radu navedeni su samo najčešći i najkorišteniji načini uzgoja, a sve alternativne metode i mediji detaljno su opisani u radu Biswas i Hutchins (2007).



**Slika 2.** Prikaz izolacije stanica embrioblasta u stadiju blastociste imunokirurgijom. Žuto je prikazan embrioblast (ICM), plavom trofoblast. Detalji u tekstu. Preuzeto iz Mummery i sur. (2014).



### 2.1.1. MIŠJE MATIČNE EMBRIONALNE STANICE (mESC)

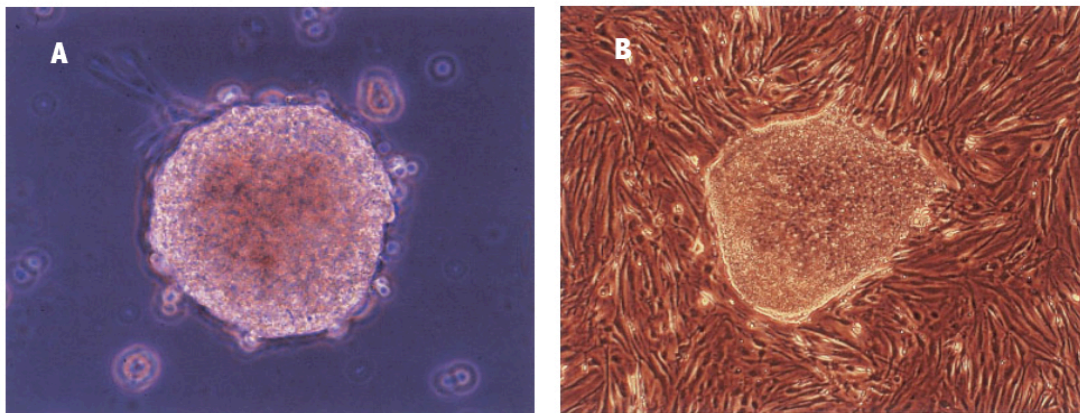
Mišje matične embrionalne stanice (mESC) počele su se ranije u povijesti proučavati, a bile su i lakše uzgojive od hESC, zbog toga nije iznenađujuće što napredovanje u usmjeravanju i karakterizacije *in vitro* diferencijacije mESC značajno uspješnije (Rippon i Bishop 2004) od hESC.

mESC se najčešće sade na podlogu sa staničnim hranidbenim slojem (stanice hranilice) koji se sastoji od mitotskih neaktivnih stanica mišjih embrionalnih fibroblasta (*mouse embryonic fibroblast*, MEF). One izlučuju tzv. *fibroblast growth factor* (LIF), faktor koji ima ulogu vanjskog primarnog glasnika i koji potiče aktivaciju niza sekundarnih glasnika i signalne kaskade reakcija. To dalje utječe na transkripciju gena potrebnih za održavanje samoobnovljivosti (Biswas i Hutchins 2007). Umjesto hranidbenog sloja može se dodati vanjski LIF faktor. Isto tako, mESC moguće je održavati na tzv. 2i mediju koji sadrži inhibitore mitogen-aktivirajuće protein kinaze kinaze (MEK) i kinaza 3 glikogen sintaze (GSK3) (Chen i Dent 2014). Stanice se redovito presađuju svaka dva do tri dana (Biswas i Hutchins 2007).

### 2.1.2. HUMANE MATIČNE EMBRIONALNE STANICE (hESC)

Humane matične embrionalne stanice po nekim se svojstvima bitno razlikuju od mESC-a. Među njima su: sporiji rast, tendencija stvaranja plosnatih umjesto sferastih kolonija (Sl. 3. B), lakše odvajanje pojedinačnih stanica iz kolonija. Također, one ne odgovaraju na LIF faktor, a razlog je još uvijek nepoznat (Rippon i Bishop 2004, Biswas i Hutchins 2007).

Za rast uz hranidbeni sloj (najčešće MEF) (Sl. 3. B), hESC zahtijevaju dodatak seruma ili, ako ih se uzgaja bez prisutnosti seruma, dodatak osnovnog faktora rasta fibroblasta (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) (Biswas i Hutchins 2007). Pasaži (presađivanja) se odvijaju svakih četiri do šest dana (Biswas i Hutchins 2007). Za terapije se obično izbjegavaju MEF podloge i svi pripravci animalnog podrijetla radi rizika prijenosa nekih patogena. Zbog toga se danas hESC sade na npr. humanim stanicama hranilicama (Rippon i Bishop 2004).



**Slika 3.** A) Prikaz mišjeg embroidnog tjelešca formiranog *in vitro*. B) Prikaz kolonije hES stanica održanim u nediferenciranom stanju (na MEF podlozi). Preuzeto iz Bishop i sur. (2002).

## 2.2. DIFERENCIJACIJA ESC

Ukoliko se ES stanice transplantiraju direktno u organizam, bez indukcije diferencijacije, one se kaotično diferenciraju i tvore teratome. Zbog toga je potrebna indukcija ESC-a i purifikacija od nediferenciranih stanica da bi se mogle upotrijebiti za uspješnu transplantaciju (Chen i Dent 2014). Formiranje embroidnih tjelešaca (*embryoid bodies*, EB), najjednostavnija je metoda *in vitro* indukcije diferencijacije. EB su 3D strukture koje sadrže diferencirane tipove stanica pa zbog toga nalikuju normalnom postimplantacijskom embrijskom tkivu (iako je neorganiziran), a otuda i ime (Sato i Nakano 2001). ESC formiraju embroidna tjelešca u odsutnosti LIF-a i/ili zasađivanjem na poseban hranidbeni sloj, a poslije se najčešće održavaju u suspenzijskoj kulturi. One se zatim ponovo postavljaju na adherentne podloge (Rippon i Bishop 2004). Mišje EB nalikuju loptastoj strukturi (Sl. 3. A). Treba naglasiti da iz takvih embroidnih tjelešaca ne mogu nastati vijabilni embriji (Sato i Nakano 2001).

Kako bi se dobile progenitorske stanice određenih linija, potrebno ih je dalje tretirati s različitim faktorima i/ili kokultivirati s inducirajućim stanicama (Biswas i Hutchins 2007). Nakon indukcije diferencijacije, pogotovo ako su u pitanju humane ESC, stanice se mogu diferencirati dalje *in vivo* jer je *in vitro* mogućnost diferencijacije ograničena (Biswas i Hutchins 2007).

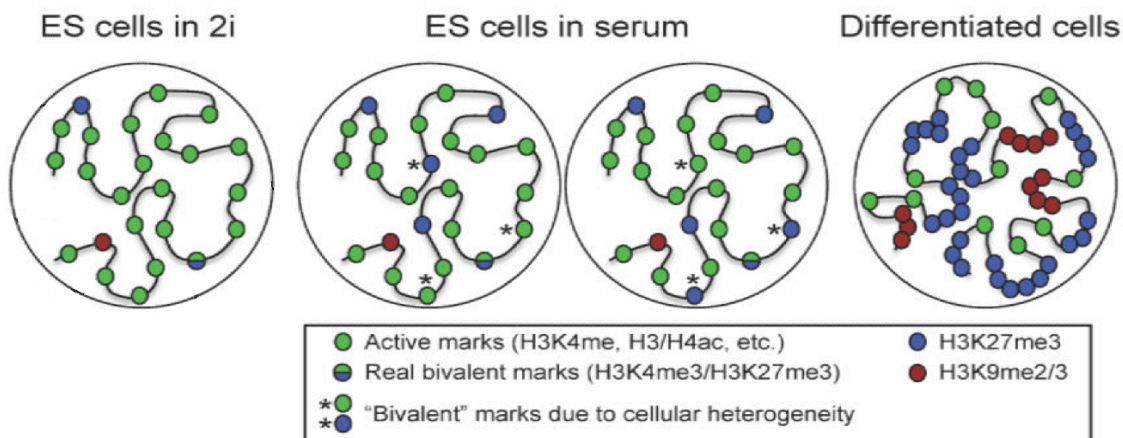
### 3. OSOBINE MATIČNIH EMBRIONALNIH STANICA NA MOLEKULARNOJ RAZINI

Da bi se ES stanice uopće mogle eventualno upotrijebiti u medicini potrebno je razumjeti molekularne osnove tih stanica. Tu su važne epigenetičke razlike somatskih i pluripotentnih stanica te njihova genetička pozadina, tj. aktivna ili suprimirana transkripcija ponajprije onih gena koji kodiraju za važne regulacijske proteine koji sudjeluju u kontroli pluripotentnosti.

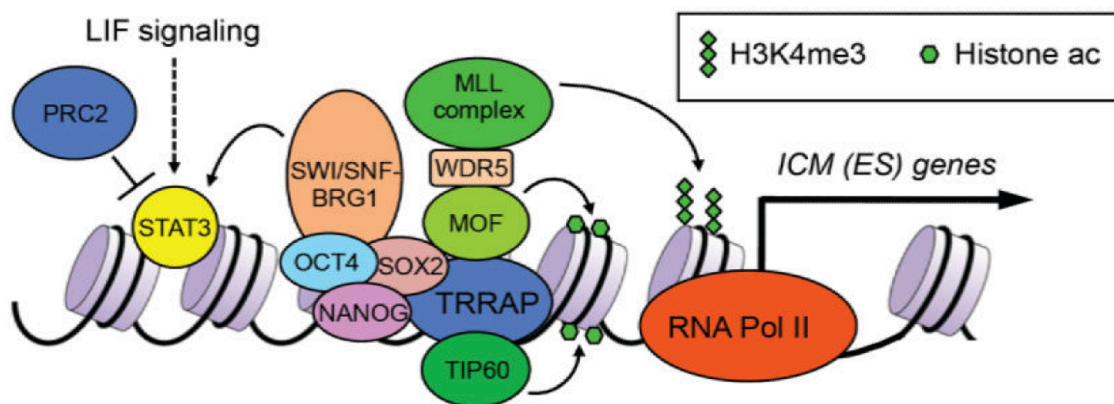
#### 3.1. EPIGENETIČKA PODLOGA

Stanična diferencijacija temelji se na epigenetici – dok genetički materijal ostaje isti, modifikacije u DNA i histonima se mijenjaju, a s tim modifikacijama i razina transkripcije gena. Kromatinsko stanje (pakiranje DNA oko histona i nehistskih proteina) doprinose osnivanju i održavanju staničnog identiteta (Chen i Dent 2014). Kompaktnost i slaganje kromatina je regulirano: DNA modifikacijama (npr. citozinske metilacije i hidroksimetilacije), inkorporacijom histonskih varijanti (npr. H2A.Z i H3.3), ATP ovisnim kromatinskim remodeliranjem, nekodirajućim RNA (*non-coding RNA*, ncRNA) te posttranslacijskim modifikacijama (*posttranslational modifications*, PTM) histona (npr. metilacija, acetilacija, fosforilacija ili ubikvitinacija) (Chen i Dent 2014). Posttranslacijske modifikacije histona mogu direktno utjecati na kompaktnost kromatina i njegovo slaganje ili služiti kao vezno mjesto za efektorske proteine uključujući druge kromatin remodelirajuće ili modificirajuće komplekse i time utjecati na transkripcijsku inicijaciju i/ili elongaciju (Sl. 5.) (Chen i Dent 2014). Veliki broj histon modificirajućih enzima su komponente koregulatorskih kompleksa koji vežu transkripcijske faktore (*transcription factors*, TF) prilikom modulacije genske ekspresije. Transkripcijski se faktori vežu za koregulator između ostaloga zato što u većini slučajeva sama srž takvog koregulatora nema veznog mjesta za DNA. Tako da su u regrutaciji histon modificirajućih kompleksa implicirani koregulatori i TF, ali njihovo vezanje ovisi i o metilaciji DNA te o prisutnosti ncRNA molekula. Koregulatorski kompleksi mogu biti korepresori ili koaktivatori po svojoj ulozi (Chen i Dent 2014).

Uočeno je nekoliko razlika između kromatina hESC u odnosu na zrele somatske stanice. Ovdje spadaju manja količina heterokromatina i njegov niži stupanj kondenzacije, hiperdinamični histoni koji su labavo vezani na DNA te rasprostranjene aktivne domene na kromatinu, bilo zbog bogate acetilacije histona ili hipometilacije DNA (Chen i Dent 2014). Sva ova svojstva zajedno upućuju na činjenicu da takav kromatin ima globalno 'otvoreno' i dinamično stanje (Sl. 4.) i zbog toga ima visoko aktivni transkriptom (Chen i Dent 2014). Transkripcijski se faktori vežu na kromatinska otvorena mjesta u genomu, pa su zato kromatinski modulatori i transkripcijski faktori usko povezani i oboje igraju važnu ulogu u diferencijaciji (Chen i Dent 2014). Isto tako, kako bi se spriječila transkripcija dijelova genoma koji uključuju linijsko specifične gene, ponekad se mogu pronaći 'bivalentne domene' koje sadrže različite vrste histona (npr. H3K4me3 i H3K27me3) (Sl. 4.). Jesu li takvi bivalenti specifični samo za pluripotentne stanice, još uvijek je nepoznanica (Chen i Dent 2014). Prilikom diferencijacije bivalenti postaju monovalenti, globalna i lokalna slika kromatinske strukture mijenja se u kompaktniji i 'zatvoreniji' oblik. Zbog toga je manja i dinamičnost kromatinskih proteina (Chen i Dent 2014).



**Slika 4.** Shematski prikaz kromatinskog stanja ESC (u 2i mediju i u serumu) i diferenciranih stanica. ESC su karakterizirane globalno 'otvorenim' kromatinom i brojnim aktivnim histonskim markerima kao npr. H3K4me, dok diferencirane stanice imaju kompaktniju strukturu kromatina karakteriziranog domenama represivnih histonskih markera, kao npr. H3K27me3, H3K9me2 i H3K9me3. ES stanice uzgojene u prisustvu seruma su više heterogene. Preuzeto iz Chen i sur. (2014).

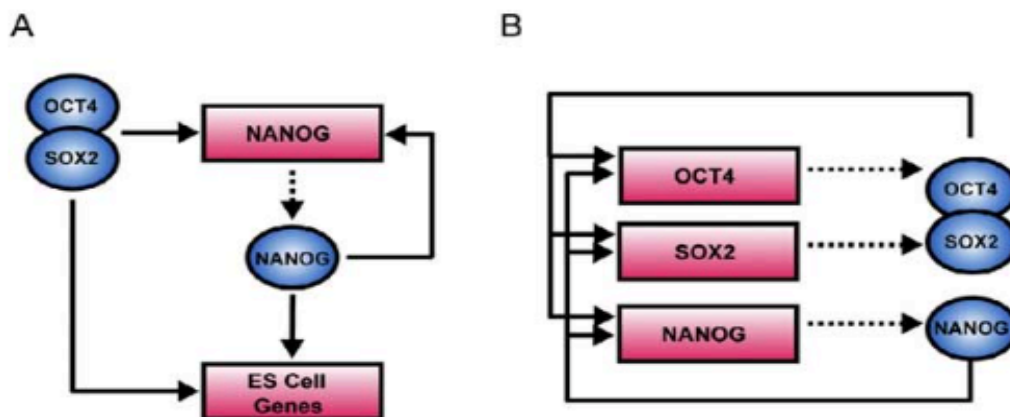


**Slika 5.** Pluripotentni faktori, kao što su NANOG, SOX2 i OCT4, regrutiraju histon modificirajuće enzime (npr. TIP60 i MLL komplekse) i kromatin remodelirajuće komplekse (npr. SWI/SNF-BRG1) na ICM specifičnim genima da bi kreirali 'otvoreno' kromatinsko stanje i omogućili transkripciju. Preuzeto iz Chen i sur. (2014).

### 3.2. GENETIČKA PODLOGA

Istraživanjem pluripotentnih stanica (mESC kao i hESC) pokazalo se da postoji nekoliko faktora, svi po svojem sastavu proteini, ključnih u održavanju samoobnovljivosti i pluripotentnosti. Oni imaju središnju ulogu u ranom embrionalnom razvoju i u *in vitro* uvjetima potiču nediferencirano stanje. To su transkripcijski faktori poput OCT4, NANOG, i SOX2 (Boyer i sur. 2005). Na slici 6. A prikazana je regulatorna petlja međusobne regulacije tih triju transkripcijskih faktora. Pojedinačno, ili u međusobnim interakcijama mogu aktivirati ili utišati ekspresiju vlastitih (autoregulacija vlastite transkripcije) ili ostalih dvaju gena iz navedene trijade (Sl. 6. B), a većina ciljnih gena na koje oni zapravo djeluju, kodiraju isto tako za TF koji dalje utječu na transkripciju gena koji su uključeni u održavanju pluripotentnosti (npr. DPPA4, TDGF1, OCT4, itd.) (Boyer i sur. 2005). U hES stanicama dosada je pronađeno najmanje 353 gena koji kodiraju za proteine i dvije miRNA kodirajuće sekvence (*mikro RNA*), na čije se regulatorne sekvence mogu vezati sva tri faktora (NANOG, OCT4 i SOX2) (Boyer i sur. 2005). Tijekom diferencijacije u ESC utišavaju se pluripotentni i reprimiraju linijsko neprikladni geni, a aktiviraju linijsko specifični. U aktivne gene spadaju transkripcijski faktori poput NANOG, OCT4, SOX2, STAT3 te komponente Tgf- $\beta$  signalnog puta (npr. TDGF1, LEFTY2) i Wnt puta (npr. DKK1, FRAT2) (Boyer i sur. 2005). Oba puta utječu na pluripotentnost i samoobnavljanje u humanim i mišjim ESC. U neaktivne gene pak spadaju geni važni za razvoj, kao što su ESX11, HOXB1, PAX6, MYF5 (Boyer i sur. 2005). Osim svojim prisustvom i količinom, regulacija ovisi i o njihovim međusobnim omjerima, njihovim posttranslacijskim modifikacijama i različitim kofaktorima (Boyer i sur. 2005). Važno je isto tako napomenuti da dolazi do aktivne ekspresije telomeraze, enzima koji omogućuje replikaciju krajeva kromosoma.

Tijekom razvoja blastociste, ekspresija telomeraze se smanjuje, mijenja se ekspresija navedenih transkripcijskih faktora (uglavnom smanjuje), čime se omogućuje transkripcija dosada suprimiranih gena. Kao posljedica toga, stanica ulazi u proces gastrulacije, tj. razvitka tri zametna listića: ektoderma, mezoderma i endoderma.



**Slika 6.** Prikaz regulatornih motiva u humanim matičnim embrionalnim stanicama. A) Opisan je shematski primjer regulatorskog sklopa u hESC. Regulatori su prikazani plavim ovalnim oblicima, genski promotori crvenkastim pravokutnicima. Vezanje regulatora na promotor naznačeno je punom crtom, a isprekidanom crtom su prikazani autoregulacijski putevi tih TF. B) Prikazana je autoregulacijska petlja između SOX2, OCT4 i NANOG. Preuzeto iz Boyer i sur. (2005).

U znanstvenim se istraživanjima pojavljuju i neki drugi faktori koji su se pokazali neophodnim za održavanje pluripotentnosti. Tako je na primjer, otkriven kompleks DREAM (*downstream regulatory element antagonist modulator*) za kojeg se vjeruje da ima također važnu funkciju u hESC (Fontán-Lozano i sur., 2016).

U ovom području znanosti još uvijek postoje brojne rupe i mnoga neodgovorena pitanja jer je sustav genskih interakcija i regulacija u stanicama vrlo kompleksan i kompliciran.

#### 4. INDUCIRANE MATIČNE STANICE (iPSC)

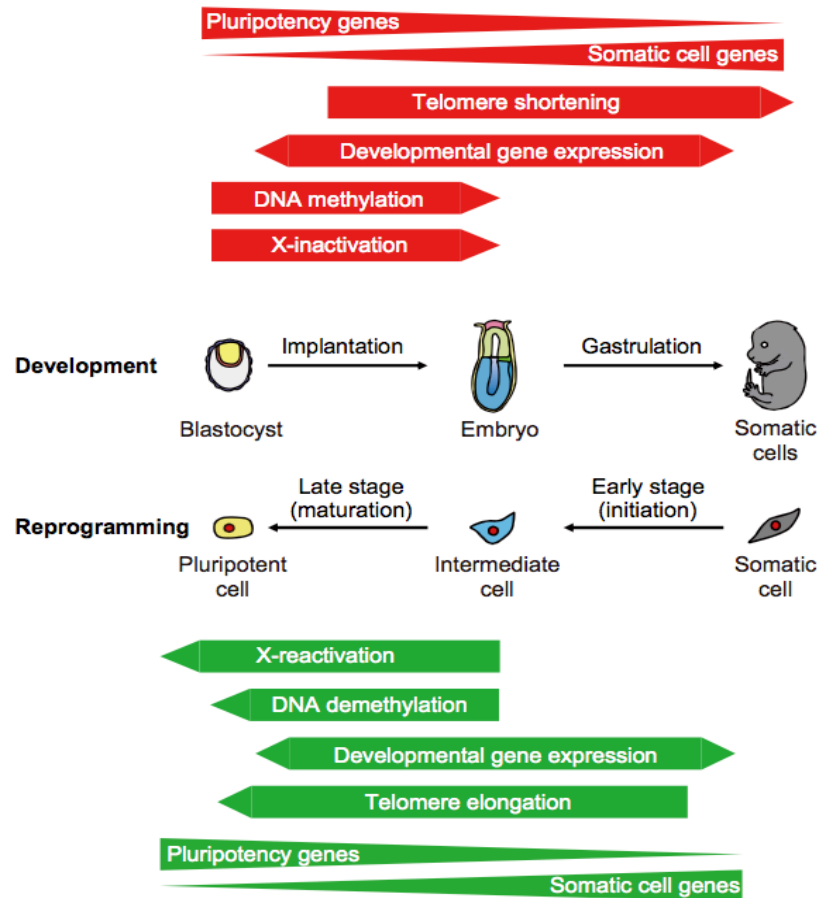
Kao alternativa u istraživanjima, zbog protivljenja koje se javilo uslijed korištenja ljudskih embrija u znanosti, u medicini se danas sve više radi na induciranim pluripotentnim stanicama (iPSC). Sustav se temelji na reprogramiranju (procesu suprotnom diferencijaciji) somatske u pluripotentnu matičnu stanicu (Sl. 7.) (Takahashi i Yamanaka 2015). Reprogramiranjem se briše stanična memorija somatskih stanica i aktiviraju geni vezani za pluripotentnost. Prilikom pomlađivanja stanica radi se na demetilaciji DNA, reaktivaciji X-kromosoma, aktiviranju pluripotentnih gena te produljenju telomera (Sl. 7.) (Takahashi i Yamanaka 2015). Kromatinske modifikacije, kao što su metilacije i histonske modifikacije, predstavljaju najveću barijeru u reprogramiranju, što upućuje na činjenicu da te modifikacije igraju važnu ulogu u staničnoj memoriji (Chen i Dent 2014).

Metode reprogramiranja somatskih stanica uključuju sljedeće: prijenos jezgre somatske stanice u bezjezgrenu jajnu stanicu (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT), fuzija somatske stanice s pluripotentnim, izlaganje stanica 'malim' kemijskim spojevima te transdukcija faktorima reprogramiranja (Takahashi i Yamanaka 2015). U SCNT metodi i metoda posredovana fuzijom, jezgra somatske stanice odjedanput je izložena pluripotentnoj okolini (citoplazmi). Iz tog razloga su takve metode reprogramiranja brze, ali i efikasne (Takahashi i Yamanaka 2015). S druge strane, transdukcija faktorima reprogramiranja *Octamer-binding transcription factor 4* (OCT4), *SRY (sex determining region Y)-box 2* (SOX2), *Krüppel-like factor 4* (KLF4) i *Myelocytomatosis oncogene* (c-MYC) (zajedničkim imenom OSKM) rezultira relativno sporom reprogramiranju i niže je efikasnosti (mali broj stanica uspješno završi reprogramiranje), ali zato nije potreban izvor pluripotentnih stanica (Takahashi i Yamanaka 2015).

Na kraju, postavlja se pitanje da li su embrionalne matične stanice (ESC) i inducirane matične stanice (iPSC) ekvivalenti dobiveni različitim metodama. Po autorima Takahashi i Yamanaka, zrele se iPSC stanice najvjerojatnije neprimjetno razlikuju od ESC po genskoj ekspresiji i epigenetskom statusu. Navode kako je usporedba tih dvaju tipova stanica otežana zbog varijacije u genetičkoj pozadini uključujući one u genskom zapisu (*single nucleotide polymorphism*, SNP) koji utječu na karakteristike iPSC (Takahashi i Yamanaka 2015).



No isto tako, pitanje je razlikuju li se, i u kojoj mjeri, u odnosu na stanice embrioblasta blastociste (ICM). Pokazalo se da epigenetika ESC i iPSC varira ovisno o uvjetima uzgoja i razlikuje se od embrioblasta do neke mjere, no kakve to posljedice ima odnosno ima li ih uopće, još se ne zna. (Chen i Dent 2014).



**Slika 7.** Na slici su opisana zajednička obilježja prirodnog procesa razvoja embrija i reprogramiranja somatskih stanica. Tijekom embriogeneze, zigota se razvija u odrasli organizam diferencijacijom. Obrnuto, reprogramiranje pomlađuje zrele stanice i dovodi ih u pluripotentno stanje. Ta dva mehanizama dijele zajedničke događaje među kojima su promjena u duljini telomera, prolazna ekspresija razvojnih gena, varijacije u aktivnosti X-kromosoma i u razini metilacije u DNA. Preuzeto iz Takahashi i Yamanaka (2015).

## 5. MOGUĆNOST PRIMJENE ES STANICA U MEDICINI

Osim što su ESC korisni predmet istraživanja, nedavna napredovanja u kultiviranju i održavanju humanih pluripotentnih matičnih stanica dali su podlogu za moguću primjenu u regenerativnoj terapiji u medicini te liječenju bolesti uzrokovanih načinom života u bliskoj budućnosti (Nishio i sur. 2016). U pokusima koje se radilo *in vitro* i *in vivo* u području znanosti i medicine, koristile su se većinom mES stanice. Dosada je uglavnom nemoguće ustvrditi imaju li hES stanice jednake potencijale kao i mESC budući da su *in vivo* eksperimenti na ljudima zabranjeni. No, neke karakteristike površinskih markera te kapacitet diferencijacije ESC-a *in vitro* i u imunokompromitiranim miševima upućuje na to da imaju slične osobine kao i mESC (Sato i Nakano 2001).

Obje vrste stanica, ESC i iPSC, potencijalno su primjenjive u medicini. Prednosti i nedostaci hES i hiPS stanica prikazani su u tablici 1 (Nishio i sur. 2015). Kada bi se, u pogledu hESC, blokiralo imunološko odbacivanje pomoću imunosupresora ili deletiranjem antigena poput B7 na površini ESC-a (Rippon i Bishop 2004), a u slučaju hiPSC minimalizirao rizik od tumorogeneze iscrpljivanjem egzogenih genskih komponenti (jer unosom c-Myc onkogeni pri reprogramiranju, ali i korištenjem virusa kao vektora, može doći do formiranja tumora (Chen i sur. 2009)), navedene bi stanice mogle imati široku primjenu u medicini (Nishio i sur. 2015). Na kraju ostaje još pitanje dugoročnog efekta transplantiranih stanica nastalih iz ESC (Sato i Nakano 2001).

Prva klinička upotreba hESC bila je 2010. godine u SAD-u vođenim organizacijom Garon Corporation u kojemu su transplantirali hESC derivirane progenitorske stanice oligodendrocita za tretman oštećene leđne moždine. Dosada nisu uočene značajne nuspojave. Prva upotreba hiPS stanica dogodila se nešto kasnije, 2014. godine, kada su se transplantirale pigmentne stanice mrežnice za tretman makularne degeneracije. Dosada isto tako nema zabilježenih ozbiljnih nuspojave (Nishio i sur. 2015).

**Tablica 1.** Kliničke primjene hESC. Prikazani su prednosti i nedostaci u mogućoj terapiji za svaku vrstu humanih pluripotentnih stanica. Pojam autologni označava da su davatelj i primatelj ESC-a jedna te ista osoba, a alogeno da davatelj i primatelj nisu ista osoba. ESC: embrionalne matične stanice; iPSC: inducirane pluripotentne matične stanice. Preuzeto iz Nishio i sur. (2016).

Human pluripotent stem cells	Sources	Ethical hurdle	Safety
ESCs	Embryos	High	Relatively high <sup>1</sup>
Allogenic iPSCs (with immunosuppression)	Cell banks	Low	Not yet evaluated
Allogenic iPSCs (without immunosuppression)		Low	High
Autologous iPSCs	Patient samples	Low	Under evaluation

<sup>1</sup>Dosada se nisu pojavljivale neke teže nus pojave.

## 5.1. PRIMJER MOGUĆE PRIMJENE hESC U REGENERACIJI KOŽE

Dosadašnji tretman oštećenja kože uključivao je tradicionalne tehnike kao što je presađivanje kože. Mogućnost kontroliranja procesa diferencijacije stanica (u ovom slučaju u keratinocite i fibroblaste, glavne stanice epiderme odnosno derme kože), omogućila je razvoj raznih tipova laboratorijski proizvedenih kožnih transplantata umjetnim matriksom koji imitira dermu te kulturom keratinocita (Chen i sur. 2009). U posljednjih nekoliko godina već su bili i primijenjeni u tretmanu kroničnih ozljeda kože (npr. opekline). Dok su te navedene tehnike značajne u napretku tretiranja rana, rutinska upotreba je zbog visoke cijene, ograničene učinkovitosti i njihove nemogućnosti rekonstrukcije derivata derme, manje vjerojatna (Chen i sur. 2009).

Dva su načina diferencijacije ESC *in vitro*: jedan je duže izlaganje stanica koktelu egzogenih citokina, faktorima rasta, kemijskim spojevima i supstratima ekstracelularnog matriksa, a drugi je pomoću genetske modulacije, što je moguće postići transfekcijom ESC-a stranom rekombinantnom DNA koja kodira za signalne proteine, pogotovo komponente Wnt puta, koji potiču njihovu diferencijaciju u keratinocite.

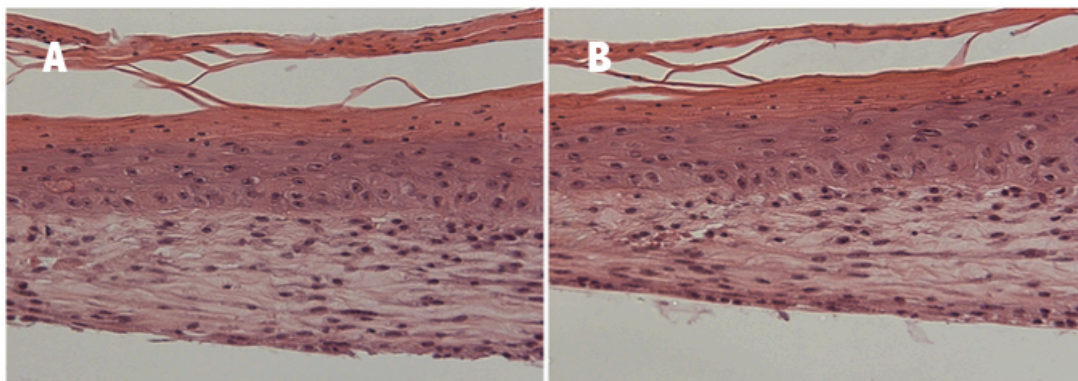
hESC sve više privlače pažnju u takvoj terapiji kako bi se prevladalo navedeno ograničenje regeneracije derivata derme (npr. folikuli dlake, znojne žlijezde) (Chen i sur. 2009). Alogeni ESC ne zahtijevaju nikakva presađivanja, no postoje još poteškoće s odbacivanjem stanica iako se i dalje koriste u istraživanjima diferencijacije stanica kože *in vitro*. Iz tog razloga sve veću važnost imaju autogeni hiESC (Sl. 8.) (Chen i sur. 2009).

## 5.2. PRIMJER MOGUĆE PRIMJENE hESC U LIJEČENJU ISHEMIJE

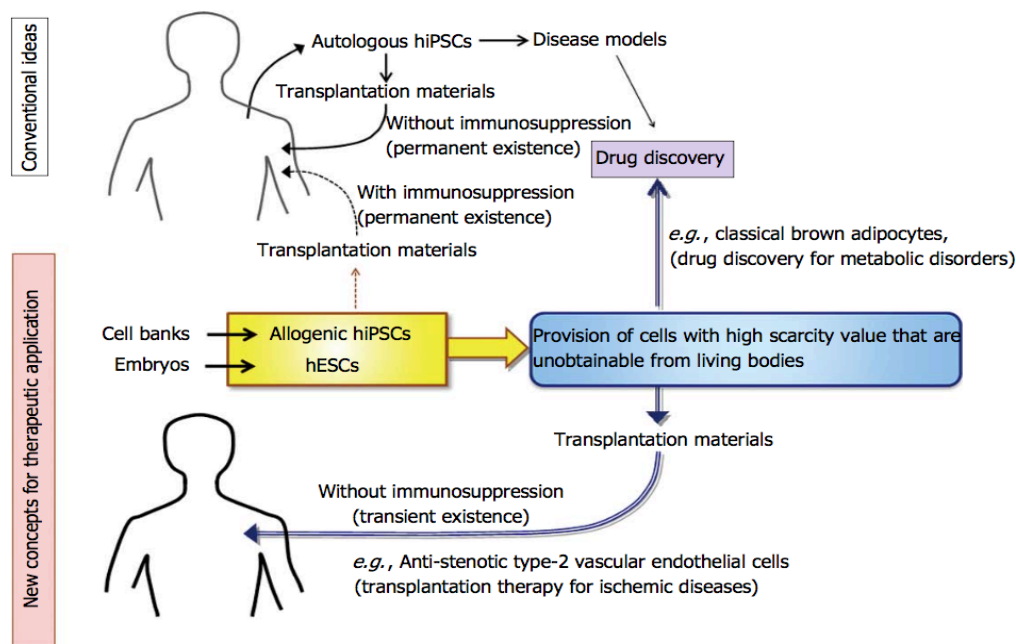
Primjer mogućnosti liječenja bolesti izazvanim načinom života jest liječenje ishemijske bolesti (Sl. 9.). Ishemija nastaje kao posljedica arteriostenoze (sužavanja krvnih arterija kao posljedica hiperproliferacije vaskularnih glatkih mišića stijenke arterija (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) (Nishio i sur. 2016).

Arterije su građene od vanjske stijenke, glatkog mišićnog sloja te unutarnjeg endotela. Pronađena su dva tipa vaskularnih endotelnih stanica arterija (*vascular endothelial cells*, VEC): tip-I i tip-II VEC (Nishio i sur. 2015). Tip-I VEC potiču proliferaciju VSMC-a (čime pogoršavaju razvitak stenozе u ozlijeđenim arterijama), a tip-II VEC ima ulogu supresije VSMC proliferacije i time sprečavaju arteriostenozu (Nishio i sur. 2015). Dok se tip-I VE stanica mogu izolirati biopsijom iz pacijenata, tip-II VEC se većinom na taj način ne mogu dobiti jer one tijekom vremena prelaze u tip-I VEC starenjem i pod utjecajem oksidativnog stresa (Nishio i sur. 2015), ali zato se mogu dobiti iz hESC ili hiPSC-a. Transplantacijom tip-II VEC-a s luminalne strane ozlijeđene krvne žile, smanjuje se hiperproliferacija VSMC-a, iako se imunološki odbacuju nedugo nakon transplantacije. Nakon odbacivanja, VE stanice domaćina preuzimaju ulogu hESC deriviranih VEC-a (Nishio i sur. 2015).

Općenito, u svakom kirurškom zahvatu u kojem se mehanički šire arterije, može doći do ozljeđivanja njezina endotela, što može izazvati stenozu. U tom bi smislu VEC transplantacijske terapije mogle postati neophodni način kontroliranja ishemijskih poremećaja tijekom i nakon operacija (Nishio i sur. 2016).



**Slika 8.** Usporedba mikroskopskih snimki ekvivalenta tkiva kože dobivenog normalnim humanim keratinocitima i fibroblastima (A) i onog dobivenog hiPSC deriviranim keratinocitima i fibroblastima (B). Nisu uočene abnormalnosti u morfologiji derme i epiderme, kao ni u terminalnoj diferencijaciji. Preuzeto iz Itoh i sur. (2013).



**Slika 9.** Primjena hESC i alogenih hiPSC u liječenju bolesti izazvanih načinom života. hESC: humane embrionalne matične stanice; iPSC: inducirane pluripotentne matične stanice. Preuzeto iz Nishio i sur. (2016).

## 6. LITERATURA

- Bishop AE**, BATTERY LDK and Polak JM, 2002. Embryonic stem cells. *J Pathol* **197**, 424–429.
- Biswas A** and Hutchins R, 2007. Embryonic Stem Cells. *Stem Cells And Development* **16**, 213–221.
- Boyer LA**, Lee IT, Cole MF, Sarah EJ, Levine SS, Jacob P, Zucker PJ, Guenther GM, Kumar RM, Murray LH, Jenner GR, Gifford KD, Melton DA, Jaenisch R, Young AR, 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **122**, 947–956.
- Chen M**, Przyborowski M, Berthiaume F (2009). Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Crit Rev Biomed Eng.* **37**, 399–421.
- Chen T** and Dent YRS, 2014. Chromatin modifiers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet.* **15**, 93–106.
- Fontán-Lozano A**, Capilla-Gonzalez V, Aguilera Y, Mellado N, Carrión AM, Soria B, Hmadcha A, 2016. Impact of transient down-regulation of DREAM in human embryonic stem cell pluripotency. The role of DREAM in the maintenance of hESCs. *Stem Cell Research* **16**, 568–578.
- Itoh M**, Umegaki-Arao N, Guo Z, Liu L, Higgins CA, Christiano MA (2013). Generation of 3D Skin Equivalents Fully Reconstituted from Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *PLoS ONE* **8**, e77673.
- Lutolf MP**, Gilbert PM, Blau HM, 2009. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* **462**, 433–441.
- Mummery Ch**, van de Stolpe A, Roelen B, Clevers H, 2014. Stem Cells – Scientific Facts and Fiction. *Elsevier Inc.*, Second edition.
- Nishio M**, Nakahara M, Yuo A, Saeki K, 2016. Human pluripotent stem cells: Towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases. *World J Stem Cells* **8**, 56-61.
- Nishio M**, Nakahara M, Saeki K, Fujii K, Iwata H, Manabe I, Yuo A, Saeki K, 2015. Pro- vs anti-stenotic capacities of type-I versus type-II human iPS-derived endothelial cells. *World J Transl Med* **4**, 113-122.
- Rippon HJ** and Bishop AE, 2004. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **37**, 23–34.
- Sato M** and Nakano T, 2001. Embryonic stem cell. *Internal Medicine* **40**, 195-200.
- Takahashi K** and Yamanaka S, 2015. A developmental framework for induced pluripotency. *Development* **142**, 3274-3285.

## 7. SAŽETAK

Matične embrionalne stanice (ESC) su populacija stanica dobivena izolacijom iz unutarnje mase stanica (ICM) blastociste. One imaju sposobnosti pluripotencije i samoobnovljivosti. Ta dva svojstva čine ih popularnim predmetom istraživanja u razvojnoj biologiji, ali isto tako i nadom za moguću upotrebu u medicini.

Zbog suprotstavljanja nekih zajednica ideji korištenja humanih embrija u znanosti, znanstvenici su uspjeli reprogramirati somatsku stanicu u pluripotentnu koristeći jedino transkripcijske faktore. Takve su stanice poznate pod nazivom inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC) i gotovo su identične ES stanicama.

Za bilo kakvu primjenu hESC ili hiPSC na ljudima, potrebno je razumjeti njihovu molekularnu osnovu. Brojna su se istraživanja, pogotovo u zadnjih nekoliko godina, bavila njihovim proučavanjem. Današnjim razvijenim tehnikama uzgoja i rukovanja ES, ali i iPS stanicama, sve se više produbljuje uvid u kompleksne mreže signalnih puteva i načine regulacije tih stanica i možda će, rješavanjem ograničenja jednih odnosno drugih vrsta stanica, one u bliskoj budućnosti postati dio široke primjene u medicini kao npr. u regenerativnoj terapiji i liječenju bolesti izazvanih načinom života.

## **8. SUMMARY**

Embryonic stem cells (ESC) are derived from the inner cell mass (ICM) of a blastocyst. These cells have properties like self-renewal and pluripotency which makes them a popular subject of research in developmental biology but also a hope for their use in, for example, regenerative therapies and the treatment of lifestyle diseases in the near future. In order for them to be applied in therapies, the molecular background has to be well understood.

As some communities disapproved of using human embryos for scientific research, scientists succeeded in obtaining pluripotent cells from mature somatic cells using only transcriptional factors where the use of external pluripotent cells was not necessary. These cells are called induced pluripotent stem cells (iPSC).

The understanding of ESC and iPSC are far from complete: advanced techniques in their cultivation and manipulation will provide a better insight into the complexity of signal networks and regulation systems of these cells and thus enable their wider application.