

# Embrionalne matične stanice

---

**Baćić, Mateja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2012**

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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:195657>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**EMBRIONALNE MATI NE STANICE**

**EMBRYONIC STEM CELLS**

Seminarski rad

Mateja Ba i

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study of Molecular Biology)

mentor: Doc.dr.sc. Inga Marijanovi

Zagreb, 2012.

## **Sadržaj**

1.	Uvod .....	3
2.	Podrijetlo embrionalnih matičnih stanica .....	4
2.1.	Embrionalne matične stanice iz blastociste .....	4
2.2.	Alternativni načni izolacije embrionalnih matičnih stanica.....	6
3.	Svojstva embrionalnih matičnih stanica .....	8
4.	Potencijalna primjena i nedostaci ES stanica .....	13
5.	Zaključak .....	16
6.	Literatura .....	17
7.	Sažetak.....	20

## 1. Uvod

U posljednje vrijeme mati ne su stanice izazvale toliko zanimanja, što znanstvenog, što javnog, kao gotovo niti jedna tema u biologiji. Jedan od razloga zašto zaokupljaju maštu mnogih jest spoznaja da je razumijevanje njihovih jedinstvenih karakteristika osigurati nova dostignuća i poglede u biologiji stanice, kao i putove ka izlječenju različitih degenerativnih bolesti.

Mati ne stanice su stanice koje imaju nevjerovatan potencijal samoobnavljanja i razvoja u više tipova stanica u tijelu tijekom ranog života i razvoja. Kada se mati na stanica podijeli, svaka novonastala stanica ima potencijal ostati mati na stanica ili postati neki drugi tip stanice sa specijaliziranom funkcijom, primjerice miši na, moždana ili crvena krvna stanica. Znači, mati ne se stanice od ostalih stanica u tijelu razlikuju dvjema važnim karakteristikama. Prvo, one su nespecijalizirane stanice sposobne za samoobnavljanje staničnim diobama, ponekad i nakon dugog perioda neaktivnosti. Mogu stvarati stanice-kemičari identične stanicama-majkama. Druga važna karakteristika je da se pod određenim fiziološkim ili eksperimentalnim uvjetima mogu inducirati da postanu tkivno- ili organ-specifične stanice s posebnom funkcijom. U nekim organizma, poput leđne moždine, mati ne se stanice redovito dijele radi popravka ili zamjene oštećenog tkiva. No, u nekim drugim organizma, poput guštera ili srca, dijele se samo pod određenim uvjetima.

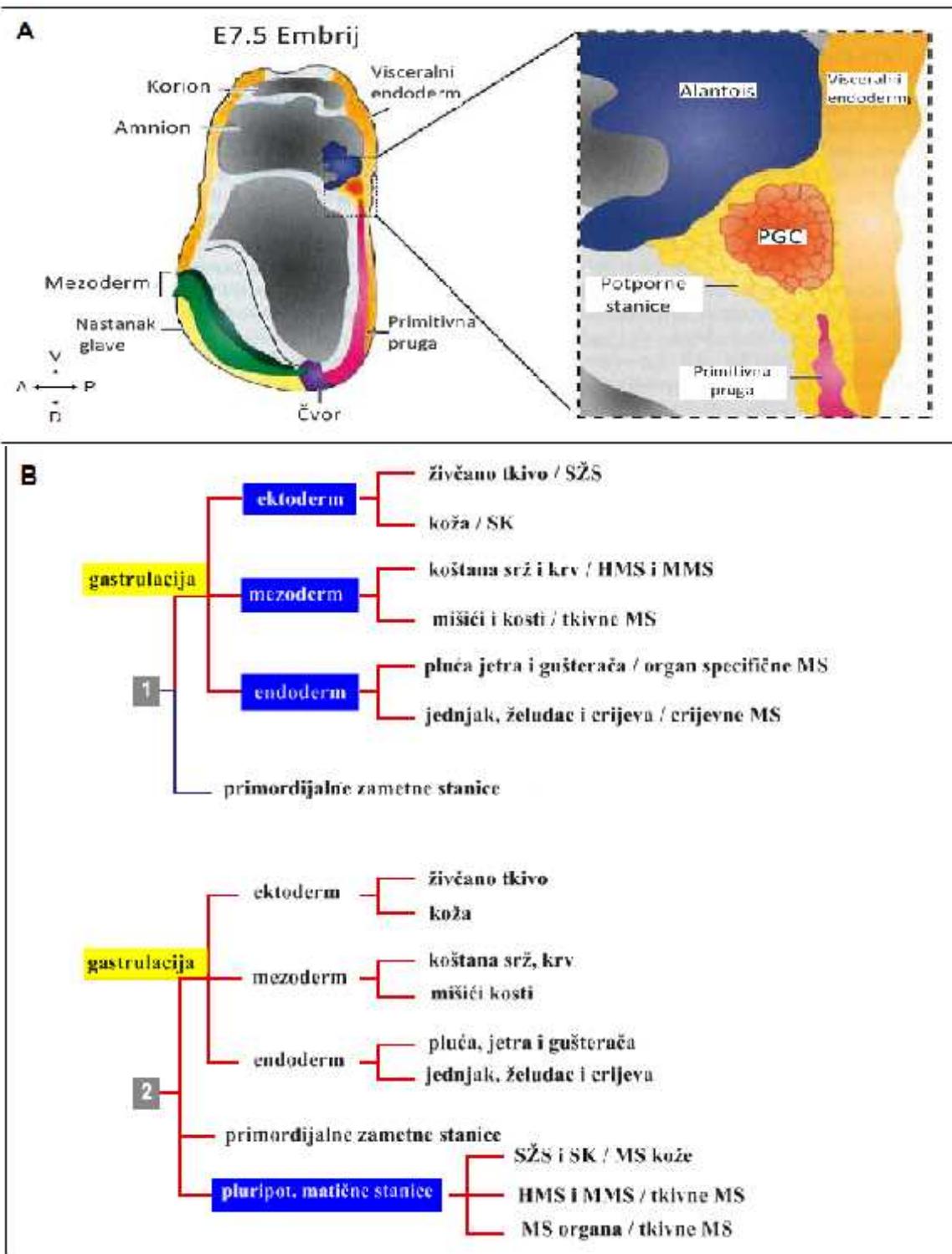
Kada se govori o mati stanicama, najčešće se spominju dvije vrste: embrionalne i 'odrasle' (adult) mati ne stanice. Embrionalne mati ne stanice (ESCs; eng. embryonic stem cells) prvi puta su izolirane iz miša prije više od 20 godina. Izolirane su iz unutarnje mase stanica blastociste u razvoju i zrele blastociste (stadija blastociste pred samu implantaciju)(Evans & Kaufman 1981; Martin 1981). Njihova inicijalna izolacija 1981. godine je navjestila veliki napredak u razvojnoj biologiji osiguravajući jednostavan modelni sustav za proučavanje osnovnih procesa u ranom embrionalnom razvoju i stanovanju diferencijaciji. No, takođe je otvorila i neke druge mogućnosti: naime, ako je ES stanice moguće izolirati iz ljudskih blastocista, njihov kapacitet za višelinjsku diferencijaciju može biti korišten u stanovanju terapiji u kojoj bi bilo koji tip stanice ili tkiva mogao biti proizveden 'po narudžbi' u laboratoriju, što bi moglo osigurati novi radikalni pristup liječenju širokog

spektra bolesti kod kojih ošte enje ili disfunkcija nadilazi kapacitet samog organizma za prirodni popravak.

## **2. Podrijetlo embrionalnih mati nih stanica**

### **2.1. Embrionalne mati ne stanice iz blastociste**

Podrijetlo mati nih stanica je vrlo dobro istraženo kod embrionalnih mati nih stanica, dok je njihovo podrijetlo kod odraslih jedinki manje poznato. Ljudske ili humane embrionalne mati ne stanice nastaju izravno iz unutarnje mase stanica preimplantacijskog embrija nakon stvaranja cisti ne blastociste. Ova populacija stanica bi ina e proizvela epiblast, a potom i sva odrasla tkiva, što pomaže objasniti razvojnu plasti nost koju pokazuju ES stanice. Dapa e, ES stanice *in vitro* su ekvivalent epiblastu, s obzirom na njihov kapacitet da doprinisu bilo kojoj somatskoj stani noj liniji. U trenutku kada zigota dosegne stadij blastociste, razvojni potencijal odre enih stanica je zaklju en. Vanske stanice embrija se po inju diferencirati i stvarati trofoektoderm. Ove specijalizirane stanice mogu stvarati sve stani ne tipove trofoektodermne linije, uklju uju i veliku diferenciranu stanicu trofoblasta. U razvojnom stadiju jajnog cilindra, populacija stanica blizu epiblasta se može identificirati kao primordijalne zametne stanice (PGCs, eng. primordial germ cells) koje se zatim isklju uju iz somatske specifikacije ili restrikcije. PGCs zatim migriraju i naseljavaju genitalne nabore te proizvode funkcionalne zrele gamete. PGCs se mogu izolirati ili prije ili poslije njihovog dolaska u genitalne nabore, te kada su u kulturi *in vitro* sa odgovaraju im faktorima, mogu proizvesti embrionalne zametne stanice (EGCs, eng. embryonic germ cells) (Slika1.) ( Essentials of Stem Cell Biology. R. Lanza., 2009.).



Slika 1. (A) Razvoj primordijalnih zmetnih stanica. Shematski prikaz embrija miša, starog 7,5 dana isti je proksimalni položaj primordijalnih zmetnih stanica u razvoju naspram epiblasta. Uveani prikaz na desnoj strani služi ilustraciji toke u kojoj primordijalne matne stanice izbjegavaju opredjeljenje/restrikciju izbjegavaju i morfogenetske efekte migracije kroz primitivnu prugu tijekom gastrulacije. (B) Prepostavljena razvojna ontogenija matnih stanica. U razvojnem stablu broj 1, razvoj matnih stanica se javlja nakon formiranja zmetnih slojeva. Ove matne stanice se tako ograničavaju opredjeljenjem zmetnog sloja na svoju stanicu liniju (npr. mezoderm se formira. Stvara hematopoetske progenitore koji postaju hematopoetske matne stanice). Razvojno stablo broj 2 ilustrira ideju da se matne stanice razvijaju slijedom i primordijalne zmetne stanice prije izbjegavaju opredjeljenje stanicu noj liniji tijekom gastrulacije i zatim migriraju u specifično tkivo i organ. (Preuzeto iz *Essentials of Stem Biology*, 2009. i modificirano).

## **2.2. Alternativni načini izolacije embrionalnih mati nih stanica**

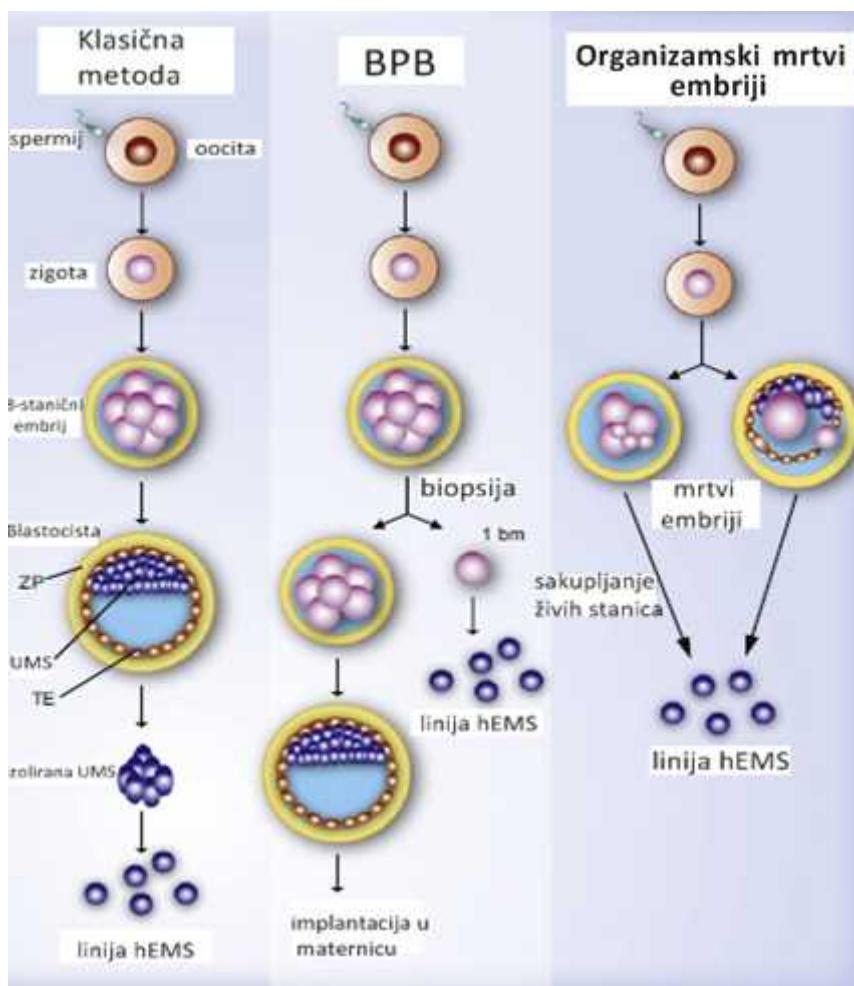
Kako je do sada opisano, humane embrionalne mati ne stanice se najčešće izoliraju iz vijabilnog preimplantacijskog embrija proizведенog oplodnjom *in vitro*. Izolacija humanih ES stanica se smatra etički kontroverznim zbog uništavanja embrija tijekom ovog procesa. Ljudski embrio se smatra objektom moralnog pitanja zbog identiteta ljudskog bića u embrionalnom stadiju razvoja. Upravo zbog tog identiteta, u biološkim terminima embrio ima jasan, jedinstven i nedvosmislen status. Međutim, politički i moralni status ljudskog embrija je u fazi definiranja. Dok s jedne strane postoji univerzalno protivljenje reproduktivnom kloniranju ljudi bilo kojom metodom, s druge strane postoji različitost u stajalištima javnosti naspram upotrebe ljudskih embrija za izolaciju ES stanica, te potencijalne terapije njima. Etički i kulturno-idejni imperativi za poštovanjem ljudskog dostašanstva od trenutka oplodnje su u sukobu sa utilitarnom željom za olakšavanjem ljudske patnje, makar i po cijenu embrionalnog ljudskog života. Ove konfliktne perspektive su rezultirale intenzivnim debatama i utjecale na zakonsku regulaciju istraživanja mati nih stanica u državama diljem svijeta. Debata o embrio-destruktivnim metodama izolacije ES stanica se najčešće fokusira na moralni senzibilitet istraživača i njegovoj želji za istraživanjem nesputan etičkim pitanjima. U konačnici, cilj istraživanja na humanim ES stanicama je pronađen terapije koja bi olakšala posljedice ozljeda i bolesti.

Kao rješenje nekih od ovih problema ponudeni su neki alternativni putevi izolacije ES stanica koji za cilj imaju izbjegavanje uporabe embrija kao njihovog izvora. U daljem tekstu razmotrit će se alternativni oblici dobivanja genetički nemodificiranih ES stanica: biopsija pojedinačnih blastmera i organizamski mrtvi embriji.

Metodu biopsije pojedinačnih blastmera u svrhu dobivanja ES stanica, razvio je Lanza u suradnji s kolegama (Klimanskaya, Lanza et. Al., 2006.). Humane mati ne stanice stvorene su iz jedne jedine blastomere izolirane iz embrija koristeći tehniku originalno razvijene za preimplantacijsku genetsku dijagnozu (PGD). Ova procedura zaobilazi etička pitanja uništavanja embrija jer embriji nad kojima je izvršena biopsija dalje normalno nastavljaju svoj razvoj, te dosegnu stadij blastociste i dalje, kako je dokazano tijekom više od desetljeća iskustva sa PGD. Ovom metodom uspješno su izolirane ES stanice iz mišjih i humanih 8-staničnih embrija (Slika 2.). Pacijenti prihvataju rizik kojem su izloženi provođenjem biopsije kao dijela procedure za PGD, no to se smatra neopravdanim u istraživačkom okruženju u

odsutnosti kliničkih indikacija. Nadalje, u primjerice SAD-u, zakonske regulative zabranjuju istraživanja na embriju kojima se embriji izlažu bilo kakvom riziku većem od minimalnog, osim ako je istraživanje u svrhu direktnе dobrobiti za fetus.

Metoda organizamski mrtvih embrija je metoda izolacija ES stanica iz ne-vijabilnih embrija koji su umrli unatoč svim naporima. Ovaj prijedlog skupljanja živih stanica iz mrtvog embrija je analogan uzimanju esencijalnih organa preminulog donora. Predloženo je da već utvrđene smjernice doniranja esencijalnih organa budu primjenjene i na kliničku primjenu ovih paradigmi za stvaranje novih humanih staničnih linija (Principles of Regenerative Medicine, Atala, A., Lanza, 2011.)



Slika 2. Klasične i alternativne metode za dobivanje humanih staničnih linija: klasična izolacija hEMS iz kulture blastocista, izolacija iz pojedinačne blastociste dobivene biopsijom (BPB), i izolacija iz organizamski mrtvih embrija. bm = blastomera; ZP = zona pelucida; UMS = unutarnja masa stanična; TE = trofoektoderm. (Preuzeto iz *Principles of Regenerative Medicine*, Drugo izdanje te modificirano)

### **3. Svojstva embrionalnih mati nih stanica**

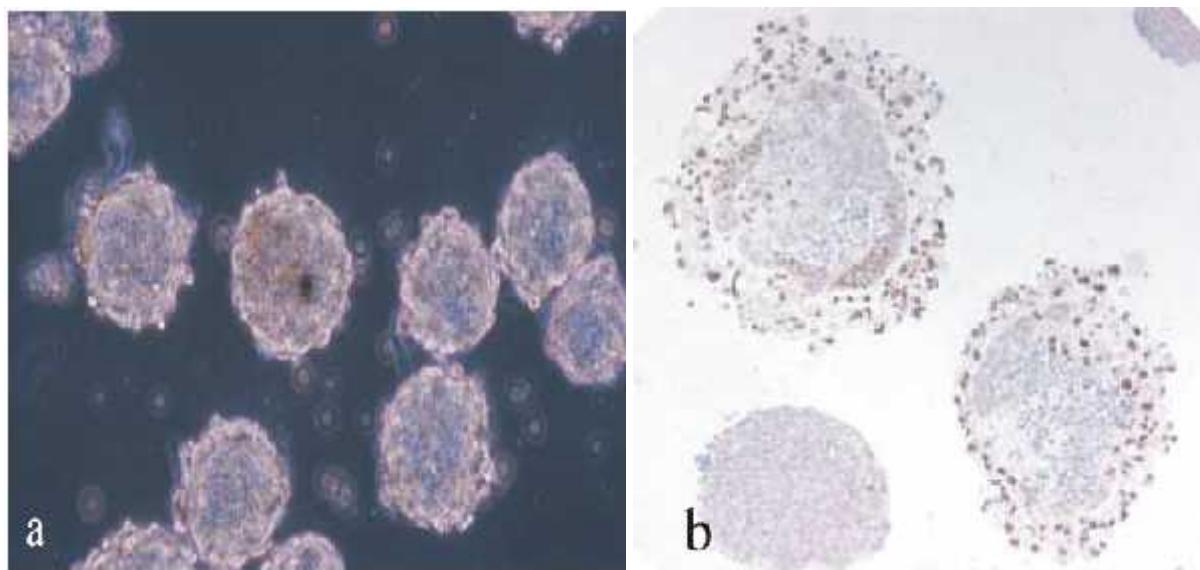
Dvije su glavne karakteristike koje se razmatraju pri definiranju mati nih stanica: kapacitet za dugoročnu samoobnovu bez starenja, te pluripotencija, sposobnost diferencijacije u više specijaliziranih stanih tipova. Ove bi stanice tako trebale osigurati teoretski neiscrpnu zalihu stanica za transplantaciju. Totipotentne mati ne stanice, koje imaju sposobnost stvaranja svih tipova tkiva, igraju ključnu ulogu u ljudskom razvoju, osiguravajući i materijal za razvoj svih tkiva i organa u embriju i van njega.

Kako je već prije spomenuto, mišje embrionalne stanice prvi su puta opisane prije više od 20 godina, kada su izolirane iz unutarnje mase stanica blastociste u razvoju te uzgojene u kulturi. Od tada, dokazano je da mogu doprinijeti svim staničnim linijama, uključujući i zametne stanice. *In vitro*, mišje ES stanice se mogu beskonačno propagirati u nediferenciranom stadiju zadržavajući kapacitet za diferencijaciju u sve zrele somatske fenotipove kada se induciraju odgovarajućim signalima. Humane mati ne stanice su izolirane 1998. godine (Thomson *et al.* 1998; Reubinoff *et al.* 2000).

Do danas, gotovo svako istraživanje je obavljeno uz pomoć embrionalnih mati nih stanica stanica miša (mESCs) ili humanih embrionalnih mati nih stanica (hESCs). Obje vrste imaju izvorne karakteristike mati nih stanica, ali zahtijevaju drugačija okruženja kako bi zadržale svoje nediferencirano stanje. Embrionalne stanice miša se uzgajaju na sloju želatine i zahtijevaju prisutnost leukemijskih inhibitorskih faktora (LIFs, eng. Leukemia Inhibitory Factors). Ljudske mati ne stanice ne reagiraju LIFs te se uzgajaju na sloju embrionalnih fibroblasta miša (MEF, eng. mouse embryonic fibroblasts) i zahtijevaju prisutnost fibroblastnog faktora rasta (bFGF ili FGF-2, eng. fibroblast growth factor). Tako er, rastu sporije, formiraju ravne umjesto sferične kolonije i mnogo lakše disociiraju u pojedinačne stanice. Bez optimalnih uvjeta ili genetske manipulacije embrionalne mati ne stanice bi ubrzano diferencirale.

Kada se embrionalne mati ne stanice uvedu u kulturu u suspenziji bez antidiferencijacijskih faktora, one spontano diferenciraju i formiraju trodimenzionalne višestanične agregate koji se nazivaju embrioidna tijela (EB, eng. embryoid bodies). EB sumiraju mnoge aspekte stanične diferencijacije tijekom rane embriogeneze i igraju važnu ulogu u diferencijaciji ES stanica u različite stanične tipove *in vitro*. Postoji nekoliko metoda za induciranje formiranja EB iz ES stanica. Tri osnovne metode su: tekuća suspenzijska kultura visoke gustoće, kultura

u metil-celuloznom polukrutom mediju, te kultura vise ih kapljica. U posljednje vrijeme, metode koje koriste ploice sa 96 jažica i klonalnu cjev icu su se prisvojile za formiranje EB iz preddeterminiranog broja ES stanica. Za proizvodnju velikog broja EB koriste se miješane suspenzije u bocama te bioreaktori. Svaka od ovih metoda po nečemu je jedinstvena stoga i karakteristike formiranih EB ovise o upotrijebljenoj metodi. Dakle, odgovarajuća metoda se odabire u skladu s ciljem koji se želi postići i. (Bishop, H. J. Rippon, A. E., 2004., Kurosawa, H., 2007.)



Slika 3. (a) Mišja embrioidna tijela, spontano derivirana iz ES stanica u diferencijaciji, plutaju u kulturi. (b) Secirana mišja embrioidna tijela nakon 8 dana diferencijacije obojani za transkripcijski marker hepatocit jezgreni faktor 3®, pokazuju formiranje endoderma na vanjskom dijelu tjelešaca (ABC metoda). (Preuzeto iz Rippon i Bishop, 2004.)

Ključna karakteristika ES stanica je i njihova pluripotentnost. Još uvijek je poprilično nejasno zašto je neka stanica pluripotentna a druga nije, iako su neki ključni faktori za održavanje ovog izvanrednog svojstva identificirani. Oct4, lan POU familije transkripcijskih faktora, je esencijalan i za nastanak i za održavanje ES stanica. Ekspresija Oct4 je ograničena na rani embrion i zametne stanice a homozigotna delecija ovog gena uzrokuje neuspjeh u formiranju unutarnje mase stanica. Da bi ES stanice miša ostale nediferencirane, ekspresija Oct4 se mora održavati u kritičnoj količini. Prekomjerna ekspresija ovog proteina uzrokuje diferencijaciju u endoderm i mezoderm, dok smanjena ekspresija dovodi do diferencijacije u trofoblast. Ekspresija Oct4 je znana za humanih ES stanica i njegova povoljna prisutnost takođe vodi do diferencijacije i ekspresije markera trofoblasta. Drugi transkripcijski faktor važan za pluripotenciju ES stanica je Nanog. Ekspresija Nanog naglo pada kada ES

stanica diferencira. Međutim, za razliku od Oct4, povećana ekspresija ovog proteina u mišjim ES stanicama dozvoljava im samoobnavljanje neovisno o LIF/STAT3, iako Nanog nije direktna nizvodna meta LIF/STAT3 puta. Štoviše, povećana ekspresija Nanoga stimulira aktivaciju pluripotentnih gena iz somatskog genoma u stanica-stanica fuzijskim modelima. U humanim ES stanicama, ekspresija Nanoga se direktno aktivira TGFb/aktivin-posredovanim SMAD signaliziranjem, i njegova prekomjerna ekspresija omogućuje rast bez hranitelja. I u mišjim i humanim ES stanicama, reducirana ekspresija Nanoga uzrokuje diferencijaciju u izvan embrionalne linije. Zanimljivo, iako su sklone diferencijaciji, mišje ES stanice se mogu samoobnavljati beskonačno i doprinositi mnogim linijama u hibridima u odsutnosti Nanoga. Funkcija Nanoga u ES stanicama je vjerojatno stabilizacija pluripotentnog stanja, a nije nužan pri njegovom uspostavljanju.

Ekspresija gena prisutnih u ES stanicama opsežno je proučavana te uključuje, npr., transkripcijske faktore Sox2 i foxd3, RNA-vezni protein Esg-1 (Dppa5) i *de novo* DNA metiltransferazu 3b. Delecija nekih od njih pokazuje njihovu ključnu funkciju u ranom razvoju (Tablica 1.). ES stanice takođe eksprimiraju visoku razinu gena uključujući enih u proteinsku sintezu i mRNA procesiranje, te ne-kodirajuće RNA jedinstvene za ES stanice. Iznenađujuće velik broj gena prisutnih u ES stanicama ima nepoznatu funkciju. Posljednje analize genoma humanih ES stanica pokazuju da Oct4 i Nanog, zajedno sa Sox2, kooperativno zauzimaju promotore velikog broja gena, od kojih su mnogi geni za transkripcijske faktore poput Oct4, Nanog i Sox2. Ova tri proteina, s obzirom da reguliraju vlastitu transkripciju, bi mogla aktivirati ili represirati ekspresiju mnogih drugih gena. Ovi genomski pristupi predstavljaju veliku nadu u razrješavanje mreže koja kontrolira pluripotentno stanje.

Tablica 1. Geni prisutni u ES stanicama te njihove uloge (Preuzeto iz *Principles of Regenerative Medicine*, 2<sup>nd</sup>)

Gen	Svojstvo i funkcija gena	Referenca
Sox2	HMG-box transkripcijski faktor; sa Oct4 regulira transkripciju; Sox2-/- mišji embriji su umrli ubrzano nakon implantacije s nedostatkom epiblasta~E6.0	Avilion et al., 2003
FOXD3	Trnskripcijski faktor Forkhead familije; FoxD3-/- mouse Embriji umrlo ubrzano nakon implantacije bez epiblasta(~E6.5); ES stanice bez FoxD3-/- se ne mogu uspostaviti	Hanna et al., 2002
Rex-1(Zfp-42)	Zinc-finger transkripcijski faktor; direct meta Oct4;	Rosfjord and Rizzino,

	Rex-1-/- ESK se nisu uspjele diferencirati u prim. i visc.endod.	1994; Thompson and Gudas, 2002
Gbx2(Stra7)	Homeobox-containing transkripcijski faktor; Gbx-/- embriji pokazuju defekt u neuralnom grebenu	Byrd and Meyers, 2005
Sall1	Jak zinc-finger transkripcijski represor; heterozigotna Mutacija kod ljudi uzrokuje Townes-Brocks sindrom; Sall1-/- miš je umro perinatalno	Kohlhase et al., 1998; Nishinakamura et al., 2001; Kiefer et al., 2002
Sall2	Homolog Sall1; Sall-/- miš ne pokazuje fenotip	Sato et al., 2003
Hoxa11	Transkripcijski faktor; Hoxa11-/- miš pokazuje defekt u muškoj i ženskoj plodnosti	Hsieh-Li et al., 1995
UTF1	Transkripcijski koaktivator, stimulira proliferaciju ES stanica	Nishimoto et al., 2005
TERT	Reverzna transkriptaza (katalitička komponenta telomeraze	Liu et al., 2000
TERF1	Telomerni 'repeat-binding' faktor 1; TERF1-/- mšji embrio je umro E5-6 sa ozbiljnim defektom rasta u unutarnjoj masi stanica	Karlseder et al., 2003
TERF2	Telomerni 'repeat-binding' faktor 2	Sakaguchi et al., 1998
DNMT3b	De novo DNA metiltransferaza; potrebna za metilaciju centromernih malih satelitsnih ponavljanja; DNMT3B-/- embrij je umro prije smrti	Okano et al., 1999
DNMT3a	De novo DNA metiltransferaza; DNMT3a-/- miš umro u starosti od 4 tjedna	Okano et al., 1999
Dppa2	Jaki DNA-vezni motiv SAP	Bortvin et al., 2003
Dpp3 (PGC7, Stella)	Jaki DNA-vezni motiv SAP	Saitou et al., 2002; Sato et al., 2002; Bortvin et al., 2003; Bowles et al., 2003
Dppa4 (FLJ10713)	Jaki DNA-vezni motiv SAP	Bortvin et al., 2003; Sperger et al., 2003
Dppa5 (Ph34, Esg-1)	Slično KH RNA-veznom motivu	Astigiano et al., 1991; Tanaka et al., 2002
ECAT11(FLJ10884)	Konzervativna domena transpozaze 22	Sperger et al., 2003

Iz ovoga je evidentno da ak i me u placentalnim sisavcima postoje razlike u karakteristikama stanica ploda u ranom razvoju koje se mogu ovjekovje iti *in vitro* u morfološki nediferenciranom stadiju. Razlog za to nije jasan, posebice zato je ve ina takvih stani nih linija dobivena u odgovaraju em stadiju, iz unutarnje mase stanica pred-implantacijske blastociste. Kod miša, ES stanice nisu dobivene iz post-implantacijskog stadija, što implicira da postoji samo kratko razdoblje tijekom kojeg je njihova izolacija mogu a. Sime je ovo povezano u razvojnem smislu ostaje nepoznato, iako otkri e da se ES stanice mogu reverzibilno prebacivati u stanje koje pokazuje promjenjenu morfologiju kolonija i gensku ekspresiju, zajedno sa gubitkom sposobnosti proizvodnje himera nakon injektiranja blastociste, nudi mogu i pristup rasyjetljavanju ovog problema. Postavlja li kasni stadij blastociste granice dobivanja stani nih linija nalik embrionalnim mati nim stanicama (ESL, eng. ES-like cell lines) još nije krit ki razmotreno kod drugih sisavaca. Me utim, mogu nost da ESL stanice u drugim sisavcima odgovaraju mišjim mati nim stanicama epiblasta poti e daljnja razmatranja (Anne E. Bishop, 2002.).

#### **4. Potencijalna primjena i nedostaci ES stanica**

Postoje mnogi načini na koje bi se humane matične stanice mogle primijeniti u raznim istraživanjima, posebice kliničkim. Studije o humanim ES stanicama pridonijete informacijama o složenim dogajanjima koji se javljaju tijekom ljudskog razvoja. Primarni cilj je utvrditi kako nediferencirane matične stanice postaju stanice koje formiraju tkiva i organe. Znanstvenici znaju da je uključivanje i isključivanje gena središte ovog procesa. Neki od najozbiljnijih medicinskih stanja poput raka i urođenih defekata se događaju upravo uslijed abnormalnih staničnih dioba i diferencijacije. Još potpunije razumijevanje genetičkih i molekularnih kontrola ovih procesa može dovesti do informacija o nastajanju bolesti te novih strategija za njihovu terapiju. Ovakav, kontrola stanične proliferacije i diferencijacije zahtjeva dodatna temeljna istraživanja molekularnih i genetičkih signala koji reguliraju staničnu diobu i specijalizaciju. Dok nedavna istraživanja na induciranim pluripotentnim stanicama sugeriraju neke od specifičnih faktora koji bi mogli biti uključeni, ove tehnike trebaju biti osmišljene za sigurno unošenje ovih faktora u stanice i kontroliranje njima induciranih procesa.

Humane matične stanice bi se također mogle upotrebljavati za testiranje novih lijekova. Na primjer, sigurnost novih lijekova bi se mogla testirati na diferenciranim stanicama nastalim iz humanih pluripotentnih staničnih linija. Druge vrste staničnih linija već su upotrijebljene na ovakav način, poput staničnih linija raka koje se upotrebljavaju u potrazi za potencijalnim anti-tumorskim lijekovima. Dostupnost pluripotentnih matičnih stanica bi omogućila testiranje lijekova na širem rasponu staničnih tipova. Međutim, da bi se ti lijekovi uinkovito istraživali, uvjeti moraju biti identični pri usporedbi različitih lijekova, te je preduvjet precizna kontrola diferencijacije matičnih stanica u specifični stanični tip na kojem će lijek biti testiran. Trenutna saznanja o kontroli signala za diferencijaciju nisu dovoljna za precizno oponašanje uvjeta za dobivanje iste populacije diferenciranih stanic za svaki lijek koji se želi testirati.

Možda najvažnija potencijalna primjena humanih matičnih stanica je proizvodnja stanic i tkiva koji bi mogli biti korišteni u staničnoj terapiji. Danas, donirani organi i tkiva se često koriste za zamjenu oboljelog ili uništenog tkiva, no potreba za transplantacijskim tkivom daleko nadmašuje njegovu dostupnost. Matične stanice, usmjerene u diferencijaciju u specifični stanični tip, nude mogućnost obnovljivog izvora zamjenskih stanic i tkiva za

lje enje stanja poput Alzheimerove bolesti, ozljeda spinalnog kanala, moždanih udara, opeklina, sranih bolesti, dijabetesa, osteoartritisa te reumatoidnog artrtisa.

Primjerice, kod ljudi koji pate od dijabetesa tipa 1, stanice guštera e koje normalno proizvode inzulin su uništene od strane pacijentovog vlastitog imunološkog sustava. Nove studije indiciraju da bi bilo mogu e usmjeriti diferencijaciju humanih ES stanica u stani noj kulturi da formiraju stanice koje proizvode inzulin i koje bi se mogle upotrijebiti u transplantacijskoj terapiji kod osoba sa dijabetesom. S ciljem ostvarenja takve, na stanicama temeljene terapije, znanstvenici moraju biti sposobni manipulirati mati nim stanicama tako da one dobiju sve potrebne karakteristike za uspješnu diferencijaciju, transplantaciju i ugradnju. Za korištenje u transplantacijske svrhe, mati ne stanice moraju biti stvorene tako da:

- opsežno proliferiraju i osiguravaju dovoljne koli ine tkiva
- diferenciraju u željeni stani ni tip
- prežive u primatelju nakon transplantacije
- se integriraju u okolno tkivo nakon transplantacije
- pravilno funkcioniraju tijekom primateljevog života
- ne štete primatelju na bilo koji na in.

Iako je potencijal ES stanica u transplantacijskoj medicini ogroman, prije bilo kakve uspješne kliničke primjene postoji cijeli niz prepreka koje se moraju savladati. Za po etak, niti jedan pristup diferencijaciji ES stanica još nije urođio 100%-tno istom populacijom zrelog potomstva. Ključno je izbjegi implantaciju nediferenciranih ES stani nih linija zbog rizika od stvaranja teratoma ili dalnjih perturbacija tkivne funkcije, dakle, moraju postojati sredstva za prošavanje željene populacije. Metode poput fluorescento-aktiviranog stani nog sortiranja (FACS) ili magnetski-aktiviranog stani nog sortiranja (MACS) mogu ujutru takvo prošavanje, ali su ovisne o površinskim markerima stanica od interesa koji mogu biti prepoznati od strane fluorescentne ili magnetske estice antitijela i, za potpuni uspjeh, marker mora biti potpuno stani no-specifičan. Vrlo esto takvi markeri nisu dostupni u tom trenutku pa se metode sortiranja tada oslanjaju na genetske modifikacije ES stanica sa genskim markerima koji su pod kontrolom linijski-specifičnog promotora. Alternativno, stanice se mogu transducirati sa genom otpornim na lijek umjesto markerom kako bi omoguile preferabilnu selekciju subpopulacije.

Na posljetku, kao i sa svim transplantatima, postoji rizik da alogeni ESC-derivirani implantati budu odbaeni od strane domaćina. Iako imunogeni nastanak (sposobnost da izazove imunološki odgovor) transplantata može biti spriječen uporabom imunosupresivnih lijekova tijekom života, oni mogu imati razne negativne nuspojave te u initiji pacijenta vrlo osjetljivim na infekcije. Proizvodnja autolognih ES stanica ne osigurava zadovoljavajuće rješenje, upravo iz razloga iz kojeg se prvotno sama transplantacija vrši. Međutim podložnost ES stanica genetskim modifikacijama osigurava sredstva za smanjenje njihove imunogenosti. To bi se moglo postići i unošenjem imunosupresivnih molekula, poput Fas liganda, ili delecijom imunoreaktivnih molekula, poput B7 antiga. Tako će postoći mogućnost zamjene gena stranog glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC; eng. Major histocompatibility complex) recipijentovim MHC genima, povećavajući i imunokompatibilnost stanica (Bishop, H. J. Rippon, 2004.).

## **5. Zaključak**

Embrionalne mati ne stanice su trenutno jedno od najzanimljivijih područja u molekularnoj biologiji i medicini jer su potencijalno nepresušan izvor nediferenciranih stanica koje, uz određen poticaj, mogu postati bilo koja stanica u tijelu te tako zamijeniti oštene ili uništene stanice i tkiva. Ovaj pristup mogao bi izljeiti neke od najtežih urođenih i starih bolesti i stanja.

Međutim, koliko god u teoriji zvučale revolucionarno, u praksi se oko njih vode brojne polemike, što zbog etičkih pitanja, a što zbog jako malo saznanja koja su, unatoč velikim naporima, do sada prikupljena o njima. ES stanice potječu iz unutarnje mase stanice u razvojnog stadija embrija, blastociste, stoga i njihova izolacija nije ešte podrazumijeva uništavanje embrija, koji u biološkim terminima ima identitet živog生物. S druge strane, isto to uništenje embrija ima toliko velik potencijal u smanjenju ljudske patnje i izlječenju bolesti.

Također, kako malo se zna o samim unutarnjim mehanizmima koji, u nekim uvjetima održavaju stanje nediferenciranosti, dok u drugima potiču u njihovu diferencijaciju. Puno se radi na proučavanju genetičkih faktora specifičnih za ES stanice u nadi se da upravo oni kriju odgovore na brojna pitanja. Uz spomenute genetičke faktore, jedno od mogućih rješenja su alternativni načini izolacije ovih stanica koji ne uključuju smrt embrija. Znanstvenici naporno rade na ovom potencijalno revolucionarnom liječenju svjesnih utjecaja koji bi dodatno saznanja o embrionalnim materijalnim stanicama mogla imati na zdravlje i kvalitetu života ljudi.

## 6. Literatura

- Solano, G. e. a. (2009.). Essentials of Stem Cell Biology. R. Lanza.
- Atala, A., Lanza, R., Thomson, J.A., Nerem,R. (2011.). Principles of Regenerative Medicine
- Bishop, H. J. Rippon, A. E. (2004.). "Embryonic stem cells." Cell Prolif.(37): 23-34.
- Anne E. Bishop, L. D. K. B. a. J. M. P. (2002.). "Embryonic stem cells." Journal of Pathology(197): 424-429.
- Kurosawa, H. (2007.). "Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells." J Biosci Bioeng. (103): 389-398.
- Martin, G. (1981.). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Developmental Biology 78(12): 7634-7638.
- Thomson et. al; Itskovitz-Eldor, J; Shapiro, SS; Waknitz, MA; Swiergiel, JJ; Marshall, VS; Jones, JM (1998). "Blastocysts Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human". *Science* 282 (5391): 1145–1147.
- Shulamit Levenberg, J. S. G., Michal Amit, Joseph Itskovitz-Eldor and Robert Langer (2002.). "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells."
- Klimanskaya, I., Chung, Y.; Becker, S., Lu, S. and Robert Lanza (2006.). "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres". *Nature* 444, 481-485.
- Rosfjord E, Rizzino A. (1994.). "The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells." Biochem Biophys Res Commun. 203(3):1795-802.
- Thompson JR, Gudas LJ. (2002.). "Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene." *Mol Cell Endocrinol.* 195(1-2):119-33.
- Byrd, N. A. and Meyers, E. N. (2005). "Loss of Gbx2 results in neural crest cell patterning and pharyngeal arch artery defects in the mouse embryo." *Dev. Biol.* 284,233 -245.
- Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H et al. (1998). "Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome". *Nat. Genet.* 18 (1): 81–3.
- Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, ..., Lacey DL, Katsuki M, Asashima M, Yokota T. (2001.). "Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development." *Development.* 128(16):3105-15.

Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M.F., Von Lintig, J. (2002). "A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(16): 10581--10586.

Sato, Mki., J. Hansen, D. Koch, A. Lacis, R. Ruedy, O. Dubovik, B. Holben, M. Chin, and T. Novakov, (2003): "Global atmospheric black carbon inferred from AERONET". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 6319-6324.

Hsieh-Li, H.M., Witte, D.P., Weinstein, M., Branford, W., Li, H., Small, K., and Potter, S.S. (1995). "Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility". *Development* 121, 1373-1385.

Nishimoto, N., Kanakura, Y., Aozasa, K., Johkoh, T., Nakamura, M., Nakahara, S., Hirokuni (2005.). "Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease." *Blood*, 106: 2627-2632.

Liu, J., Ben-Shahar, T. R., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A., & Gruenbaum, Y. (2000). "Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes." *Mol Biol Cell*, 11, 3937-47.

Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T., and de Lange, T. (2003). "Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1." *Mol. Cell. Biol.* 23, 6533–6541.

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E. (1998.). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." *Genes Dev.* 12(18):2831-41.

Okano, S., Kanno, S., Takao, M., Eker, A.P.M., Isono, K., Tsukahara, Y., Yasui, A. (1999). "A putative blue-light receptor from *Drosophila melanogaster*." *Photochem. Photobiol.* 69(1): 108--113.

Bortvin, Alex, et al. (2003.). "Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei." *Development*, 130: 1673-80.

Saitou M, Barton SC and Surani MA (2002.). "A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice." *Nature* 418,293–300.

Sperger, J.M., Chen, X. et. al. (2003.). "Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13350-13355.

Astigiano, S., Barkai, U., Abarzua, P., Tan, S.C., Harper, M.I. and Sherman, M.I. (1991.), "Changes in gene expression following exposure od nulli-SCCI murine embryonal carcinoma cells to inducers of differentiation: characterization of a downregulated mRNA." *Differentiation*, 46; 61-67.

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J., Nasmyth, K. (2002) "Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections." Cell 108: 317–329.

<http://www.stemcells.nih.gov>

## **7. Sažetak**

Embrionalne mati ne stanice se od ostalih stanica u tijelu razlikuju po dvije osnovne karakteristike: sposobnost samoobnavljanja i pluripotentnost, sposobnost da se iz nedifreneciranog stanja razviju u bilo koji tip stanice u tijelu. Njihovo je podrijetlo, za razliku od odraslih mati nih stanica, vrlo dobro istraženo. One potje u iz unutarnje mase stanica razvojnog stadija embrija, blastociste. Upravo zbog toga što se izoliraju iz predimplantacijskih embrija i što takav postupak zahtjeva njihovo uništavanje, izazivaju mnoštvo polemika oko njihovih istraživanja, s obzirom da embryo u biološkim terminima ima status živog bi a. Kao odgovor na ove probleme, predloženi su neki alternativni na ini izolacije ije su tehnike još u razvoju.

Do sada, ve ina istraživanja se provodi na mišjim i humanim embrionalnim mati nim stanicama koje se me usobno razlikuju uglavnom po uvjetima koje zahtijevaju u kulturi *in vitro* za održavanje nediferenciranog stanja, te po nekim morfološkim osobinama.

Potencijalna primjena humanih ES stanica je u stvaranju populacija stanica , tkiva i organa za implantaciju koje bi revolucionizirale medicinu osiguravanjem neograni enog materijala za implantaciju potpuno kompatibilnog sa tkivom pacijenta. Tako er,stanice se mogu koristiti kao *in vitro* sustav, ne samo za prouavanje diferencijacije specifi nih stani nih tipova, ve i za razmatranje u inka novih lijekova te identifikaciju gena kao potencijalnih terapeutskih meta. Me utim, još mnoge prepreke se moraju prije i i mnoga pitanja odgovoriti prije nego bilo kakvi klini ki tretmani mogu po eti.

## **7. Summary**

Embryonic stem cells differ from the other cells in a body by two main characteristics: the ability of self-renewal and pluripotency, the ability to develop any type of the cell from an undifferentiated state. Their origin, as opposed to adult stem cells, is very well researched.

They originate from the inner cell mass of the embryo stage of development- the blastocyst. Because of their isolation from preimplantation embryos, and its destruction that this procedure requires, their research causes plenty of controversy given that the embryo in biological terms has the status of a living being. In response to these concerns, there have been proposed some alternative ways of isolation techniques which are still in development.

Until now, most of the research is conducted in mouse and human embryonic stem cells, which differ from each other mainly in terms required for *in vitro* maintenance of undifferentiated state, and in some morphological characteristics.

Potential application of human ES cells is creating populations of cells, tissues and organs for implantation that will revolutionize medicine by providing unlimited material for implantation fully compatible with the patient's tissue. Also, the cells can be used as an *in vitro* system, not only for the study of differentiation of specific cell types, but also to consider the impact of new drugs and the identification of genes as a potential therapeutic targets. However, there are many obstacles to go over and have many questions to answer before any clinical treatments can begin.