

Embrionalne matične stanice: moguća uloga u liječenju bolesti

Žužić, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

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:217:322957>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EMBRIONALNE MATEMATIČNE STANICE
(MOGUĆA ULOGA U LIJEČENJU BOLESTI)

EMBRYONIC STEM CELLS
(POSSIBLE ROLE IN DISEASE TREATMENT)

SEMINARSKI RAD

Marta Žuži

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

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

Zagreb, 2014.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 2 |
| 2. DOBIVANJE I UZGOJ EMBRIONALNIH MATI NIH STANICA U LABORATORIJU..... | 3 |
| 2. 1. „In vitro oplodnja“ | 4 |
| 2. 2. Nuklearni transfer (terapijsko kloniranje)..... | 4 |
| 2. 3. Predimplantacijska geneti ka dijagnoza..... | 6 |
| 3. KORIŠTENJE EMBRIONALNIH MATI NIH STANICA..... | 12 |
| 3. 1. Istraživanje diferencijacije..... | 12 |
| 3. 2. Testiranje toksi nosti lijekova..... | 13 |
| 3. 3. Regenerativna medicina..... | 13 |
| 3. 3. 1. Ozljede kralježni ne moždine..... | 13 |
| 3. 3. 2. Parkinsonova bolest..... | 16 |
| 3. 3. 3. Amiotrofi na lateralna skleroza..... | 18 |
| 3. 3. 4. Bolesti mrežnice..... | 20 |
| 4. ETIKA..... | 21 |
| 5. ZAKLJU AK..... | 22 |
| 6. LITERATURA..... | 23 |
| 7. SAŽETAK..... | 26 |
| 8. SUMMARY..... | 27 |

1.UVOD

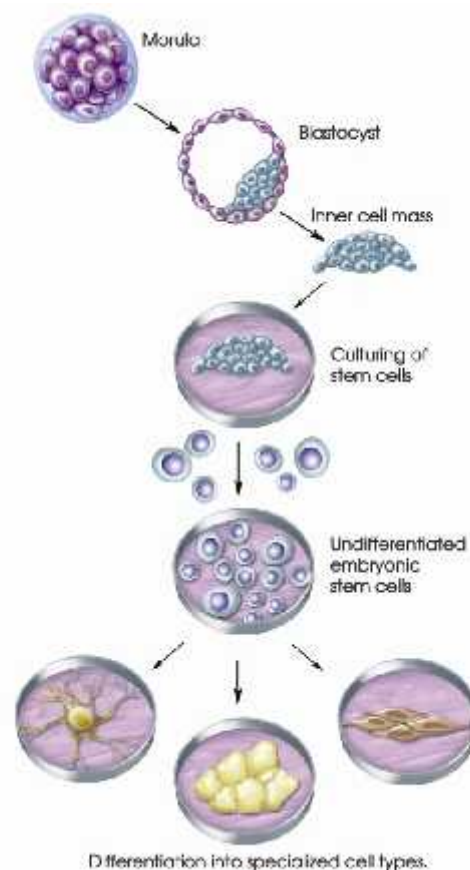
Svaka stanica u našem tijelu sadrži sve gene koji su potrebni za razvoj cijelog ljudskog organizma zato što su sve stanice nastale dijeljenjem prve stanice dobivene spajanjem jajne stanice i spermija. Na putu od prve stanice do cijelog organizma stanice se moraju specijalizirati zbog kompleksnosti zadataka koje obavljaju. Danas poznajemo više od 200 različitih tipova stanica. U specijaliziranim stanicama samo su određeni geni aktivni, dok je sve ostalo u potpunosti blokirano. Taj proces specijalizacije stanica naziva se diferencijacija. Kada jednom imamo diferencirane stanice (stanice mozga, krvne stanice, jetrene stanice, mišićne stanice...), one se rijetko ili nikada ne dijele i ne mogu se u živom organizmu više vratiti u prvotni, nespecijalizirani oblik. Nove diferencirane stanice mogu nastati jedino iz nespecijaliziranih stanica koje zovemo matične stanice.

Embrionalne matične stanice mogu se gotovo neograničeno umnožavati te se u određenim uvjetima mogu specijalizirati u bilo koji tip stanica u našem tijelu, zbog čega kažemo da su one pluripotentne. Upravo zbog toga što imaju mogućnost samoobnavljanja i što su pluripotentne, predstavljaju zamjenske stanice bilo kojeg tipa stanica ljudskog organizma.

Ljudske embrionalne matične stanice prvi su put izolirane iz blastociste 1998. godine (Thomson i sur., 1998.). Nakon tog otkrića veći broj istraživanja na hESMS pokušava odgovoriti na pitanja kako dobiti što veći broj matičnih stanica, kako ih što bolje diferencirati u određeni tip stanica i naposljetku, kako dobivene stanice koristiti kao terapiju za mnogobrojne bolesti.

2. DOBIVANJE I UZGOJ EMBRIONALNIH MATI NIH STANICA U LABORATORIJU

Embrionalne matične stanice dobivaju se iz embrioblasta blastociste (Sl. 1.) (<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/>). Blastocista je preimplantacijski stadij ljudske embriogeneze, nastao iz morule pet dana nakon oplodnje. Građena je od stanica blastomera i blastocela. Unutarnja masa stanica, ili embrioblast, su pluripotentne stanice iz kojih se razvija embrio, a vanjski sloj stanica čini trofoblast iz kojeg se razvija placenta. Trofoblast okružuje embrioblast i šupljinu ispunjenu tekućinom, blastocel. Zbog etičkih razloga (opisanih u poglavlju Etika), u većini zemalja se ne izvode „in vitro“ oplodnje kako bi se dobile blastociste za uzgoj embrionalnih matičnih stanica. Izvor hEMS su blastociste preostale nakon umjetne oplodnje, blastociste nastale nuklearnim transferom somatske jezgre u jajnu stanicu i pojedinačne stanice embrioblasta uzete iz blastociste bez njenog uništavanja (Tablica 1.) (<http://www.explorestemcells.co.uk/StemCellControversy.html>).



Slika 1. Dobivanje embrionalnih matičnih stanica iz blastocista i njihova diferencijacija.

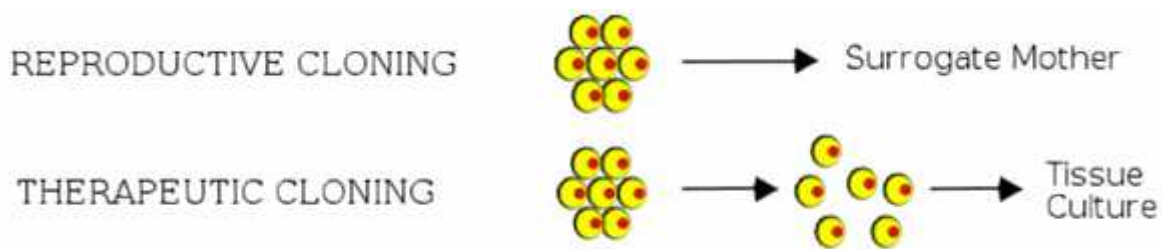
(<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/>)

2.1. „In vitro“ oplodnja

Najveći i izvor embrionalnih matičnih stanica su klinike za umjetnu oplodnju. Tijekom samog procesa veći i broj jajčica se oplodi kako bi se povećala šansa stvaranja vijabilne blastociste koja će se implantirati u maternicu. Većina blastocista se ne uspije implantirati te dolazi do stvaranja „viška“ blastocista koje se zamrzavaju i ostaju tako pohranjene. Da bi se takve zamrznute blastociste mogle koristiti kao izvor embrionalnih matičnih stanica za znanstvena istraživanja potreban je pismeni pristanak donora. (<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/>)

2.2. Nuklearni transfer (terapijsko kloniranje)

Nuklearni transfer je laboratorijska tehnika stvaranja vijabilnog embrija spajanjem jajne stanice bez jezgre s jezgrom somatske stanice. Može se koristiti u terapijskom i reproduktivnom kloniranju (Sl. 2.). Citoplazmatski faktori prisutni u oocitama imaju jedinstvenu mogućnost reprogramiranja transplantirane somatske jezgre u pluripotentno stanje. Taj proces uključuje promjene u metiliranosti DNA i modifikacije histona, što omogućuje transkripciju gena ranog embrija (Blelloch i sur.,2006).

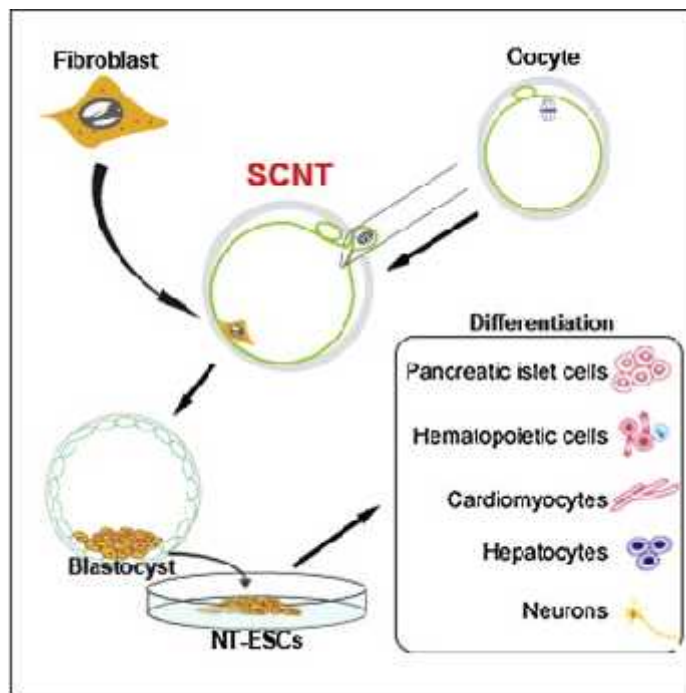


Slika 2. Razlika između u reproduktivnog i terapijskog kloniranja
(http://en.wikipedia.org/wiki/Somatic-cell_nuclear_transfer)

Ljudske embrionalne matične stanice su dobivene iz blastociste nastale transferom jezgre fibroblasta u jajnu stanicu (Sl. 3.). Stanice pokazuju normalan kariotip, nasljeđuju cijeli genom iz roditeljske somatske stanice te je njihova genska ekspresija slična onoj kod hEMS dobivenih iz blastociste nastale nakon spajanja jajne i spermalne stanice (Tachibana i sur.,

2013.). Reprogramiranje genoma teže je što je stanica starija i diferenciranija jer su njezina epigeneti ka obilježja sve razli itija od stanja pluripotentnosti. Usprks tome, znanstvenici su uspjeti dobiti embrionalne mati ne stanice koriste i fibroblaste starijih osoba (Chung i sur., 2014.), a ak i, koriste i somatske stanice osobe s dijabetesom tipa 1, diferencirati ih u stanice sposobne lu iti inzulin (Yamada i sur., 2014.). Takve stanice mogle bi se u budu nosti koristiti u terapijama osoba oboljelih od dijabetesa, jer transplantacijom ne bi izazvale imunološku reakciju kod pacijenta.

Potencijal ljudskih embrionalnih mati nih stanica dobivenih ovom metodom je velik, a njihovo dobivanje jako neefikasno. Zbog toga se vrše mnoga istraživanja s ciljem poboljšanja protokola za nuklearni transfer, kako bi dobivanje NT-hEMS bilo uspješnije (Chung i sur., 2014.).



Slika 3. Ljudske embrionalne mati ne stanice (NT-ESCs) dobivene transferom nuklearnih fibroblasta u jajnu stanicu bez jezgre mogu se dalje diferencirati u razli ite tipove stanica. (Tachibana i sur., 2013.)

2.3. Preimplantacijska geneti ka dijagnoza




To je tehnika kojom se uklanja jedna blastomera iz 8-stani nog stadija embrija (Sl. 4.). Znanstvenici mogu uzgojiti liniju embrionalnih maternih stanica iz jedne stanice, a embrio ostaje nedirnut i ima mogućnost dalje se razvijati. Koristi se za testiranje embrija na razne genetski nasljedne bolesti (<http://www.explorestemcells.co.uk>).



Slika 4. In vitro uklanjanje jedne blastomere iz 8-stani nog stadija
(<http://humrep.oxfordjournals.org/content/18/3/465.full>)

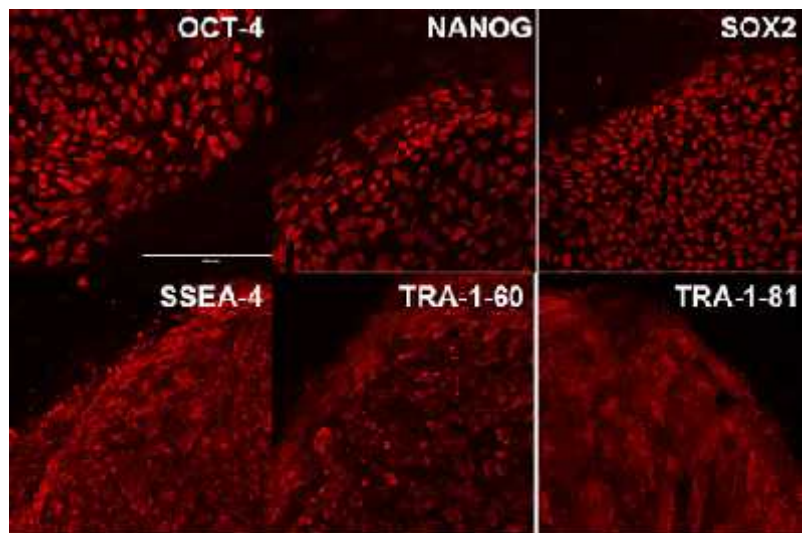
Takav postupak za sobom povla i niz etičkih pitanja, jer se izolacijom blastomere može oštetiti embrio. Posljedice mogu biti debljanje i gubitak pamćenja u odrasloj dobi (Yu i sur., 2009.). Osim toga, ovom se metodom potencijalno mogu provjeravati i pitanja koja nisu povezana s bolestima, kao što su ljepota ili inteligencija, što bi moglo dovesti do stvaranja „dizajnerske djece“ (<http://humrep.oxfordjournals.org/content/18/3/465.full>).

Tablica 1. Usporedba različitih izvora ljudskih embrionalnih matičnih stanica.
(prilagođeno prema <http://nas-sites.org/stemcells/>)

| | „In vitro“ oplodnja | Nuklearni transfer | Preimplantacijska geneti ka dijagnoza |
|-------------------|---|--|---|
| |  |  |  |
| prednosti | <ul style="list-style-type: none"> • Mogu stvoriti sve tipove stanice • Relativno lagano za izolirati, održavati i uzgajati u laboratoriju • Velik broj „viška“ blastocista iz klinika | <ul style="list-style-type: none"> • Mogu stvoriti sve tipove stanica • Relativno lagano za izolirati, održavati i uzgajati u laboratoriju • Stanice su geneti ki identične pacijentu | <ul style="list-style-type: none"> • Mogu stvoriti sve tipove stanica • Relativno lagano za izolirati, održavati i uzgajati u laboratoriju • Blastocista preživljava |
| nedostatci | <ul style="list-style-type: none"> • Ograni en broj stani nih linija za koje postoje financirana istraživanja • Rizik stvaranja teratoma ako se implantiraju nediferencirane matične stanice | <ul style="list-style-type: none"> • Mali postotak razvijenih blastocista • Rizik stvaranja teratoma ako se implantiraju nediferencirane matične stanice | <ul style="list-style-type: none"> • Može do i do ošte enja embrija i posljedica u odrasloj dobi • Rizik stvaranja teratoma ako se implantiraju nediferencirane stanice |
| etika | <ul style="list-style-type: none"> • Uništavanje ljudske blastociste • Korištenje blastociste zahtijeva pristanak donora | <ul style="list-style-type: none"> • Uništavanje ljudske blastociste • Zabrinutost oko zloupotrebe za reproduktivno kloniranje | <ul style="list-style-type: none"> • Zabrinutost oko zlouporabe za stvaranje „dizajnerske djece“ |

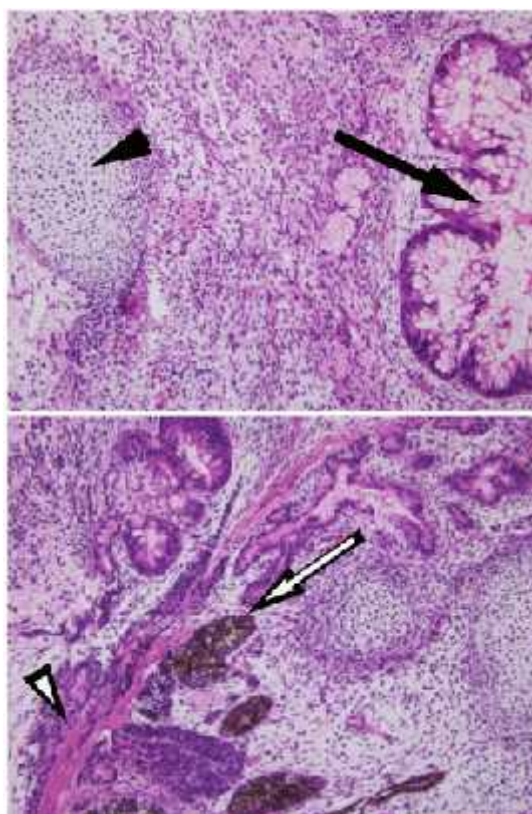
Nakon izolacije iz preimplantacijskog stadija embrija embrionalne matične stanice se nastave uzgoj na plastičnim laboratorijskim posudama u kojima se nalazi odgovarajući medij. Unutarnja površina posude može biti premazana mišjim embrionalnim stanicama kože koje se ne dijele, stanicama hranilicama, ili ne mora. Mišje stanice daju ljepljivu površinu za koju se ljudske matične stanice mogu prihvatiti te oslobode mediju. Takav proces dobivanja matičnih stanica se dosad pokazao neučinkovit, ali kad se jednom uspije, iz početne populacije matičnih stanica mogu nastati milijuni novih embrionalnih matičnih stanica.

Kako bi bili sigurni da se radi upravo o embrionalnim matičnim stanicama, tijekom uzgoja matičnih stanica provodi se karakterizacija. Takvi testovi podrazumijevaju: 1) rast i supkultiviranje matičnih stanica više mjeseci, što dokazuje jesu li stanice sposobne za rast i samoobnavljanje, 2) proučavanje izgleda stanica kroz mikroskop, 3) dokazivanje prisustva transkripcijskih faktora koje obično proizvode nediferencirane stanice (među najpoznatijim transkripcijskim faktorima su Nanog i Oct4, koji su zaslužni za održavanje matičnih stanica u nediferenciranom obliku (Sl. 5.)), 4) dokazivanje prisustva specifičnih površinskih markera za nediferencirane stanice, 5) proučavanje kromosoma pod mikroskopom kako bi se vidjelo je li došlo do njihovog oštećenja ili promjene broja, 6) određivanje mogu li stanice ponovno proliferirati nakon zamrzavanja, 7) određivanje jesu li embrionalne matične stanice pluripotentne dopuštanjem da stanice spontano diferenciraju u staničnoj kulturi, manipuliranjem stanicama da diferenciraju u tri zametna lista i injiciranjem stanica u miša s potisnutim imunološkim sustavom kako bi se testiralo formiranje teratoma. Teratom je benigni tumor koji sadržava mješavinu raznih diferenciranih ili djelomično diferenciranih tipova stanica (Sl. 6.) (<http://stemcells.nih.gov/>)



Slika 5. Standardni markeri pluripotencije vizualizirani imunocitokemijski s antitijelima protiv OCT4, NANOG, SOX2, SSEA-4, TRA-1-60, i TRA-1-81.

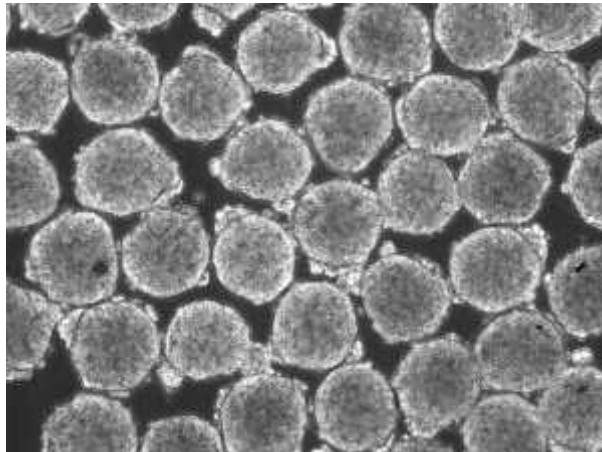
(Tachibana i sur., 2013.)



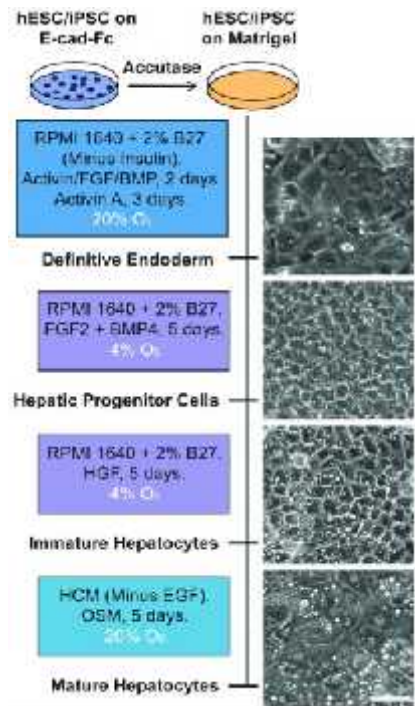
Slika 6. Histološka analiza teratoma nastalog nakon injektiranja hEMS u miša. Strelica i glava strelice na gornjoj slici pokazuju probavni epitel s vrastim stanicama (endoderm) i hrskavicu (mezoderm). Strelica i glava strelice na donjoj slici prikazuju neuroektodermalno (ektoderm) i mišino (mezoderm) tkivo. Povećanje x200

(Tachibana i sur., 2013.).

Ako se embrionalnim matičnim stanicama dopusti da se spoje i stvore embrioidna tjelešca (Sl. 7.), ona mogu spontano diferencirati. Da bi se dobile kulture specifičnih tipova diferenciranih stanica potrebno je kontrolirati diferencijaciju pomoću različitih kemijskih komponenti u mediju, promjenom površine laboratorijske posude u kojoj se uzgajaju ili modificiranjem samih stanica ubacivanjem specifičnih gena (<http://stemcells.nih.gov/>). Prilikom korištenja diferenciranih matičnih stanica za transplantaciju treba biti vrlo oprezan i siguran da se uistinu radi o potpuno diferenciranim stanicama, jer bi inače kod pacijenta mogle izazvati nastanak teratoma (<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/>). Danas postoje osnovni protokoli ili recepti za usmjerenu diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica u jednu od specifičnih tipova stanica (<http://stemcells.nih.gov/>) (Sl. 8., Sl. 9.).



Slika 7. Embrioidna tjelešca
(www.eurostemcell.org)



Slika 8. Primjer protokola usmjerene diferencijacije embrionalnih maternih stanica u hepatocite.

(<http://www.stembook.org/node/721>)



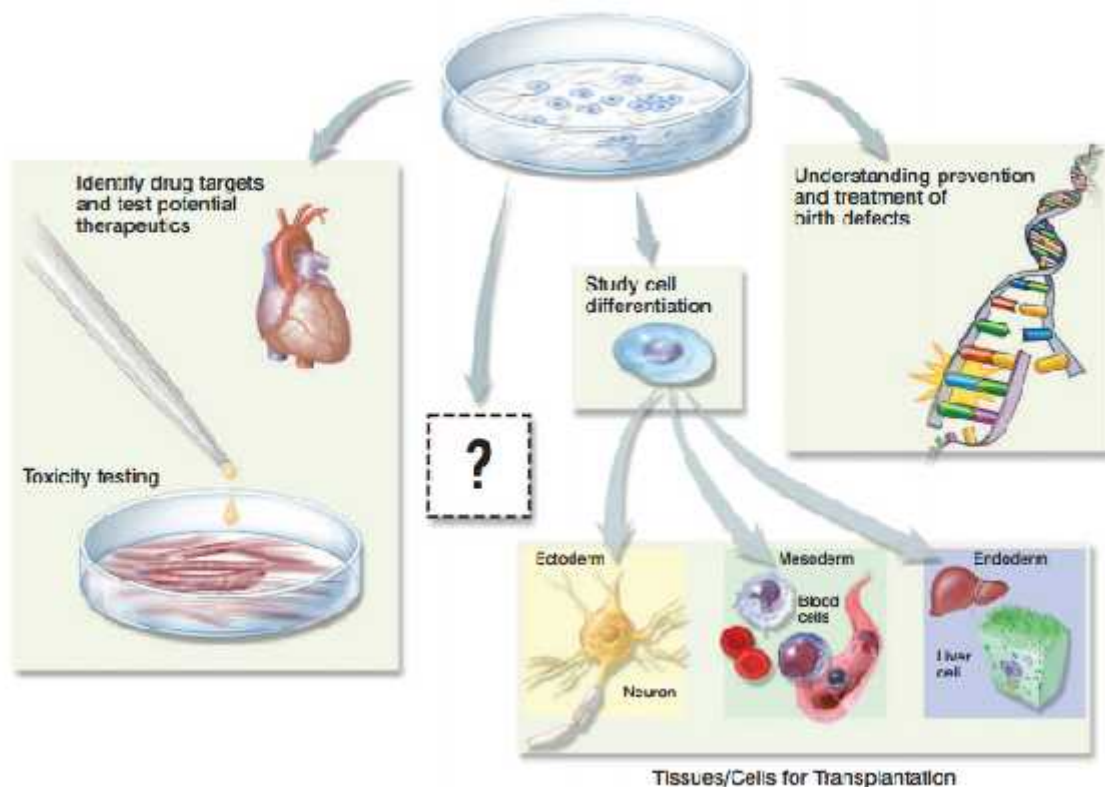
Slika 9. Primjer protokola usmjerene diferencijacije embrionalnih maternih stanica u kardiomiocite.

(<http://circres.ahajournals.org/content/111/3/344/F1.expansion.html>)

3. KORIŠTENJE EMBRIONALNIH MATI NIH STANICA

3.1. ISTRAŽIVANJE DIFERENCIJACIJE

Ima puno na ina na koje se hEMS mogu koristiti u istraživanju i lije enju bolesti (Sl. 10.). Istraživanja hEMS daju informacije o kompleksnim doga anjima do kojih dolazi tijekom ljudskog razvoja. Osnovni cilj je otkriti kako nediferencirane mati ne stanice postanu diferencirane stanice koje formiraju tkiva i organe. Osnova tog procesa je paljenje i gašenje gena, a današnja istraživanja za cilj imaju otkriti o kojim se to no genima radi i u kojem trenutku razvoja (<http://stemcells.nih.gov>). Neka od najozbiljnijih medicinskih stanja, kao što su rak i kongenitalni porema aji, posljedica su nenormalne diobe stanica i diferencijacije. Bolje razumijevanje geneti ke i molekularne kontrole tih procesa može dati informaciju o tome kako takve bolesti nastaju i dati ideju za nove terapije (<http://www.sciencedaily.com/releases/2006/08/060805124158.htm>).



Slika 10. Potencijal embrionalnih mati nih stanica. EMS se mogu koristiti za testiranja citotoksi nosti lijekova, istraživanja ljudskog razvoja kako bi se bolje razumjeli genetski poreme aji i za istraživanja usmjerene diferencijacije u razne tipove stanica i tkiva za regenerativnu medicinu.

(<http://stemcells.nih.gov>)

3.2. TESTIRANJE TOKSI NOSTI LIJEKOVA

Ljudske embrionalne matične stanice i specijalizirane somatske stanice u koje su se hEMS diferencirale „in vitro“ (kao što su kardiomiocite, dopaminergički neuroni ili beta stanice Langerhansovih otočica) koriste se za testiranje potencijalne citotoksičnosti lijekova i ksenobiotika (Rolletschek i sur, 2013.). Većina lijekova testira se na laboratorijskim životinjama, no zbog razlika između vrsta ne može se sa sigurnošću znati da oni nemaju toksičnost u inke na ljudske stanice. Ovakvim testovima se može otkriti je li novi lijek siguran za ljudske stanice i prije nego se krene koristiti u kliničkim istraživanjima, što ubrzava proces otkrivanja lijekova i vodi do sigurnijih i učinkovitijih lijekova za liječenje bolesti.

3.3. REGENERATIVNA MEDICINA

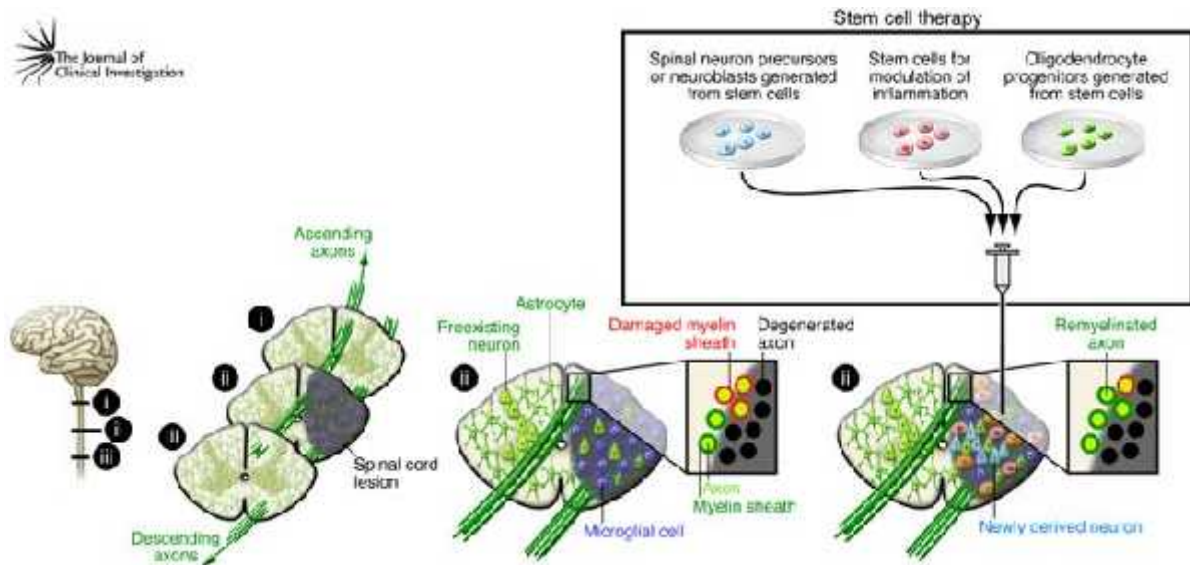
Vjerojatno najveći i potencijal ljudskih embrionalnih matičnih stanica je dobivanje stanica i tkiva koja se mogu koristiti u regenerativnoj medicini. Danas se donirani organi i tkiva često koriste kako bi zamijenili ona oštećena, ali je potreba za transplantatima puno veća nego što ih ima. Matične stanice, usmjerene u diferencijaciju u specifične tipove stanice, daju neiscrpan izvor zamjenskih stanica i tkiva za liječenje raznih bolesti, a neke od najistaknutijih su: ozljede leđne moždine, Parkinsonova bolest, ALS i bolesti mrežnice (<http://stemcells.nih.gov>).

3.3.1. Ozljede leđne moždine

Ozljeda leđne moždine dovodi do trenutne ili trajne promjene u njejoj motoričkoj, osjetilnoj ili autonomnoj funkciji. Najčešći uzroci ozljede su traume zadobivene u automobilskim nesrećama, padovima i sportskim ozljedama. Patološke promjene nakon ozljede leđne moždine su kompleksne i uključuju prekidanje uzlaznih i silaznih neuronskih puteva, gubitak neurona i glija stanica, upala, stvaranje ožiljka i demijelinizacija (Lindvall i Kokaia, 2010.).

Istraživanja vršena na laboratorijskim životinjama pokazala su da se stanice dobivene diferencijacijom iz embrionalnih matičnih mogu na različite načine koristiti kao terapija za ozljede leđne moždine: 1) tako da zamjenjuju živane stanice koje su uništene kao posljedica

ozljede, 2) stvaranjem novih potpornih stanica koje bi mijelinizirale oštećene neurone i poticale rast istih, 3) štite i neurone na mjestu ozljede od dodatnog oštećenja uzrokovanog otpuštanjem raznih faktora rasta i slobodnih radikala koji se otpuštaju u tkivo, 4) sprječavaju i širenje ozljede utišavaju i upalu koja može dodatno doprinijeti ozljeivanju tkiva (<http://www.eurostemcell.org/factsheet/spinal-cord-injuries-how-could-stem-cells-help>) (Sl. 11.).



Slika 11. Terapija matičnim stanicama za ozljede leđne moždine. Embrionalne matične stanice mogle bi se koristiti za liječenje pacijenata na više načina: prvo, transplantacijom neuroblasta dobivenih iz hEMS koji bi zamijenili oštećene ili mrtve motoričke neurone; drugo, transplantacijom oligodendrocitnih progenitorskih stanica koji bi pomogli remijelizaciji; treće, transplantacijom stanica koje bi oslobodile različite faktore za utišavanje upale.

(Lindvall i Kokaia, 2010.)

Prvo kliničko ispitivanje ljudskih embrionalnih matičnih stanica započelo je 2009. godine, u kojem su se transplantirale oligodendrocitne progenitorske stanice u pacijente s ozljedama leđne moždine različite jačine, ne starije od 14 dana. Ovo je ispitivanje prekinuto 2011. godine zbog financijskih problema tvrtke (Frantz, 2012.), a nastavilo se 2013. godine novom tvrtkom (<http://www.bizjournals.com/sanfrancisco/blog/biotech/2013/01/biotime-acquires-stem-cell-assets-geron.html>).

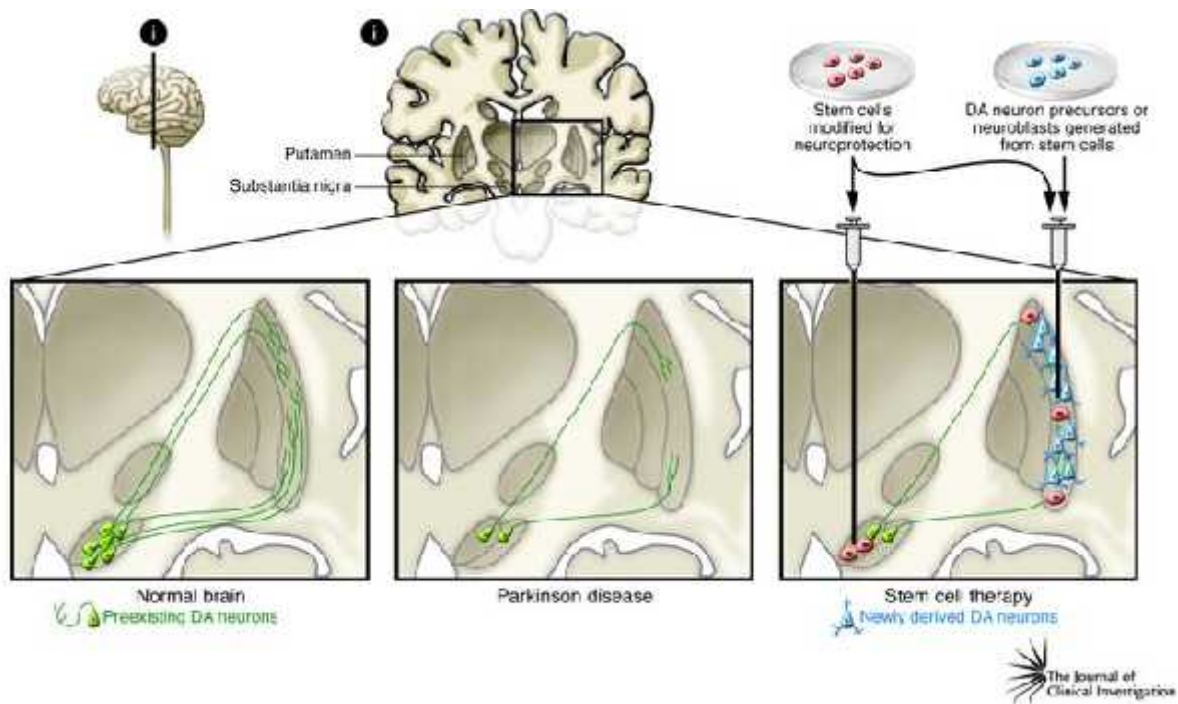
Potencijalna korist terapije matičnim stanicama je izvanredna, jer bi jednog dana moglo doći do liječenja, kao što se dosad mislilo, nepovratnih ozljeda kralježnice. Istraživanja su pokazala da, kod laboratorijskih životinja, injekcije matičnih stanica imaju pozitivan efekt

na pokretljivost, ali rezultati su bolji što je manje vremena prošlo od same ozljede (<http://www.explorestemcells.co.uk/majordiseasesstemcells.html>).

3.3.2. Parkinsonova bolest

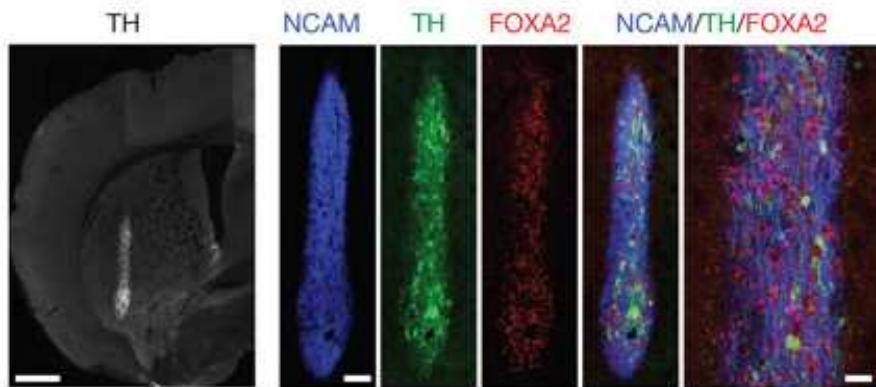
Parkinsonova bolest, druga najčešća i progresivna neurodegenerativna bolest povezana sa starenjem, karakterizirana je gubitkom dopaminergičkih neurona, stvaranjem unutarstaničnih inkluzija agregiranih proteina i upalom. Najistaknutiji simptomi bolesti su drhtanje, ukočenost, usporenost pokreta, slaba ravnoteža i smetnje u kretanju. Kako simptomi napreduju, javljaju se poteškoće u hodanju, pri hodu i obavljanju jednostavnih radnji. Dopaminski agonisti, L-dopa, inhibitori enzima i duboka stimulacija mozga se koriste za ublažavanje simptoma bolesti, ali njihova je učinkovitost ograničena (Lindvall i Kokaia, 2010.).

Embriionalne matične stanice predstavljaju potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti, jer se mogu uspješno diferencirati u dopaminergičke neurone (Kawasaki i sur., 2000.) (Sl. 12.), koji pokazuju sva svojstva dopaminergičkih neurona srednjeg mozga (Kim i sur., 2002.). Postoje tri glavna protokola za proizvodnju dopaminergičkih neurona iz hEMS. Prvi se temelji na uzgajanju EMS na stromalnim stanicama hranilicama (Kawasaki i sur., 2000.). Drugi se oslanja na stvaranje embrioidnih tjelešaca (Lescaudron i sur., 2014.). Koriste i stromalne stanice hranilice može se dobiti 30-50% neurona, od kojih 64-79% eksprimira gen za tirozin hidrolazu (TH+ neuroni) (Sl. 13.) (Perrier i sur., 2004.). Metodom embrioidnih tjelešaca 77% stanica diferencira u neurone, od kojih je 86% TH+ (Lescaudron, 2014.). Novijom metodom za dobivanje dopaminergičkih neurona koji se uspješno usvajaju in vivo, hEMS se prvo diferencijaju u stanice podne ploče (Sl. 14.). Tako dobiveni dopaminergički neuroni, nakon transplantacije u miševе i štakore, pokazuju visoko preživljenje, uzrokuju poboljšanje u pokretanju prednjih udova i ne pokazuju nekontrolirani rast. Isto je dokazano i transplantacijom u majmune (Kriks i sur., 2011.).



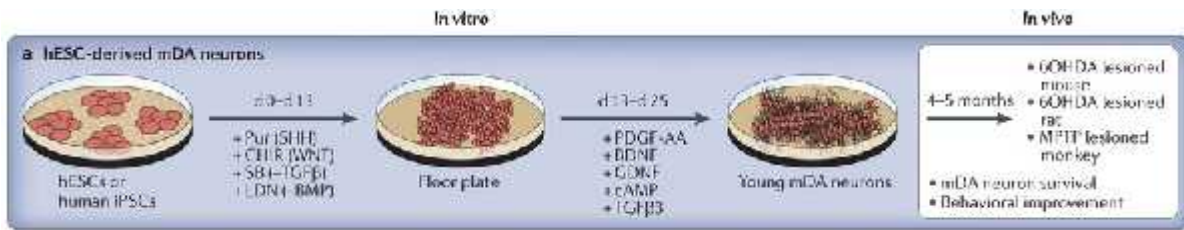
Slika 12. Terapija matičnim stanicama za Parkinsonovu bolest. Parkinsonova bolest dovodi do smrti dopaminergičkih neurona i smanjene inervacije putamena. Embriionalne matične stanice mogle bi se koristiti na dva načina: prvo, diferencijacijom u stanice koje otpuštaju faktore rasta, koje bi štatile postojeće neurone i/ili neurone dobivene iz hEMS; i drugo, diferencijacijom u dopaminergičke neuroblaste i transplantacijom u putamen, gdje bi stvorile nove neurone i ublažavale simptome bolesti.

(Lindvall i sur., 2010.)



Slika 13. Ekspresija markera specifičnih za ljudske dopaminergičke neurone. Ekspresija TH i morfologija transplantata 4,5 mjeseca nakon transplantacije, ekspresija NCAM (plavo), TH (zeleno) i FOXA2 (crveno).

(Kriks i sur., 2011.)

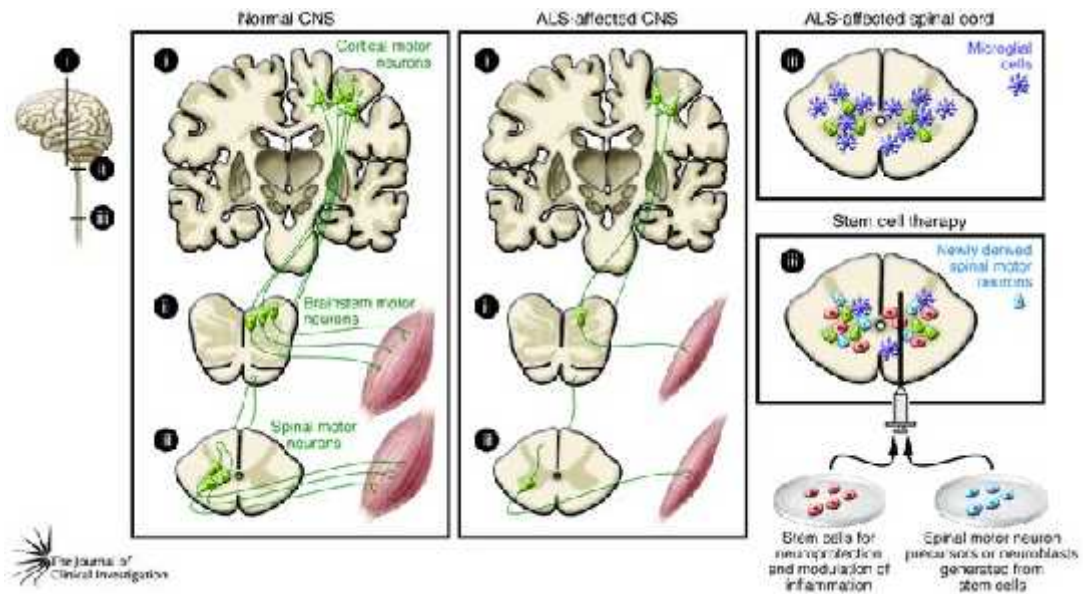


Slika 14. Protokol dobivanja dopaminergičnih neurona iz hEMS preko stanica podne ploče. (Tabar i Studer, 2014)

Iako dopaminergični neuroni dobiveni diferencijacijom iz embrionalnih matičnih stanica mogu preživjeti u animalnim modelima Parkinsonove bolesti, neka osnovna svojstva za potpunu kliničku istraživanja još uvijek nisu dokazana. Ne zna se mogu li takvi neuroni dovesti do znatnije reinervacije, oslobađajući dopamin *in vivo* i značajno smanjiti simptome kod bolesnika. Također, postoji zabrinutost za razvoj tumora nakon transplantacije. Kako pacijenti s Parkinsonovom bolešću imaju normalan životni vijek, ak i mali rizik od tumora neprihvatljiv (Lindvall i sur., 2010.).

3.3.3. Amiotrofična lateralna skleroza (Lou Gehrigova bolest)

Amiotrofična lateralna skleroza je neurodegenerativna bolest koja specifično pogađa motorna neurona u kralježničkoj moždini i moždanom deblu. Većina pacijenata dijagnosticirana s ALS-om nema bolest prisutnu u obitelji, nego je ona rezultat kompleksnih interakcija između gena i okoliša. Rijetki oblici ALS-a povezani su s mutacijom u genu za superoksidnu dismutazu (SOD1) i oni su nasljedni (Rosen i sur., 1993.). ALS uzrokuje atrofiju mišića i paralizu zbog smrti motornih neurona. Kod nasljednog oblika ALS-a smrt motornih neurona najviše izazivaju negativne interakcije između živih stanica u kralježničkoj moždini. Dokazano je da motorna neurona sa SOD1 mutacijom preživljavaju ako su okruženi divljim tipom glia stanica (Clement i sur., 2003.), a da je divlji tip motornih neurona diferenciranih iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica osjetljiv na toksični efekt astrocita koji nose mutaciju (Di Giorgio i sur., 2008.). Ljudske embrionalne matične stanice se uspješno mogu diferencirati u astrocite koji bi se u budućnosti mogli transplantirati u osobe oboljele od ALS-a, te tako usporiti tijekom razvijanja bolesti (<http://www.foxnews.com/scitech/2011/05/23/helper-brain-cells-grown-lab/>). Isto vrijedi i za motorna neurona dobivene diferencijacijom iz hEMS (Patani i sur., 2011.) (Sl. 15.)



Slika 15. Terapija matičnim stanicama za ALS. ALS dovodi do degeneracije motornih neurona u moždanoj kori, moždanom deblu i kralježnici. Embrionalne matične stanice mogle bi se koristiti na dva načina: prvo, diferencijacijom u stanice koje bi oslobodile faktore rasta i štitile motorna neurona; drugo, diferencijacijom u motorna neurona koji bi se transplantirali u oštećena područja kako bi zamijenili oštećene ili mrtve neurone. (Lindvall i sur., 2010.)

Iako se transplantacija motornih neurona dobivenih iz matičnih stanica čini rješenjem za liječenje ALS-a, još su potrebne godine istraživanja kako bi to bilo moguće. Jedan od najvećih problema je kako „natjerati“ motorna neurona transplantirana u kralježnicu moždina da izrastu do mišića gdje bi uzrokovali kontrakciju. Dok se traži odgovor na to pitanje, ali i mnoga druga, vjerojatnije je da će se za terapiju matičnim stanicama koristiti glijalne stanice – mikroglia i astrociti, koji pružaju potporu i zaštitu motornim neuronima (<http://www.alsa.org/research/about-als-research/stem-cells.html>).

3.3.4. Bolesti mrežnice

Embrionalnim matičnim stanicama moglo bi se liječiti više degenerativnih bolesti mrežnice, a posljedice mogu biti i od slabog utjecaja na vid pa do brzog gubitka vida koji završava sljepoćom. U kliničkim ispitivanjima pigmentnih epitelnih stanica dobivenih usmjerenom diferencijacijom iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica dokazano je da, nakon njihove ugradnje, ne dolazi do hiperproliferacije, nenormalnog rasta ili stvaranja tumora, niti izazivaju imunološku transplantacijsku reakciju kod pacijenata. Rezultati su pokazali blago poboljšanje vida kod pacijenata sa Stargardtovom makularnom distrofijom, kao i kod pacijenata sa „suhom“ senilnom degeneracijom makule (Schwartz i sur, 2012.). U tijeku su klinička ispitivanja sigurnosti i djelotvornosti ugradnje pigmentnih epitelnih stanica dobivenih iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica kod pacijenata sa „vlažnom“ senilnom makularnom degeneracijom (<http://clinicaltrials.gov>).

Ljudske EMS mogu se diferencirati u stanice pigmentnog epitela s 99% učinkovitosti (Schwartz i sur, 2012). Takvo napredovanje u istraživanjima je ohrabrujuće za one koji pate od degenerativnih bolesti mrežnice, jer postoji mogućnost vraćanja ili spašavanja vida.

4. ETIKA

Embrionalne matične stanice se dobivaju iz ranog embrija prilikom čega dolazi do njegovog uništavanja, što znači i uništavanje potencijalnog ljudskog života. S druge strane, istraživanja na embrionalnim matičnim stanicama mogu otkriti nove i liječljive bolesti koji bi mogli otkloniti patnje mnogih ljudi. Pitanje ima li predimplantacijski embrio status osobe ili nema uzrokuje velika neslaganja između političara, religijskih grupa, općenito javnosti, ali i dijela znanstvenika.

Protivnici istraživanja na matičnim stanicama uspoređuju uništenje embrija s abortusom. Vjeruju da je embrio živo biće, jer ima mogućnost potpuno se razviti u odraslu osobu te da je nemoralno i neetično uništiti jedan život kako bi se spasio drugi. Dodatni argument protiv istraživanja na embrionalnim matičnim stanicama je činjenica da se danas puno više u terapijama koriste odrasle matične stanice i da zato nema potrebe ni započeti s istraživanjima na embrionalnim.

(<http://www.explorestemcells.co.uk/StemCellControversy.html>)

Zagovornici istraživanja na embrionalnim matičnim stanicama vjeruju da embrio koji još nije implantiran u maternicu nema psihološka, emocionalna ni fizička svojstva koja povezujemo s osobom, zbog čega se mogu koristiti za dobrobit pacijenata koji to jesu (http://www.eurostemcell.org/factsheet/embyronic-stem-cell-research-ethical-dilemma). Dodatni argument za takva istraživanja je da su korišteni embriji ostaci procesa umjetne oplodnje te da se tako koriste u bolje svrhe jer bi inače ionako bili uništeni. Smatraju i da se embriji koji su već uništeni nakon legalnih abortusa trebaju koristiti u takvim istraživanjima s ciljem poboljšanja ljudskih života radije nego da se jednostavno odbace (http://www.explorestemcells.co.uk).

Zbog etičkih pitanja, a i zabrana korištenja embrionalnih matičnih stanica u mnogim zemljama, u tijeku su istraživanja kako usavršiti dobivanje hEMS bez uništavanja embrija. Dosad su otkrivena dva načina: nuklearni transfer (terapijsko kloniranje) i preimplantacijska genetička dijagnoza, opisana u poglavlju 2.

5. ZAKLJUČAK

Otkako su 1998. godine uspješno izolirane iz ljudske blastociste (Thomson i sur, 1998.), embrionalne matične stanice zainteresirale su znanstvenike diljem svijeta. Ove pluripotente stanice imaju sposobnost, pod određenim uvjetima, diferencirati u bilo koju stanicu ljudskog organizma. Zbog tog svojstva bi se, u teoriji, mogle liječiti neurodegenerativne, kardiovaskularne i zapravo, sve bolesti kod kojih dolazi do smanjene funkcionalnosti ili propadanja stanica. Već se godinama provode istraživanja kako bi se embrionalne matične stanice što vjernije diferencirale u zdrave stanice koje bi preživljavale nakon transplantacije i uspješnije zamjenjivale oštećene ili mrtve stanice bolesnika. Od takvih istraživanja na modelnim laboratorijskim životinjama do kliničkih ispitivanja dug je put. Iako su klinička ispitivanja terapije matičnim stanicama za neke bolesti već započela, za većinu ostalih još su u fazi pronalaženja najboljeg protokola za diferencijaciju ili testiranja na modelnim životinjama. Dosadašnji pozitivni rezultati o tome pokazuju da je potrebno ulagati u istraživanja na ljudskim embrionalnim matičnim stanicama, no ona su usporena zbog zakona nekih zemalja koji ograničavaju, ili u potpunosti zabranjuju, dobivanje hEMS iz blastocista. Etička pitanja postavljaju se oko hEMS iz blastocista koje imaju potencijal razviti se u osobu, no to nebi trebao biti problem kod hEMS dobivenih drugim, danas poznatim, metodama u kojima ne dolazi do uništavanja embrija dobivenog spajanjem jajne i spermalne stanice. Istraživanja na hEMS stvaraju nova znanstvena pitanja istom brzinom kojom se dolazi do novih otkrića, što ih čini jednim od najzanimljivijih područja današnje biologije. Svakim novim otkrićem smo korak bliže mogući da se iz hEMS može dobiti bilo koji tip stanica, koje će se uspješno ugraditi i funkcionalno zamijeniti oštećene stanice kod niza bolesti današnjice.

6. LITERATURA

- R. Blelloch, Z. Wang, A. Meissner, S. Pollard, A. Smith, R. Jaenisch, 2006. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* **24**, 2007-2013
- Y. G. Chung, J. H. Eum, J. E. Lee, S. H. Shim, V. Sepilian, S. W. Hong, Y. Lee, N. R. Treff, Y. H. Choi, E. A. Kimbrel, R. E. Dittman, R. Lanza i D. R. Lee, 2014. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell* **14**, 1-4
- A.M. Clement, M.D. Nguyen, E.A. Roberts, M.L. Garcia, S. Boillée, M. Rule, A.P. McMahon, W. Doucette, D. Siwek, R.J. Ferrante, et al., 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* **302**, 113–117
- S. Frantz, 2012. Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses. *Nature Biotechnology* **30**, 12–13
- Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K., 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat. Neurosci* **10**, 608–614.
- K. Hochedlinger, R. Jaenisch, 2003. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *The New England Journal of Medicine* **349**, 275-286
- H. Kawasaki, K. Mizuseki, S. Nishikawa, S. Kaneko, Y. Kuwana, S. Nakanishi, S. I. Nishikawa i Y. Sasai, 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**, 31-40
- S. Kriks, J. Shim, J. Piao, Y. M. Ganat, D. R. Wakeman, Z. Xie, L. Carrillo-Reid, G. Auyeung, C. Antonacci, A. Buch, L. Yang, M. Flint Beal, D. J. Surmeier, J. H. Kordower, V. V. Tabar, L. Studer, 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**, 547-551
- Laurent Lescaudron, J. Rossignol, G. L. Dunbar, 2014, Stem Cells and Neurodegenerative Diseases, U: Stem Cells as a Source for Cell Therapy in Parkinson's Disease., Taylor and Francis Group, LLC, Florida, pp: 8-9

- Olle Lindvall i Zaal Kokaia, 2010. Stem cells in human neurodegenerative disorders – time for clinical translation? *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 29-40
- R. Patani, A. J. Hollins, T. M. Wishart, C. A. Puddifoot, S. Álvarez, A. R. de Lera, D. J. A. Wyllie, D. A. S. Compston, R. A. Pedersen, T. H. Gillingwater, G. E. Hardingham, N. D. Allen & S. Chandran, 2011. Retinoid-independent motor neurogenesis from human embryonic stem cells reveals a medial columnar ground state. *Nature Communications* **214**
- A. L. Perrier, V. Tabar, T. Barberi, M. E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N. L. Harrison i L. Studer, 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *PNAS* **101**, 12543-12548
- A. Rolletschek, P. Blyszczuk, A. M. Wobus, 2003. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects. *Toxicology Letters* **149**, 361-369
- D.R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D.A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J.P. O'Regan, H.X. Deng, et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62
- Schwartz, Hubschman JP, Heilwell G i sur, 2012. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet* **379**, 713 – 720
- V. Tabar, L. Studer, 2014. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nature Reviews Genetics* **15**, 82-92
- M. Tachibana, P. Amato, M. Sparman, N. M. Gutierrez, R. Tippner-Hedges, H. Ma, E. Kang, A. Fulati, H. Lee, H. Sritanandomchai, K. Masterson, J. Larson, D. Eaton, K. Sadler-Fredd, D. Battaglia, D. Lee, D. Wu, J. Jensen, P. Patton, S. Gokhale, R. L. Stouffer, D. Wolf i S. Mitalipov, 2013. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* **153**, 1228-1238
- J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147

M. Yamada, B. Johannesson, I. Sagi, L. Cole Burnett, D. H. Kort, R. W. Prosser, D. Paull, M. W. Nestor, M. Freeby, E. Greenberg, R. S. Goland, R. L. Leibel, S. L. Solomon, N. Benvenisty, M. V. Sauer, 2014. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* **510**, 533-536

Y. Yu, J. Wu, Y. Fan, Z. Lv, X. Guo, C. Zhao, R. Zhou, Z. Zhang, F. Wang, M. Xiao, L. Chen, H. Zhu, W. Chen, M. Lin, J. Liu, Z. Zhou, L. Wang, R. Huo, Q. Zhou, J. Sha, 2009. Evaluation of Blastomere Biopsy Using a Mouse Model Indicates the Potential High Risk of Neurodegenerative Disorders in the Offspring. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**, 1490-1500

<http://www.alsa.org/research/about-als-research/stem-cells.html>

<http://www.bizjournals.com/sanfrancisco/blog/biotech/2013/01/biotime-acquires-stem-cell-assets-geron.html>

<http://circres.ahajournals.org/content/111/3/344/F1.expansion.html>

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01691261?term=%22macular+degeneration%22+and+%22stem+cell%22&rank=4>

<http://en.wikipedia.org>

<http://www.eurostemcell.org>

<http://www.explorestemcells.co.uk>

<http://www.foxnews.com/scitech/2011/05/23/helper-brain-cells-grown-lab/>

<http://humrep.oxfordjournals.org/content/18/3/465.full>

<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/download-stem-cell-figures/>

<http://www.sciencedaily.com/releases/2006/08/060805124158.htm>

<http://www.stembook.org/node/721>

<http://stemcells.nih.gov>

7. SAŽETAK

Embrionalne matične stanice se dobivaju iz unutarnje mase stanica blastociste, preimplantacijskog stanja embrija. One su pluripotentne, što znači da mogu diferencirati u više od 200 tipova stanica ljudskog tijela. Također, pod određenim uvjetima, embrionalne matične stanice se mogu neograničeno dijeliti. Zbog svoje plastičnosti i neograničene sposobnosti samoobnavljanja, embrionalne matične stanice se mogu koristiti u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu nakon ozljede tkiva ili bolesti. Znanstvenici su uspješno dobili oligodendrocitne progenitorske stanice iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica koje bi se mogle koristiti u liječenju ozljeda leđne moždine, dopaminergične neurone za Parkinsonovu bolest, astrocite i motoričke neurone za amiotrofičnu lateralnu bolest i pigmentni epitel za pacijente sa Stargardtovom makularnom distrofijom. Ovi primjeri pokazuju koliko su istraživanja na embrionalnim matičnim stanicama bitna. Uz etička pitanja o terapijama matičnim stanicama, postoje i neki tehnički problemi kao što su imunološka nekompatibilnost i formiranje teratoma. Dobivanjem embrionalnih matičnih stanica terapijskim kloniranjem mogu se riješiti etička pitanja i problem histokompatibilnosti. Ostale potencijalne koristi embrionalnih matičnih stanica podrazumijevaju istraživanja ranog ljudskog razvoja, proučavanje genetički nasljednih bolesti i „in vitro“ toksikološka istraživanja.

8. SUMMARY

Embryonic stem cells are derived from the inner cell mass of a blastocyst, an early-stage preimplantation embryo. They are pluripotent, which means that they are able to differentiate into more than 200 cell types in the adult body. Additionally, under defined conditions, embryonic stem cells are capable of propagating themselves indefinitely. Because of their plasticity and unlimited capacity for self-renewal, embryonic stem cell therapies have been proposed for regenerative medicine and tissue replacement after injury or disease. Scientists successfully derived oligodendrocyte progenitors from human embryonic stem cells that could be used in treating spinal cord injuries, dopamine-producing neurons for Parkinson's disease, astrocytes and motor neurons for amyotrophic lateral disease and retinal pigment epithelium for patients with Stargardt's macular dystrophy. These examples show how important research on embryonic stem cells really are. Besides the ethical concerns of stem cell therapy, there are some technical problems of graft-versus-host disease and forming teratomas. However, ethical problems and graft-versus-host disease can be solved using therapeutic cloning. Other potential uses of embryonic stem cells include investigation of early human development, study of genetic disease and as „in vitro“ systems for toxicology testing.