

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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:322957>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI CI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**EMBRIONALNE MATI NE STANICE
(MOGUĆA ULOGA U LIJEVENJU 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

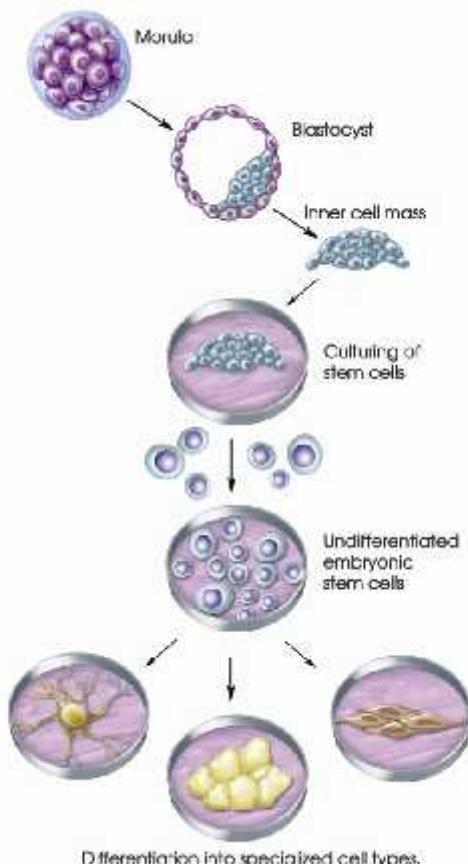
Svaka stanica u našem tijelu sadrži sve gene koji su potrebni za razvoj cijelog ljudskog organizma zato što su sve stanice nastale dijeljenjem prve stanice dobivene spajanjem jajne stanice i spermija. Na putu od prve stanice do cijelog organizma stanice se moraju specijalizirati zbog kompleksnosti zada a koje obavljaju. Danas poznajemo više od 200 različitih tipova stanica. U specijaliziranim stanicama samo su određeni geni aktivni, dok je većina ostalih gena u potpunosti blokirana. Taj proces specijalizacije stanica naziva se diferencijacija. Kada jednom imamo diferencirane stanice (stanice mozga, krvne stanice, jetrenje stanice, miši ne stanice...), one se rijetko ili nikada ne dijele i ne mogu se u životu 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 mogunost samoobnavljanja i što su pluripotentne, predstavljaju zamjenske stanice bilo kojem tipu stanica ljudskog organizma.

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

2. DOBIVANJE I UZGOJ EMBRIONALNIH MATI NIH STANICA U LABORATORIJU

Embrionalne mati ne 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 embryo, a vanjski sloj stanica, ili trofoblast, iz kojeg se razvija placenta. Trofoblast okružuje embrioblast i šupljinu ispunjenu tekućinom, blastocel. Zbog eti kih razloga (opisanih u poglavlju Etika), u većini zemalja se ne izvode „in vitro“ oplodnje kako bi se dobile blastociste za uzgoj embrionalnih mati nih 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>).



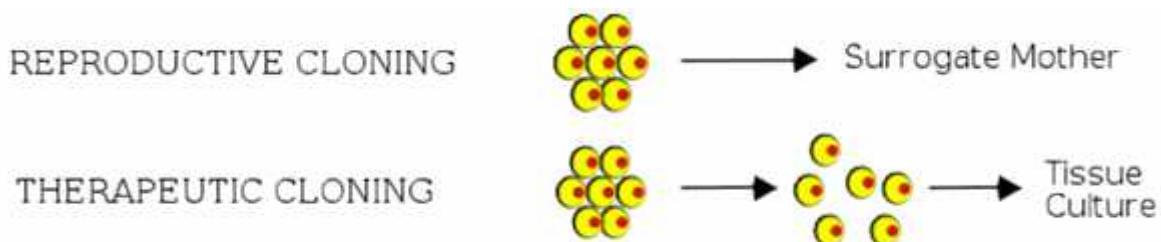
Slika 1. Dobivanje embrionalnih mati nih stanica iz blastocista i njihova diferencijacija.
(<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/>)

2.1. „In vitro“ oplodnja

Najveći izvor embrionalnih matnih stanica su klinike za umjetnu oplodnju. Tijekom samog procesa veći broj jajačaca 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 matnih stanica za znanstvena istraživanja potreban je pismeni pristanak donora. (<http://nasites.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).



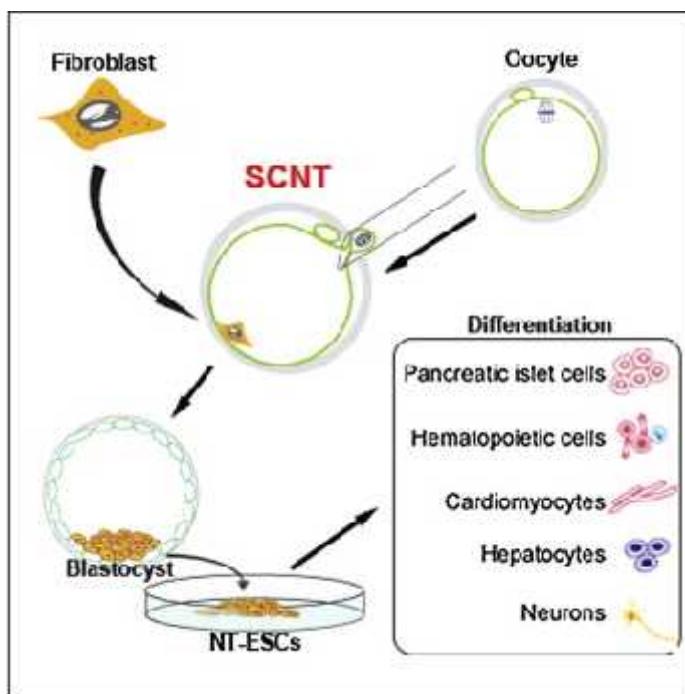
Slika 2. Razlika između reproduktivnog i terapijskog kloniranja

(http://en.wikipedia.org/wiki/Somatic-cell_nuclear_transfer)

Ljudske embrionalne matne stanice su dobivene iz blastociste nastale transferom jezgre fibroblasta u jajnu stanicu (Sl. 3.). Stanice pokazuju normalan kariotip, nasljedujući cijeli genom iz roditeljske somatske stanice te je njihova genska ekspresija slična onoj kod hEMSC 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 uspjeli 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 genetika dijagnoza

To je tehnika kojom se uklanja jedna blastomera iz 8-stani nog stadija embrija (Sl. 4.). Znanstvenici mogu uzgojiti liniju embrionalnih matih stanice iz jedne stanice, a embryo ostaje nedirnut i ima mogunost 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 povlači niz etičkih pitanja, jer se izolacijom blastomere može oštetiti embryo. 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>).

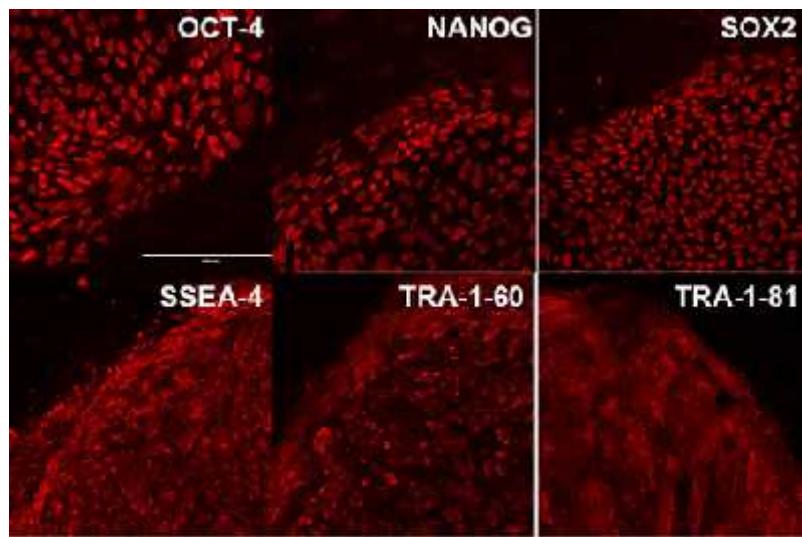
Tablica 1. Usporedba različitih izvora ljudskih embrionalnih matičnih stanica.

(prilagođeno prema <http://nas-sites.org/stemcells/>)

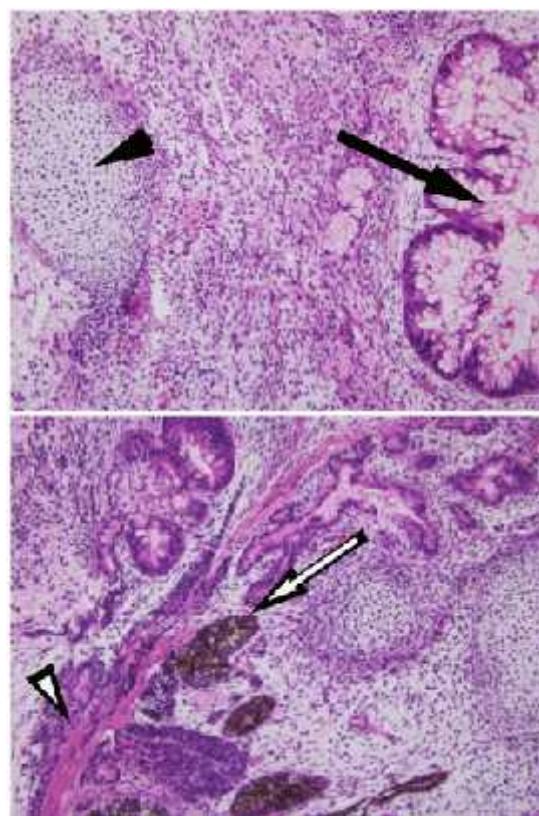
	„In vitro“ oplodnja	Nuklearni transfer	Preimplantacijska genetska dijagnoza
			
prednosti	<ul style="list-style-type: none"> Mogu stvoriti sve tipove stanica Relativno lagano za izolirati, održavati i uzbajati u laboratoriju Velik broj „viška“ blastocista iz klinika 	<ul style="list-style-type: none"> Mogu stvoriti sve tipove stanica Relativno lagano za izolirati, održavati i uzbajati u laboratoriju Stanice su genetički identične pacijentu 	<ul style="list-style-type: none"> Mogu stvoriti sve tipove stanica Relativno lagano za izolirati, održavati i uzbajati u laboratoriju Blastocista preživljava
nedostatci	<ul style="list-style-type: none"> Ograničen broj staničnih 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 doći do oštete 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 mati ne stanice se nasa uju na plasti ne laboratorijske posude u kojima se nalazi odgovaraju i 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 mati ne stanice mogu prihvati te osloba aju nutrijente u medij. Takav proces dobivanja stani ne linije se dosad pokazao neu inkovit, ali kad se jednom uspije, iz po etne populacije stanica mogu nastati milijuni novih embrionalnih mati nih stanica.

Kako bi bili sigurni da se radi upravo u embrionalnim mati nim stanicama, tijekom uzgoja stani nih linija provodi se karakterizacija. Takvi testovi podrazumijevaju: 1) rast i supkultiviranje mati nih stanica više mjeseci, što dokazuje jesu li stanice sposobne za rast i samoobnavljanje, 2) prouavanje samog izgleda stanica kroz mikroskop, 3) dokazivanje prisustva transkripcijskih faktora koje obično proizvode nediferencirane stanice (me u najpoznatijim transkripcijskim faktorima su Nanog i Oct4, koji su zaslužni za održavanje mati nih stanica u nediferenciranom obliku (Sl. 5.)), 4) dokazivanje prisustva specifičnih površinskih markera za nediferencirane stanice, 5) prouavanje 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 mati ne stanice pluripotentne dopuštanjem da stanice spontano diferenciraju u stani noj kulturi, manipuliranjem stanica 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/>)

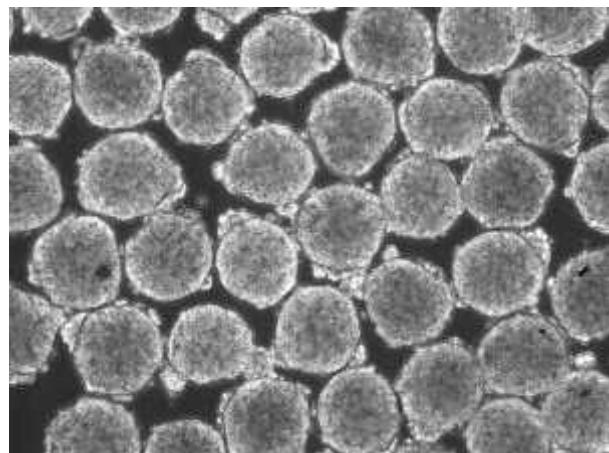


Slika 5. Standardni markeri pluripotencije vizualizirani imunocitokemijski s antitijelima protiv OCT4, NANOG, SOX2, SSEA-4, TRA-1-60, i TRA-1-81.
 (Tachibana i sur., 2013.)



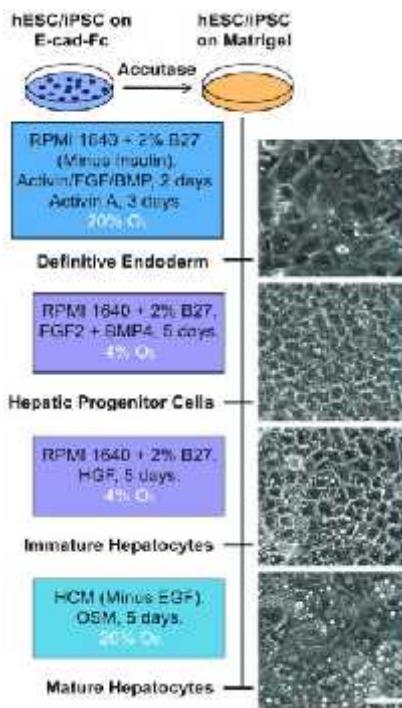
Slika 6. Histološka analiza teratoma nastalog nakon injektiranja hEMS u miša. Strelica i glava strelice na gornjoj slici pokazuju probavni epitel s vrastim stanicama (endoderm) i hrskavicu (mezoderm). Strelica i glava strelice na donjoj slici prikazuju neuroektodermalno (ektoderm) i miši no (mezoderm) tkivo. Povećanje x200
 (Tachibana i sur., 2013.).

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



Slika 7. Embrioidna tjelešca

(www.eurostemcell.org)



Slika 8. Primjer protokola usmjerenje diferencijacije embrionalnih mati nih stanica u hepatocite.

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



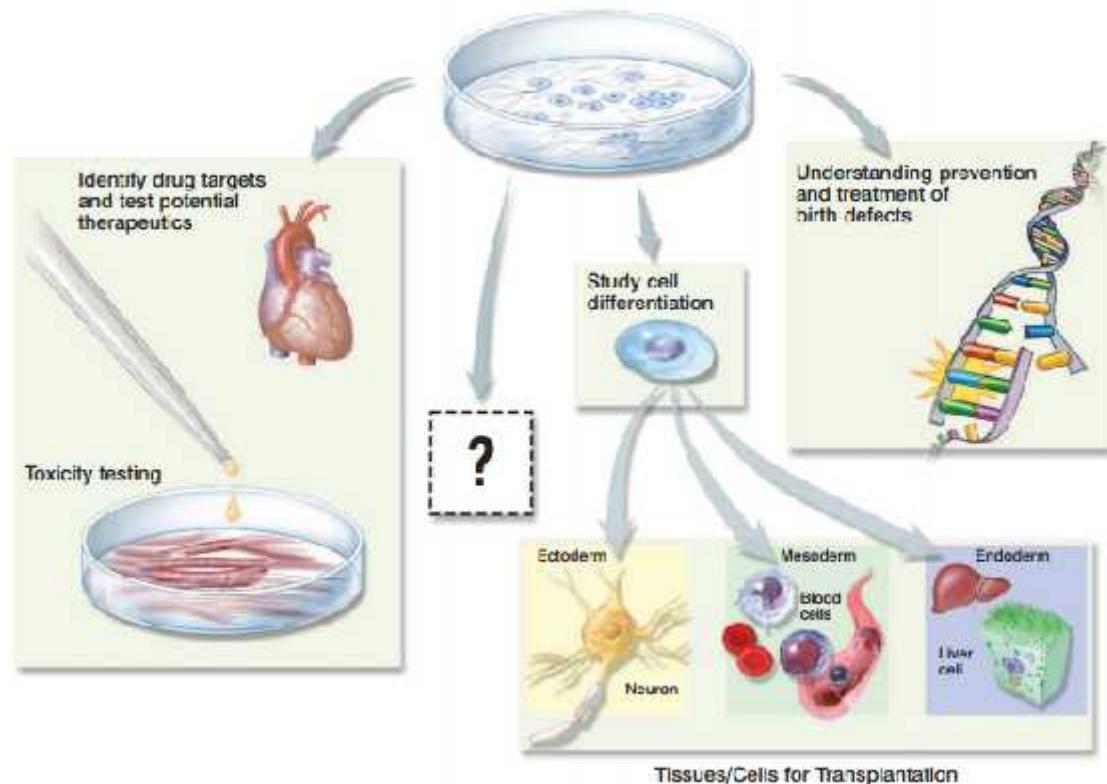
Slika 9. Primjer protokola usmjerenje diferencijacije embrionalnih mati nih stanica u kardiomiocite.

(<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 liječenju bolesti (Sl. 10.). Istraživanja hEMS daju informacije o kompleksnim događajima do kojih dolazi tijekom ljudskog razvoja. Osnovni cilj je otkriti kako nediferencirane mati ne stanicice 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 radi genima i u kojem trenutku razvoja (<http://stemcells.nih.gov>). Neka od najozbiljnijih medicinskih stanja, kao što su rak i kongenitalni poremećaji, posljedica su nenormalne diobe stanica i diferencijacije. Bolje razumijevanje genetičke 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 testiranje citotoksičnosti lijekova, istraživanja ljudskog razvoja kako bi se bolje razumjeli genetski poremećaji 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 mati ne stanice i specijalizirane somatske stanice u koje su se hEMS diferencirale „in vitro“ (kao što su kardiomiocite, dopaminergi ki neuroni ili beta stanice Langerhansovih oto i a) koriste se za testiranje potencijalne citotoksi nosti lijekova i ksenobiotika (Rolletschek i sur, 2013.). Veina lijekova testira se na laboratorijskim životinjama, no zbog razlika izme u vrsta ne može se sa sigurnoš u znati da oni nemaju toksi ne u inke na ljudske stanice. Ovakvim testovima se može otkriti je li novi lijek siguran za ljudske stanice i prije nego se kreće koristiti u klini kim istraživanjima, što ubrzava proces otkrivanja lijekova i vodi do sigurnijih i efektivnijih lije enja bolesti.

3.3. REGENERATIVNA MEDICINA

Vjerojatno najve i potencijal ljudskih embrionalnih mati nih stanica je dobivanje stanica i tkiva koja se mogu koristiti u regenerativnoj medicini. Danas se donirani organi i tkiva esto koriste kako bi zamjenili ona ošte ena, ali je potreba za transplantatima puno ve a nego što ih ima. Mati ne stanice, usmjerene u diferencijaciju u specifi ne tipove stanice, daju neiscrpan izvor zamjenskih stanica i tkiva za lije enje raznih bolesti, a neke od najistaknutijih su: ozljede le ne moždine, Parkinsonova bolest, ALS i bolesti mrežnice (<http://stemcells.nih.gov>).

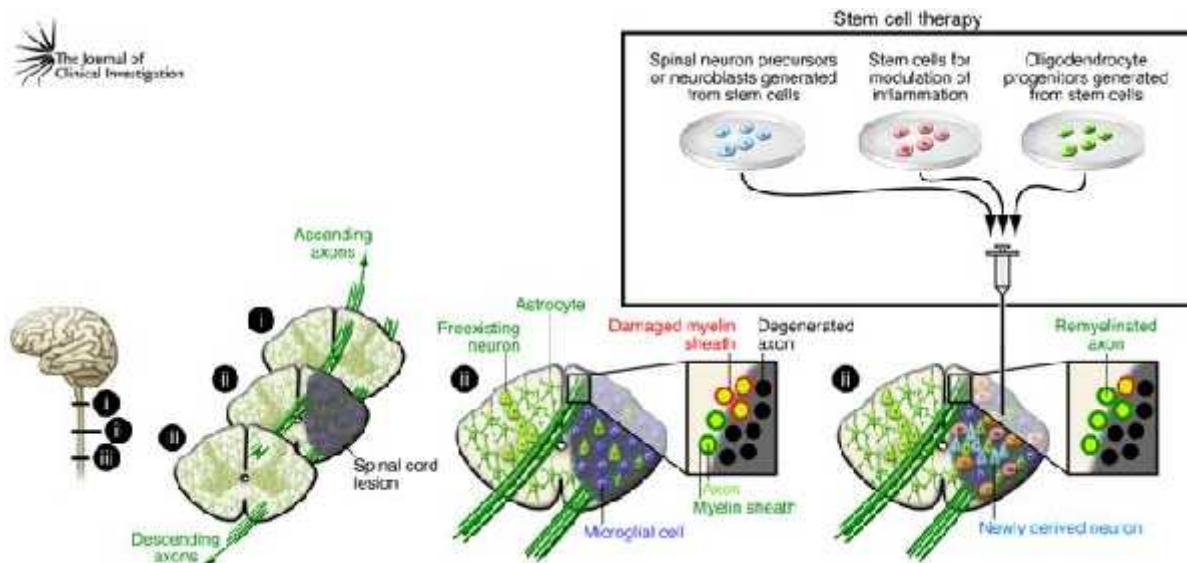
3.3.1.Ozljede le ne moždine

Ozljeda le ne moždine dovodi do trenutne ili trajne promjene u njenoj motori koj, osjetilnoj ili autonomnoj funkciji. Naj eš i uzroci ozljede su traume zadobivene u automobilskim nesre ema, padovima i sportskim ozljedama. Patološke promjene nakon ozljede le ne moždine su kompleksne i uklju uju 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 mati nih mogu na razli ite na ine koristiti kao terapija za ozljede le ne moždine: 1) tako da zamjenjuju živ ane stanice koje su uništene kao posljedica

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

(Sl. 11.).



Slika 11. Terapija mati nim stanicama za ozljede le ne moždine. Embrionalne mati ne stanice mogle bi se koristiti za lije enje pacijenata na više na ina: prvo, transplantacijom neuroblastova dobivenih iz hEMSC koji bi zamijenili ošte ene ili mrtve motori ke neurone; drugo, transplantacijom oligodendrocitnih progenitorskih stanica koji bi pomogli remyelinizaciji; tre e, transplantacijom stanica koje bi osloba ale razli ite faktore za utišavanje upale.

(Lindvall i Kokaia, 2010.)

Prvo klini ko ispitivanje ljudskih embrionalnih mati nih stanica zapo elo je 2009. godine, u kojem su se transplantirale oligodendrocitne progenitorske stanice u pacijente s ozljedama le ne moždine razli ite ja ine, ne starije od 14 dana. Ovo je ispitivanje prekinuto 2011. godine zbog finansijskih problema tvrtke (Frantz, 2012.), a nastavilo se 2013. vo eno novom tvrtkom (<http://www.bizjournals.com/sanfrancisco/blog/biotech/2013/01/biotime-acquires-stem-cell-assets-geron.html>).

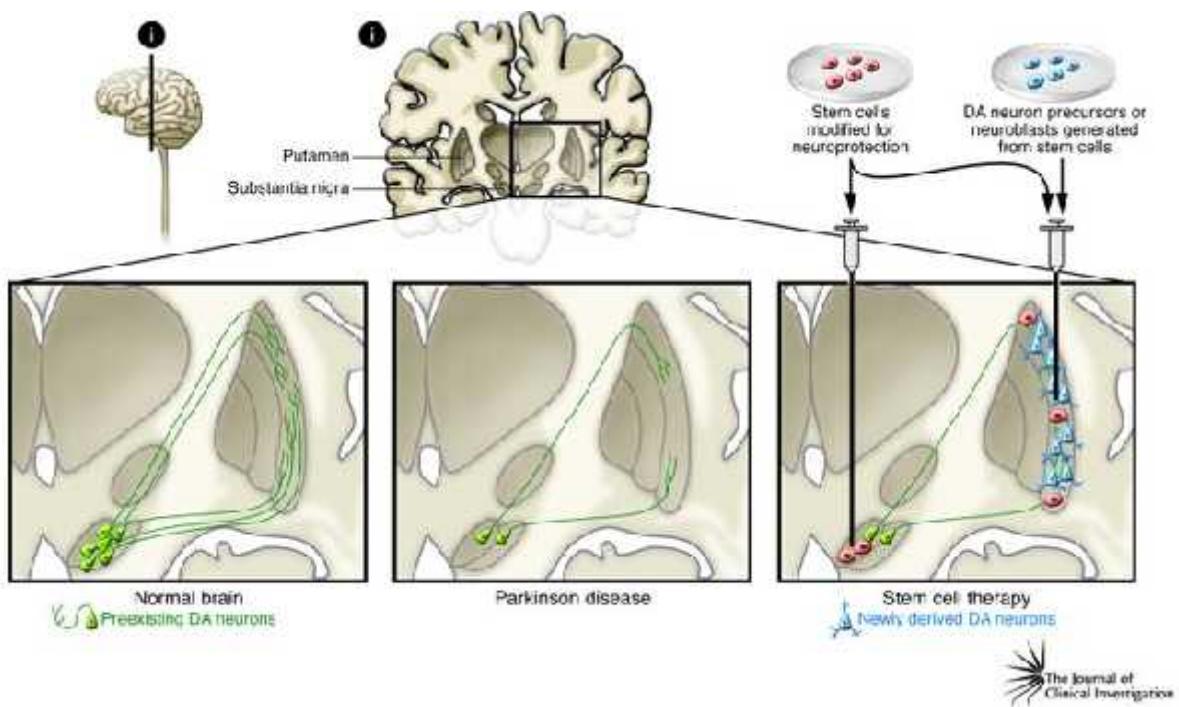
Potencijalna korist terapije mati nim stanicama je izvanredna, jer bi jednog dana moglo do i do lije enja, kao što se dosad mislilo, nepovratnih ozljeda kralježnice. Istraživanja su pokazala da, kod laboratorijskih životinja, injekcije mati nih stanica imaju pozitivni efekt

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

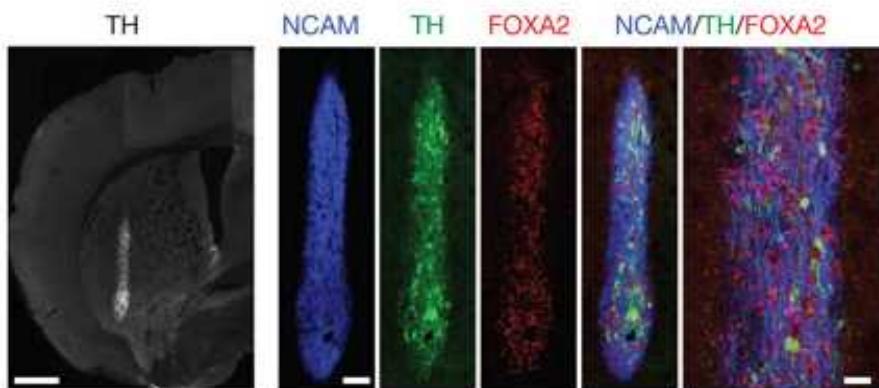
Parkinsonova bolest, druga naj eš a progresivna neurodegenerativna bolest povezana sa staroš u, karakterizirana je gubitkom dopaminergi nih neurona, stvaranjem unutarstani nih inkluzija agregiranih proteina i upalom. Najistaknutiji simptomi bolesti su drhtanje, uko enost, usporenost pokreta, slaba ravnoteža i smetnje u kretanju. Kako simptomi napreduju, javljaju se poteško e u hodanju, pri anju i obavljanju jednostavnih radnji. Dopaminski agonisti, L-dopa, inhibitori enzima i duboka stimulacija mozga se koriste za ublažavanje simptoma bolesti, ali njihova je u inkovitost ograni ena (Lindvall i Kokaia, 2010.).

Embrionalne mati ne stanice predstavljaju potencijal u lije enju Parkinsonove bolesti, jer se mogu uspješno diferencirati u dopaminergi ne neurone (Kawasaki i sur., 2000.) (Sl. 12.), koji pokazuju sva svojstva dopaminergi nih neurona srednjeg mozga (Kim i sur., 2002.). Postoje tri glavna protokola za proizvodnju dopaminergi nih 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 dopaminergi nih neurona koji se uspješno usa uju in vivo, hEMS se prvo diferencijaju u stanice podne plo e (Sl. 14.). Tako dobiveni dopaminergi ni neuroni, nakon transplantacije u miševe i štakore, pokazuju visoko preživljenje, uzrokuju poboljšanje u pokretanja prednjih udova i ne pokazuju nekontrolirani rast. Isto je dokazano i transplantacijom u majmune (Kriks i sur., 2011.).



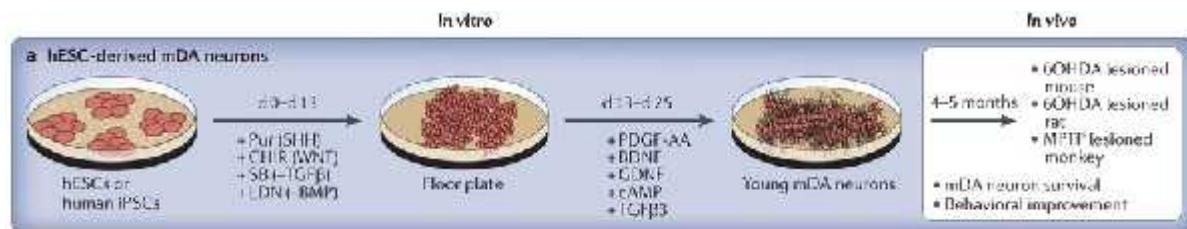
Slika 12. Terapija mati nim stanicama za Parkinsonovu bolest. Parkinsonova bolest dovodi do smrti dopaminergi nih neurona i smanjene inervacije putamena. Embrialne mati ne stanice mogle bi se koristiti na dva na ina: prvo, diferencijacijom u stanice koje otpuštaju faktore rasta, koje bi štitile postoje e neurone i/ili neurone dobivene iz hEMSC; i drugo, diferencijacijom u dopaminergi ne neuroblaste i transplantacijom u putamen, gdje bi stvorile nove neurone i ublažavale simptome bolesti.

(Lindvall i sur., 2010.)



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

(Kriks i sur., 2011.)

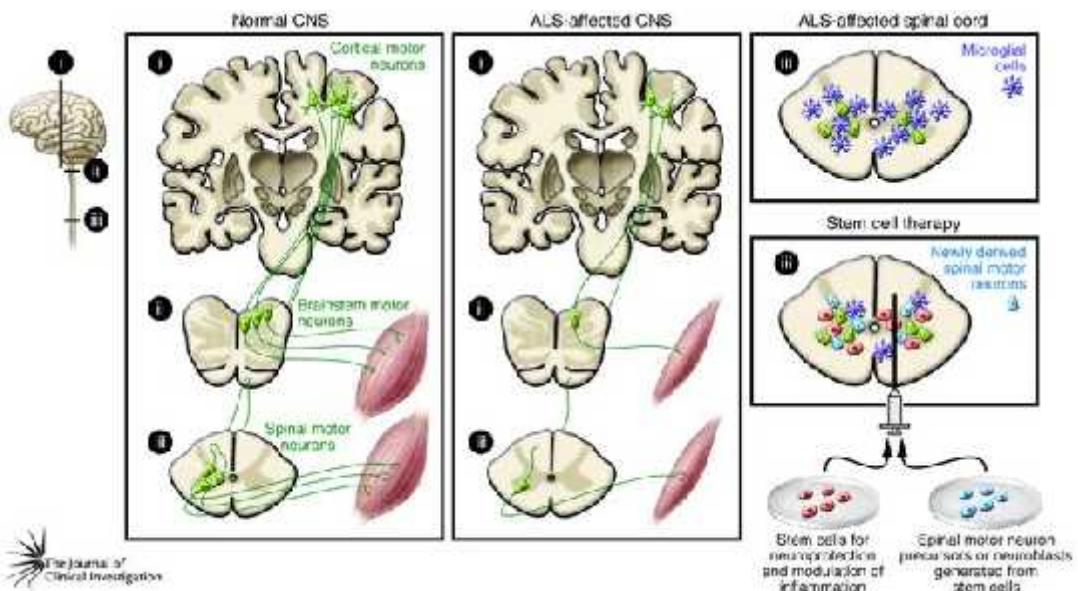


Slika 14. Protokol dobivanja dopaminergičnih neurona iz hEMSC preko stanica podne ploče.
(Tabar i Studer, 2014)

Iako dopaminergični neuroni dobiveni diferencijacijom iz embrionalnih mati nih stanica mogu preživjeti u animalnim modelima Parkinsonove bolesti, neka osnovna svojsta za početak kliničkih istraživanja još uvek nisu dokazana. Ne zna se mogu li takvi neuroni dovesti do znatnije reinervacije, oslobaći dopamin in vivo i značajno smanjiti simptome kod bolesnika. Tako je, postoje zabrinutosti za razvoj tumora nakon transplantacije. Kako pacijenti s Parkinsonovom bolesti u imaju normalan životni vijek, ak je i mali rizik od tumora neprihvatljiv (Lindvall i sur., 2010.).

3.3.3. Amiotrofična lateralna skleroza (Lou Gehrigova bolest)

Amitrofična lateralna skleroza je neurodegenerativna bolest koja specifično pogodi motorne neurone u kralježni 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 smrт motornih neurona najviše izazivaju negativne interakcije između živanih stanica u kralježni moždini. Dokazano je da motorni neuroni sa SOD1 mutacijom preživljavaju ako su okruženi divljim tipom glija stanica (Clement i sur., 2003.), a da je divlji tip motornih neurona diferenciranih iz ljudskih embrionalnih mati nih stanica osjetljiv na toksični efekt astrocita koji nose mutaciju (Di Giorgio i sur., 2008.). Ljudske embrionalne mati nih stanice se uspješno mogu diferencirati u astrocite koji bi se u budućnosti mogli transplantirati u osobe oboljele od ALS-a, te tako usporiti tijek razvijanja bolesti (<http://www.foxnews.com/scitech/2011/05/23/helper-brain-cells-grown-lab/>). Isto vrijedi i za motorne neurone dobivene diferencijacijom iz hEMSC (Patani i sur., 2011.) (Sl. 15.)



Slika 15. Terapija mati nih stanicama za ALS. ALS dovodi do degeneracije motori kih neurona u moždanoj kori, moždanom deblu i kralježni koj moždini. Embrionalne mati ne stanice mogle bi se koristiti na dva na ina: prvo, diferencijacijom u stanice koje bi osloba ale faktore rasta i štitile motori ke neurone; drugo, diferencijacijom u motori ke neuroblaste koji bi se transplantirani u ošte ena podru ja kako bi zamijenili ošte eni ili mrtvi neuron.

(Lindvall i sur., 2010.)

Iako se transplantacija motori kih neurona dobivenih iz mati nih stanica ini rješenjem za lije enje ALS-a, još su potrebne godine istraživanja kako bi to bilo mogu e. Jedan od najve ih problema je kako „natjerati“ motori ke neurone transplantirane u kralježni nu moždinu da izrastu do miši a gdje bi uzrokovali kontrakciju. Dok se traži odgovor na to pitanje, ali i mnoga druga, vjerojatnije je da e se za terapiju mati nih stanicama koristiti glija stanice – mikroglija i astrociti, koji pružaju potporu i zaštitu motori kim neuronima (<http://www.alsa.org/research/about-als-research/stem-cells.html>).

3.3.4. Bolesti mrežnice

Embrionalnim mati nim stanicama moglo bi se lije iti više degenerativnih bolesti mrežnica, ije posljedice mogu i i od slabog utjecaja na vid pa do brzog gubitka vida koji završava sljepo om. U klini kim ispitivanjima pigmentnih epitelnih stanica dobivenih usmjerrenom diferencijacijom iz ljudskih embrionalnih mati nih 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 pacijanata sa Stargardtovom makularnom distrofijom, kao i kod pacijenacta sa „suhom“ senilnom degeneracijom makule (Schwartz i sur, 2012.). U tijeku su klini ka ispitivanja sigurnosti i djelotvornosti ugra ivanja pigmentnih epitelnih stanica dobivenih iz ljudskih embrionalnih mati nih stanica kod pacijenata sa „vlažnom“ senilnom makularnom degeneracijom (<http://clinicaltrials.gov>).

Ljudske EMS mogu se diferencirati u stanice pigmentnog epitela s 99% u inkovitoš u (Schwartz i sur, 2012). Takvo napredovanje u istraživanjima je ohrabruju e za one koji pate od degenerativnih bolesti mrežnice, jer postoji mogu nost vra anja ili spašavanja vida.

4. ETIKA

Embrionalne mati ne stanice se dobivaju iz ranog embrija prilikom ega dolazi do njegovog uništavanja, što zna i uništavanje potencijalnog ljudskog života. S druge strane, istraživanja na embrionalnim mati nim stanicama mogu otkriti nove na ine lije enja bolesti koji bi mogli otkloniti patnje mnogih ljudi. Pitanje ima li preimplantacijski embryo status osobe ili nema uzrokuje velika neslaganja izme u politi ara, religijskih grupa, op enito javnosti, ali i dijela znanstvenika.

Protivnici istraživanja na mati nim stanicama uspore uju uništenje embrija s abortusom. Vjeruju da je embryo živo bi e, jer ima mogu nost potpuno se razviti u odraslu osobu te da je nemoralno i neeti no uništiti jedan život kako bi se spasio drugi. Dodatni argument protiv istraživanja na embrionalnim mati nim stanicama je injenica da se danas puno više u terapijama koriste odrasle mati ne stanice i da zato nema potrebe ni zapo injati s istraživanjima na embrionalnim.

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

Zagovornici istraživanja na embrionalnim mati nim stanicama vjeruju da embryo koji još nije implantiran u maternicu nema psihološka, emocionalna ni fizi ka svojstva koja povezujemo s osobom, zbog ega se mogu koristiti za dobrobit pacijenata koji to jesu (<http://www.eurostemcell.org/factsheet/embryonic-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 ina e ionako bili uništeni. Smatraju i da se embriji koji su ve 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 eti kih pitanja, a i zabrana korištenja embrionalnih mati nih stanica u mnogim zemljama, u tijeku su istraživanja kako usavršiti dobivanje hEMS bez uništavanja embrija. Dosad su otkrivena dva na ina: nuklearni transfer (terapijsko kloniranje) i preimplantacijska geneti ka dijagnoza, opisana u poglavljju 2.

5. ZAKLJU AK

Otkako su 1998. godine uspješno izolirane iz ljudske blastociste (Thomson i sur, 1998.), embrionalne mati ne stanice zainteresirale su znanstvenike diljem svijeta. Ove pluripotentne stanice imaju sposobnost, pod odre enim uvjetima, diferencirati u bilo koju stanicu ljudskog organizma. Zbog tog svojstva bi se, u teoriji, mogle lijeiti neurodegenerativne, kardiovaskularne i zapravo, sve bolesti kod kojih dolazi do smanjene funkcionalnosti ili propadanja stanica. Ve se godinama provode istraživanja kako bi se embrionalne mati ne stanice što vjernije diferencirale u zdrave stanice koje bi preživljavale nakon transplantacije i uspješnije zamjenjivale ošte ene ili mrtve stanice bolesnika. Od takvih istraživanja na modelnim laboratorijskim životinjama do kliničkih ispitivanja dug je put. Iako su klinička ispitivanja terapije mati nim stanicama za neke bolesti već započele, 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 mati nim stanicama, no ona su usporena zbog zakona nekih zamalja koji ograničavaju, ili u potpunosti zabranjuju, dobivanje hEMSC iz blastocista. Etička pitanja postavljaju se oko hEMSC iz blastocista koje imaju potencijal razviti se u osobu, no to ne bi trebao biti problem kod hEMSC dobivenih drugim, danas poznatim, metodama u kojima ne dolazi do uništavanja embrija dobivenog spajanjem jajne i spermialne stanice. Istraživanja na hEMSC stvaraju nova znanstvena pitanja istom brzinom kojom se dolazi do novih otkrića, što ih čini jednim od najzanimljivih područja današnje biologije. Svakim novim otkrićem smo korak bliže mogućiosti da se iz hEMSC može dobiti bilo koji tip stanica, koje će se uspješno ugraditi i funkcionalno zamijeniti ošte ene 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. Blysaczuk, 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. Sritanaudomchai, 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 mati ne stanice se dobivaju iz unutarnje mase stanica blastociste, preimplantacijskog stanja embrija. One su pluripotentne, što zna i da mogu diferencirati u više od 200 tipova stanica ljudskog tijela. Tako er, pod odre enim uvjetima, embrionalne mati ne stanice se mogu neograni eno dijeliti. Zbog svoje plasti nosti i neograni ene sposobnosti samoobnavljanja, embrionalne mati ne stanice se mogu koristiti u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu nakon ozljede tkiva ili bolesti. Znanstvenici su uspješno dobili oligodendrocytne progenitorske stanice iz ljudskih embrionalnih mati nih stanica koje bi se mogle koristiti u lije enju ozljeda le ne moždine, dopaminergi ne neurone za Parkinsonovu bolest, astrocite i motori ke neurone za amiotrofi nu lateralnu bolest i pigmentni epitel za pacijente sa Stargardtovom makularnom distrofijom. Ovi primjeri pokazuju koliko su istraživanja na embrionalnim mati nim stanicama bitna. Uz eti ka pitanja o terapijama mati nim stanicama, postoje i neki tehni ki problemi kao što su imunološka nekompatibilnost i formiranje teratoma. Dobivanjem embrionalnih mati nih stanica terapijskim kloniranjem mogu se riješiti eti ka pitanja i problem histokompatibilnosti. Ostale potencijalne koristi embrionalnih mati nih stanica podrazumijevaju istraživanja ranog ljudskog razvoja, prou avanje geneti ki 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 sclerosis 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.