

## NASTAVNI TEKST

# Embrionalne matične stanice

**Prvi dio: Od kuda se dobivaju, kako se uzgajaju i što sve od njih može nastati**

Autor: **Prof. dr. sc. Srećko Gajović**

Katedra za histologiju i embriologiju

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Kada je 1981. godine uspostavljena prva kultura embrionalnih matičnih stanica, vjerojatno, niti sami istraživači, Martin Evans i Matthew Kaufman (slika 1), nisu zamišljali koliko će značenje danas imati njihovo otkriće, a pogotovo kolika će biti očekivanja od embrionalnih matičnih stanica u budućnosti. Sada, 28 godina poslije, one su tema oko koje se opredjeljuju predsjednički kandidati, a etički i zakonski okvir njihove primjene izgubio je obilježje znanstvene ekskluzivnosti i postao pitanje o kojem raspravlja svaki građanin. Dok se Matthew Kaufman nastavio baviti nekim drugim znanstvenim pitanjima embrionalnog razvoja miša, koja su tada bila više atraktivna, Douglas Melton, suvoditelj Harvardskog instituta za matične stanice, izabran je po izboru časopisa Time među 100 najutjecajnijih ljudi na svijetu u 2007. i ponovo u 2009. godini. On je usprkos zakonskoj zabrani državnog financiranja uspio pridobiti privatne izvore financija za izolaciju novih linija ljudskih embrionalnih matičnih stanica koje je bez naknade, ustupio za daljnja istraživanja znanstvenicima diljem svijeta. Stoga, želja časopisa Medicinar da se osmisli ovaj nastavni tekst ne oslikava samo stručnu potrebu studenata medicine, već i nužnost da se, upravo u ovom trenutku, spoje i prikažu stara i nova znanja i potakne studente za daljnje praćenje i razumijevanje činjenica za koje očekujemo da će biti od velike važnosti u njihovom budućem radu za dobrobit oboljelih kojima će pružati liječničku pomoć.

### Što su matične stanice?

Svakoga dana naše tijelo gubi veliku količinu stanica koje moraju biti nadomještene novima. Potreba za novim stanicama osobito je izražena ako dolazi do dodatnog gubitka stanica zbog ozljede ili bolesti, kada to nadomještanje izgubljenih stanica nazivamo cijeljenjem ili obnovom (regeneracijom). Dio takvih stanica može se nadomjestiti diobom susjednih stanica koje su izvršavale istu



Slika 1. Matthew Kaufman, koji je zajedno s Martinom Evansom prvi uspostavio kulturu mišjih embrionalnih matičnih stanica. Iz Cambridgea se odselio u Edinburgh, gdje je kao profesor anatomije objavio jedan od dva najbolja atlasa razvoja mišjeg zametka. Danas je u mirovini. Fotografiju sam snimio 21. listopada 1994. u Strasbourgu u Francuskoj.

ulogu kao izgubljene stanice (npr. jetrene stanice svojim diobama nadomještaju oštećene). Međutim, u većini slučajeva naše tijelo koristi skupinu stanica koje nisu bile djelatne, već su spremne to tek postati i koje u udžbenicima (npr. histologije) često nazivamo nediferenciranim stanicama (npr. nediferencirana mezenhimska stanica kao važna stanica vezivnog tkiva), koje u skladu s novim spoznajama opravdano označavamo kao matične stanice.

Matične stanice zadovoljavaju dva svojstva: prvo je da one same ne vrše nikakvu djelatnu ulogu u organizmu, ali su se sposobne pretvoriti (diferencirati) u djelatne stanice (npr. eritrocite, žljezdane stanice, mišićne stanice). Drugo svojstvo matičnih stanica je sposobnost samoobnavljanja, jer one osim stvaranja djelatnih stanica, moraju zadržati i mogućnost stvaranja novih matičnih stanica koje se mogu ponovno iskoristiti u slučaju potrebe. Matične stanice nužne su za normalno funkcioniranje odrasle osobe. Neke od njih se ubrzano dijele, jer moraju zadovoljiti svakodnevnu potrebu za novim djelatnim stanicama (npr. krvotvorne matične stanice), dok druge miruju u tkivu i bit će potaknute na diferencijaciju samo po potrebi (npr. satelitske stanice u mišićnom tkivu). Matične stanice su pogotovo važne tijekom embrionalnog razvoja kada od nediferenciranih stanica nastaju nove djelatne stanice novog organizma. Diferencijacija obuhvaća niz promjena u kojima stanica postupno dobiva svoj identitet, prilagođava svoju građu i konačno počinje izvršavati svoju djelatnu ulogu. Stoga, postoji vrlo složena hijerarhija matičnih stanica određena postupnošću diferencijacije, koja je istovremeno praćena ograničavanjem mogućnosti navedenih stanica. Primjerice, od krvotvornih matičnih stanica mogu nastati sve krvne stanice, ali od eritroblasta samo eritrociti. Razlikujemo pluripotentne matične stanice od kojih mogu nastajati razne vrste stanica, prastanice (progenitorne stanice, npr. koštane prastanice ili osteoprogenitorne stanice) koje su se već ograničile u jednu vrstu stanica i preteče (prekursore, npr. retikulociti) koji su samo predstadij završne diferencijacije.

### Koje stanice su svemoćne?

Postoji li stanica od koje mogu nastati sve stanice našeg tijela? Naravno, odgovor je vrlo jednostavan, to je oplođena jajna stanica. Zanimljivo je da na samom početku embrionalnog razvoja postoji još cijeli niz stanica koje nastaju od oplođene jajne stanice i od kojih mogu nastati sve stanice našeg tijela. Te stanice nazivamo *totipotentne* ili *omnipotentne* (hrv. svemoćne), jer od njih mogu nastati sve stanice našeg tijela. One imaju veće mogućnosti od pluripotentnih, od kojih može nastati mnogo vrsta različitih stanica (ali ne sve).

Koje su to stanice koje tijekom embrionalnog razvoja imaju svojstvo totipotencije? Kako bi odgovorili na ovo pitanje, moramo razumjeti da neposredni zadatak oplođene jajne stanice nije stvaranje tijela zametka, već postoje neke zadaće koje se moraju izvršiti prije tog koraka i koje ispunjavaju uvjete potrebne za početak oblikovanja tijela zametka. Četiri su osnovne zadaće koje prethode njegovom oblikovanju.

Prva se osniva na činjenici da oplođena jajna stanica ima samo jednu kopiju genoma, genetske upute koje će biti osnova za embrionalni razvoj i cijeli život jedinke. Zato, prvi korak embrionalnog razvoja čini *brazdanje*, niz uzastopnih staničnih dioba koji u najkraćem mogućem roku umnožava genetsku uputu. Nastale stanice su male kuglice (*blastomere*) koje zbog svog oblika imaju male plohe dodira sa susjednim blastomerama. Sljedeća, druga osnovna zadaća zametka naziva se *kompakcija* kojom blastomere promijene svoj oblik, te tako nastaje neprekinuti sloj epitelnih stanica koji odjeljuje unutrašnjost zametka od njegove

okoline. Tim je omogućeno da se u unutrašnjosti zametka mogu odvijati neka događanja odvojena od utjecaja okoline, a prvo je takvo događanje nakupljanje tekućine i nastanak kuglaste tvorbe koja se zove *blastocista*, koja je sposobna odraditi treći važni zadatak, *implantaciju*. Stanice na površini blastociste (stanice trofoblasta) ukopat će zametak u endometriju maternice, uspostaviti prehranu iz majčine krvi i omogućiti mu da u krv majke pošalje hormone kojima će se sačuvati novonastala trudnoća. Mala skupina stanica unutar blastociste, *zametni čvor* ili *embrioblast*, ispunit će i završnu četvrtu zadaću, stvaranje *amnijske šupljine*, odvojenog prostora u kojemu će se razvijati tijelo zametka. On nastaje razmicanjem stanica embrioblasta i stvaranjem ravnog sloja stanica okrenutog prema amnijskoj šupljini koji nazivamo *epiblast*. Epiblast predstavlja konačnu skupinu stanica koje će započeti oblikovanje tijela zametka *gastrulacijom*. Gastrulacija je zbog toga označena kao ključno zbivanje embrionalnog razvoja.

Iz tog skraćene prikaza najranijih događanja tijekom razvoja zametka vidljivo je da osim oplodene jajne stanice, totipotentnim stanicama pripadaju i blastomere, stanice embrioblasta te stanice epiblasta. Jednostavan je dokaz njihove totipotencije mogućnost da se na početku embrionalnog razvoja te stanice razdvoje u dvije odvojene skupine koje će se, svaka za sebe, razviti u novo živo biće. Tako nastaju jednojajni blizanci koji mogu nastati razdvajanjem blastomera, embrioblasta ili epiblasta.

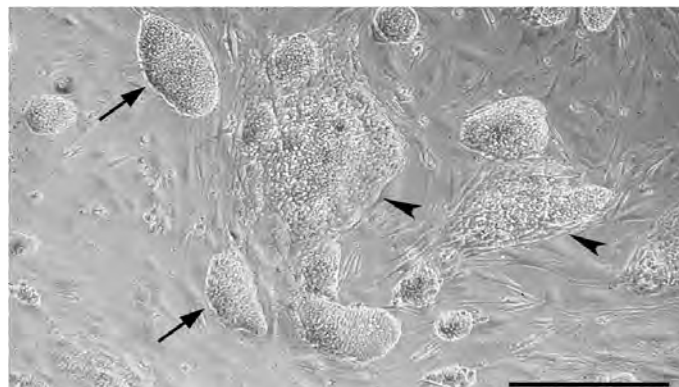
### Što su embrionalne matične stanice?

*Embrionalne matične stanice* (engl. ES cells, embryonic stem cells) predstavljaju izdvojene i u kulturi stanica uzgajane totipotentne stanice zametka. One mogu nastati izdvajanjem i kultiviranjem bilo koje od navedenih vrsta stanica, oplodene jajne stanice, blastomera, embrioblasta ili epiblasta. Međutim, embrionalne se matične stanice dobivaju redovito iz zametka na stadiju blastociste od stanica embrioblasta. Razlog ovome je što je oplodena jajna stanica samo jedna stanica, a i blastomere su malobrojne, pa je od njih vrlo teško uspostaviti kulturu stanica. Štoviše, većina su stanica nastala od njih stanice trofoblasta koje dominiraju prilikom nastanka blastociste. Po brojnosti stanica najbolji kandidat bio bi epiblast, međutim, on je nedostupan jer je zametak tada već implantiran u endometriju maternice. Blastociste se u pokusima na životinjama mogu izolirati jednostavnim ispiranjem maternice, a u ljudi su rezultat umjetne oplodnje. Mikrokirurškim postupcima se iz blastociste izdvoje stanice embrioblasta koje se potom uzgajaju u kulturi stanica. Danas korištene linije embrionalnih matičnih stanica dobivene su iz embrioblasta (engl. inner cell mass) zametka i uzgajaju se u nediferenciranom stanju u kulturi stanica.

Zanimljivo je da su embrionalne matične stanice dobivene isključivo od zametaka sisavaca dok su pokusi na pticama i ribama bili samo djelomično uspješni. Prve su takve stanice bile iz zametka miša, potom štakora, hrčka, zeca, svinje, ovce, krave, konja i majmuna, a također i čovjeka.

### Kultura embrionalnih matičnih stanica

Kod kulture mišjih embrionalnih matičnih stanica najupečatljivija je činjenica da se te stanice uzgajaju u petrijevki u inkubatoru, mogu se gledati pod mikroskopom, s njima se vrše pokusi, pa ipak u jednom trenutku imaju sposobnost postati stanice živog miša. Ovo svojstvo ogleđa se i u njihovom izgledu u kulturi stanica (Slika 2). Dio tih stanica ostaje stalno u nediferenciranom stanju i ponaša se na jednak način kao da su još uvijek stanice embrioblasta. To su gusto zbijene male sitne stanice organizirane

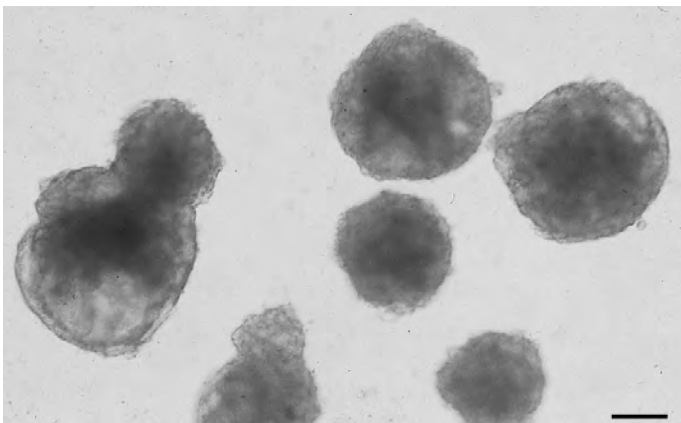


Slika 2. Mišje embrionalne matične stanice u kulturi. *Strelice* pokazuju nakupine nediferenciranih stanica, a *glave strelica* diferencirane stanice. Stanice rastu na podlozi od mišjih embrionalnih fibroblasta. Mjerna crta je 100  $\mu\text{m}$ .

u jasno odvojene nakupine vezane za podlogu. Okolne stanice iskazuju spremnost matičnih stanica da nastave svoj razvoj i diferencijaciju, što se očituje gubitkom opisanog izgleda, stanice se povećavaju i šire po podlozi bez točno određene granice prema okolini. Embrionalne matične stanice istovremeno pokazuju obje slike u kulturi, nediferencirane i diferencirane stanice, pokazujući spremnost nediferenciranih stanica da se po potrebi diferenciraju. Ta nestabilna ravnoteža održava se odgovarajućim čimbenicima rasta. Dio proizvode embrionalni fibroblasti koji predstavljaju podlogu na koju se nasađuju te stanice, dio je iz fetalnog kravlje serumu koji je dodatak mediju u kojem se stanice uzgajaju, a najvažniji čimbenici rasta dodaju se direktno u medij (u miša čimbenik inhibicije leukemije, LIF, engl. leukemia inhibitory factor) i osiguravaju da stanice ostanu nediferencirane. Embrionalne matične stanice mogle bi se u nedogled održavati u kulturi, no s brojem presađivanja iz petrijevke u petrijevku povećava se broj diferenciranih stanica i genetskih grešaka koje smanjuju njihove sposobnosti, tako da je idealno koristiti ih u pokusima uz što manje presađivanja od trenutka izolacije.

### Dokazi totipotentnosti embrionalnih matičnih stanica

Sposobnosti se embrionalnih matičnih stanica mogu pokazati diferencijacijom u kulturi stanica, u tzv. *in vitro* uvjetima. Ukoliko se prestanu održavati potrebni uvjeti u kulturi time što se dopušta pregusti rast stanica ili ako se uskrate potrebni čimbenici rasta, one će se početi spontano diferencirati. Uobičajeni način diferencijacije embrionalnih stanica uključuje njihovo uzgajanje u suspenziji. Ako im se onemogući da se prihvate za podlogu, one plutaju u mediju i od njihovih se nakupina stvaraju kuglaste šuplje tvorbe koje podsjećaju na zametak, pa se nazivaju embrionalna tjelešca (engl. embryonic bodies) (Slika 3). Ona se potom uzgajaju tako da se prihvate za podlogu i diferenciraju u niz različitih vrsta stanica koje odgovaraju derivatima sva tri zametna listića. Posebno je u kulturi upečatljiva njihova diferencijacija u srčane mišićne stanice koje se odmah počinju spontano ritmički kontrahirati što se može lako uočiti mikroskopom. Primjerice, tijekom mojih istraživanja uspostavljen je pomoću embrionalnih tjelešaca, uz dodavanje retinoičke kiseline, postupak diferencijacije embrionalnih matičnih stanica u živčane stanice. Drugi je način diferencijacije embrionalnih matičnih stanica njihovo presađivanje na pogodno mjesto odrasle životinje gdje one u *in vivo* uvjetima stvaraju teratome. Uobičajeno mjesto presađivanja je pod bubrežnu čahuru miša gdje se presadci zbog dobre krvne opskrbe lako prihvate i razvijaju u velike *teratome*. Osim nastanka različitih vrsta stanica tu je moguća i ograničena



Slika 3. Embrionalna tjelešca koja su dobivena uzgojem mišjih embrionalnih matičnih stanica u suspenziji. Stanice oblikuju kuglice u kojima se mogu nazrijeti različiti oblici koji podsjećaju na razvoj zametka. Mjerna crta je 100  $\mu\text{m}$ .

morfogeneza tako da nastaju nepotpuno organizirani dijelovi tkiva i organa kao što je to sluznica crijeva, kost ili hrskavica. Jedan od mojih pokusa bilo je provjeriti mogu li se embrionalne matične stanice presaditi na korioalantoisnu membranu pilećeg zametka. Vjerojatno je jedan od najzбудljivijih trenutaka mog znanstvenog rada bio upravo kad sam otvorio ljusku jajeta i uočio veliki tumor nastao umnažanjem i diferencijacijom embrionalnih matičnih stanica. Premda se pokazalo da embrionalne matične stanice mogu rasti u pilećem jajetu, diferencijacija je bila vrlo oskudna, pa su se bez obzira na početno oduševljenje ti pokusi ubrzo napustili.

### Od embrionalnih matičnih stanica do živog miša

Pokusi diferencijacije pokazuju široke mogućnosti embrionalnih matičnih stanica, no pitanje je mogu li one dati sve vrste stanica i tkiva, jesu li one stvarno totipotentne? Jedini način da se to provjeri bio je da ih se vrati u zametak na stadiju blastociste, upravo tamo od kuda su i uzete. Taj se postupak zove injiciranje blastociste. Uz pomoć mikromanipulatora pod kontrolom mikroskopa tankom se staklenom cjevčicom u šupljinu blastociste unesu embrionalne matične stanice. One u tom trenutku prepoznaju da su potekle od embrioblasta te se s njim združe i uključe se u daljnji razvoj zametka. Kažemo da su embrionalne matične stanice sposobne stvarati *kimere*, jedinke koje imaju dijelove koje pripadaju dvjema različitim jedinkama. U grčkoj je mitologiji to bila sirena (pola žena, pola riba) ili Kentaur (pola muškarac, pola konj), a u ovom slučaju to je kombinacija zametka domaćina (blastociste u koju su ubačene stanice) te zametka iz kojeg su dobivene embrionalne matične stanice injicirane u blastocistu.

Kimerična blastocista potom se vrati u maternicu mišice kako bi nastavila embrionalni razvoj. Doprinos embrionalnih matičnih stanica prati se po boji krzna novonastalih miševa, jer se za pokus odaberu dvije po boji različite vrste miševa. Konačni dokaz sposobnosti diferencijacije embrionalnih matičnih stanica nazivamo *prenošenje spolnim stanicama* (engl. germ line transmission). Ako su embrionalne matične stanice doprinijele svim tkivima i organima kimeričnog miša, očekujemo da su se ugradile i u spolne žlijezde. Za ove pokuse odabiru se stanice koje imaju muški kariotip, tako da utjecaj djelovanja njihovog Y kromosoma odredi muški spol kimere. Spermiji koji se nalaze u testisima kimere potječu ili od zametka domaćina ili od embrionalnih matičnih stanica. Ako se ovi mužjaci pare, boja krzna potomaka pokazat će koji spermij je oplodio jajnu stanicu. Tako spermij nastao od embrionalnih matičnih stanica postaje

“otac” nove jedinke dokazujući iznimna svojstva embrionalnih matičnih stanica. Stanice koje se uzgajaju u petrijevki u kulturi stanica mogu imati svoje potomke.

Embrionalne matične stanice dio su kimere, te se u njenim tkivima i organima izmjenjuju sa stanicama nastalim iz blastociste domaćina. Da bi se dokazala njihova potpuna totipotentnost, trebao se stvoriti miš građen isključivo od embrionalnih matičnih stanica. To je bio prilično težak zadatak, jer je embrioblast blastociste domaćina očito nužan za ispravnu organizaciju embrionalnih matičnih stanica kako bi bile sposobne izgraditi zametak. Stvoriti miša isključivo od embrionalnih matičnih stanica omogućila je primjena tetraploidnih embrija. Strujnim se udarom izazvalo stapanje blastomera mišjeg zametka tako da su stanice imale dvostruki broj kromosoma ( $4n$ , tetraploidija). Takav se zametak ne može razviti, no može nastati blastocista u koju se unesu embrionalne matične stanice. One se izmiješaju s tetraploidnim stanicama embrioblasta što im je dovoljno da nastave normalni embrionalni razvitak dok tetraploidne stanice odumru. Nastali miš isključivo je građen od embrionalnih matičnih stanica i to je bio najjači dokaz da su te stanice totipotentne – ne samo da su sposobne doprinijeti svim tkivima i organima odraslog miša i da su sposobne putem spolnih stanica dati novu generaciju miševa, već mogu same stvoriti cijelog miša.

Ovim konačnim dokazom totipotencije (svemoćnosti) embrionalnih matičnih stanica zaključujem prvi dio ovog nastavnog teksta. U drugom dijelu koji ćete čitati u sljedećem broju Medicinara govorit ću o njihovoj sadašnjoj i budućoj primjeni te razmatrati na koji sve način bi ih mogli iskoristiti u novim pravcima liječenja za koje se očekuje da će biti prekretnica prema medicini budućnosti.

### Literatura:

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6

(Prvi rad o uspostavi kulture embrionalnih matičnih stanica iz mišje blastociste)

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7

(Prvi rad o dobivanju ljudskih embrionalnih matičnih stanica)

Gajović S, St-Onge L, Yokota Y, Gruss P (1997) Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem (ES) cells. *Differentiation* 62:187-92

(Naš rad u kojem je prikazana diferencijacija embrionalnih matičnih u živčane stanice)

Gajović S, Gruss P (1998) Differentiation of the mouse embryoid bodies grafted on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Int J Dev Biol* 42:225-28

(Naš rad u kojem je prvi put pokazano presađivanje embrionalnih matičnih stanica na korioalantoisnu membranu pilećeg zametka)

Nagy A, Gócsa E, Diaz EM, Prideaux VR, Iványi E, Markkula M, Rossant J (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110:815-21

(Pokus s tetraploidnim zamcima kojim je dokazana totipotentnost embrionalnih matičnih stanica)