

NASTAVNI TEKST

Embrionalne matične stanice

Drugi dio: Primjena embrionalnih matičnih stanica

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

Katedra za histologiju i embriologiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Ilustracije: **Ivan Barun**

Kratki sadržaj prethodnog dijela:

Matične stanice imaju dva svojstva: mogućnost diferencijacije u djelatne stanice i svojstvo samoobnavljanja. Embrionalne matične stanice dobivene su iz embrionalnog čvorića blastociste i imaju svojstvo totipotencije - od njih može nastati bilo koja stanica novog organizma. Embrionalne matične stanice se mogu u nedogled uzgajati u kulturi u nediferenciranom stanju, a ako se potaknu, diferenciraju se u razne vrste stanica. Ugrađene u zametak na stadiju morule ili blastociste, doprinijet će svim tkivima i organima novostvorene jedinke. Pokus kojim se od mišjih embrionalnih matičnih stanica dobio novi miš građen isključivo od stanica nastalih njihovom diferencijacijom, nedvosmisleno je potvrdio totipotentnost (svemoćnost) ovih stanica.

Znanstvena primjena embrionalnih matičnih stanica

Kada su Martin Evans i Matthew Kaufman prvi puta uspostavili kulturu embrionalnih matičnih stanica, njihova osnovna namjera bila je proučavati najranija događanja tijekom embrionalnog razvoja. Umjesto da za svaki pokus izoliraju nove mišje zametke, te stanice omogućile su uvid u najraniju diferencijaciju zametka. Ova prva primjena embrionalnih matičnih stanica važna je i danas te se ovim stanicama intenzivno proučavaju diferencijacijski putovi kojima se mogu dobiti one vrste stanica koje su predmet našeg interesa. Posebno je zanimljiva mogućnost dobivanja srčanih mišićnih i živčanih stanica, jer se te stanice ne obnavljaju u našem tijelu, te bi se embrionalne matične stanice mogle iskoristiti kao nadomjestak izgubljenih stanica nakon oštećenja ili bolesti. Svojstvo totipotentnosti embrionalnih matičnih stanica (tj. svojstvo da od njih nastane bilo koja stanica odraslog organizma) istovremeno je i prednost i nedostatak – od njih se mogu dobiti sve potrebne stanice, ali će embrionalne matične stanice uvijek moći napraviti i razne druge vrste stanica, tako da je dosta teško usmjeriti ih isključivo u željenom smjeru.

Znanstvena primjena embrionalnih matičnih stanica vrlo je važna u molekularnoj genetici. Danas, kada poznajemo sekvencu cijelog genoma, pokušavamo razumjeti značenje genomskog zapisa koji sadrži nasljednu informaciju. Osnovni elementi nasljedne informacije su geni koji određuju bjelančevine kao djelatne molekule koje oživotvoruju genomski zapis. Stoga, ako se razjasni što svaka pojedina bjelančevina čini mogao bi se razumjeti cijeli djelatni mehanizam određen zapisom nasljeđa. Razotkrivanje značenja zapisanog u genomu nazivamo proučavanjem uloge gena i za to su nam potrebne embrionalne matične stanice. Postupci molekularne genetike omogućuju osmišljavanje i

unošenje najrazličitijih genskih preinaka u genom stanica u kulturi. Stoga, genske preinake možemo u kulturi unijeti i u embrionalne matične stanice, a od njih zbog njihovih izvanrednih svojstava možemo stvoriti novu generaciju miševa koji su nositelji unesene genske preinake. Embrionalne matične stanice tako postaju izvanredan alat kojim dobivamo genetski preinačene miševe, koji posjeduju upravo onu gensku preinaku izazvanu u kulturi stanica. Genske preinake osmišljavamo tako da imaju točno određene posljedice na djelovanje gena. Osnovna je genska preinaka koja dovodi do onemogućavanja gena (engl. loss of function, knock-out). Njen rezultat je miš kojemu nedostaje bjelančevina koju proučavamo. Takvi miševi razviju određene posljedice koje se ogledaju u promjeni njihovog fenotipa, te proučavanjem ovih posljedica zaključujemo što bjelančevina koja nedostaje čini u mišu, odnosno dobivamo uvid u ulogu onemogućenog gena.

Osim onemogućavanja gena mogu se uvesti i druge preinake u genom miša. Tako su na primjer miševi koji se uzgajaju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga dobiveni postupkom genske zamke - genom embrionalnih matičnih stanica preinačen je tako da su nepoznati geni obilježavanjem "uhvaćeni u zamku" te su tako postali dostupni za istraživanje.

Poznavanje svojstava matičnih stanica otvorilo je put potpuno novom pristupu u medicini, koji se bitno razlikuje od kirurške terapije i terapije lijekovima. To je nadomjesna terapija stanicama kojom bi se zbog bolesti nedjelotvorne, oštećene ili izgubljene stanice nadomjestile novima

Primjena embrionalnih matičnih stanica u medicini

Poznavanje svojstava matičnih stanica otvorilo je put potpuno novom pristupu u medicini, koji se bitno razlikuje od kirurške terapije i terapije lijekovima. To je nadomjesna terapija stanicama kojom bi se zbog bolesti nedjelotvorne, oštećene ili izgubljene stanice nadomjestile novima. Kao i u spontanom procesu cijeljenja, osnovni izvor novih djelatnih stanica su matične stanice. Primjer ovakve nadomjesne terapije stanicama, a koji već danas predstavlja uhodanu medicinsku praksu, presađivanje je koštane srži. Zanimljivo je da nadomjesnom terapijom stanica možemo nazvati i transfuziju krvi, koja je kao terapijski postupak poznata već stotinjak godina. Novost bi u ovom pristupu bila mogućnost nadomještanja stanica koje nemaju sposobnost cijeljenja, kao što su živčane i srčane mišićne stanice. Mogućnost nadomještanja tih stanica otvorilo bi put rješavanju velikih zdravstvenih problema koji uključuju bolesti srca i krvnih žila te bolesti mozga.

Obzirom da su embrionalne matične stanice totipotentne one predstavljaju (sve)mogući izvor bilo kojih stanica koje bi bile potrebne našem tijelu. Ovladavanjem postupcima diferencijacije matičnih stanica one bi mogle biti unesene u bolesnika i u njegovom tijelu bi postale djelatne stanice koje bi zamijenile oboljele i na taj način izliječile bolest (shema 1).

Pred mogućom upotrebom embrionalnih matičnih stanica stoji još niz tehnoloških i etičkih prepreka. Jedna od njih je sama totipotentnost embrionalnih matičnih stanica koje, osim što se diferenciraju u željeni tip stanica, također se diferenciraju i u druge za terapiju nepotrebne stanice. Kao što zaostale matične stanice tijekom normalnog razvoja zametka uzrokuju teratome, tako je za očekivati i da bi presađivanje matičnih stanica moglo zbog nastanka neželjenih tipova stanica dovesti do stvaranja tumora u tako liječenih osoba.

Matične stanice se presađuju na nekom stupnju diferencijacije, te se očekuje da se održe u tkivu i završe svoju diferencijaciju. Završna diferencijacija podrazumijeva da stanice zadobiju izgled djelatnih stanica i započnu vršiti očekivanu funkciju

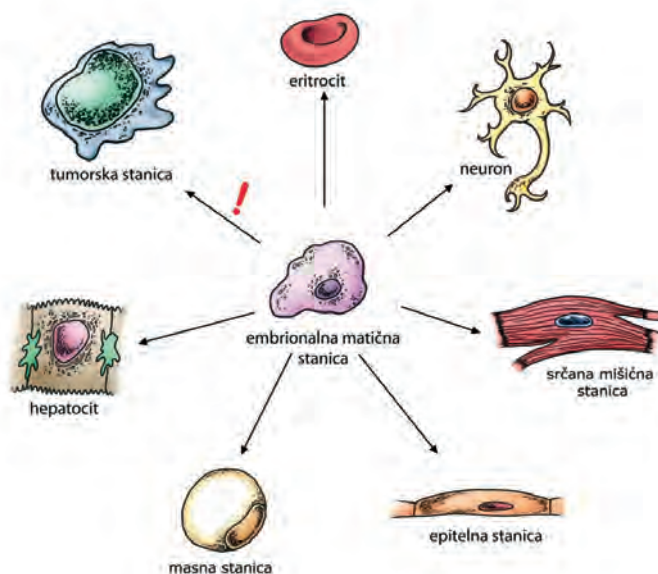
Potrebno je naglasiti da se u većini zamišljenih scenarija nadomjesne terapije stanicama ne presađuju završno diferencirane stanice, već stanice na nekom stupnju diferencijacije, za koje se onda očekuje da se održe u tkivu i završe svoju diferencijaciju. Završna diferencijacija podrazumijeva da stanice zadobiju izgled djelatnih stanica, započnu vršiti očekivanu funkciju i njome se uklpe u djelovanje organizma kao cjeline. U živčanom sustavu, za sada, nismo sigurni bi li presađena stanica, osim što bi postala živčana, uspostavila sinapse sa susjednim živčanim stanicama i uključila se na ispravan način u oštećene neuronske krugove. Međutim, u tom se sustavu čini da embrionalne matične stanice kao izvor matičnih stanica nemaju alternative – živčane su matične stanice odrasle jedinke malobrojne i nedostupne, a matične stanice iz mozga fetusa mogu se dobiti samo u iznimnim uvjetima (rijetki indicirani pobačaji). Stoga se embrionalne matične stanice nameću kao jedini izvor živčanih matičnih stanica koje se mogu dobiti u dovoljno velikom broju kako bi se omogućilo liječenje svih kojima bi ovakva terapija mogla pomoći. Niz objavljenih pokusa u posljednjih pet godina je pokazao da injiciranje životinjskih ili ljudskih embrionalnih matičnih stanica u tkiva (npr. srčani mišić ili mozak oštećeni ishemijom) značajno doprinosi njihovoj obnovi funkcije. Pokazano je da dio stanica dolazi u područje oštećenog tkiva, tamo se diferencira i djelomično obnavlja funkciju (npr. štakori oboljeli od progresivne paralize u sklopu amiotrofične lateralne skleroze nakon injekcije embrionalnih matičnih stanica značajno usporavaju gubitak motoričkih funkcija ili ih čak djelomično poprave). Važna je vijest da je nedavno odobrena prva faza kliničkih pokusa s ljudskim embrionalnim matičnim stanicama kao pokušaj liječenja ozljeda kralježničke moždine.

Osnovnu etičku prepreku u korištenju embrionalnih matičnih stanica predstavlja činjenica da se one moraju izdvojiti iz ljudskog zametka na stadiju blastociste koji ovim postupkom biva uništen. Ljudske blastociste dobivaju se postupkom umjetne oplodnje i predstavljaju zametke koji ostaju višak i doniraju se za dobivanje embrionalnih matičnih stanica. Svaka linija matičnih stanica po svom genomu odgovara zametku od kojeg je dobivena, pa bi je bolesnik, u čijoj terapiji bi se koristila, mogao prepoznati

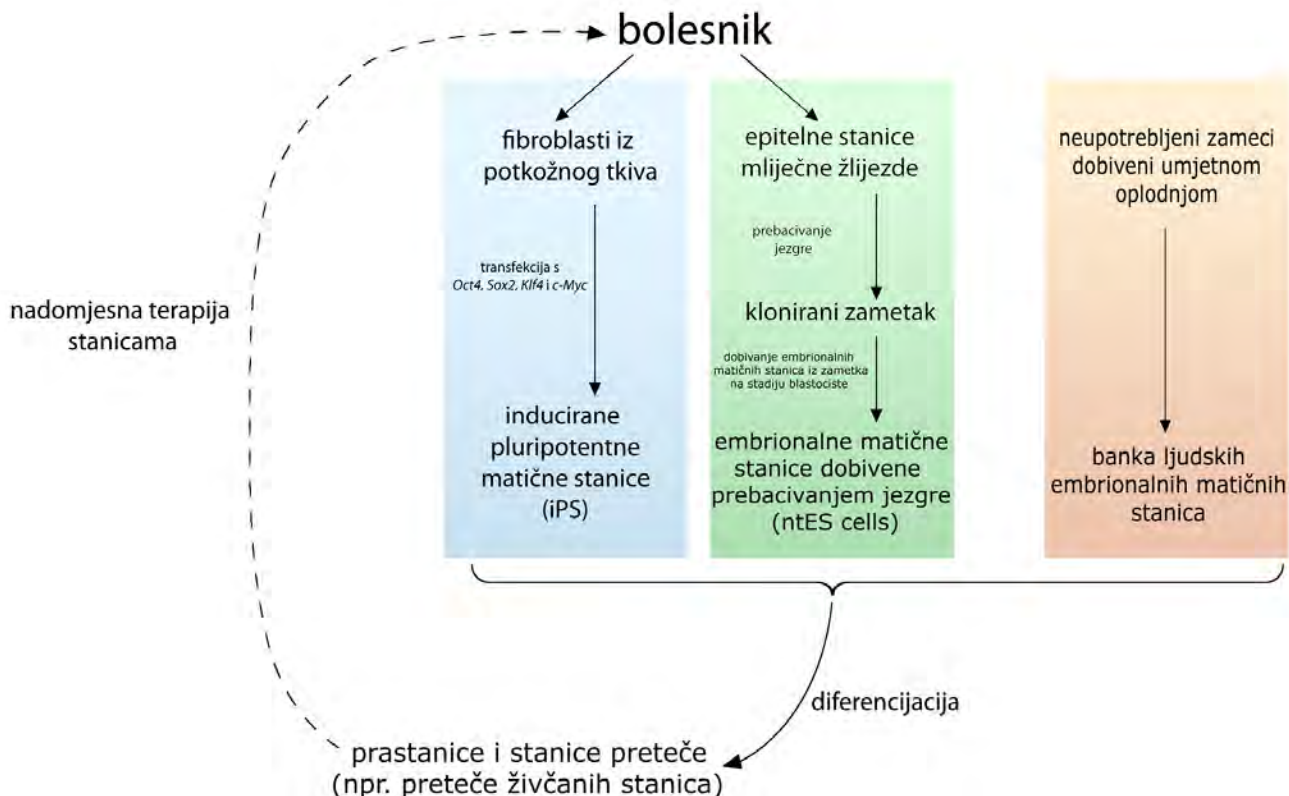
kao stranu stanicu. Kako bi se izbjegla imunološka reakcija odbacivanja nakon provedbe terapije matičnim stanicama, morale bi se uspostaviti banke ljudskih embrionalnih matičnih stanica iz kojih bi se odabirale linije stanica koje bi bilježima tkivne snošljivosti odgovarale liječenoj osobi.

Terapijsko kloniranje omogućilo bi da se oboljeli liječi svojim vlastitim embrionalnim matičnim stanicama. Jezgra stanice oboljele osobe mogla bi se prebaciti u jajnu stanicu koja bi se potom razvila do stadija blastociste i iz koje bi se mogle izolirati embrionalne matične stanice koje se označuju kao ntES (engl. nuclear transfer embryonic stem cells). Do nedavno se činilo da je to jedini scenarij buduće terapije embrionalnim matičnim stanicama, koji je zbog primjene kloniranja postupkom prebacivanja jezgre bio iznimno upitan.

Veliki preokret u predviđanjima terapije embrionalnim matičnim stanicama započeo je 2006. dobivanjem iz miša, a već 2007. iz čovjeka, induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPS, engl. induced pluripotent stem cells). Genetska preinaka fibroblasta dobivenih iz odraslog potkožnog tkiva kojom postaju djelatni četiri čimbenika prepisivanja, Oct4, Sox2, Klf4, i c-Myc, inače izraženih samo tijekom embrionalnog razvoja, uzrokuje da stanice odraslog tkiva zadobiju svojstva embrionalnih matičnih stanica. Tako nastale iPS mogu se poput embrionalnih matičnih stanica dalje diferencirati *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* se diferenciraju u razne vrste stanica koje odgovaraju derivatima sva tri zametna listića, a *in vivo* mogu stvarati kimere, kolonizirati spolne žlijezde i stvoriti spolne stanice od kojih može nastati nova jedinka (prijenos spolnim stanicama) što potvrđuje da su te stanice, poput embrionalnih matičnih stanica, također totipotentne. Na žalost, jedan od upotrebljenih gena, c-Myc, je onkogen, tako da je 20% kimeri koje su sadržavale iPS razvilo tumore i pokazalo da je za bilo kakvu terapijsku primjenu ovakvih stanica nužno poništiti učinjenu genetsku preinaku. Najnovije istraživanje objavljeno u travnju 2009. pokazalo je da se iPS u miša mogu dobiti i bez genetske preinake, samo unošenjem u stanice bjelanjčevina određenih putem ova 4 gena. Stoga, trenutna zamisao liječenja



Iz embrionalne matične stanice moguće je dobiti bilo koju stanicu organizma. Međutim, postoji rizik da iz nje nastane i tumorska stanica



HEMA 1: Zamišljeni postupci primjene embrionalnih matičnih stanica u nadomjesnoj terapiji stanicama. Tri boje označavaju tri različita pristupa dobivanja totipotentnih matičnih stanica.

matičnim stanicama obuhvaća izolaciju iPS iz oboljelog, njihovu diferencijaciju, te liječenje presađivanjem diferenciranih stanica. Obzirom da upotreba iPS zaobilazi kontroverznu primjenu zametaka i omogućava zadobivanje totipotencije i kod odraslih stanica, čini se da su mogućnosti za upotrebu takve vrste stanica, koje odgovaraju embrionalnim matičnim stanicama, u nadomjesnoj terapiji stanicama sve bliže.

Istraživanja embrionalnih matičnih stanica uspjela su postići ogroman napredak u zadnje vrijeme, koji ukazuje na sve veću opravdanost očekivanja njihove primjene u liječenju niza bolesti. Na tom putu stoje još mnoge tehnološke prepreke, ali i nužnost sveobuhvatne procjene etičkih pitanja koja se vežu uz primjenu matičnih stanica. Kako bi se te prepreke otklonile i etičke nedoumice razjasnile, potrebna je široka podrška znanstvenim istraživanjima matičnih stanica koja bi prikupila saznanja, iskustva i rezultate potrebne za što bržu primjenu matičnih stanica u liječenju ljudi.



Danas se embrionalne matične stanice uglavnom koriste samo u znanstvene svrhe

Literatura:

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, Chowdury K, Gruss P (1998) Genes expressed after retinoic acid mediated differentiation of embryoid bodies are likely to be expressed during embryo development. *Exp Cell Res* 242, 138-143.

(Naš rad u kojem je prikazana kombinacija diferencijacije embrionalnih matičnih stanica i genetske preinake postupkom genske zamke)

Muro AF, Marro ML, Gajović S, Porro F, Luzzatto L, Baralle FE (2000) Mild spherocytic hereditary elliptocytosis and altered levels of α - and γ -adducins in β -adducin deficient mice. *Blood* 95, 3978-3985.

(Naš rad u kojem smo postupkom onemogućavanja gena pokazali ulogu β -adducina u eritrocitima i dobili mišji model za nasljednu ljudsku bolest)

Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, Kupriyanov S, Baldwin KK (2009) Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*. 461:91-94.

Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation *Nature* 461:86-90

(Dva rada objavljena u rujnu 2009. u istom broju časopisa Nature, koja potvrđuju da se i iz iPS može dobiti novi miš građen isključivo od ovih stanica)

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 4:381-384.

(Dobivanje iPS bez genetske preinake samo korištenjem odgovarajućih rekombinantnih bjelancevina)