

**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**EMBRIONALNE MATI NE STANICE**

**EMBRYONIC STEM CELLS**

Seminarski rad

Mateja Ba i

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of Molecular Biology)

mentor: Doc.dr.sc. Inga Marijanovi

Zagreb, 2012.

## Sadržaj

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

## 1. Uvod

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

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

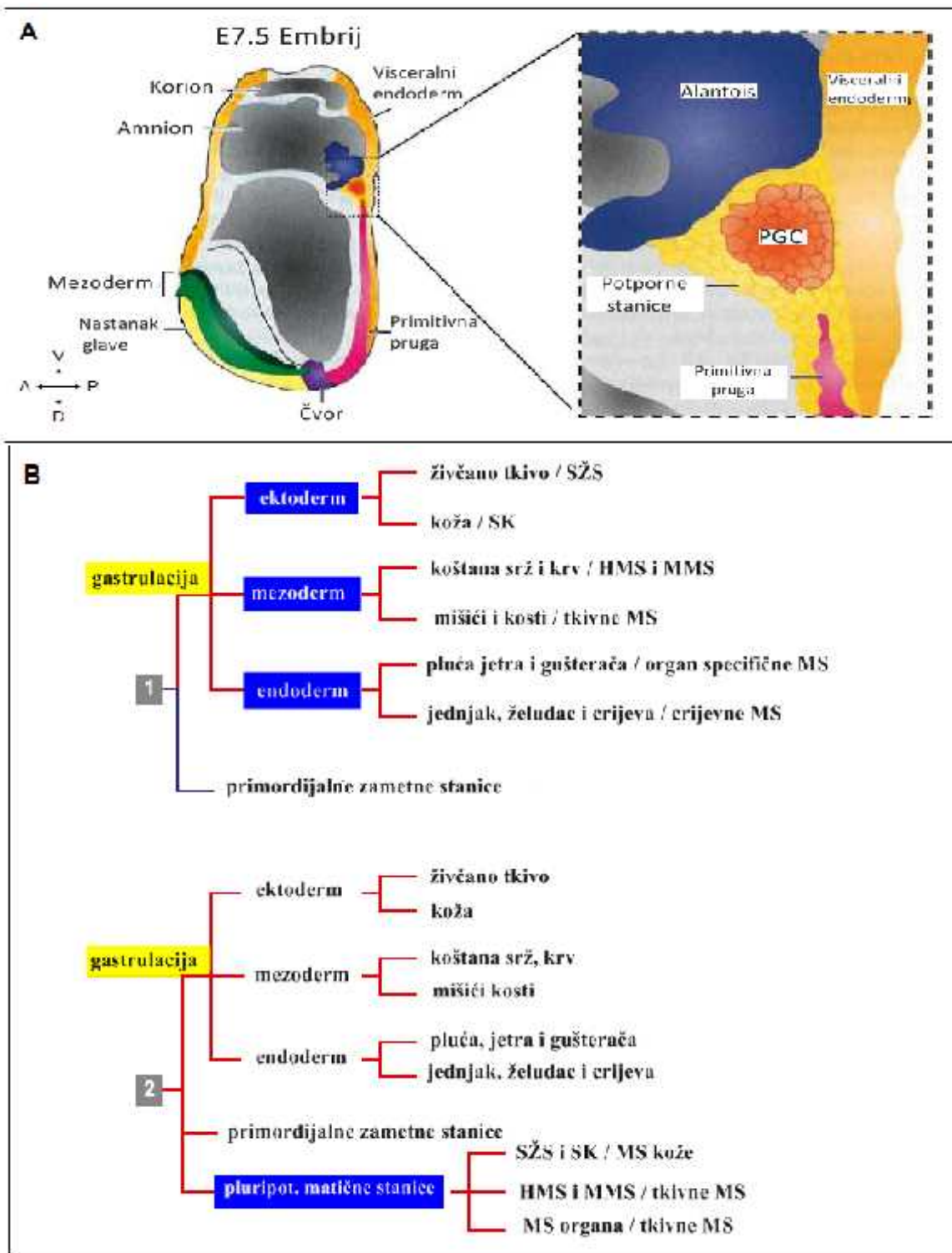
Kada se govori o matičnim stanicama, najčešće se spominju dvije vrste: embrionalne i 'odrasle' (adult) matične stanice. Embrionalne matične stanice (ESCs; eng. embryonic stem cells) prvi puta su izolirane iz miša prije više od 20 godina. Izolirane su iz unutarnje mase stanica blastociste u razvoju i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

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

## **2. Podrijetlo embrionalnih matičnih stanica**

### **2.1. Embrionalne matične stanice iz blastociste**

Podrijetlo matičnih stanica je vrlo dobro istraženo kod embrionalnih matičnih stanica, dok je njihovo podrijetlo kod odraslih jedinki manje poznato. Ljudske ili humane embrionalne matične stanice nastaju izravno iz unutarnje mase stanica predimplantacijskog embrija nakon stvaranja cistične blastociste. Ova populacija stanica bi inače proizvela epiblast, a potom i sva odrasla tkiva, što pomaže objasniti razvojnu plastičnost koju pokazuju ES stanice. Dapače, ES stanice *in vitro* su ekvivalent epiblastu, s obzirom na njihov kapacitet da doprinosu bilo kojoj somatskoj staničnoj liniji. U trenutku kada zigota dosegne stadij blastociste, razvojni potencijal određenih stanica je zaključen. Vanjske stanice embrija se počinju diferencirati i stvarati trofoektoderm. Ove specijalizirane stanice mogu stvarati sve stanične tipove trofoektodermne linije, uključujući i veliku diferenciranu stanicu trofoblasta. U razvojnom stadiju jajnog cilindra, populacija stanica blizu epiblasta se može identificirati kao primordijalne zametne stanice (PGCs, eng. primordial germ cells) koje se zatim isključuju iz somatske specifikacije ili restrikcije. PGCs zatim migriraju i naseljavaju genitalne nabore te proizvode funkcionalne zrele gamete. PGCs se mogu izolirati ili prije ili poslije njihovog dolaska u genitalne nabore, te kada su u kulturi *in vitro* sa odgovarajućim faktorima, mogu proizvesti embrionalne zametne stanice (EGCs, eng. embryonic germ cells) (Slika 1.) (Essentials of Stem Cell Biology. R. Lanza., 2009.).



Slika 1. (A) Razvoj primordijalnih zametnih stanica. Shematski prikaz embrija miša, starog 7,5 dana isti e proksimalni položaj primordijalnih zametnih stanica u razvoju naspram epiblasta. Uve ani prikaz na desnoj strani služi ilustraciji to ke u kojoj primordijalne mati ne stanice izbjegavaju opredjeljenje/restrikciju izbjegavaju i morfogenetske efekte migracije kroz primitivnu prugu tijekom gastrulacije. (B) Pretpostavljena razvojna ontogenija mati nih stanica. U razvojnom stablu broj 1, razvoj mati nih stanica se javlja nakon formiranja zametnih slojeva. Ove mati ne stanice se tako ograni avaju opredjeljenjem zametnog sloja na svoju stani nu liniju (npr. mezoderm se formira. Stvara hematopoetske progenitore koji postaju hematopoetske mati ne stanice). Razvojno stablo broj 2 ilustrira ideju da se mati ne stanice razvijaju sli no kao i porimordijalne zametne stanice pri emu izbjegavaju opredjeljenje stani noj lniji tijekom gastrulacije i zatim migriraju u specifi no tkivo i organ. (Preuzeto iz *Essentials of Stem Biology*, 2009. i modificirano).

## 2.2. Alternativni načini izolacije embrionalnih matičnih stanica

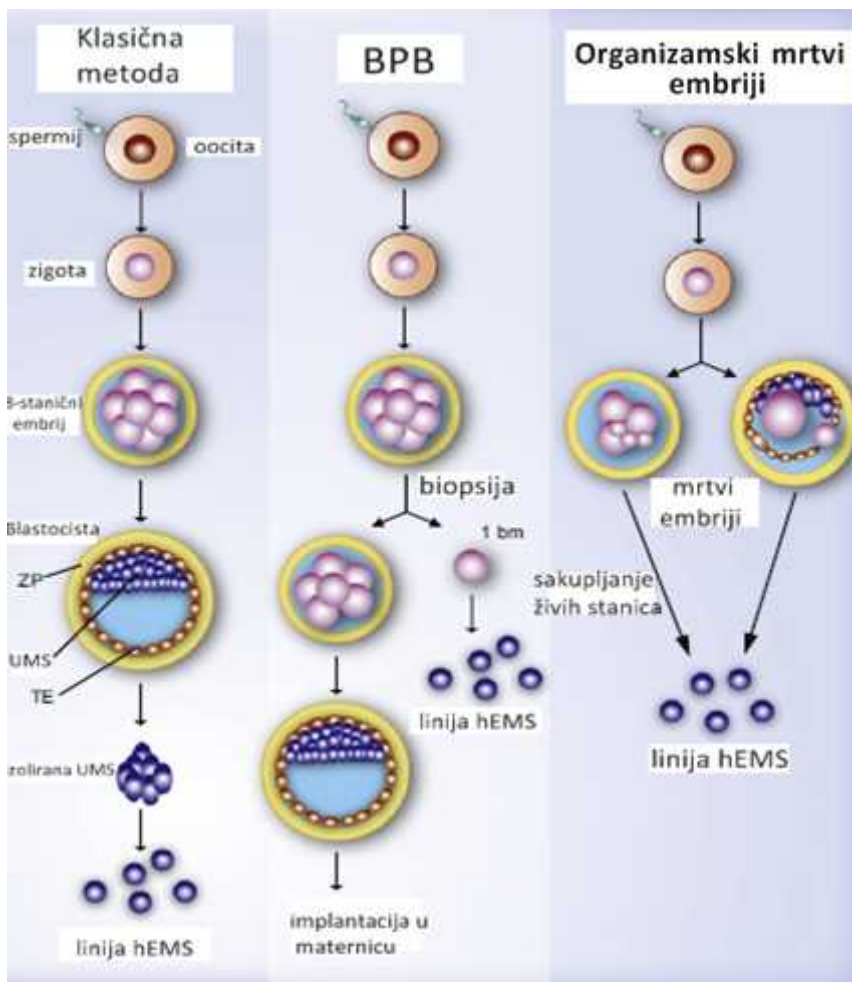
Kako je do sada opisano, humane embrionalne matične stanice se najčešće izoliraju iz vijabilnog predimplantacijskog embrija proizvedenog oplodnjom *in vitro*. Izolacija humanih ES stanica se smatra etički kontroverznom zbog uništavanja embrija tijekom ovog procesa. Ljudski embrio se smatra objektom moralnog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

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

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

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

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



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

### 3. Svojstva embrionalnih mati nih stanica

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

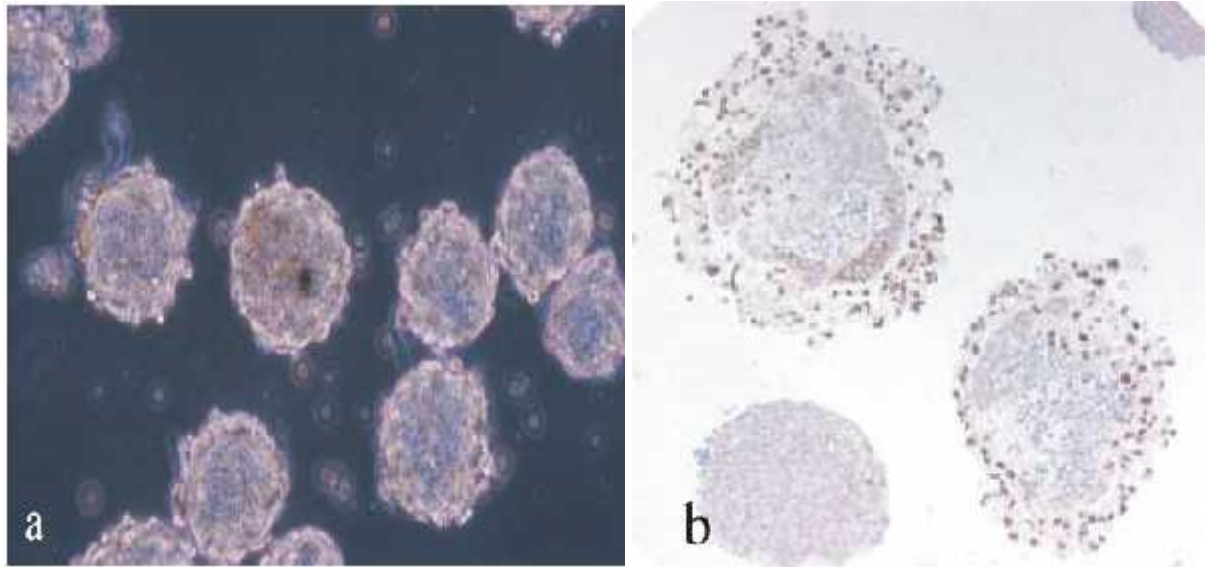
Kako je već prije spomenuto, mišje embrionalne stanice prvi su puta opisane prije više od 20 godina, kada su izolirane iz unutarnje mase stanica blastociste u razvoju te uzgojene u kulturi. Od tada, dokazano je da mogu doprinijeti svim stani nim linijama, uključujući i zametne stanice. *In vitro*, mišje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

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

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



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



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

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

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

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

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

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

	Rex-1 <sup>-/-</sup> ESK se nisu uspjele diferencirati u prim. i visc.endod.	1994; Thompson and Gudas, 2002
Gbx2(Stra7)	Homeobox-containing transkripcijski faktor; Gbx <sup>-/-</sup> embriji pokazuju defekt u neuralnom grebenu	Byrd and Meyers, 2005
Sall1	Jak zinc-finger transkripcijski represor; heterozigotna Mutacija kod ljudi uzrokuje Townes-Brocks sindrom; Sall1 <sup>-/-</sup> miš je umro perinatalno	Kohlhase et al., 1998; Nishinakamura et al., 2001; Kiefer et al., 2002
Sall2	Homolog Sall1; Sall <sup>-/-</sup> miš ne pokazuje fenotip	Sato et al., 2003
Hoxa11	Transkripcijski faktor; Hoxa11 <sup>-/-</sup> miš pokazuje defekt u muškoj i ženskoj plodnosti	Hsieh-Li et al., 1995
UTF1	Transkripcijski koaktivator, stimulira proliferaciju ES stanica	Nishimoto et al., 2005
TERT	Reverzna transkriptaza (kataliti ka komponenta telomeraze	Liu et al., 2000
TERF1	Telomerni 'repeat-binding' faktor 1; TERF1 <sup>-/-</sup> mšji embrio je umro E5-6 sa ozbiljnim defektom rasta u unutarnjoj masi stanica	Karlseder et al., 2003
TERF2	Telomerni 'repeat-binding' faktor 2	Sakaguchi et al., 1998
DNMT3b	De novo DNA metiltransferaza; potrebna za metilaciju centromernih malih satelitsnih ponavljanja; DNMT3b <sup>-/-</sup> embrij je umro prije smrti	Okano et al., 1999
DNMT3a	De novo DNA metiltransferaza; DNMT3a <sup>-/-</sup> miš umro u starosti od 4 tjedna	Okano et al., 1999
Dppa2	Jaki DNA-vezni motiv SAP	Bortvin et al., 2003
Dpp3 (PGC7, Stella)	Jaki DNA-vezni motiv SAP	Saitou et al., 2002; Sato et al., 2002; Bortvin et al., 2003; Bowles et al., 2003
Dppa4 (FLJ10713)	Jaki DNA-vezni motiv SAP	Bortvin et al., 2003; Sperger et al., 2003
Dppa5 (Ph34, Esg-1)	Sli no KH RNA-veznom motivu	Astigiano et al., 1991; Tanaka et al., 2002
ECAT11(FLJ10884)	Konzervativna domena transpozaze 22	Sperger et al., 2003

Iz ovoga je evidentno da iako i među u placentalnim sisavcima postoje razlike u karakteristikama stanica ploda u ranom razvoju koje se mogu ovjekovječiti *in vitro* u morfološki nediferenciranom stadiju. Razlog za to nije jasan, posebice zato što je u većini takvih stanica njihova linija dobivena u odgovarajućem stadiju, iz unutarnje mase stanica preimplantacijske blastociste. Kod miša, ES stanice nisu dobivene iz post-implantacijskog stadija, što implicira da postoji samo kratko razdoblje tijekom kojeg je njihova izolacija moguća. Stoga je ovo povezano u razvojnom smislu ostaje nepoznato, iako otkriveno da se ES stanice mogu reverzibilno prebacivati u stanje koje pokazuje promijenjenu morfologiju kolonija i gensku ekspresiju, zajedno sa gubitkom sposobnosti proizvodnje himera nakon injektiranja blastociste, nudi mogućnost pristupa rasvjetljavanju ovog problema. Postavlja li kasni stadij blastociste granice dobivanja stanica njihova linija nalik embrionalnim matičnim stanicama (ESL, eng. ES-like cell lines) još nije kritički razmotreno kod drugih sisavaca. Međutim, moguće je da ESL stanice u drugim sisavcima odgovaraju mišjim matičnim stanicama epiblasta potpuno i daljnja razmatranja (Anne E. Bishop, 2002.).

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

Postoje mnogi na ini na koje bi se humane mati ne stanice mogle primijeniti u raznim istraživanjima, posebice klini kim. Studije o humanim ES stanicama pridonijet e informacijama o složenim doga ajima koji se javljaju tijekom ljudskog razvoja. Primarni cilj je utvrditi kako nediferencirane mati ne stanice postaju stanice koje formiraju tkiva i organe. Znanstvenici znaju da je uklju ivanje i isklju ivanje gena središte ovog procesa. Neki od najozbiljnijih medicinskih stanja poput raka i uro enih defekata se doga aju upravo uslijed abnormalnih stani nih dioba i diferencijacije. Još potpunije razumijevanje geneti kih i molekularnih kontrola ovih procesa može dovesti do informacija o nastajanju bolesti te novih strategija za njihovu terapiju. O ekivano, kontrola stani ne proliferacije i diferencijacije zahtjeva dodatna temeljna istraživanja molekularnih i geneti kih signala koji reguliraju stani nu diobu i specijalizaciju. Dok nedavna istraživanja na induciranim pluripotentnim stanicama sugeriraju neke od specifi nih faktora koji bi mogli biti uklju eni, ove tehnike trebaju biti osmišljene za sigurno unošenje ovih faktora u stanice i kontroliranje njima induciranih procesa.

Humane mati ne stanice bi se tako er mogle upotrebljavati za testiranje novih lijekova. Na primjer, sigurnost novih lijekova bi se mogla testirati na diferenciranim stanicama nastalim iz humanih pluripotentnih stani nih linija. Druge vrste stani nih linija ve su upotrijebljene na ovakav na in, poput stani nih linija raka koje se upotrebljavaju u potrazi za potencijalnim anti-tumorskim lijekovima. Dostupnost pluripotentnih mati nih stanica bi omogu ila testiranje lijekova na širem rasponu stani nih tipova. Me utim, da bi se ti lijekovi u inkovito istraživali, uvjeti moraju biti identitni pri usporedbi razli itih lijekova, te je preduvjet precizna kontrola diferencijacije mati nih stanica u specifi ni stani ni tip na kojem e lijek biti testiran. Trenutna saznanja o kontroli signala za diferencijaciju nisu dovoljna za precizno oponašanje uvjeta za dobivanje iste populacije diferenciranih stanica za svaki lijek koji se želi testirati.

Možda najvažnija potencijalna primjena humanih mati nih stanica je proizvodnja stanica i tkiva koji bi mogli biti korišteni u stani noj terapiji. Danas, donirani organi i tkiva se esto koriste za zamjenu oboljelog ili uništenog tkiva, no potreba za transplantacijskim tkivom daleko nadmašuje njegovu dostupnost. Mati ne stanice, usmjerene u diferencijaciju u specifi ni stani ni tip, nude mogu nost obnovljivog izvora zamjenskih stanica i tkiva za

lje enje stanja poput Alzheimerove bolesti, ozljeda spinalnog kanala, moždanih udara, opekline, sr anih bolesti, dijabetesa, osteoartritisa te reumatoidnog artritisa.

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

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

Iako je potencijal ES stanica u transplantacijskoj medicini ogroman, prije bilo kakve uspješne kliničke primjene postoji cijeli niz prepreka koje se moraju savladati. Za potpuno uspjeh, niti jedan pristup diferencijaciji ES stanica još nije urodio 100%-tno istom populacijom zrelog potomstva. Ključno je izbjeći i implantaciju nediferenciranih ES stanica u ciljnu liniju zbog rizika od stvaranja teratoma ili daljnjih perturbacija tkivne funkcije, dakle, moraju postojati sredstva za potpuno uspjeh, ali su ovisne o površinskim markerima stanica od interesa koji mogu biti prepoznati od strane fluorescentne ili magnetske selekcije antitijelima, za potpuni uspjeh, marker mora biti potpuno stani no-specifičan. Vrlo često takvi markeri nisu dostupni u tom trenutku pa se metode sortiranja tada oslanjaju na genetske modifikacije ES stanica sa genskim markerima koji su pod kontrolom linijski-specifičnog promotora. Alternativno, stanice se mogu transducirati sa genom otpornim na lijek umjesto markerom kako bi omogućile preferabilnu selekciju subpopulacije.

Na posljetku, kao i sa svim transplantatima, postoji rizik da alogeni ESC-derivirani implantati budu odba eni od strane doma ina. Iako imunogeni nost (sposobnost da izazove imunološki odgovor) transplantata može biti sprije ena uporabom imunosupresivnih lijekova tijekom života, oni mogu mati razne negativne nuspojave te u initi pacijenta vrlo osjetljivim na infekcije. Proizvodnja autolognih ES stanica ne osigurava zadovoljavaju e rješenje, upravo iz razloga iz kojeg se prvotno sama transplantacija vrši. Me utim podložnost ES stanica genetskim modifikacijama osigurava sredstva za smanjenje njihove imunogeni nosti. To bi se moglo posti i unošenjem imunosupresivnih molekula, poput Fas liganda, ili delecijom imunoreaktivnih molekula, poput B7 antigena. Tako er postoji mogu nost zamjene gena stranog glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC; eng. Major histocompatibility complex) recipijentovim MHC genima, pove avaju i imunokompatibilnost stanica (Bishop, H. J. Rippon, 2004.).

## 5. Zaključak

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

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

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



## 6. Literatura

Solano, G. e. a. (2009.). *Essentials of Stem Cell Biology*. R. Lanza.

Atala, A., Lanza, R., Thomson, J.A., Nerem, R. (2011.). *Principles of Regenerative Medicine*

Bishop, H. J. Rippon, A. E. (2004.). "Embryonic stem cells." *Cell Prolif.*(37): 23-34.

Anne E. Bishop, L. D. K. B. a. J. M. P. (2002.). "Embryonic stem cells." *Journal of Pathology*(197): 424-429.

Kurosawa, H. (2007.). "Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells." *J Biosci Bioeng.* (103): 389-398.

Martin, G. (1981.). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Developmental Biology* **78**(12): 7634-7638.

Thomson et. al; Itskovitz-Eldor, J; Shapiro, SS; Waknitz, MA; Swiergiel, JJ; Marshall, VS; Jones, JM (1998). "Blastocysts Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human". *Science* 282 (5391): 1145–1147.

Shulamit Levenberg, J. S. G., Michal Amit, Joseph Itskovitz-Eldor and Robert Langer (2002.). "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells."

Klimanskaya, I., Chung, Y.; Becker, S., Lu, S. and Robert Lanza (2006.). "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres". *Nature* 444, 481-485.

Rosfjord E, Rizzino A. (1994.). "The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 203(3):1795-802.

Thompson JR, Gudas LJ. (2002.). "Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene." *Mol Cell Endocrinol.* 195(1-2):119-33.

Byrd, N. A. and Meyers, E. N. (2005). "Loss of Gbx2 results in neural crest cell patterning and pharyngeal arch artery defects in the mouse embryo." *Dev. Biol.* 284,233 -245.

Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H et al. (1998). "Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome". *Nat. Genet.* **18** (1): 81–3.

Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, ..., Lacey DL, Katsuki M, Asashima M, Yokota T. (2001.). "Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development." *Development.* 128(16):3105-15.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 7. Sažetak

Embrionalne matične stanice se od ostalih stanica u tijelu razlikuju po dvije osnovne karakteristike: sposobnost samoobnavljanja i pluripotencija, sposobnost da se iz nediferenciranog stanja razviju u bilo koji tip stanice u tijelu. Njihovo je podrijetlo, za razliku od odraslih matičnih stanica, vrlo dobro istraženo. One potječu iz unutarnje mase stanica razvojnog stadija embrija, blastociste. Upravo zbog toga što se izoliraju iz predimplantacijskih embrija i što takav postupak zahtjeva njihovo uništavanje, izazivaju mnoštvo polemika oko njihovih istraživanja, s obzirom da embrio u biološkim terminima ima status živog bića. Kao odgovor na ove probleme, predloženi su neki alternativni načini izolacije i one su tehnike još u razvoju.

Do sada, većina istraživanja se provodi na mišjim i humanim embrionalnim matičnim stanicama koje se međusobno razlikuju uglavnom po uvjetima koje zahtijevaju u kulturi *in vitro* za održavanje nediferenciranog stanja, te po nekim morfološkim osobinama.

Potencijalna primjena humanih ES stanica je u stvaranju populacija stanica, tkiva i organa za implantaciju koje bi revolucionizirale medicinu osiguravanjem neograničenog materijala za implantaciju potpuno kompatibilnog sa tkivom pacijenta. Također, stanice se mogu koristiti kao *in vitro* sustav, ne samo za proučavanje diferencijacije specifičnih stanica i njihovih tipova, već i za razmatranje u inka novih lijekova te identifikaciju gena kao potencijalnih terapijskih meta. Međutim, još mnoge prepreke se moraju prijeći i mnoga pitanja odgovoriti prije nego bilo kakvi klinički tretmani mogu poći u čini.

## 7. Summary

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

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

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

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