

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**UPOTREBA MATIČNIH STANICA U
LIJEČENJU ŽIVČANOG SUSTAVA**

**UTILIZATION OF STEM CELLS IN CURING
OF NERVOUS SYSTEM**

SEMINARSKI RAD

Ana Mesić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Romana Gračan

Sadržaj

1. UVOD	3
1.1. MATIČNE STANICE	3
1.1.1. NEURALNE PROGENITORSKE STANICE	4
1.1.2. EMBRIONALNE MATIČNE STANICE	5
1.1.3. PREKURSORSKE STANICE KOŽE	5
1.1.4. MATIČNE STANICE KOŠTANE SRŽI	5
1.1.5. INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE	6
1.2. ŽIVČANI SUSTAV	7
2. POREMEĆAJI FUNKCIJE ŽIVČANOG SUSTAVA	9
2.1. OŠTEĆENJA UZROKOVANA FIZIČKOM TRAUMOM	9
2.1.1. TRAUMATSKA OZLJEDA MOZGA	9
2.1.2. OZLJEDA LEĐNE MOŽDINE	11
2.2. PROGRESIVNE NEURODEGENERATIVNE BOLESTI	15
2.2.1. ALZHEIMEROVA BOLEST	16
3. LITERATURA	20
4. SAŽETAK	23
5. SUMMARY	24

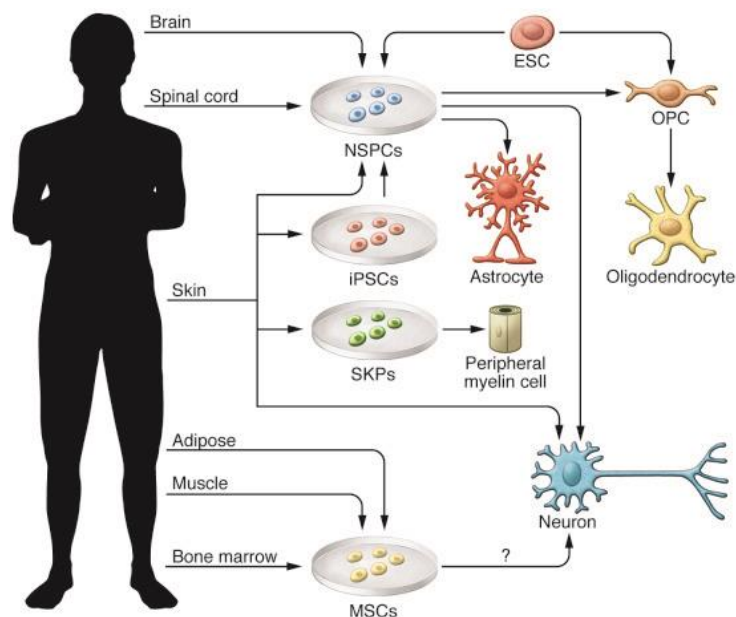
1. UVOD

1.1. MATIČNE STANICE

Matične stanice su besmrtnne stanice sa sposobnošću kontinuiranog samoobnavljanja, asimetrične diobe i diferencijacije u ostale stanične tipove. Glavna karakteristika matičnih stanica je pluripotentnost, tj. najniži stupanj diferenciranosti stanica. U sisavaca pluripotentne matične stanice čine unutarnju staničnu masu blastociste iz čega se nakon implantacije počinju razvijati pojedini organi i tkiva. U adultnom organizmu se u pojedinim tkivima, tako zvanim nišama, zadržavaju pluripotentne ili multipotentne stanice, koje se potaknute okolišnim čimbenicima tijekom života jedinke diferenciraju. Prema tkivu u koje se diferenciraju, u tijelu sisavaca postoje hematopoetske matične stanice, mezenhimske matične stanice, matične stanice derivirane iz adipoznog tkiva, matične stanice iz amnionske tekućine i neuralne matične stanice.

Tipovi matičnih stanica također se mogu podijeliti prema izvoru i metodama dobivanja na embrionalne matične stanice (ESCs, *embrional stem cells*), neuralne progenitorske matične stanice (NSPCs, *neural stem progenitor cells*), prekursorske stanice kože (SKPs, *skin-derived precursors*), hematopoetske matične stanice (HSCs, *hematopoietic stem cells*), mezenhimske matične stanice (MSCs, *mesenchymal stem cells*) i inducirane pluripotentne matične stanice (iPSCs, *induced pluripotent stem cells*). Pojedini tip matičnih stanica u eksperimentalnom se tijeku pokazao najboljim za upotrebu pri liječenju odgovarajuće disfunkcije živčanog sustava, a veliki dio literature ovaj korak (odabira pravog tipa matičnih stanica) navodi ključnim u cijelom procesu terapije. Najveći potencijal u liječenju živčanog sustava općenito imaju multipotentne neuralne progenitorske matične stanice (NSPCs) zbog svoje sposobnosti diferencijacije u tri glavna tipa stanica koja čine centralni živčani sustav (CNS): neurone, astrocite i oligodendrocite (Sl. 1). U kontekstu korištenja matičnih stanica za potrebe transplantacije u dijelove živčanog sustava koriste se i potpuno diferencirane Schwannove stanice, olfaktorne glija stanice i aktivirani makrofazi.

Dva su ključna pristupa u dizajnu terapije matičnim stanicama: endogeni popravak i egzogena stanična terapija. Endogeni popravak podrazumijeva regulaciju regija neuralnog tkiva zahvaćenih oštećenjem, indukcijom ekspresije pojedinih faktora rasta ili drugih vrsta reparatornih molekula u matičnim stanicama *ex vivo*. Egzogena stanična terapija za cilj ima ponovnu uspostavu neuralnih mreža i povratak normalne funkcije kroz direktno uvođenje matičnih stanica u organizam, tj. transplantaciju (Duncan i sur. 2017.).



Slika 1. Prikaz različitih izvora tkiva za uzgoj matičnih stanica; prikazane vrste matičnih stanica su: neuralne progenitorske stanice (NSPC), inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC), prekursorske stanice kože (SKP), mezenhimske matične stanice (MSC), embrionalne matične stanice (ESC) i metode direktne konverzije za dobivanje neuralnih stanica za transplantaciju (Mothe i sur. 2012).

1.1.1. NEURALNE PROGENITORSKE STANICE

Za razliku od matičnih stanica koje se kontinuirano dijele kako bi stvorile stanice kćeri koje će ući u diferencijaciju, progenitorske stanice pokazuju ograničeni proliferativni kapacitet i diferencijacijski potencijal.

NSCP se obično u kulturi uzgajaju kao slobodno plutajuće neurosfere u mediju bez seruma uz dodatak epidermalnog faktora rasta (EGF, *epidermal growth factor*) i fibroblastnog faktora rasta 2 (FGF 2, *fibroblast growth factor 2*). Neurosfere su 3D agregati sastavljeno od progenitorskih stanica (najvećim udjelom), matičnih stanica (malim udjelom) i malog broja diferenciranih stanica koje su dobivene višestrukim presađivanjem. Nakon presađivanja u medij bez faktora rasta uz serum, neuralne matične stanice se diferenciraju u neurone, oligodendrocite i astrocite. Ovaj tip matičnih stanica prisutan je u fetalnom kao i u odraslom CNS-u otkuda se može i izolirati te uzgojiti u kulturi stanica. Njegova dosadašnja najčešća primjena bila je transplantacija (Mothe i sur. 2012).

1.1.2. EMBRIONALNE MATIČNE STANICE

Embrionalne matične stanice su pluripotentne stanice dobivene iz unutarnje mase stanica blastociste (embrioblasta) u razvoju. Njihova je najveća prednost što od svih ovdje navedenih tipova matičnih stanica one imaju najniži stupanj potentnosti što znači da se mogu diferencirati u sve stanične tipove. Također, zbog jake telomerazne aktivnosti, ova se linija stanica može dijeliti gotovo beskonačno. S druge strane, pri njihovoj je kultivaciji veoma teško održati čistoću linije i dobiti visoko specifičnu diferenciranu liniju stanica bez kariotipskih abnormalnosti. Ljudske embrionalne matične stanice dobivaju se iz embrija tijekom *in vitro* oplodnje ili mogu biti generirane partenogenetskom aktivacijom jajne stanice. Velika je mana ovog tipa stanica nemogućnost njihove transplantacije u živi organizam zbog izuzetno visoke vjerojatnosti njihove migracije u druge dijelove tijela i razvoja teratoma, zbog čega one prvo moraju biti potaknute na diferencijaciju u kulturi prije presađivanja u živi organizam. Za sada su razvijeni protokoli za poticanje diferencijacije embrionalnih matičnih stanica u liniju prekursorskih, glija stanica i motornih neurona (Mothe i sur. 2012).

1.1.3. PREKURSORSKE STANICE KOŽE

Prekursorske stanice kože stvaraju se tijekom embriogeneze i održavaju tijekom cijelog života. Dijele mnogo zajedničkih karakteristika s embrionalnim stanicama neuralnog grebena u pogledu toga što svojom diobom stvaraju mezodermalne stanice, periferne neurone i Schwannove stanice. Neki od razloga zašto se često koriste su dostupnost i mogućnost uzorkovanja iz autolognog izvora. Pokazale su veliki potencijal za poticanje remijelinizacije tkiva zahvaćenog lezijom, ali imaju jako ograničen kapacitet indukcije funkcionalnog oporavka (Mothe i sur. 2012).

1.1.4. MATIČNE STANICE KOŠTANE SRŽI

Odrasla koštana srž sadrži više različitih populacija matičnih stanica od kojih su najznačajnije hematopoetske matične stanice (HSC) i mezenhimske matične stanice (MSC). Dok se HSC diferenciraju u krvotvorne stanice, dakle eritrocite i stanice imuno sustava, MSC se diferenciraju u različite tipove vezivnog tkiva, odnosno osteoblaste, adipocite, miocite. Neke od njihovih zajedničkih obilježja su jedan od najvećih stupnjeva sigurnosti što se tiče kompatibilnosti s domaćinom kod transplantacije zbog mogućnosti korištenja autolognog izvora i intravenozni i intratekalni način primjene.

Specifičnost HSC-a je da su one ne-adhezivna linija stanica koja kao prepoznatljivi marker razvija karakterističnu površinu. Ove stanice se dobivaju uzorkovanjem periferne krvi, a najznačajniji su doprinos pokazale u funkcionalnom oporavku živčanog sustava. MSC su značajne zbog poticanje lokalne imunogeničnosti (uspostave imunskog odgovora) na području na kojem se primijene kroz ekspresiju velikih količina neurotrofnih faktora pogodnih za oporavak tkiva. Od tih su faktora najznačajniji citokinini koji kroz kemotaksiju djeluju na privlačenje stanica imunskog sustava. Zbog nepotpune diferenciranosti ovih stanica često je njihovo metastaziranje, poticanje rasta tumora i malignih oboljenja hematopoetskog sustava.

Jedna od trenutno najpopularnijih i komercijalno raširenih metoda dobivanja HSC-a i MSC-a je uzorkovanje stanica iz pupčane vrpce pri rođenju djeteta. Prednosti koje imaju stanice skupljene ovom metodom su manja sklonost odbijanju transplantata u tijelu domaćina i njihov veći postotak u uzorku nego što se to može dobiti uzorkovanjem iz odraslog organizma (Mothe i sur. 2012).

1.1.5. INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE

iPSC su stanice dobivene reprogramiranjem potpuno diferenciranih stanica u pluripotentno stanje. Prvi puta su dobivene 2006. godine protokolom koji su razvili japanski znanstvenici Takahashi i Yamanaka, u kojem je linija fibroblasta pod utjecajem retroviralne ekspresije transkripcijskih faktora Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc vraćena u stanje pluripotentnosti, što je označilo veliki korak u području biologije matičnih stanica (Takahashi i sur. 2006). Ova stanična linija dijeli mnogo karakteristika s embrionalnim matičnim stanicama kao što su na primjer morfologija, stupanj potentnosti, visoka sposobnost samoobnavljanja i genska ekspresija. Najveći problem u dobivanju ovih stanica je ekspresija reprogramirajućih faktora koji su povezani s razvojem teratoma. Kao rješenje ovo problema razvijene su različite alternativne metode koje ne zahtijevaju trajnu ugradnju ciljanih transgena kao na primjer korištenje adenovirusa, piggyBac transpozona i direktna transdukcija proteina (González i sur. 2011).

1.2 ŽIVČANI SUSTAV

Živčani sustav je jedinstveni i sveobuhvatni organski sustav koji svake minute dobiva stotine informacija iz različitih senzoričkih organa koje procesira i integrira te u skladu s njima kontrolira reakcije koje organizam izvodi.

Funkcije koje obavlja živčani mogu se podijeliti na senzoričke, motoričke, integrativne i funkcije skladištenja/spremanja. Senzoričku funkciju obavljaju senzorni receptori organizirani u pet osnovnih osjetnih organa ili raspoređeni po tijelu bez usmjerene lokalizacije, i senzorička vlakna koja živčani impuls prenose od receptora do dijela gdje se te informacije obrađuju. Pod motoričkom funkcijom živčanog sustava smatra se ujedno i njegova najvažnija uloga za cijelo tijelo, što je kontrola različitih tjelesnih aktivnosti. To se postiže kroz izazivanje kontrakcije skeletnih ili glatkih mišića unutarnjih organa ili pak poticanje sekrecije aktivnih kemijskih supstanci endokrinih i egzokrinih žlijezda, pri čemu se sva tkiva do kojih se finalno provodi akcijski potencijal iz motoričkih vlakana nazivaju efektori. Integrativna funkcija podrazumijeva kanaliziranje i procesiranje primljenih informacija, a može se provoditi kroz refleksne ili mentalne puteve reakcije.

Anatomska podjela živčanog sustava dijeli ga na centralni i periferni živčani sustav, pri čemu centralni živčani sustav (CNS, *central nervous system*) čine mozak i leđna moždina, a histološki je on građen od sive i bijele tvari. Siva tvar sadrži tijela neurona i njihove dendrite, glija stanice i kapilare, dok je bijela tvar tako obojena zbog snopova mijelinskih ovojnica koje obavijaju akson. Periferni živčani sustav (PNS, *periferal nervous system*) čine svi živci, živčana vlakna i njihovi ogranci po tijelu koji ne spadaju u CNS. Ovisno o funkciji koju pojedini dio perifernog sustava obavlja on se još dijeli na somatski sustav, koji donosi senzoričke i motoričke informacije u/iz CNS-a, i autonomni sustav, koji regulira nevoljne tjelesne funkcije.

Vrste stanica koje sačinjavaju živčani sustav su neuroni i glija stanice. Neuroni su fundamentalne jedinice živčanog sustava koje ujedno obavljaju i sve njegove funkcije. Građeni su od tijela neurona u kojem se nalazi jezgra, dendrita kratkih ogranaka koji primaju akcijski potencijal, i aksona što je dugi ogranak te stanice kojim se provodi primljeni akcijski potencijal.

Neuroni nisu u međusobnom fizičkom dodiru već komuniciraju preko sinapsi. Presinaptički neuron otpušta neurotransmitere, male signalne molekule, u sinaptičku pukotinu (prostor između dva neurona) te se oni vežu na receptore postsinaptičkog neurona i na njemu izazivaju promjenu membranskog potencijala što omogućava otvaranje ionskih kanala uzduž aksona postsinaptičkog neurona i na taj način prijenos živčanog impulsa. Neuroni se ovisno o položaju

tijela neurona dijele na unipolarne, bipolarne, pseudopolarne i multipolarne, a s obzirom na funkciju koju obavljaju na senzorne, motorne i interneurone (čine poveznicu između motornih i senzornih neurona).

Glija stanice su neneuralne stanice živčanog sustava koje ne provode akcijski potencijal već svojom aktivnošću omogućavaju neuronima obavljanje zadaće u živčanom sustavu. Ovisno o položaju unutar dijela živčanog sustava i zadaće koju obavljaju razlikuje se šest tipova glija stanica: ependimske stanice, oligodendrocite, astrocite, mikroglia, Schwannove stanice i satelitske stanice. Za shvaćanje patologije dalje navedenih poremećaja živčanog sustava važno je spomenuti ulogu oligodendrocita koji oko dugih aksona sintetiziraju mijelin koji tvori mijelinsku ovojnicu i omogućava brži protok akcijskog potencijala kroz neuron i astrocita koji čine krvno- moždano barijeru (Hall i sur. 2011).

2. POREMEĆAJI FUNKCIJE ŽIVČANOG SUSTAVA

Poremećaji funkcije živčanog sustava ovdje su podijeljeni prema zajedničkim karakteristikama koje pojedine bolesti, ozljede ili stanja poprimaju. Neke od tih karakteristika odnose se na dio centralnog živčanog sustava koji je njima zahvaćen, uzrok koji je do poremećaja doveo (fizička trauma ili poremećaj staničnih metaboličkih procesa) te radi li se o progresivnom ili trenutnom oštećenju.

2.1. OŠTEĆENJA UZROKOVANA FIZIČKOM TRAUMOM

Dva glavna oblika ozljede CNS-a su ozljeda mozga i leđne moždine, a uzrok im je vanjska fizička trauma. Neki od glavnih uzroka ovih oštećenja su padovi, motorističke prometne nesreće, fizički obračuni, sportske aktivnosti i nesvjestice (Langlois i sur. 2006).

2.1.1. TRAUMATSKA OZLJEDA MOZGA

Traumatska ozljeda mozga jedan od velikih globalnih problema u zdravstvu i liječenju. Ona može dovesti do dugotrajnih kroničnih fizičkih, kognitivnih, bihevioralnih i emotivnih posljedica koji mogu imati utjecaj na svakodnevne aktivnosti osobe zbog čega se ovo smatra jednom od najopasnijih ozljeda. Osim trenutnih i direktnih utjecaja koje ozljeda mozga može imati na pacijenta, ona također povećava rizik drugih zdravstvenih problema. Osobe koje su proživjele ovakvu ozljedu, u budućnosti imaju puno veću vjerojatnost od razvoja depresije, ovisnosti, epilepsije, Alzheimerove bolesti i preuranjene smrti zbog povezanosti s procesima staničnog starenja (Langlois i sur. 2006).

Na staničnoj razini traumatska ozljeda mozga uzrokuje poremećaj strukture neuralnog citoskeleta. U ekstracelularnoj tekućini aksona nakon pretrpljene ozljede mozga detektirane su visoke koncentracije glutamata koji oštećuje okolne stanice i na taj način uzrokuje kaskadu staničnih smrti i progresivno otpuštanje citotoksičnih molekula zbog čega utjecaj ozljede na poremećaj funkcije mozga traje kroz dugi period vremena (Jain i sur. 2009).

Traumatska ozljeda mozga dugo je vremena, zbog zakašnjelih i progresivnih promjena koje stvara, smatrana ireverzibilnom štetom na mozgu. Trenutna terapija sastoji se primarno od operacijskog zahvata kojim se saniraju hematomi i cerebralni edemi te na opskrbu oštećenog tkiva neuroprotektorima. Terapija zamjene oštećenog tkiva matičnim stanicama kod ove vrste ozljede ima velik potencijal jer bi se na taj način, ne samo osigurao nadomjestak nekrotičnih neurona, već i sinteza potrebnih agenasa za obnovu i ponovnu uspostavu funkcije u ostatku

tkiva. Mehanizmi kojima se pokušavaju postići ovi učinci su integracija matičnih stanica u preživjele neuralne krugove, lokalno poticanje rasta neuralnog tkiva ili modifikacija lokalnog mikro-okoliša kako bi se potakla endogena regeneracija (Jain i sur. 2011).

Tip matičnih stanica koji je u dosadašnjim istraživanjima pokazao djelovanje s najefikasnijim terapijskim učinkom su matične stanice dobivene iz koštane srži (BMSC). Djelovanje ovog tipa stanica uključuje zaštitu okolnog neuralnog tkiva neuroprotektorima, stvaranje povoljnog okoliša za regeneraciju i pojačanu ekspresiju faktora rasta i citokina (Parr i sur. 2007). Još jedan razlog za razvoj patologije kod traumatske ozljede mozga je oštećenje moždano- krvne barijere koja postane previše propusna. Upotrebom embrionalnih neuralnih progenitorskih stanica (NSCP) koje mogu stupati u interakciju s mikrovaskularnim stanicama endotela, dokazana je sposobnost obnove krvno- moždane barijere. NSCP pupaju u obliku neurosfera koje mogu stvarati gušće barijere i onemogućiti prolaz malim molekulama iz krvotoka (Weidenfeller i sur. 2007).

Jedan od efikasnih oblika *ex vivo* terapije traumatske ozljede mozga je genska terapija s ciljem produkcije neuralnog faktora rasta. Neuralne matične stanice podvrgnu se transdukciji retrovirusom tako da eksprimiraju neuralni faktor rasta te se tako modificirane transplantiraju u ozlijeđeni dio mozga. Ovom terapijom je zabilježen napredak kognitivnih i neuromotornih funkcija (Jain i sur. 2011).

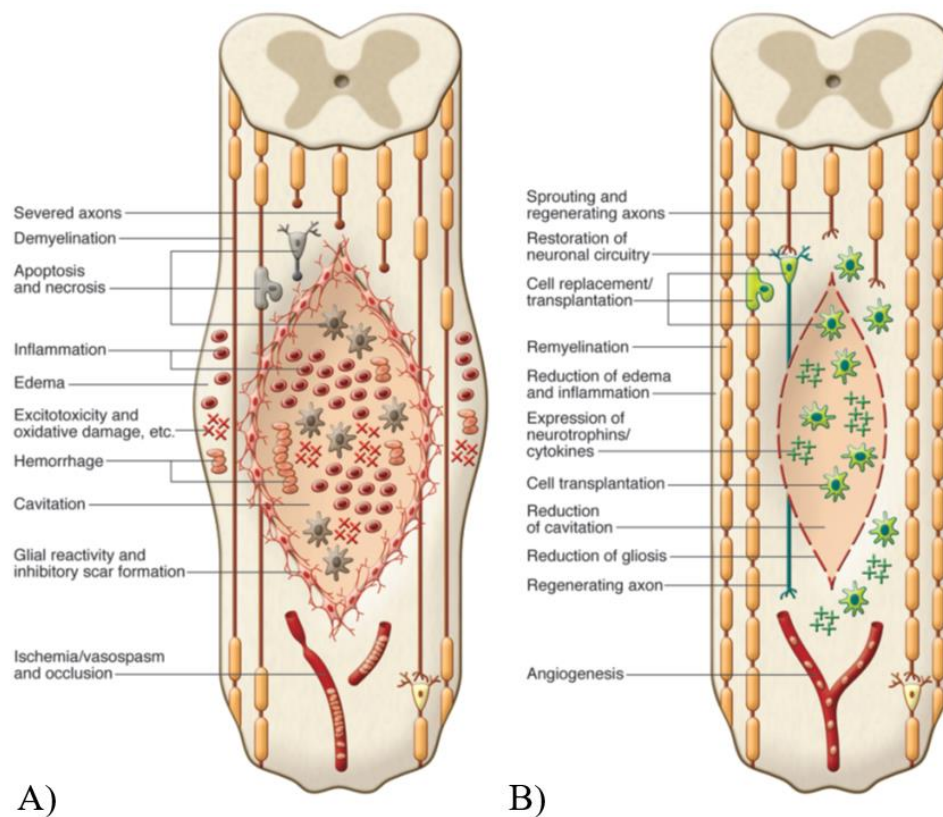
Jedan od najvećih problema u tretmanu moždanog tkiva nakon traumatske ozljede je gubitak velikog broja različitih stanica. Molcanyi i suradnici u (2007) svom su radu dokazali da upalni procesi umanjuju opstanak i integraciju embrionalnih matičnih stanica u mozgu miša nakon traumatske ozlijede. Mišje embrionalne matične stanice obilježene GFP-jem implantirane su u korteks miševa 72 sata nakon ozlijede mozga perkusijom. Sekcijom mozga miševa 5- 7 dana nakon implantacije pronađeno je tek par GFP pozitivnih stanica. Ovim je istraživanjem također, po prvi put dokazano da je uzrok gubitka tako značajnog broja stanica fagocitoza koju obavljaju makrofazi aktivirani upalnim okolišem. Molekule koje dovode do stvaranja ovih mikrouvjeta su ponajviše interleukini IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i tumorski faktor nekroze- α (Molcanyi i sur. 2007).

Cilj budućih terapija za traumatsku ozljedu mozga trebao bi biti upravo akutni upalni odgovor tkiva nakon traumatske ozlijede mozga jer se bez stvaranja povoljnog lokalnog okoliša efikasnost i vjerojatnost za uspjeh terapije matičnim stanicama drastično smanjuju.

2.1.2. OZLJEDA LEĐNE MOŽDINE

Više je klasifikacija ozljeda leđne moždine, ovisno o tome primjenjuje li se kriterij patofiziologije, histologije ili liječničkog tretmana. Najčešća je međutim podjela na potpunu i nepotpunu frakturu leđne moždine. Bez obzira na vrstu, kod svih ozljeda leđne moždine, dolazi do remećenja funkcije motoričkih i senzoričkih živčanih puteva, što za posljedicu ima senzomotoričku disfunkciju svih dijelova tijela ispod mjesta lezije. Potpunom frakturom se pri tome smatra ozljeda nakon koje je izgubljen bilo kakav oblik motoričke i/ili senzoričke funkcije u segmentima koji se neurološki nalaze ispod mjesta ozljede. Dok u potpunoj frakturi dolazi do potpunog puknuća aksona koji prolaze kroz leđnu moždinu ili potpunog prekida veza između neurona, u nepotpunoj frakturi spektar mogućih oštećenja puno je širi, a obuhvaća događaje od mekšanja i promjene boje zahvaćenog tkiva, nagnječenja nekog od dijelova leđne moždine ili prekida provođenja impulsa u jednom od njezinih dijelova. U djelomičnoj frakturi neke informacije još uvijek mogu proći neuralnim putevima, ali obično samo djelomično, što dovodi do dodatnih komplikacija kao što su kronična bol i nekontrolirane kontrakcije i grčenje mišića. Ovisno o vrsti ozljede primjenjuje se i pojedina strategija u liječenju (Raineteau i sur. 2001; Norenberg i sur. 2004).

Primarna mehanička trauma obično uzrokuje nekrozu, edem, lokalno unutarnje krvarenje i vazokonstrikciju. Ovi događaji uzrokuju kaskadu sekundarnih patofizioloških mehanizama kao što su ishemija, apoptoza, nekroza, poremećaje u protoku elektrolita i cerebrospinalne tekućine, peroksidaciju lipida, demijelinizaciju aksona, stvaranje slobodnih radikala i daljnji upalni odgovor tkiva (Sl. 1.A). U predakutnoj i kroničnoj fazi na mjestu ozljede se formira šupljina ili cista ispunjena tekućinom s hipertrofnim astrocitama i makrofagima. Ove stanice u ekstracelularni matriks otpuštaju inhibitorne molekule poput proteoglikana hondroitin sulfata (CSPG, *chondroitin sulfate proteoglycans*), koji formiraju glijalni ožiljak, koji stvara fizičku i kemijsku barijeru regeneraciji tkiva. Strategije tretiranja ovakvog patofiziološkog stanja osim pokušaja inhibicije sekundarnih mehanizama odgovora tkiva koncentriraju se na stvaranje povoljnih uvjeta za neuroplastičnost i regeneraciju tkiva ili transplantaciju stanica ili dijelova tkiva (Sl. 2.B) (Mothe i sur. 2012).



Slika 2. Patofiziologija ozljede leđne moždine. A) Prikaz primarnih i sekundarnih mehanizama nakon ozljede. B) Potencijalni mehanizmi popravka tkiva nakon terapije matičnim stanicama (Mothe i sur. 2012).

POTPUNA FRAKTURA LEĐNE MOŽDINE

Strategije liječenja koje se primjenjuju kod potpune frakture leđne moždine ponajviše su koncentrirane na regeneraciju pokidanih živčanih vlakana duž lezije kako bi se ona mogla ponovo povezati. U svom istraživanju iz 1980. Richardson i suradnici (1980) prvi su puta dokazali da je u posebnim uvjetima moguća regeneracija i pupanje aksona u centralnom živčanom sustavu. Ova činjenica potaknula je razvoj cijelog novog područja unutar neuroznanosti i danas služi kao okosnica gotovo svih strategija liječenja potpunog puknuća leđne moždine.

Prilikom nanošenja fizičke traume koja dovodi do ove vrste ozljede aksoni leđne moždine se podijele na dva citoplazmatska segmenta. U periodu nakon nanošenja ozljede distalni i proksimalni segment prekinutog aksona se počinju povlačiti u anterogradnom i retrogradnom smjeru ostavljajući tako između sebe rupu u tkivu. Primijećeno je da iako distalni aksonski segment postepeno nestaje, proksimalni pokazuje morfološke promjene koje dovode do pojave

izbojaka/ pupova. Razlog iz kojeg ova pojava ne uspijeva do kraja vratiti početni fenotip tkiva nakon pretrpjele traume je taj što se novonastali pupovi produžuju na veoma kratke udaljenosti i ne uspijevaju premostiti nastalu leziju. Pokazalo se da konceptualno regeneracija aksona ovisi o uzajamnom utjecaju koji imaju ekstrinzičnim uvjeti i mikrookoliš u kojem se neuron nalazi i intrinzičnim svojstvima samog neurona. Konkretno to podrazumijeva sposobnost ponovne ekspresije gena povezanih s rastom (*growth related genes*), dostupnost neurotrofnih faktora i molekula matriksa na koje bi se rastući neuron mogao vezati, prisutnost inhibitora rasta i formiranje glijalnog ožiljka (Stichel i sur. 1998).

Jedna od metoda koja je u tretiranju ove vrste ozljede do sada dala obećavajuće rezultate, a trenutno je u fazi kliničkog istraživanja je tretman matičnim stanicama vlastite koštane srži. Prednosti ovog tipa matičnih stanica su to što je puno lakši za izolaciju i uzgoj od ostalih tipova matičnih stanica i već je odobren u liječenju hematopoetskih bolesti što mu daje veliki potencijal za ekspanziju primjene u liječenju i neuralnog tkiva. (Syková i sur. 2006)

Druga metoda korištena za rekonstrukciju oštećenih dijelova CNS-a je implantacija dijelova fetalnog tkiva. Dva su glavna puta kroz koje fetalno tkivo može manifestirati svoje doprinose. Prvo, regenerativni potencijal može biti povećan zamjenom izgubljenog i oštećenog tkiva fetalnim. Ovo potvrđuje istraživanje Isacson i suradnika (1995), u kojem je otkriven izniman kapacitet tkiva porijeklom iz centralnog živčanog sustava za integraciju u novi okoliš, kroz primanje sinapsi neurona domaćina i formiranje vlastitih. Drugo i još značajnije za regeneraciju aksona, dijelovi fetalnog tkiva mogu služiti kao mostovi od biološkog materijala i promovirati elongaciju aksona između nasuprotnih strana lezije (Stichel i sur. 1998).

NEPOTPUNA FRAKTURA LEĐNE MOŽDINE

Za razliku od potpune frakture leđne moždine, ciljevi terapije za nepotpunu frakturu leđne moždine puno su više koncentrirani na ponovnu uspostavu funkcije koju su prethodno obavljali oštećeni neuralni putevi, kroz plastičnost neuralnog sustava, tj. funkcionalni oporavak (bez pokušaja uspostave anatomskog oporavka). Ključna razlika između oporavka kroz regeneraciju i plastičnost neuralnog tkiva je ta da kod regeneracije nužno mora doći do nastajanja novih sinapsi što se postiže kroz produljivanje postojećih ili nastanak novih aksona, dok plastičnost, s druge strane podrazumijeva korištenje već postojećih, funkcionalnih i ozljedom neoštećenih neuralnih puteva i preusmjerenje živčanog impulsa preko njih.

Plastičnost CNS-a jedna je od njegovih prirodnih karakteristika i kod pacijenata s ovakvom vrstom ozljede događa se spontano pri čemu funkcionalni napredak može biti evidentan u

duljem periodu kroz tek nekoliko godina. Terapije ovog tipa ozljede pokušavaju što je više moguće potencirati ove spontane mehanizme neuroplastičnosti. Ovisno o području leđne moždine koja je zahvaćena procesom funkcionalnog oporavak razlikuju se mehanizmi reorganizacije tkiva u cerebralnom korteksu i subkortikalnom motornom centru. Subkortikalna tkiva reorganiziraju se pod utjecajem crvene jezgre, koja potiče njihovu reorganizaciju. Ako je ozljedom zahvaćena i crvena jezgra funkcionalni oporavak cijelog subkortikalnog tkiva biti će značajno smanjen ili će potpuno izostati (Raineteau i sur. 2001).

Trenutno najprimjenjivanija i najdjelotvornija terapija je fizički trening, tj. aktivnost dijela lokomotornog sustava čija su živčana vlakna preživjela traumu. Nedostatci ovog tretmana su to što je obično dugotrajan i bolan za pacijenta zbog čega se ubrzano traga za njegovim alternativama. Ostali oblici tretmana se odnose na terapiju specifičnim antitijelima, inhibitornim proteinima mijelina i neurotrofnim faktorima (Maier i sur. 2009). Naime, pokazalo se da je mijelin ključni inhibitor anatomske reorganizacije neurona leđne moždine zbog čega se u terapiji cilja na njegovu inhibiciju ili dodatak faktora rasta. Razlog tomu je činjenica da mijelin CNS-a sadržava nekoliko proteina koji inhibiraju rast neurona kao što su Nogo-A/NI-250, MAG (*myelin-associated glycoprotein*), BCAN (*brevican*) i VCAN (*versican*). Ove terapije koriste matične stanice samo u *ex vivo* fazi za dobivanje navedenih faktora koji se onda nanose lokalno na mjesto lezije ili daju intravenozno (Onifer i sur. 2011).

2.2. PROGRESIVNE NEURODEGENERATIVNE BOLESTI

Neurodegeneracija je progresivna deterioracija neuralnih struktura i funkcija povezana sa starenjem organizma koja u konačnici dovodi do kognitivnih, motoričkih i senzornih nemogućnosti i demencije (Ramanan i sur. 2013). Gruba identifikacija i klasifikacija neurodegenerativnih bolesti provodi se preko simptomatskih pojava koje uzrokuju pri čemu su najobičajniji motorički poremećaji u piramidalnom i ekstrapiramidalnom neuralnom putu te kognitivni i bihevioralni poremećaji. Kod malog broja pacijenata se primjećuje jasna pojava samo jednog od sindroma, već je učestalija pojava više simptoma iz različitih bolesti, zbog čega je trenutno postavljanje konačne dijagnoze moguće samo pri obdukciji (Dugger i sur. 2017).

Procesi koji u organizmu dovode do neurodegeneracije i označavaju zajedničke karakteristike svih neurodegenerativnih bolesti mogu se podijeliti u četiri skupine ovisno o razini na kojoj djeluju pri čemu su procesi na staničnoj i molekularnoj razini najkarakterističnija obilježja ove skupine bolesti. Od unutar staničnih mehanizama dolazi do apoptoze i autofagije živčanog tkiva u CNS-u zbog čega se pojavljuje prepoznatljiv spužvast izgled tkiva na histološkim preparatima; potom disfunkcije mitohondrija, što uzrokuje nedovoljnu opskrbljenost tkiva kisikom; oksidativnog stresa DNA i pojačane aktivnost ubikvitin- proteasomalnog sistema koja indicira povišenu koncentraciju krivo smotanih ili agregiranih proteina. Na lokalnoj tkivnoj razini dolazi do promijenjene ekspresije adhezije stanica, nekontrolirane endocitoze, smanjene sekrecije neurotransmitera i pojave prionskih proteina. Na razini cijelog organizma može doći do niza upalnih procesa i smanjene aktivnosti imunskog sustava, također poremećaja metabolizma lipida kako duž cijelog živčanog sustava, tako i u membranama drugih usko povezanih organskih sustava i vaskularnih promjena što za najznačajniju posljedicu ima disfunkciju krvno moždane-barijere. Četvrta skupina mehanizama karakterističnih za neurodegenerativne bolesti povezana je uz utjecaj koji na živčani sustav ima razvoj živčanog sustava i starenje, a to su epigenetičke promjene, promjene u ekspresiju neurotrofnih faktora i različit stupanj aktivnosti telomeraza (Ramanan i sur. 2013)

Navedene značajke su posljedica taloženja proteina aberantnih fizio- kemijskih karakteristika u mozgu i perifernim organima. Ova spoznaja je omogućila i uspostavu klasifikacije neurodegenerativnih bolesti temeljene na proteinu koji se najviše taloži u živčanom sustavu. Prema klasifikaciji neurodegenerativnih bolesti temeljenoj na proteinima razlikujemo: tautopatije, α - sinukleinopatije, TDP- 43 proteinopatije, FUS/ FET proteinopatije, prionske bolesti, bolesti uzrokovane pojavom tri-nukleotidnih repeticija, neuroserpinopatije, feritinopatije i cerebralne amiloidoze (Kovacs i sur. 2017).

Postoji sve veća potreba za otkrivanjem i razvojem terapija protiv neurodegenerativnih bolesti zbog sve većeg broja ljudi koji su njima zahvaćeni. Trenutni podaci Američkog nacionalnog instituta za zdravstvo pokazuju da trenutno 5 milijuna Amerikanaca boluje od Alzheimerove bolesti, 1 milijun od Parkinsonove bolesti, 400 000 milijuna od multiple skleroze i 30 000 od Huntingtonove bolesti što su za sada najučestalije neurodegenerativne bolesti. Prognoze govore da će do 2030. neurodegenerativnim bolestima biti zahvaćeno 12 milijuna Amerikanaca, tj. jedna od pet osoba starija od 65 godina (internetski izvor).

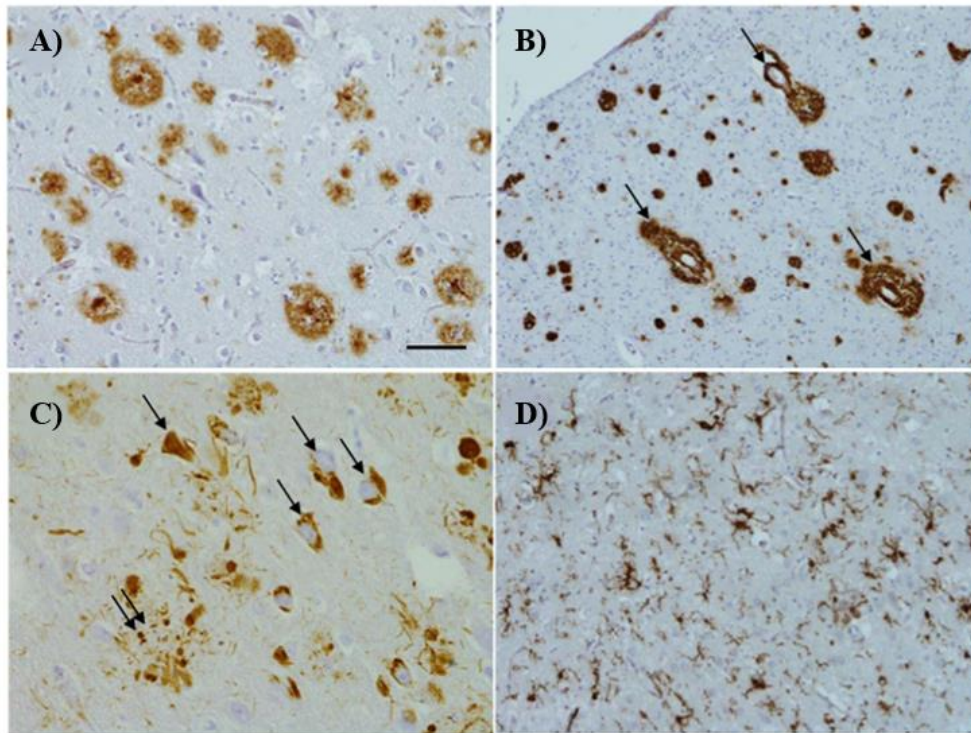
2.2.1. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest spada u skupinu tautopatija, neurodegenerativnih bolesti definiranih prisutnošću agregata proteina *tau*, a ujedno je i najraširenija neurodegenerativna bolest. Procjenjuje se da trenutno 44 milijuna ljudi živi s demencijom, a Alzheimerova bolest smatra se u 50- 75% slučajeva njezinim uzročnikom. O značaju nalaženja njene terapije govori činjenica da je ova bolest od strane Svjetske zdravstvene organizacije proglašena (WHO) proglašena globalnim, javnim svjetskim prioritetom, jer u 112 godina od njezinog otkrića još nije nađen ni jedan tretman kojim bi se tretirali sami uzroci bolesti (Lane i sur. 2018).

Najznačajnija klinička karakteristika ove bolesti je demencija, što je stečeni kognitivni poremećaj normalne moždane aktivnosti, koji direktno i aktivno utječe na svakodnevne ljudske aktivnosti i glavni je uzrok ovisnosti pacijenta o stalnom nadzoru i kliničkoj skrbi. Uz to još se često javljaju poteškoće s ispunjavanjem paralelnih zadataka („multitasking“) i gubitak povjerenja u članove najbliže okoline. Kako stanje napreduje kognitivne teškoće postaju sve dublje i rasprostranjenije kroz veći spektar aktivnosti. U jako uznapređovalom stadiju bolesti može doći do naglih i drastičnih promjena raspoloženja i ponašanja, poremećaja pokretljivosti, halucinacija i napadaja. Iako diferencijalna dijagnoza Alzheimerove bolesti može biti donesena već pri ranim manifestacijama nekih od ovih simptoma konačna dijagnoza donosi se tek nakon obdukcije. Smrt nastupa u prosjeku 8, 5 godina nakon pojave prvih simptoma (Lane i sur. 2018).

Agregati proteina tau glavni su uzročnik patologije ove bolesti, a nastaju radi poremećaja u staničnim mehanizmima neurona, gdje je ovaj protein eksprimiran u velikoj mjeri, što za posljedicu ima staničnu smrt neurona. Tau je protein ključan u stabilizaciji mikrotubula, a potvrđena je i njegova uloga u održavanju strukture cijelog neuralnog tkiva u mozgu (Orr i sur. 2017). Najprepoznatljivije patološke karakteristike Alzheimerove bolesti direktna su posljedica stvaranja tau agregata, a to su amiloidni plakovi i klupka neurofibrila (Sl 3.). Osim toga pojavljuju se abnormalno širenje neurofilnih niti (dio živčanog sustava kojeg čine demijelizirani aksoni, dendriti i glija stanice koji međusobno tvore nepredviđene sinaptičke regije), distrofični

neuriti, povećanje broja astrocita, aktivacija mikroglia stanica i cerebralna neuropatija. Daljnje posljedice ovih patoloških procesa uključuju neurodegeneraciju uz gubitak sinapsi i neuralnog tkiva.



Slika 3. Prikaz patologije Alzheimerove bolesti na histološkim preparatima metodom imunohistokemijskog bojanja. A) $A\beta$ (amiloid beta) plakovi u frontalnom korteksu B) cerebralna amiloidna angiopatija u kojoj se $A\beta$ nakuplja unutar krvnih žila E) klupka neurofibrila (jednostruke strelice) i plakovi neurita (dvostruka strelica) F) mikroglijalna reakcija na upalne procese živčanog tkiva (Preuzeto od Lane i sur. 2018).

Neuralne matične stanice (NSC) dosada su pokazale veliki potencijal u liječenju Alzheimerove bolesti svojim parakrinim djelovanjem. Transplantacija NSC potaknutih na sekreciju faktora rasta povećala je neurogenezu i kognitivnu funkciju kod glodavaca s Alzheimerovom bolešću i u mozgu ostarjelih primata. Transplantacija ljudskih NSC s nadekspresijom kolin acetiltransferaze u kolinergične neurotoksične modele glodavaca rezultirala je povratkom spacijalne memorije i poboljšanje problema u učenju. Istraživanja transplantacije NSC bez dodatnih modifikacija na glodavcima također su pokazala smanjenje upalnog područja u mozgu i sinaptogenezu (proces formiranja sinapsi). Iako terapijski mehanizmi ovih procesa još nisu

poznati smatra se da su učinci postignuti kroz parakrino otpuštanje neuroprotektora, modulatora imunskog sustava i direktno poticanjem diferencijacije neurona.

Suprotno tome, matične stanice dobivene iz koštane srži, ne mogu se koristiti za transplantaciju, već se u terapijske svrhe koriste benefiti njihovih parakrinih faktora koji stimuliraju proliferaciju i diferencijaciju neuralnog tkiva. Mehanizam preko kojih rade ovi parakrini faktori uglavnom je kroz antiupalne procese i modulaciju imunskog sustava pri čemu u signalnoj kaskadi dolazi do aktivacije citokina IL-10, TNF- α i IL-1 β . Osim terapije derivatima MSC-a može se primijeniti i intravenozno ubrizgavanje suspenzije ovih stanica pri čemu se koristi njihova sposobnost prelaska krvno-moždane barijere. Istraživanja su pokazala da nakon prelaska ove barijere MSC uspješno lociraju upalno područje u mozgu i do njega efikasno migriraju, bez indukcije tumora ili autoimunog odgovora tkiva. Zbog minimalne invazivnosti ovaj pristup liječenju ima značajne prednosti pred klasičnim transplantacijama matičnih stanica.

Tip matičnih stanica koje trenutno bilježe najveći rast broja istraživanja su neuralne matične stanice (NSC) dobivene kao derivat iPSC. Neka od značajnijih rezultata dobivenih istraživanjima na ovim stanicama su uspješna transplantacija ljudskih NSC derivata iPSC stanica u područje hipokampusa miša s Alzheimerovom bolesti. Zabilježeno je preživljenje transplantiranih stanica i diferencijacija u zrele kolinergične neurone, a fenotipski učinak na razini organizma bio je povratak specijalne memorije.

Osim u terapijske svrhe, neuroni dobiveni iz iPSC stanica trenutno se koriste i za simulaciju patologije Alzheimerove bolesti *in vitro* što znanstvenicima daje uvid u patogenezu i omogućuje daljnju potragu za potencijalnim oblicima liječenja.

Iako prekliničke studije pokazuju veliki potencijal matičnih stanica u liječenju Alzheimerove bolesti, ovo je područje poznato po lošoj povezanosti između istraživanja provedenim na animalnim modelima (najčešće glodavcima) i ljudima. Do sada je zabilježeno uspješno liječenje Alzheimerove bolesti u modelnim transgeničnim miševima na 50 različitih načina, međutim pokazalo se da su ovi pozitivni učinci terapijama striktno ograničeni na pojedini model te se kao takvi ispostavili beskorisnima u kliničkim istraživanjima na ljudima. Nemogućnost transfera pozitivnih učinaka s modelnih organizama u kliničke tretmane leži u manjkavosti samih modelnih organizama. Naime, simulacija Alzheimerove bolesti se provodi kroz oponašanje dosad poznate patologije ove bolesti bez potpunog shvaćanja njezinih iskonskih uzroka i cjelokupnosti staničnih mehanizama koje ona obuhvaća. Zato je za bilo kakav daljnji

napredak u pronalasku efikasne terapije potrebno detaljnije shvaćanje patogeneze na staničnoj i molekularnoj razini (Duncan i sur. 2017).

3. LITERATURA

- Lane C.A., Hardy J.J., Schott M. (2018) Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* 25: 59-70.
- Arber C., Lovejoy C., Wray S. (2017) Stem cell models of Alzheimer's disease: progress and challenges. *Alzheimer's Research & Therapy* 9:42.
- Dugger B.N., Dickson D.W. (2017) Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9:a028035.
- Duncan, Thomas, Michael V. (2017) Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 8(1): 111.
- Gonzalez, Federico, Stephanie B., Juan C.I.B. (2011) Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nature Reviews Genetics* 12(4): 231.
- Hall, John E. (2011) Guyton and Hall textbook of medical physiology. *Philadelphia, PA: Saunders Elsevier* 107. 1146.
- Isacson O., Deacon T.W., Pakzaban P., Galpern W.R., Dinsmore J. i sur. (1995) Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nature Medicine* 1(11): 1189.
- Jain K.K. (2008) Neuroprotection in traumatic brain injury. U: *The Handbook of Neuroprotection*. Ed.K.K. Jain, Human Press, Totowa, New York, pp. 217-253.
- Jain K.K. (2009) Cell therapy for CNS trauma. *Molecular Biotechnology* 42: 367.
- Kovacs, Gabor G. (2018) Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handbook of clinical neurology*. 145: 301-307.
- Langlois, Jean A., Rutland-Brown W., Wald M.M. (2006) The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation* 21(5): 375-378.
- Maier I.C., Ichiyama R.M., Courtine G., Schnell L., Lavrov I. i sur. (2009) Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury. *Brain* 132(6): 1426- 1440.

- Molcanyi M., Riess P., Bentz K., Maegele M, Hescheler J. i sur. (2007) Trauma- associated inflammatory response impairs embryonic stem cells survival and integration after implantation into injured rat brain. *Journal of Neurotrauma* 24(4): 625-637.
- Mothe A.J., Tator C.H. (2012) Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. *The Journal of Clinical Investigation* 122(11): 3824-3834.
- Norenberg M.D., Smith J., Marcillo A. (2004) The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of Neurotrauma* 21: 429-440.
- Onifer S.M., Smith G.M., Fouad K. (2011) Plasticity after spinal cord injury: relevance to recovery and approaches to facilitate it. *Neurotherapeutics* 8(2): 283-293
- Orr M.E., Sullivan A.C., Frost B. (2017) A brief overview of tauopathy: causes, consequences, and therapeutic strategies. *Trends in Pharmacological Sciences* 38(7): 637-648.
- Parr A.M., Tator C.H., Keating A. (2007) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplantation* 40(7): 609.
- Raineteau O., Schwab M.E. (2001) Plasticity of motor system after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience* 2(4): 263.
- Ramanan V.K., Saykin A.J. (2013) Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *American Journal of Neurodegenerative Disease* 2(3): 145.
- Richardson P.M., McGuinness U.M., Aguayo A.J. (1980) Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature* 284: 264.
- Selkoe D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81(2): 742-766.
- Stichel C.C., Müller H.W. (1998) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Progress in Neurobiology* 56(2):119-148.

Sykova E., Jendelova P., Urdzikova L., Lesny P., Hejčl A. (2006) Bone marrow stem cells and polymer hydrogels- two strategies for spinal cord injury repair. *Cellular and Molecular Neurobiology* 26(7-8):1111-1127.

Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-676.

Weidenfeller C., Svendsen C.N., Shusta E.V. (2007) Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *Journal of neurochemistry* 101(2):555-565.

<https://neurodiscovery.harvard.edu/challenge> (8.6.2019.)

4. SAŽETAK

Poremećaji živčanog sustava danas još uvijek predstavljaju izazov u liječenju zbog kompleksnosti i specifičnosti cijelog sustava. Nizom novih otkrića i razvojem novih laboratorijskih protokola u području kulture stanica i genetskog inženjeringa omogućena je primjena matičnih stanica u svrhe liječenja velikog spektra poremećaja živčanog sustava. U ovom seminarskom radu napravljena je podjela patoloških stanja koje dovode do disfunkcije živčanog sustava te do sada ispitivanih terapija za svako od tih stanja primjenom matičnih stanica.

Dvije glavne skupine na koje su podijeljeni poremećaji živčanog sustava su fizička oštećenja jednog dijela CNS-a i progresivne neurodegenerativne bolesti. Zbog razlika u pristupu terapiji primjeri fizičkih oštećenja živčanog sustava su traumatska ozljeda mozga te potpuna i nepotpuna fraktura leđne moždine. Što se tiče neurodegenerativnih bolesti navedene su dosada istražene terapije samo za Alzheimerovu bolest kao najučestaliji oblik ovakvoga tipa poremećaja živčanog sustava. Dosadašnjim istraživanjima u ovom području napravljen je veliki pomak u razumijevanju patologije navedenih stanja i određene su glavne crte strategija liječenja. Ipak, najuznapredovanije od ovih metoda liječenja još su uvijek u fazi kliničkih ispitivanja. Neki od glavnih problema koji će u pogledu njihove široke primjene morati biti riješeni su nekontrolirana migracija matičnih stanica, diferencijacija u pogrešan tip stanica i potencijal za razvoj tumora.

5. SUMMARY

Today, dysfunctions of the nervous system still appear to be a challenge in the treatment due to the complexity and specificity of the whole system. A series of new discoveries and development of new laboratory protocols in the area of cell culture and genetical engineering have enabled the use of stem cells for the purposes of treatment of a wide spectrum of nervous system dysfunctions. This article presents a division of pathological conditions, which lead to dysfunctions of the nervous system as well as stem cell therapies for each of these conditions that have been tested up to date.

Two main groups of nervous system dysfunctions are physical damages of part of the CNS and progressive neurodegenerative diseases. Due to differences in the approach to therapy, examples of physical damages of the nervous system are a traumatic brain injury and a complete and incomplete spinal cord injury. Regarding neurodegenerative diseases, only therapies for the Alzheimer disease, as the most common type of this sort of neural dysfunctions, are described. Previous research in this field have made a big breakthrough in understanding of the pathology of mentioned conditions and determined main guidelines for the strategy of therapy. However, even the most advanced methods of therapy are still in the phase of clinical trials. Some of the major problems that will have to be solved in order for this to become widely used are an uncontrolled migration of stem cells, differentiation of stem cells in a wrong cell type and the potential for tumor development.