Inducirane pluripotentne matične stanice

Ivanković, Danica

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:112225

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Danica Ivanković

Inducirane pluripotentne matične stanice

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, pod vodstvom doc. dr. sc. Filipa Sedlića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

Mentor rada: doc. dr. sc. Filip Sedlić

POPIS KRATICA:

Aβ – hrv. amiloid β peptid

AD – engl. Alzheimer's disease, hrv. Alzheimerova bolest

ASC – engl. adult stem cell, hrv. adultna matična stanica

CPP – engl. cell penetrating peptide, hrv. peptid koji prodire u stanicu

CSC – engl. cancer stem cell, hrv. tumorska matična stanica

DHA – engl. docosahexaenoic acid, hrv. dokosaheksaenoična kiselina

DNA – engl. deoxyribonucleic acid, hrv. deoksiribonukleinska kiselina

ESC – engl. embryonic stem cell, hrv. embrionalna matična stanica

HNF – engl. human newborn fibroblasts, hrv. fibroblasti novorođenčeta

ICM – engl. inner cell mass, hrv. unutrašnja stanična masa

iPSC – engl. induced pluripotent stem cell, hrv. inducirana pluripotentna matična stanica

LQTS – engl. long QT syndrome, hrv. sindrom produljenog QT

MSC – engl. mesenchymal stem cell, hrv. mezenhimalna matična stanica

ROS – engl. reacitve oxygen species, hrv. reaktivni kisikovi radikali

RT-PCR – engl. reverse transcription polymerase chain reaction, hrv. lančana reakcija polimeraze reverznom transkripcijom

SC-β – engl. stem cell-derived β cell, hrv. β stanica stvorena iz matične stanice

Sadržaj

1 UVOD 1
1.1 Osnove o matičnim stanicama 1
1.2 Izvor i uloga matičnih stanica u ljudskom organizmu 1
1.3 Otkriće induciranih pluripotentnih matičnih stanica 3
2 MATIČNE STANICE 4
2.1 Vrste matičnih stanica 4
2.1.1 Embrionalne matične stanice 4
2.1.2 Adultne matične stanice 5
2.1.3 Mezenhimalne matične stanice 6
2.1.4 Inducirane pluripotentne matične stanice 6
2.1.5 Progenitorne stanice 8
2.2 Usporedba ESC, ASC i iPSC 8
2.3 Potencijal diferenciranja matičnih stanica 9
2.4 Specijalizacija i diferencijacija 11
2.5 Uloga adultnih matičnih stanica 12
2.6 Svojstva ESC kao „zlatnog standarda“ 14
2.7 Geni i čimbenici pluripotentnosti 15
3 OSOBINE iPSC 17
3.1 Yamanakino istraživanje 17
3.2 Dokazivanje uspješnog stvaranja iPSC 19
3.3 Nuklearno reprogramiranje 21
3.4 Metode stvaranja iPSC 22
3.4.1 Transdukcija virusnim vektorima 23
3.4.2 Transfekcija plazmidom 24
3.4.3 Izravna dostava proteina 25
3.5 Diferencijacija iPSC 27

4 PRIMJENA iPSC 29
4.1 Proučavanje embrionalnog razvoja i poremećaja 29
4.2 Modeliranje bolesti 30
4.2.1 Model kardiomiocita 30
4.2.2 Model neurona 31
4.3 Regeneracija organa 32
4.3.1 Transplantacija jetara 32
4.3.2 Regeneracija gušterače 32
4.3.3 Regeneracija hrskavice 34
5 ZAKLJUČAK 35
6 ZAHVALE 36
7 LITERATURA 37
8 ŽIVOTOPIS 40

SAŽETAK

Matične stanice su nediferencirane i nespecijalizirane stanice sposobne samoobnavljati se diobom i diferencirati u različite tipove stanica. Izvori matičnih stanica su embrionalne stanice iz zigote, koštana srž, periferna krv i drugi, a hipotetski i tumori u kojima su tumorske matične stanice uzrokuju njihove metastaze i relapse. Matične stanice dijele se na embrionalne, adultne, mezenhimalne, inducirane pluripotentne matične stanice te posebna vrsta, progenitorne stanice. Međusobno se razlikuju prema diferencijacijskoj sposobnosti pa tako postoje totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligopotentne i unipotentne matične stanice. Stanična diferencijacija jest proces pri kojemu se stanica mijenja iz manje specijaliziranog tipa postaje više specijalizirani s određenim funkcijama, čime se stanicama ograničava diferencijacijski potencijal. Nuklearno reprogramiranje je reverzija diferencijacijskog stanja zrele stanice u stanje karakteristično za embrionalne nediferencirane stanice, čime nastaju inducirane pluripotentne matične stanice. Yamanaka ih je prvi 2006.godine uspio stvoriti transdukcijom nekoliko transkripcijskih čimbenika (Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf) virusnim vektorom, a u upotrebi su i druge metode bez manipulacije genomom poput transfekcija plazmidom i direktna dostava proteina. Utvrđivanjem bioloških staničnih osobina, pluripotentnosti i oznaka epigenetskog reprogramiranja dokazuje se uspješnost reprogramiranja. S upotrebom embrionalnih matičnih stanica povezana su mnoga etička pitanja i problem imunološkog odbacivanja, za razliku od induciranih gdje se koriste vlastite pacijentove stanice, no njihove mane su nedostatna učinkovitost u proizvodnji, postojanje „memorije“ o somatskom porijeklu, manipulacija genomom i izazivanje malignih bolesti. U bazičnim znanostima primjenjuju se pri istraživanju patogeneze različitih bolesti, ali i mehanizama djelovanja i određivanju nuspojava novih lijekova. Važne su za proučavanje normalnog rasta i razvoja te za identificiranje uzroka prirođenih anomalija, a njihova budućnost je primjena za regeneraciju i potpunu zamjenu oštećenih tkiva i organa.

Ključne riječi: inducirane pluripotentne matične stanice, pluripotentnost, diferencijacija, reprogramiranje, Oct3/4, Sox2 , Nanog, transdukcija virusnim vektorom, regeneracija

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated and unspecialized cells that possess properties of self-renewal through mitosis/division and differentiation into many cell types. The sources of stem cells are embryonic stem cells from zygote, bone marrow, peripheral blood and others, but also hypothetically tumors in which cancer stem cells cause metastasis and tumor relapse. Stem cells are divided into embryonic, adult, mesenchymal, induced pluripotent stem cells and a special type of cells – progenitor cells. Depending on their differentiation potential, there are totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent and unipotent stem cells. Cell differentiation is a process in which cell changes from a less specialized type into a more specialized type with certain functions, thus limiting cell differentiation potential. Nuclear reprogramming is the reversal of the differentiation state of a mature cell into one that is characteristic of the undifferentiated embryonic cells, thus creating induced pluripotent stem cells. Yamanaka was the first one to create them in 2006 by transduction of several transcription factors (Oct3 / 4, Sox2, c-Myc and KLF) by viral vector, but there are other methods that do not include manipulation of the genome, such as plasmid transfection and direct delivery of the protein. The success of the reprogramming is based on determining the biological properties of the cell, pluripotency and the reprogramming of epigenetic marks. The use of embryonic stem cells is linked with many ethical issues and the problem of immune rejection, as opposed to induced cells, where the patient's own cells are used, but their disadvantages are the lack of efficiency in production, existing "memory" of somatic origin, and manipulation of the genome causing malignancies. In the basic sciences they are applied in the study of the pathogenesis of various diseases, but also in determining the mechanisms of action and the side effects of new drugs. They are important for the study of normal growth and development and for identifying the causes of congenital anomalies, and their future is their application in the regeneration and complete replacement of damaged tissues and organs.

Keywords: induced pluripotent stem cells, pluripotency, differentiation, reprogramming, Oct3 / 4, Sox2, Nanog, viral vector transduction, regeneration

1 UVOD

1.1 Osnove o matičnim stanicama

Matične stanice su nediferencirane i nespecijalizirane stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja diobom i diferenciranja u različite tipove stanica u tijelu za vrijeme ranog života i rasta. Dijeljenjem matične stanice mitozom može nastati novi klon ili se nastala stanica diferencira, u posebnim fiziološkim ili eksperimentalnim uvjetima, u neku drugu stanicu s određenom specijaliziranom funkcijom poput mišićne, crvene krvne ili neke druge stanice. Zahvaljujući osobini samoobnavljanja, stvaranjem vlastitih klonova stanica, matične stanice mogu poslužiti kao vrsta unutrašnjeg sustava za popravljanje koji se može neograničeno dijeliti i nadomjestiti druge stanice dok god je osoba ili životinja živa. Razumijevanje sposobnosti samoobnavljanja pomaže pri otkrivanju disfunkcija staničnog dijeljenja koje uzrokuju razvoj malignih stanica, a nudi i odgovore na pitanja o regulaciji normalne proliferacije i diferencijacije stanica (Watt FM, Hogan BL, 2000).

1.2 Izvor i uloga matičnih stanica u ljudskom organizmu

Kod sisavaca postoje dva glavna tipa matičnih stanica, a to su embrionalne matične stanice (engl. ESC – embryonic stem cell), izolirane iz unutarnje stanične mase (engl. ICM – inner cell mass) blastociste, i neembrionalne, somatske ili odrasle matične stanice (engl. ASC – adult stem cells) koje su pronađene u raznim tkivima (Orford KW , Scadden DT, 2008). Metoda dobivanja ESC iz mišjih embrija pronađena je 1981.godine, a ta otkrića su pripomogla 1998. godine izoliranju matičnih stanica iz ljudskih embrija i njihovom uzgajanju u laboratorijima (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Matične stanice imaju važnu ulogu, a jedna, vjerojatno i najvažnija, jest sposobnost diferenciranja u različite vrste stanica. Time ESC doprinose razvoju cijelog ljudskog organizma zbog mogućnosti diferenciranja u otprilike dvjesto različitih tipova stanica.

Za njihovu diferencijaciju bitni su unutrašnji signali koje kontroliraju stanični geni (autokrina regulacija) te vanjski signali koji su uključeni u parakrinu i endokrinu regulaciju. Interakcija signala tijekom diferencijacije prouzrokuje stjecanje epigenetskih promjena na DNA koje ograničavaju ekspresiju DNA u stanici i mogu se prenijeti dalje staničnim dijeljenjem (Gnecchi M i sur., 2008).

Nekoliko je dostupnih izvora autolognih ASC kod ljudi, a najčešće spominjani su koštana srž, masno tkivo i periferna krv (te krv iz pupčane vrpce netom nakon rođenja), čija upotreba izaziva najmanje rizika za pacijenta. ASC su multipotentne matične stanice koje stvaraju nadomjeske stanica za tkiva ili organe iz kojih su izolirane. U tu skupinu spadaju hematopoetske matične stanice, stanice kože i crijeva. Kao dodatni izvor valja spomenuti i mezenhimalne matične stanice (engl. MSC – mesenchymal stem cell), matične stanice izolirane iz strome vezivnog tkiva (Watt FM, Hogan BL, 2000).

Dobro je poznata teorija nastanka karcinoma iz normalnih stanica koje dobiju sposobnost aberantne proliferacije stvarajući vlastite klonove koji postepeno postaju maligni. Nedavna istraživanja rasvijetlila su mnoga pitanja i uvele novo shvaćanje nastanka tumora, a to se odnosi na postojanje tumorskih matičnih stanica (engl. CSC – cancer stem cell). To je mala subpopulacija stanica unutar tumora koja posjeduje osobine slične normalnim matičnim stanicama kao što je sposobnost samoobnavljanja i diferenciranja, ali i tumorigeneze pri transplantiranju u životinjskog domaćina. Signalni putovi za samoobnavljanje poput Bmi1 i Wnt/β-katenin imaju slične učinke i u normalnim i u tumorskim matičnim stanicama, što upućuje na zaključak da isti molekularni putovi reguliraju obje populacije stanica (Lobo i sur., 2007).

Te stanice opstaju u tumorima kao posebna populacija koja može uzrokovati relapse tumora i udaljene metastaze. Najčešće se nalaze u stanju tumorskog mirovanja zahvaljujući genetskim i epigenetskim promjenama kao i prilagodbi imunološkom sustavu pa ih je nemoguće otkriti. Svojstva tih stanica su metastaziranje, povećana invazivnost, rezistencija na apoptozu, mogućnost popravka tumorske DNA, amplifikacija signalnih putova i čimbenika koji reguliraju cikluse hipoksije i oksigenacije te prilagodbe mikrookolišu, imunološka nevidljivost i otpornost na terapiju zračenjem te na kemoterapiju. Vjeruje se da će upravo te CSC i njihovi markeri biti vrlo važna meta novih protutumorskih lijekova (Patel P, Chen EI, 2012).

1.3 Otkriće induciranih pluripotentnih matičnih stanica

Danas vrlo aktualna tema su inducirane pluripotentne matične stanice (engl. iPSC-induced pluripotent stem cell), za čije je otkriće najzaslužniji Japanac Shinya Yamanaka koji je 2006. godine otkrio način na koji odrasle stanice miša može genetski „reprogramirati" u stadij nalik ESC. Uspjeh metode povezan je sa sposobnošću izazivanja izražavanja čimbenika pluripotentnosti odraslim somatskim stanicama, što ih je reprogramiralo i vratilo u stadij pluripotentnosti (Takahashi K, Yamanaka S, 2006), za što mu je 2012. godine dodijeljena Nobelova nagrada za medicinu zajedno sa Sir John Gurdonom.

Značaj ovih stanica očituje se u potencijalu iskorištavanja njihove regenerativne i reparativne moći u liječenju raznih bolesti kao što je dijabetes melitus, bolesti srca i živaca, makularne degeneracije, opeklina, osteoartritisa, reumatoidnog artritisa i mnogih drugih. Pri transplantaciji uzgojenih iPSC mogla bi se izbjeći reakcija odbacivanja organa posredovana imunološkim mehanizmima zbog korištenja vlastitih stanica (Okita K, Yamanaka S, 2010).

Primjena ovih stanica u bazičnim znanostima povezana je s istraživanjem patogeneze različitih bolesti, ali i mehanizama djelovanja i određivanjem nuspojava novih lijekova. Pored toga, iPSC se koriste za proučavanje normalnog rasta i razvoja te za identificiranje uzroka prirođenih anomalija (Okita K, Yamanaka S, 2010).

Zadaća je ovog diplomskog rada na temelju članaka iz medicinske literature, utvrditi razlike između pojedinih vrsta matičnih stanica, načine na koje se iPSC najefikasnije mogu stvoriti, medicinske indikacije za upotrebu iPSC te prednosti i nedostatke njihove primjene.

2 MATIČNE STANICE

2.1 Vrste matičnih stanica

Znanstvenici su matične stanice podijelili na nekoliko vrsta, a to su embrionalne, adultne ili tkivno-specifične, mezenhimalne, inducirane pluripotentne matične stanice te posebna vrsta, progenitorne stanice. Među njima su utvrđene mnoge sličnosti, ali i poneke razlike koje ih upravo razdvajaju u zasebne skupine.

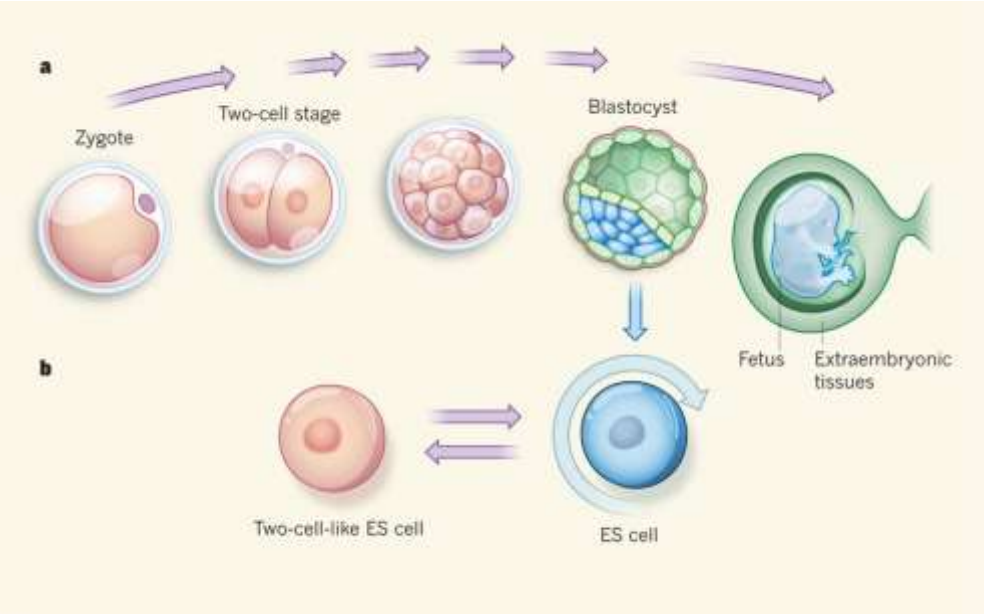
2.1.1 Embrionalne matične stanice

ESC su pluripotentne matične stanice izolirane iz embrija, odnosno ICM blastociste, koja se stvara trećeg do petog dana nakon oplodnje jajne stanice spermijem (Okita K, Yamanaka S, 2010). Te stanice mogu se neograničen broj puta dijeliti i rasti, održavati pluripotentnost i mogućnost diferenciranja u bilo koju stanicu porijeklom iz tri zametna listića (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). Ukoliko su odvojene u stadiju zigote ili u ranim fazama dijeljenja zigote, mogu biti i totipotentne, što znači da su sposobne diferencirati se i u izvanembrionalno tkivo (Slika br. 1).

Izoliranje tih stanica vrši se u preimplantacijskoj fazi, a u staničnoj kulturi nastavlja se uzgajanje. Prema originalnom protokolu uzgajale su se na mišjim embrionalnim stanicama kože, ali ta praksa je danas izašla iz upotrebe, čime je smanjena mogućnost prijenosa mikroorganizama s mišjih stanica na ljudske matične stanice. Nakon što se stanice umnože u dovoljnoj količini u kulturi, obavlja se pasaža (passage). Dakle, stanice se subkultiviraju i prenose u druge stanične kulture gdje ponovo rastu. Stanice ostaju nediferencirane sve dok se nalaze u povoljnim uvjetima za održavanje takvog stanja, a promjenom mikrookoliša, optimalne količine transkripcijskih čimbenika te duljine trajanja njihove ekspresije potiču se na diferencijaciju u određenu staničnu liniju (Okita K, Yamanaka S, 2010).

ESC su određene ekspresijom nekoliko transkripcijskih čimbenika (Oct3/4, Nanog i Sox2) te proteina na staničnoj membrani (glikolipidi SSEA 3 i 4, kreatan sulfat antigeni Tra-1-60 i Tra-1-81) (Takahashi K, Yamanaka S, 2006, Orford KW, Scadden DT, 2008).

Njihova upotreba u istraživanjima i u terapiji je kontroverzna jer iziskuje uništenje embrija ili manipulaciju embrijem u fazi preimplantacije pa se te stanice dobivaju nakon *in vitro* oplodnje jajnih stanica koje su uz informirani pristanak darovane u istraživačke svrhe (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).



Slika br.1: Embrionalne matične stanice izolirane iz blastociste
(Surani A i Tischler J (2012) Stem cells: A sporadic super state. Nature. 487: 43-45)

2.1.2 Adultne matične stanice

ASC, specijaliziranije od ESC, mogu stvoriti različite tipove stanica specifičnog organa ili tkiva u kojemu žive pa se najčešće radi o multipotentnim stanicama. Također mogu ostati u nediferenciranom stanju i samoobnavljati se (Watt FM, Hogan BL, 2000). Jedna od karakteristika ASC jest izražavanje transportera na staničnoj površini iz obitelji ATP – vežuće kazete koji aktivno pumpaju strane organske molekule iz stanica, što ih čini rezistentnima na lijekove (Chaudahary PM, Roninson IB, 1991).

Primjer ovih stanica su krvotvorne matične stanice koštane srži koje mogu dati trombocite, crvene i bijele krvne stanice, ali ne mogu stvoriti neke druge stanice poput stanica pluća ili mozga. Pojedina tkiva i organi sastoje se od malih skladišta ASC čija je zadaća zamijeniti stanice tog tkiva koje su izgubljene u prirodnom obrtaju stanica ili pri ozljedi, poput stanica kože (bazalne stanice epitela ili na bazi korijena dlake) i crijeva (Orford KW, Scadden DT, 2008).

Transdiferencijacija, fenomen utvrđen kod pojedinih ASC, jest mogućnost diferenciranja u tipove stanica koje ne uključuju one iz stanične obitelji bliske ASC, to jest tkiva iz kojeg su potekle. Ta pojava je primijećena kod određenih vrsta kralježnjaka (Watt FM, Hogan BL, 2000). Čak i kad se detektira transdiferencijacija, postotak stanica koje podliježu tom procesu jako je malen pa je cijeli postupak s ciljem stvaranja novih stanica koje pripadaju drugim staničnim obiteljima neučinkovit.

2.1.3 Mezenhimalne matične stanice

Mezenhimalne matične stanice vrsta su multipotentnih matičnih stanica izoliranih iz strome, vezivnog tkiva koje okružuje razna tkiva i organe pa se stoga najčešće nazivaju stromalnim stanicama. Prve su pronađene u koštanoj srži, a sposobne su stvarati stanice kosti, hrskavice, masnog tkiva i mišića. Od tada su se uzgajale i iz drugih tkiva, kao što su masno tkivo, krv iz pupčane vrpce, placenta, amnionska tekućina, zreli mišići, stroma rožnice i dentalna pulpa. Za mnoge od mezenhimalnih matičnih stanica smatralo se da posjeduju i imunomodulatorne osobine (Phinney DG, Prockop DJ, 2007), stoga su testirane za liječenje mnogih imunosnih poremećaja, ali malo je dokaza koji potvrđuju korisnost tog postupka. Još uvijek ne postoji konsenzus jesu li to doista matične stanice i koje sve stanice mogu stvarati, ali zasigurno je riječ o stanicama koje se međusobno razlikuju i čije karakteristike ovise o tome odakle su izolirane i kako su uzgojene.

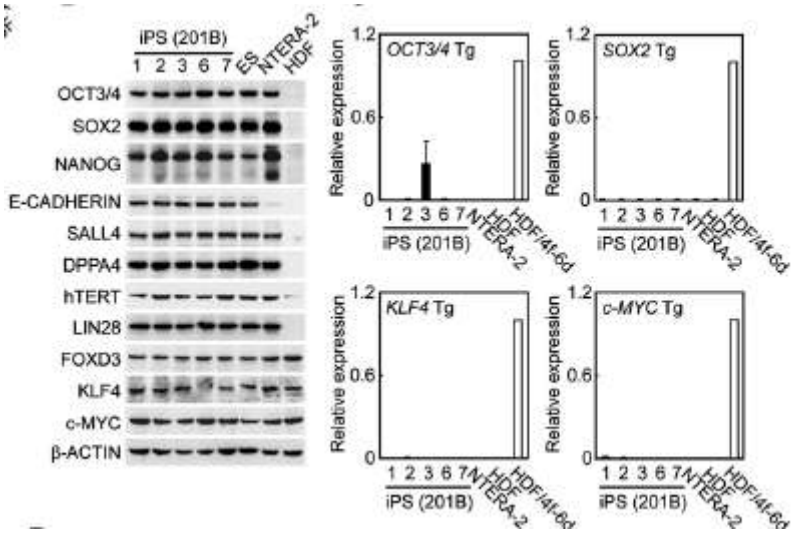
2.1.4 Inducirane pluripotentne matične stanice

Inducirane pluripotentne matične stanice vrsta su matičnih stanica koje se genetskim reprogramiranjem u laboratoriju stvaraju od zrelih odraslih stanica unošenjem nekoliko kombinacija transkripcijskih čimbenika (Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf) kako bi se ponašale poput ESC (Slika br.2), no nisu im u potpunosti jednake (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). Bitna osobina iPSC u stanju pluripotentnosti jest neograničena proliferacija *in vitro.*

ESC i iPSC pokazuju sličnost u morfologiji, izražavanju markera matičnih stanica, stvaranju stanica sastavljenih od sva tri zametna listića diferenciranjem *in vitro* te induciranju nastanka teratoma transplantiranjem tih stanica u imunodeficijentog miša, što je bitna odrednica pluripotentnosti *in vivo* (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Najpopularnija metoda stvaranja ovih stanica, ujedno i prva koja se koristila, je transdukcija gena virusnim vektorima. Navedena metoda iziskuje visoku kontrolu i oprezno postupanje prije transplantacije iPSC ljudima zbog potencijalnih modifikacija genoma domaćina. Dodatnu opasnost predstavlja upotreba protoonkogena c-Myc koji je zbog induciranja stvaranja tumora najčešće zamijenjen nekim drugim čimbenikom (Okita K i sur., 2007).

Obećavajuća su istraživanja koja pokazuju da se čimbenici pluripotentnosti mogu dostaviti i neintegrirajućim vektorima kao što su plazmidi ili pak dostava samih proteina. Ovo ujedno omogućava i prolazni izražaj gena pluripotentnosti za koje je važno da su inaktivirani tijekom inducirane diferencijacije. Glavna prednost korištenja iPSC u terapijske (regeneracijske) svrhe je činjenica da se radi o individualiziranoj terapiji, vlastitim stanicama, što smanjuje mogućnost nastanka reakcije odbacivanja (Takahashi K, Yamanaka S, 2006), a važan su alat i za proučavanje normalnog razvoja organizma i nastanka bolesti te su korisne za razvijanje i testiranje novih lijekova i terapija (Okita K, Yamanaka S, 2010).



Slika br.2: Transkripcijski čimbenici bitni za induciranje pluripotentnosti. Detekcija pomoću Western blot analize i kvantitativne PCR analize
(Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M i sur. (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131, 861–872.)

2.1.5 Progenitorne stanice

Progenitorna stanica specifičnija je od matične stanice, s tendencijom diferenciranja u svoju ciljnu stanicu. Za razliku od matičnih stanica, proliferativna sposobnost progenitornih stanica je limitirana. One se nalaze na polovici diferencijacijskog puta između matične stanice i potpuno diferencirane stanice. Potentnost ovih stanica ovisi o tipu njihove „roditeljske“ matične stanice i o niši u kojoj se nalaze, a najčešće su oligopotentne ili unipotentne. Većinom su u stanju mirovanja ili povremeno aktivne s ciljem održavanja postojećih stanica tkiva i organa, slično kao ASC (Seaberg RM, Van Der Kooy D, 2003). U ovu skupinu spadaju satelitne stanice mišića, progenitorne stanice periosta, pankreasa i subventrikularne zone mozga, stromalne stanice koštane srži, angioblasti i druge stanice.

2.2 Usporedba ESC, ASC i iPSC

Sve matične stanice pokazuju sličnost u sposobnosti samoobnavljanja i u izražavanju pojedinih gena i čimbenika koji ih održavaju u tom stanju te koji utječu na mogućnost diferenciranja u određene tipove stanica, a zajednička uloga im je zamjena izgubljenih, odnosno oštećenih stanica.

Među njima postoje brojne razlike, a najistaknutija je u rasponu potentnosti, odnosno nejednakom diferencijacijskom potencijalu. ESC i iPSC su pluripotentne, sposobne stvarati bilo koji tip stanica u tijelu, dok su ASC multipotentne pa im je diferenciranje ograničeno na tipove stanica organa čijeg su porijekla. Međutim, neke studije su sugerirale postojanje „memorije“ o somatskom porijeklu iPSC, odnosno njihove tendencije diferenciranju u izvornu somatsku stanicu iz koje su nastale reprogramiranjem. Još nema čvrstih dokaza predstavlja li to problem pri regeneracijskoj terapiji baziranoj na iPSC, ali utvrđena je razlika u diferencijacijskom potencijalu između iPSC stvorenih od fetalnih i adultnih mišjih fibroblasta. ESC i ASC lakše održavaju svoju potentnost, za razliku od iPSC, kod kojih i mala promjena u omjeru primijenjenih čimbenika ili vremenu trajanja njihove ekspresije uzrokuje poticanje diferencijacije (Okita K, Yamanaka S, 2010).

Porijeklo matičnih stanica nije jednako. ESC izoliraju se iz embrija, ASC iz različitih tkiva, a iPSC dobivaju se reprogramiranjem *in vitro,* pri čemu može nastati promjena u genomu. Dok se ESC relativno lako izoliraju i uzgajaju u kulturi, ASC rijetko se nalaze u zrelim tkivima, a učinkovitost stvaranja iPSC je vrlo niska, stoga izolacija ASC i iPSC predstavlja veliki izazov. S obzirom da je za terapijsku upotrebu potreban uzgoj velikog broja stanica, ove činjenice umanjuju mogućnost njihove primjene (Watt FM, Hogan BL, 2000, Okita K, Yamanaka S, 2010).

Vjeruje se da se tkiva stvorena pomoću ESC i ASC razlikuju u vjerojatnosti odbacivanja nakon transplantacije, ali sa sigurnošću se ništa ne može tvrditi, stoga što nije proveden dovoljan broj studija. Odbacivanje tkiva nastalih iz ASC nakon transplantacije je manje vjerojatno jer se koriste pacijentove vlastite stanice te stoga nema imunološke reakcije na strano tijelo. Imunološko odbacivanje može spriječiti samo kontinuiranom primjernom imunosupresivnih lijekova koji imaju mnoge štetne nuspojave, a pri korištenju iPSC ti se lijekovi mogu izostaviti iz upotrebe.

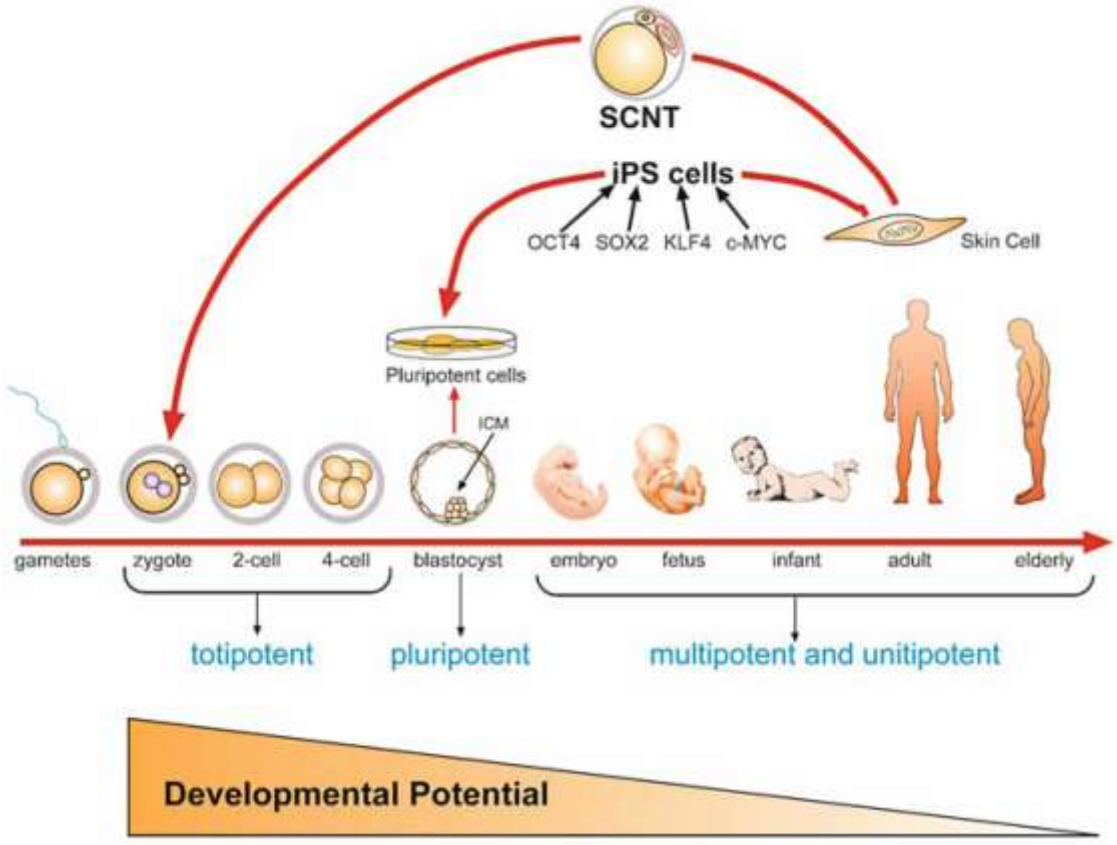
2.3 Potencijal diferenciranja matičnih stanica

Kao što je već spomenuto, matične stanice se međusobno razlikuju prema potentnosti, odnosno diferencijacijskoj sposobnosti (potencijal diferenciranja u različite tipove stanica) pa tako postoje totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligopotentne i unipotentne matične stanice.

Totipotentne (omnipotentne) matične stanice mogu se dijeliti i diferencirati u sve embrionalne i izvanembrionalne tipove stanica te time stvoriti kompletan živi organizam, a nastaju stapanjem jajne stanice i spermija. Stanice stvorene u prvih nekoliko dioba oplođene jajne stanice do četverostaničnog stadija embrija također su totipotentne (Slika br.3). Totipotentnost se gubi napredovanjem razvoja embrija do osmostaničnog stadija. Općenito se smatra da ta restrikcija u razvojnom potencijalu ukazuje na ireverzibilnu diferencijaciju i specijalizaciju ranih embrionalnih stanica u prve dvije linije, a to su ICM iz kojih se stvara fetus i vanjski sloj stanica za razvoj izvanembrionalnog tkiva (Mitalipov S, Wolf D, 2009).

Pluripotentne matične stanice rangirane su po potentnosti za stupanj niže od totipotentnih stanica, a mogu se diferencirati u sve stanice nastale iz triju zametnih listića (ektoderm, mezoderm i endoderm). One stvaraju bilo koji fetalni ili adultni tip stanica, ali ne mogu izvanembrionalno tkivo. Ovoj skupini stanica pripada iPSC (Mitalipov S, Wolf D , 2009).

Multipotentne matične stanice nastale od pluripotentnih stanica nespecijalizirane su stanice koje se mogu se samoobnavljati tijekom dužeg vremena i diferencirati se u brojne tipove stanica s posebnom funkcijom i svrhom. „Širina“ diferencijacije uglavnom je ograničena na one tipove stanica koje se nalaze u specifičnom tkivu iz kojeg su izolirane multipotentne matične stanice. Primjeri ovih stanica su hematopoetske, mezenhimalne i mnoge druge ASC. Izazovi današnjice odnose na pokušaje diferenciranja tih stanica u bilo koju drugu stanicu tijela, na njihovo uspješnije i brže izoliranje te uzgajanje u laboratorijima. Ova metoda gubi na svojoj vrijednosti prilikom liječenja genetskih bolesti jer izolirane stanice najvjerojatnije nose istu genetsku pogrešku te stoga nisu od koristi (Phinney DG, Prockop DJ, 2007).



Slika br.3: Diferencijacijski potencijal matičnih stanica (Mitalipov S, Wolf D, 2009)

Oligopotentne matične stanice mogu se diferencirati u samo nekoliko tipova stanica. Uz mijeloidne, u tu skupinu spadaju i limfoidne, iz kojih mogu nastati B i T limfociti i plazma stanice, te progenitorne vaskularne matične stanice koje stvaraju stanice endotela ili glatkih mišića.

Unipotentne matične stanice nastale od multipotentnih matičnih stanica mogu stvoriti samo jedan tip stanica, njihov vlastiti, no mogu se samoobnavljati. Bez obzira na uski diferencijacijski potencijal, imaju značajnu ulogu u liječenju određenih bolesti i ozljeda. Primjer su matične stanice kože koje se nalaze u epitelu i iz kojih se mogu uzgojiti čitavi slojevi kože potrebni pri transplantaciji u slučaju nastanka opeklina ili drugih oštećenja kože (Slika br.4). Vrijeme potrebno za uzgoj ovih stanica je limitirajući čimbenik njihove upotrebe. S obzirom da je koža primarna barijera prodoru mikroorganizama u ljudsko tijelo, jasno je da taj postupak mora biti što brži i što prije izveden, stoga se druge mogućnosti još istražuju (Blanpain C i sur., 2007).



Slika br.4: Epidermalna regenerativna terapija (Blanpain C i sur., 2007)

2.4 Specijalizacija i diferencijacija

Općenito specijalizacija znači izdvajanje zadataka unutar nekog sustava. Živi organizmi su građeni od jedne stanice (bakterije, protisti), ili od više stanica (biljke, životinje, gljive i ljudi). Upravo zbog činjenice da su građeni od više stanica, za obavljanje različitih funkcija trebaju različite vrste stanica. Svaka od tih specijaliziranih stanica ima drugačiju strukturu koja pomaže izvođenju specifičnih funkcija. Diferencijacija stanica je proces pri kojemu stanice postaju specijalizirane u smislu izvođenja različitih funkcija. Da ne postoji specijalizacija stanica, sve stanice bi izgledale jednako i obavljale bi istu funkciju.

Stanična diferencijacija jest proces pri kojemu se stanica mijenja iz jednog staničnog oblika u drugi, a koji se zbiva mnogo puta tijekom razvoja organizma. Manje specijalizirani tip postaje više specijaliziran s određenim funkcijama, odnosno odvija se proces koji stanicama ograničava diferencijacijski potencijal.

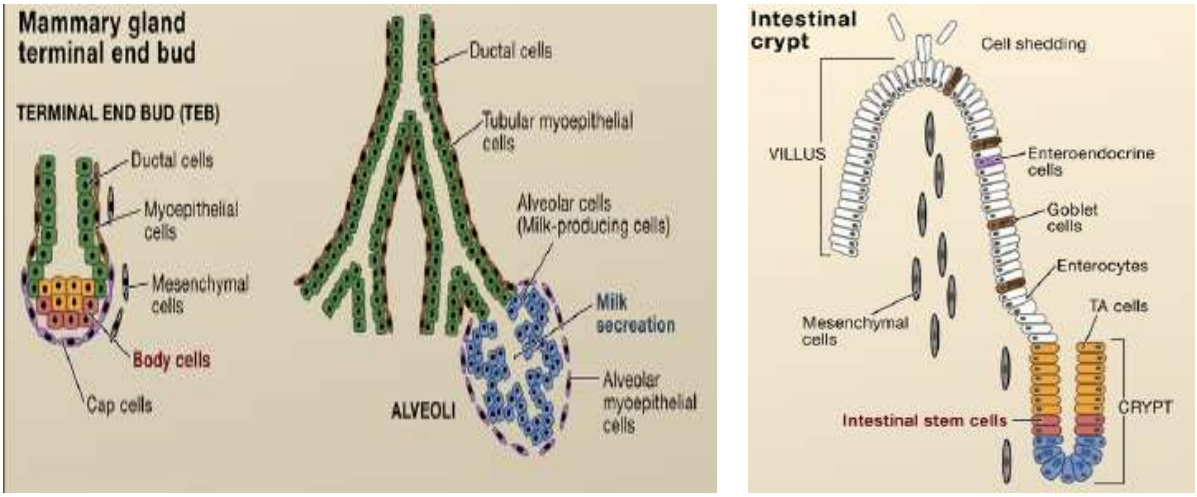
Diferencijacija se zbiva već nakon oplodnje, u stadiju morule, a rezultira stvaranjem embrija i izvanembrionalnog tkiva te se nastavlja u odrasloj dobi dijeljenjem ASC. Poticaj za to je potreba popravljanja tkiva, normalan obrtaj stanica ili nastanak posebnih uvjeta kao što je izlaganje antigenu koje uzrokuje diferencijaciju limfocita B u plazma stanicu. Diferencijacija dramatično mijenja veličinu stanice, oblik, membranski potencijal, metaboličku aktivnost i odgovor na signale, a te promjene najčešće su izazvane modifikacijama u genskoj ekspresiji ili uslijed epigenetskih procesa (Okita K, Yamanaka S, 2010).

Uz nekoliko iznimaka, stanična diferencijacija nikad ne uključuje promjene u DNA sekvenciji, ali pojedine stanice mogu imati vrlo različite fizikalne karakteristike unatoč činjenici da imaju jednaki genom. Zanimljivo, u patologiji se gradus tumora određuje na temelju stupnja stanične diferencijacije, pri čemu slabije diferencirani tumori pokazuju agresivnije ponašanje (Rudel D, Sommer RJ, 2003).

2.5 Uloga adultnih matičnih stanica

Adultne ili somatske matične stanice pronađene su u mnogim tkivima gdje se umnažaju staničnim dijeljenjem kako bi zamijenile odumrle stanice i regenerirale oštećeno tkivo. Te stanice, kao što je već navedeno, mogu se samoobnavljati i po prirodi su multipotentne. Postoji mnogo tipova adultnih matičnih stanica od kojih se hematopoetske rabe rabe vjerojatno najduže, već više četrdeset godina, za transplantaciju u liječenju leukemije, a pored toga koriste se za liječenje koštanih i hematogenih tumora te mnogih drugih bolesti (Orford KW, Scadden DT, 2008).

Matične stanice pronađene su i u dojci gdje služe kao izvor stanica za rast žljezdanog tkiva u vrijeme puberteta i trudnoće, ali imaju važnu ulogu i u karcinogenezi (Liu S i sur., 2005). Intestinalne matične stanice koje se svakodnevno dijele kako bi obnovile stanice u tankom i debelom crijevu smatraju se potencijalnim izvorom polipoza (Slika br.5), a samim time i karcinoma gastrointestinalnog sustava (Orford KW, Scadden DT, 2008). Osim što se matične stanice smatra bitnim rezervoarima stanica za reparaciju i regeneraciju, epigenetske i genetske promjene u njima smatraju se ključnima za nastajanje mnogih abnormalnih stanja, pa tako i raka (Patel P, Chen EI, 2012, Lobo NA i sur., 2007).



Slika br. 5: Matične stanice dojke i intestinalne matične stanice
(Blanpain C, Horsley V, Fuchs E (2007)

Mezenhimalne matične stanice korisne su zbog mogućnosti diferenciranja u razne vrste stanica, a posjeduju i imunomodulatornu ulogu, odnosno mijenjaju imunološki odgovor (Phinney DG, Prockop DJ, 2007). Mnogobrojne studije su pokazale kako ove stanice izbjegavaju alorekogniciju, suprotstavljaju se dendritičkim stanicama i T-stanicama, a stvaraju poseban oblik lokalnog imunosupresivnog okoliša izlučivanjem citokina (Ryan JM i sur., 2005). Njihova upotreba najviše se povezuje s liječenjem bolesti hrskavice (Lach M i sur., 2014).

Proces neurogeneze normalno se odvija i poslije rođenja u dvjema regijama, subventrikularnoj zoni i hipokampusu. U tim područjima detektirane su živčane matične stanice koje se u stanju ishemije mogu se početi stvarati i na drugim mjestima u mozgu, stoga su potencijalno korisne u regenerativnoj terapiji središnjeg živčanog sustava, u liječenju Parkinsonove i Huntingtonove bolesti te multiple skleroze (Alvarez-Buylla A i sur., 2002). U slične svrhe mogle bi koristiti i olfaktorne matične stanice, stanice za osjet mirisa.

Ukupno gledajući, terapijski potencijal adultnih matičnih stanica je u središnjem fokusu mnogih istraživača zbog mogućnosti uzimanja tih stanica direktno od pacijenta (Pagliuca FW i sur., 2014). Zbog mogućnosti transdiferencijacije, odnosno diferencijacije u bilo koju stanicu, ne samo u one stanice tkiva iz kojeg su potekle, proširen je spektar indikacija u kojima bi ove stanice bile adekvatne za liječenje.

2.6 Svojstva ESC kao „zlatnog standarda“

Embrionalne matične stanice smatraju se „zlatnim“ standardom među matičnim stanicama, a za to postoji više razloga. Riječ je ponajprije o pluripotentnim stanicama koje se mogu diferencirati u bilo koju stanicu porijeklom iz triju zametnih listića (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). One imaju normalan kariotip, visoku telomeraznu aktivnost i izražavaju iznimno dugi proliferativni potencijal, a u posebnim uvjetima sposobne su se neograničeno dijeliti i ostati u nediferenciranom stanju. Iz njih mogu nastati prekursorske stanice, ukoliko su potaknute odgovarajućim signalima, a dalje se te stanice mogu diferencirati u sve zrele fenotipove stanica (Watt FM, Hogan BL, 2000). Ta činjenica ih čini korisnim alatom u istraživačkoj i regenerativnoj medicini zato što mogu proizvesti mnogobrojne kopije stanica pogodnih za istraživanja ili kliničku upotrebu.

Nedostatci primjene ovih stanica su etička pitanja i dileme jer se dobivaju iz embrija, ICM, te reakcija odbacivanja od strane domaćina nakon transplantacije zato što se ne koriste vlastite pacijentove stanice (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). Iako su iPSC sličnih svojstva kao ESC, ipak pred njima nemaju prednost jer sve metode koje se danas koriste za njihovo stvaranje pokazuju nisku učinkovitost pa ih je stoga teško izolirati i uzgojiti u laboratoriju u dovoljnom broju.

Druga bitna prednost ESC je manja vjerojatnost nastanka tumora nakon transplantacije negoli uz upotrebu iPSC jer se ne manipulira genomom ugradnjom novih gena (Okita K, Yamanaka S, 2010). Pored navedenog, održavanje pluripotentnosti kod ESC traje kroz dulji vremenski period i ne treba, kao kod iPSC, biti strogo regulirano optimalnom razinom ekspresije čimbenika pluripotentnosti i njihovim trajanjem. U usporedbi s ESC, iPSC posjeduju „memoriju“ o svom somatskom porijeklu, što uzrokuje neuspjeh pri diferenciranju tih stanice u stanice od interesa (Okita K, Yamanaka S, 2010), ali upotreba iPSC pruža mogućnost autologne transplantacije i modeliranje različitih genetskih bolesti ovisno o pacijentu iz kojeg potječu, uz izostanak etičkih dilema.

2.7 Geni i čimbenici pluripotentnosti

Markeri embrionalnih matičnih stanica su molekule bitne za održavanje pluripotentnosti i sposobnosti samoobnavljanja. Različiti tipovi stanica mogu sadržavati jedan ili više markera pa se stoga raznim tehnikama kao što je protočna citometrija pokušavaju dobiti pročišćene ESC koje je važno odvojiti od CSC. Markeri na staničnoj površini su specijalizirani proteini koji se selektivno vežu za druge signalne molekule, a razlikuju se u svojoj strukturi i afinitetu vezanja. U tu skupinu ubrajaju se SSEA markeri, CD markeri, TRA -1-60, TRA-1-81, SCF i mnogi drugi.

Transkripcijski čimbenici djeluju na jezgru stanice te reguliraju izražaj gena. Neki od transkripcijskih čimbenika prisutni su u neaktivnom obliku u normalnim uvjetima, a potaknuti određenim signalom vežu se za posebne unutarnje sekvence (Zhao W i sur., 2012, Okita K, Yamanaka S, 2010, Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Ključni transkripcijski čimbenici za održavanje pluripotentnosti su Oct3/4 , Nanog i Sox2. Za stvaranje iPSC esencijalni su Oct3/4 i Sox2 te dva onkogena Klf4 i c-Myc, a Nanog nije nužan (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). iPSC mogu se stvoriti i uz druge kombinacije čimbenika, ali učinkovitost reprogramiranja je značajno smanjena. Za indukciju reprogramiranja kod miševa, svinja, štakora i psa koristi se ta standardna mješavina čimbenika pluripotentnosti, a kod ljudi je c-Myc zamjenjen LIN28. Učinkovitost reprogramiranja može se povećati dodatkom drugih čimbenika kao što su Essrb, Utf1, Sall4, Tbx3 koji povećavaju ekspresiju gena matičnih stanica povezanih s održavanjem pluripotentnosti, a smanjuju ekspresiju gena povezanih s procesom diferenciranja (Okita K, Yamanaka S, 2010).

Oct3/4 je član Oct obitelji (oktamernih) POU transkripcijskih čimbenika, koji igra glavnu ulogu u održavanju pluripotentnosti i regulaciji diferencijacije matičnih stanica. Ovaj čimbenik je ograničen na pluripotentne i zametne stanične linije. Ekspresija ovog gena održana je dok god se stanica nalazi u nediferenciranom obliku te ona utječe na ekspresiju drugih gena za vrijeme ranog razvoja, kao što su Sox2, Fgf4, Rex1, hCG i Utf1, a odsutnost Oct3/4 vodi u spontanoj diferencijaciji (Zhao W i sur., 2012, Okita K, Yamanaka S, 2010, Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Sox2 je transkripcijski čimbenik koji pripada obitelji Sox gena koji funkcionalno međusobno djeluju s POU proteinskim domenama. Ovaj čimbenik zaslužan je za održavanje pluripotentnosti matičnih stanica, a povezan je sa multipotentnim i unipotentnim matičnim stanicama. Izražen je u preimplantacijskim embrijima i u postmigratornim primordijalnim zametnim stanicama. Unutar Sox obitelji postoje i drugi geni s jednakom učinkovitošću kao što je Sox1 ili s nešto nižom učinkovitošću kao što su Sox3, Sox15 i Sox18

Klf (engl. Krupple-like factor) obitelj regulira veliki broj bioloških procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, razvoj i apoptozu stanica. Klf5 direktno regulira transkripciju Oct3/4 i Nanog, a Klf 4 i Klf2 reguliraju ekspresiju drugih transkripcijskih čimbenika kao što su Nanog, Esrrb, Sall4 i drugih. Klf4 izravno potiskuje aktivnost gena p53, a protein p53 suprimira aktivnost gena Nanog tijekom diferencijacije ESC. S obzirom da je u iPSC pronađena niska razina proteina p53, aktivirani su Nanog i drugi transkripcijski čimbenici bitni za održavanje pluripotentnosti. Pored ovog učinka, Klf 4 aktivira gen p21, čime suprimira proliferaciju stanica, dok čimbenik c-Myc ima suprotan učinak pa je ravnoteža ovih dvaju čimbenika bitna u stvaranju matičnih stanica (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Nanog je transkripcijski čimbenik koji dijelom utječe na održavanje pluripotentnosti i samoobnavljanja ESC (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). Njegova ekspresija opada kako napreduje diferencijacija stanica, što ide u prilog činjenici da je veća izražajnost vezana uz stanje pluripotentnosti. (Zhao W i sur. 2012, Okita K, Yamanaka S, 2010, Takahashi K, Yamanaka S, 2006)

Myc genska obitelj spada u skupinu protoonkogena, dakle uključena je u nastanak tumora. Čimbenik c-Myc pokazao se bitnim za stvaranje mišijh i ljudskih iPSC. Upotreba članova Myc obitelji u indukciji nastanka iPSC problematična je za korištenje u terapijske svrhe na ljudima jer postoji mogućnost razvoja letalnih teratoma u pacijenata kojima bi se te stanice transplantirale pa se zamjenjuje s čimbenikom Glis1 (Okita K i sur., 2007). Uz c-Myc pronađeni su drugi čimbenici koji sa sličnom učinkovitošću induciraju stvaranje iPSC kao što su n-Myc i l-Myc (Zhao W i sur., 2012, Okita K, Yamanaka S, 2010, Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Mnogi drugi markeri popout posrednika signalnih putova u citoplazmi (SMAD1, β-katenin), enzima (alkalna fosfataza, telomeraza) te mRNA vezujućih proteina (LIN28), povezani su s održavanjem pluripotentnosti stanica (Zhao W i sur., 2012).

3 OSOBINE iPSC

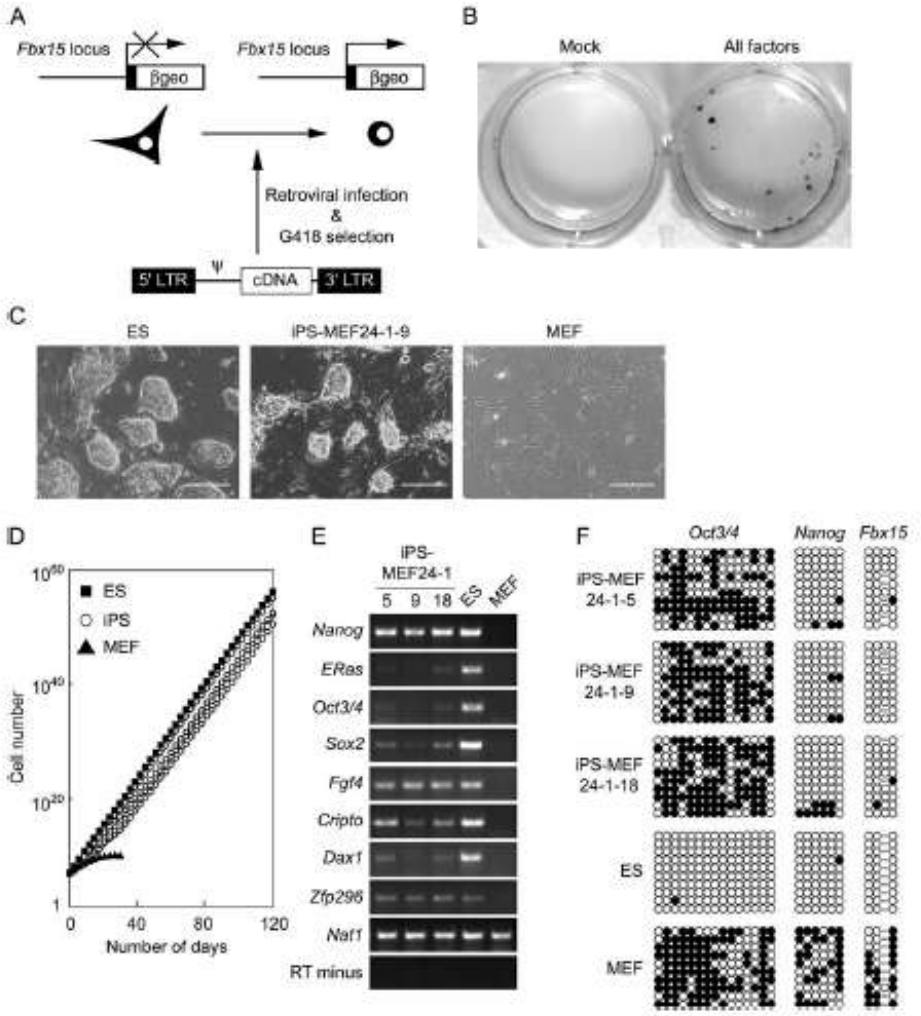
3.1 Yamanakino istraživanje

Shinya Yamanaka, japanski znanstvenik, prvi je uspio 2006. godine dokazati stvaranje pluripotentne matične stanice potaknutim reprogramiranjem zrele stanice koja se zbog toga naziva iPSC. Svoje otkriće temelji na radu s kulturama mišjih embrionalnih i odraslih fibroblasta uz definirane čimbenike. U kasnijim radovima je pokazao i stvaranje ljudskih iPSC.

U prvom istraživanju na miševima je koristio 24 gena hipotetski bitnih za održavanje identiteta ESC kao kandidate za induciranje pluripotentnosti u somatskim stanicama (Slika br. 6). Kako bi se detektirala pluripotentnost, ispitivana je otpornost stanica mišjih fibroblasta na G418 (gentamicin koji inhibira eukariotsku translaciju). Homolognom rekombinacijom u gen Fbx15 unešena je βgeo kazeta koja se sastoji od spoja gena otpornih na β – galaktozidazu i neomicin. ESC s genotipom $Fbx15^{\beta geo/\beta geo}$ mogle su tolerirati visoke koncentracije G418, dok bi somatske stanice s istim genotipom podnosile samo niže koncentracije što je iskorišteno za selekcioniranje ESC. S obzirom na to da je gen Fbx15 aktivan samo kod ESC i ranih embrija, njegova aktivacija nakon dodavanja nekih od 24 čimbenika upućuje na zaključak da se u somatskim stanicama inducirala pluripotentnost i stekla otpornost na G418. Pojedinačnim unošenjem svakog čimbenika transdukcijom retrovirusima u mišje fibroblaste nije stvorena niti jedna iPSC, odnosno nije pronađena nijedna kolonija otporna na G418 jer se Fbx15 lokus nije aktivirao, dok je prijenos svih čimbenika rezultirao nastankom rezistentnih kolonija.

Efektom povlačenja, odnosno uklanjanja jednog po jednog gena iz bazena sačinjenog od 24 člana, utvrđeno je da u procesu reprogramiranja najvažniju ulogu imaju četiri čimbenika, a to su Oct3/4, Sox 2, c-Myc i Klf4, koji se danas nazivaju Yamanakinim čimbenicima. Neočekivano, ali Nanog nije bio neophodan, a za neke gene koji su izraženi u tumorima (Stat3, E-Ras, c-Myc, Klf4 i β-katenin) utvrđeno je da doprinose dugotrajnom održavanju fenotipa ESC i ubrzanoj proliferaciji ESC u kulturi. Stanice koje su stvorene tom metodom pokazivale su morfologiju, osobine rasta te neke markere ESC, ali ne sve pa se te stanice po tome međusobno razlikuju.

Subkutani prijenos iPSC stanica u imunodeficijentnog miša rezultirao je razvojem tumora sastavljenog od tkiva porijeklom iz svih triju zametnih listića, što ide u prilog uspješno induciranoj pluripotentnosti tim čimbenicima. Nakon što su se iPSC uzgojile na staničnim kulturama i adherirale uz posudu, bile su sposobne diferencirati se pa je time potvrđena pluripotentnost i u *in vitro* uvjetima.



Slika br. 6: Stvaranje iPSC iz kultura mišjih fibroblasta pomoću 24 transkripcijska faktora (Takahashi K i Yamanaka S, 2006)

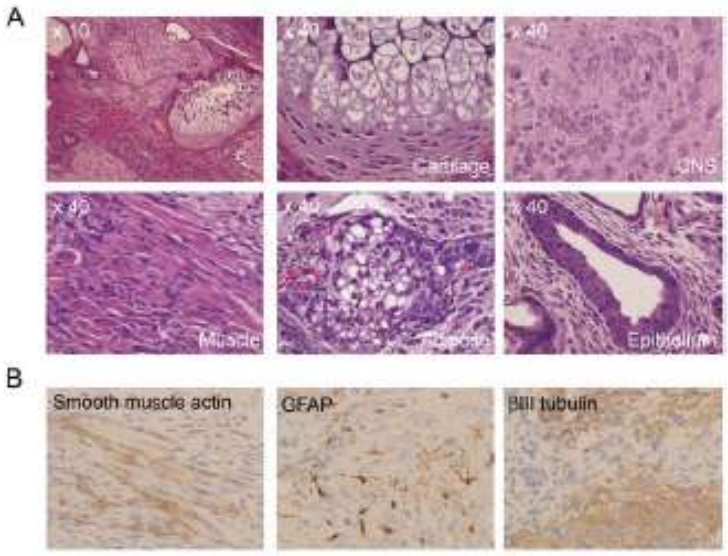
Ovo otkriće pokazuje da se pluripotentne matične stanice mogu izravno dobiti iz kultura fibroblasta ukoliko se dodaju odgovarajući čimbenici. Etičke dileme i poteškoće povezane s korištenjem ESC s ciljem liječenja određenih bolesti te problem potencijalnog odbacivanja tkiva nakon transplantacije kod pacijenata upućuju na važnost stvaranja i istraživanja iPSC dobivenih izravno iz pacijentovih vlastitih stanica (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

3.2 Dokazivanje uspješnog stvaranja iPSC

U mnogočemu su iPSC-e i ESC-e slične, kao na primjer u ekspresiji određenih gena matičnih stanica, metilirajućeg obrasca kromatina, vremena udvostručenja, formiranja teratoma i živućih kimeričnih životinja te održavanja pluripotentnosti i širokog diferencijacijskog raspona. Dokazivanje uspješnog generiranja se provodi na više razina koje uključuju biološke stanične osobine, osobine pluripotentnosti i oznake epigenetskog reprogramiranja.

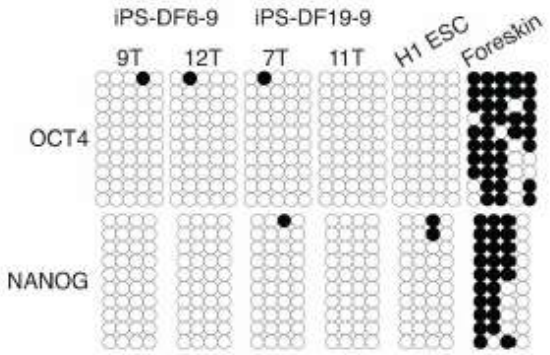
Pokazano je da stanične osobine obuhvaćaju mikroskopski uočene promjene u morfologiji (okrugla jezgra, velika jezgrica i oskudna citoplazma) (Si-Tayeb K i sur., 2010), osobinama rasta (vrijeme udvostručenja je slično vremenu udvostručenja ESC budući da se stanice obnavljaju i mitotički su aktivnije) (Takahashi K, Yamanaka S, 2006) što je utvrđeno metodama kultiviranja i subkultiviranja tijekom dužeg vremena. Izražavanje markera matičnih stanica na staničnoj površini (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60) (Kim D i sur., 2009) i gena matičnih stanica (Oct3/4, Nanog, E-Ras, Dax1 i drugi) se može utvrditi RT-PCR analizom (engl. reverse transcription polymerase chain reaction – lančana reakcija polimeraze reverznom transkripcijom) (Takahashi K, Yamanaka S, 2006) te visokom aktivnošću telomeraze (Kim D i sur., 2009). Pregledom kromosoma pod mikroskopom kod većine iPSC utvrđen je normalan kariotip (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

Pluripotentnost iPSC izražena je kao sposobnost diferenciranja tih stanica u bilo koju stanicu organizma. Na temelju nekoliko karakteristika iPSC zaključuje se o posjedovanju te sposobnosti, a to je mogućnost diferencijacije u neurone (ekspresija βIII tubulina – ektodermalni marker), kardiomiocite (ekspresija GATA4, troponina T i α-aktina mišićja – mesodermalni maker) i hepatocite (albumin, α-fetoprotein – endodermalni marker) (Takahashi K, Yamanaka S, 2006, Si-Tayeb K i sur., 2010). Stvaranje teratoma, tumora sastavljenih od tkiva iz svih triju zametnih listića, u imunodeficijentom mišu nakon unosa iPSC, koje je detektirano imunobojanjem i RT-PCR metodom (Slika br.7), služi kao *in vivo* potvrda pluripotentnosti (Takahashi K, Yamanaka S, 2006, Kim D i sur., 2009). Formiranje embrioidnog tijela, sastavljenog od raznih tkiva kao i teratom, diferenciranjem iPSC nakon adheriranja za površinu u staničnoj kulturi je dokaz pluripotentnosti *in vitro* (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).



Slika br.7: A- histološki prikaz različitih tkiva izoliranih iz teratoma;
B- tehnikom imunobojanja potvrđeni markeri diferencijacije
(Takahashi K i Yamanaka S, 2006)

Epigenetsko reprogramiranje, utvrđeno analizom imunoprecipitacije kromatina, vidljivo je u demetilaciji određenih promotora gena bitnih za reprogramiranje (Slika br. 8) i pluripotentnost, kao što su Oct3/4, Nanog, ukupnoj metilaciji DNA (CpG otoci su metilirani više nego kod drugih tipova stanica, ali, za razliku od ESC, kod iPSC postoji hipermetilacija gena bitnih za razvoj koja može pridonijeti neuspjehu prilikom njihova diferenciranja) (Okita K, Yamanaka S, 2010) te demetilacija histona (H3 histoni su povezani s Oct 3/4, Sox2 i Nanog, što upućuje na njihovu aktivnost). Southern blot analiza je pokazala jedinstveni uzorak transgenične integracije svakog iPSC klona (Takahashi K, Yamanaka S, 2006).

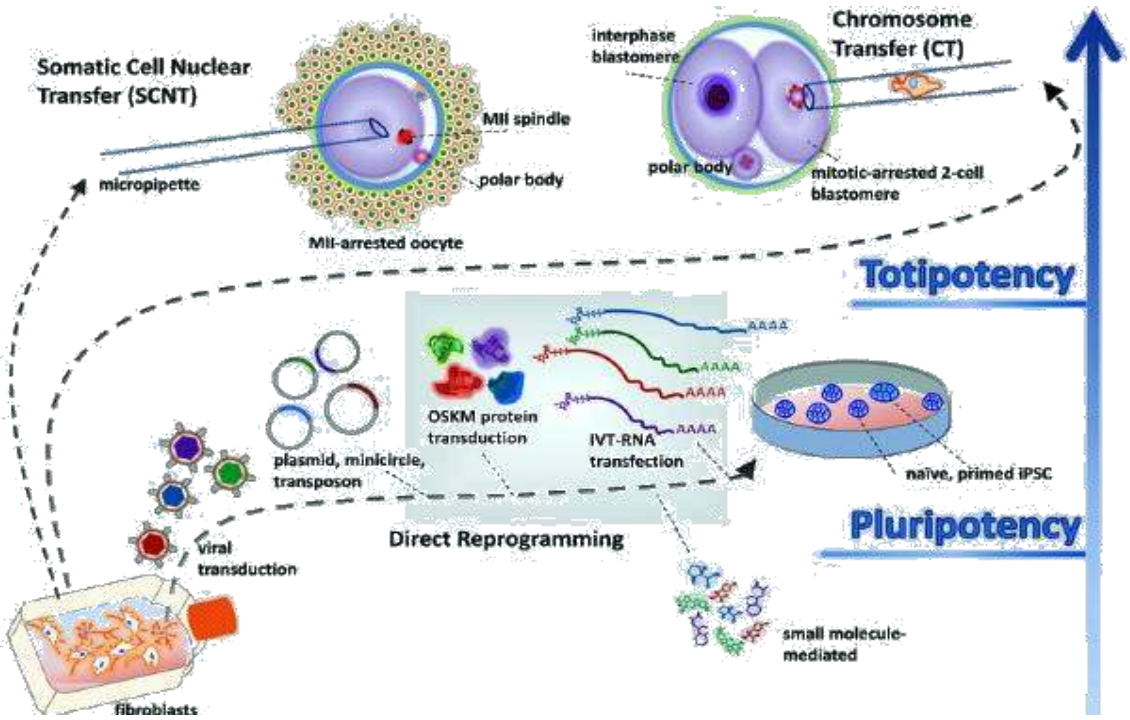


Slika br. 8: Prikaz demetilacije kod iPSC i ESC i pojačane metilacije kod stanica kože (Yu J i sur., 2009)

3.3 Nuklearno reprogramiranje

Nuklearno reprogramiranje su definirali Hochedlinger i Jaenisch kao reverziju diferencijacijskog stanja zrele stanice u ono stanje koje je karakteristično za embrionalne nediferencirane stanice. Danas je poznato da se genski materijal ne gubi tijekom razvoja i diferencijacije. Kao posljedica toga, proces diferencijacije u svakom stadiju odražava ekspresiju određenog seta gena, njegove prijepise pa se čini da upravo ta razlika u ekspresiji određena ili regulirana reverzibilnim epigenetskim promjenama koje su se postepeno odvijale na genomu za vrijeme razvoja.

Epigenetski mehanizmi koji su uključeni u regulaciju različitosti genske aktivnosti uključuju promjene na histonima (kao što su acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija i ADP-ribozilacija), metilacija DNA na mjestima CpG dinukleotida. Ove specifične epigenetske promjene reguliraju ekspresiju ili utišavaju gene za prepisivanje, posredovane razinom pakiranja DNA u kromatin. Postoje dva glavna pristupa nuklearnom reprogramiranju ili reverziji razvojnog procesa (Slika br. 9), a to su prijenos jezgre somatske stanice u oocitu ili fuzija s ESC te direktno reprogramiranje genskom manipulacijom (Mitalipov S, Wolf D, 2009).



Slika br. 9: Nuklearno reprogramiranje dvama pristupima, prijenosom somatske stanice u oocitu i direktnim reprogramiranjem genskom manipulacijom (Mitalipov S i Wolf D, 2009)

3.4 Metode stvaranja iPSC

Najčešće korištene metode za stvaranje iPSC su transdukcija virusnim vektorima uz integraciju transgena u genom primatelja, transfekcija plazmidom koji kodira čimbenike pluripotentnosti i dostava samih proteina koja se odvija bez manipulacije genomom (Okita K, Yamanaka S, 2010). Osim tih metoda u izradi su još mnoge druge (Tablica br. 1).

Tablica br. 1: Prednosti i nedostatci metoda za stvaranje iPSC (Rao MS i Malik N, 2012)

METODA	PREDNOST	NEDOSTATAK
Retrovirus lentivirus	Dobra učinkovitost, lako provodljiva, testiran za više tipova stanica	Trag promjene na genomu reprogramirane stanice
Lentivirusna mRNA	Vrlo visoka učinkovitost	Trag promjena na genomu,samo za jedan tip stanica
mRNA	Nema tragova na genomu	Niska učinkovitost, za jedan tip stanica
Adenovirusi	Nema tragova na genomu	Niska učinkovitost, za jedan tip stanica, tehnički zahtjevno
Sendai virus	Nema tragova genomu, dostupno, dobra učinkovitost, mnogi tipovi stanica	Skupo, tehnički zahtjevno, poteškoće s pacijentima
mRNA	Nema tragova na genomu, visoka učinkovitost, dostupno	Skupo, tehnički zahtjevno, naporno, testirano samo na fibroblastima
Protein	Nema tragova na genomu	Niska učinkovitost, tehnički zahtjevno, dugotrajno, testirano na fibroblastima
Episomal	Nema tragova na genomu, dobra učinkovitost,za većinu stanica,	Neke vrste stanica se reprogramiraju s niskom učinkovitošću (fibroblasti)
Piggy Bac	Nema tragova na genomu, dobra učinkovitost	Testirano jedino na fibroblastima, nema podataka na ljudskim iPSC
Mini-krugovi	Nema tragova na genomu	Niska učinkovitost, jedan tip stanica

3.4.1 Transdukcija virusnim vektorima

Metodu transdukcije virusnim vektorima, retrovirusom, prvi je primijenio Yamanaka, koji je sa svojim timom uspio dediferencirati mišje embrionalne i odrasle fibroblaste u iPSC (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). Postupak transdukcije obuhvaća inficiranje stanice domaćina virusom te integraciju gena (Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4) virusnog vektora u genom stanice primatelja pomoću reverzne transkriptaze, koja omogućava konstantnu ekspresiju transgena za vrijeme reprogramiranja u povoljnom mikrookolišu. Inaktivacija retrovirusnog promotora vjerojatno se zbiva uslijed epigenetskih promjena, što znači da se ekspresija retrovirusnih transgena nastavlja sve dok stanica ne postane iPSC (Okita K, Yamanaka S, 2010).

Ova je metoda lako primjenjiva u većini biomedicinskih istraživačkih laboratorija jer se najduže vremena koristi, a popularnost u primjeni stekla je zbog najboljeg uspjeha u stvaranju kolonija iPSC s učinkovitošću reprogramiranja od 0,01-0,02% (Tablica br. 2), već 25-30 dana od transdukcije (Rao MS, Malik N, 2012). Nakon dodavanja drugih čimbenika i antigena uočena je efektivnost do 0,25% (Park IH i sur., 2008).

Nedostatak ove metode je poticanje nastanka promjene u genomu domaćina (Tablica br.1), odnosno integracija transgena čija nepotpuna ekspresija može ometati endogenu transkripciju mreže čimbenika te tako može voditi k neuspješnoj diferencijaciji (Okita K, Yamanaka S, 2010). Manipulacija genskim materijalom može biti okidač za nastanak malignih bolesti jer ometa endogenu strukturu gena, a osobito uz korištenje onkogena c-Myc (Okita K i sur., 2007).

Zbog tih nedostataka učinjene su pojedine modifikacije ove metode. Unošenjem čimbenika reprogramiranja u obliku jednog vektora kao kazete s loxP sekvencama te Cre-rekombinaze zadužene za njezino izrezivanje nastojalo se smanjiti broj integracijskih mjesta, čime se minimalizira promjena genoma (Okita K, Yamanaka S, 2010). Čak i korištenjem ekscizije Cre-rekombinazom opasnost od rezidualnih dijelova transgena i kromosomalnih disrupcija koje mogu zaostati i maligno alterirati još uvijek je prisutna (Kim D i sur., 2009).

3.4.2 Transfekcija plazmidom

Upravo zbog ograničavajućih činjenica povezanih s upotrebom metode transdukcije retrovirusima pronađeno je alternativno rješenje korištenjem episomalnih plazmida. Prekomjerna ekspresija čimbenika reprogramiranja moguća je uz transkripciju gena plazmida koji nisu integrirani u genom stanice primatelja (Si-Tayeb K i sur., 2010).

S obzirom na to da je ekspresija osnovnih četiriju gena plazmida nestabilna, ubacivanjem tri oriP/EBNA episomalna plazmida koji kodiraju ukupno sedam čimbenika (Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, SV40 Large T antigen, c-Myc i Lin 28) uspješno je osigurana dovoljno duga ekspresija čimbenika reprogramiranja (Yu J i sur., 2009) koja se postepeno, selekcijom pomoću lijekova i presađivanjem na hranjive podloge (pasažom) između 3 do 15 puta, gubi. Približno 20 dana poslije transfekcije uočene su kolonije iPSC s učinkovitošću reprogramiranja 0,0003-0,0006% (Rao MS, Malik N, 2012). Dvije sekvencijalne transfekcije neepisomalnih plazmida koje neovisno kodiraju četiri čimbenika reprogramiranja dovoljne su za stvaranje iPSC (Si-Tayeb K i sur., 2010).

Prednost ove metode ogleda se u DNA domaćina koja je slobodna od integracije transgena pa je time izbjegnuto manipuliranje genomom i induciranje tumorigenog potencijala pa bez obzira na to stanice zadržavaju pluripotentnost (Tablica br.1). Ova procedura je lišena potrebe prekomjernih eksperimentalnih procedura, jednostavna je i pristupačna, a s puno većom sigurnošću može se koristiti u terapeutske svrhe (Si-Tayeb K i sur., 2010).

Glavne mane ove metode su potreba subkloniranja za identifikaciju ljudskih embrionalnih stanica koje su slobodne od egzogene DNA, zatim znanje iz virologije i nužnost sigurnih procedura te detaljnog razumijevanja biokemije proteina (Si-Tayeb K i sur., 2010).
Iako je utvrđena veća sigurnost korištenjem ove metode, učinkovitost reprogramiranja (Tablica br. 2) pomoću plazmida je niska, i to deset puta manja nego kod lentivirusa (0,01%) jer odražava nekonstantnost ekspresije čimbenika reprogramiranja zato što je prisutnost plazmida nestalna (Rao MS, Malik N, 2012). Učinkovitost reprogramiranja može se povećati dodavanjem malih molekula, odnosno kombinacija lijekova kao što su antagonisti TGFβ, tiazovivin, valproična kiselina i natrijev butirat (Si-Tayeb K i sur., 2010).

3.4.3 Izravna dostava proteina

Osim već opisanih načina reprogramiranja stanica, postoji mogućnost stvaranja iPSC izravnim unošenjem reprogramirajućih proteina (Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc) fuzionizanih sa proteinom koji prodire u stanicu (engl. CPP – cell penetrating peptide). Problem ove metode je bio prijenos proteina preko stanične membrane, ali ta poteškoća je riješena korištenjem CPP koji posjeduju veliki udio bazičnih aminokiselina, odnosno fuzijom s poliargininom. Jednostrukim prijenosom proteina uspjelo se prenijeti većinu unutar jezgre, ali oni nisu bili konstantno dostupni u jezgri pa se kolonije iPSC nisu mogle uočiti niti nakon četiri tjedna uzgoja (Kim D i sur., 2009). Zbog toga su se tretmani unošenja proteina ponavljali nekoliko puta u periodu od sedam dana te su tek nakon dva mjeseca uočene iPSC kolonije nakon uzgoja (Rao MS, Malik N, 2012).

Dobivanje iPSC ovim načinom trajalo je dva mjeseca, što je dva puta duže negoli virusnom transdukcijom, a učinkovitost je znatno niža (0,001%) u usporedbi s korištenjem retrovirusa (0,01%) (Park IH i sur., 2008, Yu J i sur., 2009). Ekspresijski uzorci markera pluripotentnosti nisu se razlikovali od onih kod ESC, što znači da je riječ o prikladnom epigenetskom reprogramiranju u iPSC jer su promotorske regije Nanog i Oct3/4 gena značajno demetilirane u iPSC i ESC, a metilirane u roditeljskim HNF (engl. human newborn fibroblasts) stanicama, što ide u prilog aktivnosti tih gena kod iPSC. RT- PCR metodom nisu utvrđene četiri trangenične mRNA u tim iPSC te je opovrgnuta opcija kontaminacije stanica. DNA fingerprintingom utvrđeno je da su uzorci kariotipa iPSC dobivenih metodom korištenja proteina i retrovirusima identični HNF stanicama, a različiti od ESC. Time je potvrđeno porijeklo iz HNF stanica (Kim D i sur., 2009), a njihova pluripotentnost potvrđena je razvojem tkiva iz svih triju zametnih listića u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.

Prednost ove metode jest što ne mijenja strukturu genoma stanice, nema rizika od korištenja virusa, nema potrebe za uništenjem embrija, DNA transfekcije, potencijalne mutagenosti te efekta opasnih kemikalija i lijekova koji se koriste kod reprogramiranja pomoću plazmida. Tehnologija prijenosa proteina stvara iPSC prikladne za otkrivanje lijekova, stvaranje modela bolesti te buduća klinička istraživanja. Ovaj postupak je jako spor i neučinkovit (Tablica br. 2) te zahtjeva daljnju optimizaciju. Možda bi ova metoda bila bolja i efikasnija kada bi se koristili pročišćeni rekombinantni proteini (Kim D i sur., 2009).

Tablica br.2: Usporedba učinkovitosti metoda za dobivanje iPSC (Rao MS i Malik N, 2012)

METODA	Integracija	Vrijeme (dani)	Učinkovitost/%	Reprogramirani brojni tipovi stanica
Retrovirus	Da	25-35	0,02-0,08	Da
Lentivirus	Da	20-30	0,02-1	Da
Lentivirusna mRNA	Ne	18-26	10,4-11,6	Ne
mRNA	Ne	20	0,002	Da
Adenovirusi	Ne	25-30	0.0002	Ne
Sendai virus	Ne	25	0,5-1,4	Da
mRNA	Ne	20	0,6-4,4	Ne
Protein	Ne	56	0,001	Ne
Episomalni	Ne	30	0,0006-0,02	Da
Piggy Bac	Da	14-28	0,02-0,05	Ne
Mini-krugovi	Ne	14-16	0,005	Ne

3.5 Diferencijacija iPSC

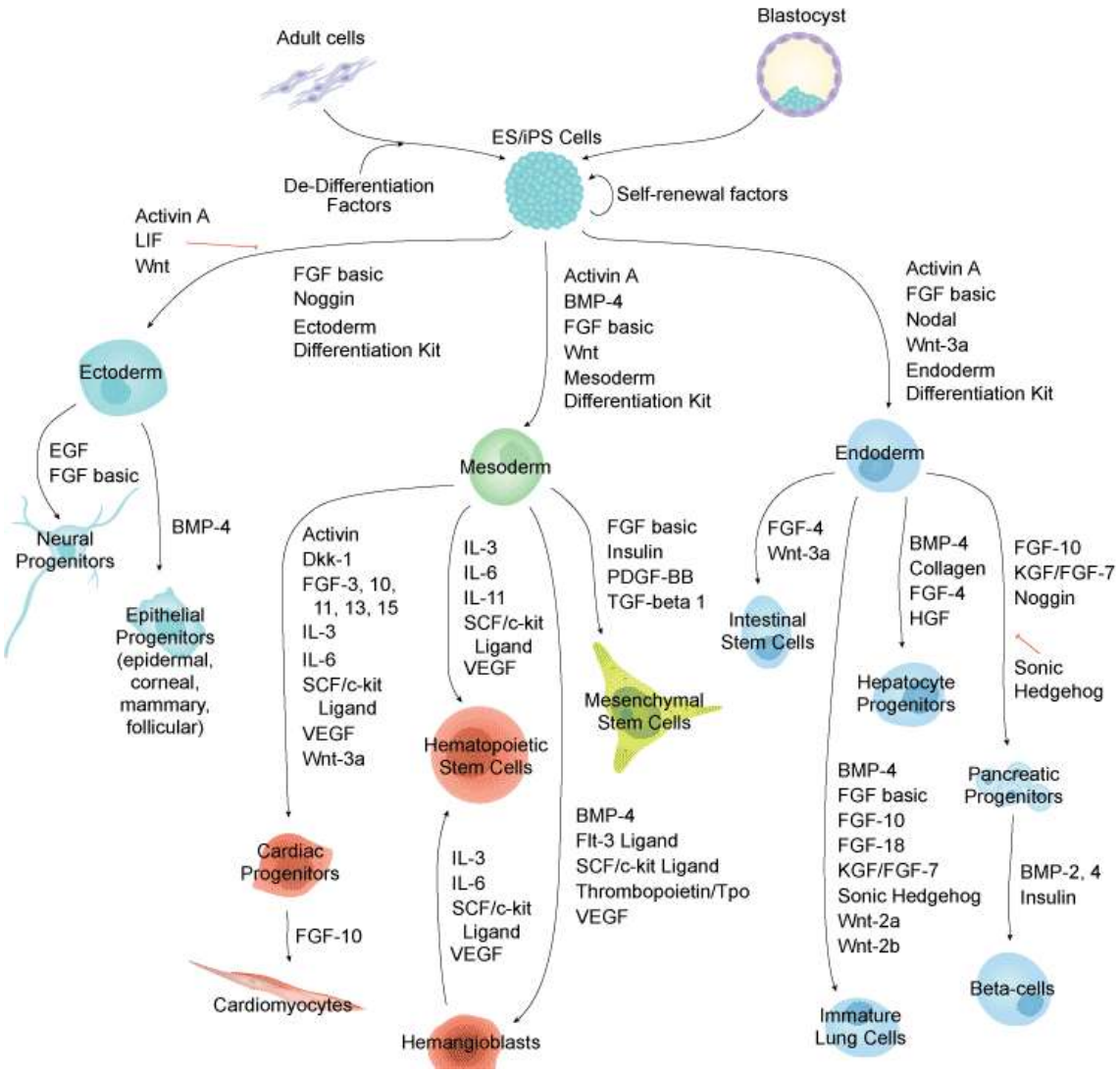
Nakon što se korištenjem jedne od tehnologija inducira pluripotentnost u somatskim stanicama, one su sposobne stvoriti, odnosno diferencirati se u stanicu od interesa ukoliko su joj omogućeni adekvatni uvjeti, signali i pogodan mikrookoliš. Do danas su iz iPSC uspješno diferencirane mnoge različite stanice kao što su kardiomiociti, neuroni, hepatociti, β-stanice gušterače.

iPSC, prethodno stvorene tehnikom transfekcije plazmida, uspješno su diferencirane u stanice nalik hepatocitima u jednoj studiji (Si-Tayeb K i sur., 2010). Derivirane stanice diferencirale su se u kulturi te pokazale sličnost sa normalnim zrelim hepatocitima u epitelnoj organizaciji, velikim omjerom citoplazme prema jezgri, u prominentnoj jezgrici, prisutnosti lipidnih vezikula i stanica s dvostrukim jezgrama. S obzirom da je nakon unošenja karboksidiklorofluorescein diacetat koji je u stanici ostao zarobljen uz pomoć intracelularne esteraze bio izlučen između hepatocita, potvrđeno je postojanje bilijarnih kanalića kod tih stanica jer je to jedini poznati način za izlučivanje tog spoja. Hepatociti stvoreni iz iPSC izažavali su hepatičke markere kao što su FoxA3, E-kadherin, HNF4α, α-fetoprotein i albumin (Si-Tayeb K i sur., 2010).

Iz iPSC s uspjehom su diferencirani i kardiomiociti, čime se dokazalo da se iPSC mogu usmjeriti u razvoj stanica mezodermalnog porijekla, a ne samo smjeru razvoja stanica endodermalnog porijekla. Nakon provedenog protokola utvrđene su stanice koje su se ritmički kontrahirale dva tjedna od nastanka i nastavile sljedećih četrdeset dana. Kucajuće regije izražavale su GATA4 i srčani specifični marker troponin-T (Si-Tayeb K i sur., 2010) te prugasti uzorak koji je ukazivao na strukturalni integritet sličan onom kod zrelih srčanih miocita (Canfield SG i sur., 2012). Pomoću fluo-4 AM fluorescentnog indikatora detektirana je prisutnost kalcija i njegovih oscilacija koje su ukazivale na funkcionalnost stvorenih stanica. Pri tome su neke stanice bile više nalik atrijskim, a druge ventrikulskim stanicama (Si-Tayeb K i sur., 2010). Druge karakteristike koje upućuju na sličnost s ljudskim zrelim kardiomiocitima su prisutne kontrakcije, kardiospecifično imunobojanje koje prikazuje visoko organizirane kontraktilne sarkomere, akcijski potencijali nalik na uobičajene potencijale u atrijima i ventrikulima te adekvatan odgovor na prekondicioniranje anesteticima u svrhu zaštite od oksidativnog stresa (Canfield SG i sur., 2012).

Iz stvorenih iPSC, porijeklom iz dermalnih fibroblasta, diferencirane su i živčane stanice koje su izražavale markere kortikalnih neurona kao što su SATB2 i TBR1, a diferencirani neuroni bili su funkcionalno aktivni (Kondo T i sur., 2013). U *in vitro* uvjetima uspješno su diferencirani i modeli cerebralnih organoida iz kojih su stvorene različite, ali međusobno povezane odvojene regije mozga (Lancaster MA i sur., 2013).

Pored navedenih, iz iPSC stanica stvorene su i β-stanice Langerhansovih otočića, stanice makularnog područja retine te mnoge druge, a broj deriviranih stanica je u porastu (Slika br. 10).



Slika br. 10: Derivirani tipovi stanica iz iPSC i ESC iz svih triju zametnih listića (Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells, http://www.rndsystems.com)

4 PRIMJENA iPSC

4.1 Proučavanje embrionalnog razvoja i poremećaja

Jedno od brojnih područja primjene iPSC je proučavanje normalnog embrionalnog razvoja. Istraživanjima na stanicama modela stvorenih pomoću iPSC nastoje se dobiti odgovori na pitanja o funkciji pojedinih organa i tkiva kroz faze odrastanja i starenja, a također i u kontekstu oboljenja te nekih drugih uvjeta. Bolje razumijevanje unutrašnjeg ustrojstva živog organizma vodi k ranijoj detekciji, boljoj dijagnozi i mnogo učinkovitijim tretmanima liječenja bolesti i ozljeda.

Kompleksnost ustroja ljudskog mozga čini proučavanje mnogih neuroloških poremećaja na životinjskim modelima teškim te potkrepljuje potrebu za pronalaženjem odgovarajućeg *in vitro* modela na kojem je moguće proučavati razvoj ljudskog mozga (Lancaster MA i sur., 2013). Na temelju stvorenog trodimenzionalnog sustava cerebralnog organoida u kulturi deriviranog iz ljudskih iPSC načinjen je model prikladan za proučavanje razvoja ljudskog mozga. Cerebralni organoid sadržava različite odvojene, a ujedno i međuovisne regije mozga, što obuhvaća postojanje korteksa mozga s progenitornim stanicama koje stvaraju zrele podtipove kortikalnih neurona. Ovi modeli mogu predočiti razvojne segmente ljudskog korteksa, a osobito karakteristične progenitorne zone s velikim brojem vanjskih radijalnih glijalnih matičnih stanica (Hansen DV i sur., 2010).

Na ovim modelima analizira se mehanizam rada zdravog mozga, ali i patofiziologija raznih bolesti poput mikrocefalije jer mišji modeli ne prikazuju jednaku težinu kliničke slike te mišje neuralne progenitorne stanice ne podliježu ekspanziji u istoj mjeri kao ljudske stanice prije početka neurogeneze (Lui JH i sur., 2011). Model embrioidnog tijela s mikrocefalijom stvoren je pomoću RNA molekula, koje utišavaju aktivnost CDK5RAP2 proteina i pacijent-specifičnih iPSC (Megraw i sur. 2011). Utišavanjem tog proteina, čime je smanjena ekspresija Sox2 čimbenika, u progenitornim stanicama podržana je prijevremena neuralna diferencijacija na štetu progenitornih stanica jer se progenitorne stanice nisu mogle održati u nediferenciranom stanju. Ishodišna populacija stanica za stvaranje radijalne glije zbog toga se može valjano proširiti, što uzrokuje razvoj cjelokupno manjeg mozga, mikrocefaliju (Lancaster MA i sur., 2013).

4.2 Modeliranje bolesti

Uzimajući u obzir osobine samoobnavljanja i pluripotentnosti, iPSC teorijski predstavljaju neograničen izvor stanica pacijenata koje se mogu diferencirati u ciljnu stanicu te pomoću kojih se može sastaviti model određene bolesti i tako upotrebljavati u proučavanju rada raznih tkiva i organa te također pri testiranje različitih novih lijekova.

4.2.1 Model kardiomiocita

Molekularni mehanizmi odgovorni za nastanak mnogih srčanih bolesti ispitani su na kardiomiocitima deriviranima iz iPSC. Razne nokse oštećuju normalno funkcioniranje srca, a jedna od čestih je hiperglikemija u sklopu dijabetesa melitusa. Povišena razina šećera u krvi izaziva ozljede srca koje prvenstveno nastaju uslijed stvaranja reaktivnih kisikovih radikala (engl. ROS – reacitve oxygen species).

Studija je pokazala da su kardiomiociti diferencirani iz iPSC pacijenata s i bez dijabetes melitusa sačuvali genotip fibroblasta iz kojih su izvedeni, ali im je fenotip jednak fenotipu normalnih kardiomiocita (spontane i ritmične kontrakcije i izražavanje specifičnih srčanih markera) (Yu J i sur., 2009) pa su na stimuluse reagirali onako kako bi reagirali normalni kardiomiociti. Modeli kardiomiocita diferenciranih iz iPSC su poslužili pri ispitivanju učinka kardioprotektivnog prekondicioniranja anestetikom izofluranom u uvjetima visoke koncentracije glukoze. Pri vrlo visokoj hiperglikemiji izolfuran se nije pokazao korisnim, ali je pri blažim hiperglikemijama štitio kardiomiocite što se vidjelo smanjenim otpuštanjem laktat dehidrogenaze, produkta oksidativnog stresa, odgađanjem otvaranja mitohondrijske permeabilizacijske pore te otvaranjem ATP osjetljivog kalijevog kanala.

Ovi *in vitro* uzgojeni modeli nisu idealna preslika jer nemaju sve osobine normalnih kardiomiocita. Ograničenje ove studije je i što je induciranje oksidativnog stresa bilo izazvano vodikovim peroksidom i fotoekscitacijom. Nadalje, izofluran ne djeluje isključivo izravnom zaštitom kardiomiocita, već i neizravno, djelujući na endotelne stanice srca te moduliranjem upalnog odgovora (Canfield SG i sur., 2012).

Modeli kardiomiocita djelomično su razjasnili i patofiziologiju nastanka nasljednog sindroma produljenog QT segmenta (engl. LQTS – long QT syndrome), karakteriziranog nastankom sinkope i nagle srčane smrti. Poznate su različite mutacije u sklopu LQTS, a uloga unutarstaničnog kalcija nije do kraja jasna iako se zna da je promjena razine kalcija usko povezana s produljenjem akcijskog potencijala (Spencer CI i sur., 2014). Mjerenje promjena membranskog potencijala povezanog s preuranjenom depolarizacijom popraćeno je oscilacijama slobodnog unutarstaničnog kalcija. Posrijedi je bio vjerojatno aritmogeni mehanizam ovisan o kalciju, stoga bi ciljani pristup prema regulaciji razine kalcija mogao biti primjenjiv u terapiji LQTS, bez obzira koji je ionski kanal promijenjen mutacijom (Spencer CI i sur., 2014).

4.2.2 Model neurona

Ključnu ulogu u patogenezi Alzheimerove bolesti (engl. AD – Alzheimer's disease) imaju oligomerne forme amiloid – β peptida (Aβ) čije točno patogenetsko djelovanje nije do kraja poznato. Na modelima živčanih stanica deriviranih iz iPSC dobivenih od pacijenata oboljelih od AD utvrđena je poveznica između akumuliranja oligomera Aβ i izazivanja oksidativnog stresa te smrti stanica. Nakupljanjem Aβ u interakciji je s metalnim ionima cinka, željeza i bakra koji potiču oligomerizaciju te dolazi do stvaranja ROS i oscilacija u koncentracijama kalcija koje izazivaju lipidnu peroksidaciju membrana i poremećaj funkcije membranskih proteina.

Koristeći ove vrijedne modele otkriveno je da Aβ oligomeri nisu proteolitički otporni na djelovanje DHA (dokosaheksaenoična kiselina – omega-3 masna kiselina, primarna gradivna komponenta kore ljudskog mozga) koja ublažava stresni odgovor u živčanim stanicama s AD. Različitost u opsegu oksidativnog stresa i odgovora na DHA ukazuje na varijabilne kliničke rezultate kod pacijenata koji su liječeni s DHA. Stanice reagiraju bolje na DHA u ranim fazama nastanka AD te kod sporadičnih slučajeva jer je veći opseg oksidativnog stresa uočen kod familijarnih slučajeva, čime je naglašena genetska komponenta u etiopatogenezi ove bolesti. Osim okolišnih čimbenika i starenja, na razvoj neurodegenerativnih bolesti utječu kod dijela pacijenata i gena. Korištenjem iPSC može se ocijeniti učinkovitost pojedinih lijekova koji nisu polučili uspjeh u nekim kliničkim istraživanjima, kao što je na primjer DHA (Kondo T i sur., 2013).

4.3 Regeneracija organa

Regeneracija organa je jedan od važnih aspekata potencijalne primjene iPSC jer bi ona moglo pridonositi efikasnijem liječenju pacijenata. Iako ESC predstavljaju zlatni standard, njihova primjena je upitna zbog mnogih etičkih pitanja te problema imunokompatibilnosti (Takahashi K, Yamanaka S, 2006). iPSC imaju svoje mane, a to su potencijalno formiranje tumora nakon transplantacije i niska učinkovitost reprogramiranja (Okita K, Yamanaka S, 2010).

4.3.1 Transplantacija jetara

Dokaz koncepta korištenja iPSC u stvaranju ljudskih organa za transplantaciju objavljen je u radu istraživača iz Japana. Ljudski jetreni pupoljci (engl. liver buds) uzgojeni su iz mješavine triju različitih vrsta matičnih stanica, hepatocita stvorenih iz iPSC, endotelnih matičnih stanica te MSC. Ovaj pristup je omogućio samim stanicama samostalno organiziranje u kompleksni organ oponašajući procese fetalnog razvoja. Nakon uzgoja *in vitro*, jetreni pupoljci su presađeni u miša, gdje su jetra brzo spojena s krvnim žilama, čime je omogućen rast organa. Zapanjujuća činjenica jest ta što je jetra zadržala sve svoje funkcije, uključujući zadaće metaboliziranja, ali i sintetiziranja jetrenih proteina. Jedna od opasnosti je moguća transformacije u tumore, stoga ovaj postupak zahtjeva dodatna ispitivanja dugovječnosti transplantiranog organa u tijelu domaćina (sposobnost integriranja i izbjegavanja odbacivanja) (Takebe T i sur., 2013). Ova istraživanja i pokusi korisni su i zbog testiranja djelovanja lijekova na jetrene stanice, čime bi se moglo uštedjeti na novcu, ali i uporabi životinjskih modela.

4.3.2 Regeneracija gušterače

Dijabetes melitus zasigurno spada u skupinu najčešćih bolesti današnjice, a povezan je sa smanjenim stvaranjem inzulina ili rezistencijom tkiva na njegovo djelovanje. Dosadašnji pokušaji stvaranja β stanica koje proizvode inzulin iz ljudskih progenitornih pankreasnih stanica *in vitro* rezultirao je proizvodnjom stanica nezrelog i abnormalnog fenotipa koje nisu proizvodile inzulin na stimulaciju glukozom *in vitro* niti su izražavale β stanične markere kao NKX6-1 i PDX1, a abnormalno su izlučivale druge hormone kao što je glukagon te nisu funkcionirale nakon transplantacije *in vivo* (D'Amour KA i sur., 2006; Cheng X i sur., 2012).

Novim diferencijacijskim *in vitro* protokolom pomoću ljudskih ESC i iPSC može se stvoriti stotine milijuna β stanica (engl. SC-β – stem cell-derived β cell) koje odgovaraju na stimulaciju glukozom. Procesu stvaranja SC-β ne podliježu sve stanice, već jednak broj stanica kao u normalnim pankreasnim otočićima. Uzorak ukupne genske ekspresijske SC-β stanica sličan je uzorku odraslih ljudskih β stanica, no male razlike ipak postoje, a posljedice su promjena u mediju kulture, u načinu izoliranja stanica i uzgoja, u utjecaju susjednih neendokrinih stanica te drugih razloga. SC-β stanice izražavaju markere zrelih β stanica, izlučuju kalcij kao odgovor na glukozu, pakiraju inzulin u sekretorne granule te na multiple podražaje glukozom stanice adekvatno odgovaraju proizvodnjom inzulina. Ubrzo nakon transplantacije ovih stanica u miša, one izlučuju inzulin na stimulaciju glukozom, čime se ublažava hiperglikemija kod miša, iz čega se može donijeti zaključak o njihovom oponašanju normalnih β stanica i *in vitro* i *in vivo* (Pagliuca FW i sur., 2014).

Pokazano je da su transplantirane nakupine SC-β stanica koje su morfološki veće od normalnih otočića izlučivale nešto niže razine inzulina u usporedbi s otočićima s kadaveričnog donora. Razlog toj pojavi može biti nedostajanje okolnih stanica kao što su mezenhimalne, endotelne ili druge endokrine stanice koje podupiru vaskularizaciju i bolje prihvaćanje presatka, pa time i bolji odgovor inzulina na glukozu, a uz sve to normalni otočići su izlučivali relativno više inzulina po stanici negoli veće nakupine stanica (Fujita Y i sur., 2011).

Budući da je broj doniranih kadaveričnih otočića malen, kao i replikacija tih stanica *in vitro,* to je znatno utjecalo na smanjene zaliha β stanica. Novim načinom njihova stvaranja omogućit će se dovoljne zalihe zbog brže, duže i efikasnije replikacije, a period poslije transplantacije do proizvodnje inzulina traje podosta kraće pa će se tako smanjiti potreba za egzogenim inzulinom.

Otkriće hPSC otvorilo je nove mogućnosti za stvaranja zamjenskih stanica i tkiva, odnosno za formiranje cijelog organa gušterače u laboratorijima koji bi mogli biti upotrjebljeni za liječenje dijabetesa melitusa, za testiranje lijekova, proučavanje funkcioniranja β stanica te stvaranje modela za proučavanje bolesti (Pagliuca FW i sur.2014).

4.3.3 Regeneracija hrskavice

Kao posljedica modernog načina života, duljeg životnog vijeka i dužeg radnog vijeka, broj ljudi koji pate od bolesti lokomotornog sustava je u porastu. U tu skupinu ubrajaju se osteoartritis koji spada u vodeće uzroke invaliditeta, reumatoidni artritis te druge bolesti uzrokovane patološkim procesom koje progresivno dovode do oštećenja zglobne hrskavice. Dosadašnje standardne metode liječenja oštećenja zglobne hrskavice dijele se na palijativne, reparativne i regenerativne (osteohondralno presađivanje, autologna implantacija hondrocita te mikrofrakture), ali to su metode koje dovode samo do olakšavanja simptoma i predstavljaju kratkoročno rješenje, neke čak s mnogo nuspojava, a krajnji rezultat je potreba za zamjenom zgloba. Nove metode koje koriste iPSC predstavljaju novo rješenje u liječenju bolesti hrskavice, ali potrebna su dodatna istraživanja na tom području (Lach M i sur.,2014).

Prikladne stanice za ovu upotrebu su MSC, uključujući matične stanice koštane srži, adipozne matične stanice i matične stanice iz sinovije. Limitirajući čimbenici kod njihove upotrebe su smanjenje proliferacije povezano s dobi i ograničen broj željene stanične populacije dobivene iz tkiva pacijenta te veliki troškovi kultiviranja tih stanica i kasnijih operacijskih zahvata.

Oldershaw i njegova grupa utvrdili su protokol sastavljen od tri faze za diferencijaciju ljudskih ESC u hondrocite koristeći različite matrikse i čimbenike rasta (WNT3, aktivin, folistatin, BMP4, FGF2, GDF5 i NT4) (Oldershaw RA i sur., 2010). Promjene u sustavima *in vitro* kultura poboljšavaju stabilnost ili povećavaju izražaj hondrocitnih markera u stimuliranim stanicama za vrijeme razmnožavanja, a one obuhvaćaju hipoksiju i niže razine glukoze, dok više razine u trodimenzionalnim staničnim kulturama povećavaju razinu proteina izvanstaničnog matriksa. Utvrđen je utjecaj fizikalnih čimbenika, odnosno ultrazvuka niskog intenziteta *in vitro,* ali nema dokaza u *in vivo* modelima. Korištenje visokog hidrostatskog tlaka je dovelo do oprečnih rezultata. S jedne strane nije bilo utjecaja na povećanje markera hondrocita, a dodatkom TGF-β u medij povećala se učinkovitost diferenciranja u hondrocite (Lach M i sur., 2014).

Upotreba iPSC koje su stvorene inovativnim i od tumora slobodnim metodama predstavljaju obećavajući postupak u liječenju osteoartritisa ili ozljeda zglobne hrskavice, a na taj način bi se moglo znatno utjecati na kvalitetu života pacijenata (Lach M i sur., 2014).

5 ZAKLJUČAK

Inducirane pluripotentne matične stanice veoma su moćan alat medicine novijeg doba zahvaljujući osobinama samoobnavljanja i širokog diferencijacijskog potencijala s mogućnošću stvaranja svih vrsta stanica ljudskog organizma. Iz navedenih primjera, a i još mnogih drugih provedenih, a ovdje nespomenutih studija, korisnost iPSC stanica je utvrđena za širok spektar patoloških stanja.

Upotreba iPSC-a ima mnogo prednosti pred ESC kao što je mogućnost njihovog stvaranja iz bilo koje zrele stanice tijela, nema etičkih kontroverza povezanih s njihovim korištenjem, manja je šansa od imunološkog odbacivanja jer su te stanice „poznate“ pacijentu pa na njih ne reagira kao na strano tijelo. Nebrojene su medicinske indikacije u kojima bi upotreba iPSC našla svoje mjesto. Do sada su upotrjebljene pri proučavanju mehanizama uključenih u procese rasta i razvoja ljudskog organizma te funkcioniranja različitih organskih sustava, ali također i za modeliranje raznovrsnih bolesti, gdje služe boljem upoznavanju njihove patogeneze. Također, korisne su pri testiranju novih potentnih lijekova prije negoli budu dostupni kao rutinska terapija za liječenje, čime se ranije mogu zabilježiti nuspojave i učinkovitost samih lijekova.

Nedostatci iPSC pred ESC su mnogi, primjenom mogu izazvati nastanak teratoma zbog velikog diferencijacijskog potencijala te zbog ponekad nemogućeg usmjeravanja u cilju stvaranja stanica od interesa, ali i zbog dodatka pojedinih onkogena u „koktel“ transkripcijskih čimbenika koji se koriste pri induciranju pluripotentnosti, poput c-Myc.
S obzirom da je transdukcija virusnim vektorom najčešće primijenjena metoda, veća je vjerojatnost takvog ishoda jer se mijenja struktura genoma stanice primatelja. Iako ta metoda ima najveću učinkovitost u proizvodnji u usporedbi s ostalima, općenito se smatra proizvodnja iPSC pomoću bilo koje od njih nedovoljno učinkovitom, dugotrajnom i skupom da bi se dobio dovoljan broj iPSC koje bi se mogle koristiti kao terapijsko sredstvo.

Budućnost primjene leži u daljnjim usavršavanjima tehnika za stvaranje iPSC koje neće imati negativnih posljedica, bez mogućnosti razvoja malignih tumora i bez mogućnosti diferenciranja u neželjenu staničnu liniju, a i pomoću kojih će se moći osigurati proizvodnja dovoljnog broja tih stanica. Neke od tih metoda su transfekcija plazmida ili direktna dostava proteina za reprogramiranje. Kao novi oblik liječenja, terapija matičnim stanicama može pridonijeti vrhunskim rezultatima u liječenju kroničnih bolesti ili ireverzibilnih oštećenja za koje današnja medicina ne nudi adekvatna rješenja, čime bi se poboljšala kvaliteta života oboljelih ili bi ih se u potpunosti izliječilo te na taj način produžilo životni vijek.

6 ZAHVALE

Zahvaljujem mom mentoru, doc. dr. sc. Filipu Sedliću, na pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Najviše hvala mojim roditeljima, tati Milenku i mami Marici, bratu Ivici i sestri Antoneli na velikoj podršci tijekom studija.

7 LITERATURA

1. Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Research Bulletin 57(6): 751-758.

2. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E (2007) Epithelial Stem Cell: Turning over New Leaves. Cell. 128(3): 445-458.

3. Canfield SG, Sepac A, Sedlic F, Muravyeva MY, Bai X, Bosnjak ZJ (2012) Marked hyperglycemia attenuates anesthetiv preconditioning in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Anesthesiology. 117(4): 735-744.

4. Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. Cell. 66(1): 85-94.

5. Cheng X, Ying L, Lu L, Galva˜ o AM, Mills JA, Lin HC, Kotton DN, Shen SS, Nostro MC, Choi JK, i sur. (2012) Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 10, 371–384.

6. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 24: 1392–1401.

7. Fujita Y, Takita M, Shimoda M, Itoh T, Sugimoto K, Noguchi H, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S (2011) Large human islets secrete less insulin per islet equivalent than smaller islets in vitro. Islets 3, 1–5.

8. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ (2008) Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. Circulation Research. 103: 1204-1219.

9. Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR (2010) Neurogenic radial glia int he outer subventricular zone of human neocortex. Nature. 464: 554-561.

10. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E; Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009) Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. Cell Stem Cell. 4(6): 472-476.

11. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, i sur.(2013) Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular Aβ and Differential Drug Responsiveness. Cell Stem Cell. 12: 487-496.

12. Lach M, Trzeciak T, Richter M, Pawlicz J, Suchorska WM (2014) Directed differentiaion od induced pluripotent stem cells into chondrogenic lineages for articular cartilage treatment. Journal of Tissue Engineering. 5: 1-9.

13. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature. 501(7467):.doi:10.1038/nature12517.

14. Liu S, Dontu G, Wicha MS (2005) Mammary stem cells, self renewal pathways, and carcinogenesis. Breast Cancer Research. 7(3): 86-95.

15. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF (2007) The Biology of Cancer Stem Cells.Annu Rev Cell Dev Biol. 23: 675-699.

16. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR (2011) Development and evolution of the human neocortex. Cell. 146: 18-36.

17. Mitalipov S, Wolf D (2009) Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. Adv Biochem Eng Biotechnol.114: 185-199.

18. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germ-line component induced pluripotent stem cells. Nature. 448: 313-317.

19. Okita K, Yamanaka S (2010) Induction of pluripotency by defined factors. Experimental Cell Research. 316: 2565-2570.

20. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET i sur. (2010) Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. Nat Biotechnol. 28(11): 1187-1194.

21. Orford KW, Scadden DT (2008) Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell – cycle regulation. Nature Reviews Genetics. 9: 115-128.

22. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Hyoje Ryu J, Peterson QP, Greiner D, Melton DA (2014) Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. Cell. 159: 428-439.

23. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature. 451: 141-146.

24. Patel P, Chen EI (2012) Cancer stem cells, tumor dormancy, and metastasis. Front. Endocrin. 3:125. Doi:10.3389/fendo.2012.00125.

25. Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes od tissue repair – current views. Stem Cell. 25(11): 2896-2902.

26. Rao MS, Malik N (2012) Assesing iPSC Reprogramming Methods for Their Suitability in Translational Medicine. J Cell Biochem. 113(10): 3061-3068.

27. Rudel D, Sommer RJ (2003) The evolution of developmental mechanisms. Developmental Biology. 264(1): 15-37.

28. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP (2005) Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. Journal of Inflammation 2:8 doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x.

29. Seaberg RM, Van Der Kooy D (2003) Stem and progenitor cells: The premature desertion of rigorous definitions. Trends in Neurosciences. 26(3): 125-131.

30. Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, Duncan SA (2010) Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection od plasmid DNA encoding reprogramming factors. BMC Developmental Biology. 10:81.

31. Spencer CI, Baba S, Nakamura K, Hua EA, Sears MAF, Fu CC, Zhang J i sur. (2014) Calcium Transients Closely Reflect Prolonged Action Potentials in iPSC Models of Inherited Cardiac Arrhythmia. Stem Cell Reports. 3: 269-281.

32. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 126: 663-676.

33. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike J, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H (2013) Vascularized and functional human liver from an iPSC – derived organ bud transplant. Nature. 499(7459): 481-484.

34. Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. Science. 287(5457): 1427-1430.

35. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2009) Human inducd pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. 324: 797-801.

36. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L (2012) Embryonic Stem Cell Markers. Molecules. 17: 6196-6236.

8 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 6. ožujka 1991. u Makarskoj, Republika Hrvatska, gdje sam završila OŠ oca Petra Perice i opću gimnaziju u SŠ fra Andrije Kačića Miošića. Po završetku gimnazijskog školovanja, 2009. proglašena sam učenicom generacije. Paralelno s općim obrazovanjem sudjelovala sam na županijskim i državnim natjecanjima iz matematike, pohađala sam školu stranih jezika „Euroschool“ te trenirala odbojku u ŽOK „Makarska“.

Studij medicine upisala sam 2009. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2013. godine obavila sam stručnu praksu na Katoličkim klinikama Okruga Kleve, Njemačka, na odjelu interne medicine. Za vrijeme studija bila sam članica pjevačkog zbora „Lege artis“, ženskog odbojkaškog tima medicinskog fakulteta, udruženja CroMSIC te studentske pedijatrijske sekcije. Na katedri za patofiziologiju sam od 2012. do 2015. godine bila demonstratorica.

Sudjelovala sam na CROSS-u (Croatian Student Summit) i na StEPP (Studentska ekipa prve pomoći) edukacijama te položila program osnovnog (engl. BSL – Basic Life Support) i naprednog održavanja na životu (engl. ALS – Advanced Life Support). Služim se engleskim i njemačkim (razina znanja C1) u govoru i u pismu.

e-mail: ivankovic.danica@gmail.com