

Embrionalne matične stanice: tehnike uzgoja i njihova primjena

Kukolj, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:611239>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**EMBRIONALNE MATIČNE STANICE
TEHNIKE UZGOJA I NJIHOVA PRIMJENA**

**EMBRYONIC STEM CELLS
CULTURE TECHNIQUES AND THEIR APPLICATION**

SEMINARSKI RAD

Marina Kukolj
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković - Venturin

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

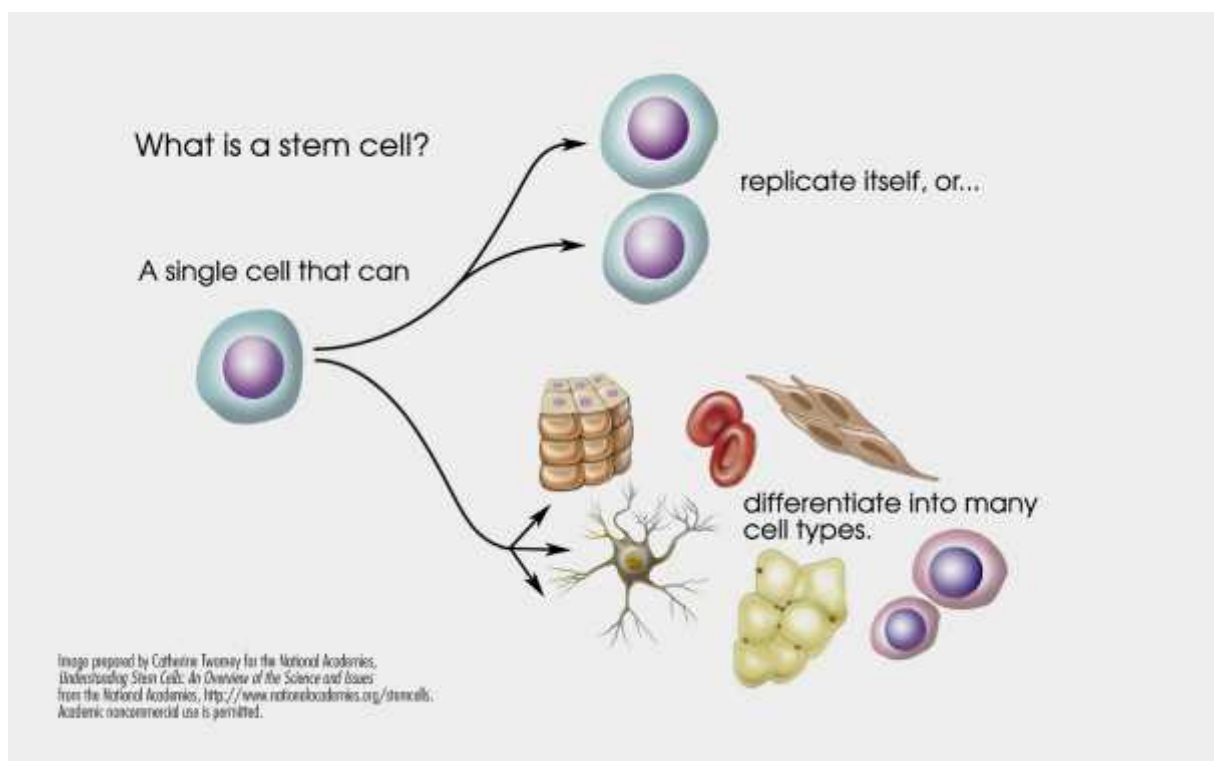
1. UVOD	2
2. MATIČNE STANICE	4
2.1. Embrionalne matične stanice (ES)	4
2.2. Embrionalne stanice karcinoma (EC)	6
2.3. Embrionalne germinativne stanice (EG)	6
2.4. Odrasle matične stanice.....	7
2.4.1. Krvotvorne matične stanice	8
2.4.2. Inducirane pluripotentne matične stanice (iPS).....	9
3. TEHNIKE UZGOJA MATIČNIH STANICA.....	11
3.1. Humane matične stanice u kulturi	11
3.1.1. Održavanje i umnaženje hEM stanica	11
3.1.2. Indukcija diferencijacije EM stanica	12
3.1.3. Izolacija specifičnih stanica iz kulture dobivenih EM stanica	12
3.1.4. Karakteristike izoliranih endotelijskih perkusornih stanica	12
3.1.5. Dobivanje EM stanica u velikom omjeru (scale-up)	13
3.2. Kloniranje	15
3.2.1. Terapijsko kloniranje i manipulacija EMS	15
4. PODRUČJE PRIMJENE	17
5. ETIČKI PROBLEMI	19
6. LITERATURA	20
7. SAŽETAK	21
8. SUMMARY	22

1. UVOD

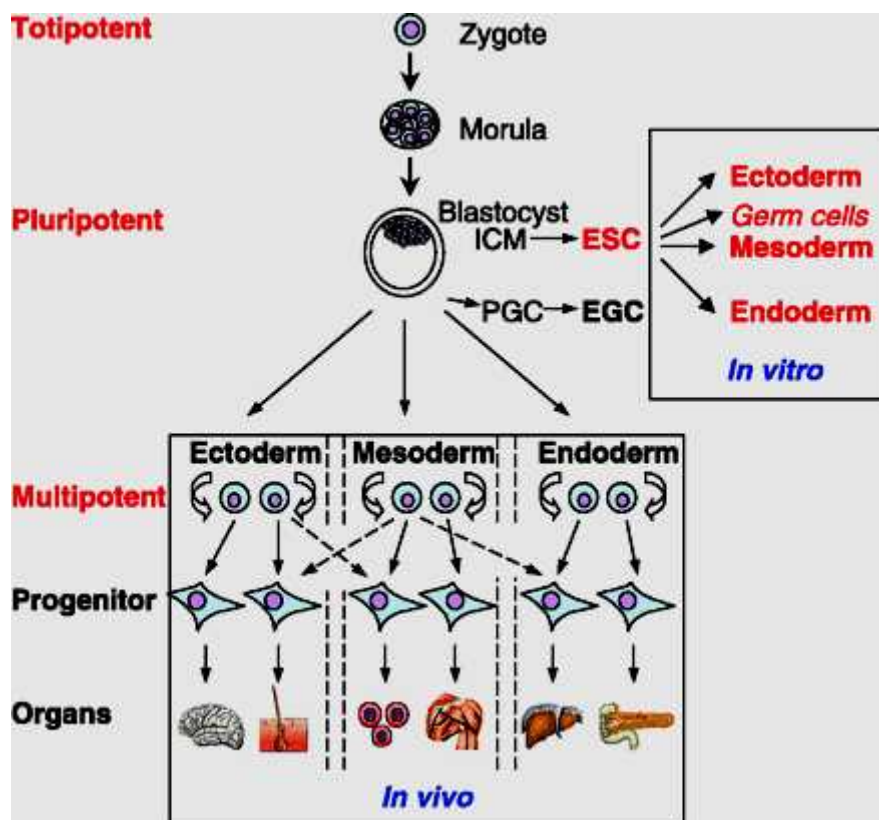
Razvoj na polju matičnih stanica izrastao je iz istraživanja kanadskih znanstvenika Ernesta A. McCullocha i Jamesa E. Tilla iz 1960-ih ¹. Kada je 1981. godine uspostavljena prva kultura embrionalnih matičnih stanica, vjerojatno, niti sami istraživači, Martin Evans i Matthew Kaufman, nisu zamišljali koliko će značenje danas imati njihovo otkriće, a pogotovo koliko će biti očekivanja od embrionalnih matičnih stanica u budućnosti ².

Matične stanice su jedan od važnijih izazova kliničke medicine u 21. stoljeću. Prisutne su u gotovo svim ljudskim tkivima i organima iako su prvotno nađene u krvotvornom tkivu. Temeljne značajke matičnih stanica su sposobnost samoobnavljanja i diferencijacija (**Slika 1.**). Diobom iz matičnih stanica nastaju iste stanice koje ne gube sposobnost diferencijacije (samoobnavljanja) ili stanice poprimaju zreliji oblik (diferencijacija) iz kojih daljnjim procesima diferencijacije, diobe i sazrijevanja nastaju funkcionalno zrele stanice pojedinih tkiva i organa. Potentnost matičnih stanica ponajprije ovisi o diferencijacijskoj sposobnosti. Razlikuju se totipotentna matična stanica (posjeduje sposobnost stvaranja svih stanica embrija, kao i ekstraembrionalnog tkiva /npr. posteljica/), i pluripotentna matična stanica (stvara stanice tkiva embrija, uključujući stanice germinativnog epitela pa tako i bilo koje stanice tkiva i organa). Multipotentna matična stanica stvara stanice isključivo jednog germinativnog sloja npr. multipotentna stanica mezodermalnog krvnog tkiva stvara isključivo krvne stanice, a ne može stvarati živčane stanice ili stanice jetre (**Slika 2.**). Iz unipotentne matične stanice nastaje samo jedan tip stanica npr. germinativne matične stanice stvaraju stanice koje sazrijevaju u spermije ili jajnu stanicu. ³

Pošto se matične stanice mogu uzgajati i transformirati u specijalizirane stanice sa karakteristikama konzistentnim sa stanicama raznih tkiva kao što su mišići i živci uz pomoć kulture stanica, predložena je njihova upotreba u medicinske svrhe ³. Služe kao pomoć u razumijevanju događaja koji se odvijaju tijekom razvoja: identifikacija čimbenika uključenih u specijalizaciju stanica ("*decision-making*" geni), primjena u razvoju i testiranju novih lijekova, mogućnost testiranja novih lijekova na ljudskim staničnim linijama, stvaranje stanica i tkiva koji se mogu koristiti za "terapiju stanicama" i kao zamjena za transplantacije ⁴.



Slika 1. Matična stanica (<http://dels-old.nas.edu/bls/stemcells/what-is-a-stem-cell.shtml>)



Slika 2. Hijerarhija matičnih stanica
(http://www.biology-online.org/articles/embryonic_stem_cells_prospects/figures.html)

2. MATIČNE STANICE

Postoji nekoliko vrsta matičnih stanica sisavaca: embrionalne matične stanice (ES), embrionalne stanice karcinoma (EC), embrionalne germinativne stanice (EG), matične stanice trofoektoderma (TS), stanice ekstraembrionalnog endoderma (XEN), matične stanice amniotske tekućine (AFSC), matične stanice iz pupkovine (CBSC), inducirane pluripotentne matične stanice (iPS) i matične stanice odrasle jedinke (ASC) ⁵.

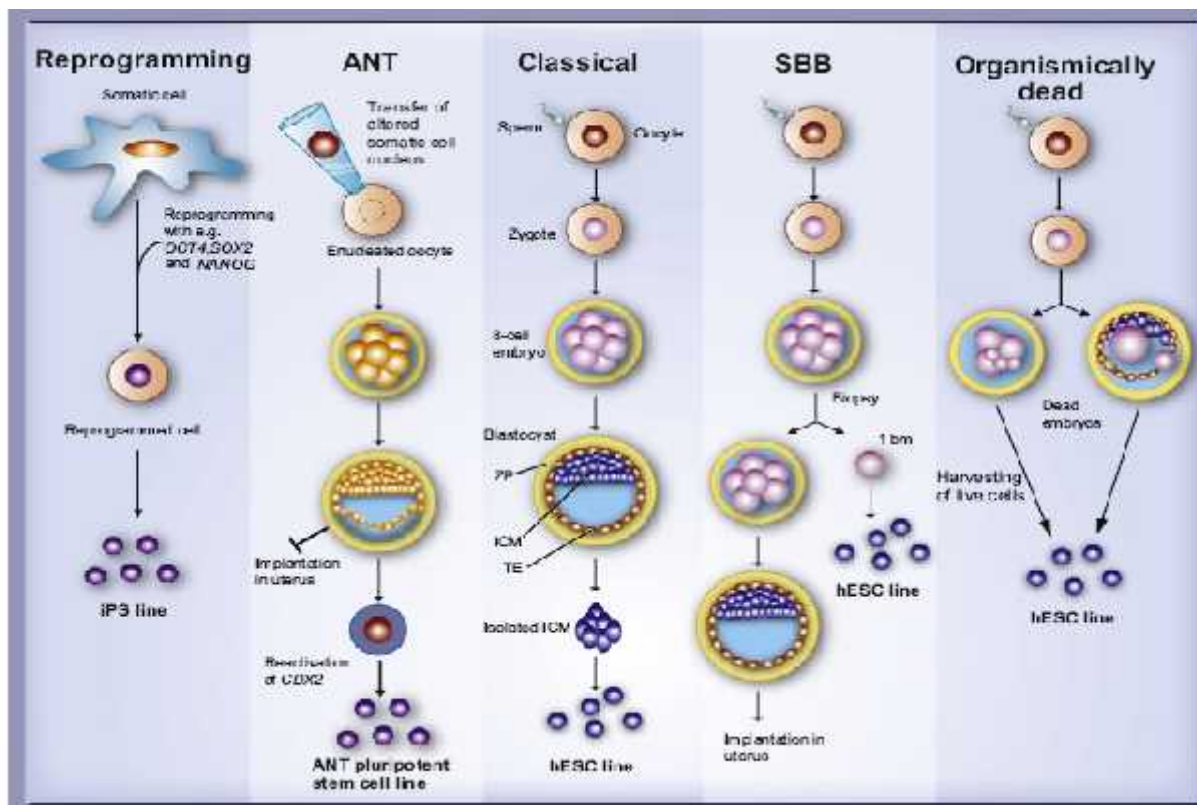
Donedavno se mislilo da je potentnost matičnih stanica primarno vezana za razdoblje embrionalnog razvoja. Nakon fertilizacije jajne stanice nastaje zigota, iz koje u nekoliko prvih dioba nastaju totipotentne matične stanice. Pluripotentne stanice u tom razvoju su stanice unutarnjeg sloja blastociste (u čovjeka nastaju od 7-10 dana nakon fertilizacije). Stanične kulture i stanične linije navedenih struktura nazivaju se embrionalne matične stanice. Nakon 10 dana od fertilizacije matične stanice su usmjerene u multipotentne ili unipotentne. Te se stanice nazivaju i „adultne“ matične stanice, a ako nisu dobivene iz germinativnog tkiva nazivaju se i somatskim. Adultne matične stanice su prisutne u većini tkiva i perzistiraju tijekom života. Održavaju tkiva i njihovu staničnost kao odgovor na ozljedu. Od 2006. godine istraživačima je eksperimentalnim pristupom uspjelo promijeniti potencijal i stadij matičnih stanica. Uzimanjem gena iz pluripotentne embrionalne matične stanice i njihovim prijenosom u zrelije stanice, uspjeli su postići da dolazi do ekspresije gena u stanicama u kojima takva ekspresija nije uobičajena. Tim se potaknutim pristupom zrelije stanice vraćaju unatrag u vrlo nezrelo stanje koje odgovara embrionalnim matičnim stanicama. ³

2.1. EMBRIONALNE MATIČNE STANICE (ES)

Embrionalne matične stanice su kulture stanica izvedene od embrionalnog tkiva epiblasta unutrašnje mase stanica blastociste (**Slika 3.**). Blastocista je rani razvoj embrija – otprilike 4 do 5 dana starog fetusa koji ima svega 50 do 150 stanica. Embrionalne stanice su pluripotentne i iz njih se razvijaju sljedeći slojevi: ektoderm, endoderm i mezoderm. Dakle, mogu se razviti u svaku od više od 200 tipova stanica odraslog tijela čovjeka, kada imaju dovoljnu stimulaciju za specifičan tip stanica. Od njih ne nastaju izvanembrionalne membrane ili placenta. Kada nemaju podražaj za diferencijaciju, embrionalne stanice će nastaviti dijeliti se *in vitro* a svaka sestrinska stanica će ostati pluripotentna. ¹

Do danas je skoro svako istraživanje ES obavljeno uz pomoć embrionalnih matičnih stanica miša (mES) ili ljudskih embrionalnih matičnih stanica (hES). Obje vrste imaju izvorne karakteristike matičnih stanica, ali zahtijevaju drugačija okruženja kako bi zadržale svoje nediferencirano stanje. Embrionalne stanice miša se uzgajaju na sloju želatina i zahtijevaju prisutnost *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF). Ljudske matične stanice se uzgajaju na sloju embrionalnih fibroblasta miša (MEF) i zahtijevaju prisutnost fibroblastnog faktora rasta (bFGF ili FGF-2). Bez optimalnih uvjeta ili genetske manipulacije embrionalne matične stanice bi se ubrzano diferencirale. Ljudska embrionalna matična stanica je također definirana i prisutnošću raznih transkripcijskih faktora i proteina površine stanice. Transkripcijski faktori Oct-4, Nanog i Sox2 čine srž nadzorne mreže koja osigurava obuzdavanje gena koji vode do diferencijacije i zadržavanja pluripotencije. Proteini površine stanice koji se koriste za identifikaciju hES stanica su glikolipidi SSEA3 i SSEA4 te antigeni Tra-1-60 i Tra-1-81.¹

Postoji zakonska regulativa derivacije ljudskih ES stanica, Dickey amendment (1996), koji kaže da država ne financira stvaranje ljudskih embrija za istraživačke svrhe niti financira istraživanja gdje se ljudski embriji uništavaju, odbacuju ili se riskira njihova ozljeda ili smrt i Executive Order 13505 (2009), koji dozvoljava financiranje odgovornog i znanstveno vrijednog istraživanja ljudskih matičnih stanica.⁵



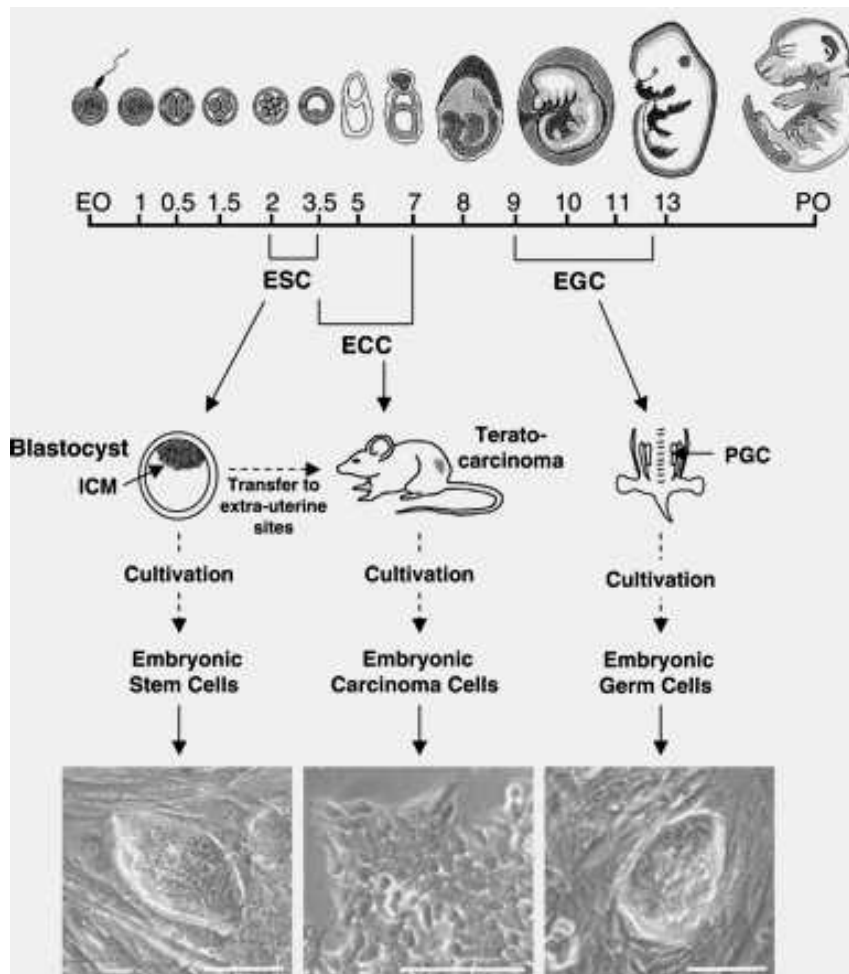
Slika 3. Izvori embrionalnih matičnih stanica (www.pmf.unizg.hr/_download/repository/BMS1.ppt)

2.2. EMBRIONALNE STANICE KARCINOMA (EC)

Teratomi i teratokarcinomi su tumori koji se sastoje od tkivnih derivata svih triju zametnih listića. Moguće ih je inducirati transplantacijom animalnih zametaka u ektopični mikrookoliš. Razvoj malignog teratokarcinoma ovisi o stadiju razvoja zametka, species-specifičnosti te imunološkoj kompetenciji domaćina. U čovjeka, teratomi i teratokarcinomi obično predstavljaju podtipove tumora spolnih stanica, a sakrokokcigealni teratom nastaje iz zaostataka pluripotentne primitivne pruge. Nediferencirane stanice embrionalnog karcinoma (EC) odgovorne su za malignost eksperimentalnog mišjeg teratokarcinoma. Mišje EC stanice injicirane odraslom stvaraju tumore, a ako se injiciraju u rane zametke nastaju diferencirana tkiva te stoga nalikuju normalnim mišjim matičnim stanicama zametka (mESC). Epigenetske promjene, prije nego li mutacije, povezane su s transformacijom mESC u EC stanice. Ljudske EC i ES stanične linije (hESC) sadrže kromosomske aberacije i mogu formirati teratokarcinom nakon transplantacije. ES stanice su među stanicama predloženim za staničnu nadomjesnu terapiju čovjeka. Trebalo bi preporučiti da se u njih unesu samoubilački geni prije upotrebe *in vivo*, kako bi se mogle odstraniti u slučaju maligne transformacije. ⁶

2.3. EMBRIONALNE GERMINATIVNE STANICE (EG)

Embrionalne germinativne stanice (EG) potječu iz transformacije primordijalnih zametnih stanica (PGCs) izoliranih iz embrionalnih gonada. Obično se izvode kulture na slojevima mitotički neaktivnog fibroblasta (*termed feeder layers*)⁷. Iako imaju pluripotentne i proliferativne sposobnosti, smatra se da je hEG stanica jednaka embrionalnoj matičnoj stanici (hES). Teškoće izoliranja i održavanje linije hEG stanica *in vitro* su ograničile njihovu raspoloživost za eksperimentalni rad i terapijsku upotrebu. Iako je inicijalna generacija hEG stanica relativno jednostavna, održavanje dobro definiranih staničnih linija kroz duže vrijeme u kulturi pokazalo se vrlo teškim. ⁸



Slika 4. Embrionalne matične stanice, embrionalne stanice karcinoma i embrionalne germinativne stanice
(http://www.biologyonline.org/articles/embryonic_stem_cells_prospects/figures.html)

2.4. ODRASLE MATIČNE STANICE

Matične stanice odraslog čovjeka, znane i kao somatske matične stanice, su nediferencirane stanice koje se mogu naći u tijelu djece i odraslih osoba. One se mogu dijeliti kako bi zamijenile umiruće stanice i regenerirale oštećeno tkivo ¹. Posljednjih godina pluripotentne matične stanice otkrivene su i u različitim ljudskim tkivima - u koštanoj srži (HSCs), u mozgu (NSCs), u mezenhimu (MSCs) (embrionalno vezivno tkivo iz kojeg se razvijaju sve ostale vrste vezivnoga i potpornog tkiva poput hrskavice, kostiju, krvnih žila, op. pr.) različitih organa te u krvi pupčane vrpce (P/CB, placental/cord blood) ⁹.

2.4.1. KRVOTVORNE MATIČNE STANICE

Stanice svih krvnih loza nastaju proliferacijom i diferencijacijom krvotvornih matičnih stanica (KMS) (engl. *haematopoietic stem cells*, HSC) u specijaliziranom krvotvornom tkivu procesom koji se naziva hematopoeza. KMS jest prototip multipotentne matične stanice odraslog tkiva. S obzirom na stupanj diferencijacije, stanice krvotvornog tkiva su hijerarhijski organizirane. Možemo ih razvrstati u tri glavna odjeljka: a) odjeljak matičnih stanica (engl. *stem cells*); b) odjeljak prastanica (engl. *progenitor cells*) koji obuhvaća i stanice-preteče (engl. *precursors*); i c) odjeljak zrelih krvnih stanica. Odjeljak matičnih stanica čine multipotentne KMS i njihovo potomstvo s dvije usmjerene KMS, od kojih je mijeloidna matična stanica zajednička za sve stanice mijeloidne loze, a limfoidna matična stanica za sve limfocite. Diferencijacijom multipotentnih matičnih stanica nastaju usmjerene prastanice (engl. *committed progenitor cells*) koje su poznate i kao stanice koje *in vitro* stvaraju kolonije specijaliziranih stanica (eritrocitne, granulocitne, monocitne i megakariocitne loze). Danas je poznato da održavanje KMS i reguliranje njihovog samoobnavljanja i diferencijacije *in vivo* ovisi o njihovom specifičnom mikrookolišu koji se naziva hematopoetski induktivni mikrookoliš ili „niša“ matičnih stanica.¹⁰

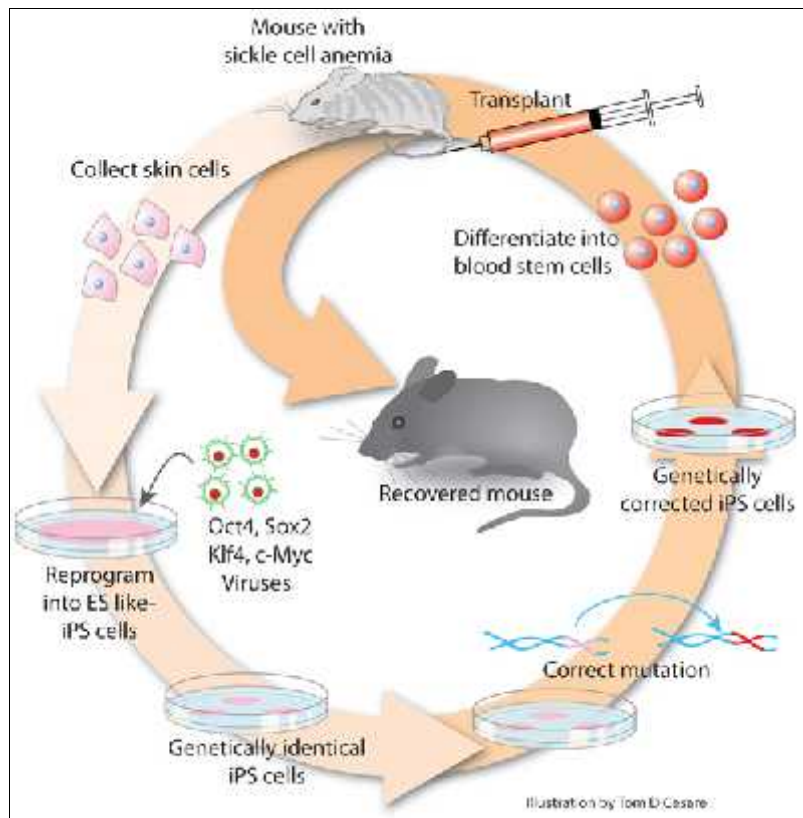
Hematopoetski mikrookoliš je složena prostorna struktura sposobna da udomi KMS i omogući joj samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju u zrele stanice svih krvnih loza. Budući da se tkivne matične stanice odraslog organizma kao što su i KMS rijetko dijele, one mogu biti u stanju mirovanja tjednima ili čak mjesecima, te se smatraju metabolički inaktivnima, a služe kao pričuva stanica koje se reaktiviraju kao odgovor na stres ili oštećenje. Stoga „niša“ mora pružiti i uvjete u kojima će KMS biti u stanju mirovanja dok se ne pokaže potreba za samoobnavljanjem, diferencijacijom i proliferacijom. Važno je naglasiti da prostor niše može biti prolazno bez matične stanice, a potom može prihvatiti i održati novo pridošle transplantirane matične stanice.¹⁰

Danas su na raspolaganju tri izvora KMS, a to su koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Odluka o odabiru izvora KMS ovisi u prvom redu o osnovnoj bolesti i raspoloživosti darivatelja KMS. U autolognoj transplantaciji danas se preferiraju KMS iz periferne krvi. U alogenoj transplantaciji na odluku utječe dob i sklonost darivatelja te iskustva transplantacijskog centra. Krv iz pupkovine se većinom koristi kao izvor nesrodnih KMS, kad u obitelji nema HLA-podudarnog (engl. *Hystocompatibility Leukocite Antigen*) darivatelja, a učestalost primjene ovisi o raspoloživosti podudarnih doza pohranjenih u banci krvi iz pupkovine.¹⁰

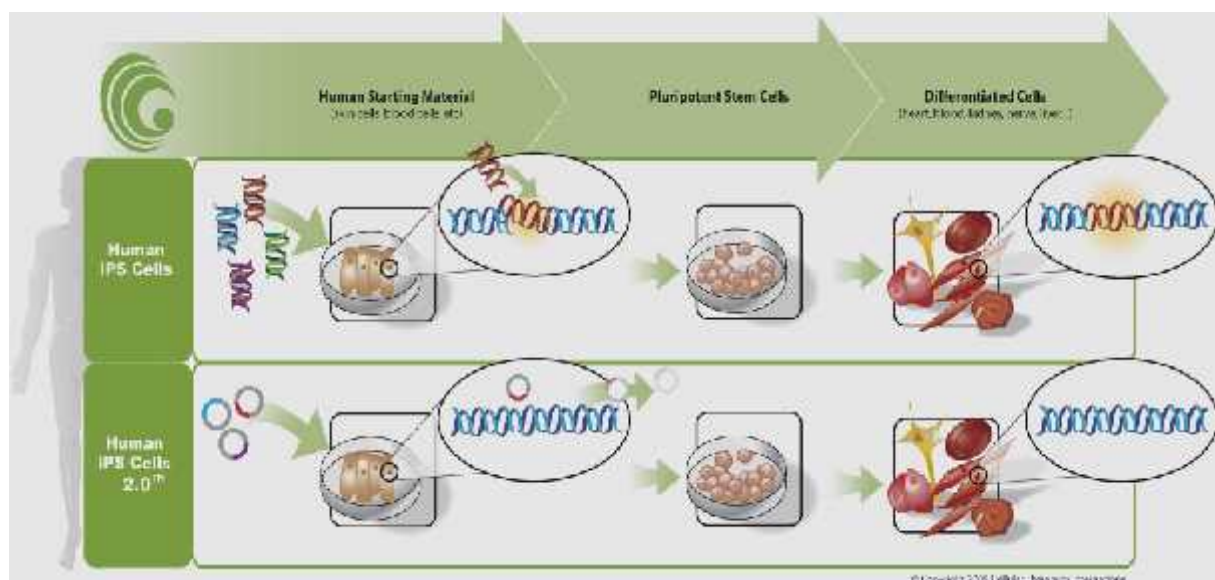
2.4.2. INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE (iPS)

Inducirane pluripotentne matične stanice (iPS) jesu odrasle matične stanice koje su kreirane na način da se ponašaju kao matične stanice embrija, što znači kako imaju potencijal postati bilo koja vrsta stanice u ljudskom tijelu ¹¹.

Veliki preokret u predviđanjima terapije embrionalnim matičnim stanicama započeo je dobivanjem 2006. iz miša (**Slika 5.**), a već 2007. iz čovjeka (**Slika 6.**) induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPS, engl. *induced pluripotent stem cells*). Genetska preinaka fibroblasta dobivenih iz odraslog potkožnog tkiva kojom postaju djelatni četiri čimbenika prepisivanja, Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc, inače izraženih samo tijekom embrionalnog razvoja, uzrokuje da stanice odraslog tkiva zadobiju svojstva embrionalnih matičnih stanica. Tako nastale iPS mogu se poput embrionalnih matičnih stanica dalje diferencirati *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* se diferenciraju u razne vrste stanica koje odgovaraju derivatima sva tri zametna listića, a *in vivo* mogu stvarati kimere, kolonizirati spolne žlijezde i stvoriti spolne stanice od kojih može nastati nova jedinka (prijenos spolnim stanicama) što potvrđuje da su te stanice, poput embrionalnih matičnih stanica, također totipotentne. Na žalost, jedan od upotrebljenih gena, c-Myc je onkogen, tako da je 20% kimera koje su sadržavale iPS razvilo tumore i pokazalo da je za bilo kakvu terapijsku primjenu ovakvih stanica nužno poništiti učinjenu genetsku preinaku. Najnovije istraživanje objavljeno u travnju 2009. pokazalo je da se iPS u miša mogu dobiti i bez genetske preinake, samo unošenjem u stanice bjelančevina određenih putem ova 4 gena. Stoga, trenutna zamisao liječenja matičnim stanicama obuhvaća izolaciju iPS iz oboljelog, njihovu diferencijaciju, te liječenje presađivanjem diferenciranih stanica. Obzirom da upotreba iPS zaobilazi kontroverznu primjenu zametaka i omogućava zadobivanje totipotencije i kod odraslih stanica, čini se da su mogućnosti za upotrebu takve vrste stanica, koje odgovaraju embrionalnim matičnim stanicama, u nadomjesnoj terapiji stanicama sve bliže. ¹²



Slika 5. Miševima se unose reprogramirane stanice injekcijom u repnu venu
(http://www.wi.mit.edu/news/archives/2007/rj_1206.html)



Slika 6. Ljudske iPS stanice (<http://www.cellulardynamics.com/tech/ipstech.html>)

1. Uzimaju se biološki uzorci ljudske kože, krvi ili kose te se iz njih inducira rast pluripotentnih matičnih stanica pod odgovarajućim uvjetima stanične kulture.
2. U drugom koraku (iPS 2.0) u stanice se unose reprogramirani geni uz pomoć dva ili tri plazmida.

3. TEHNIKE UZGOJA MATIČNIH STANICA

3.1. HUMANE MATIČNE STANICE U KULTURI

Pod embrionalnom matičnom stanicom podrazumijeva se stanica dobivena *in vitro* (izvan organizma u laboratorijskim uvjetima) iz tzv. pluripotentnih embrionalnih stanica prije procesa gastrulacije ili brazdanja (**Slika 7. i 8.**). Prvi put su izolirane 1998. g. na Sveučilištu Wisconsin, a autori su dobili nekoliko staničnih linija koje su rasle s najmanje 300 udvostručenja populacije stanica¹³.

Svojstva humanih embrionalnih matičnih stanica u kulturi: pluripotentnost – mogućnost da stvore bilo koju od 200 različitih tipova stanica u organizmu, samoobnavljanje u *in vitro* uvjetima - mogu se uzgajati i proliferirati neograničeno u nediferenciranom stanju, eksprimiraju enzim telomerazu (potreban za održavanje krajeva kromosoma) i Oct 4 (glavni regulator pluripotentnosti EM stanica), održavaju normalnu strukturu kromosoma i komplement, čak i nakon dužih perioda u kulturi (to nije svojstvo ostalih staničnih linija)⁴.

3.1.1. ODRŽAVANE I UMNAŽANJE hEM STANICA

Da bi se dobila vrijedno tkivo iz hEM stanica, važno je te stanice održavati u nediferenciranom stanju. Vanjski uvjeti koji spriječavaju spontanu diferencijaciju:

1. faktori dobiveni iz stanica hranilica (*feeder layers*), najčešće mišji embrionalni fibroblasti (MEFs)- prije uporabe te se stanice mitotički inaktiviraju (zračenje ili dodatak Mitomicyn C), nisu poznati faktori koje izlučuju MEFs u hranjivu podlogu ali su ključni za održavanje hEM stanica u nediferenciranom stanju.

2. faktori koji imaju ulogu u samoobnavljanju stanica su bazični fibroblastni faktor rasta (bFGF) i inhibirajući faktor leukemije (LIF). LIF je osobito važan budući je njegovo prisustvo dovoljno za obnavljanje mišjih EM stanica. LIF sam nije dovoljan da spriječi diferencijaciju hEM stanica i njegov učinak na ljudski sustav nije u potpunosti razjašnjen.

Da bi se utvrdila pluripotentnost hEM stanica tj. mogućnost diferencijacije u stanice ektoderma, endoderma i mezoderma, moraju se provesti *in vivo* istraživanja (SCID miš).

Zbog nerazvijenog imunološkog sustava, takvi miševi ne odbacuju injektirane EM stanice koje rastu u nakupinama (tumorima) koji se mogu istražiti u cilju određivanja diferencijacije stanica. Ova istraživanja je moguće provesti i u *in vitro* uvjetima (prati se eksprimiranje specifičnih markera SSEA-3; SSEA-4; Tra1-60; Oct-4; alkalna fosfataza)⁴.

3.1.2. INDUKCIJA DIFERENCIJACIJE EM STANICA

Metode uključuju uklanjanje kemijskih signala i molekularnih znakova koji induciraju samoobnavljanje matičnih stanica, dok u isto vrijeme omogućuju molekularne signale koji induciraju diferencijaciju. Matične stanice se induciraju da diferenciraju u 2D kulturi ili unutar suspenzijske kulture agregata stanica ili sferoida koji se mogu dobiti kloniranjem ili agregiranjem velikog broja EM stanica . Diferencijacija hEM stanica na 3D nosačima. Stanice su djelomično diferencirane u embrioidna tjelešca koja su disocirana, nacijepljena na nosače i uzgajana *in vitro*. Nakon uzgoja, konstrukt se implantira *in vivo* .⁴

3.1.3. IZOLACIJA SPECIFIČNIH STANICA IZ KULTURE DOBIVENIH IZ EM STANICA

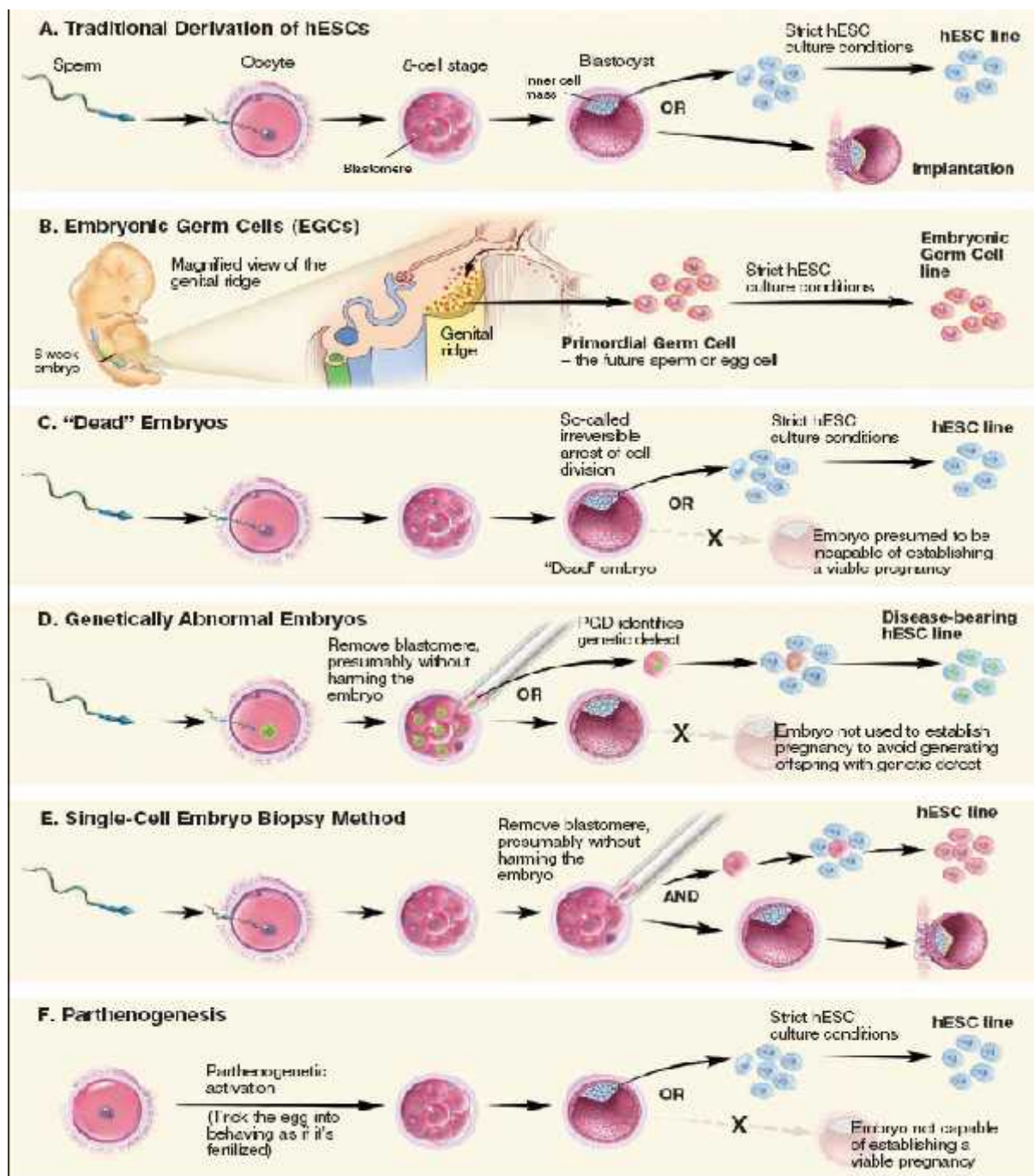
Metode se zasnivaju od genetičkog pristupa do pristupa zasnovanog na morfološkim i fizičkim svojstvima stanica (heterogena populacija stanica). Imunobojanje i FACS (engl. *cell fluorescence-activated cell sorting*) je obilježavanje stanica protutijelima specifičnim za određene površinske proteine te sortiranje željenih stanica iz cjelokupne populacije, mogućnost korištenja kombinacije markera npr. izolacija stanica koštane srži. Genetički markeri, aktivacija suicidalnih gena ili ekspresija određenih gena važnih za održavanje stanice, npr. rezistencija na neomicin. Poželjno je prihvaćanja ili odvajanje od podloge, svojstva prihvaćanja stanica (integrini), za odvajanje stanica mezenhima od populacije stanica koštane srži . Ručno obogaćivanje je mehanička izolacija koja se zasniva na vidljivim morfološkim svojstvima (kucajući kardiomiociti) .⁴

3.1.4. KARAKTERISTIKE IZOLIRANIH ENDOTELIJSKIH PERKUSORNIH STANICA

Razvijene su metode indukcije diferencijacije EM stanica i njihovog razdvajanja. Tako dobivene stanice se moraju validirati u smislu ekspresije gena, fenotipa i funkcionalnosti u *in vivo* uvjetima. Metode karakterizacije su sljedeće : ekspresija endotelijskih markera, LDL ugradnja, *in vitro* analiza stvaranja cjevčica, *in vivo* analiza stvaranja krvnih žila .⁴

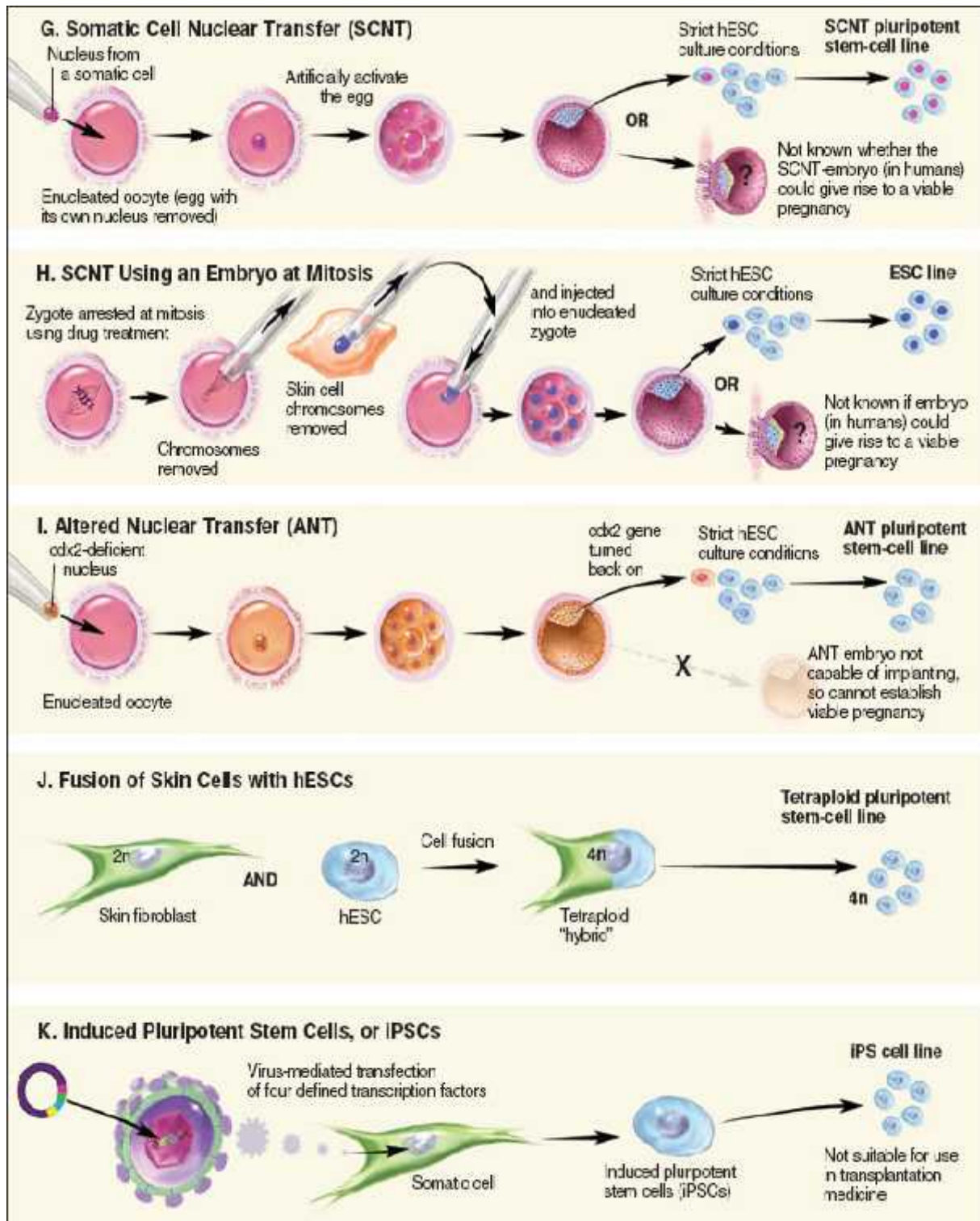
3.1.5. DOBIVANJE EM STANICA U VELIKOM OMJERU (*scale-up*)

Za širu kliničku uporabu EM stanica neophodna je optimizacija i standardizacija proizvodnje u velikoj mjeri ⁴. Trenutno se hES stanice uglavnom uzgajaju na statičkim tkivnim pločama, koje imaju ograničenu površinu i zahtijevaju ponoviti pod-uzgoj.



Slika 7. Alternativni izvori matičnih stanica

(<http://stemcells.nih.gov/info/2006report/2006Chapter8.htm>)



Slika 8. In vitro tehnike
 (<http://stemcells.nih.gov/info/2006report/2006Chapter8.htm>)

3.2. KLONIRANJE

Klon (grčki klon - grana, ogranak, cijepika, kalem, podmladak) označava skupinu jedinki ili pojedinih organizama, nastalih aseksualnim razmnožavanjem, iz jedne seksualnim načinom dobivene jedinke. Stoga je kloniranje postupak dobivanja populacije klonskih jedinki. Termin kloniranje označava procese kojima nastaju genetički istovjetni organizmi.¹⁴ U posljednjih nekoliko godina znanstvenici su uspjeli klonirati više vrsta životinja. Godine 2001. američki su znanstvenici čak pokušali klonirati čovjeka, no u tome nisu uspjeli¹⁵.

3.2.1. TERAPIJSKO KLONIRANJE I MANIPULACIJA EMS

Jedna tehnika koju znanstvenici primjenjuju za dobivanje klonova naziva se nuklearni transfer (**Slika 8.**). Znanstvenici najprije iz ženke uzmu neoplođenu jajnu stanicu i iz nje odstrane jezgru, koja sadrži DNK. Iz tijela životinje koju će klonirati uzmu odgovarajuću stanicu, primjerice stanicu kože, čija jezgra sadrži sve genetske informacije o svom vlasniku. Tu stanicu (ili samo njenu jezgru) znanstvenici tada unesu u jajnu stanicu iz koje su odstranili jezgru i kroz nju puste struju. Tim se postupkom postiže sjedinjenje stanice i citoplazme jajne stanice. Nakon što dobije novu jezgru, jajna stanica počinje se dijeliti kao da je oplođena, čime počinje razvoj klona životinje iz koje je uzeta tjelesna stanica. Embrij se tada može implantirati u maternicu surogat majke, gdje će se, u rijetkim slučajevima kada se sve odvija po planu, nastaviti razvijati dok ne dođe vrijeme da mlado dođe na svijet. Ovaj postupak zovemo reproduksijsko kloniranje. Postoji i druga mogućnost, a to je da se embrij zadrži u maternici samo dotle dok se iz embrioblasta ne uspiju izdvojiti embrionalne matične stanice koje se dalje mogu držati u kulturi¹⁵. Tzv. terapijsko kloniranje podrazumijeva stvaranje embrija; obično se radi o embrijima stvorenima fertilizacijom *in vitro*, kod kojih se u njihovoj ranoj razvojnoj fazi (fazi blastociste) stvaraju embrionalne matične stanice koje imaju svojstvo pluripotentnosti, tj. imaju sposobnost razviti se u sve tipove stanica i tkiva u ljudskom tijelu. Nakon nekoliko dana unutarnja masa embrija posebnim se preciznim tehnikama usisava i stavlja na hranjivu podlogu gdje se uzgoji linija embrionalnih matičnih stanica kojima se u laboratoriju manipulira isključivo za razvoj različitih tipova stanica, tkiva i organa, a ne za stvaranje novog organizma. Neupotrebljivi dio embrija odbacuje se i uništava, što znaci da se time ubija i ljudsko biće.¹⁴

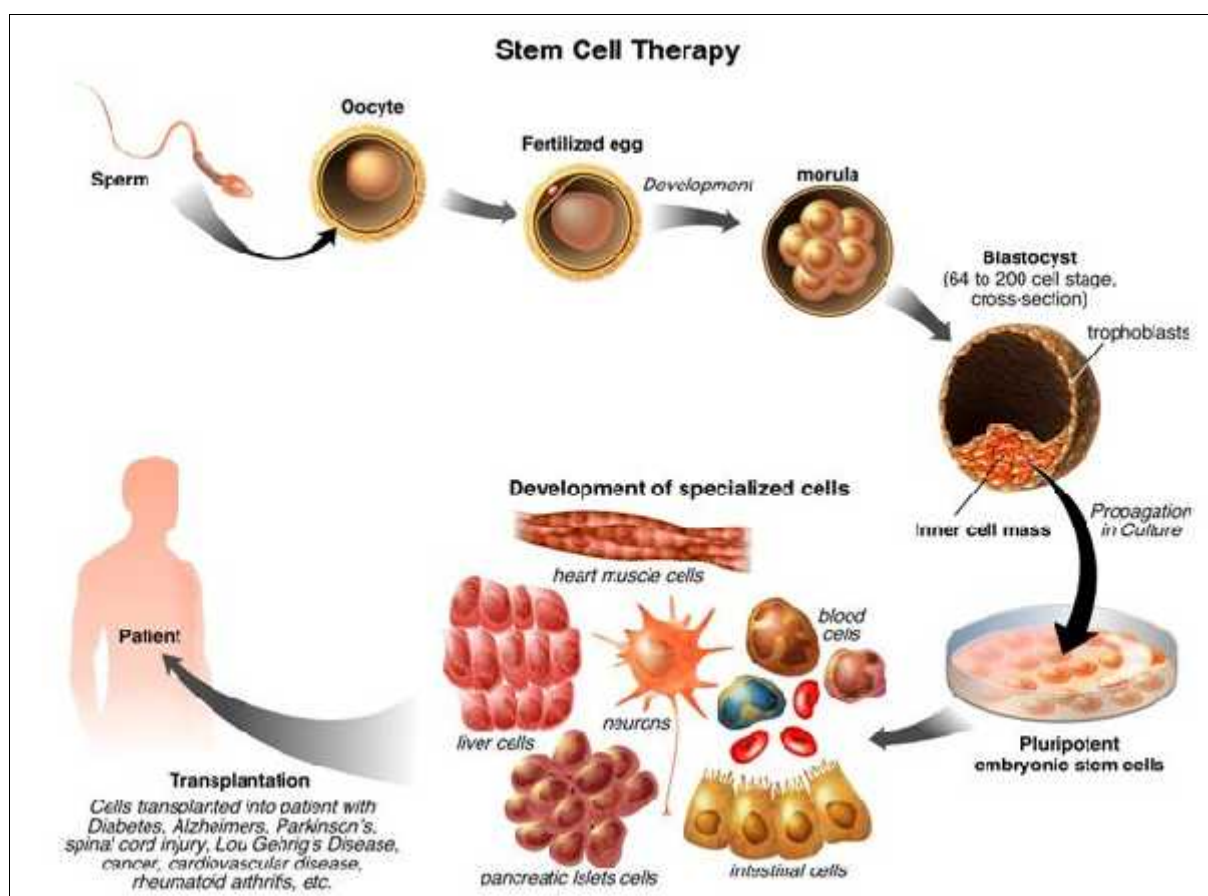
Budući da primjena terapijskog kloniranja i s njim povezana primjena i daljnji razvoj tehnologije ljudskih embrionalnih matičnih stanica nailazi na etičko-moralnu osudu (**Slika 9.**), traže se alternativni izvori kao što su adultne matične stanice koje mogu stvarati vlastite stanice određenoga tkiva (matične stanice koštane srži, neonatalne matične stanice-krv iz pupkovine, živčane matične stanice, matične stanice pankreasa, matične stanice masnog tkiva)¹⁴.

COMPARISON OF THE DIFFERENT SOURCES OF STEM CELLS			
	Embryonic Stem Cells		Adult Stem Cells
			
Attributes	In Vitro Fertilization • can produce all cell types • relatively easy to identify, isolate, maintain, and grow in the laboratory • large source of "excess" blastocysts from IVF clinics	Nuclear Transfer • can produce all cell types • relatively easy to identify, isolate, maintain, and grow in the laboratory • stem cells may be genetically matched to patient	Adult Tissues • demonstrated success in some treatments • stem cells may be genetically matched to patient
Limitations	• limited number of cell lines available for federally funded research • risk of creating teratomas (tumors) from implanting undifferentiated stem cells	• not yet achieved with human cells • risk of creating teratomas (tumors) from implanting undifferentiated stem cells	• produce limited number of cell types • not found in all tissues • difficult to identify, isolate, maintain, and grow in the laboratory
Ethical Concerns	• destruction of human blastocysts • donation of blastocysts requires informed consent	• destruction of human blastocysts • donation of eggs requires informed consent • concern about misapplication for reproductive cloning	• no major ethical concerns have been raised

Slika 9. Usporedba različitih izvora matičnih stanica
(<http://dels-old.nas.edu/bls/stemcells/types-of-stem-cells.shtml>)

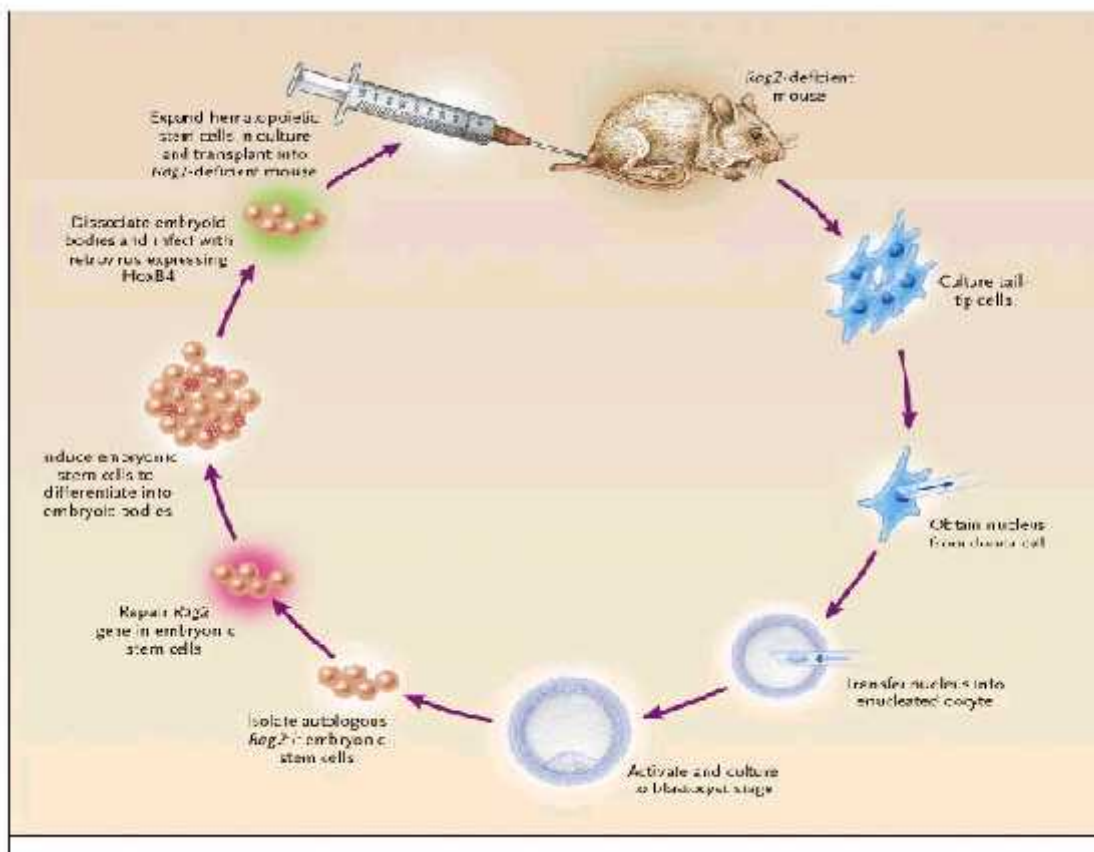
4. PODRUČJE PRIMJENE

Matične stanice se danas primjenjuju u liječenju niza bolesti u hematologiji, onkologiji, dermatologiji, oftalmologiji i ortopediji (**Slika 10.**). No njihova primjena posljednjih godina nalazi sve šire indikacijski pristup i nije samo nadomjesna terapija manje vrijednog tkiva. Tako se matične stanice primjenjuju: 1. Kao nadomjesna terapija sa ciljem zamjene stanica i tkiva koja su oštećena bolešću; matične stanice također mogu potaknuti ili kontrolirati funkciju drugih stanica unutar tkiva i organa. 2. Matične stanice mogu biti ciljno mjesto terapije lijekovima i 3. Matične stanice mogu diferencijacijom stvarati funkcionalno zrelo tkivo za *in vitro* istraživanja raznih bolesti u svrhu razvoja novih lijekova i terapijskih postupaka ³ (**Slika 11. i 12.**) .

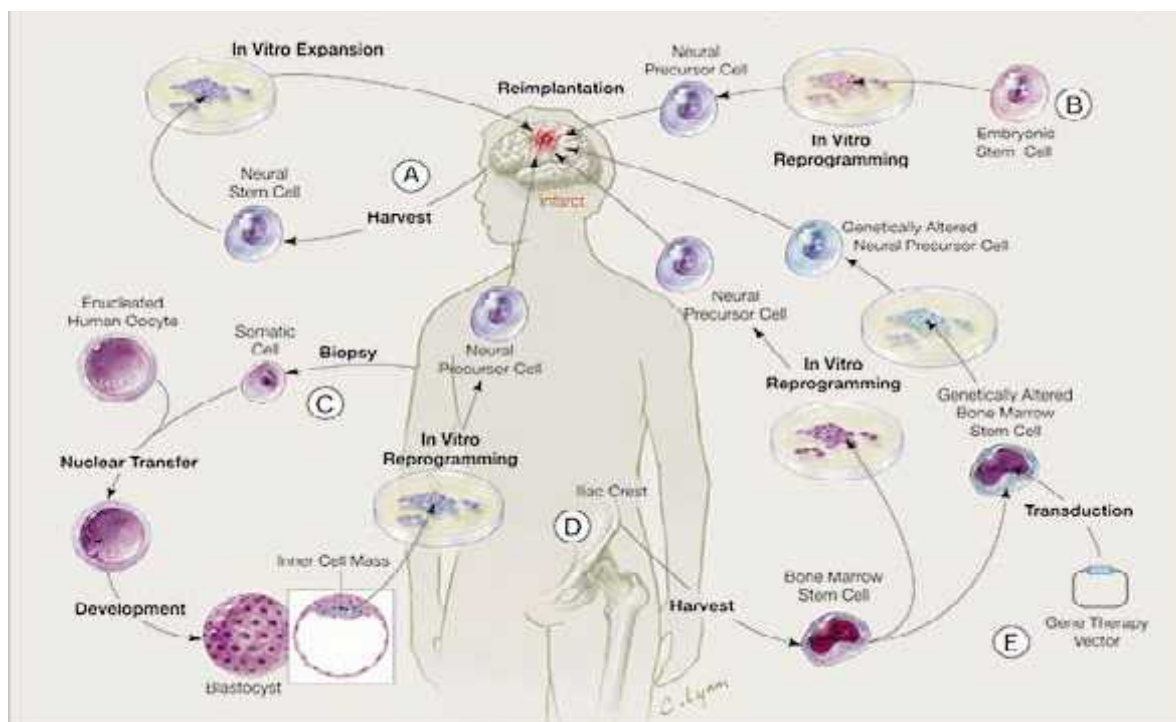


Slika 10. Terapija matičnim stanicama

(<http://sgugenetics.pbworks.com/w/page/38198357/Embryonic%20Stem%20Cells>)



Slika 11. Kombinacija kloniranja u terapijske svrhe i popravka genskog defekta
 (http://genom.mefst.hr/postdipl_BN/predmeti/2godina/casopisni_klub/)



Slika 12. Mogući pristupi u staničnoj terapiji
 (http://genom.mefst.hr/postdipl_BN/predmeti/2godina/casopisni_klub/)

5. ETIČKI PROBLEMI

Imajući u vidu mnogobrojne etičke probleme koji su povezani s primjenom embrionalnih matičnih stanica u istraživanju, u javnom diskursu, kao i među znanstvenicima, često se ukazuje na adultne matične stanice i njihovu sposobnost pluripotentnosti, dakle diferencijacije u različite tipove stanica i tkiva. No i ovdje javljaju etičke dvojbe, kao npr. kod upotrebe matičnih stanica iz pobačenih fetusa i tijela umrlih ljudi, koje mogu biti povezane s moralnim i socijalnim problemima. Upotreba humanih pobačenih fetusa u višestrukome je smislu dvojbeno. Iz etičke perspektive, principijelno je, u najmanju ruku, problematična upotreba ljudskoga tijela kao materijala za istraživanje. U kliničkoj svakodnevici od odraslih se osoba pretpostavlja da prethodno valja dobiti njihovo odobrenje. Kod djece ili fetusa suglasnost daju roditelji ili žena koja nosi dijete, tj. koja ga pobačuje. I ovdje se postavljaju pitanja i etičke dvojbe o dopustivosti i posljedicama instrumentaliziranja ljudskog života ¹⁴.

Europski zakon za patente zabranjuje patentiranje kultura ljudskih matičnih stanica čija primjena nužno uključuje uništenje ljudskih embrija. To je odluka koju je donijelo Prošireno žalbeno vijeće Europskog ureda za patente (EPO) u svojoj presudi od 25. studenog 2008. na žalbeni postupak vezan uz zahtjev za patentiranje WARF/Thomson matičnih stanica. Ta aplikacija je uključivala metodu dobivanja kultura embrionalnih matičnih stanica od primata, uključujući i ljudi ¹⁶.

Istraživanja embrionalnih matičnih stanica uspjela su postići ogroman napredak u zadnje vrijeme, koji ukazuje na sve veću opravdanost očekivanja njihove primjene u liječenju niza bolesti. Na tom putu stoje još mnoge tehnološke prepreke, ali i nužnost sveobuhvatne procjene etičkih pitanja koja se vežu uz primjenu matičnih stanica. Kako bi se te prepreke otklonile i etičke nedoumice razjasnile, potrebna je široka podrška znanstvenim istraživanjima matičnih stanica koja bi prikupila saznanja, iskustva i rezultate potrebne za što bržu primjenu matičnih stanica u liječenju ljudi ¹².

6. LITERATURA

1. <http://medicinar.mef.hr/nastava/embriologija/embrionalne-maticne-stanice-1>
 2. <http://www.cficroatia.org/?p=298>
 3. http://hr.wikipedia.org/wiki/Matične_stanice
 4. <http://www.pbf.unizg.hr/hr/content/.../Predavanje+2-odabir+stanica.pdf>
 5. http://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/BMS1.ppt
 6. <http://medlib.mef.hr/495/>
 7. http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6859/fig_tab/414092a0_F1.html
 8. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166905001357>
 9. <http://zmo.wordpress.com/teoloske-teme/crkveni-dokumenti/deklaracija-o-maticnim-stanicama/>
 10. <http://medlib.mef.hr>
 11. http://www.r-1.hr/do_izljecenja_vlastitim_maticnim_stanicama/10284_17
 12. <http://medicinar.mef.hr/nastava/embriologija/embrionalne-maticne-stanice-2>
 13. <http://www.scribd.com/doc/68752396/Predavanje1>
 14. [http://www.google.hr. \(hrcak.srce.hr/file/39537\)](http://www.google.hr. (hrcak.srce.hr/file/39537))
 15. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Kloniranje>
 16. <http://hkld.hr/news.php?extend.611>
- <http://dels-old.nas.edu/bls/stemcells/types-of-stem-cells.shtml>
- <http://dels-old.nas.edu/bls/stemcells/what-is-a-stem-cell.shtml>
- http://genom.mefst.hr/postdipl_BN/predmeti/2godina/casopisni_klub/
- <http://sgugenetics.pbworks.com/w/page/38198357/Embryonic%20Stem%20Cells>
- <http://stemcells.nih.gov/info/2006report/2006Chapter8.htm>
- http://www.biology-online.org/articles/embryonic_stem_cells_prospects/figures.html
- <http://www.cellulardynamics.com/tech/ipstech.html>
- http://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/BMS1.ppt
- http://www.wi.mit.edu/news/archives/2007/rj_1206.html

7. SAŽETAK

Matične stanice imaju sposobnost neograničenog umnažanja u kulturi i sposobnost diferenciranja u brojne tipove stanica. Razlikuju se po potentnosti; unipotentne matične stanice tvore samo jedan tip specijaliziranih stanica, multipotentne matične stanice mogu stvarati više tipova stanica i tkiva, pluripotentne matične stanice mogu stvoriti većinu ili sve stanične tipove odraslog organizma, totipotentne matične stanice mogu stvoriti sve stanice odraslog organizma kao i specijalizirana tkiva koja podupiru razvoj embrija.

U ovom radu izložen je kratki prikaz matičnih stanica, tehnike uzgoja i moguća područja primjene od kliničkih do znanstveno-istraživačkih, kao i etičke polemike vezane za izvore i daljnju primjenu matičnih stanica.

Iako matične stanice već 30 godina koristimo u liječenju leukemije ili prilikom transplantacije kože kod opsežnih opekotina, u novijoj povijesti medicine ova je tema postala predmetom mnogih polemika. Zasad se, kao izvor tih stanica koriste embriji nastali za potrebe umjetne oplodnje, iako se mogu koristiti i embriji nastali transplantacijom jezgre bilo koje stanice tijela donora u neoplođenu jajnu stanicu (terapijsko kloniranje). Kako se prilikom prikupljanja embrionalnih matičnih stanica zametak mora žrtvovati, znanstvenici se okreću drugim tipovima matičnih stanica, kao što su matične stanice odraslih ili, pak, matične stanice dobivene iz krvi pupkovine, a puno se truda i sredstava ulaže u istraživanje načina kako bi se iz diferenciranih stanica (primjerice kože) stvorile matične stanice bez uporabe jajnih stanica.

U svakom slučaju, potraga za načinom kako matične stanice usmjeriti u diferencirane stanice koje će biti funkcionalne nakon presađivanja u živi organizam, u punom je jeku i predstavjalju nadu za oboljele od dijabetesa, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, srčanih bolesti, karcinoma, reumatoidnog artritisa i dr.

8. SUMMARY

In cell culture, stem cells have the ability of dividing indefinitely, as well as differentiating into numerous cell types. They differ in potency: unipotent stem cells develop into one specialised type of cells, multipotent ones are able to develop into multiple types of cells and tissues, pluripotent ones into the majority or all cell types of a mature organism, totipotent cells into all cell types of a mature organism, as well as specialised tissues that support embrional development.

This paper presents a brief overview of stem cell, cultivation techniques and possible areas of clinical applications and the scientific research, as well as ethical controversies related to sources and further application of stem cells.

Although stem cells have been used in the treatment of leukemia and in treatments of skin burns, by using transplantation, for over thirty years now, in the recent history of medicine this topic became the cause of many controversies. Nowadays, stem cells are mostly derived from embryos made by artificial insemination, but embryos made by transplantation of the nucleus of the donor's body cells into an unfertilized egg cell (therapeutic cloning) could be used as well. Since the embryo is destroyed during the act of acquiring EM cells, scientists turn to other types of stem cells, such as adult stem cells or stem cells which can be derived from the blood of umbilical cords. A lot of effort and resources is put into researching ways of creating stem cells from differentiated cells (like skin cells) without the usage of egg cells.

In any case, the quest for a way to guide stem cells into differentiated cells that will be functional after transplantation into a living organism is in full throttle. This quest gives hope to those suffering from diabetes, Alzheimer's and Parkinson's disease, cardiovascular diseases, carcinomas, rheumatoid arthritis etc.