

Pluripotentne matične celice v embrionalnem razvoju in pri odraslem

Pluripotent stem cells during embryo development and in the adult

Mojca Jež, Matija Veber, Primož Rožman

Povzetek: Glede na njihovo sposobnost za diferenciacijo matične celice delimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne. Zigota je totipotentna, z razvojem in staranjem osebk pa se potentnost vseh matičnih celic organizma zmanjšuje. Poznamo več vrst pluripotentnih matičnih celic – embrionalne matične celice, pluripotentne linije iz spolnih celic, inducirane pluripotentne celice, celice epiblasta ter domnevno pluripotentne celice, ki se nahajajo v tkivih odraslega osebk. Po prevladujoči teoriji vsako tkivo vsebuje tudi majhno populacijo matičnih celic, ki so ohranile sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije. Največji potencial za diferenciacijo imajo embrionalne matične celice, ki se lahko v pogojih *in vitro* razvijejo v praktično vse tipe celic ter so zato tudi najzanimivejše za uporabo v medicini. V zadnjem času so mnoge študije nakazale, da imajo odrasle matične celice verjetno širšo potentnost, kot se je domnevalo do sedaj, hkrati pa nimajo slabosti embrionalnih matičnih celic.

Ključne besede: pluripotentnost, embrionalne matične celice, somatske matične celice, embrionalni razvoj

Abstract: According to their capabilities for differentiation stem cells can be totipotent, pluripotent, multipotent and unipotent. After fertilization, zygote is the ultimate totipotent cell. Cells arising during embryonic development have a lesser potency. Different pluripotent cell types are known: embryonic stem cells, embryonic germ cells, induced pluripotent stem cells, epiblast stem cells, and still controversial pluripotent stem cells isolated from the adult tissues. It is currently recognized that every tissue contains a small population of stem cells that are capable of self-renewal and differentiation. Embryonic stem cells have the broadest potential for differentiation because they are capable of turning into every cell type in our bodies. This is the reason why they are the most interesting for use in medicine. Lately, a lot of new studies have shown that somatic stem cells have broader potency than it has been expected until now and at the same time do not have any of embryonic stem cell drawbacks.

Key words: pluripotency, embryonic stem cells, somatic stem cells, embryonic development

1 Uvod

V človekovem telesu se nahaja posebna vrsta celic, ki jih ohranimo v sebi vse življenje in nam omogočajo, da se naša tkiva in organi obnavljajo kljub poškodbam in okvaram, do katerih prihaja v vsakdanjem življenju. To so matične celice – nediferencirane celice v živih bitjih s tremi ključnimi lastnostmi: sposobnostjo samoobnavljanja, potentnostjo, to je sposobnostjo diferenciacije v različne, bolj usmerjene celične vrste; ter plastičnostjo, kar pomeni, da se lahko spremenijo v celice tkiv drugih zarodnih plasti. Glede na njihovo potentnost matične celice delimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne. Manj kot so celice diferencirane, večja je njihova potentnost (preglednica 1).

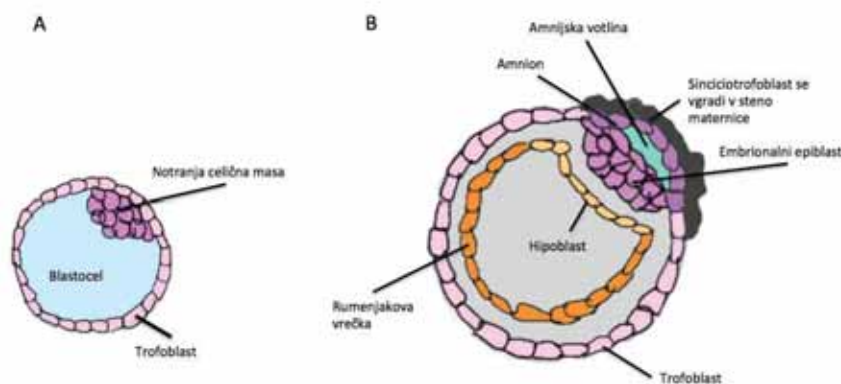
Spreminjanje potentnosti celic najlažje spremljamo skozi embrionalni razvoj organizma, ko se njihova potentnost zmanjšuje. Z združljivijo moške in ženske spolne celice nastane zigota, ki je najprimitivnejša

totipotentna celica. Iz nje se razvije celoten organizem, vključno z izvenembrionalnimi membranami in placento. Z delitvami celic se njihova potentnost zmanjšuje, obenem pa pada tudi delež celic s širokim razvojnim potencialom. Prve blastomere po prvih delitvah ohranjajo totipotentnost, zato se lahko iz vsake razvije nov zarodek (2). Na stopnji morule zarodek sestavlja 16 celic, ki se delijo na majhno skupino celic v notranjosti in večje število zunanjih celic. Na naslednjih stopnjah razvoja se ti dve skupini celic dokončno ločita, kar predstavlja prvo diferenciacijo v embrionalnem razvoju sesalcev. Zunanja plast celic tvori trofoblast, ki neposredno ne prispeva k razvoju zarodka, saj se iz njega razvije placenta. Iz notranje skupine celic, tako imenovane notranje celične mase (ICM, ang. Inner Cell Mass), (slika 1) se razvije zarodek (3). Celice notranje celične mase so pluripotentne in ne več totipotentne, saj iz njih ne more več nastati placenta. Pluripotentne celice torej prispevajo k razvoju vseh treh zarodnih plasti (endo-, mezo- in ektoderma), ne morejo

Preglednica 1: Matične celice imajo lahko različne stopnje potentnosti (1).

Table 1: Stem cells have different differentiation potential (1).

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Totipotentne matične celice | Sposobne so tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom. V naravi so totipotentne celice samo zigota in blastomere, ki nastanejo v zgodnjih celičnih delitvah zarodka do stadija morule. Po nastanku blastociste pride do prve diferenciacije celic in izgube totipotentnosti. |
| Pluripotentne matične celice | Sposobne so tvoriti vse telesne celice, vključno s spolnimi celicami, ne morejo pa več tvoriti celotnega zarodka vključno z ekstraembrionalnimi tkivi. Primer pluripotentnih matičnih celic so embrionalne matične celice. |
| Multipotentne matične celice | Lahko tvorijo različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo isti zarodni plasti. Večina tkivno specifičnih matičnih celic iz odraslih tkiv je multipotentnih. Primer multipotentne matične celice je krvotvorna matična celica. |
| Unipotentne matične celice | So tkivno specifične in se lahko razvijejo v samo eno celično linijo, imajo pa sposobnost samoobnavljanja, po kateri se razlikujejo od somatskih celic (npr. mišične matične celice). |



Slika 1: Preoblikovanje blastociste pred gastrulacijo

A) Blastocista pred implantacijo v steno maternice. Embriionalne matične celice izoliramo iz notranje celične mase (ICM).

B) Preoblikovanje blastociste – notranja celična masa se razdeli na hipoblast in epiblast. Epiblast je del, iz katerega se razvije zarodek. Iz njega lahko izoliramo epiblastne pluripotentne matične celice.

Figure 1: Blastocyst development before gastrulation.

A) Blastocyst before implantation into the endometrium of the uterus. Embryonic stem cells are isolated from inner cell mass (ICM).

B) Blastocyst development – inner cell mass is divided into hypoblast and epiblast. Embryo develops from epiblast. Epiblast is also a source of epiblast-derived stem cells.

pa tvoriti trofoblasta (1). Notranjost zarodka se nato napolni s tekočino, ki jo izločajo celice morule, in zarodek se preoblikuje v blastocisto. V njej sta še vedno dve skupini celic – ICM in trofoblast –, vmes pa je s tekočino napolnjena votlina, imenovana blastocel. Pred gastrulacijo poteka preoblikovanje blastociste.

Plast celic ICM, ki se nahaja bliže blastocelu, se loči od ostalih celic in tvori hipoblast oziroma primitivni endoderm. Celice hipoblasta, ki z notranje strani (pod trofoblastom) obdajo blastocel, se razvijejo v rumenjaskovo vrečko, tako da ne prispevajo k razvoju embrionalnih tkiv. Preostali del ICM nad hipoblastom se imenuje epiblast. Skupino celic, iz katere se bo razvil zarodek, imenujemo embrionalni epiblast. Na vrhu epiblasta se iz druge skupine celic tvori amnion kot obloga amnijske votline, ki jo napolni amnijska tekočina (slika 1) (3). Celice epiblasta so, tako kot celice ICM, pluripotentne (4).

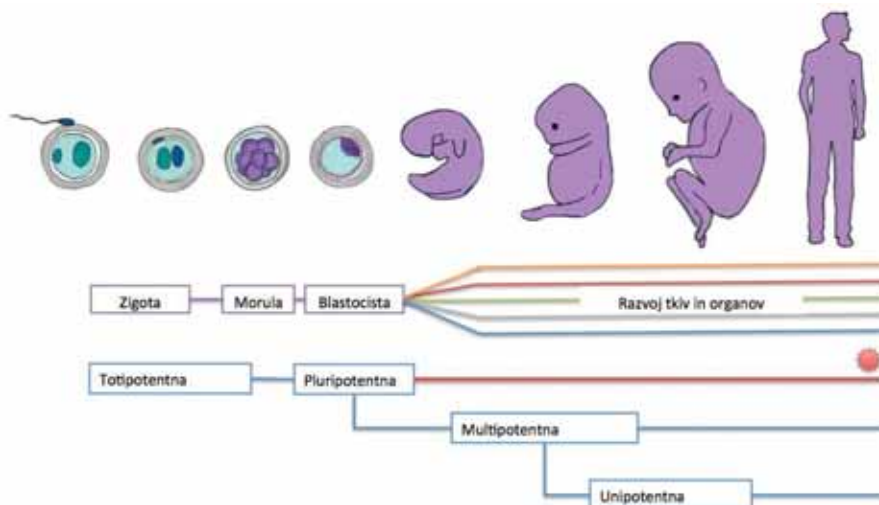
Gastrulacija je naslednja stopnja embrionalnega razvoja. Poteka ob strukturi, imenovani primitivna proga. Na sprednjem delu primitivne proge je razširitev, ki jo imenujemo Hensenov vozle. Takoj po nastanku primitivne proge in Hensenovega vozla začnejo celice epiblasta preko teh dveh struktur potovati proti blastocelu. Skupina celic, ki pride v

blastocel preko primitivne proge, izrine hipoblast in na njegovem mestu začne tvoriti celično plast, iz katere se razvija endoderm embrija ter del izvenembrionalnih membran, druga skupina celic pa se razširi v blastocel med epiblast in hipoblast ter tvori rahlo celično plast, iz katere se razvija mezoderm embrija in mezodermalni del izvenembrionalnih membran. Tiste celice, ki ostanejo na površini, tvorijo ektoderm embrija (3). Tako po gastrulaciji dobimo tri ločene zarodne plasti. V vsaki izmed njih se nahajajo multipotentne matične celice, ki lahko tvorijo samo tkiva, značilna za zarodno plast, iz katere izhajajo.

V nadaljnjem razvoju se preko organogeneze izoblikujejo vedno bolj diferencirani celični tipi, kar vodi do končne diferenciacije celic, ki sestavljajo tkiva in organe. V tkivih in organih odraslega oseba se nahajajo tkivno specifične multipotentne in unipotentne matične celice (slika 2).

2 Pluripotentne matične celice

Klasične pluripotentne celice so le embrionalne matične celice (EMC). Poleg njih poznamo še nekaj drugih tipov pluripotentnih ali njim podobnih



Slika 2: Na različnih razvojnih stopnjah razvoja osebk se nahajajo matične celice z različnim razvojnim potencialom. Novejša dognanja nakazujejo, da ima tudi odrasel človek matične celice z razširjenim razvojnim potencialom (rdeča črta, označena z zvezdico).

Figure 2: At different stages of development an organism harbours stem cells with different differentiation potential. Recent data suggests that stem cells with broad differentiation potential exist even in the adult (red line marked with asterisk).

matičnih celic. Transkripcijski dejavniki OCT4 (ang. octamer-binding transcription factor 4), SOX2 (ang. sex determining region Y-box 2) in NANOG imajo osrednjo vlogo v zgodnjem embrionalnem razvoju in so potrebni tudi za ohranjanje pluripotentnosti matičnih celic *in vitro*. Proteini OCT4, SOX2 in NANOG se vežejo na več skupnih regulatornih mest in tvorijo transkripcijsko mrežo, v kateri regulirajo tako drug drugega kot tudi sami sebe. Poleg teh treh označevalcev, ki se najpogosteje uporabljajo za identifikacijo pluripotentnih celic, se pogosto uporabljajo še SSEA-4 in SSEA-3 (ang. stage-specific embryonic antigen-4 in 3), TRA-1-60, TRA-1-81, REX1 (drugo ime ZFP42, ang. Zinc finger protein 42) in CRIPTO1 (drugo ime TDGF1, ang. teratocarcinoma-derived growth factor 1).

Embrionalne karcinomske celice (celice ECC, iz ang. Embryonal Carcinoma Cells) so bile prve odkrite pluripotentne celice. Našli so jih v teratocarcinomih, tumorjih, ki vsebujejo neorganiziran nabor različnih somatskih celic, ki pripadajo vsem trem zarodnim plastem, poleg njih pa so odkrili tudi nekaj celic ECC. Celice ECC so pluripotentne matične celice teh tumorjev in so sposobne tako samoobnavljanja kot diferenciacije. Večina celičnih linij ECC ima omejen razvojni potencial in po injiciranju v mišjo blastocisto (kar je eden izmed klasičnih testov za dokazovanje pluripotentnosti) slabo sodeluje pri nastanku himernih zarodkov, verjetno zaradi akumulacije mnogih genetskih sprememb, do katerih pride med nastankom in rastjo tumorsko spremenjenih celic (5).

Embrionalne matične celice so pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti (~5. dan po oploditvi) in jih lahko osamimo iz njene notranje celične mase. EMC so iz mišjih zarodkov prvič pridobili leta 1981 (6, 7), iz humanih pa leta 1998 (8). Izoliramo jih lahko tudi iz morule (9) ali pa jih pridobimo iz posameznih izoliranih blastomer (10). Za EMC so značilne pluripotentnost, asimetrična celična delitev in sposobnost diferenciacije v vse tri zarodne plasti. Izražajo gene in proteine OCT4, SOX2 ter NANOG, ki omogočajo

vzdrževanje njihovega nediferenciranega stanja. V pogojih *in vitro* jih lahko diferenciramo v celice vseh treh zarodnih plasti. Če jih vbrizgamo v miši SCID (ang. Severe Combined Immunodeficiency) z oslabljenim imunskim odzivom, te tvorijo teratome. Ta test *in vivo* služi za potrditev diferenciacije v vse tri zarodne plasti. Podoben test za dokaz pluripotentnosti, ki pa zaradi etičnih zadržkov ni izvedljiv na človeških EMC, je opazovanje njihovega sodelovanja pri razvoju osebk po injiciji v blastocisto (11).

Teoretično se torej EMC lahko razvijejo v katero koli celico. Iz njih lahko ustvarimo različne celične linije, z optimizacijo postopkov in izbiro biološko prenosljivih in razgradljivih tridimenzionalnih nosilcev pa pričakujejo, da bodo nekoč služile za izdelavo katerega koli tkiva ali organa. Človeške EMC so na začetku pridobivali iz nadštevilnih blastocist po postopku oploditve *in vitro*. Ker pri tem postopku zarodek uničimo, se glede uporabe EMC porajajo številna moralno-etična vprašanja. Zato so v zadnjem času razvili precej alternativnih metod, s katerimi lahko pridobimo EMC brez uničenja zarodka. Pri nas zakon dovoljuje delo z EMC pod pogojem, da niso načrtno ustvarjene za raziskovalne namene, ampak so odpadni produkt pri medicinskih postopkih. Poleg tega za vsako raziskavo, ki vključuje uporabo EMC, potrebujemo posebno etično dovoljenje Komisije RS za medicinsko etiko Ministrstva za zdravje (www.kme-nmec.si/). Klinična uporaba EMC zaenkrat ostaja vprašanje prihodnosti, saj se pri njihovi aplikaciji pojavljajo številni stranski učinki. Ker nimajo še razvitih nadzornih genetskih mehanizmov, lahko pride do nastanka neželenega tkiva ali celo tvorbe teratomov. Problemi pri klinični uporabi EMC pa so tudi posledica alogenskega izvora celic, saj lahko pride do nezaželenega imunskega odziva prejemnika na presajene celice (1).

Matične celice epiblasta (EpiMC) so pluripotentne matične celice, izolirane na poznejši stopnji embrionalnega razvoja, ko se ICM že razdeli

na hipoblast in epiblast (slika 1). Tudi matične celice iz mišjega epiblasta lahko, tako kot EMC, uspešno gojimo v kulturi in jih diferenciramo v vse tri zarodne plasti (4, 12). EpiMC, podobno kot EMC, izražajo značilne označevalce pluripotentnosti OCT4, SOX2 in NANOG ter tvorijo teratome po injekciji v miši SCID. Zanje je značilno, da ob vnosu v mišjo blastocisto ne prispevajo k razvoju himere. Pogoji, v katerih jih gojimo *in vitro*, ter mreža transkripcijskih dejavnikov, ki jo izražajo, imajo več značilnosti humanih kot mišjih EMC. Zato bi lahko sklepali, da so humane EMC pravzaprav bolj podobne celicam epiblasta kot pa celicam ICM (4), kar nam omogoča boljše razumevanje razlik med mišjimi in človeškimi EMC.

Embrionalne germinalne (spolne) celice (EGC) je prvi opisal Shambloott s sodelavci leta 1988 (13). Primordialne germinalne celice so osamili iz spolnih grebenov 5–9 tednov starih splavljenih humanih zarodkov ter jih namnožili *in vitro*. Po gojenju v kulturi te celice postanejo pluripotentne, zato jih imenujemo celice EGC. Po svojih značilnostih so zelo podobne EMC oz. EpiMC, vendar je zanje značilno, da postanejo pluripotentne šele po gojenju v kulturi. Takoj po osamitvi namreč niso sposobne sodelovati pri razvoju zarodka, če jih vbrižgamo v mišjo blastocisto, ampak to stanje dosežejo šele po predhodnem gojenju v kulturi ob prisotnosti specifičnih rastnih dejavnikov. Pri tem pride do neke vrste dediferenciacije zarodnih celic v EGC (1,14). Prvotno je zarodna (germinalna) celica v slovenskem medicinskem izrazoslovju pomenila celico v določenem predelu organa, npr. v epiteliju, ki se lahko hitro namnoži. Kasneje se je ta izraz bolj uveljavil kot prevod angleškega termina »germ cell«, zato danes zarodna celica pomeni spolno celico oziroma njene prednice.

Inducirane pluripotentne matične celice (celice iPS, iz ang. induced Pluripotent Stem Cells) so pluripotentne celice, ki jih umetno dediferenciramo iz odraslih somatskih celic. Celice iPS so pridobili s transfekcijo somatskih celic z zgodnjimi embrionalnimi geni, ki se značilno močno izražajo v pluripotentnih EMC (geni *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc* in nekateri drugi) (15–17). Za prenos genov se lahko uporabijo retrovirusi ali drugi načini vnosa, reprogramiranje pa je mogoče tudi z vnosom proteinov ali določenih majhnih molekul. Celice iPS z izražanjem omenjenih genov pridobijo vse lastnosti pluripotentnih celic, zato so precej podobne EMC. Predvidevajo, da bodo te celice po premostitvi določenih tehničnih problemov lahko izdelovali »po meri« bolnika in jih uporabljali za avtologno zdravljenje, pri katerem ne bo prihajalo do imunskega zavračanja (1, 17).

3 Domnevno pluripotentne matične celice pri odraslem

Na področju biologije matičnih celic obstaja veliko zmede zaradi neustreznih definicij. Po prevladujoči teoriji se potentnost vseh matičnih celic organizma z njegovim razvojem in staranjem zmanjšuje, vsako tkivo odaslega pa ohranja majhno populacijo somatskih matičnih celic. Kot smo že omenili, imajo največji potencial za diferenciacijo EMC, ki se lahko razvijejo v vse tipe celic v telesu (8). Takih celic naj odrasel človek ne bi imel. Pri odraslih smo do nedavnega poznali le multipotentne matične celice, kot so npr. mezenhimske matične celice (MMC), ki se lahko razvijejo v tkiva mezoderma (hrustanec, kost in mišice), krvotvorne matične celice, ki tvorijo vse krvne in imunске celice, endoteljske matične celice, ki se lahko razvijejo v različne vrste endotelija, in še

nekatero druge. Poleg tega, da so te celice po definiciji multipotentne, raziskovalci ugotavljajo, da so sposobne tudi nepričakovanega preskoka v tkiva druge zarodne plasti. Tako npr. krvotvorne matične celice lahko razvijemo v celice jeter, ki po definiciji pripadajo endodermu, mezenhimske matične celice pa v živčne celice, ki pripadajo ektodermu. Ta pojav še ni pojasnjen in ga pripisujejo plastičnosti matičnih celic. Do pred kratkim je nasplošno veljalo prepričanje, da imajo somatske matične celice v primerjavi z EMC manjšo sposobnost samoobnavljanja in so multipotentne.

V zadnjem času pa več avtorjev poroča o različnih vrstah matičnih celic, ki so jih identificirali v različnih tkivih odraslih ljudi in za katere kaže, da so pluripotentne (18–24) (preglednica 2). Če te celice dejansko obstajajo v odraslem organizmu, bi lahko predstavljale odlično alternativo EMC za uporabo v regenerativni medicini, saj njihovo pridobivanje ni etično sporno. Vendar pa se zdi, da jih je v odraslih tkivih izjemno malo, zato so njihovo pridobivanje, dokazovanje in uporaba tehnično zelo zahtevni. Različne raziskovalne skupine so takim celicam nadele različna imena, npr. zelo majhne, embrionalnim matičnim celicam podobne celice (celice VSEL, ang. Very Small Embryonic-like Stem Cells) (22), embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (celice CBE, ang. Cord Blood-derived Embryonic-like stem cells) (21), celice MIAMI (ang. Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells) (24), multipotentne celice, prednice odraslega (MAPC, angl. Multipotent Adult Progenitor Cells) (19) in multipotentne matične celice odraslega (celice MASC, ang. Multipotent Adult Stem Cells) (18). Obstaja tudi več poročil o pluripotentnih celicah v humanem ovariju in testisih, na primer, embrionalnim celicam podobne matične celice odraslega (celice ESC-A, ang. Embryonic-like Stem Cells of the Adult) (20). Povsem verjetno je, da so vse te celične populacije z različnimi imeni pravzaprav ena populacija primitivnih matičnih celic, ki so jih izolirali in karakterizirali na različne načine in jim pri tem naredili različna imena. V nadaljevanju so podrobneje opisane različne vrste matičnih celic pri odraslih, za katere nekatere raziskovalne skupine trdijo, da so pluripotentne.

Mezenhimske matične celice (MMC) uvrščamo med stromalne celice kostnega mozga (KM) z dvojno vlogo – predstavljajo izvor celic nekrvotvornih tkiv in so hkrati hranilne in podporne celice za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo komponente zunajceličnega matriksa in rastne dejavnike. Diferencirajo se lahko v celice kosti, hrustanca, mišic, kožo, verjetno pa tudi v celice drugih zarodnih plasti (ekto- in endoderma), vendar to še ni povsem raziskano. Delujejo tudi imunomodulatorno, saj zmanjšujejo imunski odziv (1). V zadnjem času so v populaciji mišjih in humanih mezenhimskih matičnih celic odkrili tudi izražanje pluripotentnih označevalcev OCT4, SSEA-4 in NANOG, kar je verjetno posledica prisotnosti nediferencirane primitivne populacije mezenhimskih matičnih celic (25).

Multipotentne prednice odraslega ali celice MAPC, ki jih je opisala Verfaillie s sodelavci leta 2001, so matične celice, ki imajo EMC podoben diferenciacijski potencial. Izolirani so jih iz mišjih in podganjih tkiv pa tudi iz človeškega KM. V kulturi jih gojimo v pogojih, ki so podobni pogojem za gojenje EMC. Po 21 dneh gojenja kažejo telomerazno aktivnost in izražajo OCT4, SSEA-1, NANOG in REX-1. Sposobne so tudi samoobnavljanja in diferenciacije v različne linije. Človeške celice MAPC ohranjajo normalno dolžino telomer po več kot 80 podvojitvah, mišje pa celo po več kot 120 (19). V pogojih *in vitro* se lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti, če jih presadimo v mišji SCID, pa ne tvorijo teratomov,

Preglednica 2: Domnevno pluripotentne matične celice in njihove značilnosti

Table 2: Supposedly pluripotent stem cells and their characteristics

| Celice | Vrsta* | Izvor | Označevalci pluripotentnosti | In vitro diferenciacija** | Tvorba teratomov | Intrablastocistna injekcija*** |
|--------|---------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------|
| MMC | h, m | Kostni mozeg, vezivno tkivo organov | OCT4, SSEA-4, NANOG | Vse tri zarodne plasti | / | / |
| MAPC | h, m, p | Kostni mozeg, mozgani in druga tkiva | Telomeraza, OCT4, SSEA-1, REX-1, NANOG | Vse tri zarodne plasti | NE | Injicirane celice sodelujejo pri razvoju zarodka |
| MIAMI | h | Kostni mozeg | Telomeraza, OCT4, REX-1 | Vse tri zarodne plasti | NE | / |
| MASC | h | Kostni mozeg, jetra, srce | Telomeraza, OCT4, NANOG, REX-1 | Vse tri zarodne plasti | NE | / |
| ESC-A | h | Površinski epitelij jajčnika | OCT4, NANOG, SSEA-4, SOX-2 | Oociti | NE | / |
| CBE | h | Popkovnična kri | OCT4, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60 | Vse tri zarodne plasti | / | / |
| VSEL | h, m | Kostni mozeg, popkovnična in periferna kri, druga tkiva | Telomeraza, OCT4, NANOG, REX-1 | Vse tri zarodne plasti | NE | Po injekciji v blastocisto ne sodelujejo pri razvoju zarodka. |

* h – humane, m – mišje, p – podganje

**Vse tri zarodne plasti – uspešna diferenciacija v endo-, mezo- in ektoderm

***Za humane matične celice je ta test neetičen.

temveč se diferencirajo v različne linije, te pa se vključijo v tkiva (26). Celice MAPC so edine domnevno pluripotentne matične celice odraslih tkiv, za katere je bilo dokazano, da ob vnosu v blastocisto prispevajo k razvoju večine celic zarodka (27).

Celice MIAMI, ki jih je leta 2004 opisal Schiller s sodelavci, so izolirali iz KM oseb, starih od 3 do 72 let. Osamili so jih s posebnimi pogoji gojenja, s katerimi so poskušali čim bolj posnemati razmere v mikro okolju v KM. Celice MIAMI so adherentne, njihov premer je od 7 do 10 µm, imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Njihova morfologija in diferenciacijski potencial ostajata nespremenjena tudi po 52 podvojitvah. V pogojih *in vitro* lahko se celice MIAMI diferencirajo v vse tri zarodne plasti. Po vnosu v miši SCID ne tvorijo tumorjev (24).

Celice MASCID, o katerih je poročal Beltrami s sodelavci leta 2007, so izolirali iz človeških jeter, srca in KM. Vse so izražale gene, značilne za pluripotentne celice (OCT4, NANOG in REX-1), kazale pa so tudi telomerazno aktivnost. Celice MASC imajo širok diferenciacijski potencial in se lahko diferencirajo v ektoderm (živčne celice), mezoderm (kost in mišice) in endoderm (jetra). Po injiciranju v miši SCID ne tvorijo

tumorjev. Opazili so tudi, da imajo celice MASC, osamljene iz različnih tkiv, podoben transkripcijski profil, zato menijo, da predstavljajo skupno populacijo celic (18).

Embrionalnim podobne matične celice odraslega (celice ESC-A), ki jih je opisala Virant-Klun s sodelavci leta 2008, so avtorji osamili iz površinskega epitelija jajčnikov bolnic s prezgodnjo menopavzo. Te celice so pozitivne na označevalce OCT4, SOX2, NANOG in na površinski antigen SSEA-4. So majhne (2–4 µm), okrogle oblike, rumenkaste barve in vsebujejo vakuolo. V površinskem epiteliju jajčnika so torej prisotne potencialne matične celice embrionalnega značaja, ki se v pogojih *in vitro* lahko razvijejo v jajčnim podobne celice in druge vrste celic. Te jajčnim podobne celice se lahko pod določenimi pogoji celo spremenijo v blastociste, kar pomeni, da pride do začetka partenogenetskega razvoja zarodka (20). Ta dognanja nakazujejo, da bo določene vrste neplodnosti kmalu mogoče zdraviti na nove načine.

Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (celice CBE) je leta 2005 v popkovnični krvi odkril McGuckin s sodelavci. Celice CBE so podobne EMC in se lahko razvijejo v krvne

celice pa tudi v celice nehematopoetskih tkiv (npr. hepatocite). Izražajo embrionalne označevalce OCT4, SSEA-4 in SSEA-3 ter TRA-1-60 in TRA-1-81. V kulturi se pritrldijo na podlago, tako da jih lahko ohranjamo v nediferenciranem stanju več kot 13 tednov. V kulturi rastejo v skupkih, ki so podobni embrioidnim telescem (21).

Celice VSEL, ki jih je leta 2007 opisala Kucia s sodelavci, so najprej izolirali iz mišjega KM, kasneje pa tudi iz človeškega KM ter popkovnične in periferne krvi. Ta populacija celic je negativna na označevalce linijsko usmerjenih celic (Lin-) ter pozitivna na CD133, CD34, CXCR4 (ang. C-X-C chemokine receptor type 4). Človeške VSEL so majhne (3 do 5 μm), imajo visoko razmerje med površino jedra in površino citoplazme in odprto strukturo kromatina, izražajo transkripcijska dejavnika OCT4 in NANOG, značilna za pluripotentne matične celice, ter površinski označevalec SSEA-4 (23). Celice VSEL so zelo redke. Iz 50 do 100 ml popkovnične krvi jih lahko izoliramo največ 10 do 20 tisoč (28). Celice VSEL bo potrebno še natančneje funkcijsko opredeliti. Največja razlika med celicami VSEL in EMC je v tem, da prve ne prispevajo k razvoju zarodka po injekciji v blastocisto (29).

4 Biološka vloga različnih pluripotentnih matičnih celic

Nastanek in biološka vloga različnih pluripotentnih matičnih celic še nista popolnoma pojasnjena. Predvsem se zastavlja vprašanje, kakšno je razmerje med EMC in primordijalnimi germinalnimi celicami (PGC). Vedeti moramo, da so EMC pravzaprav celice, gojene v nefiziološkem okolju, to je, *in vitro*. Označevalci zgodnjih spolnih celic se izražajo že v večini nediferenciranih EMC, medtem ko se označevalci zrelejših spolnih celic začnejo izražati šele ob diferenciaciji v zarodne celice. Nasprotno pa celice takoj po izolaciji ICM ne izražajo vseh omenjenih zarodnih genov (30, 31). Glede na dosegljive podatke so EMC še najbolj podobne zgodnjim zarodnim celicam. Zato kaže, da je možna tudi nova hipoteza o nastanku EMC iz zgodnjih germinalnih celic, saj sta si transkripcijska profila EMC in PGC zelo podobna. Poleg tega pa v kulturi le majhen del celic, izoliranih iz ICM, tvori kolonije EMC, kar bi utegnilo pomeniti, da se EMC lahko razvijejo samo iz redkih predniških zarodnih celic (32). Razumevanje izvora EMC je ključno za razumevanje njihove biologije ter za boljše razumevanje pridobivanja celic iPS in EMC pri živalskih vrstah, pri katerih izolacija EMC do zdaj še ni bila uspešna. Nekoliko bolj jasna je povezava med ostalimi pluripotentnimi vrstami celic. Izolirane celice PGC postanejo med gojenjem *in vitro* pluripotentne in jih imenujemo EGC. Če pride do rakave transformacije, lahko PGC postanejo maligne in tvorijo teratokarcinome, v katerih se nato nahajajo v obliki matičnih celic tumorjev (celice ECC).

Povezava med EMC oziroma PGC in somatskimi celicami z razširjenim razvojnim potencialom so najbolje raziskali na primeru celic VSEL. Nekateri avtorji menijo, da se embrionalnim celicam podobne matične celice, ki se nahajajo v odraslih tkivih (torej celice MASC, MIAMI, MAPC, CBE in ESC-A), verjetno ostanek iz embrionalnega obdobja življenja. Med migracijo PGC v spolne grebene se lahko zgodi, da manjša populacija celic zapusti svojo običajno pot in potuje skupaj s krvotvornimi matičnimi celicami v KM ali v druge organe. Tako so Zuba-Surma in sodelavci dokazali, da je število celic VSEL v fetalnih jetrih povečano ravno v obdobju, ko je tam tudi največ krvotvornih matičnih celic (33). Primerjali so tudi epigenetski profil obeh vrst celic. Znano je, da med

migracijo celic PGC pride do izbrisa njihovega genskega vtisnenja (imprintinga). To naj bi preprečevalo možnost nenadzorovanih delitev, partenogeneze in tvorbe teratomov. Vendar pa lahko iz PGC z ustreznimi postopki gojenja kljub temu pridobimo pluripotentne EGC. Podobno bi lahko veljalo tudi za celice VSEL, za katere še niso mogli dokazati, da bi lahko po intrablastocistni injekciji prispevale k razvoju zarodka. Primerjava metilacijskih profilov DNA med PGC oziroma EMC in VSEL je pokazala, da imajo vse omenjene vrste celic nekaj genov podobno vtisnjenih, hkrati pa se metilacija genov, povezanih s proliferacijo med njimi bistveno razlikuje, kar ima verjetno za posledico prej omenjene biološke razlike (29).

Za skoraj vse naštete matične celice iz neonatalnih in odraslih tkiv je značilno, da so z različnimi postopki gojenja iz njih uspeli pridobiti domnevno pluripotentne celice. Pri tem ni jasno, ali so te celice zgolj rezultat reprogramiranja, ki ga sprožijo različni pogoji gojenja, ali pa so posledica dejanske prisotnosti pluripotentnih celic *in vivo*. Možno je namreč, da gojenje *in vitro*, še posebej v prisotnosti različnih rastnih dejavnikov, povzroči reaktivacijo embrionalnih genskih lokusov in s tem celično dediferenciacijo (34). Izjema so celice VSEL, ki so jih izolirali neposredno iz različnih tkiv brez predhodnega gojenja *in vitro*. Znano je, da imajo označevalci pluripotentnosti nadpovprečno število psevdogenov (35). Trenutno je znanih šest visoko homolognih psevdogenov za OCT4, 10 za NANOG, 16 za STELLO in 6 za CRIPTO1. Nekateri psevdogeni se prepisujejo in tudi prevajajo, zaradi svoje podobnosti s parentalnim genom pa lahko v različnih eksperimentih dajo lažno pozitivne rezultate. Zaradi napačne razlage signalov iz ozadja pri poskusih barvanja s protitelesi proti proteinom, pomembnim za vzdrževanje pluripotentnosti, in lažno pozitivnih rezultatov pri zaznavanju izražanja embrionalnih genov z metodami PCR, se pojavljajo številna vprašanja o verodostojnosti tovrstnih raziskav (36). Najzanesljivejši dokaz pluripotentnosti odraslih matičnih celic bi bila namreč injekcija v blastocisto ter nato dokaz, da te celice sodelujejo pri razvoju zarodka, vendar tega do sedaj še niso mogli dokazati na zanesljiv in ponovljiv način.

5 Sklep

Od vseh pluripotentnih celic imajo EMC največji potencial za uporabo v medicini, čeprav še niso rešeni številni problemi, povezani z njimi. Zato postajajo vse bolj zanimive pluripotentne matične celice odraslega, saj naj ne bi tvorile tumorjev, njihova izolacija je etično nesporna, prisotne so vse življenje, lahko bi jih pridobili iz vsakega bolnika in jih nato uporabili za njegovo lastno, to je avtologno zdravljenje, ki ne bi povzročalo zapletov, povezanih z imunskim odzivom na tuje tkivo. Vendar so glavne ovire, ki preprečujejo učinkovito uporabo v regenerativni medicini, še vedno nepremostljive. Teh celic je izredno malo, njihova izolacija je zahtevna, težko je tudi gojenje v kulturi. Uspehe pri gojenju embrionalnim podobnih matičnih celic odraslega navaja le ena raziskovalna skupina (23). Vprašanje, katere matične celice bodo najbolj uspešne za regenerativno medicino, ostaja neodgovorjeno. Ni še jasno, ali bodo to celice VSEL, celice iPS ali EMC ali pa bo na koncu prevladala kakšna nova metodologija.

6 Literatura

1. Rožman P, Jež M. Matične celice in napredno zdravljenje, pojmovnik. Celjska Mohorjeva družba; 2011.

2. Tarkowski AK, Ozdzinski W, Czolowska R. Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *The International journal of developmental biology* 2005; 49 (7): 825–32.
3. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates; 2000.
4. Tesar PJ, Chenoweth JG, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007; 448 (7150): 196–9.
5. Andrews PW. Human teratocarcinomas. *Biochimica et biophysica acta* 1988; 948 (1): 17–36.
6. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78 (12): 7634–8.
7. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292 (5819): 154–6.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282 (5391): 1145–7.
9. Strelchenko N, Verlinsky O, et al. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reproductive biomedicine online* 2004; 9 (6): 623–9.
10. Klimanskaya I, Chung Y, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006; 444 (7118): 481–5.
11. Smith KP, Luong MX, Stein GS. Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *Journal of cellular physiology* 2009; 220 (1): 21–9.
12. Brons IGM, Smithers LE, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448 (7150): 191–5.
13. Shambloot MJ, Axelman J, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95 (23): 13726–31.
14. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes & development* 2008; 22 (15): 1987–97.
15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 (4): 663–76.
16. Yu J, Vodyanik MA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318 (5858): 1917–20.
17. Takahashi K, Tanabe K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131 (5): 861–72.
18. Beltrami AP, Cesselli D, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007; 110 (9): 3438–46.
19. Reyes M, Lund T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98 (9): 2615–25.
20. Virant-Klun I, Zech N, et al. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation; research in biological diversity* 2008; 76 (8): 843–56.
21. McGuckin CP, Forraz N, et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell proliferation* 2005; 38 (4): 245–55.
22. Kucia M, Wysoczynski M, et al. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell and tissue research* 2008; 331 (1): 125–34.
23. Kucia M, Halasa M, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia* 2007; 21 (2): 297–303.
24. D'ippolito G, Diabira S, et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of cell science* 2004; 117 (Pt 14): 2971–81.
25. Pochampally RR, Smith JR, et al. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 2004; 103 (5): 1647–52.
26. Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem cell reviews* 2005; 1 (1): 53–9.
27. Jiang Y, Jahagirdar BN, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418 (6893): 41–9.
28. Zuba-Surma EK, Ratajczak MZ. Overview of very small embryonic-like stem cells (VSELS) and methodology of their identification and isolation by flow cytometric methods. *Current protocols in cytometry* 2010; (9): 9.29.
29. Shin D-M, Liu R, et al. Molecular signature of adult bone marrow-purified very small embryonic-like stem cells supports their developmental epiblast/germ line origin. *Leukemia* 2010; 24 (8): 1450–61.
30. Clark AT, Bodnar MS, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Human molecular genetics* 2004; 13 (7): 727–39.
31. Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 2005; 132 (2): 227–33.
32. Chu L-F, Surani MA, et al. Blimp1 Expression Predicts Embryonic Stem Cell Development In Vitro. *Current biology* 2011; 21 (20): 1759–65.
33. Zuba-Surma EK, Kucia M, et al. Fetal liver very small embryonic/epiblast like stem cells follow developmental migratory pathway of hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1176: 205–18.
34. Page RL, Ambady S, et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning and stem cells* 2009; 11 (3): 417–26.
35. Debleena P, Chirn G-W, Strassel C, Kemp DM. Multiple retroseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (8): 6265–8.
36. Liedtke S, Stephan M, Kögler G. Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biological chemistry* 2008; 389 (7): 845–50.