
Davor
SOLTER

KLONIRANJE I MATIČNE
STANICE ZAMETAKA.
NOVO RAZDOBLJE
LJUDSKE BIOLOGIJE I
MEDICINE

Nedavni tehnološki napredak u sekvenciranju cijeloga genoma, kloniranje sisavaca korištenjem odraslih stanica davalca jezgri, te utvrđivanje ljudskih matičnih (*engl.* stem) stanica zametaka, stigao je tako naglo, da je bitno pretekao naše biološko razumijevanje i shvaćanje njegovih etičkih, socioloških i moralnih dilema. Vrlo je bitno pokušati staloženo utvrditi što te tehnologije nude a što ne nude, što je potrebno poduzeti kako bismo ih koristili mudro i svrhovito, kao i to na čemu smo i kamo bismo točno htjeli ići. Iz mnogih nedavno objavljenih članaka i knjiga o tim temama očito je da dominiraju jednostrani ekonomski, znanstveni ili etički stavovi, i čini se da je izgubljen iz vida jedan uravnoteženiji pristup. U tekstu koji slijedi pokušat ću ocrtati ono što zasigurno znamo, ono što iz toga znanja možemo razložno zaključiti i izvesti, i istaknuti ono što ne znamo i što bez daljnjeg istraživanja nećemo moći znati. Znanje o genomima (cijelu sekvencu ljudskoga genoma doznat ćemo vjerojatno za nekoliko godina) osnovni je preduvjet bilo kakvom racionalnom pristupu i pregledu naših budućih ciljeva. Trebat ćemo spoznati funkciju gena i ulogu koju oni, pojedinačno ili u raznim kombinacijama, imaju u stvaranju brojnih ljudskih bolesti. Pri određivanju strategija prevencije ili odbacivanja greški u našoj genetskoj tvorbi, trebat ćemo razviti i utvrditi razne pristupe i metode koje u ovome trenutku jedva možemo predočiti. Vrlo je vjerojatno da će barem neke takve strategije uključivati kloniranje i tehnologije matičnih stanica zametaka, stoga je nužno jasno razumjeti njihov potencijal i korist.

Kloniranje: prošlost, sadašnjost, budućnost

Kloniranje, odnosno derivacija nekoliko genetski istovjetnih entiteta iz jedne jedinice prati nas kroz cijelu povijest, te je svatko tko je ikada zasadio i iz grančice dobio novu biljku bio uključen u kloniranje. Oduvijek nas je fascinira-

la mogućnost kloniranja životinja, kičmenjaka a potom i ljudi, i premda su se pri tome postavljala bitna znanstvena pitanja, čini se da su oduvijek bile očite i goleme socio-loške implikacije. Ograničit ćemo se na nedavni napredak u kloniranju odraslih sisavaca, a za temeljitiju informaciju čitatelja upućujem na detaljnu, nedavno objavljenu knjigu Di Berardina. (1)

Kloniranje sisavaca (i ostalih vrsta) u biti uključuje zamjenu genetskog materijala jajašca s genetskim materijalom somatske stanice embrija ili odrasle jedinke. Kada su ranih osamdesetih tehnički aspekti toga postupka shvaćeni, brojne pokušaje kloniranja raznih laboratorijskih i domaćih životinja korištenjem stanica embrija kao davatelja jezgre, pratio je različit i prilično skroman uspjeh. U to je vrijeme bilo logično pretpostaviti: što je davatelj jezgre u razvoju bliži jajetu, to će uspjeh transfera jezgre biti veći. Ta pretpostavka, izvedena na temelju eksperimenata s transferom jezgre na žabama, ukazivala je također i na zaključak da će kloniranje iz odraslih stanica, premda je kloniranje iz stanica zametaka moguće, biti bitno teže ako ne i nemoguće. Takav je način mišljenja prevladavao do 1996. kada je izvješće o kloniranoj ovci stvorenoj iz utvrđene stanične linije, (2) po prvi puta ukazalo na mogućnost kloniranja iz odrasle stanice, (3) a ta je mogućnost i realizirana godinu dana potom, kada je rođena ovca Dolly. (4) Rijetko je u povijesti jedno znanstveno izvješće potaknulo takvu javnu pažnju i tolike sporove. Implikacija, da je postojanje ovce Dolly tek uvod u kloniranje ljudi, proizvela je pravu poplavu knjiga, članaka i mnijenja. Kakvo je stanje danas, dvije godine kasnije, u vezi s kloniranjem odraslih sisavaca? Koliko je meni poznato, Dolly je do sada jedina ovca klonirana iz odrasle somatske stanice, ali potom je slijedilo kloniranje nekoliko goveda, (5) a nedavno je uspjelo kloniranje i brojnih miševa. (6-8) Možda je klonirano i nekoliko drugih domaćih i laboratorijskih životinja, ali o tomu se pisalo samo u javnome tisku, ali ne i u znanstvenim člancima.

Iz rečenoga je vidljivo da je broj kloniranih sisavaca relativno vrlo mali (riječ je naime isključivo o kloniranju odraslih jezgri stanica, budući da je to, kako ćemo vidjeti, jedina relevantna metoda kloniranja u našoj raspravi), pa se postavlja pitanje što možemo naučiti iz dostupnih podataka. Prvo, iz navedenih brojeva očito je da je kloniranje vrlo neproduktivan postupak. Iz više od 400 manipuliranih zametaka stvorena je samo jedna ovca, (4) iz 250 embrija samo osam krava, (5) a iz 2500 manipuliranih zametaka razvio se samo 31 novorođeni miš. (6) Rezultati postnatalnoga razvoja još su gori, jer su od osam krava četiri

uginule ubrzo po rođenju, a isto vrijedi i za devet od tridesetjednog miša. Očito je da trenutno ne znamo mnogo o tome što se zbiva u somatskim jezgrama koje su prebačene u jajašce iz kojeg je izvađena jezgra. Jezgra tada mora proći reprogramiranje, tajnoviti molekularni proces o kojemu imamo tek nejasno razumijevanje, ali o tome svakako možemo spekulirati. Nakon fertilizacije, genom spermija i jajašca, koji u tome trenutku transkripcijski miruju, vrlo vjerojatno prolaze proces reprogramiranja koji aktivira genom zametka te započinje regularni razvoj. Citoplazma jajašca, krajnji proizvod složene diferencijacije tijekom oogeneze, po svojem je makromolekularnom sadržaju vjerojatno izuzetna i jedina sposobna za reprogramiranje. Sada se postavlja pitanje, može li ona reprogramirati bilo kakav drugi genom osim genoma jajeta i spermija? Uspješni eksperimenti s kloniranjem upućuju na zaključak da može, ali niska razina uspješnosti upućuje na zaključak da ona to može činiti vrlo slabo.

Postoje dva osnovna (premda možda i više) načina vizualizacije reprogramiranja somatskih jezgri, a oba su u skladu sa skromnim eksperimentalnim podacima. Prema prvome, većina pokušaja reprogramiranja ubrzo propada, stoga dolazi do ranog gubitka zametaka s prebačenom jezgrom. To bi značilo da je citoplazma jajašca gotovo potpuno nesposobna za reprogramiranje somatske jezgre. Druga je mogućnost da je reprogramiranje u biti stohastički događaj, te da svaki gen koji treba reprogramirati (uključiti ili isključiti) ima jednake šanse da se reprogramira, odnosno da se ne reprogramira. U tom slučaju, zameci će se, kada je riječ o postotku reprogramiranoga genoma, distribuirati po Gaussovoj krivulji. Bez obzira na to koji je od ta dva scenarija točan, velika većina zametaka propast će zbog nedovoljnog ili nepotpunog reprogramiranja, pa će posljedice toga nedostatka kasnije biti veće ako dođe do razvoja. Kada raspravljamo o ljudskome kloniranju, treba li ga dopustiti ili zabraniti, ti su podaci vrlo značajni. Međutim, neke pogreške u reprogramiranju moći će dovesti do rađanja, ali visoka stopa novorođenčadi koja je umrla ubrzo po začeću (5-6) ili čak nekoliko tjedana kasnije, (9) upućuje na zaključak da se posljedice pogrešnog reprogramiranja mogu vidjeti dugo nakon što je razvoj dovršen. Trenutno ne znamo koliki je razmjor potreban za reprogramiranje, koliko gena on uključuje, ovisi li o vrsti stanice davatelja jezgre, je li moguće procijeniti razmjere reprogramiranja ranih zametaka, itd. To golemo neznanje posve je dovoljno da ovoga trenutka kloniranje ljudi proglasimo medicinski nesigurnim i opasnim postupkom koje bi, dok ne saznamo više, svakako trebalo onemogućiti.

Koje su onda koristi što ih dobivamo od primjene tehnologije kloniranja? To uglavnom ovisi o tome tko ili što se klonira (7). Kloniranje laboratorijskih životinja, uglavnom miševa, pružit će nam mnoge važne odgovore na osnovna biološka pitanja, od kojih smo neka upravo spomenuli. Naše razumijevanje molekularne biologije ranog razvoja sisavaca vrlo je ograničeno usporedimo li ga sa znanjem o vrstama ne-sisavaca. Međutim, mi počinjemo identificirati i karakterizirati gene koji pokazuju svoje ekspresije tijekom preimplantacijskog razdoblja sisavaca, stoga ćemo, uz nova znanja, moći postaviti pitanja mogu li se ti geni, i koliko njih, točno izraziti poslije transfera jezgre. Ako skupina gena koju možemo analizirati bude dovoljno velika, moći ćemo predvidjeti koji će zamci s prebačenom jezgrom imati šansu da se normalno razviju.

Neke gene sisavaca s važnom funkcijom tijekom razvoja kontrolira proces koji zovemo "upisivanjem" (engl. *imprinting*). Ukratko, "upisani" geni imaju ekspresije ovisno o tome od kojeg roditelja su naslijeđeni, tako da je jedan alel aktivan a drugi nije. (10-12) Budući da normalnoga razvoja nema bez "upisivanja", neke jezgre somatskih stanica koje se koriste za kloniranje moraju zadržati točni "upis". Međutim, mi ne znamo dolazi li do promašaja u kloniranju zbog gubitka ili netočnog "upisivanja". Ta je mogućnost vjerojatna, jer su brojni neuspješni klonovi pokazivali abnormalni rast fetusa ili placente i jer kontrolu rasta vrši nekoliko "upisanih" gena. Istraživanje statusa i ekspresije "upisanih" gena koji slijede transfer jezgre, bitno će unaprijediti naše razumijevanje "upisivanja" i njegovu ulogu u kloniranju. Slično temeljno pitanje koje treba postaviti u eksperimentima s kloniranjem je inaktivacija X kromosoma. Kada koristimo žensku stanicu kao davatelja jezgre, jedan od njezinih X kromosoma trajno je inaktiviran. Budući da su inače u ranome razvoju zametka oba X kromosoma normalno aktivna, postavlja se pitanje hoće li se taj X kromosom inaktivirati nakon transfera? Očev X kromosom se obično ne aktivira u vanzametnim membranama; to je još jedan aspekt "upisivanja". Vrijedi li takvo "upisivanje" i za ženske somatske stanice, i hoće li se očev X kromosom u prebačenoj jezgri obično inaktivirati u vanzametnim membranama? Što smo stariji, i što se naše stanice više dijele, krajevi kromosoma, telomere, postaju sve kraći i kraći, sve dok ne postignu kritičnu dužinu, kada stanica umire. Postoje tvrdnje da je skraćenje telomera temeljni mehanizam starenja i da se dužina telomera obnavlja u zametnoj liniji. Stoga se postavlja pitanje hoće li prijenos jezgara stvoriti obnovljene telomere ili će životinje klonirane iz odraslih stanica započeti s rastom s mnogo

kraćim telomerama, što bi negativno utjecalo na njihovo zdravlje i životni vijek? Nedavna ispitivanja telomera ovce Dolly i nekih drugih ovaca kloniranih iz fetalnih stanica, pokazala su da su njihove telomere znatno kraće od telomera njihovih nekloniranih vršnjakinja. (13) Je li to još jedna opasnost kloniranja? Te su ovce naoko normalne, ali očito je prerano reći hoće li one u budućnosti imati drastične probleme.

Kloniranje domaćih životinja oduvijek se poduzimalo s vrlo praktičnim ciljevima na umu. Brojni pokušaji korištenja domaćih životinja kao bioreaktora započeli su s rađanjem transgeneze. Međutim, ubacivanje DNK u oplodeno jajašce domaće životinje kako bi se dobio poželjni gen ukorporiran u genom domaće životinje, rijetko je donio zadovoljavajuće rezultate. Broj transgeničnih životinja bio je vrlo nizak a ekspresija transgena bila je slaba ili otpočeta, ili je postala slaba nakon nekoliko generacija. Slučajna ili nekontrolirana integracija transgenične DNK češće je rezultirala zatamljivanjem ubačenog gena. Kada bi se DNK mogla ubaciti u stanice kulture, kada bismo mogli izabrati one stanice u kojima se gen pokazao dobrim, i kada bismo koristili jezgre takvih stanica za kloniranje, uspješnost bi se bitno povećala. Neka recentna izvješća ukazuju da je takav pristup moguć (14-16) i vjerojatno ćemo u budućnosti vidjeti mnogo takvih radova koji će donijeti brojne koristi ljudskoj medicini. Premda su se dosada takvi eksperimenti oslanjali na odabir stanica u kojima je ekspresija transgena obilna, vrlo je vjerojatno da ćemo u budućnosti, korištenjem homologne rekombinacije (vidi niže) moći ubaciti poželjni transgen u prethodno odabrano mjesto na genomu, i da ćemo ga moći smjestiti pod kontrolu pogodnog endogenog promotora, kako bismo dodatno osigurali adekvatnu ekspresiju transgena u odabranom tkivu.

Napokon, što je s kloniranjem ljudi? Trenutno, zbog izloženih razloga, mislim da bi takvi pokušaji bili neodgovorni i da bi bili u sukobu s dobrom medicinskom praksom. Pitanja sigurnosti posve su dovoljna da danas zaustave kloniranje ljudi, stoga nema prave potrebe da u raspravu uvedemo i druga. Međutim, što ako riješimo biološke probleme i omogućimo sigurnost? Naime, mnogi se postupci u reproduktivnoj asistenciji (intracitoplazmatsko ubacivanje sjemena, ubacivanje jajne citoplazme) nisu u potpunosti testirali, njihova sigurnost nije u potpunosti ustanovljena, a ipak se koriste u IVF centrima po čitavome svijetu. Takva je situacija vrlo dvojbena, i trebali bismo prvo utvrditi sigurnost tih postupaka prije negoli dođe do neke medicinsko inducirane tragedije umjesto da ih koristimo

kao argument u prilog kloniranja. Ako se na kraju pokaže da je kloniranje sigurno, ili barem ne gore od normalne reprodukcije, ne vidim razloga zašto bismo zabranili kloniranje. Unatoč mnogim suprotnim stavovima, nejasno je naime postavlja li kloniranje posve novi skup moralnih pitanja i dilema. Iz perspektive sve veće reproduktivne slobode, teško je zamisliti valjani argument za zabranu kloniranja. Mi naime ne zabranjujemo reprodukciju ljudima koji se po svim biološkim i sociološkim standardima ne bi trebali reproducirati. Posve je ispravno da to ne činimo, i trajna je sramota što smo to nekoć činili. Zašto bismo onda zabranili nekome da se reproducira uz pomoć kloniranja? Vrlo je vjerojatno da ćemo nastaviti s raspravama. Trenutno kloniranje treba zabraniti jer je opasno, ali jednom kada postane sigurno, možemo se nadati da ćemo imati dovoljno kolektivne mudrosti da odlučimo je li to ispravno. Međutim, jedan posve tehnički aspekt kloniranja, tj. transfer jezgri u oocita s izvađenom jezgrom, bez daljnjega razvoja i rađanja, mogao bi postati bitan dio stanične terapije budućnosti, stoga je važno da taj aspekt ne zamijenimo s kloniranjem koje vodi k rađanju.

Matične stanice zametaka – prošlost, sadašnjost, budućnost

Kako bismo shvatili potencijalne koristi i ograničenja primjene tehnologija embrionalnih matičnih stanica u ljudskoj medicini, makar ukratko moramo razmotriti ono što znamo o embrionalnim matičnim stanicama miševa, budući da je to u biti jedino što znamo o tom fascinantnom predmetu istraživanja.

Mišje embrionalne matične stanice (ESC) dobivene su ranih osamdesetih godina (17-18) iz mišjeg blastocita. Danas ih možemo dobiti iz bilo koje mišje vrste (19) i o njihovoj biologiji znamo podosta. Slična vrsta stanica, nazvana embrionalnim zametnim stanicama (EGC) dobivena je iz primordijalnih zametnih stanica. (20-22) Premda o EGC ne znamo toliko, te su stanice vrlo slične ESC, a uočene razlike ne moraju biti biološki ključne za njihovu funkciju. Dva svojstva ESC pokazala su se izuzetno važnima za njihovo korištenje u biološkim istraživanjima, a jedno od njih, sposobnost sudjelovanja u proizvodnji zametnih stanica u himeričnih životinja, revolucioniralo je proučavanje funkcije gena u sisavaca.

a) **ESC stanice diferenciraju se *in vitro* i *in vivo*.** Ta je sposobnost uvijek fascinirala biologe koji su radili s tim stanicama, ali taj proces i kontrolu njegovih elemenata još uvijek ne razumijemo u potpunosti. Intenzitet istraživanja na tome području posljednjih je godina djelomično opao,

ali kako sada vidimo golemi medicinski potencijal toga područja, interes će se zasigurno povećavati. Posve je očito da se diferencijacija ESC u retorti može usmjeravati u za nas poželjnim pravcima, i da se u kombinaciji s nekom vrstom odabira, razložno čista populacija diferenciranih stanica može izolirati. (23-26)

b) **ESC mogu sudjelovati u razvoju zametne linije himeričnoga miša.** Ubrzo nakon izolacije ESC-a testirana je njihova omnipotencija ubrizgavanjem u normalne blastocite, (27) i pokazalo se da oni mogu sudjelovati u razvoju svih odraslih tkiva. Posebno su značajne funkcionalne zametne stanice. Taj je pronalazak, uz sposobnost manipuliranja ESC *in vitro* pomoću homologne rekombinacije, revolucionirao genetiku miševa. Homologna rekombinacija omogućuje eliminaciju ili mutiranje bilo kojeg poznatog kloniranog gena. Ta se mutacija potom može propagirati pomoću zametne linije dobivene iz ESC, a njezine se fenotipske posljedice mogu analizirati. (28-30) Stoga nas ne mora čuditi da se naše razumijevanje funkcioniranja gena u cijelome organizmu u posljednjih deset godina bitno povećalo. (31) Unatoč našoj sposobnosti da po volji manipuliramo ESC, neposredna medicinska primjena tih stanica tek se predviđa na temelju njihove sposobnosti diferencijacije. Kako ćemo kasnije pokazati, manipulacija genomom ESC-a donijet će nesumnjivo značajnu korist u budućoj medicinskoj terapiji.

Ljudske matične stanične linije sa svojstvima sličnim mišjima nedavno su izolirane iz ljudskih blastocita, (32) ljudske ESC, i iz ljudskih primordijalnih zametnih stanica, (33) ljudske EGC. Ovoga trenutka moguća korist od ljudskih zametnih stanica leži tek u budućnosti. Treba riješiti mnoga složena biološka, medicinska i etička pitanja. Međutim, sada je dobro vrijeme da odredimo moguće primjene, i da raspravimo o tome kakve eksperimente treba izvesti kako bismo te primjene ostvarili. Pretpostavljamo da će ljudske ESC po svojim biološkim svojstvima biti slične mišjima. To nije posve izvjesno, i možda će se pokazati da dosad pronađene stanične linije uopće nisu optimalne. Ali ako su te dvije vrste stanica slične, možemo zamisliti njihovu značajnu korist pri uzgoju stanica i tkiva za transplantaciju. (34-37) Da, možemo ih zamisliti, ali postoje još brojne teškoće koje treba nadići, stoga je od presudne važnosti da se postojeća istraživanja na ljudskim ESC ne zabrane zbog nekih nebitnih razloga prije negoli saznamo jesu li te stanice doista korisne.

ESC miša mogu se diferencirati u mnoge vrste stanica i danas znamo mnogo o faktorima i uvjetima u kulturama koje induciraju diferencijaciju u posebne vrste stanica.

Zbog brojnih koristi u zdravstvu, vrlo je vjerojatno da će ova vrsta istraživanja s ESC ljudi privući više pažnje i novca, i da će to ubrzati istraživanja. S razlogom očekujemo da ćemo uskoro utvrditi uvjete za diferencijaciju ESC u jednostavna tkiva, i stvoriti stanice koje proizvode krv, mišićne stanice, neurone, pa čak i razne endokrine stanice. Ali nije jasno hoće li oblikovanje složenih organa ili nečega što zahtijeva preciznu strukturu biti tako lagano. Proizvodnja bubrega i srca iz ESC još je neko vrijeme pred nama (ako će se to ikada realizirati) ali postoje neki ohrabrujući znakovi da se jednostavne strukture mogu oblikovati u kulturi. Korištenjem različitih polimera kao potpornja, i koloniziranjem takvih utora endotelialnim stanicama i stanicama glatkih mišića, istraživači su uspjeli stvoriti funkcionalne arterije *in vitro*, (38-39) a potom su tkiva uspješno implantirana u svinje. Na sličan je način stvoren i funkcionalni mokraćni mjehur iz bioraspadnih polimera u obliku mjehura preko kojih su kultivirani glatki mišići i urotelialne stanice. Takvi su mjehuri transplantirani u pse kojima je zamijenjen njihov mjehur, i oni su normalno funkcionirali do 11 mjeseci. (40-41) Možemo zamisliti da će korištenjem interakcija složenih stanica i tkiva i raznih vanstaničnih matrica *in vitro*, rekapituliranjem normalnoga razvoja biti moguće izgraditi složene organe poput bubrega.

Osim transplantacije stanica i tkiva, diferencirane ESC i njihovi produkti vjerojatno će se u budućnosti koristiti za razne oblike genetske terapije. Trenutno, zbog različitih razloga genska terapija za monogenske bolesti ima skromne rezultate. Teško je postići vrlo produktivan i pouzdan sistem prijenosa gena u odrasli organizam. Jednom kada se željena DNK ubrizga u stanice domaćina i kada se integriira u njihov genom, ekspresija takvoga transgena obično je slaba i kratkotrajna. Najvjerojatniji razlog za tako skroman rezultat jest to što većina slučajnih lokacija integracije nije primjerena, pa se integrirani gen ubrzo isključuje. Korištenjem ESC, možemo locirati određeni gen i postaviti ga na primjereno mjesto i time osigurati njegovu pravu ekspresiju. Kada utvrdimo da je gen ispravno integriran i aktivan, odabrana ESC se potakne na diferencijaciju i diferencirane stanice se injekcijom ubacuju u bolesnika.

Postoji nekoliko problema koje moramo riješiti prije negoli primijenimo čak i najjednostavniju transplantaciju stanica i tkiva. Na temelju našeg iskustva sa stanicama miševa, diferencijacija po utvrđenom pravcu nikada nije potpuna, a osim toga u kulturi je obično prisutno i nekoliko drugih diferenciranih vrsta stanica. Stoga će biti potrebno razviti vitalne biljege za svaku željenu vrstu stanice, tako da možemo odabrati upravo one stanice koje nam

trebaju. Ili pak možemo zamisliti uvođenje odabranog genetskog markera u ESC, tako da tim procesom nastane samo diferencijacija stanica poželjne vrste, a da se pri tome selektivno izdvoje sve ostale. (23) Kada bismo imali nekoliko diferenciranih vrsta stanica u kulturi, to bi predstavljalo problem, ali postojanje nediferenciranih matičnih stanica embrija bilo bi pogubno. Kada se ESC ucijepe u miševе, one uvijek proizvode tumore, razvija se teratokarcinom, stoga će biti bitno eliminirati sve nediferencirane ESC prije nego li započnemo s transplantacijom stanica. Moramo potanko istražiti o kakvom je tumorogeničnom potencijalu ESC-a riječ kod miševa, tj. koliko je stanica potrebno da stvori tumor. Ti eksperimenti neće biti dovoljni, s obzirom da miševi u usporedbi s ljudima kratko žive, stoga miševi nisu idealni model procjene dugoročne opasnosti od terapije temeljene na ESC. Kako bismo se obranili od mogućnosti nenamjernog stvaranja tumora u pokušaju zamjene stanica, možda će prije injekcije biti potrebno ubaciti u sve stanice neku vrstu "suicidalnog" gena, tako da se ona može ubiti njegovim aktiviranjem ako neka ESC izmakne selektivnom postupku.

Sada kada smo predočili bar neke potencijalne koristi i probleme korištenja ESC u ljudskoj medicini, što u bližoj budućnosti treba učiniti kako bismo ESC mogli iskoristiti? Moramo započeti s intenzivnim radom u proučavanju svih aspekata diferencijacije, odrediti sve nužne uvjete u kulturi, identificirati promotivne faktore, diferencijacijske faktore i selekcijske biljege. Glavnina toga posla može se napraviti, i napraviti će se, korištenjem mišjih i ljudskih ESC koje su do sada izolirane. Međutim, prava korist od ESC postići će se samo ako se dođe do primjerenih stanica u jedinki ili pojedincu koja treba takve stanice. Alternativa tome bila bi da prihvatimo doživotno korištenje imunosupresivnih lijekova, kao što je to danas standardna praksa u transplantaciji organa, ili da pokušamo izolirati veće zbirke različitih ESC tako da većina pacijenata pronade barem približno, ako već ne i savršeno poklapanje. Premda su moguće, takve alternative nisu poželjne. Danas je jasno da alogena transplantacija ima brojne dugoročne posljedice (42) i da trajno korištenje imunosupresivnih lijekova može dovesti do raka. (43-44) Moguće je stvoriti veće skupove ESC tako da većina histološki kompatibilnih antigena uvijek bude prisutna. Ali, budući da bi barem neke ubačene stanice vjerojatno sudjelovale u složenim interakcijama u tkivu, takvo nesavršeno poklapanje ne bi bilo dovoljno dobro. Jedno je prihvatiti nešto zato što nema bolje alternative; ali u slučaju ESC-a takav pristup doista nije nužan. Vrlo ćemo vjerojatno uspjeti stvoriti autologne ESC nizo-

ve za svakog pacijenta kome će trebati. Trenutno postoje tri, a možda i više načina da se to postigne. Prvi način, koji će najvjerojatnije uspjeti, jest da uzmemo jezgru somatske stanice izabranog pojedinca ili jedinke, da je ubacimo u denukleizirani ljudski oocit, te da dopustimo da se takav embrio kao što smo opisali razvije do stupnja blastocita i stvori ESC liniju. (32) Premda tu postoje neki tehnički problemi, oni će se najvjerojatnije svesti na najmanju mjeru, stoga će glavna prepreka takvome pristupu biti etičke prirode. Ovaj je postupak, naime, istovjetan prvim stupnjima kloniranja, a blastocit koji time razvijamo i naposljetku uništavamo kako bismo dobili primjerene stanice, potencijalno je ljudsko biće. Naglasak je na “potencijalno-me”, jer bi u slučaju da ga implantiramo u maternicu, stvarna vjerojatnost da do njegova razvoja i rađanja dođe, s obzirom na stupanj uspješnosti kloniranja, bila vrlo mala. “Vrlo mala” vjerojatnost međutim nije isto što i “nemoguće”, stoga takav pristup u zemljama u kojima je uništavanje zametaka zabranjeno, neće biti moguće. Netko bi mogao tvrditi, baš kao što se to tvrdi u slučaju pobačaja zbog zdravstvenih razloga, da zdravstvene koristi za odraslog pojedinca čine nužnim uništenje takvih zametaka. Međutim, takav zametak bi se stvorio da bude uništen, i bez obzira na koristi, neki pojedinci i društva takav bi postupak mogli smatrati neprihvatljivim.

Kakve su onda alternative? Možda bismo u tom slučaju mogli koristiti ne-ljudske (mišje, kravlje, ovčje) oocite kao primatelje jezgre, i o jednom je takvom navodnom pokušaju izvijestio popularni tisak. (45) Nije posve jasno koliko je taj postupak bio uspješan. Naše ograničeno iskustvo s transferom jezgri među različitim prirodnim vrstama do sada je bilo prilično razočaravajuće. (46) Nadalje, čak i kada bi taj postupak bio uspješan, ne bi bilo jasno kakva je priroda tako stvorenog blastocita, pa bi netko mogao tvrditi kako je ponovno riječ o ljudskome zametku, te bi za nj vrijedili gorespomenuti problemi. Treća, najmanje sporna mogućnost, ali istodobno i mogućnost koja prema našem sadašnjem stupnju znanja ima najmanje šanse za uspjeh, jest korištenje citoplazme već postojeće ljudske ESC kao primatelja jezgre, u nadi da će on uspjeti reprogramirati jezgru somatske stanice. Postoje neki dokazi, prilično stari, jer donedavno nitko nije bio posebno zainteresiran za takve eksperimente, da u takvim somatsko staničnim hibridima može doći do djelomičnog genetskog reprogramiranja. (47) Zbog potrebe za autolognim ESC linijama i zbog etičkih i pravnih problema s izravnim i najočitijim pristupima, vrlo je vjerojatno da će se u budućnosti posao na toj trećoj alternativu intenzivirati.

Ljudske zametne matične stanice izolirane su tek nedavno i nitko u stvari ne zna hoće li one biti onoliko korisne koliko bismo mi to željeli. Ali i sam njihov pronalazak potaknuo je još jednu poplavu besmislenih napisa u tisku, a većinu takvih napisa pisali su pojedinci koji o biologiji toga sistema nemaju pojma, ili pak pojedinci koji se nisu potrudili da se informiraju i da o tome temeljito razmisle. U tim sporovima iznesene su brojne tvrdnje o tome jesu li ESC identične zamecima (nisu!), i retorička pitanja bismo li trebali dopustiti rad na njima, pa čak i to bismo li trebali dopustiti njihovu izolaciju. Čini se da sve zemlje iznose vlastite kratkovidne i brzoplete prijedloge i odluke. Ohrabrujuća je činjenica da je Nacionalna bioetička savjetnička komisija Predsjednika Sjedinjenih Država napokon shvatila kako je apsurdno s jedne strane dopustiti da se sredstva troše na istraživanja postojećih ESC, a s druge strane zabraniti trošenje sredstava za izolaciju novih ESC. Svi zainteresirani za moralna i etička pitanja u vezi s korištenjem ljudskih ESC mogu pronaći brojna mnijenja za i protiv takvih istraživanja u bilo kojem tjednom izdanju časopisa *Science* i *Nature*, i u ostalom popularnom tisku. (48-54)

Budući da primjena i daljnji razvoj tehnologije ljudske ES potiče toliko sporova, postoje li dodatne alternative koje bismo mogli koristiti? Čini se da naša tijela sadrže velik broj različitih matičnih stanica, mnogo više negoli smo mislili dosada. Sada znamo da se glavnina našeg epitelnog tkiva stalno obnavlja i da su matične stanice temelj takvog procesa. Skorašnji rezultati pokazuju, da uz to tkivo, postoje i brojne druge multipotencijalne populacije matičnih stanica koje bi se mogle iskoristiti za staničnu transplantaciju i transplantaciju tkiva. (55) Matične stanice živca izolirane su iz fetalnog perifernog živca. Kada se transplantiraju u odraslu jedinku, one stvaraju neurone i ganglije. (56-57) Ako bi se takve stanice mogle izolirati i iz perifernih živaca odrasle jedinke, lako bismo mogli zamisliti njihovu primjenu u terapiji raznih degenerativnih poremećaja živčanog sustava.

Živčane matične stanice dobivene su i iz odraslih endodermalnih stanica i te se stanice također mogu diferencirati u neurone i astrocite. (58) Zanimljivo je spomenuti da živčane matične stanice nisu sposobne samo nastaniti središnji živčani sustav, već mogu stvarati i stanice za proizvodnju krvi i nastaniti koštano srž. (59, 57) Ti rezultati upućuju na zaključak da neke matične stanice imaju vrlo širok potencijal diferencijacije, te da nisu ograničene na tkiva i organe iz kojih su izolirane. Dodatni primjeri takvih polivalentnih matičnih stanica su odrasle ljudske me-

zenhimalne matične stanice koje se mogu diferencirati u stanice masnog tkiva, hrskavice i kosti (60) ili pak matične stanice koštane srži koje stvaraju jetrene ovalne stanice koje mogu nastaniti jetru nakon toksične ozljede. (61) Iz navedenih primjera vidljivo je da se brojne potrebe za transplantacijom stanica i tkiva mogu zadovoljiti pomoću matičnih stanica što postoje u svakoj odrasloj jedinki, te da bi istraživanja u tome pravcu trebalo pojačati.

Zašto bismo se onda trebali brinuti za matične stanice ljudskih zametaka, ako su one tako sporne i ako o njihovoj upotrebi tako malo znamo? Prvo zbog toga što se može dogoditi da neke vrste matičnih stanica tipičnih za pojedine organe ne uspijemo izolirati, već samo stvoriti iz matičnih stanica zametka. Netko bi primjerice mogao reći da proizvodnja ESC-a za izabranog pojedinca zadovoljava sve njegove buduće potrebe, te da stoga ne moramo nastaviti izolirati različite matične stanice s ograničenom sposobnošću. Drugo, i još mnogo važnije: ne smijemo razmišljati samo o kratkoročnoj i neposrednoj upotrebi ljudskih ESC u transplantaciji stanica i tkiva, već moramo razmišljati o potencijalnim budućim primjenama. Trenutno možemo zamisliti nekoliko primjena ove tehnologije, od kojih su neke relativno jednostavne i izravne, dok za neke trebamo bitno detaljnije informacije. Kao što smo već opisali, ESC se mogu koristiti i nakon *in vitro* diferencijacije i izbora stanica i tkiva za transplantaciju. Iste stanice možemo naime koristiti i kao sredstva genske terapije, i postoje brojne razine na kojima bi se to moglo učiniti. Najlogičniju, i usuđujemo se reći "najprirodniju" upotrebu možemo ilustrirati sljedećim primjerom. Različite poremećaje hemoglobina, poput sindroma srpaste stanice ili talasemije, stvaraju različite mutacije koje djeluju na strukturu ili sintezu α - i β -globulina. Kada bismo pomoću bilo koje gore spomenute metode dobili ES stanice pojedinca s poremećajem, to bi nam omogućilo da pomoću homologne rekombinacije zamijenimo poremećeni gen. Ekspresiju novostvorenog gena mogli bismo procijeniti *in vitro*, izabrati klon ES stanice, diferencirati ga u matičnu stanicu za proizvodnju krvi, i iskoristiti za obnovu pacijentove koštane srži. To bi onda bio potpun i trajan lijek za genetski poremećaj.

Možemo zamisliti i dodatnu, premda rijetku situaciju, u kojoj su oba roditelja homozigotna za određen genetski poremećaj. Danas za njih ne postoji mogućnost da dobiju vlastito, genetski normalno potomstvo. Ali u budućnosti možemo zamisliti da takav par *in vitro* oplodnjom stvori nekoliko blastocita. Uslijedilo bi izdvajanje ESC i korekcija genetskog poremećaja. Čim bismo izdvojili klon ESC-a

normalnoga genotipa, jezgre iz tih ESC-a mogli bismo ubaciti u jajašce s izvađenom jezgrom i implantirati dobiveni zametak. Na taj bi način mutirani zametak u biti bio kloniran, mutacija bi se korigirala, i takav bi par mogao dobiti normalno dijete. Većina takvih primjena očito leži u budućnosti. Neke će možda biti složene ili čak nemoguće, ali ne postoji neki očit biološki razlog zbog čega takav postupak ne bismo mogli izvesti. Ali treba imati na umu: ako je zamjena DNK korištenjem ESC tehnologije moguća za korekciju mutacija, onda je također moguća i zamjena zbog navodnih genetskih "poboljšanja". Danas, duh genetskih "poboljšanja" oživljavaju kritičari takvoga istraživanja. Premda mi još ne znamo koje gene bismo trebali dodati kako bismo popravili naše genetsko nasljeđe, to ne znači da to nikada nećemo znati. To moramo imati na umu, i nadati se, da će mudrost i etičnost držati korak s napretkom naših tehničkih sposobnosti i biološke spoznaje.

Zaključci

Kloniranje sisavaca pomoću odraslih stanica davatelja jezgri, i utvrđivanje ljudskih matičnih stanica zametaka, dvije su tehnologije s revolucionarnim potencijalom za ljudsku medicinu i reprodukciju. Obje su tehnologije uhvaćene u zamku brojnih bitnih i nebitnih moralnih, etičkih i pravnih sporova, prije negoli se njihov potencijal doista mogao procijeniti. U tim raspravama često se zaboravlja da mi u stvari ne znamo hoće li se pokazati da su sve ili neke navodne koristi doista izvedive i moguće. Pokušaji da se *a priori* zabrani korištenje tih tehnologija, lišilo bi nas najbitnijih bioloških spoznaja i potencijalno korisnih terapijskih sredstava. Kloniranje ljudi trenutno bi zbog sigurnosti trebalo onemogućiti, i još je potrebno mnogo istraživanja kako bismo utvrdili koji parametri određuju rezultat reprogramiranja jezgre i kloniranja. Biologija ljudskih matičnih stanica zametka još je u povojima, i premda su izvršeni brojni eksperimenti s matičnim stanicama zametaka miševa, tehnike koje imaju praktične primjene u ljudskoj medicini, moraju se naposljetku utvrditi na ljudskim stanicama. Trenutno raspoložemo s jasnim uputama o transplantaciji tkiva i organa, a rad na ljudskim matičnim stanicama zametaka lako se može kontrolirati već postojećim regulativama. Svaka zemlja, a naposljetku i svaka osoba, morat će za sebe odlučiti što osjeća i misli o moralnim aspektima korištenja tih tehnologija, ali izravni zahtjevi da se one zabrane prije negoli ih u potpunosti razumijemo bili bi kratkovidni i potencijalno štetni. Ako net-

ko od nas traži da se odrekujemo nečega, čini se logičnim da prvo točno znamo čega se odričemo.

S engleskog izvornika preveo Darko Polšek

LITERATURA

1. Di Berardino, M. A. (1997), *Genomic potential of differentiated cells*, New York, Columbia University Press.
2. Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., Wilmut, I. (1996), Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, *Nature*, 380:64-6.
3. Solter, D. (1996), Lambing by nuclear transfer, *Nature*, 380:24-5.
4. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 385:810-3.
5. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H. et al. (1998), Eight calves cloned from somatic cells of a single adult, *Science*, 282:2095-8.
6. Wakayama, T., Perry, A. C. F., Zuccotti, M., Johnson, K. R., Yanagimachi, R. (1998), Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei, *Nature*, 394:369-74.
7. Solter, D. (1998), Dolly is a clone - and no longer alone, *Nature*, 394:315-6.
8. Wakayama, T., Yanagimachi, R. (1999), Cloning of male mice from adult tail-tip cells, *Nat. Genet.*, 22:127-8.
9. Renard, J.-P., Chastant, S., Chesnç, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N. et al. (1999), Lymphoid hypoplasia and somatic cloning, *Lancet*, 353:1489-91.
10. Solter, D. (1988), Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes, *Ann. Rev. Genet.*, 22:127-46.
11. Bartolomei, M. S., Tilghman, S. M. (1997) Genomic imprinting in mammals, *Ann Rev Genet*, 31:493-525.
12. Surani, M. A. (1998), Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line, *Cell*, 93:309-12.
13. Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H. S., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A. et al. (1999), Analysis of telomere lengths in cloned sheep, *Nature*, 399:316-7.
14. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M. et al. (1997), Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts, *Science*, 278:2130-3.
15. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C. et al. (1998), Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts, *Science*, 280:1256-8.
16. Anderson, G. B., Seidel, G. E. (1998), Cloning for profit, *Science*, 280:1400-1.
17. Evans, M. J., Kaufman, M. H. (1981), Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 292:154-6.
18. Martin, G. R. (1981), Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7634-8.

19. Brook, F. A., Gardner, R. L. (1997), The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:5709-12.
20. Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B. L. M. (1992), Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture, *Cell*, 70:841-7.
21. Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., Donovan, P. J. (1992), Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture, *Nature*, 359:550-1.
22. Rossant, J. (1993), Immortal germ cells?, *Curr. Biol.*, 3:47-9.
23. Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., Smith, A. (1998), Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection, *Curr. Biol.*, 8:971-4.
24. Palacios, R., Golunski, E., Samaridis, J. (1995), In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7530-4.
25. Nakano, T., Kodama, H., Honjo, T. (1994), Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture, *Science*, 265:1098-101.
26. Chen, U., Kosco, M., Staerz, U. (1992), Establishment and characterization of lymphoid and myeloid mixed-cell populations from mouse late embryoid bodies, "embryonic-stem-cell fetuses", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2541-5.
27. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., Robertson, E. (1984), Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines, *Nature*, 309:255-6.
28. Thomas, K. R., Capecchi, M. R. (1987), Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, *Cell*, 51:503-12.
29. Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S. et al. (1987), Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells, *Nature*, 330:576-8.
30. Capecchi, M. R. (1989), Altering the genome by homologous recombination, *Science*, 244:1288-92.
31. Muller, U. (1999), Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis, *Mech. Dev.*, 82:3-21.
32. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. et al. (1998), Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282:1145-7.
33. Shambloott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J. et al. (1998), Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13726-31.
34. Gearhart, J. (1998), New potential for human embryonic stem cells, *Science*, 282:1061-2.
35. Rossant, J., Nagy, A. (1999), In search of the tabula rasa of human cells, *Nat. Biotechnol.*, 17:23-4.
36. Smith, A. (1998), Cell therapy: In search of pluripotency, *Curr. Biol.*, 8:R802-4.
37. Solter, D., Gearhart, J. (1999), Putting stem cells to work, *Science*, 283:1468-70.
38. Ferber, D. (1999), Lab-grown organs begin to take shape, *Science*, 284:422-5.
39. Niklason, L. E., Gao, J., Abbott, W. M., Hirschi, K. K., Houser, S., Marini, R. et al. (1999), Functional arteries grown in vitro, *Science*, 284:489-93.

40. Hubbell, J. A. (1999), A new-for-old urinary bladder, *Nature*, 398: 198-9.
41. Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J. J., Atala, A. (1999), De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering, *Nat. Biotechnol.*, 17:149-55.
42. Leiper, A. D. (1999), What is in store after stem-cell transplantation?, *Lancet*, 353:1544-5.
43. Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M. et al. (1999), Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism, *Nature*, 397:530-4.
44. Nabel, G. J. (1999), A transformed view of cyclosporine, *Nature*, 397:471-2.
45. Marshall, E. (1998), Claim of human-cow embryo greeted with skepticism, *Science*, 282:1390-1.
46. Solter, D., Aronson, J., Gilbert, S. F., McGrath, J. (1985), Nuclear transfer in mouse embryos: activation of the embryonic genome, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, L:45-50.
47. Lipsich, L. A., Kates, J. R., Lucas, J. J. (1979), Expression of a liver-specific function by mouse fibroblast nuclei transplanted into rat hepatoma cytoplasts, *Nature*, 281:74-6.
48. Lanza, R. P., Arrow, K. J., Axelrod, J., Baltimore, D., Benacerraf, B., Bloch, K. E. et al. (1999), Science over politics, *Science*, 283:1849-50.
49. Wolpert, L. (1999), Is science dangerous?, *Nature*, 398:281-2.
50. Abbott, A. (1999), Don't try to change embryo research law, *Nature*, 398:275.
51. Gordon, J. W. (1999), Genetic enhancement in humans, *Science*, 283:2023-4.
52. Wadman, M. (1999), NIH stem-cell guidelines face stormy ride, *Nature*, 398:551.
53. Marshall, E. (1999), NIH plans ethics review of proposals, *Science*, 284:413-5.
54. Wadman, M. (1999), Ethicists urge funding for extraction of embryo cells, *Nature*, 399:292.
55. Vogel, G. (1999), Harnessing the power of stem cells, *Science*, 283: 1432-4.
56. Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C., Anderson, D. J. (1999), Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells, *Cell*, 96:737-49.
57. Sikorski, R., Peters, R. (1999), Some nerve!, *Science*, 284:453.
58. Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., Frisen, J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system, *Cell*, 96:25-34.
59. Bjornson, C. R. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., Vescovi, A. L. (1999), Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo, *Science*, 283:534-7.
60. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D. et al. (1999), Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284:143-7.
61. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N. et al. (1999), Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, *Science*, 284:1168-70.