

## Genska terapija, matične celice, celično in tkivno inženirstvo

Celična biologija z genetiko  
2012/13  
Prof.dr. Irena Mlinarič-Raščan

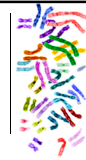


## Načini zdravljenja, osnovani na rekombinantni DNA



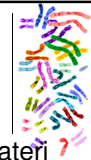
- **Rekombinantni proteini in cepiva**
- **Genska terapija**
  - **Pri vseh gre za ekspresijsko kloniranje → v ekspresijski sistem vstavimo tarčni gen**
  - za proizvodnjo rekombinantnih proteinov in cepiv izberemo optimalen eks. sistem, ki bo proizvajal želeni protein (npr. bakterije lahko gojimo v velikih količinah, se hitro delijo → vendar niso primerne za sinzeto glikoziliranih proteinov)
  - Pri genskem zdravljenju je ekspresijski sistem bolnik oz. njegove celice → uporabimo drugačne pristope, pomembna predvsem varnost za bolnika

## Genska terapija (gensko zdravljenje)



- Zdravimo **genske bolezni** – katerih vzrok je okvara gena (protein se ne sintetizira ali je nedelujoč):
    - **prirojene** genske bolezni (**dedne**)
    - **pridobljene** (npr. rak)
  - V telesne celice **vnašamo klonirane gene** z različnimi pristopi:
    - Biokemijske metode (DEAE-dekstran, kalcijev fosfat, liposomi)
    - Fizikalne metode (direktno mikroinjiciranje, elektroporacija, biolistika)
    - S pomočjo virusnih vektorjev (najpogosteje)
- } **transfekcija**  
} **transdukcija**

## Katere bolezni lahko zdravimo z gensko terapijo?

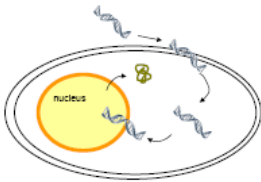


- Predvsem **enogenske bolezni** – vemo točno kateri gen je okvarjen
- Poligenske bolezni (osteoporoza, sladkorna bolezen, itd.) še niso dovolj raziskane
- Lahko zdravimo avtosomne bolezni, vezane na spolna kromosoma ali na mitohondrijsko DNA
- Zdravljenje **recesivnih bolezni** (večina dednih bolezni) je bistveno lažje kot zdravljenje dominantnih → **vstavimo kopijo neokvarjenega gena** (ni pomembno točno kam)
- **Dominantne bolezni** → običajno mutirani aleli kodirajo za proteine s spremenjenimi lastnostmi → vstavimo delujočo kopijo gena + mutirani alel **odstranimo ali preprečimo izražanje**

## Transfekcija celic

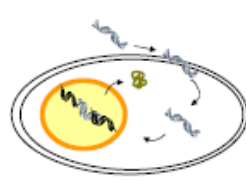
### Prehodna transfekcija

- DNA se ne vstavi v genom gostitelja
- DNA se izgubi po celični delitvi



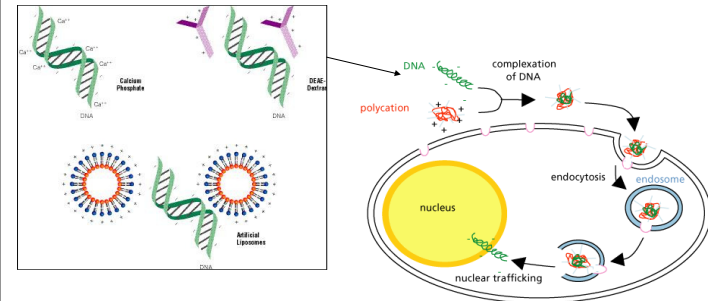
### Stabilna transfekcija

- DNA vstavljena v genom gostitelja
- Ne moremo kontrolirati, kam se bo DNA ustavila



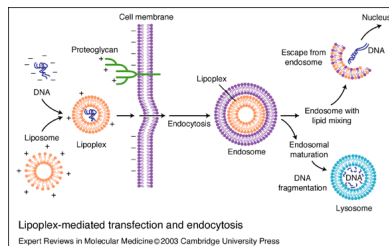
## Biokemijske metode za vnos genov (I)

- **Kalcijev fosfat, DEAE-dekstran, liposomi:** DNA kompleksiramo s kationi → olajšan vstop v celico z **endocitozo**



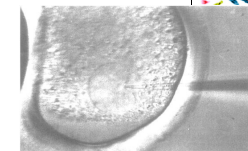
## Biokemijske metode za vnos genov(II)

- Kalcijev fosfat: za prehodno in stabilno transfekcijo
- DEAE-Dekstran: prehodna transfekcija
- liposomi: prehodna in stabilna transfekcija; DNA lahko vstavimo tudi v liposom

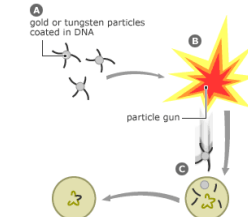


## Fizikalne metode za vnos genov

- **Mikroinjiciranje:** direktno injiciranje DNA v celice ali tkivo
- **Elektroporacija:** uporaba visoke napetosti za vnos DNA
- **Biolistika:** "bombardiranje" celic s kovinskimi delci, ki so obloženi z DNA (DNA-puške)

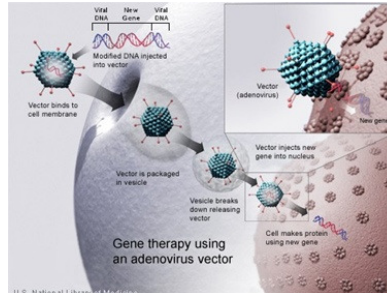


Transferring a gene using a particle gun



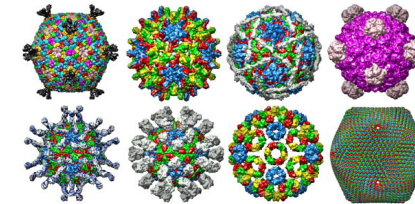
## Vnos genov z virusnimi vektorji

- Virusi, ki okužijo človeka, so vektor izbora za vnašanje DNA v človeške celice – **visoka učinkovitost transdukcije**
- **Retrovirusi**
- **Adenovirusi**
- **Lentivirusi**



## Kaj je virus?

- Sub-mikroskopska infektivna snov
- **DNA ali RNA + proteinski plašč** (+ nekateri: lipidna ovojnica)
- Ni se zmožen sam razmnoževati – **za razmnoževanje uporablja gostiteljske celice**
- Prisotni so v vseh zemeljskih ekosistemih, sposobni so okužiti vsa živa bitja



## Virusni vektorji

- **Sistemi za vnos tarčnega gena** v gostiteljske/bolnikove celice = **rekombinantni virusni delci**
- Pripravljamo jih s transfekcijo virusnih zaporedij in zaporedja tarčnega gena v produkcijskih gostiteljskih celičnih linijah
- Poleg tarčnega gena vsebujejo zaporedja, ki so potrebna za okužbo gostiteljske celice (vnos tarčnega gena), **ne vsebujejo pa zaporedij za replikacijo virusa** (virusni vektor ni patogen – ne povzroča bolezni)

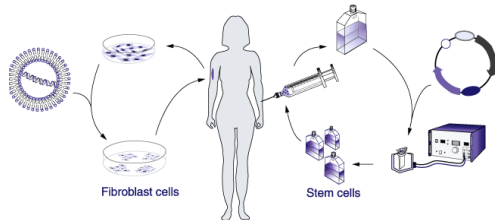
## Načini vnosa genov v bolnikov genom – glede na dednost bolezni

- **Somatsko gensko zdravljenje:** DNA vnašamo v celice posameznih tkiv, kjer se bolezen izraža → vendar ne odpravimo dedne napake v zarodnih celic → potomci imajo enako verjetnost, da bodo bolezen podedovali
- **Teoretično: zarodno gensko zdravljenje** – terapevtski gen bi vnašali v embrio – v vse njegove celice → oseba, ki bi se razvila, bi imela odpravljeno bolezen in se ne bi dedovala na potomce (to še zdaleč ni mogoče – ni zagotovljene varnosti)



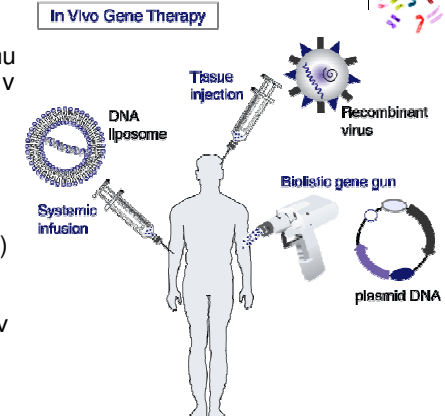
## Izvedba terapije – *ex vivo*

- Bolniku odvezamo celice bolnega organa, gojimo jih v kulturi in vanje vnesemo DNA
- Celice, ki so sprejele vnesen gen na načrtovano mesto, vrnemo nazaj v bolnikovo telo
- Prednost: lahko preverimo vsako celico
- Slabost: ne moremo vnašati v vsak organ (npr. barvna slepota)



## Izvedba terapije – *in vivo*

- DNA v primernem dostavnem sistemu vstavimo direktno v bolnikovo telo
- Za celice, ki jih ne moremo gojiti *in vitro* v zadostnih količinah (npr. možganske celice) ali jih ne moremo uspešno re-implantirati nazaj v bolnikovo telo



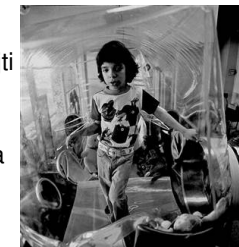
## Primer genskega zdravljenja - SCID

- Prva klinična študija se je pričela leta 1990 s prenosom manjkajočega gena za **adenozin-deaminazo (ADA)** v izolirane limfocite (*ex vivo*) pri bolnikih s sindromom **težke kombinirane imunske pomanjkljivosti** ali SCID (severe combined immunodeficiency)
- Dve obliki SCID:
  - **Recesivna** (mutacija gena za ADA; oboleli so homozigoti za mutacijo)
  - **X-vezana** (okvara gena za receptor za interleukin 7 na kromosomu X – obolevajo predvsem dečki)

IL-7 je nujno potreben za nastanek limfocitov T!

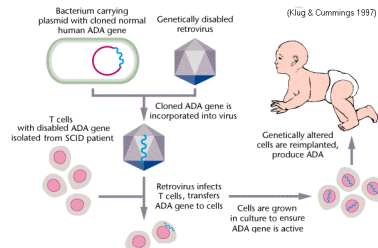
## Klasično zdravljenje SCID

- Odraščanje v sterilnem inkubatorju ("bubble boy")
- Transplantacija kostnega mozga tkivno skladne osebe (problem je najti darovalca, možnost prenosa okužbe → lahko smrtna!)
- Vsakodnevno nadomeščanje encima ADA (drago, neprijetno – injiciranje) (Encim ADA presnavlja adenzin in kadar ni aktiven, nerazgrajeni presnovki zastrupljajo limfocite.)



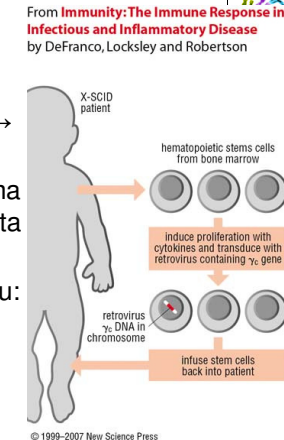
## Gensko zdravljenje SCID – prvi poskusi

- Vnos aktivnega encima ADA z **retrovirusom v limfocite T** (*ex vivo*) → problem: življenjska doba limfocitov le 6-12 mesecev → ponavljanje postopka, bolniki so še vedno potrebovali injiciranje encima ADA



## Gensko zdravljenje SCID – novejši poskusi

- Kasneje so vnesli gen v **hematopoetične celice kostnega mozga** (*ex vivo*) → stalno izražanje
- Uspeh (nadomeščanje encima ADA ni več potrebno) šele leta 2002 pri dveh bolnikih
- Stranski učinek pri zdravljenju: rak (akutna limfoblastna levkemija) – kar pri 3 od 15 bolnikov pri francoski študiji (insercijska mutageneza)

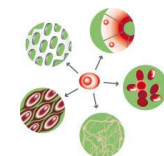


## Drugi primeri uspešnega genskega zdravljenja

- **Parkinsonova bolezen** (rezultati študije leta 2006 na 12 bolnikih: tudi do 65% izboljšanje stanja)
- **Slabovidnost/slepota** (izboljšanje občutljivosti na svetlobo in vida pri bolnikih s prirojeno obliko slabovidnosti)
- **Hemofilija B** (tudi do 80% zmanjšana potreba po prejemanju faktorja strjevanja krvi IX)
- Trenutno je zdravljenje z gensko terapijo le **eksperimentalno**

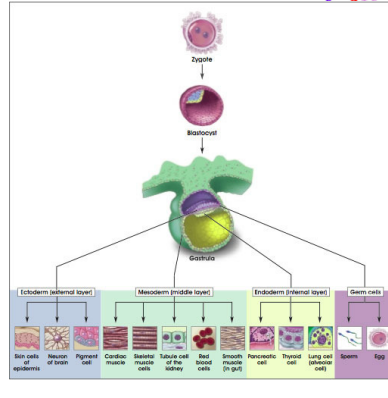
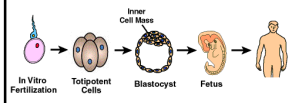
## Matične celice

- Matične celice (*angl. stem cells*) so nespecializirane nezrele celice, ki so zmožne **samoobnavljanja** in **diferenciacije** v bolj zrele celice s specializiranimi funkcijami.
- Njihova naloga v zgodnjih fazah razvoja (embrionalne matične celice, fetalne matične celice) je »izgraditi«  
organizem ter ga nato tekom življenja ohranjati zdravega in delujočega (odrasle matične celice)
- [http://hstalks.com/main/view\\_talk.php?t=250&r=39&c=252](http://hstalks.com/main/view_talk.php?t=250&r=39&c=252)



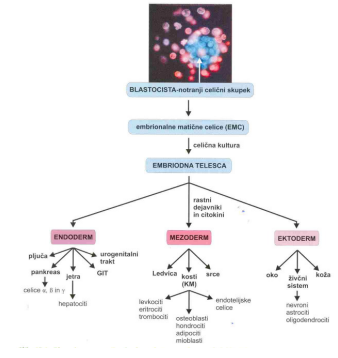
## Totipotentne matične celice

- Oplojena jajčna celica (zigota) in **vseh osem celic, ki nastanejo po prvih treh celičnih delitvah**
- Iz njih nastane vseh več kot 200 različnih vrst celic človeškega organizma



## Pluripotentne matične celice

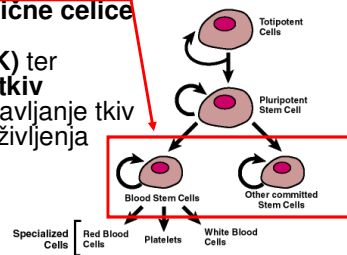
- Vir je **notranji skupek celic blastociste** (~50 celic), ki lahko diferencirajo v progenitorne (predniške) celice **vseh treh zarodnih plasti**
- Lahko tvorijo **večino različnih celičnih vrst**, ne morejo pa več samostojno izdelati vseh tkiv za popoln razvoj ploda



Vir slike: Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila, SFD, 2007

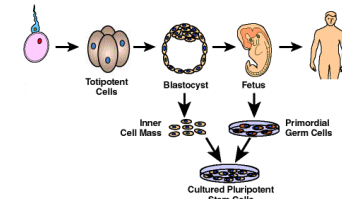
## Multipotentne progenitorne (predniške) celice

- Med nadaljnjo delitvijo postanejo pluripotentne EMC (embrionalne matične celice) vse bolj diferencirane in imajo omejene razvojne sposobnosti
- Sem spadajo **fetalne matične celice (FMC)**, **matične celice iz popkovnične krvi (MCPK)** ter **matične celice odraslih tkiv (MCOT)**, ki skrbijo za obnavljanje tkiv in tkivnih poškodb tekom življenja posameznika



## Uporaba EMC v terapevtske namene

- Etična, moralna, verska in socialna vprašanja
- Praktična vprašanja: varnost, imunogenost, dostopnost
- Le omejeno število držav dovoli poskuse z EMC, znotraj EU velike razlike
- Embrio????  
partehnogensis

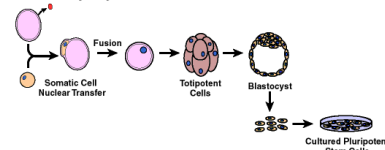


<http://www.youtube.com/watch?v=ZmKFDvHuuWA>



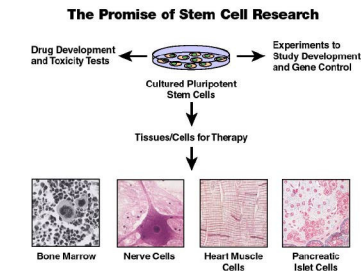
## Terapevtsko kloniranje (I)

- Za pripravo tkivno skladnih oz. z bolnikom genetsko identičnih EMC
- **Tehnika prenosa jedra somatske celice: v izpraznjeno oocito prenesejo jedro odrasle somatske celice bolnika** → nastane blastocista → odstranijo celice notranje mase in jih namnožijo ter diferencirajo v celice, ki jih bolnik potrebuje za zdravljenje



## Terapevtsko kloniranje (II)

- Opisani postopek še ni v rabi za zdravljenje, je pa nepogrešljiv za raziskovalne namene (proučevanje procesov diferenciacije)



## Terapevtsko kloniranje (III)

- **Problem: potreba po zelo velikem številu jajčnih celic** → ni še zakonsko urejeno doniranje jajčnih celic: prostovoljno-plačano?
- V okviru projekta **EuroSTELLS** so razpravljali, da bi se liberaliziralo doniranje jajčnih celic in da bi se lahko recimo prodajale. V Veliki Britaniji že razmišljajo o tem (**Prof. dr. Krešimir Pavelić, molekularni biolog**, intervju v Sobotni prilogi Večera, 14.3.2009)

## Terapevtsko kloniranje – etična vprašanja

- Prof. dr. **Jože Trontelj**, predsednik državne komisije za medicinsko etiko pri ministrstvu za zdravje: **kloniranje zarodkov za namene zdravljenja komaj kaj manj sporno kot reproduktivno kloniranje**. "Vprašanje je, ali naj bo dopustno ustvarjati človeške zarodke zato, da jih bomo potem usmrtili in porabili kot vir celic za nova tkiva in organe, s katerimi bomo zdravili druge ljudi. Ne smemo pozabiti, da so človeški zarodki človeška bitja, čeprav so šele na začetku svojega razvoja in čeprav njihovega življenja in nedotakljivosti danes še ne varuje noben zakon. V veliki večini držav zakoni varujejo človeka šele po rojstvu, ko pridobi status osebe," pravi prof. dr. Trontelj. Tisti, ki v terapevtskem kloniranju ne vidijo nič slabega, zatrjujejo, da zarodek pred 14. dnevom razvoja še ne čuti ničesar, se ne zaveda, saj še nima zrelih živčnih celic. "

## Uporaba embrionalnih matičnih celic v svetu (vir: Mladina, številka 29, 2006)

- **Permisivna politika:** dovoljuje različne postopke z zarodkovimi izvornimi celicami, denimo tako imenovani **raziskovalno oziroma terapevtsko kloniranje**. Gre za prenos celičnega jedra iz celice v jajčece, iz katerega so bili odstranili jedro. Med državami v tej kategoriji so Združeno kraljestvo, Belgija, Švedska, Iran, Izrael, Indija, Singapur, Kitajska, Japonska, Južna Koreja, Južnoafriška republika in druge. V teh državah živi okoli 2,7 milijarde ljudi.
- **Prožna politika:** raziskave izvajajo **le na darovanih celicah ambulant za zdravljenje neplodnosti, ne izvajajo pa terapevtskega kloniranja**. Pogosto veljajo tudi določene omejitve, denimo da se smejo uporabiti le preostali zarodki, ki jih ne potrebujejo več za reprodukcijo. V to kategorijo sodijo na primer Avstralija, Brazilija, Kanada, Francija, Španija, Nizozemska, Tajvan in druge, v njih pa živi okoli 700 milijonov ljudi.
- **Restriktivna politika oziroma nedorečena politika:** mednje sodijo tako prepoved raziskav človeških zarodkov do raziskav na uvoženih izvornih celicah, vendar tudi tu veljajo stroge omejitve. Restriktivno politiko imajo Avstrija, Irska, Norveška, Poljska (to so države z največ omejitev), Nemčija, Italija in ZDA (ki imajo nekoliko blažje predpise).

May 25, 2005



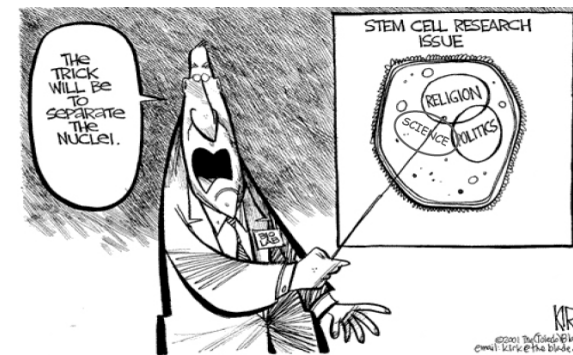
- *President George W. Bush steadfastly refused to consider stem cell research if it involved embryonic cells, which offered the greatest promise for major advances in treating a variety of ailments, supporting only specific and limited research; he cited not wanting to "take lives to save lives."*

March 19, 2009



- *President Obama lifted the ban by George W. Bush on scientific research involving embryonic stem cells. These cells offer the greatest promise for potentially finding cures for Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, juvenile diabetes, spinal cord injuries and a host of other conditions, but religious objections, equating such research to abortion, kept those cells — and those potential cures — off limits for eight years.*

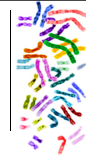
## Prihodnost raziskav na EMC ?



Alternativa: Matične celice odraslih tkiv, matične celice iz popkovnične krvi

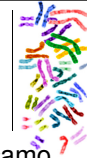


## Reproduktivno kloniranje



- Ustvariti novo človeško bitje, ki je genetska kopija drugega človeka
- **"Reproduktivno kloniranje ni dovoljeno v nobeni državi,** kjer je to področje zakonsko urejeno. V Evropi je 20 držav podpisalo protokol o prepovedi kloniranja, ta pa velja kot zakon," pravi prof. dr. Trontelj. Slovenija je protokol ratificirala že decembra 1999.

## Umetna oploditev = zunajtelesna oploditev



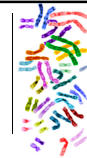
- Za oploditev z biomedicinsko pomočjo se odločamo, kadar tudi s pomočjo zdravljenja ne pride do zanositve po naravni pot (cca 10% parov)
- Pri umetni oploditvi gre za posnemanje naravnega spočetja, pri kloniranju pa bi šlo za razmnoževanje na nespolen način
- Oploditev z darovanimi spolnimi celicami: *Za oploditev z biomedicinsko pomočjo z uporabo darovanih spolnih celic se odločimo pri tistih neplodnih parih, pri katerih zaradi bolezni pri moškem ali ženski ni mogoče dobiti spolnih celic, ali pa sta partnerja nosilca hudih genetskih bolezni.* ([www.daruj.com](http://www.daruj.com))

## Matične celice odraslih tkiv (MCOT) (I)



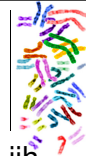
- Etično sprejemljiva alternativa EMC
- Najverjetneje MCOT nastajajo med samim embrionalnim razvojem in v času življenja vztrajajo v posebnih specializiranih prostorih ali nišah znotraj posameznih organov in tkiv
- **Nadomeščajo fiziološko izgubljene celice** (v črevesnem epiteliju vsake 3 dni, v dermisu vsakih 14 dni) ter **obnavljajo tkiva po poškodbah**

## Matične celice odraslih tkiv (MCOT) (II)



- **Endodermalnega izvora:** MC plučnega epitelija, MC gastrointestinalnega trakta, MC pankreasa, jetrne ovalne celice, MC urogenitalnega trakta
- **Mezodermalnega izvora:** kostni mozeg (KM), krvotvorne matične celice (KMC), stromalne matične celice (SMC), matične celice v srcu
- **Ektodermalnega izvora:** MC živčnega sistema, kožne MC, očne MC

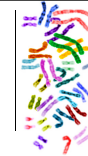
## Možnosti zdravljenja z matičnimi celicami



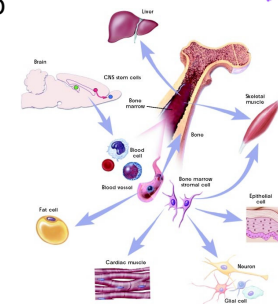
Bolezni, ki jih trenutno že zdravimo oz. ki bi jih lahko v kratkem začeli zdraviti:

- Diabetes, akutne jetrne in srčne odpovedi, motnje v delovanju mišic, artritis, poškodbe in motnje v delovanju možganov, motnje vida, motnje v delovanju ledvic, bolezni krvotvornega in imunskega sistema, akutne levkemije in limfomi, različne vrste solidnih tumorjev

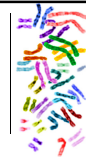
## Matične celice iz kostnega mozga (I)



- Že vrsto let se uporabljajo kot vir krvotvornih matičnih celic za **zdravljenje krvnih bolezni**, predvsem levkemij pri otrocih
- Tkivna skladnost (HLA tipizacija) pri **alogenem darovanju** (drugi osebi)
- [www.bmdw.org](http://www.bmdw.org)



## Matične celice iz kostnega mozga (II)



- Odvzem kostnega mozga za **avtologo** darovanje/zdravljenje (namenjeno isti osebi) → za regeneracijo obrabljenih, poškodovanih tkiv (**regenerativna medicina**)
- KM je predvsem bogat vir **progenitornih matičnih celic vezivnega tkiva (PCVT) za tkivno inženirstvo** (popravljanje vezivnih tkiv)
- Celice lahko direktno presadimo ali predhodno namnožimo

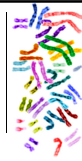
## Uporaba matičnih celic za regenerativno zdravljenje



- Podjetja, ki se ukvarjajo s to aktivnostjo:
  - Evropa: <http://www.xcell-center.com/> (ponujajo **avtologi odvzem MC iz kostnega mozga** in re-implantacijo, obravnavanje vsakega bolnika posebej, samoplačniško)
  - ZDA: <http://www.osiristx.com/> (razvili so **prapravek iz MC kostnega mozga za obnovo tkiv** (odvzamejo zdravim prostovoljcem), ki ne povzroči zavrnitve presadka pri prejemnikih) – klinično preizkušanje
  - <http://www.advancedcell.com/> - <http://www.mytogen.com/> → bolniku odvzamejo matične celice iz mišic, in vitro gojijo in vstavijo v srce (za regeneracijo srca pri kongestivni srčni odpovedi) – klinično preizkušanje

## Matične celice iz popkovnične krvi (MCPK) (I)

- Pred rojstvom novorojenčka je njegova kri bogata z matičnimi celicami, ki se selijo v tkiva in organe, kjer bodo tekom življenja služile za obnavljanje organizma: krvotvorne matične celice gredo v kostni mozeg, ostale pa v druge organe. Po rojstvu otroka in prerezu popkovnice ostane nekaj te krvi, ki je **bogata z matičnimi celicami**, v ožilju popkovnice.



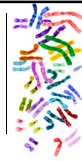
## Matične celice iz popkovnične krvi (MCPK) (II)

- Popkovnično kri je mogoče odvzeti in shraniti za bodočo uporabo v **javnih ali zasebnih bankah popkovnične krvi**
- **Javne banke** = darovanje za alogeno uporabo (za drugo osebo) (<https://www.netcord.org>)
- **Zasebne banke** = shranjevanje za morebitno lastno uporabo
- Zbiranje popkovnične krvi je **moralno-etično nesporno**, saj se posteljica po porodu sicer zavrže, postopek odvzema je neboleč ter ne predstavlja bistvenega tveganja za porodnico ali novorojenčka



## Uporaba MCPK za zdravljenje

- Vsebuje krvotvorne matične celice = že 20 let se uporabljajo za **zdravljenje krvnih bolezni** (predvsem levkemij pri otrocih) in **bolezni imunskega sistema**
- Vsebuje tudi mezenhimske matične celice (podobno kot kostni mozeg) = lahko se diferencirajo v celice jeter, trebušne slinavke, ledvic, kosti, celice vezivnega tkiva, živčnega tkiva in celice srčne mišice → v prihodnosti pričakujejo, da bo mogoča uporaba teh celic za **regeneracijo tkiv**
- Kljub temu, da je uporaba lastnih matičnih celic iz popkovnične krvi trenutno le hipotetična, pa je tudi mnenje Evropske skupine za etiko v znanosti in novih tehnologijah (EGE) naslednje: *»če se bo v prihodnosti regenerativna medicina tako razvila, da bo omogočila avtologno uporabo matičnih celic, potem bo ob rojstvu shranjena lastna popkovnična kri posamezniku omogočila dostop do novih oblik zdravljenja.«*



## Banke popkovnične krvi v Sloveniji

- Javna banka: Zavod RS za transfuzijsko medicino (do 4.5.2009 shranjenih 108 vzorcev)

(Članek v Dnevniku:

<http://www.dnevnik.si/novice/zdravje/1042263682>)

<http://poptv.si/multimedia/dojencek/darovanje-popkovnicne-krvi.html>

- Zasebne banke:

Izvorna celica  
Biohramba  
Neocelica



## Tkivno in celično inženirstvo (I)

- Celice odzamejo iz bolnika, jih *in vitro* namnožijo (običajno na ustreznih nosilcih) in ponovno vsadijo
- Uveljavljena in zelo uspešna:
  - gojenje avtolognih hondrocitov za popravilo globokih poškodb kolenskega sklepnega hrustanca
  - celjenje opeklin in ran z epidermalnimi kožnimi nadomestki
- Tudi slovensko podjetje: <http://www.educell.si/>

