

Inimese tüvirakud ja rakuteraapia

Toomas Neuman – Tallinna Tehnikaülikooli geenitehnoloogia instituut

Inimese tüvirakkude avastamine ja meetodikate väljatöötamine nende kasvatamiseks *in vitro* on loonud võimaluse autoloogilise rakuteraapia tekkeks. Koos tüvirakkude temaatikaga on viimasel kümnendil ühiskonna tähelepanu keskmesse kerkinud ka inimese ja loomade kloonimine. Teadusliku kontseptsioonina on nii tüvirakud kui ka kloonimine suhteliselt vanad valdkonnad. Efektīvse rakuteraapia areng eeldab täpseid teadmisi tüvirakkude bioloogiast ja nendel teadmistel põhinevate meetodite loomist tüvirakkude suunatud kultiveerimiseks.

Mis on tüvirakud ja miks nad on populaarsed?

Tüvirakud ja tüvirakkudega seotud teaduslikud, meditsiinilised, eetilised ning õiguslikud probleemid on tõusnud ühiskonna teravdatud tähelepanu keskmesse viimase kümne aasta jooksul. Miks on see nii?

Üheks põhjuseks on kindlasti asjaolu, et tüvirakkudest loodetakse palju abi onkoloogiliste, neurooloogiliste ja südame-veresoonkonnahaiguste ravis. Nimetatud haigused on tänapäeval suurimad lahendamata probleemid meditsiini valdkonnas. Vastuoluliseks muudab aga tüvirakkude kasutamise asjaolu, et rohkesti tähelepanu pälvinud embrüonaalsete tüvirakkude saamiseks hävitatakse viljastamisel tekkinud inimese loode. Looete kui inimese alge hävitamine aga tekitab hulgaliselt eetilisi probleeme.

Seda valdkonda on mitmes riigis ja samuti rahvusvaheliselt üritatud seadustega reguleerida. Üks markantsemaid näiteid on USA seadus, mis ei võimalda kasutada riiklikke vahendeid inimese embrüonaalsete tüvirakkude uurimistöös (juhuil kui ei ole tegemist rakuliinidega, mis on juba loodud ja heaks kiidetud). Inimese tüvirakkude loomist ja nende uurimist on üritatud kriminaliseerida ja mõnes riigis on see isegi õnnestunud.

Tüvirakkudest rääkides mõeldakse sageli väga erinevaid rakke, mis käituvad erinevalt ja saadakse erinevatel meetoditel. Mis siis ikkagi on tüvirakud? Tüvirakud taastoodavad endasarnaseid rakke ja omavad võimet areneda eri tüüpi diferentseerunud rakkudeks. Tüvirakke eristatakse ja liigitakse mitmete kriteeriumide alusel. Kõige levinumaks on tüvirakkude klassifitseerimine nende arengulise

potentsiaali põhjal, s.t. nende võime järgi diferentseeruda ja areneda erinevateks rakutüüpideks.

Arengulise potentsiaali alusel eristatakse järgmist tüüpi tüvirakke:

- Totipotentsed tüvirakud. Need rakud on võimelised diferentseeruma kõikideks rakutüüpideks. Totipotentsed on eelkõige embrüonaalsed tüvirakud.
- Pluripotentsed tüvirakud. Inimese loode areneb kolmest lootelehest ja pluripotentsed rakud on võimelised arenema rakutüüpideks, mis on kolme lootelehe – ektodermi, mesodermi ja endodermi – tulemid. Pluripotentsed tüvirakud on eraldatud paljudest inimese kudetest, nt luuüdi, aju, nahk, rasv, lihased ja erinevad epiteliaalsed koed.
- Multipotentsed tüvirakud. Need rakud diferentseeruvad ainult arenguliselt lähedasteks rakutüüpideks. Kui räägitakse täiskasvanud organismi tüvirakkudest, siis mõeldakse eelkõige multipotentseid tüvirakke, nt vereloomet ja neuraalne tüvirakk.
- Unipotentsed tüvirakud. Need rakud suudavad diferentseeruda ainult üheks rakutüübiks, kuid omavad seejuures võimet eneseuunduseks. Nt nahas asuvad epidermaalsed tüvirakud.

Hulk teadustöid mitmetest laborites näitab tüvirakkude arengulise potentsiaali muutmise võimalikkust, kasutades erinevaid geneetilise manipuleerimise meetodeid või aktiveerides ja inaktiveerides erinevaid rakusisesid reguloorseid signaali ülekande radasid. Samuti on võimalik dediferentseerida erinevaid rakutüüpe, mis viib tüvirakkude või tüvirakusarnaste rakkude tekkeni. Üheks huvitavaks

näiteks selles vallas on pluripotentsete tüvirakkude sarnaste rakkude saamine strooma rakkudest, kasutades nelja tüvirakkudele omase transkriptsiooniteguri ekspresseerimist fibroblastides *in vitro* (1).

Kõrvuti arengulise potentsiaaliga kasutatakse tüvirakkude klassifitseerimiseks samuti **tüvirakkude eraldamise allikaid**, mis viib allpool toodud süsteemini:

- Täiskasvanud tüvirakud. Täiskasvanud tüvirakud on organismi kudedes asuvad mittediferentseerunud multipotentsed rakud, mida sageli kutsutakse ka somaatilisteks tüvirakkudeks. Neid rakke on võimalik eraldada täiskasvanud inimese kudedest ja kasvatada suhteliselt suurtes hulkades organismiväliselt. *In vitro* propageeritud ja teatud arengu suunas diferentseeritud täiskasvanud tüvirakud on parimad kandidaadid autoloogilise rakuteraapia meetodite ja tehnoloogiate loomiseks. Autoloogilistel rakkudel baseeruva rakuteraapia suur eelis on immunoloogilise sobimatuse puudumine transplantaadi ja pere-mehe vahel, kuna kasutatakse sama indiviidi rakke.
- Embrüonaalsed tüvirakud. Embrüonaalsed tüvirakud on *in vitro* kasvatatavad pluripotentsed rakud, mis pärinevad varajase loote (blastotsüst) mittediferentseerunud sisemisest rakumassist. Nende rakkudega ongi seotud enamik aktuaalseid eetilisi ja õiguslikke probleeme. Tekkinud probleeme üritatakse vältida uute meetodite väljatöötamisega, mis ei nõua loote hävitamist. Kahjuks on sellised tehnoloogiad praegu varases uurimistöö staadiumis ja ainuke kindel tee saada embrüonaalseid tüvirakke on eraldada neid lootest.
- Kasvajate tüvirakud. Kasvajate tüvirakud on maligne transformatsiooni teel täiskasvanud tüvirakkudest tekkinud rakud, olles vähkkasvajate metastaseerumise ja haiguse taastekkumise allikaks. Tänapäeval on tüvirakud tuvastatud peaaegu kõigis enam levinud kasvajates. Need tüvirakud kui võimalikud ravimite märklaud on väga hoolika uurimise all paljudes laborites.
- Nabavädi vere tüvirakud. Nabavädi vere tüvirakud eraldatakse kas platsenta või nabavädi verest kohe pärast sündi. Need on ka ainukesed tüvirakud, mida praegu kasutatakse intensiivselt

kliinilises praktikas. Alates 1988. aastast on nabavädi vere tüvirakke edukalt kasutatud mitmete vererakuhaiguste ja leukeemia ravis. Nabavädi vere säilitamiseks on loodud koepangad.

Tüvirakkude kontseptsiooni ja uuringute lühiajalugu

Kuigi tüvirakud on ühiskonna huviorbiiti tõusnud viimasel aastakümnel, on nendega tegeldud ja neid uuritud juba pikemat aega. Alates eelmise sajandi kuuekümnendatest aastatest on töö tüvirakkudega olnud teadlaste pidevas huvikeskmes.

1960. aastal näitasid Altman ja Das, et täiskasvanud aju toimub uute neuronite sünd ja areng (neurogenees), mille aluseks on tüvirakud. See lähenemine oli vastandiks pikalt valitsenud seisukohale, et täiskasvanud imetajate aju uusi neuroneid elu jooksul ei teki.

1963. aastal demonstreerisid McCulloch ja Till iseennast taastootvate tüvirakkude olemasolu luuüdis.

1978. aastal avastati hematopoeetilised tüvirakud inimese nabavädi verest.

1981. aastal eraldati hiire embrüonaalsed tüvirakud varase loote sisemisest rakumassist. See saavutus võimaldas välja töötada spetsiifiliste geenide selektiivse inaktiveerimise meetodi (*knockout*), mis põhineb DNA homoloogilisel rekombinatsioonil embrüonaalsetes tüvirakkudes. See meetod on ka nüüdisaegse arengugeneetika edu aluseks individuaalsete geenide funktsiooni tuvastamisel arengus, samuti kudede ja elundite funktsioneerimisel.

1992. aastal kirjeldati neuraalsete tüvirakkude kultiveerimist *in vitro*. Alates Reynolds'i ja Weissi artikli (2) ilmumisest on tüvirakkude temaatika üldsuse tähelepanu all.

1995. aastal allkirjastas USA president Bill Clinton seaduse, mis keelas USAs maksumaksjate raha kasutamise uurimistööde finantseerimiseks, kus kasutatakse tüvirakke, mille saamiseks on hävitatud inimese loode.

1997. aastal näidati, et leukeemia tekib hematopoeetiliste tüvirakkude muutumise tulemusena, mis on ühtlasi ka esimene otsene tõestus vähi tüvirakkude eksisteerimise kohta.

1998. aastal löid dr Thomson ja tema kaastöötajad (Wisconsini Madisoni Ülikool, USA) esimesed inimese embrüonaalsete tüvirakkude liinid.

2000. aastal ilmus suur hulk artikleid, mis veenvalt demonstreerisid täiskasvanud tüvirakkude plastilisust ehk teisisõnu nende võimet areneda erinevates suundades.

2003. aastal tuvastas dr Songtao Shi (*National Institutes of Health*, USA) uue ja paljulubava täiskasvanud tüvirakkude allika inimese piimahammastest (3). See avastus viis piimahammaste pankade tekkeni, neist tuntuim on Bioeden USAs.

2004.–2005. aastal avaldas Lõuna-Korea teadlane Hwang Woo-Suk koos kaastöötajatega artiklisarja, kus ta näitas, et inimese viljastamata ootsüütidest on võimalik luua embüonaalseid tüvirakke. Kahjuks osutusid nende artiklite tulemused võltsinguks ja nii kirjutati tüvirakkude uuringute ajalukku uus ja teadlasi ning teadustööd diskrediteeriv peatükk.

19.07.2006 pani USA president George W. Bush veto eelnõule, mis võimaldanuks kasutada maksumaksjate raha embrüonaalsete tüvirakkude uurimistöös.

Tüvirakkude uurimise ajalugu on selgelt näidanud, et juhul kui erinevate gruppide huvid põrkuvad ja valdkonnaga on seotud suured lootused, võib rakendusliku aspektiga teaduslikust kontseptsioonist kergesti saada skandaale ja kõmu-uudiseid tulvil valdkond. "Segadusse" on veelgi õli tulle valanud kloonimistematika, millel on ka otsene seos tüvirakkudega.

Kloonimine ja tüvirakud

Kloonimise all mõeldakse eelkõige uute rakkude ja organismide loomist, mis on eellasraku või -organismi geneetilised koopiad. Kloonimise protseduuri käigus eraldatakse doonorrakust geneetiline materjal (kas DNA, kromatiin või rakutuum) ja siiratakse retsipientrakku, millest on geneetiline materjal eemaldatud. Selle tulemuseks on identse geneetilise materjaliga rakud. Kui retsipientina kasutada ootsüüti (munarakk), siis on võimalik loodud rakust saada uus loode ja järelikult ka geneetiliselt identne indiviid.

Mõistet "kloonimine" kasutatakse ka tüvirakkude puhul, kuigi siin on sellel hoopis teine tähendus. Tüvirakuualases kirjanduses tähendab kloonimine ühe raku järglaste paljundamist, mille tagajärjel saadava rakuliini kõik rakud on sama geneetilise materjaliga. Kloonimise mõistete segiajamine ongi põhjuseks, miks tüvirakke seostatakse ajakirjanduses sageli kloonimisega. Samas on olemas ka loomulik seos. Geneetiliselt identsete indiviidide loomisel on oluline, et geneetiline materjal realiseeruks vastavalt arengus ette nähtud programmile. Enamiku diferentseerunud rakkude (ka eellasrakkude) geneetiline materjal on epigeneetiliselt muudetud, mis väljendub DNA või kromatiini metüülimises, atsetüülimises või ribosüülimises. Muudetud geneetiline materjal ei võimalda aga normaalseks arenguks vajalike geneetiliste protsesside täpset realiseerumist, tuues kaasa arenguhäireid ja põhjustades haigusi (4, 5).

Epigeneetiliste muutuste vältimise üheks võimaluseks on geneetilise materjali eraldamine embrüonaalsetest tüvirakkudest. Teiselt poolt on võimalik kasutada kloonimist, mis põhineb geneetilise materjali ülekandel uute embrüonaalsete tüvirakuliinide loomisel. Selline lähenemine võimaldaks luua embrüonaalsed tüvirakud, mis on geneetiliselt identsed doonoriga ja kasutatavad autoloogilise rakuteraapia materjalina. Kahjuks ei ole praegu inimese tüvirakkudega manipuleerimise tehnoloogia veel arenenud sellisesse staadiumi, et oleks täielikult tagatud vajalike omadustega rakkude teke, kuid kindlasti on see perspektiivikas käsitlus, mille edukat rakendamist võib loota tuleviku rakuteraapias.

Rakenduslikult on võimalik eristada reproduktiivset ja terapeutilist kloonimist. Reproduktiivne kloonimine on seotud uute isendite loomisega, mis on taunitav inimeste puhul, kuid mida kasutatakse juba suure eduga põllumajandus- ja lemmikloomade paljundamisel ning samuti hävimisohus olevate loomaliikide säilitamisel. Terapeutiline kloonimine piirdub rakkude, kudede ja elundite kasvatamisega. Sarnaselt tüvirakkudega on ka kloonimisega seotud teadustegevus märgatavalt vanem kui temaga kaasnevate vastuoluliste probleemide kajastamine

ajakirjanduses. Sellealased uurimistööd said alguse möödunud sajandi alguses ja kõrgendatud tähelepanu neile kasvab võrdeliselt võimalike rakenduste reaalseks muutumisega.

Kloonimise lühiajalugu

1902. aastal näitas Hans Spemann, et areneva varase loote kõik rakud sisaldavad identselt geneetilist infot ja on võimelised andma aluse uue organismi tekkele.

1928. aastal tegi Hans Spemann esimese eduka rakutuuma siirdamise katse.

1952. aastal kloonisid Briggs ja King konnakullesed.

1962. aastal näitas John Gurdon, et on võimalik kloonida konnasid, kasutades täiskasvanud loomast isoleeritud diferentseeritud rakke.

1979. aastal väitis Karl Illmensee, et ta kloonis kolm hiirt.

1984. aastal kloonis Steen Willadsen embrüonaalse raku tuuma siirdamist kasutades esimese imetaja (lammas).

1993. aastal demonstreeriti potentsiaalset võimalust kasvatada inimese loode ühest rakust kuni 32 raku staadiumini.

1994. aastal kloonis dr Ned First (USA) esimesed veised, kasutades varaseid looteid.

1996. aastal kloonis dr Ian Wilmut (Ühendkuningriik) lamba Dolly, kasutades täiskasvanud raku tuuma siirdamist.

1997. aastal klooniti (*Oregon Regional Primate Research Center*, USA) esimesed primaadid, kasutades DNAd, mis oli eraldatud arenevast lootest.

1997. aastal kloonis Wilmuti laboratoorium esimese geneetiliselt modifitseeritud lamba Polly, kelle genoomi olid integreeritud inimese geenid.

1999. aastal leiti, et lammas Dolly näitab varase vananemise märke.

2000. aastal andis Vatikan teada, et katoliku kirik on inimese kloonimise vastu.

2002. aastal väitis kompanii Clonaid, et nad on klooninud inimese. Kahjuks (või õnneks) ei ole nad oma väiteid suutnud teadusavallikkusele tõestada.

Vaieldamatult on selge, et imetajate (seega ka inimese) kloonimine on tänapäeval võimalik. Selle võimaluse kasutamine ei sõltu enam ainuüksi teadlastest ja meedikutest, vaid selles peab kokku leppima ühiskond tervikuna.

Mis teeb tüvirakkudest tüvirakud?

Paaril viimasel aastal on kindlaks tehtud spetsiifilised molekulaarsed mehhanismid, mis tagavad tüvirakkudele nende tüvirakulisuse säilimise läbi paljude rakupõlvkondade ja diferentseerumise eri rakutüüpideks. Nii embrüonaalsetes kui ka koespetsiifilistes täiskasvanud tüvirakkudes toimivad molekulaarsed mehhanismid, mis on unikaalsed.

Inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes on tuvastatud regulaarsed võrgustikud, mis sisaldavad suurt hulka geene. Mitmete laborite töö tulemusena on kujunenud arusaamine, et inimese ja ka teiste imetajate embrüonaalsete tüvirakkude regulatsiooni süsteemi aluseks on transkriptsioonitegurid OCT4, SOX2 ja NANOG (6, 7). Nimetatud transkriptsioonitegurid reguleerivad suurt hulka geene, mis on vajalikud nii tüvirakulisuse säilitamiseks kui ka diferentseerumiseks erinevateks rakutüüpideks. Oluliseks komponendiks tüvirakkude geneetilises programmis on OCT4, SOX2 ja NANOG autoregulatsioon. Autoregulatsioon tagab tüvirakulisuse säilimise jagunevates tüvirakkudes ja võimaldab diferentseerumise programmi alustamist õige signaali saabumisel. Totipotentsetes tüvirakkudes on erinevate arengusuundade geneetilised programmid inhibeeritud, kuni saabub signaal, mis lülitab sisse spetsiifilise arengutee ja käivitab geneetilise programmi. Sama kehtib ka koespetsiifiliste tüvirakkude kohta. Koespetsiifiliste tüvirakkude areng on samuti määratud spetsiifiliste transkriptsioonitegurite signaalmolekulide süsteemiga, mis on iseloomulik igale konkreetsele rakutüübile.

Rakuteraapia ja tüvirakud

Rakuteraapia aluseks on kas patsiendi enda (autoloogiline rakuteraapia) või teiste indiviidide (allogeenne rakuteraapia) rakud. Nii autoloogilise kui ka allogeenne rakuteraapia suurimateks

probleemideks on sobilike rakkude saamine ja transplanteeritud rakkude integreerumine ravi vajavatesse kudedesse ja organitesse. Tüvirakkude kasutamine rakuteraapias nõuab meetodite väljatöötamist tüvirakkude eraldamiseks, kultiveerimiseks ja nende transplantatsiooniks ettevalmistamiseks. Enamikul rakuteraapia kliinilistel näidustustel ei ole kasu lihtsalt tüvirakkude siirdamisest, vaid nendest tuleb kasvatada teatud omadustega kindlal diferentseerumistasmel olevad rakud.

Seoses rakuteraapiaga räägitakse palju tüvirakkude saamisest ja kasvatamisest, unustatakse aga teine väga oluline komponent – nimelt siiratud rakkude integreerumine retsiipiendi koesse. Nüüdisajal on juba võimalik eraldada ja kasvatada suurtes kogustes erinevaid tüvirakke, kuid nende kliiniline rakendatavus takerdub sageli koesse integreerumise taha.

Üheks rakuteraapia potentsiaalseks kasutusala on neuroloogilised haigused ja vigastused. Närvi-

süsteemi rakuteraapia nõuab aga väga täpset rakkude integreerimist olemasolevasse ajukoosse, kuna rakkude omavaheline interaktsioon on määrava tähtsusega aju funktsioneerimisel. Siin ei saa loota, et tüvirakkude lisamine ajukoosse viib nende õige diferentseerumiseni ja integratsioonini. Närvisüsteemi rakuteraapia nõuab rakkude eelnevat diferentseerimist ja eri populatsioonide kasutamist transplantatsioonil. Lihtsam on olukord kudede puhul, mis koosnevad vähestest rakutüüpidest ja kus spetsiifilised interaktsioonid ei mängi määravat osa. Sellisteks kudedeks on näiteks luuüdi, kõhrkude, luukude, maks ja mitmed teised suhteliselt homogeensed koed. Rakuteraapial põhinevad rakendused nende kudede ravis ongi andnud parimaid kliinilisi tulemusi.

Kokkuvõtteks võib öelda, et kiire edasimineku tüvirakkude uurimises on loonud võimaluse efektiivse rakuteraapia arenguks.

Kirjandus

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–76.
2. Reynolds BA and Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707–10.
3. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG and Shi S. SHED-Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 2003;100:5807–12.
4. Bllloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 2006;24:2007–13.
5. Jaenisch R, Hochedlinger K, Eggan K. Nuclear cloning, epigenetic reprogramming and cellular differentiation. *Novartis Found Symp* 2005;265:107–18.
6. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;122:947–56.
7. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006;442:533–8.

Summary

Human stem cells and cell therapy

Discovery of human stem cells and development of techniques with the aim to culture them *in vitro* have created a basis for development of effective cell therapies. Public attention on stem cells during the last decade has also highlighted topics related to human and animal cloning.

Intensive research of both stem cells and cloning started already several decades ago. Development of effective cell therapy requires the understanding of the biology of stem cells and invention of techniques allowing to differentiate stem cells into specific cell types.

toomas.neuman@ttu.ee