

**Bebić, Bernarda**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:559346>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Bernarda Bebić

**HIMERE**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Klinika za porodništvo i reprodukciju

Predstojnik: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori: prof. dr. sc. Martina Lojkić

dr. sc. Ivan Butković

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Tugomir Karadjole
2. prof. dr. sc. Martina Lojkić
3. dr. sc. Ivan Butković
4. doc. dr. sc. Ivan Folnožić

## POPIS PRILOGA

### POPIS SLIKA:

Slika 1. Prikaz neobičnog fenotipa krzna kod ženke mačke perzijske pasmine kod koje je dokazan himerizam. (a) Mačka u dobi od 4 tjedna starosti. (b) Ista jedinka u dobi od 7 mjeseci starosti (JARAUD i sur., 2020.).

Slika 2. Prikaz neobičnog fenotipa krzna ženskog šteneta labrador retriever pasmine u dobi od (a) 1 dana, (b) 6 mjeseci, te (c) s ostatkom legla (DREGER i SCHMUTZ, 2012.).

Slika 3. (Lijevo) Prikaz druge teorije nastanka himeričnih jedinki koja zagovara preimplantacijsko spajanje trofoblasta dvije genetski različite zigote. (Desno) Prikaz treće teorije koja uključuje oplodnju biovulirajućih folikula u kojem se nalaze dvije oocite unutar jedne zone pellucide. U obje teorije fuzija se može dogoditi i postimplantacijski (McNAMARA i sur., 2016.).

Slika 4. Prikaz in vivo stvaranja ljudskih organa koristeći metodu komplementacije blastociste. (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.)

Slika 5. Prikaz mlade ovca-koza himere (POLZIN i sur., 1987.)

### POPIS TABLICA:

Tablica 1. Usporedba životinjskih modela opisanih u tekstu (GLOVER i sur., 2010.)

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. ISTOVRNSNI HIMERIZAM ( <i>intraspecies</i> ).....	3
2.1. MIKROHIMERIZAM .....	3
2.2. DOSAD PRIJAVLJENI SLUČAJEVI .....	4
2.3. TEORIJE NASTANKA.....	7
2.4. OSTALE SLIČNE PATOLOGIJE BLIZANSTVA .....	10
3. MEĐUVRSNI HIMERIZAM ( <i>interspecies</i> ).....	13
3.1. OSNOVNI POJMOVI .....	13
3.2. METODE STVARANJA.....	14
3.2.1. PRIMARNE EMBRIONALNE STANICE.....	14
3.2.2. UBRIZGAVANJE PLURIPOTENTNIH MATIČNIH STANICA .....	15
3.2.3. DJELOMIČNE HIMERE.....	16
3.3. VAŽNI ČIMBENICI.....	18
3.4. ŽIVOTINJSKI HIMERIZAM.....	19
3.5. LJUDSKO-ŽIVOTINJSKI HIMERIZAM .....	21
3.5.1. CILJ .....	21
3.5.2. ŽIVOTINJSKI MODELI .....	22
3.5.3. ETIČNOST .....	27
3.5.4. ZAKONSKA REGULATIVA .....	28
4. RASPRAVA .....	30
5. ZAKLJUČAK.....	32
6. LITERATURA .....	33
7. SAŽETAK .....	41
8. SUMMARY .....	42
9. ŽIVOTOPIS.....	43

## 1. UVOD

Pojam *himera* najčešće podsjeća na čudovišno biće porijeklom iz antičke grčke mitologije koje ima zmijski rep, tijelo kože i glavu lava iz koje izlazi plamen vatre. Međutim, himerizam kao pojam u današnjoj znanosti ne povezuje se sa spomenutom povijesnom abominacijom (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Znanost definira himeru kao organizam ili tkivo sastavljeno od barem dvije genetski različite populacije stanica porijeklom od različitih zigota (TIPPETT, 1983.). Ovaj se pojam treba razlikovati od *hibrida* koji predstavljaju potomstvo nastalo prirodnom reprodukcijom među životinjama različitih vrsta te *mozaika*, organizama koje posjeduju genetski različite stanice porijeklom od iste zigote (WU i sur., 2016.).

Himerizam može biti unutar iste vrste (*intraspecies*), gdje himeru predstavlja organizam porijeklom od genetski različitih, ali istovrsnih zigota (DEVOLDER i sur., 2021.). Takav oblik himerizma događa se gotovo uvijek prirodnim odnosno spontanom putem, a zabilježen je kod brojnih životinjskih vrsta uključujući i čovjeka. Unutar te kategorije često se javljaju prirodni slučajevi tzv. mikrohimerizma, kada dvojajčani blizanci u maternici dijele majčin dotok krvi te su samim time djelomične himere, kao i njihova majka, zbog prisustva stanica različitog genotipa od svoga (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). U ovaj tip himerizma također spadaju slučajevi obične transfuzije krvi te transplantacije organa gdje u organizam ulaze stanice različitog porijekla i genotipa. Osim djelomičnih himera postoje i sistemske himere koje nastaju fuzijom embrija tijekom ranog razvoja rezultirajući jednim organizmom koji u sebi sadrži različite stanice ravnomjerno rasprostranjene kroz sva tkiva (SUCHY i NAKAUCHY, 2017.). U prirodi, postoje mnogobrojni slučajevi himerizma nastalog spontano kao npr. zebrina trava (lat. *Miscanthus sinensis 'Zebrinus'*) te himerizma nastalog evolucijom gdje je glavni predstavnik zapravo sami čovjek (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.).

Druga kategorija u glavnoj podjeli himerizma međuvrsni je himerizam (*interspecies*) koji predstavlja organizam koji u sebi sadrži genetski različite stanice nastale od zigota porijeklom od različitih vrsta (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Ovaj je oblik himerizma u cijelosti ljudski induciran, a svoju svrhu pronalazi u potencijalnom liječenju brojnih ljudskih bolesti s posebnim naglaskom na ljudsko-životinjskim himerama. Samim time, otvorena su vrata velikom broju

istraživanja u području biomedicine koja uključuju proučavanja mehanizama tumora, bolesti jetre, razvoja ljudskih živčanih stanica te neurodegenerativnih poremećaja na životinjskim modelima (DEVOLDER i sur., 2021.). Himerizam potencijalno omogućuje stvaranje ljudskih organa i tkiva unutar životinjskog organizma čime bi došlo do velikog napretka na području medicine omogućujući transplantaciju organa te poboljšavanje kvalitete ljudskog života. Međutim, uz brojne prednosti nadolaze i mnoga etička pitanja kao moralnost korištenja ljudskih zametaka, zanemarivanje dobrobiti životinja te dobrobiti viših primata (osobito čimpanza), potencijal humaniziranih ljudsko-životinjskih himera te njihov status, kao i potencijalna mogućnost reprodukcije (KOPLIN, 2019.).

S obzirom na slabu istraženost ovoga područja u svijetu, a pogotovo u hrvatskoj veterinarskoj i humanoj medicini, cilj ovoga diplomskog rada je približiti i detaljnije iznijeti što zapravo znači himerizam, objasniti načine na koje se očituje u okolini te pokušati pobliže istražiti uzroke i mehanizme nastanka. S posebnim naglaskom na međuvrsni himerizam, glavni je cilj ovoga rada približiti taj pojam hrvatskoj publici u području biomedicine te objasniti potencijalni značaj koje ono donosi. Uz brojne prednosti, u radu će se obraditi i niz etičkih pitanja koja su usko povezana s ovim pojmom.

## 2. ISTOVRSNSI HIMERIZAM (*intraspecies*)

### 2.1. MIKROHIMERIZAM

Prisutnost stanica placente, porijeklom od fetusa, u majčinom krvotoku uzrokuju stanje poznato pod nazivom mikrohimerizam. S obzirom na to da himera označava jedinku koja posjeduje stanice s dva ili više različita genotipa porijeklom od različitih zigota, majka i plodovi koje nosi postaju privremene himere zajedno sa životinjama/osobama koje primaju transfuziju krvi ili transplantirani organ (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.).

Otkriće da placenta posjeduje širok spektar stanica s velikim regenerativnim potencijalom uvelike utječe na smjer istraživanja matičnih stanica u puno većem opsegu od dosad poznatih uloga koje su imale u razvoju fetusa (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.). Istraživanjima na miševima i ljudima i dalje nije otkriveno kojim točno mehanizmima stanice prolaze kroz decidualne stanice maternice, ali zato je utvrđena njihova pozitivna uloga u uspostavljanju fetalnog imuniteta te stvaranju tolerancije majčinog organizma na strane stanice u vlastitom krvotoku. Ovo otkriće posebno je važno u vezi s nenaslijeđenim maternalnim antigenima i njihovom trajanju do odrasle dobi te indukciji tolerancije povezane s odbacivanjem transplantiranih organa. (MOLD i sur., 2008.).

Uz brojne pozitivne uloge, rezultati istraživanja provedenih u humanoj medicini otkrila su njihovu vrlo vjerojatnu povezanost s nastankom brojnih autoimunih bolesti, uključujući sistemski eritemski lupus (SLE) (KOWALZICH i sur., 2005.). Ovo je otkriće podijelilo pojavu mikrohimerizma na "dobar" i "loš" himerizam u kontekstu uloge koje fetalno-maternalne stanice imaju na oba organizma (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.).

Istraživanja su dokazala prisustvo fetalnih mikrohimeričnih stanica u različitim organima majke, uključujući mozak, jetru, pluća, srce, bubrege, kožu te koštano srž (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.). Na mišjem modelu dokazana je migracija fetalnih placentalnih stanica u ozlijeđena područja maternalnog srčanog tkiva te njihovu diferencijaciju u spontano kucajuće kardiomiocite, endotelne stanice te stanice glatkog mišićnog tkiva (KARA i sur., 2012.). Stanice izolirane iz placenti primjenjene su intravenozno muškim miševima s ozljedom srčanog tkiva kod kojih je uočena migracija himeričnih stanica u ozlijeđena područja s pritom poboljšanom srčanom funkcijom. Također, zabilježena je



diferencijacija fetalnih mikrohimeričnih stanica u limfocite, hepatocite te neurone. Svoju multipotenciju fetalne mikrohimerične stanice pokazale su *in vivo* i *in vitro* (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.).

Puno je češća pojava fetalnih stanica u majčinom krvotoku (eng. *fetal microchimerism* (FMC)) nego u suprotnoj situaciji gdje se maternalne stanice nalaze u fetalnom krvotoku (eng. *maternal microchimerism* (MMC)) (VADAKKE MADATHIL I CHAUDHRY, 2020.). Dokazano je perzistiranje maternalnih stanica u organizmu fetusa do 40 godina i više (ZHOU i sur., 2000.), a fetalnih stanica u majčinom krvotoku do 27 godina postpartum (BIANCHI i sur., 1996.).

Ove stanice pokazale su sva svojstva matičnih stanica zametka s dodatnim ulogama u rastu, preživljavanju te ulozi u imunološkom sustavu. Bez obzira na nedovoljnu istraženost funkcija koje ove multipotentne stanice posjeduju, vidljiv je velik potencijal za napredak u regenerativnoj veterinarskoj i humanoj medicini.

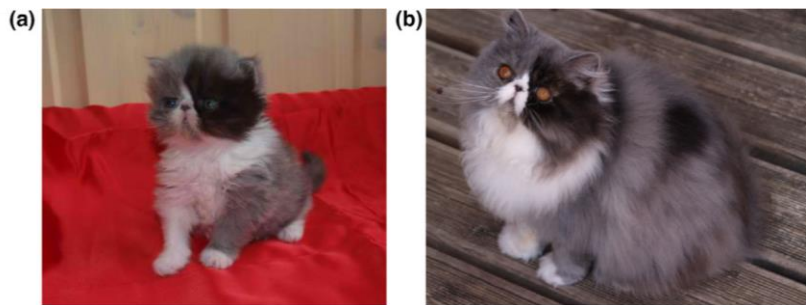
## 2.2. DOSAD PRIJAVLJENI SLUČAJEVI

Slučajevi himerizma kod jedinki iste vrste do sada su prijavljeni kod mačaka, miševa, koza, tvorova, pasa, konja i ljudi, od kojih su istraživanja rađena najčešće na mačkama i psima koji imaju atipičnu boju krzna pasmine kojoj pripadaju (JARAUD i sur., 2020.). Najčešće je riječ o samoinicijativnom upitu uzgajivača o obavljanju pretraga zbog nepoznate etiologije takvog fenotipa, neizvjesnosti daljnje mogućnosti rasplodivanja te same vrijednosti životinje.

Istraživanja na domaćim mačkama i psima s neobičnom bojom krzna dovela su do zaključka da, uz moguće druge uzroke, može biti riječ o himerama. Naime, kod mužjaka mačke sa šarenom bojom krzna, tzv. bojom kornjačevine, gdje se crvena boja dlake miješa s ostalim tipičnim bojama krzna, najveća je mogućnost da se pronađe himerična jedinka. Razlog toga prisustvo je lokusa na X kromosomu koji nosi gen za narančastu boju dlake. Neki drugi razlozi nastanka takvog krzna mogu biti aneuploidija ograničena na spolne kromosome (XXY) ili

kombinirane uključenosti autosoma i genosoma. Mužjaci s ovakvom bojom krzna obično su sterilni osim ako je riječ o himerama s normalnim kariotipom (38,XY) (JARAUD i sur., 2020.).

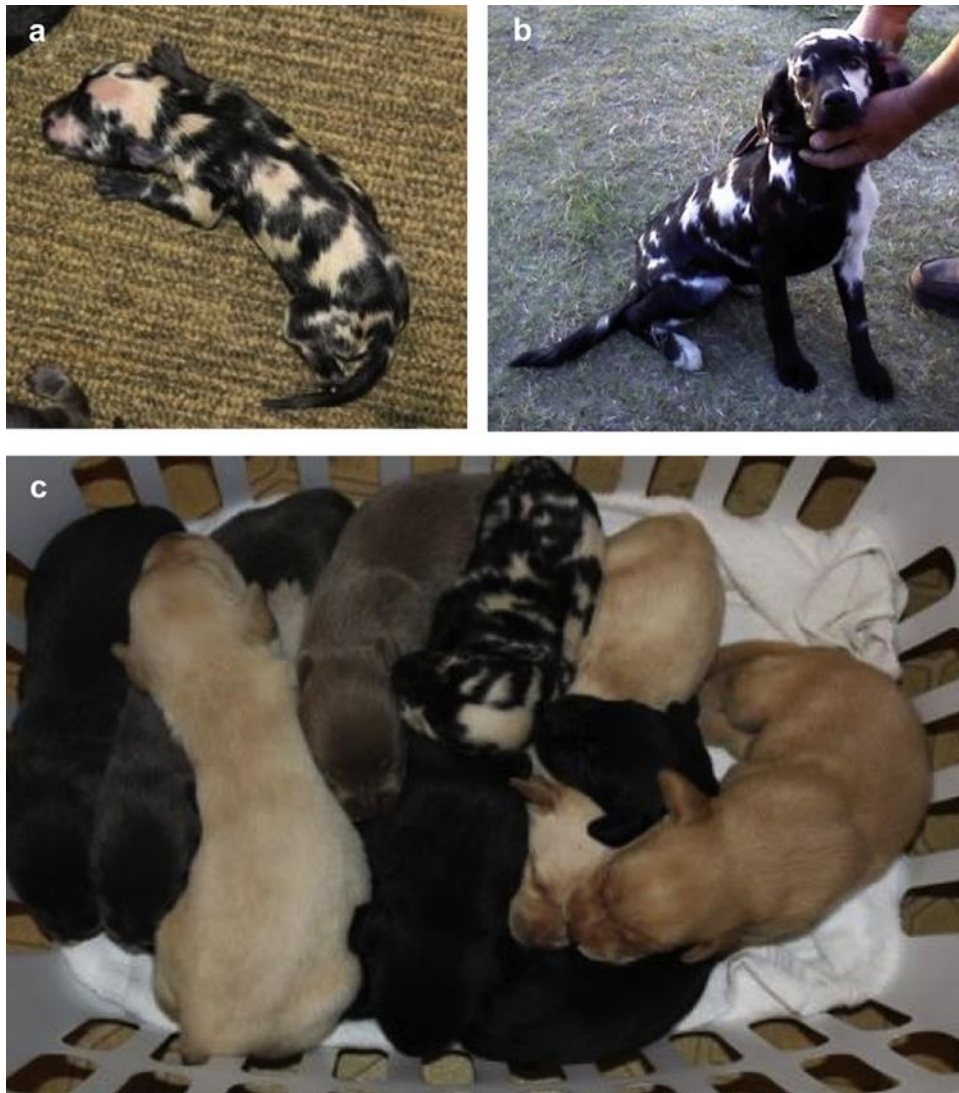
Nedavno je, 2020. godine, metodom DNK profiliranja potvrđen slučaj himerizma kod ženke mačke perzijske pasmine gdje je krzno te jedinke prikazivalo neobičan fenotip od crne boje krzna s područjima sive i bijele boje koji se zadržao i kroz odraslu dob. Uzorak za pretragu bila je krv, dlaka s korijenom te bris bukalne sluznice, a rezultati istraživanja otkrili su homozigotnost stanica sive boje dlake te heterozigotnost krvnih stanica te stanica crne dlake. Svi podatci dobiveni istraživanjem ukazivali su na slučaj prirodnog himerizma, a u prilog je išla i plodnost jedinke čime je isključena aneuploidija, a kasnije i mozaicizam (JARAUD i sur., 2020.).



Slika 1. Prikaz neobičnog fenotipa krzna kod ženke mačke perzijske pasmine kod koje je dokazan himerizam. (a) Mačka u dobi od 4 tjedna starosti. (b) Ista jedinka u dobi od 7 mjeseci starosti (JARAUD i sur., 2020.).

DREGER i SCHMUTZ sličan su slučaj opisali 2012. godine kada je uzgajivač labrador retrievera zatražio da se istraživanje napravi na njegovom ženskom štenetu koje je imalo fenotip krzna nespecifičan toj pasmini. Krzno šteneta bilo je prošarano bijelom, žutom i crnom bojom u nepravilnim uzorcima. Uzorci su uzeti jednako kao i u prethodno navedenom slučaju, a rezultati istraživanja otkrili su dva različita genotipa u uzorku dlake crne boje, dok su uzorak

žute dlake te obrisak bukalne sluznice imali uobičajen, zajednički genotip. Isključivši mogućnost mozaicizma, donešen je zaključak da je riječ o himeri. Negativan rezultat dobiven je korištenjem primera za Y kromosom u sva tri uzorka upućujući na teoriju da je ova himerična jedinka nastala fuzijom dvaju ženskih zigota (XX) te da će najvjerojatnije biti plodna.



Slika 2. Prikaz neobičnog fenotipa krzna ženskog šteneta labrador retriever pasmine u dobi od (a) 1 dana, (b) 6 mjeseci, te (c) s ostatkom legla (DREGER i SCHMUTZ, 2012.).

Prijavljeni slučajevi dvospolnih odnosno heteroseksualnih himera (XX/XY) kod pasa jako su rijetki iako sačinjavaju 50% slučajeva himerizma kod pasa, dok preostali postotak čine normalne, istospolne himere (XX/XX, XY/XY) (DREGER i SCHMUTZ, 2012.).

Uz navedeno, ovakvi slučajevi himerizma, kod kojeg je napravljeno istraživanje, samo su oni koji naočigled imaju neobičnu i nekarakterističnu boju krzna, dok kod mnogih pasmina postoje razne varijacije boja što povećava vjerojatnost da ima mnogo više slučajeva prirodnog, istovrsnog himerizma nego što je prijavljeno i poznato.

Istraživanjem provedenim na ovim dvjema jedinkama može se donijeti zaključak da je himerizam moguće otkriti i dijagnosticirati analizom polimorfizma jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism* (SNP)) koristeći se PCR metodom (eng. *polymerase chain reaction*) namijenjenu genima za uobičajenu boju krzna (DREGER i SCHMUTZ, 2012.).

## 2.3. TEORIJE NASTANKA

McNAMARA i sur. (2016.) postavili su tri teorije nastanka himeričnih jedinki koje su temeljene istraživanjem na ljudskim modelima. Prvi spomen himeričnih jedinki kod ljudi zabilježen je još 1976. godine (ROBINSON i sur., 1976.), a opisan je kod blizanaca s monokorionskom dizigotnom placentacijom (eng. *monochorionic dizygotic*, MCDZ).

### 1. PLACENTALNE ANASTOMOZE KOJE DOPUŠTAJU RANI PRIJENOS GENETSKOG MATERIJALA

Sindrom fetu-fetalne transfuzije (eng. *twin to twin transfusion syndrome*, TTTS) patologija je karakteristična za monokorionsku blizanačku trudnoću i njihovu zajedničku cirkulaciju (ĐELMIŠ, 2017.). Kroz anastomoze krvnih žila posteljice dolazi do kontinuirane izmjene krvi između blizanaca te ih time čini himerama. Međutim, potrebno je naglasiti da je blizanac primatelj (eng. *recipient twin*) u puno većoj mjeri himeričan od

blizanca davatelja (eng. *donor twin*) (UMSTAD i sur., 2012.). Uz to, uzrokom tkivnog himerizma smatra se migracija himeričnih hematopoetskih matičnih stanica i njihova posljedična ektopična diferencijacija (FUMOTO i sur., 2014.). Tome u prilog, istraživanjima je otkivena perzistencija himerizma kod blizanaca nakon selektivne laserske fotokoagulacije placentalnih anastomoza (ASSAF i sur., 2010.).

## 2. FUZIJA DIJELOVA PORIJEKLOM OD DVIJE GENETSKI RAZLIČITE ZIGOTE

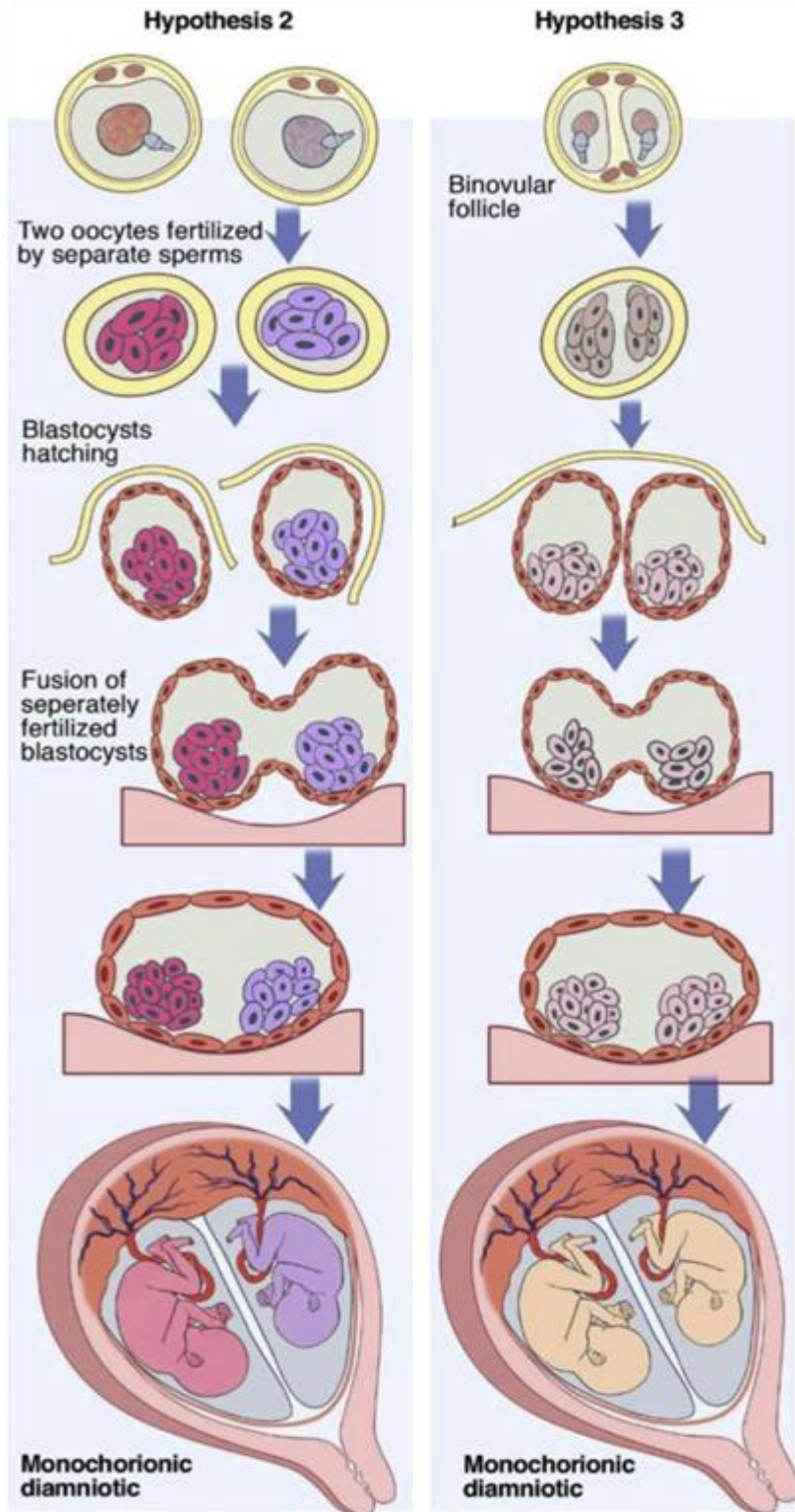
Postoji mogućnost spajanja koriona u stadijima rane trudnoće s posljedičnom degeneracijom tkiva (NYLANDER i OSUNKOYA, 1970.). Preimplantacijski može doći do spajanja trofoblasta, a *in vitro* i do spajanja embrija (TARKOWSKI i WOJEWODZKA, 1982.). Blizanci s monokorionskom dizigotnom placentacijom puno su češći kod slučajeva trudnoće nastale korištenjem tehnologije potpomognute reprodukcije (eng. *assisted reproductive technologies*, ART). Remećenjem integriteta *zone pellucide* prilikom potpomognutog izlijevanja zametka (eng. *assisted hatching*) te prijenosom većeg broja embrija koji se nalaze prostorno blizu, embriji se izlažu većoj vjerojatnosti spajanja te posljedičnom nastanku spomenutog sindroma (WILLIAMS i sur., 2004.).

## 3. OPLODNJA BIOVULARNIH FOLIKULA

To su folikuli u kojima se nalaze dvije oocite unutar jedne *zone pellucide* (McNAMARA i sur., 2016.). Ovakav tip folikula uočen je istraživanjem na ženama čija je ovulacija inducirana korištenjem gonadotropina (PAPADAKI, 1978.). Oplodnja biovularnih folikula postignuta je *in vitro*, međutim nije opisana mogućnost nastavka s daljnjom trudnoćom (VAN DE LEUR i ZEILMAKER, 1990.).

FIGURE 3

Models of chimeric twinning



Slika 3. (Lijevo) Prikaz druge teorije nastanka himeričnih jedinki koja zagovara preimplantacijsko spajanje trofoblasta dvije genetski različite zigote. (Desno) Prikaz treće teorije koja uključuje oplodnju biovularnih folikula u kojem se nalaze dvije oocite unutar jedne zone pellucide. U obje teorije fuzija se može dogoditi i postimplantacijski (McNAMARA i sur., 2016.).

## 2.4. OSTALE SLIČNE PATOLOGIJE BLIZANSTVA

### 1. BLIZANCI POLARNOG TIJELA

Polarno tijelo je mali, stanični nusproizvod porijeklom od mejotičke diobe oocite. U prirodnom tijeku, apoptoza polarnog tijela nastupa u razdoblju unutar 17-24 sata od nastanka ostavljajući fragmente unutar *zone pellucide* (SCHMERLER i WESSEL, 2011.). Smatra se da ova patologija nastaje oplodnjom prvog ili drugog polarnog tijela s dva različita spermija. Ovu teoriju podupire istraživanje provedeno na monokorionskim blizancima od kojih je muški blizanac imao normalan (XY) kariotip, a ženski, akardijačni blizanac, triploidni (XXX) kariotip. (BIEBER i sur., 1981.).

### 2. HIDATIFORMNA MOLA S POSTOJEĆIM BLIZANCEM

Višestruka gravidnost s kompletnom hidatiformnom molom (eng. *complete hydatiform mole*, CHM) te istodobno živim blizancem (eng. *coexisting live fetus*, CLF) karakterizirana je postojanjem fetusa s normalnim kariotipom, anatomijom te placencijom uz molarnu sastojnicu, bez ikakvih fetalnih dijelova, te placentu koja ima diploidne, očeve kromosome. Uz to, ultrazvučnim pregledom, vidljiv je samo slučaj CHM-a (CANDELIER, 2015.). Inače, hidatiformna mola naziv je za gestacijsko trofoblastični poremećaj koji nastaje patološkom oplodnjom koje dovodi do kromosomskih abnormalnosti (McNAMARA i sur., 2016.). Postoji kompletna i parcijalna hidatiformna mola, od kojih kompletna predstavlja oplodnju u kojoj je spermij udvostručio svoju DNK te takva stanica ima diploidni broj kromosoma, svi podrijetlom od oca. Parcijalna mola nastaje kada jajnu stanicu oplode dva spermija rezultirajući triploidnošću (CANDELIER, 2015.). Ovi se slučajevi trebaju diferencijalno dijagnostički isključiti od CHM-CFL sindroma. U povijesti, većina slučajeva spomenute patologije rezultirala je spontanom pobačajem (McNAMARA i sur., 2016.).



### 3. NESTAJUĆI BLIZANCI (eng. *vanishing twin syndrome*, VTS)

Predstavlja višeploidnu gravidnost sa spontanom gubitkom zametka ili fetusa u prvih tri mjeseca. Smatra se da je VTS sindrom nedovoljno prijavljiv u blizanačkoj gravidnosti (SPENCER i sur., 2010.), a stopa pojavljivanja viša je kod slučajeva s potpomognutom oplodnjom (LA SALA i sur., 2006.).

### 4. PAPIRUSNA MUMIFIKACIJA PLODA (lat. *fetus papiraceus*; *mumificatio foeti*)

Ovaj pojam odnosi se na mumifikaciju fetusa u višeploidnoj gravidnosti bez posljedica na ostale, žive plodove. Mumifikacija nastaje ako plodovi uginu u kasnijem stadiju gravidnosti, nakon što je počela osifikacija kostiju, uz ostanak ploda u maternici (SAMARDŽIJA i DOBRANIĆ, 2012.). Dolazi do resorpcije plodne vode te tjelesne i tkivne tekućine ploda, a plodne ovojnice smežuraju se i isuše te posljedično slične papirusu.

Mumifikacija plodova vrlo je čest poremećaj održavanja gravidnosti u krmača i nazimica, kao i goveda, kod kojih se pojavljuje češće nego kod ostalih vrsta domaćih životinja (SAMARDŽIJA i DOBRANIĆ, 2012.). Etiologija nije u potpunosti razjašnjena, a smatra se da je najčešće posljedica virusnih infekcija poput reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (RRSS) te bolesti Aujeszkeg. Pretpostavlja se da uzroci ovog poremećaja mogu biti i genetski činitelji, torzija ili kompresija pupkovine zajedno uz hormonalne nepravilnosti. U krmača i nazimica najčešće nema nikakvih vanjskih znakova, a plotkinje mogu mumificirani plod nositi od tri mjeseca pa čak do dvije godine. Dijagnoza se najčešće otkriva tek tijekom porođaja kad se mumificirani plodovi mogu naći među živima, međutim nije rijetko ni postavljanje dijagnoze rektalnom pretragom plotkinje zbog produljenog trajanja gravidnosti. Liječi se izazivanjem pobačaja mumificiranog ploda, a prognoza daljnje rasplodne sposobnosti plotkinje najčešće je povoljna (SAMARDŽIJA i DOBRANIĆ, 2012.).

U humanoj medicini prijavljeni su slučajevi kod monokorionskih i dikorionskih blizanaca te višeploidne gravidnosti. Smatra se da nastaje zbog tromboembolije kod monokorionskih te placentalne ishemije kod dikorionskih (McNAMARA i sur., 2016.).



## 5. PARAZITSKO BLIZANSTVO (eng. *fetus in fetu*)

Odnosi se na postojanje jednog ili više djelomično razvijenih fetusa smještenih u cijelosti na tijelu normalno razvijenog fetusa. Ovakvi slučajevi iznimno su rijetki (McNAMARA i sur., 2016.). Dugo vremena smatralo se da je riječ o dobro razvijenom teratomu, međutim prisustvo kralježaka s prikladno organiziranim udovima i organima usmjerilo je istraživanje u smjeru parazitskog blizanstva pritom ne isključivši povezanost nastanka ove patologije s nastankom teratoma. Uzrok ovog oblika parazitizma leži u perzistentnim anastomozama vitelinog krvotoka koje su dovele do apsorpcije jednog fetusa unutar drugog tijekom ventralnog preklapanja trilaminarnog embionskog diska (GEORGE i sur., 1983).

### 3. MEĐUVRSNI HIMERIZAM (*interspecies*)

#### 3.1. OSNOVNI POJMOVI

Kao što je već poznato, međuvrsni himerizam opisuje postojanje jedinstvenog organizma koji u sebi sadrži genetski različite stanice nastale od zigota porijeklom od različitih vrsta (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). S obzirom na to da je nastanak ovakvih jedinki ljudski induciran, spomenuti tip himerizma pripada arteficialnom, odnosno umjetnom himerizmu. Prije svega, potrebno je istaknuti nekoliko pojmova vezanih uz stvaranje ovog tipa himeričnih jedinki.

Primarne ili embrionalne himere nastaju u slučaju inicijacije himerizma u ranoj fazi embriogeneze, često rezultirajući sistemskim himerizmom (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Unutar ovih jedinki, različite populacije stanica postoje od iznimno rane faze razvoja, moguće čak od oplodnje (McLAREN i BOWMAN, 1969.). Bitno je naglasiti da primateljske stanice, kao ni davateljske, nisu još prošle kroz proces diferencijacije (MASCETTI i PEDERSEN, 2016.). Inače, primarne su himere formirane stapanjem izoliranih blastomera, porijeklom od najmanje dva embrija, agregacijom dva ili više rano odcijepljena embrija ili transplantacijom matičnih stanica unutar *zone pellucide* (ili u šupljinu blastociste preimplantacijskog embrija) (MASCETTI i PEDERSEN, 2016.). Uz primarne, bitno je naglasiti postojanje sekundarnih himera koje predstavljaju organizme čije je tkivo porijekla od dva ili više odrasla pojedinca, ili od embrija kod kojih je razdoblje organogeneze već počelo (McLAREN i BOWMAN, 1969.). Posljedično tome, sekundarni je himerizam većinski ograničen na jedno ili više već diferenciranih tkiva (MASCETTI i PEDERSEN, 2016.).

Uz spomenutu podjelu, bitno je istaknuti različitosti među heterotopičnim i ortotopičnim, kao i heterokroničnim i izokroničnim himerama. Ortotopične himere dobivene su transplantacijom stanica davatelja njihovoj tkivno srodnoj lokaciji kod primatelja, gdje će moći sudjelovati u prirodnim procesima razvoja uz prikladnu organizaciju tkiva domaćina (WU i sur., 2016.). Kao primjer, može se uzeti transplantacija donorskih hepatocita u jetru primatelja. Heterotopične himere nastaju u slučaju diferencijacije ili integracije stanica davatelja na različito mjesto u organizmu primatelja tj. domaćina (WU i sur., 2016.). Primjer za potonje opisuje transplantacija donorskih  $\beta$ -stanica gušterače u jetru primatelja. Izokronične jedinice nastaju u slučaju kada su davateljske stanice prenešene u organizam domaćina u vrijeme sukladno vremenu razvoja dotičnih

stanica *in vivo* porijekla, dok u suprotnom slučaju nastaje heterokronična himera (WU i sur., 2016.).

## 3.2. METODE STVARANJA

### 3.2.1. PRIMARNE EMBRIONALNE STANICE

Prve sistemske himere kod sisavaca nastale su stapanjem primarnih stanica porijeklom od embrija (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Agregacija morula metoda je u kojoj se dvije ili više morula, bez pripadajućih *zona pellucida*, spajaju *in vitro*. Posljedično tome, spojene morule tvore himeričnu blastocistu (TARKOWSKI 1961.). Postoje četiri tehnike agregacije od kojih prvu predstavlja agregacija dva diploidna embrija (*Sandwich Aggregation*) (PLÜCK i KLASSEN, 2009.). Ova tehnika koristi se za spajanje dva genetski identična embrija kao i dva embrija s različitim genotipovima. Nakon stavljanja dvije genetski različite morule, bez pripadajućih *zona pellucida*, zajedno u udubljenje stanične kulture u laboratorijskoj zdjelici, ostavljaju se preko noći tijekom koje se odvija agregacija te nastaje blastocista (PLÜCK i KLASSEN, 2009.). Kao takva, može se prenijeti u organizam pseudogravidne ženke miša kako bi se omogućio *in vivo* razvoj himerične jedinice. Drugu tehniku predstavlja agregacija diploidnih embrija i embrionalnih matičnih stanica u kojoj dolazi do spajanja osmostanične morule s kulturom embrionalnih matičnih stanica koje se, slično prethodnoj tehnici, ostavljaju preko noći da bi sljedećeg dana tvorili embrij kasnog stadija ili blastocistu (PLÜCK i KLASSEN, 2009.). Generacija tetraploidnih embrija nastaje trećom tehnikom agregacije u kojoj dolazi do spajanja dvije morule koje su u dvostaničnom stadiju, uz pomoć elektrofuzijskog generatora. Četverostanični embriji koji nastaju ovom metodom dalje se koriste za spajanje s embrionalnim matičnim stanicama, koja opisuje četvrtu tehniku agregacije (PLÜCK i KLASSEN, 2009.). Uspjeh ovih tehnika uvelike ovisi o kvaliteti embrionalnih matičnih stanica.

Postoji i slična tehnika koja uključuje agregaciju izoliranih blastomera porijeklom od preblastuliranih embrija. Uz ovaj način, blastomere mogu biti ubrizgane u morulu ili subzonalni prostor između morula i *zona pellucida* sekundarnog embrija. Ovim metodama

himerizam započinje prije početka blastulacije, odnosno diferencijacije stanica (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.).

Sistemske himere mogu nastati i nakon procesa blastulacije, a proces uključuje spajanje embrioblasta (eng. *inner cell mass* (ICM)) blastociste sa sekundarnim embrijem (GARDNER i JOHNSON, 1973.). Tehnika uključuje uklanjanje *zone pellucide* trofoblasta da bi se mogla izolirati ICM. Potom se ICM ubrizgava u drugu blastocistu ili se spaja s drugom morulom.

Himere nastale premještanjem ICM-e razlikuju se od onih koje nastaju agregacijom morula ili blastomera iz razloga što je prije procesa blastulacije većina stanica totipotentna. Agregacija totipotentnih stanica rezultira u himeričnom trofoblastu i embrioblastu stvarajući himerizam u svim embrionalnim tkivima (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Himere koje nastaju transferom embrioblasta nisu trofoblastno himerične što znači da imaju manji doprinos u placenti i ekstraembrionalnim tkivima od himera nastalih spajanjem morula ili blastomera (ROSSANT, 1976.). S obzirom na to, u slučaju implantacije i daljnjeg razvoja međuvrsne himere s himeričnim trofoblastom, metode totipotentne agregacije nisu najbolji izbor. Međutim, potrebno je istaknuti da su tehnički lakše za izvođenje uzimajući u obzir nezahitjevnost opreme te veći postotak uspješnosti (TACHIBANA i sur. 2012.).

### **3.2.2. UBRIZGAVANJE PLURIPOTENTNIH MATIČNIH STANICA**

Još jedan način nastanka sistemskih himera uključuje ubrizgavanje pluripotentnih matičnih stanica (eng. *pluripotent stem cell* (PSC)) unutar embrija koji su u ranoj fazi razvoja. Donorske tj. davateljske stanice u ovoj metodi predstavljaju navedene PSC, dok primateljske stanice, odnosno domaćina, predstavlja embrij. U sličnosti sa ICM-om, PSC imaju ograničen doprinos ekstraembrionalnom tkivu, dok se, u suprotnosti, mnogo češće i lakše genetski modificira od ICM-e. Uz navedeno, PSC mogu se dobiti od specifičnih jedinki, dok se ICM dobiva samo iz genetski jedinstvenih blastocista (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.).

Funkcionalna vrijednost PSC-a često se procjenjuje njihovom sposobnošću doprinosa svim tkivima, uključujući zametnu liniju kod istovrsnih himera (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Istraživanjem na mišjim zametcima otkriveno PSC u kasnijim pasażama imaju manji

razvojni potencijal od PSC ranijih pasaža (LI i sur., 2007.). Također, osjetljivost i kvaliteta kultura PSC stanica ovisi o vrsti organizma iz kojega su uzete (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.).

Embrionalne matične stanice (eng. *embryonic stem cells* (ESC)) predstavljaju kulture stanica koje su izolirane od embrionalnog tkiva epiblasta embrioblasta blastociste (KUKOLJ, 2012.). Iz tih stanica razvijaju se tri zametna sloja: endoderm, mezoderm i ektoderm te pokazuju izrazitu pluripotentnost. Rezultati istraživanja otkrili su razlike u razvojnem vremenskom periodu izolacije ESC-a kod miša te posljedično njihovim razlikama u daljnjem razvoju *in vitro*. Primjer za to predstavljaju tradicionalne, preimplantacijski izolirane ESC koje zahtijevaju čimbenik inhibicije leukemije (eng. *leukemia inhibitory factor* (LIF)) kao medij za rast kulture stanica, čije su kolonije u obliku kule te koje preživljavaju uzimanje izoliranih stanica (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Uz to, imaju sposobnost stvaranja sistemskih himera njihovim injiciranjem u blastocistu (NICHOLS i SMITH 2009.). Za razliku od preimplantacijski izoliranih ESC-a, postoje postimplantacijski izolirane stanica epiblasta ICM-e (eng. *postimplantation epiblast stem cells* (EpiSC)) koje su samo nekoliko dana kasnije razvijene iz ESC-a. Takve stanice ne pokazuju reakciju na LIF, kolonije rastu u jednom sloju, nemaju sposobnost izolacije pojedinačne stanice te ne mogu stvoriti sistemsku himeru (TESAR i sur., 2007.). Ljudske ESC imaju mnogo sličnosti s mišjima, međutim, daljnja istraživanja uključuju stvaranje ljudskog zametka čime se podiže velik broj etičkih pitanja i restrikcija.

Trenutno, stvaranje himeričnih jedinki metodom ubrizgavanja PSC-a unutar domaćina i dalje je u fazi istraživanja. Međutim, napredak u biologiji matičnih stanica eventualno bi mogao omogućiti konstrukciju umjetnih embrija metodom spajanja matičnih stanica trofoblasta ili totipotentnih stanica koje bi se samostalno strukturirale u jedinstvenu blastocistu (HARRISON i sur., 2017.).

### **3.2.3. DJELOMIČNE HIMERE**

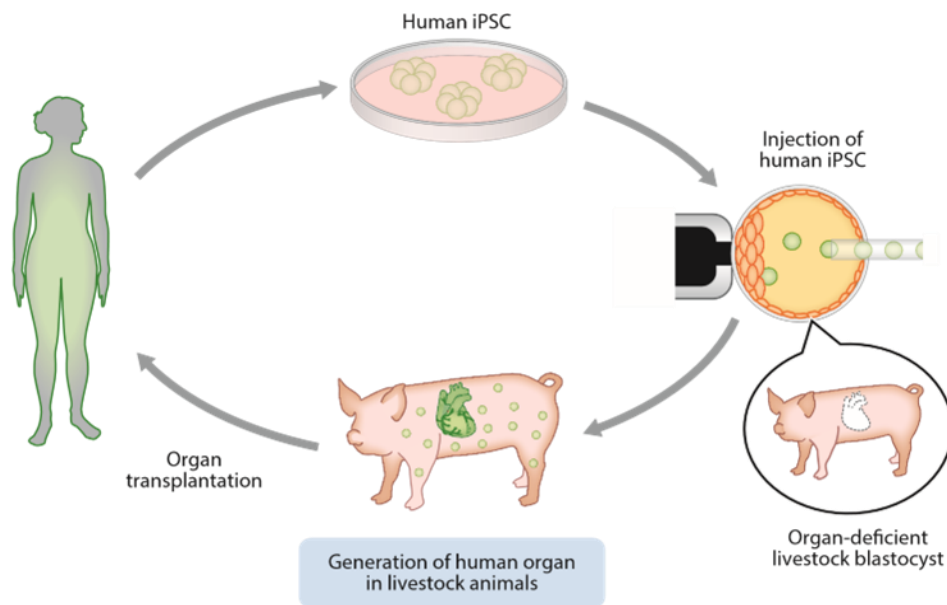
Djelomične himere nastaju ubrizgavanjem davateljskih stanica u domaćina, nakon početka procesa gastrulacije (WOOD i sur., 2012.). Ova metoda nosi mnogo prednosti u odnosu na stvaranje sistemskih himera te se izvodi ubrizgavanjem davateljskih stanica unutar maternice gdje se te stanice uklope u razvojni stadij primateljskih stanica istog tipa unutar

embrija (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Velik utjecaj donorskih stanica na stanice primatelja može donijeti i niz etičkih predostrožnosti posebno u slučaju ljudskih davateljskih stanica u mozak ostalih sisavaca (HYUN i sur., 2007.).

Komplementacija blastociste najbitnija je metoda stvaranja djelomičnih međuvrsnih himera zbog svog velikog utjecaja u regenerativnoj medicini. Ova tehnika posjeduje potencijal za stvaranje velikih količina ljudskih stanica, tkiva te čitavih organa, *in vivo*, koji će se moći koristiti kao zamjena za oštećene ili zatajene organe (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.). Istraživanje na ovom području znatno je napredovalo u posljednjih deset godina otkrićem induciranih pluripotentnih matičnih stanica (eng. *induced pluripotent stem (iPS)*) (TAKAHASHI i YAMANAKA, 2006.). To su pluripotentne matične stanice koje su nastale od fibrocita odraslog organizma te posjeduju potencijal za diferencijaciju u svaku stanicu u organizmu (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.).

NAKAUCHI i sur. 2010. su godine stvorili liniju stanica gušterače štakora u organizmu miša komplementacijom mišjeg embrija iPS stanicama štakora. Tome je prethodila genetska modifikacija domaćina, odnosno stvaranje prostora za štakorske stanice unutar mišjeg embrija upućujući na to da razvoj mišje gušterače nebi ni uslijedio bez komplementacije štakorskih stanica.

Nisu sve djelomične himere nastale tijekom embrionalnog razvoja. Svakoga dana, alogenetske transplantacije te transfuzije krvi čine milijune organizama diljem svijeta djelomičnim himerama. Međutim, transplantacije organa pažljivo se prate da bi se osigurala najniža razina imunosnog odbijanja novog tkiva. Time rečeno, međuvrsne djelomične himere najbolje uspijevaju ako se njihovo stvaranje inicira prije razvitka imunosnog sustava domaćina, bez obzira na cijeli niz tehničkih poteškoća koje nastaju ubrizgavanjem davateljskih stanica u točno određenom mjestu unutar embrija pokušavajući ne oštetiti okolno tkivo (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.).



Slika 4. Prikaz *in vivo* stvaranja ljudskih organa koristeći metodu komplementacije blastociste. Ljudske inducirane pluripotentne matične stanice uzete su od pacijenta koji ima potrebu za transplantacijom organa. IPSC su ubrizgane u svinjsku blastocistu koja je prethodno genetski modificirana. Razvojem ploda nastupa i razvoj ljudskog organa (SUCHY i NAKAUCHI, 2017.).

### 3.3. VAŽNI ČIMBENICI

#### TOČNOST U VREMENU RAZVOJA

Ovaj čimbenik posebno je važan za implementaciju PSC-a u stanice domaćina koje, za uspješan razvoj, trebaju biti u sinkroniziranoj fazi razvoja kao i davateljske stanice (GAVIDIA i sur., 2020.). Rezultati istraživanja stapanja EpSC-a s preimplantacijskim embrijima doživjeli su neuspjeh zbog neujednačenosti faza razvoja stanica davatelja i primatelja (MASAKI i sur., 2015.).

## POZNAVANJE PREDNOSTI DONORSKIH STANICA

WU i sur. (2016.) opisali su različite strategije koje bi znanstvenici trebali uzeti u obzir pri odabiru najprikladnije davateljske stanice. Jedna od njih poznavanje je, ili stvaranje (genetski modificirajući domaćina), mjesta u domaćinu za diferencijaciju, proliferaciju te funkciju davateljske stanice. Koristi se za stvaranje ksenogenetskih organa međuvrskom komplementacijom blastociste.

Druga strategija opisuje staničnu kompeticiju u kojoj susjedne stanice eliminiraju manje prikladne stanice (THOMSON i sur., 1995.).

Treća strategija uključuje povećavanje vjerojatnosti preživljavanja davateljskih stanica. Rezultati istraživanja u ovom području otkrili su da prevencijom apoptoze davateljskih stanica raste vjerojatnost njihova preživljavanja u preimplantacijskom embriju, uz povećavanje stupnja heterokroničnosti koji su blastocistične himere u mogućnosti tolerirati (MASAKI i sur., 2015.).

## RAZMATRANJE O EVOLUCIJI

Stvaranje međuvrskih himera u mnogo je manjoj mjeri učinkovito u odnosu na istovrsne himere. Razlog tome skriva se u genetski vrsnoj različitosti te evolucijskoj udaljenosti (ROSSANT i FRELS, 1980.). S obzirom na to, da bi postotak uspješnosti bio veći, kod stvaranja međuvrskih jedinki, vrste organizama davatelja i primatelja trebaju biti u što manjoj evolucijskoj udaljenosti (WU i sur., 2016.). Tu teoriju potkrjepljuju nedavna istraživanja u kojima su korištene životinje u bliskoj evolucijskoj vezi sa ljudima, kao i primjer himerizma između vrsta ovca-koza te miš-štakor. WU i sur. (2016.) uspješno su transplantirali ljudsku pluripotentnu matičnu stanicu u svinjske embrije (ROSSANT i FRELS, 1980.).

### **3.4. ŽIVOTINJSKI HIMERIZAM**

Međuvrsne životinjske himere predstavljaju odličan eksterimentalni model za proučavanje razvoja, homeostaze organizma, potencijala matičnih stanica te bolesti. Brzim razvojem tehnologije, otvaraju se nove mogućnosti u proučavanju i pristupu stvaranja ovih jedinstvenih organizama (WU i sur., 2016.). Prvi spomen međuvrskog himerizma kod sisavaca bio je 1970.



godine, kao pomoć i orijentacija u proučavanju stanične potentnosti te stanične sudbine pri embriološkom razvoju (WU i sur., 2016.).

Prva istraživanja napravili su GARDNER i JOHNSON (1973.) inicirajući stvaranje štakor-miš himerične jedinke transferom stanica embrioblasta štakora unutar blastociste miša. Nedugo nakon, MYSTKOWSKA (1975.) uspješno je stvorila miš-voluharica himerični organizam. Navedene jedinke nisu nastavile razvoj dalje od rane postimplantacijske faze (MASCETTI i PEDERSEN, 2016.).

ROSSANT i FRELS (1980.) početkom su 80-ih godina prošlog stoljeća uspješno stvorili himeričnu jedinku pomoću embrija porijeklom od dvije vrste miša, *Mus caroli* i *Mus musculus*. Ubrizgavanjem stanica embrioblasta *M. caroli* unutar blastociste porijeklom od *M. musculus*, stvorene jedinke razvile su se do odrasle dobi ukazujući na to da su himere imale genotipski slične stanice trofoblasta s genotipom ženke koja ih je nosila. Tu pretpostavku potvrdili su FEHILLY i sur. 1984. godine kreiravši koza-ovca himeru agregacijom embrija i blastomera, a himerične jedinke preživjele su mnogo dalje od intrauterinog razvoja. SUMMER i sur. su 1983. proizveli organizam stapajući dvije bovine vrste, *Bos taurus* i *Bos indicus*.

POLZIN i sur. su 1987. napravili istraživanje o himeričnim ovca-koza jedinkama imunokirurškom izolacijom stanica kozjeg embrioblasta, njihovim ubrizgavanjem u ovčje blastociste te transferom himeričnih embrija unutar maternice ovaca. Rezultati su pokazali da je postotak začeca bio 64% dok je postotak preživljavanja embrija činio 59%. Deset od trinaest himera ispoljavalo je standardni fenotip janjadi, a jedno od preostala tri mladunčeta imalo je zanimljiv fenotip krzna, miješajući područja runa i dlake. Također, oblik glave, veličina i položaj ušiju te simetrični uzorci krzna na licu i nogama upućivali su na kozje porijeklo.

MACLAREN i sur. (1993.) napravili su istraživanje o plodnosti ovca-koza himera te otkrili da su sve jedinke ispoljavale znakove estrusa te imale sposobnost gravidnosti ovčjih plodova do punog termina. Međutim, gravidnost implantacijom kozjih embrija kod himeričnih jedinki rezultirala je pobačajem, čiji uzrok ostaje nepoznat.



Slika 5. Prikaz mlade ovca-koza himere (POLZIN i sur., 1987.)

### **3.5. LJUDSKO-ŽIVOTINJSKI HIMERIZAM**

#### **3.5.1. CILJ**

Posljednjih godina, ljudsko-životinjski oblik himerizma posebno se ističe u području regenerativne medicine te dobiva na važnosti zbog svoje sposobnosti stvaranja ljudskih organa. Trenutno u svijetu, potreba za transplantacijom organa premašila je svoju opskrbu, čime je u još većoj mjeri porastao interes za ovo područje (GAVIDIA i sur., 2020.). Činjenica da se štakorski organi mogu proizvesti u organizmu miša daje mogućnost da bi se ljudski organi mogli uzgojiti u životinjskom organizmu, premda bi životinja, koja se koristi kao domaćin za ljudske stanice, trebala veličinom odgovarati čovjeku (svinja, ovca, majmun) (ARCABASCIO, 2007.). Himerične životinje važne su u proučavanju embriogeneze, stvaranju staničnih linija, sudbini stanica, mehanizama diferencijacije progenitora specifičnih ljudskom tkivu (GUO i sur., 2014.).

Također, ljudsko-životinjske himere mogle bi pomoći u proučavanju i boljem razumijevanju ljudskih bolesti u *in vivo* uvjetima. Integracija iPSC-a, koje nose sve genetske promjene koje mogu uzrokovati bolesti, u životinjski embrij u razvoju, omogućuje detaljnije

proučavanje početka, razvitka te kliničke slike bolesti. Uz sve to, imaju potencijal za detaljnije proučavanje ljudskog metabolizma lijekova te farmakokinetike (ARCABASCIO, 2007.).

### 3.5.2. ŽIVOTINJSKI MODELI

#### GLODAVCI

Glodavci već godinama predstavljaju glavni oslonac u biomedicinskim istraživanjima. Imaju mnogo prednosti u odnosu na druge sisavce: male su veličine, relativno jeftini te nezahtjevni za rukovanje (GLOVER i sur., 2010.). Uz prednosti, postoji i mnogo nedostataka u koje spada veličina ljudskih organa te složenost određenih (primjerice ljudski mozak). Nadalje, s obzirom na kratak životni vijek glodavaca teško je procijeniti dugotrajne učinke transplantacije matičnih i progenitorskih stanica (GLOVER i sur., 2010.). Postoji i zabrinutost vezana uz embrionalne matične stanice koje imaju potencijal stvaranja složenih teratoma *in vivo*, od kojih neki mogu postati kancerogeni (PRZYBORSKI, 2005.).

Prva istraživanja na ovom modelu uključivala su proučavanje ljudske hematopoeze, a kasnih 80-ih godina prošlog stoljeća McCUNE i sur. (1988.) uspješno su transplantirali ljudske matične stanice u organizam glodavca. Prekretnica u istraživanju dogodila se 1992. godine kada su LAPIDOT i sur. (1992.) otkrili da stanice koštane srži čovjeka, ubrizgane intravenozno imunodeficientnim miševima, mogu repopulirati koštanu srž domaćina starajući fenotipski karakteristične fragmente ljudske koštane srži. S obzirom na rezultate istraživanja, imunodeficientni glodavci postali su nezamjenjiv model, ne samo za proučavanje ljudskih hematopoetskih matičnih i progenitorskih stanica, već i potencijalne načine liječenja neurodegenerativnih bolesti i ozljeda središnjeg živčanog sustava (GLOVER i sur., 2010.).

Novija istraživanja otkrila su da je transplantacija ljudskih progenitorskih stanica oligodendrocita, porijeklom od embrionalnih matičnih stanica, unutar odraslih štakora s ozljedom leđne moždine, pridonijela remijelinizaciji i poboljšanoj pokretljivosti štakora (KEIRSTEAD i sur., 2005.). Tim otkrićem otvorena su vrata prvim kliničkim ispitivanjima koristeći ljudske embrionalne matične stanice kod pacijenata s ozljedom leđne moždine (GLOVER i sur., 2010.).

LEE je 2011. proveo istraživanje o metodama stvaranja himeričnih miševa koristeći embrionalne matične stanice. Najčešće metode stvaranja himeričnih jedinski, poput *sandwich* agregacije te mikroubrizgavanja, postale su nedovoljne zbog problematike vezane uz sistemsku ograničenost, te se otvorila potreba za traženjem novih, alternativnih metoda. LEE, skupa sa svojim timom stručnjaka, došao je do lako ponovljive, cijenom relativno povoljne te jednostavne tehnike koja se koristi za stvaranje velikog broja himeričnih embrija, a uključuje spajanje osmostaničnih morula, bez *zone pellucide*, s morulama koje sadrže embrionalne matične stanice. Rezultirajuće jedinice posjeduju znatno veću razinu himerizma (uključujući 100% himerizam krzna) uz visoku nasljednu stopu (LEE, 2011.).

## PAPKARI

Upotreba ovaca, koza i svinja, kao modela za ksenotransplantacijska istraživanja, nudi nekoliko važnih prednosti. Jedna od njih sličnost je veličine organa (BREVINI i sur., 2008.), čime je omogućena ekspanzija implantiranih ljudskih stanica do količine u kojoj je olakšana provedba biokemijske analize kao i uzimanje višebrojnih uzoraka (GLOVER i sur., 2010.).

Drugom prednost predstavlja sličnost u fiziologiji organa, posebno se odnoseći na sličnost između svinja i ljudi. Štoviše, njihovna fiziološka sličnost velika je u mjeri da je organska transplantacija sa svinja na ljude postala dobro i održivo rješenje koje se može primijeniti za gotovo sve organe (GLOVER i sur., 2010.). Sličnost na staničnoj razini također je veća u odnosu na onu između glodavaca i ljudi. Uz navedeno, dužim životnim vijekom papkara omogućena je dugotrajna procjena sigurnosti i učinkovitosti potencijalne terapije matičnim stanicama (DALL i sur., 2012.).

Nedostatke korištenja ovih modela predstavljaju veća zahtjevnost rukovanja te troškovi održavanja, koji su mnogo skuplji u odnosu na one kod manjih životinja.

Kao modeli u transplantaciji organa, svinje su korištene u svrhu liječenja Parkinsonove bolesti (SCHUMACHER i sur., 2000.), dok se na ovacama proučavala proliferativna kinetika i diferencijacijski potencijal raznih ljudskih matičnih stanica (ZANJANI i sur., 1994.).

Novija istraživanja dodatno su potvrdila mogućnost korištenja svinja kao *in vivo* modela za proučavanje razvojnog potencijala ljudskih pluripotentnih matičnih stanica stvaranjem ljudsko-

svinjskih himeričnih embrija. Ovakva istraživanja imaju veliku ulogu u budućnosti regenerativne medicine, *in vivo* testiranju lijekova te modeliranju ljudskih bolesti (ZHONG i sur., 2019.).

## NEHUMANI PRIMATI

Oku vidljiva prednost upotrebe nehumanih primata kao životinjskih modela predstavlja njihova fiziološki i morfološki bliska srodnost. Reproductivna fiziologija izrazito je slična s ljudskom što u isto vrijeme stvara poteškoće zbog dugog gestacijskog razdoblja. Veličina tijela te socijalno ponašanje većine primata zahtijeva skup smještaj te prilagodbu veličine instrumenata korištenih u istraživanjima (GLOVER i sur., 2010.).

Nehumani primati predstavljaju jedan od najvažnijih i najšire korištenih životinjskih modela u proučavanju Parkinsonove bolesti (BURNS i sur., 1983.), a nešto manje i za proučavanje ozljede leđne moždine. Vrste koje se najčešće koriste su obični marmozet (*Callithrix jacchus*), makaki (*Macaca fascicularis*) te rezus majmun (*Macaca mulata*). Rezultati brojnih istraživanja upućuju na to da ljudske neuralne matične i progenitorske stanice potiču funkcionalni oporavak uz povećanu neurogenezu kod spomenutih vrsta, nakon ozljeda nagnječenja u različitom stupnju (IWANAMI i sur., 2005.).

U novijem istraživanju, ljudske embrionalne pluripotentne matične stanice (eng. *human embryonic pluripotent stem cell*, hEPSC) ubrizgane u stariju kulturu *ex vivo* stanica majmuskog embrija (*M. fascicularis*). Otkriveno je da su se hEPSC uklopile u razvoj majmuskog embrija do 19. dana razvoja, ponašajući se u organizmu domaćina slično kao u ljudskom organizmu (TAN i sur., 2021.). Time možemo doći do zaključka da su razvojni procesi u znatno većoj mjeri evolucijski očuvaniji od onih u evolucijski udaljenijih vrsta, kao npr. ljudi i glodavaca (TAN i sur., 2021.). Međutim, uza svu sličnost, i dalje postoje mnoge ksenogenetske barijere koje onemogućavaju razvoj himerizma u većem stupnju, kao i mnoge prepreke za pokretanje više istraživanja ovakvog tipa.

Upotrebom nehumanih primata stvara se puno veći broj etičkih problema kao što je pitanje više razine kognitivnog razvoja, očuvanja vrste te afektivni odnos životinje i stručnog osoblja (GLOVER i sur., 2010.).

## KOKOŠJI ZAMETAK

Već početkom 20. stoljeća, kokošji je zametak korišten kao model za ksenotransplantaciju koristeći ekstraembrionalnu korioalantoisnu membranu kao tkivo za proučavanje rasta tumorskih stanica (MURPHY i ROUS, 1911.). LE DOUARIN i sur. (1973.) početkom su 1970-ih implantirali tkivo prepelice unutar kokošnjeg zametka u svrhu proučavanja sudbine stanica u središnjem i perifernom živčanom sustavu. Time je kokošji zametak postao omiljeni model za proučavanje implantata tkiva različitog porijekla (VOGEL i BERRY, 1975.).

Glavne prednosti korištenja kokošnjeg zametka kao modela predstavljaju niski troškovi, jednostavnost pri rukovanju te sposobnost točnog usklađivanja vremena inkubacije sa stadijem razvoja zametka u svrhu eksperimentalne standardizacije. Također, prednost predstavlja i visoka razina pristupačnosti različitim metodama implantacije tkiva te smanjena razvijenost imunološkog sustava uz posljedično smanjeno odbijanje transplantiranog tkiva (GLOVER i sur., 2010.).

Uz mnogo prednosti, model kokošnjeg zametka ima i nekoliko nedostataka, od kojih glavni predstavlja njihova mala veličina koja ograničava razvoj ljudskih organa do njihove pune veličine. Također, posjeduju razne fiziološke te anatomske osobitosti koje ljudski organizam ne posjeduje.

Iako kokošji zametak trenutno ne predstavlja prikladan model za rutinsku transgenetsku modifikaciju, pruža dostatnu podlogu za *in vivo* karakterizaciju svakog tipa ljudske matične stanice te predstavlja jednu od najsvestranijih životinjskih modela za proučavanje biologije matičnih stanica (GLOVER i sur., 2010.).

## IZBOR MODELA

Izbor životinjskog modela za proučavanje himeričnosti primarno ovisi o metodi koja će se koristiti uz razmatranje o prihvatljivosti troškova (GLOVER i sur., 2010.). Životinje manje veličine relativno su niskog troška te imaju mnogo prednosti s obzirom na raznolikost eksperimentalnih pristupa i metoda. Međutim, mala veličina uz kratak životni vijek veliki su nedostaci ako ih se uspoređi s onima kod ljudi.

Velike životinje predstavljaju suprotnost od prethodno navedenog, gdje veličinom puno bolje odgovaraju ljudskom organizmu, premda zahtjevaju veći trošak uz izazovnost pri eksperimentalnom pristupu s posebnim naglaskom na slikovnu dijagnostiku.

Racionalan pristup izboru modela uključuje korištenje više njih, počevši od manjih istraživanja na životinjama nižeg troška i male veličine tijela s vremenom prelazeći na one veće, skuplje s većim značajem u rezultatima pretkliničkih istraživanja (GLOVER i sur., 2010.).

Tablica 1. Usporedba životinjskih modela opisanih u tekstu (GLOVER i sur., 2010.)

VRSTA	VELIČINA	TROŠAK	TRENTNA IZVEDIVOST GENETSKE MANIPULACIJE	SLIČNOST S LJUDIMA	RAZINA ETIČKE ZABRINUTOSTI
MIŠ	Mala	Nizak	Jako visoka	Organski specifično umjerena	Umjerena
ŠTAKOR	Mala	Nizak	Visoka	Organski specifično umjerena	Umjerena
PAPKARI	Velika	Visok	Umjerena	Organski specifično visoka	Umjerena
NEHUMANI PRIMATI	Mala do velika	Jako visok	Nikakva	Generalno visoka	Visoka
KOKOŠJI ZAMETAK	Jako mala	Jako nizak	Niska	Organski specifično niska do umjerena	Niska

### 3.5.3. ETIČNOST

Postoje četiri velika etička i socijalna pitanja u istraživanju ljudsko-životinjskog himerizma: dobrobit životinja, izvor donorskih stanica, opća javna nelagoda i neprihvatanje te „humanizacija“ životinjskih vrsta, domaćina (WU i sur., 2016.).

Prvu od njih, dobrobit, teško je primijeniti zbog otežane procjene razine boli i neugode koje su himerične životinje sposobne osjetiti. S tim na umu, znanstvenici bi trebali voditi posebnu brigu o dobrobiti ovakvih jedinki u odnosu na već proučavane, dobro poznate laboratorijske životinje (GREELY i sur., 2007.) U slučaju stvaranja himeričnih životinja u svrhu transplantacije ljudskih organa, otvara se pitanje zabrane ljudske konzumacije njihova mesa te humanog postupka i klanja (WU i sur., 2016.). Uz sve navedeno, postoji i zabrinutost prelaska granica među vrstama, odnosno očuvanja karakteristika svih pojedinih vrsta životinja.

S obzirom na izvor donorskih stanica, postoji veliki problem etičnosti u korištenju ljudskih embrionalnih matičnih stanica porijeklom od pobačenih fetusa (WU i sur., 2016.).

Opća nelagoda koja proizlazi od javnosti, kad je riječ o ljudsko-životinjskim himerama, često je rezultat razmišljanja o „neprirodnosti“ stvaranja takvih organizama uz vjerovanje u neispravnost miješanja bilo kojih vrsta (HERMERÉN, 2015.). Premda spomenuti argument ne posjeduje adekvatnu osnovu, ima znatan utjecaj na ovakva istraživanja uključujući i financiranje (WU i sur., 2016.).

Najkontroverznija stavka glede stvaranja himeričnih jedinki predstavlja strah da bi one mogle pridonijeti etičkoj važnosti ljudskih osobitosti u neljudskim domaćinima. Postoje tri specifične ljudske značajke kod himeričnih životinja kojima bi se trebala pridati posebna pozornost: ljudska kognitivna sposobnost, ljudske gamete te čovjekoliki izgled (WU i sur., 2016.). U središtu rasprava najčešće je riječ o mozgu te posljedičnoj moralnoj zbunjenosti koja se tiče ljudi te ljudsko-životinjskih himera uz smanjenje ljudskog dostojanstva (KARPOWICZ i sur., 2004.). Premda postoji mala vjerojatnost, stvorila se zabrinutost da bi himere mogle dostići svijest i inteligenciju sličnu ljudima do mjere gdje im se ne bi mogla uskratiti osobnost, odnosno status osobe (STREIFFER, 2009.).



Iako je vjerojatnost stvaranja ljudsko-životinjskih himera, koje zahtjevaju ljudsko ophođenje, jako mala, mogućnost nije u potpunosti odbačena. Naime, rezultatima jednog istraživanja već je ustanovljeno poboljšanje u pamćenju miša nakon umetanja ljudskih glijalnih progenitorskih stanica (HAN i sur., 2013.).

### 3.5.4. ZAKONSKA REGULATIVA

Regulativa i zakoni o korištenju stanica porijeklom od ljudskog zametka razlikuju se na nacionalnoj razini diljem svijeta. U Europskoj je uniji (EU) na snazi Direktiva 98/44/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. srpnja 1998. o pravnoj zaštiti biotehnoloških izuma (ANONYMUS, 1998).

Članak 6, stavak 1 Direktive 98/44/EZ navodi sljedeće: „Izumi se neće moći patentirati u slučaju da je njihovo komercijalno iskorištavanje u suprotnosti s javnim redom ili moralom; međutim, neće se smatrati da je iskorištenje u potpunoj suprotnosti samo zato što ga zabranjuje neki zakon ili propis”

Stavak 2 navodi: „Na temelju stavka 1, posebno se ne mogu patentirati:

- (a) postupci za kloniranje ljudskih bića;
- (b) postupci za modificiranje linije genetskog identiteta ljudskih bića;
- (c) korištenje ljudskih embrija za industrijske ili komercijalne svrhe;
- (d) postupci za modificiranje genetskog identiteta životinja koji im nanose patnju bez bitne medicinske koristi za čovjeka ili životinju, kao i životinje koje su rezultat takvih postupaka.“

Uvodna izjava br. 16 Direktive navodi: „Patentni zakon mora se primjenjivati tako da se poštuju temeljni principi zaštite dostojanstva i integriteta čovjeka; budući da je važno naglasiti princip da ljudsko tijelo, u bilo kojem stadiju svojeg oblikovanja ili razvoja, uključujući i spolne stanice, te jednostavno otkriće jednog od njegovih elemenata ili proizvoda, uključujući i sekvencu

ili djelomičnu sekvencu nekog ljudskoga gena, ne može biti patentirano; budući da su ovi principi u skladu s kriterijima patentibilnosti sadržanima u patentnom zakonu, prema kojima samo otkriće ne može biti patentirano.”

U uvodnoj izjavi br. 42 Direktive stoji: „Nadalje, korištenje ljudskih embrija za industrijske ili komercijalne svrhe mora se isključiti iz patentibilnosti; budući da se izuzeci koji se odnose na upotrebu ljudskih embrija u industrijske ili komercijalne svrhe ne odnose na izume u terapijske ili dijagnostičke svrhe koji se primjenjuju na ljudski embrio i koriste mu.“

Uvodna izjava br. 45 glasi: „Postupci kojima se modificira genetski identitet životinja a koji uzrokuju patnju životinja bez značajne medicinske koristi u smislu istraživanja, prevencije, dijagnoze ili terapije ljudi ili životinja, kao i životinje koje nastaju kao rezultat takvih postupaka, moraju isključiti iz patentibilnosti.“

U uvodnoj izjavi br. 38 navodi se sljedeće: „Operativni dio ove Direktive trebao bi također uključivati ilustrativan popis izuma koji su isključeni iz patentibilnosti kako bi nacionalnim sudovima i uredima za patente pružili opći vodič za tumačenje reference o javnom redu i moralu; budući da je očigledno da taj popis ne može biti potpun; budući da je očigledno da se postupci čije korištenje narušava ljudsko dostojanstvo, odnosno postupci kojima se stvaraju himere od spolnih ili totipotentnih stanica ljudi i životinja također isključuju iz patentibilnosti.“

Na temelju navedenih izjava Direktive 98/44/EZ, može se donijeti zaključak kako u Europskoj uniji, a posljedično i Republici Hrvatskoj (RH), trenutno nije dopušteno istraživanje na velikom području međuvrskog himerizma. Međutim, postoje određene iznimke, pomoću kojih je i dalje omogućeno istraživanje, kao i mogućnost da će se zakonska regulativa u budućnosti promijeniti.

#### 4. RASPRAVA

Prirodni oblik himerizma kompleksan je i multifaktorijalan fenomen čiji mehanizmi nastanka do danas nisu u potpunosti shvaćeni. Potrebna su daljnja istraživanja kojima bismo mogli bolje razumjeti rani embrionalni razvoj u višeploidnoj gravidnosti.

S obzirom na istovrsni himerizam, a posebno mikrohimerizam, istraživanja u budućnosti trebala bi staviti težište na stvaranju metoda za poboljšanu detekciju i izolaciju fetalnih himeričnih stanica, čime bi se mogla razjasniti mnogo šira uloga placentalnih progenitorskih stanica u regenerativnoj humanoj te animalnoj medicini (VADAKKE MADATHIL i CHAUDHRY, 2020.). Istraživanjima u ovom području tek se počinje otkrivati izniman regenerativni potencijal placente koja predstavlja skoro bezgraničan izvor stanica, a gotovo je uvijek rutinski odbačena poslije poroda.

Unatoč velikom napretku u istraživanju međuvrsnog himerizma, trenutno postoji više pitanja nego odgovora vezanih uz temu ljudsko-životinjskih himera. I dalje je upitna mogućnost stvaranja opsežnijeg stupnja himerizma između ljudi i životinja, kao i pitanje hoće li ljudski organi, uzgojeni u životinjskom organizmu, biti prikladni za transplantaciju uzimajući u obzir inervaciju te vaskularizaciju domaćina. Treba pronaći rješenje za osnovni problem kojeg predstavlja heterokroničnost razvojnih procesa te razlike u trajanju gestacije između ljudi i ostalih životinjskih vrsta (WU i sur., 2016.). Postoji pitanje hoće li umjetno stvorene ljudske stanice, tkiva i organi biti funkcionalno kompatibilni s ljudskom fiziologijom te hoće li biti u mogućnosti jednako se natjecati sa stanicama domaćina.

Razvoj strategija za povećanje stupnja ljudsko-životinjskog himerizma neophodan je za dostizanje punog biološkog i kliničkog potencijala međuvrsnih himera. Potreban je novi pristup koji bi omogućio ljudskim matičnim stanicama nove genetske mehanizme koji bi upravljali njihovim specifičnim ponašanjem te uz koje bi potencijalno prevladali neke od sadašnjih granica među vrstama (WU i sur., 2016.). U slučaju uspjeha novih pristupa, moglo bi doći do širenja opsega istraživanja himera iz laboratorija u potencijalnu kliničku primjenu što bi pomoglo u razvoju lijekova, metodologiji učinkovitosti i toksičnosti, kao i stvaranju novih modela za proučavanje bolesti.

Uz postojeću zakonsku regulativu u EU, uz niz etičkih i socijalnih problema, istraživanja na području međuvrsnog himerizma sporo napreduju u Europi, a posebice u RH. Međutim, uz napredak tehnologije i znanosti, kao i sve veću potrebu u transplantacijskoj medicini, raste i vjerojatnost promjene trenutnog stanja.

## **5. ZAKLJUČAK**

Istraživanja istovrsnog, a posebno međuvrsnog himerizma, nude jedinstvenu priliku za rješavanje raznih problema na području medicine, posebice u regenerativnoj medicini, kao i napretku u znanju ljudskih i životinjskih bioloških procesa. Premda budućnost u području međuvrsnog himerizma nosi brojne znanstvene, socijalne, etičke, političke te financijske probleme, potrebno je raspravljati, razmišljati i nastaviti s istraživanjem u skladu s etičkim, pravnim te društvenim smjernicama.

## 6. LITERATURA

1. ANONYMUS (1998): Direktiva 98/44/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. srpnja 1998. o pravnoj zaštiti biotehnoških izuma, L 213/13, 30.07.1998., 85-93.
2. ARCABASCIO, C. (2007): Chimeras: Double the DNA-double the fun for crime scene. Dostupno na: <https://www.uakron.edu/dotAsset/727954>
3. ASSAF, S. A., L. M. RANDOLPH, K. BENIRSCHKE, S. WU, R. SAMADI, R. H. CHMAIT (2010): Discordant blood chimerism in dizygotic monochorionic laser-treated twin-twin transfusion syndrome. *Obstet. Gynecol.* 116, 483-485.
4. BIANCHI, D. W., G. K. ZICKWOLF, G. J. WEIL, S. SYLVESTER, M. A. DEMARIA (1996): Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 705–708.
5. BIEBER, F. R., W. E. NANCE, C. C. MORTON, J. A. BROWN, F. O. REDWINE, R. L. JORDAN, T. MOHANAKUMAR (1981): Genetic studies of an acardiac monster: evidence of polar body twinning in man. *Science* 213, 775-777.
6. BREVINI, T. A., S. ANTONINI, G. PENNAROSSA, F. GANDOLFI (2008): Recent progress in embryonic stem cell research and its application in domestic species. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 193-199.
7. BURNS, R. S., C. C. CHIUEH, S. P. MARKEY, M. H. EBERT, D. M. JACOBOWITZ, I. J. KOPIN (1983): A primate model of parkinsonism: Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by Nmethyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80, 4546-4550.
8. CANDELIER, J. J. (2015): The hydatiform mole. *Cell Adh. Migr.* 10, 226-235. doi: 10.1080/19336918.2015.1093275
9. DALL, A. M., S. E. DANIEL, J. C. SØRENSEN, F. ANDERSEN, A. MØLLER, J. ZIMMER, A. H. GJEDDE, P. CUMMING (2002): Quantitative [18F]fluorodopa/PET and histology of fetal mesencephalic dopaminergic grafts to the striatum of MPTP-poisoned minipigs. *Cell Transplant* 11, 733-746.
10. DEVOLDER K., L. J. YIP, T. DOUGLAS (2021): The ethics of creating and using human-animal chimeras. *ILAR J.* 60, 434-438. doi: 10.1093/ilar/ilaa002

11. DREGER, D. L., S. M. SCHMUTZ (2012): A case of canine chimerism diagnosed using coat color tests. *Mol. Cell. Probes* 26, 253-255. doi: 10.1016/j.mcp.2012.03.004
12. ĐELMIŠ, J. (2017): Sindromi fetofetalne transfuzije i fetalne anemije-policitemije. *Gynaecol. Perinatol.* 26, 26-29.
13. FEHILLY, C. B., S. M. WILLADSEN, E. M. TUCKER (1984): Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature* 307, 634–636.
14. FUMOTO, S., K. HOSOI, H. OHNISHI, H. HOSHINA, K. YAN, H. SAJI, A. OKA (2014): Chimerism of buccal membrane cells in a monozygotic dizygotic twin. *Pediatrics* 133, 1097-1100.
15. GARDNER, R., M. JOHNSON (1973): Investigation of early mammalian development using interspecific chimaeras between rat and mouse. *Nat. New Biol.* 246, 86–89.
16. GAVIDIA, A. N. A., O. N. KANWUGU, M. N. IVANTSOVA (2020): Chimeric animal production: a brief overview. The VII International young researchers' conference – physics, technology, innovations, PTI 2020, Doi: 10.1063/5.0032669
17. GEORGE, V., M. KHANNA, T. DUTTA (1983): Fetus in fetu. *J. Pediatr. Surg.* 18, 288-289.
18. GLOVER, J. C., J. L. BOULLAND, N. KASUMACIC (2010): Chimeric animal models in human stem cell biology. *ILAR Journal* 51, 62-73. doi: 10.1093/ilar.51.1.62
19. GREELY, H. T., M. K. CHO, L. F. HOGLE, D. M. SATZ (2007): Thinking about the human neuron mouse. *Am. J. Bioeth.* 7, 27–40.
20. GUO, J., B. WU, S. LI, S. BAO, L. ZHAO, H. SHUNXIANG. W. SUN, J. SU, Y. DAI, X. LI (2014): Contribution of Mouse Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Chimeras through Injection and Coculture of Embryos. *Stem Cells Int.* 2014, 1-9. doi: 10.1155/2014/409021
21. HAN, X., M. CHEN, F. WANG, M. WINDREM, S. WANG, S. SHANZ, Q. XU, N. A. OBERHEIM, L. BEKAR, S. BETSTADT, A. J. SILVA, T. TAKANO, S. A. GOLDMAN, M. NEDERGAARD (2013): Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell* 12, 342–353.
22. HARRISON, S., B. SOZEN, N. CHRISTODOULOU, C. KYPRIANOU, M. ZERNICKA-GOETZ (2017): Assembly of embryonic and extra-embryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science* 356, 18-20.

23. HERMERÉN, G. (2015): Ethical considerations in chimera research. *Development* 142, 3–5.
24. HYUN, I., P. TAYLOR, G. TESTA, B. DICKENS, K. JUNG, A. McNAB, J. ROBERTSON, L. SKENE, L. ZOLOTH (2007): Ethical standards for human-to-animal chimera experiments in stem cell research. *Cell Stem Cell* 1, 159–163.
25. IWANAMI, A., S. KANEKO, M. NAKAMURA, Y. KANEMURA, H. MORI, S. KOBAYASHI, M. YAMASAKI, S. MOMOSHIMA, H. ISHII, K. ANDO, Y. TANIOKA, N. TAMAOKI, T. NOMURA, Y. TOYAMA, H. OKANO (2005): Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J. Neurosci. Res.* 80, 182-190.
26. JARAUD, A., P. BOSSE, C. DUFAURE SE CITRES, L. TIRET, V. GACHE, M. ABITBOL (2020): Feline chimerism revealed by DNA profiling. *Anim. Gen.* 51, 631-633. doi: 10.1111/age.12957
27. KARA, R.J., P. BOLLI, I. KARAKIKES, I. MATSUNAGA, J. TRIPODI, O. TANWEER, P. ALTMAN, N. S. SHACHTER, A. NAKANO, V. NAJFELD, H. W. CHAUDHRY (2012): Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circ. Res.* 110, 82–93.
28. KARPOWICZ, P., C. B. COHEN, D. VAN DER KOOY (2004): It is ethical to transplant human stem cells into nonhuman embryos. *Nat. Med.* 10, 331–335.
29. KEIRSTEAD, H. S., G. NISTOR, G. BERNAL, M. TOTOIU, F. CLOUTIER, K. SHARP, O. STEWARD (2005): Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 4694-4705.
30. KOPLIN, J. J. (2019): Human-Animal chimeras. The moral insignificance of uniquely human capacities. *Hastings Cent. Rep.* 49, 23-32. doi: 10.1002/hast.1051.
31. KOWALZICK, L., C. M. ARTLETT, K. THOSS, H. P. BAUM, H. ZIEGLER, D. MISCHKE, R. BLUM, J. M. PONNIGHAUS, J. QUIETZSCH (2005): Chronic graft-versus-host-disease-like dermatopathy in a child with CD4+ cell microchimerism. *Dermatology* 210, 68–71. doi: 10.1159/000081489
32. KUKOLJ, M. (2012): Embrionalne matične stanice: tehnike uzgoja i njihova primjena. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet



33. LA SALA, G. B., M. T. VILLANI, A. NICOLI, A. GALLINELLI, G. NUCERA, I. BLICKSTEIN (2006): Effect of the mode of assisted reproductive technology conception on obstetric outcomes for survivors of the vanishing twin syndrome. *Fertil. Steril.* 86, 247-249.
34. LAPIDOT, T., F. UMIO, M. DOEDENS, B. MURDOCH, D. E. WILLIAMS, J. E. DICK (1992): Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255, 1137-1141.
35. LE DOUARIN, N. (1973): A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev. Biol.* 30, 217-222.
36. LEE, K. H. (2011): Methods to generate chimeric mice from embryonic stem cells. U: Embryonic stem cells – basic biology to bioengineering. (M. Kallos Ur.). In *Tech.* Shanghai, 193-213. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/embryonic-stem-cells-basic-biology-to-bioengineering/methods-to-generate-chimeric-mice-from-embryonic-stem-cells>
37. LI, X., Q. JIA, K. DI, S. GAO, X. WEN, R. ZHOU, W. WEI, L. WANG (2007): Passage number affects the pluripotency of mouse embryonic stem cells as judged by tetraploid embryo aggregation. *Cell Tissue Res.* 327, 607–614.
38. MACLAREN, L. A., G. B. ANDERSON, R. H. BONDURANT, A. J. EDMONDSON (1993): Reproductive cycles and pregnancy in interspecific sheep-goat chimaeras. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 261-270.
39. MASAKI, H., M. KATO-ITOH, A. UMINO, H. SATO, S. HAMANAKA, T. KOBAYASHI, T. YAMAGUCHI, K. NISHIMURA, M. OHTAKA, M. NAKANISHI, H. NAKAUCHI (2015): Interspecific in vitro assay for the chimera-forming ability of human pluripotent stem cells. *Development* 142, 3222–3230.
40. MASCETTI, V. L., R. A. PEDERSEN (2016): Contributions of mammalian chimeras to pluripotent stem cell research. *Cell stem cell* 19, 163-175. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.018.
41. McCUNE, J. M., R. NAMIKAWA, H. KANESHIMA, L. D. SHULTZ, M. LIEBERMAN, I. L. WEISSMAN (1988): The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241, 1632-1639.

42. McLAREN, A., P. BOWMAN (1969): Mouse chimaeras derived from fusion of embryos differing by nine genetic factors. *Nature* 224, 238-240.
43. McNAMARA, H. C., S. C. KANE, J. M. CRAIG, R. V. SHORT, M. P. UMSTAD (2016): A review of the mechanisms and evidence for typical and atypical twinning. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 214, 172-191. doi: 10.1016/j.ajog.2015.10.930
44. MOLD, J. E., J. MICHAELSSON, T.D. BURT., M. O. MUENCH, K. P. BECKERMAN, M. P. MUSCH (2008): Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322, 1562–1565. doi: 10.1126/science.1164511
45. MURPHY, J. B., P. ROUS (1911): Tumor implantation in the developing embryo. *JAMA* 56, 741-742.
46. MYSTKOWSKA, E.T. (1975). Development of mouse-bank vole interspecific chimaeric embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33, 731–744.
47. NICHOLS, J., A. SMITH (2009): Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487–492.
48. NYLANDER, P. P., B. O. OSUNKOYA (1970): Unusual monochorionic placentation with heterosexual twins. *Obstet. Gynecol.* 36, 621-625.
49. PAPADAKI, L. (1978): Binovular follicles in the adult human ovary. *Fertil. Steril* 29, 342-350.
50. PLÜCK, A., C. KLASSEN (2009): Generation of chimeras by morula aggregation. *Methods Mol. Bio.* 561, 219-229. doi: 10.1007/978-1-60327-019-9\_14
51. POLZIN, V. J., D. L. ANDERSON, G. B. ANDERSON, R. H. BONDURANT, J. E. BULTER, R. L. PASHENS, J. D. ROWE (1987): Production of sheep-goat chimeras by inner cell mass transplantation. *J. Anim. Sci.* 65, 325-330.
52. PRZYBORSKI, S. A. (2005): Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* 23, 1242-1250.
53. ROBINSON E., D. NORTH, G. HORSFIELD, H. KELLY (1976): A case of twin chimerism. *J. Med. Genet.* 13, 528-530.
54. ROSSANT, J. (1976): Investigation of inner cell mass determination by aggregation of isolated rat inner cell masses with mouse morulae. *J. Embryol. Exp. Morph.* 36, 163–174.
55. ROSSANT, J., W. I. FRELS (1980): Interspecific chimeras in mammals: successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *Science* 208, 419–421

56. SAMARDŽIJA, M., T. DOBRANIĆ (2012): Mumifikacija ploda. U: Veterinarski priručnik. (V. Herak-Perković, Ž. Grabarević, J. Kos Ur.). Medicinska naklada. Zagreb, 1785-1787.
57. SCHMERLER, S., G. M. WESSEL (2011): Polar bodies more a lack of understanding than a lack of respect. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 3-8.
58. SCHUMACHER, J. M., S. A. ELLIAS, E. P. PALMER, H. S. KOTT, J. DINSMORE, P. K. DEMPSEY, A. J. FISCHMAN, C. THOMAS, R. G. FELDMAN, S. KASSISSIEH, R. RAINERI, C. MANHART, D. PENNEY, J. S. FINK, O. ISACSON (2000): Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* 54, 1042-1050.
59. SPENCER, K., I. STABOULIDOU, K. H. NICOLAIDE (2010): First trimester aneuploidy screening in the presence of a vanishing twin: implications for maternal serum markers. *Prenat. Diagn.* 30, 235-240.
60. STREIFFER, R. (2009): Human/Non-Human Chimeras. U: *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*. (E. N. Zalta Ur.). The Metaphysics Research Lab. Stanford, <http://plato.stanford.edu/entries/chimeras/>
61. SUCHY, F., H. NAKAUCHI (2017): Lessons from Interspecies Mammalian Chimeras. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 203-217. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060654
62. SUMMER, P. M., J. B. SHELTON, K. BELL (1983): Synthesis of primary *Bos taurus*-*Bos indicus* chimeric calves. *Anim. Reprod. Sci.* 6, 91-98.
63. TACHIBANA, M., M. SPARMAN, C. RAMSEY, H. MA, H. LEE, M. C. T. PENEDO, S. MITALIPOV (2012): Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell* 148, 285–295.
64. TAKAHASHI, K., S. YAMANAKA (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
65. TAN, T., J. WU, C. SI, S. DAI, Y. ZHANG, N. SUN, E. ZHANG, H. SHAO, W. SI, P. YANG, H. WANG, Z. CHEN, R. ZHU, Y. KANG, R. HERNANDEZ-BENITEZ, L. M. MARTINEZ, E. N. DELICADO, W. T. BERGGREN, M. SCHWARZ, Z. AI, T. LI, H. DENG, C. R. ESTEBAN, W. JI, Y. NIU, J. C. I. BELMONTE (2021): Chimeric contribution of human extended pluripotent stem cells to monkey embryos ex vivo. *Cell* 184, 2020-2032. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.011

66. TARKOWSKI, A. (1961): Mouse chimæras developed from fused eggs. *Nature* 190, 857–860.
67. TARKOWSKI, A. K., M. WOJEWODZKA (1982): A method for obtaining chimaeric mouse blastocysts with two separate inner cell masses: a preliminary report. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 71, 215-221.
68. TESAR, P., J. CHENOWETH, F. BROOK, T. DAVIES, E. EVANS, D. L. MACK, R. L. GARDNER, R. D. G. MCKAY (2007): New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199.
69. THOMSON, J. A. , J. KALISHMAN, T. G. GOLOS, M. DURNING, C. P. HARRIS, R. A. BECKER, J. H. HEARN (1995): Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 7844–7848. doi: 10.1073/pnas.92.17.7844
70. TIPPETT P. (1983): Blood group chimeras: a review. *Vox Sang.* 44, 333–359.
71. UMSTAD, M. P., R. V. SHORT, M. WILSON, J. M. CRAIG. (2012): Chimaeric twins: Why monochorionicity does not guarantee monozygosity. *Obstet. Gynaecol.* 52,305-307.
72. VADAKKE MADATHIL, S., H. W. CHAUDHRY (2020): Chimerism as the basis for organ repair. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1487, 12-20. doi: 10.1111/nyas.14488
73. VAN DE LEUR, S. J., G. H. ZEILMAKER (1990): Double fertilization in vitro and the origin of human chimerism. *Fertil. Steril.* 54, 539-540.
74. VOGEL, H. B., R. G. BERRY (1975): Chorioallantoic membrane heterotransplantation of human brain tumors. *Int. J. Cancer.* 15, 401-408.
75. WILLIAMS, C. A., M. R. WALLACE, K. C. DRURY, S. KIPERSZTOK, R. K. EDWARDS, R. S. WILLIAMS, M. J. HALLER, D. A. SCHATZ, J. H. SILVERSTEIN, B. A. GRAY, R. T. ZORI (2004): Blood lymphocyte chimerism associated with IVF and monochorionic dizygous twinning: case report. *Hum. Reprod.* 19, 2816-2821.
76. WOOD, J., E. COLLETTI, L. MEAD, D. INGRAM, C. PORADA, E. D. ZANJANI, M. C. YODER, G. ALMEIDA-PORADA (2012): Distinct contribution of human cord blood–derived endothelial colony forming cells to liver and gut in a fetal sheep model. *Hepatology* 56, 1086–1096.
77. WU, J., H. T. GREELY. R. JAENISCH, H. NAKAUCHI, J. ROSSANT, J. C. I. BELMONTE (2016): Stem cells and interpecies chimæras. *Nature* 540, 52-59. doi: 10.1038/nature20573

78. ZANJANI, E. D., A. W. FLAKE, H. RICE, M. HEDRICK, M. TAVASSOLI (1994): Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. *J. Clin. Invest.* 93, 1051-1055.
79. ZHONG, C., J. WU, J. C. BELMONTE (2019): Pig chimeric model with human pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2005, 101-124. doi: 10.1007/978-1-4939-9524-0\_8
80. ZHOU, L., Y. YOSHIMURA, Y. HUANG, R. SUZUKI, M. YOKOYAMA, M. OKABE, M. SHIMAMURA (2000): Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology* 101, 570–580.

## 7. SAŽETAK

Bernarda Bebić

### HIMERE

Znanost definira himeru kao organizam koji u sebi sadrži genetski različite stanice porijeklom od različitih zigota koji mogu biti unutar granica iste vrste, kao i izvan. Slaba istraženost istovrsnog himerizma upućuje na vjerojatnost da je njegovo postojanje u prirodi mnogo učestalije. Tu činjenicu potkrjepljuje dokaz himerizma u istraživanjima rađenim na životinjama, najčešće kućnim ljubimcima, koja su ispoljavala nekarakterističan fenotip krzna, čiji uzrok i dalje ostaje nepoznat. Himerizam, u znatno manjoj mjeri, postoji kao prolazno stanje u cijelom svijetu, a poznatije je pod nazivom mikrohimerizam. Svaka osoba koja je primila krv transfuzijom ili transplantirani organ, postaje himera. Taj fenomen može se pronaći i kod gravidnih ženki u čijem se krvotoku nalaze stanice ploda, kao i majčine stanice u organizmu ploda. Dosadašnji rezultati istraživanja upućuju na izniman regenerativni potencijal placentalnih stanica koji bi mogao uvelike utjecati na tijek proučavanja matičnih stanica i njihovu ulogu u fetalnom razvoju. Najveći utjecaj u humanoj i veterinarskoj medicini ima ljudski posredovan himerizam koji uključuje stvaranje jedinstvenog organizma koji u sebi sadrži stanice različitog genotipa porijeklom od različitih vrsta, međuvrsta oblik himerizma. Znanstvenici su mnogo godina istraživali himerizam između životinjskih, evolucijski bliskih vrsta, preko kojih su otkrili potencijal za rast ljudskih stanica, tkiva te naposljetku čitavih organa u životinjskom organizmu. Takvo otkriće otvorilo je mnoga vrata u napretku regenerativne medicine kao i istraživanju ljudskih i životinjskih ranih razvojnih procesa. Premda ljudsko-životinjski himerizam nosi mnogo nade za napredak u znanosti, isto tako njegovo je istraživanje u iznimno sporom tijeku zbog trenutne zakonske regulative u EU, ali i zbog cijelog niza etičkih, socijalnih i znanstvenih problema.

**Ključne riječi:** himera, mikrohimerizam, ljudsko-životinjski himerizam, regenerativna medicina

## 8. SUMMARY

Bernarda Bebić

### CHIMERAS

Science defines a chimera as an organism that consists of genetically distinct cell populations originating from different zygotes, which can descend from same or different species. Lack of research in the field of intraspecies chimerism raises the probability that chimerism is much more common in our environment. This fact is supported by diagnosis of chimerism in research done on animals, most often pets, who exhibited uncharacteristic coat phenotype whose cause still remains unknown. Chimerism in its lesser degrees, more known as microchimerism, presents transitory state in human as well as animal organisms worldwide. Any person who has transfused blood of transplanted organ becomes a chimera. This phenomenon can also be found in pregnant females whose placenta allows the entry of fetal cells into her circulation as well as the egress of her own cells into the fetal circulation. Results of research done so far point to a significant regenerative potential of placental cells that could greatly influence the course of stem cell research together with their role in fetal development. The greatest impact in human and veterinary medicine has human-induced chimerism that implies creation of a unique organism that consists of different genotype cells originating from different species, better known as interspecies chimerism. For many years, scientists have done research on chimerism between evolutionarily close animals, which has led them to discover a great potential for the growth of human cells, tissues and eventually entire organs in the living, animal organism. Such a discovery opened many doors in the field of regenerative medicine as well as made progress in research of human and animal early developmental processes. Although human-animal chimerism holds a lot of hope regarding the progress of science, its research has been extremely slow due to the current legal regulations in the EU as well as whole series of ethical, social and scientific problems.

**Key words:** chimera, microchimerism, human-animal chimerism, regenerative medicine

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zadru 23. ožujka 1998. godine. Nakon završetka Osnovne škole Bartola Kašića, upisujem Gimnaziju Franje Petrića, čiji opći smjer završavam 2016. godine. Te iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te se na petoj godini opredjeljujem za smjer javno zdravstvo. U vrijeme studija volontirala sam na Klinici za unutarnje bolesti na fakultetu. Terensko-stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici u Zadru.