

Received: 2013.06.19
Accepted: 2014.11.19
Published: 2015.03.08

Okoloporodowe źródła komórek macierzystych

Perinatal sources of stem cells

Magdalena Maria Piskorska-Jasiulewicz, Małgorzata Witkowska-Zimny

Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Komórki macierzyste są jednym z odkryć medycyny i biologii wywołującym tyle samo nadziei w terapii, co kontrowersji natury etycznej i medycznej. Badania nad nimi zapoczątkowane już na początku XX w. wciąż dostarczają coraz więcej informacji o możliwościach i nadziejach terapeutycznych w ich praktycznym wykorzystaniu, ale także wątpliwości etycznych dotyczących pozyskiwania, czy zagrożeń w działaniach niepożądanych. Zastosowanie z sukcesami w hematologii krwiotwórczych komórek macierzystych doprowadziło do poszukiwań nowych źródeł komórek macierzystych zarówno krwiotwórczych, jak i niehematopoetycznych oraz rozszerzenia skali ich zastosowań.

W pracy omówiono informacje na temat tkanek perinatalnych, takich jak łożysko, krew pępowinowa, galareta Whartona sznura pępowinowego, owodnia i płyn owodniowy jako źródeł ich pozyskiwania i możliwości wykorzystania w terapii.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste • łożysko • owodnia • pępowina

Summary

Recently, stem cell biology has become an interesting topic. Several varieties of human stem cells have been isolated and identified in vivo and in vitro. Successful application of hematopoietic stem cells in hematology has led to the search for other sources of stem cells and expanding the scale of their application. Perinatal stem cells are a versatile cell population, and they are interesting for both scientific and practical objectives. Stem cells from perinatal tissue may be particularly useful in the clinic for autologous transplantation for fetuses and newborns, and after banking in later stages of life, as well as for in utero transplantation in the case of genetic disorders. In this review paper we focus on the extraction and therapeutic potential of stem cells derived from perinatal tissues such as the placenta, the amnion, amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly.

Keywords: stem cells • placenta • amnion • umbilical cord

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1143052>

Word count: 3640
Tables: –
Figures: –
References: 48

Adres autorki: dr Małgorzata Witkowska-Zimny, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; e-mail: mwitkowska@wum.edu.pl

Wykaz skrótów: **AFSCs** – komórki macierzyste z płynu owodniowego (amniotic fluid stem cells); **ASCs** – somatyczne/dorosłe komórki macierzyste (adult stem cells); **ESCs** – embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells); **FSCs** – okołoporodowe komórki macierzyste (foetal stem cells); **hAESC**s – ludzkie komórki macierzyste nabłonka owodni (human amnion epithelial stem cells); **iPSCs** – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells); **KP** – krew pępowinowa; **MSCs** – mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells); **PD-MSCs** – komórki macierzyste pochodzące z łożyska (placenta-derived mesenchymal stem cells); **SCs** – komórki macierzyste (stem cells); **WJ** – galareta Whartona (Wharton's jelly).

WSTĘP

Komórki macierzyste – SCs (stem cells) są to niewyspecjalizowane komórki występujące w wielu tkankach, mające unikalną cechę zdolności samoodnowy – proliferacji i jednocześnie różnicowania w różne typy dojrzałych komórek. Namnażając się i różnicując są stałym źródłem komórek budujących organizm [23]. Są źródłem regeneracji narządu i dostarczania białek terapeutycznych, a to otwiera ogromne możliwości ich wykorzystania w inżynierii tkankowej, medycynie estetycznej czy genoterapii [19,31]. W zależności od środowiska w jakim występują i bodźców, jakim zostaną poddane, mogą nabywać cech charakterystycznych dla komórek danej populacji, ten sam czynnik działający w różnych warunkach może działać na te same komórki pobudzająco lub hamująco [46].

Dzięki odkryciu tych cech komórek macierzystych, istnieje realna szansa na dobre rokowania terapii komórkowej w leczeniu chorób dotychczas nieuleczalnych. Komórki o zmianach patogennych można wymienić na już zróżnicowane komórki uzyskane z komórek macierzystych i wykorzystać w terapii wielu schorzeń, takich jak: białaczki, cukrzyca, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera, uszkodzenia rdzenia kręgowego, choroba Parkinsona [14]. W hematologii komórki macierzyste stosuje się od prawie 50 lat, a sukcesy z ich wykorzystaniem sprawiły, że wzrasta zainteresowanie innymi źródłami komórek zarówno krwiotwórczych jak i niehematopoetycznych. Na podstawie doświadczeń można przewidzieć również rozwój terapii genowej i molekularnej i wykorzystania wytwarzanych przez komórki macierzyste białek, czynników wzrostu do pobudzania własnych rezerwuarów komórek macierzystych do odnowy i naprawy w terapiach medycyny spersonalizowanej. Obecnie ich wykorzystanie wiąże się z ryzykiem działań niepożądanych i powikłań wynikających z braku dogłębnej znajomości biologii komórek niezróżnicowanych. Przykładem może być terapia opisana przez Amarglio i wsp. u chłopca, któremu przeszczepiono neuronalne komórki macierzyste przy próbie regeneracji centralnego systemu nerwowego, po 4 latach od zabiegu rozwinęły się wieloogniskowe guzy o utkaniu neuronów pochodzące z przeszczepionych komórek [2]. Jednak tempo badań zapowiada, że metody terapii będą bardziej doskonałe z coraz mniejszym ryzy-

kiem powikłań. Deklaracje naukowców, co do kolejnych osiągnięć sięgają najbliższych lat. Najnowsze badania nad komórkami macierzystymi pozwoliły na „odwrócenie zegara biologicznego” komórek i otrzymanie komórek pluripotencjalnych będących odpowiednikiem zarodkowych komórek macierzystych, w wyniku reprogramowania komórek somatycznych. Tym samym usunięto część wątpliwości etycznych dotyczących zastosowania embrionalnych komórek. Podczas wieloletnich badań nad białkami obecnymi w cytoplazmie oocyta, prof. John Gordon i dr Shinya Yamanaka odkryli mechanizm różnicowania się komórki. Dzięki nim wiadomo, że komórka mająca komplet informacji genetycznej podejmuje różnicowanie się w tkankę, z której się wywodzi, wykorzystując jedynie niewielką część genów, podczas gdy większość zostaje nieaktywna. Stwarza to możliwość praktycznego wykorzystania komórek macierzystych, bo wiadomo już, że wystarczy niewiele białek, aby w ciągu kilku tygodni z komórek zróżnicowanych uzyskać komórki o cechach mniejszej specjalizacji – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste – iPSCs (induced pluripotent stem cells). Za te osiągnięcia obydwoim naukowcom przyznano w 2012 r. Nagrodę Nobla. Przed rutynowym stosowaniem komórek macierzystych w terapii pozostało jednak do rozwiązania wiele problemów związanych m.in. z ukierunkowaniem komórek macierzystych w taki sposób, aby po zregenerowaniu tkanki/narządu zaprzestały dalszych podziałów [32].

PODZIAŁ KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Klasyfikacja komórek macierzystych opiera się na dwóch podstawowych kryteriach: jednym z nich jest umiejętność przekształcania się w inne typy komórek, a drugim źródło pochodzenia. Przyjmując jako kryterium podziału zdolność komórek macierzystych do proliferacji i różnicowania się w określone linie komórek potomnych wyróżniamy cztery ich rodzaje: totipotencjne, pluripotencjne, multipotencjne i unipotencjne.

Największe zdolności do różnicowania się i namnażania mają najmłodsze rozwojowo komórki. Są to komórki totipotencjne (pełnopotencjalne) pochodzące z embrionu przez pierwsze dni od zapłodnienia. Każdy z początkowych blastomerów ma zdolność wytworzenia całego organizmu wraz z elementami „towarzyszącymi”, czyli



płodów z pójciem [30]. Każdy z nich ma charakter totipotenty.

Po około siedemdziesięciu dwóch godzinach ludzki zarodek składa się z trzydziestu dwóch komórek i tworzy morulę, która przekształca się w blastocystę. W jej skład wchodzi dwie masy: zewnętrzna trofoektoderma – TE (trophectoderm) i wewnętrzna – ICM (inner cell mass), której komórki są pluripotenty (wielopotencjalne). Są to tzw. ludzkie komórki embrionalne pnia. Pod wpływem aktywności genów oraz biochemicznych i mechanicznych czynników następuje ich różnicowanie w liczne linie komórkowe, grupujące się w trzy listki zarodkowe: mezodermę, ektodermę i endodermę, tworzące następnie wszystkie tkanki i narządy rozwijającego się organizmu [42].

Każda następna komórka powstała z pojedynczego listka zarodkowego jest komórką multipotentną i może dać początek linii komórek tylko z danego listka zarodkowego. Przykładem są tutaj krwiotwórcze komórki macierzyste obecne również w krwi pępowinowej, pochodzące z mezodermi, zdolne wytworzyć wszystkie komórki krwi oraz inne tkanki, takie jak szpik kostny i mięśnie.

Dorośle/somatyczne komórki macierzyste występujące w wykształconych już tkankach, mają właściwości unipotenty. Różnicują się jedynie w obrębie jednej linii komórkowej tworząc pulę komórek wyspecjalizowanych tylko dla danej tkanki [23]. Ponadto w niektórych tkankach, np. w szpiku kostnym są obecne rezerwuary wielu komórek mezenchymalnych i hematopoetycznych [36].

Wraz z rozwojem ontogenetycznym organizm ludzki zyskuje coraz bardziej wyspecjalizowane i ukierunkowane komórki, zmniejszając pulę komórek nieukierunkowanych. Jednocześnie tracą one swoją potencję i zdolność do odnawiania, co nieuchronnie prowadzi do starzenia się całego organizmu i ostatecznie do jego śmierci.

Ze względu na pochodzenie i tym samym etap rozwoju ontogenetycznego człowieka, komórki macierzyste można podzielić na dwa główne typy: komórki embrionalne i nieembrionalne [24], w tym komórki płodowe i dorosłe.

Embrionalne komórki macierzyste - ESCs (embryonic stem cells) stanowią wewnętrzną masę komórek, pochodzącą z epiblastu blastocysty. Są obecne już od chwili zapłodnienia do pierwszych etapów rozwoju, czyli w pierwszym stadium rozwoju człowieka. Ich cechą jest niezróżnicowanie i totipotenty [24]. Proces ich różnicowania prowadzi do powstania trzech listków zarodkowych. Poddanie komórek działaniu wybranych czynników np.: LIF (leukemia inhibitory factor) powoduje zahamowanie zdolności ich różnicowania się i stymuluje do kolejnych podziałów odnawiając populację [23]. Dzięki aktywności telomerazy – enzymu odpowiadającego za stabilność genomu i żywotność komórek, ESCs są właściwie nieśmiertelne [11]. Pobiera się je wprost z embrionów

powstałych w zapłodnieniu *in vitro*, niewykorzystanych do implantacji bądź też klonów tych zarodków. Los ludzkich embrionów budzi jednak ogromny niepokój, gdyż uzyskanie z nich komórek macierzystych wiąże się z ich zniszczeniem [45]. Z tych powodów nie wykonuje się w wielu krajach, w tym w Polsce, badań nad ludzkimi ESCs [16]. Wykorzystywanie zarodkowych komórek embrionalnych w terapii jest bardzo kontrowersyjne także na podstawie przesłanek naukowych, ze względu na bardzo częste tworzenie potworników po wprowadzeniu do dorosłego organizmu.

Do drugiej grupy nieembrionalnych komórek macierzystych należą:

- okołoporodowe komórki macierzyste (płodowe komórki macierzyste (foetal stem cells – FSCs), o których więcej w dalszej części;
- komórki macierzyste dorosłego człowieka (komórki somatyczne, adult stem cells – ASCs) jako swoiste tkankowo komórki mają możliwość odtworzenia danej tkanki. Są wstępnie ukierunkowane, ale na tyle plastyczne, że w hodowli mogą tworzyć komórki macierzyste tkanek innego pochodzenia, metabolicznie i strukturalnie współmierne do ich nowego umiejscowienia [27]. Mogą też wytwarzać dwa rodzaje komórek potomnych jednocześnie: jednych identycznych kopii siebie oraz drugich zróżnicowanych pod względem funkcji i morfologii. Proces zapewnia stałą liczbę komórek somatycznych. Obecność dorosłych komórek macierzystych potwierdzono m.in. w szpiku kostnym, tkance tłuszczowej, włóknach nerwowych i mięśniowych, miazdze zębów, skórze, krwi obwodowej [23]. Pobieranie dorosłych komórek macierzystych i ich identyfikacja napotyka na wiele trudności, jednak ze względu na ich dostępność znajdują one coraz większe zastosowanie w leczeniu [46].

OKOŁOPORODOWE ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Okres okołoporodowy, to okres bezpośrednio przed i po urodzeniu dotyczący zarówno matki, jak i dziecka, zdefiniowany przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) jako czas od ukończonego 22 tygodnia ciąży (154 dzień) do 7 dni po porodzie. Najbardziej utylitarnym nurtem badań stały się okołoporodowe źródła komórek macierzystych. Ze względu na dużą objętość, łatwość dostępu i możliwość manipulacji w środowisku zewnętrznym bez ponoszenia ryzyka fizycznego uszkodzenia płodu, są pozbawione wielu kontrowersji. Doceniona została krew pępowinowa jako rezerwuar komórek niezróżnicowanych, które z powodzeniem są wykorzystywane do przeszczepień na świecie od 1988 r., a w Polsce od 1994 r. [4]. Komórki z płynu owodniowego można zdeponować od 2009 r. w działających na terenie Stanów Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii bankach. Pozostałe elementy pójcia są materiałem rutynowo odrzucanym po porodzie i powszechnie nie są uważane za narzędzia medycyny regeneracyjnej. Jednak badania

wykazały, że zarówno łożysko, owodnia, kosmówka, jak i tkanka okalająca naczynia pępowinowe (galareta Wharтона) są bogatymi źródłami płodowych, mezenchymalnych i hematopoetycznych komórek macierzystych [47].

ŁOŻYSKO JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Łożysko jest jednym z najważniejszych przejściowych narządów wewnątrzmacicznego etapu rozwoju człowieka. Prawidłowa budowa łożyska jest warunkiem wzrostu płodu przez cały okres trwania ciąży. Łożysko dostarcza składników odżywczych, usuwa produkty przemiany materii, pełni rolę immunomodulującą i wydzielniczą. Te wszystkie funkcje łożysko może pełnić dzięki wyspecjalizowanym i zróżnicowanym na odpowiednim etapie rozwoju komórkom. Proces zależy od skoordynowanych interakcji fizjologicznych i genetycznych, każda jego zmiana może nieodwracalnie zakłócić prawidłowy bieg ciąży [25]. Masa łożyska po porodzie ciąży donoszonej waha się w granicach 590 g, jest to piętnastokrotnie więcej niż masa krwi pępowinowej, dlatego uważa się, że kryje się w nim duży potencjał i z tego powodu jest obiektem zainteresowania komercyjnych banków tkanek [9]. Wszystkie prognozy i dotychczasowe założenia są oparte jeszcze na wczesnych etapach badań [41].

Komórki macierzyste wyizolowane z łożyska pochodzącego z okresu poporodowego, wykazują duże możliwości różnicowania nie tylko w zakresie mezenchymalnym, ale również śródbłonkowym i neuronalnym [9]. Uwzględniając jednak wyniki badań, pochodzenie komórek macierzystych dostarczanych przez łożysko (placenta-derived mesenchymal stem cells - PD-MSCs) nie zostało dokładnie wyjaśnione. Metodą cytometrii przepływowej otrzymano pojedynczą frakcję komórek pochodzących od płodu, natomiast źródłem pozostałej większości była matka. Dopiero na dalszym etapie badań można określić pochodzenie PD-MSCs [33].

Badania przeprowadzane z udziałem PD-MSCs mają na celu ocenę ich użyteczności dla przyszłej terapii komórkowej i inżynierii tkankowej oraz zdolności do działania immunosupresyjnego i wydzielania cytokin antyapoptycznych, wspomagających odnowę tkanki. Znajomość tych właściwości jest warunkiem do zastosowania terapeutycznego. Odkryto, że wraz ze spadkiem wydolności łożyska pod koniec ciąży (trzeci trymestr), spada liczba komórek macierzystych krążących w krwi pępowinowej, natomiast zwiększa się ich liczba w tkance łożyska [10].

PĘPOWINA JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Krew pępowinowa

W krwi pępowinowej (KP) znajdują się komórki macierzyste o potencjale hematopoetycznym oraz mezenchymalnym. Komórki macierzyste z KP mają niewielką reaktywność immunologiczną, dzięki czemu istnieje małe ryzyko odrzucenia przeszczepu i z tego powodu

mogą być wykorzystywane także w przeszczepach allogenicznych. Komórki te są zdolne do większej proliferacji niż komórki pochodzące ze szpiku kostnego, mają też większą aktywność cyklu komórkowego. Jednak w terapii z udziałem KP istnieje ryzyko przeniesienia nierozpoznanej na tym etapie choroby genetycznej [37].

Hematopoetyczne komórki macierzyste (hematopoietic stem cells - HSCs) stanowią 0,02-1,42% wszystkich komórek w krwi pępowinowej. Znajdują się w fazie komórkowej o najwyższej zdolności proliferacyjnej w odpowiedzi na trombopoetynę i erytropoetynę. Są prekursorami komórek wszystkich linii hematopoetycznych, które różnicują się we wszystkie typy komórek krwi oraz w kierunku hepatocytów. Oznacza to, że krew pępowinowa jest materiałem wykorzystywanym do przeszczepów zamiast szpiku kostnego. W jednej jednostce krwi pępowinowej występuje niewielka liczba komórek macierzystych, dlatego prowadzi się badania nad hodowlą tych komórek *ex vivo* oraz możliwością łączenia jednostek do przeszczepu od kilku dawców [30].

Drugim typem komórek obecnych w KP są niehematopoetyczne mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells - MSCs). Mogą się one różnicować w komórki pochodzenia mezodermalnego, takie jak osteoblasty, osteocyty, chondrocyty, adipocyty. Badania *in vitro* wykazały, że można uzyskać z nich komórki różniące się w kierunku kardiomiocytów oraz komórek nerwowych [7,29]. Duża plastyczność budzi nadzieję na wykorzystanie ich w medycynie regeneracyjnej np.: regeneracji wątroby, mięśnia sercowego po zawale, chorób neurodegeneracyjnych lub cukrzycy. W cukrzycy typu 1 wykorzystuje się nie tylko potencjał naprawczy MSCs, ale i właściwości immunomodulacyjne. Hamują bowiem proliferację limfocytów T i B oraz komórek NK wykazując tym samym właściwości immunosupresyjne [1,18].

Przeprowadza się również przeszczepy autologiczne w leczeniu wrodzonej łamliwości kości (osteogenesis imperfecta) [3]. Terapia z wykorzystaniem potencjału naprawczego MSCs ma charakter przyspieszania regeneracji tkanki.

Pierwszą udaną transplantację komórek macierzystych z krwi pępowinowej przeprowadzono we Francji w 1988 r. pod kierunkiem prof. Elaine Gluckman u dziecka z niedokrwiistością Fanconiego. Według danych międzynarodowej organizacji naukowej Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT), zajmującej się od 1974 r. propagowaniem terapii komórkami macierzystymi dotychczas wykonano na świecie ponad milion przeszczepień komórek macierzystych.

W raporcie opublikowanym przez European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) w 2010 r. stwierdzono, że wskazania do transplantacji krwiotwórczych komórek KP są takie same, jak w przypadku komórek szpiku kostnego lub z mobilizowanej krwi obwodowej [6]. Transplantację przeprowadza się



w sposób standardowy „standard of care” w określonych chorobach, co oznacza, że sposób transplantacji dobrze poznano, a jej wyniki zostały uznane za lepsze od leczenia prowadzonego bez transplantacji SCs z krwi pępowinowej [26,43].

Galareta Whartona

Galareta Whartona (Wharton's jelly - WJ) jest tkanką łączną pochodzenia mezodermalnego, wypełniająca pępowinę i okalającą naczynia pępowinowe. Sznur pępowinowy jest otoczony tkanką nabłonkową pochodzącą z rozwoju owodni. Galareta Whartona zawiera śluzowe komórki tkanki łącznej, fibroblasty otoczone kwasem hialuronowym oraz włókna kolagenowe. Jest to struktura chroniąca naczynia pępowinowe przed ciśnieniem wewnątrzmacicznym, dzięki czemu jest zachowany przepływ krwi w tętnicach i żyłach pępowinowej [12].

Komórki wchodzące w skład galarety Whartona wykazują ekspresję genów charakterystycznych dla komórek macierzystych. Są to mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly - WJ-MSCs) zdolne do samoodnowy, a po wyizolowaniu mogą zostać pobudzone do różnicowania się w inne typy komórek: w komórki tkanki mięśniowej, nerwowej, tłuszczowej, kostnej i chrzęstnej [40,44,47]. Ich obecność w macierzy tkanki łącznej wiąże się z embriogenezą. Dzięki migracji MSCs z łożyska do wątroby płodu i z powrotem przez pępowinę wraz z krwią pępowinową, osadzają się na tkance łącznej i pozostają tam do końca ciąży. Tworzenie się tych komórek we wczesnym okresie płodowym pozwala im zachować niektóre właściwości embrionalnych komórek macierzystych, przy jednoczesnym zachowaniu właściwości somatycznych mezenchymalnych komórek macierzystych [38]. Pobieranie galarety Whartona do bankowania jest niezwykle proste i całkowicie bezpieczne zarówno dla pacjenta jak i personelu [47]. W związku z tym, że przeszczep krwi pępowinowej jest ograniczony liczbą komórek w jednej porcji, komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona mogą być uzupełnieniem dawki terapeutycznej podczas przeszczepiania komórek wyizolowanych z krwi pępowinowej [38]. WJ-MSCs mają znacznie większy potencjał proliferacyjny niż komórki pochodzące ze szpiku kostnego i mimo wielokrotnego ich pasażowania nie stwierdzono zmian w ich kariotypie [17,38]. Wykazano również, że komórki macierzyste pochodzące z tego źródła obniżają wytwarzanie cytokin prozapalnych [28].

Obecnie w Stem Cell Research Center, w Shandong w Chinach trwają badania kliniczne nad skutecznością terapii WJ-MSCs w cukrzycy typu 1. Przedstawione dane wskazują, że implantacja WJ-MSCs w leczeniu cukrzycy typu 1 jest bezpieczna i skuteczna. Może przywrócić funkcje komórek β wysp trzustkowych, choć dokładny mechanizm nie jest jeszcze poznany, a na długoterminowe wyniki leczenia należy jeszcze poczekać [13].

OWODNIOWE ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Owodnia

Owodnia składa się z trzech warstw: pojedynczej błony podstawnej, grubszej błony podstawowej i nieunaczynionej błony mezenchymalnej. Nie ma unerwienia, mięśni ani naczyń limfatycznych. Przylega do trofoblastu i jamy owodni, łatwo oddziela się od kosmówki. Jedną z podstawowych funkcji owodni jest ochrona zarodka przed wyschnięciem oraz przed urazami podczas ciąży i porodu. Bierze czynny udział w inicjowaniu i utrzymaniu czynności skurczowej macicy [39].

Owodnia jest jedną z trzech błon tworzących łożysko. Każda z tych błon (doczesna, owodnia i kosmówka) ma inne pochodzenie. Doczesna jest pochodzenia matczyńskiego, pozostałe dwie, pochodzenia płodowego. Podczas, gdy kosmówka powstaje z trofoblastu, owodnia powstaje 8 dnia po zapłodnieniu z epiblastu. Ludzkie komórki macierzyste nabłonka owodni (human amnion epithelial stem cells - hAESC) powstają jeszcze przed procesem gastrulacji, czyli przed trzecim tygodniem po zapłodnieniu. Stąd obecność pluripotencjalnych komórek macierzystych na powierzchni owodni [20,22].

Komórki te budzą duże zainteresowanie transplantologów, ze względu na potwierdzone badaniami różnicowanie się w trzy linie komórkowe, o niewielkiej immunogenności, cechach przeciwzapalnych, bez dylematów etycznych przy ich pobieraniu. Błona owodniowa znajduje zastosowanie w leczeniu chirurgicznym poparzeń, ciężko gojących się ran zmienionych stanem zapalnym oraz w okulistyce, mimo utrzymującej się niepewności dotyczącej mechanizmu działania i skutków terapii [35].

Zazwyczaj przeszczepienie komórek macierzystych przeprowadza się przez wstrzyknięcie zawiesiny komórek do organizmu. Przy zastosowaniu tej metody trudno zachować kontrolę nad położeniem, a tym samym nad różnicowaniem komórek w terapii niektórych schorzeń, dlatego w większości przypadków zastosowań hAESC używa się kawałka błony owodniowej po odwodnieniu lub kriokonserwacji. Membrana owodni może wówczas służyć jako przeszczep samodzielny, ale również jako rusztowanie, na którym można zaaplikować komórki, tworząc nowe, zdrowe tkanki [34].

Płyn owodniowy

Płyn owodniowy może być pozyskiwany w wyniku amniopunkcji w drugim trymestrze ciąży. Procedura jest wykorzystywana w diagnostyce prenatalnej, w wykrywaniu wrodzonych wad płodu lub określaniu cech, takich jak np. płeć. Jest to zabieg inwazyjny, niosący ze sobą ryzyko powikłań. Kobiety decydują się na amniopunkcję, gdy korzyści tej diagnostyki przewyższają potencjalne jednoprocetowe ryzyko poronienia. Pozyskany płyn owodniowy to nie tylko narzędzie diagno-

styczne, ale może być także źródłem materiału do terapii wielu wad wrodzonych. Do badania pobiera się około 20 ml płynu. Jest to ilość niewielka i niestanowiąca zagrożenia dla płodu przy prawidłowej ilości płynu owodniowego wyrażanej w indeksie AFI (amniotic fluid indeks). Pobrana do badania próbka może być potencjalnym źródłem materiału terapeutycznego, który można zamrozić i wykorzystać w razie konieczności. Również ukończenie ciąży przez cesarskie cięcie umożliwia pobranie próbek do zamrożenia [21]. Pobieranie, gromadzenie i wykorzystywanie do badań tych komórek jest pozbawione wszelkich dylematów etycznych. Wyjątkowość tego źródła polega na tym, że może być pozyskane jeszcze przed porodem, w przeciwieństwie do tkanek płodu, które można uzyskać i przechować dopiero po porodzie. Umożliwia to wykorzystanie AFSCs (amniotic fluid stem cells) w terapii komórkowej jeszcze w czasie życia płodowego lub w razie konieczności zaraz po porodzie. W badaniach przedklinicznych wykazano, że komórki pobrane z płynu owodniowego na wczesnym etapie rozwoju płodu, mogą posłużyć do wewnątrzmacicznej terapii regeneracji zastawek w sercu, dzięki czemu można uniknąć zastosowania implantów i powikłań związanych ze złym stanem dziecka zaraz po urodzeniu [48].

Badania nad składem płynu owodniowego dowiodły, że jest mieszaniną różnych typów komórek o różnych kształtach i właściwościach. Zidentyfikowano komórki pochodzące z rozwoju płodu, złuszczone komórki owodni oraz komórki ze złuszczonego naskórka, przewodu pokarmowego, układu oddechowego i moczowego. Populacje komórek i ich zawartość w płynie owodniowym są zmienne w zależności od wieku ciążowego, czyli rozwoju płodu i jego dobrostanu. W związku z tym, że płyn owodniowy powstaje jeszcze przed procesem gastrulacji, znajdują się w nim komórki, które nie uległy jeszcze specjalizacji. W dwóch mililitrach płynu owodniowego znajduje się około 20 tysięcy komórek, z których można wyizolować komórki macierzyste o właściwościach multipotentnych. W ciągu 36 godzin można uzyskać podwojenie liczby komórek, a po 250 podziałach zachowują nadal prawidłowy kariotyp. Jest to niezwykle ważna cecha ponieważ efektywność proliferacji jest szansą na uzyskanie wystarczającej liczby komórek do przeszczepu [8].

Podczas gdy badania nad biologią AFSCs nie są zaawansowane, ich hodowla dowiodła zdolności do generowania komórek linii krwiotwórczych, adipocytów, osteocytów, miocytów, komórek śródbłonna, hepatocytów, chondrocytów i komórek tkanki nerwowej. Daje to potencjał w terapii regeneracyjnej. W badaniach przedklinicznych wykazano możliwość leczenia: uszkodzonych kości, regeneracji komórek po zawale mięśnia sercowego, regeneracji komórek nerwowych, chorób płuc, chorób krwi oraz chorób autoimmunologicznych [21]. Jest to szerokie pole do badań nad możliwościami AFSCs także do stymulowania *in vivo* endogennych populacji komórek tkanki zmienionej zapalnie lub w procesie chorobowym. Jedynym warunkiem udanej terapii jest

zachowanie funkcjonalności stymulowanej tkanki i brak zaburzeń genetycznych. Drugą możliwością wykorzystania AFSCs jest tworzenie i przeszczepianie tkanki/narządu *in vitro*. Jednak inżynieria tkankowa wymaga głębszego poznania kaskad sygnalizacyjnych i szlaków odpowiedzi tychże komórek na stymulację [8].

PODSUMOWANIE

Badania nad komórkami macierzystymi trwają od wielu lat i towarzyszą im prace nad pozyskaniem nowych rodzajów komórek macierzystych. Badania zaczęły dostarczać coraz więcej wiadomości na temat możliwości ich wykorzystania terapeutycznego, ale także wątpliwości etycznych, co do ich pozyskiwania oraz zagrożeń wynikających z działań niepożądanych. Naukowcy zidentyfikowali nowe źródła komórek macierzystych, z których pozyskiwanie i wykorzystywanie komórek nieodróżnicowanych jest wolne od dylematów etycznych. Tkanki okołoporodowe, na które składają się krew pępowinowa, galareta Whartona, płyn owodniowy, łożysko oraz błony płodowe są bogatym źródłem komórek macierzystych o właściwościach multipotentnych i immunosupresyjnych. Wykazano, że mogą się one różnicować w komórki różnych tkanek, takich jak nerwowa, kostna, chrzęstna, mięśniowa, komórki wątroby.

Ich największą zaletą jest dostępność; można zaryzykować stwierdzeniem, że każdy człowiek rodzi się z własnym bankiem komórek macierzystych. Idealnie byłoby, gdyby każdy, gdy zajdzie taka potrzeba, miał możliwość skorzystania z tych zasobów. Niestety, ze względów technicznych i ekonomicznych ten potencjał nie jest jeszcze w pełni wykorzystywany.

W Polsce można zdeponować jedynie krew pępowinową, żaden bank nie podejmuje się przechowywania innych tkanek okołoporodowych. Również stosunek przeszczepień komórek krwi pępowinowej do innych rodzajów transplantacji jest mało imponujący, jak na możliwości, którymi dysponujemy. Za przyczynę tego stanu rzeczy można uznać zbyt małą liczbę banków publicznych krwi pępowinowej oraz tylko okazjonalne akcje takie jak „Dni krwi pępowinowej” zorganizowane przez Polski Bank Komórek Macierzystych, podczas których w wybranych szpitalach można było oddać krew pępowinową, zrzekając się do niej praw na rzecz badań i potrzeb terapeutycznych. Podczas trzech miesięcy pobrano jedynie 324 porcje krwi pępowinowej, a w akcji uczestniczyły tylko 22 szpitale. Jest to niezwykle mało, biorąc pod uwagę liczbę szpitali i oddziałów położniczych w Polsce. Może to świadczyć o braku wiedzy pacjentek i małym zaangażowaniu personelu w przekazywanie rzetelnych informacji dotyczących komórek macierzystych.

Od 2009 r. działa bank płynu owodniowego z siedzibą w Bostonie. Bank współpracuje ze szpitalami w Stanach Zjednoczonych oraz klinikami w Wielkiej Brytanii. Bankowanie płynu owodniowego pobranego do amniopunkcji zyskuje coraz większe uznanie w tych krajach,



jednak nadal jest mało popularne, ze względu na wysoki koszt przechowywania, który ponoszony jest przez osoby chcące taką tkankę zdeponować. Jednak właśnie płyn owodniowy daje najwięcej możliwości i największe nadzieje w medycynie regeneracyjnej. Atrakcyjna wydaje się możliwość terapii komórkowej z wykorzystaniem komórek macierzystych pobranych z płynu owodniowego u dzieci z uszkodzeniami okołoporodowymi, takimi jak: uszkodzenie spłotu barkowego, mózgowe niedotlenienie okołoporodowe, dysplazja oskrzelowo-płucna u dzieci urodzonych przedwcześnie, wady serca wymagające natychmiastowej interwencji.

W razie konieczności zastosowania terapii komórkowej u noworodka, komórki pobrane z tych tkanek mogą od razu służyć do przeszczepu autologicznego, a po zdeponowaniu, w razie potrzeby także w późniejszym czasie. Komórki macierzyste wyizolowane z płynu owodniowego mogą zostać wykorzystane do terapii jeszcze *in utero* [47]. Terapia ta (in utero hematopoietic stem cell transplantation – IUHST) jest alternatywną terapią

do transplantacji poporodowych w chorobach, które mogą być zdiagnozowane już w czasie ciąży. Komórki macierzyste są wprowadzane przezskórnie do otrzewnej płodu [15]. Dotychczas na świecie przeprowadzono około 50 takich zabiegów. Skuteczność terapii potwierdzona została w przypadku ciężkiego, złożonego niedoboru odporności, sprzężonego z chromosomem X (X-linked severe combined immunodeficiency – XSCID) [5]. W badaniach klinicznych i przedklinicznych komórki macierzyste okazały się skuteczne w leczeniu choroby Crohna, chorób płuc, cukrzycy, naprawy uszkodzeń kości, chorób serca, chorób nerek, degeneracji nerwowej, chorób krwi i wielu innych. Komórki macierzyste pochodzące z tkanek perinatalnych: łożyska, błon łożyskowych, płynu owodniowego, galarety Whartona sznura pępowinowego ze względu na swoje możliwości oraz dostępność są niezwykle interesujące w terapii komórkowej, medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Pozostaje mieć nadzieję, że ich potencjał zostanie wkrótce doceniony i w pełni wykorzystany.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aggarwal S., Pittenger M.F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005; 105: 1815-1822
- [2] Amarglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W., Cohen Y., Loewenthal R., Trakhtenbrot L., Paz N., Koren-Michowitz M., Waldman D., Leider-Trejo L., Toren A., Constantini S., Rechavi G.: Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.*, 2009; 6: e1000029
- [3] Bieback K., Kluter H.: Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2007; 2: 310-323
- [4] Boruczkowski D.: Krew pępowinowa. Przeszłość, teraźniejszość, przyszłość. *Ginekologia Polska - Medical Project*, 2009; 14: 73-84
- [5] Boruczkowski D., Pawelec D., Pieczonka A.: Krew pępowinowa. Część trzecia – przyszłość. *Nowa Pediatria*, 2011; 3: 61-65
- [6] Boruczkowski D., Pawelec K., Boruczkowski M.: Możliwości zastosowania komórek macierzystych u pacjentów z chorobami genetycznymi. Część pierwsza – niektóre wskazania. *Nowa Pediatria*, 2012; 3: 61-65
- [7] Buzańska L., Jurga M., Domańska-Janik K.: Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener. Dis.*, 2006; 3: 19-26
- [8] Carraro G., Garcia O., Perin L.: Amniotic Fluid Stem Cells, Research Institute, Children's Hospital Los Angeles. http://cdn.intechopen.com/pdfs/21373/InTech-Amniotic_fluid_stem_cells.pdf (01.10.2013)
- [9] Delo D.M., De Coppi P., Bartsch G.Jr., Atala A.: Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol.*, 2006; 419: 426-438
- [10] Ericson K., Chhabra A., Mikkola H.: Hematopoietic Stem Cell Development in the Placenta. *Perinatal Stem Cells*, John Wiley & Sons 2013
- [11] Gavory G., Farrow M., Balasubramanian S.: Minimum length requirement of the alignment domain of human telomerase RNA to sustain catalytic activity in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 2002; 30: 4470-4480
- [12] Hao H., Chen G., Liu J., Ti D., Zhao Y., Xu S., Fu X., Han W.: Culturing on Wharton's jelly extract delays mesenchymal stem cell senescence through p53 and p16INK4a/pRb pathways. *PLoS One*, 2013; 8: e58314
- [13] Hu J., Yu X., Wang Z., Wang F., Wang L., Gao H., Chen Y., Zhao W., Jia Z., Yan S., Wang Y.: Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr. J.*, 2013; 60: 347-357
- [14] Ilic D., Miere C., Lazic E.: Umbilical cord blood stem cells: clinical trials in non-hematological disorders. *Br. Med. Bull.*, 2012; 102: 43-57
- [15] In Utero Stem Cell Transplantation. www.chop.edu/service/fetal-diagnosis-and-treatment/fetal-diagnoses/in-utero-stem-cell-transplantation.html (18.01.2013)
- [16] Kapelańska J.: Klonowanie człowieka i embrionalne komórki macierzyste w świetle prawa porównawczego. *Prawo i Medycyna*, 2006; 8: 64-76
- [17] Karahuseyinoglu S., Cinar O., Kilic E., Kara F., Akay G.G., Demiralp D.O., Tukun A., Uckan D., Can A.: Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 2007; 25: 319-331
- [18] Le Blanc K., Ringdén O.: Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2005; 11: 321-334
- [19] Lewandowska-Szumiel M., Wójtowicz J.: Bone tissue engineering - a field for new medicinal products? *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2011; 12: 1850-1859
- [20] Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D.B., Strom S.C.: Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 2005; 23: 1549-1559
- [21] Murphy S.V., Atala A.: Amniotic fluid stem cells. W: *Perinatal Stem Cells*, Second Edition, red.: K.J. Cetrulo, C.L. Cetrulo Jr., R.R. Taghizadeh. John Wiley & Sons, New Jersey 2013, 1-16
- [22] Murphy S.V., Atala A.: Amniotic fluid and placental membranes: unexpected sources of highly multipotent cells. *Semin. Reprod. Med.*, 2013; 31: 62-68
- [23] Olszewska-Slonina D.M., Styczyński J., Drewa T.A., Czajkowski R.: Komórki niezróżnicowane – źródła i plastyczność. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 497-503
- [24] Paczkowska E., Dąbkowska E., Nowacki P., Machaliński B.: Terapia komórkowa w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2009; 43: 550-558

- [25] Pipino C., Shangaris P., Resca E., Zia S., Deprest J., Sebire N.J., David A.L., Guillot P.V., De Coppi P.: Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource. *Br. Med. Bull.*, 2013; 105: 43-68
- [26] Poręba R., Czajka R., Czajkowski K., Drews K., Oleszczuk J., Wielgoś M., Wilczyński J.: Opinia Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w sprawie pobierania i deponowania komórek macierzystych krwi pępowinowej. *Ginekologia Polska*, 2010; 81: 874-876
- [27] Poulsom R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002; 197: 441-456
- [28] Prasanna S.J., Gopalakrishnan D., Shankar S.R., Vasandan A.B.: Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*, 2010; 5: e9016
- [29] Prat-Vidal C., Roura S., Farré J., Gálvez C., Llach A., Molina C.E., Hove-Madsen L., Garcia J., Cinca J., Bayes-Genis A.: Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant. Proc.*, 2007; 39: 2434-2437
- [30] Roszek K., Komoszyński M.: Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 660-667
- [31] Rozwadowska N., Kurpisz M.: Modyfikacje genetyczne w komórkach macierzystych na potrzeby terapii genowej ex vivo. *Postępy Biol. Kom.*, 2010; 37: 253-269
- [32] Sanak M.: Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny lub fizjologii w roku 2012. *Medycyna Praktyczna Ginekologia i Położnictwo*, 2013; 1
- [33] Semenov O.V., Koestenbauer S., Riegel M., Zech N., Zimmermann R., Zisch A.H., Malek A.: Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2010; 202: 193.e1-193.e13
- [34] Shimazaki J., Kosaka K., Shimmura S., Tsubota K.: Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology*, 2003; 110: 119-124
- [35] Shiroyanagi Y., Yamato M., Yamazaki Y., Toma H., Okano T.: Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue Eng.*, 2003; 9: 1005-1012
- [36] Sikora M.A., Olszewski W.L.: Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 202-208
- [37] Styczyński J., Kałwak K., Ussowicz M., Owoc-Lempach J., Chybicka A., Pieczonka A., Dębski R., Krenska A., Drabko K., Kowalczyk J., Boruckowski D., Wysocki M., Wachowiak J.: Przeszczepianie krwi pępowinowej w polskich ośrodkach pediatrycznych: raport Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Transplantacji Komórek Krwiotwórczych. *Acta Haematol. Pol.*, 2012; 43: 265-270
- [38] Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L.: Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*, 2011; 32 (Suppl. 4): S311-S315
- [39] Toda A., Okabe M., Yoshida T., Nikaido T.: The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J. Pharmacol. Sci.*, 2007; 105: 215-228
- [40] Troyer D.L., Weiss M.L.: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 2008; 26: 591-599
- [41] Tsagias N., Koliakos I., Lappa M., Karagiannis V., Koliakos G.G.: Placenta perfusion has hematopoietic and mesenchymal progenitor stem cell potential. *Transfusion*, 2011; 51: 976-985
- [42] Volarevic V., Ljubic B., Stojkovic P., Lukic A., Arsenijevic N., Stojkovic M.: Human stem cell research and regenerative medicine - present and future. *Br. Med. Bull.*, 2011; 99: 155-168
- [43] Wachowiak J., Labopin M., Miano M., Chybicka A., Sary J., Sterba J., Masszi T., Labar B., Maschan A., Kowalczyk J.R., Lange A., Holowiecki J., Kalman N., Afanassiev B.V., Dini G.: Haematopoietic stem cell transplantation in children in eastern European countries 1985-2004: development, recent activity and role of the EBMT/ESH Outreach Programme. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 41 (Suppl. 2): S112-S117
- [44] Weiss M.L., Medicetty S., Bledsoe A.R., Rachakatla R.S., Choi M., Merchav S., Luo Y., Rao M.S., Velagaleti G., Troyer D.: Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*, 2006; 24: 781-792
- [45] Witkowska A., Ciemerych A.M., Suwińska A.: Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste – regulacja pluripotencji i różnicowania. *Postępy Biol. Kom.*, 2010; 37: 23-40
- [46] Witkowska-Zimny M., Walenko K.: Stem cells from adipose tissue. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2011; 16: 236-257
- [47] Witkowska-Zimny M., Wróbel E.: Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2011; 16: 493-514
- [48] Zeisberger S., Weber B., Hoerstrup S.P.: Fetal cells used for tissue engineering of cardiovascular implants and prospects for prenatal heart-valve implantation. *W: The Regenerative Potential of Placenta Derived Cells: 2nd International Meeting of the International Placenta Stem Cell Society (IPLASS)*. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2012; 6 (Suppl. 1): 459

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.

