

PRACA POGLĄDOWA

Charakterystyka komórek macierzystych występujących w łożysku ludzkim

Characteristics of stem cells occurring in human placenta

Karolina Smorzyk

STRESZCZENIE

Koło STN
przy Zakładzie Histologii Katedry Morfologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
Opiekun Koła i pracy:
dr hab. n. med. Piotr Czekaj

Potencjalnie, tak duży narząd jak łożysko ludzkie powinien być wydajnym źródłem komórek macierzystych. Pobieranie łożyska nie budzi kontrowersji. Izolacja komórek z poszczególnych warstw tego narządu jest procesem kilkietapowym. Z części płodowej łożyska ludzkiego wyizolowano: komórki nabłonka owodni (hAEC), mezenchymalne komórki podścieliska owodni (hAMSC), mezenchymalne komórki podścieliska kosmówki (hCMSC) oraz komórki trofoblastu kosmówki (hCTC). Wśród tych komórek wykazano obecność komórek macierzystych posiadających cechy pluripotencjalności. Pochodzące z łożyska komórki macierzyste wykazują ekspresję markerów specyficznych dla embrionalnych komórek macierzystych (SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81), a także mają zdolność do różnicowania się w kierunku komórek reprezentujących trzy listki zarodkowe: mezoderme, endoderme i ektoderme, np. do adipocytów, osteoblastów, chondrocytów, endoteliocytów, komórek mięśnia szkieletowego, kardiomiocytów, neuronów, komórek glejowych, komórek trzustki i hepatocytów. Komórki izolowane z łożyska ludzkiego charakteryzują się niską immunogennością i nie wykazują tendencji do transformacji nowotworowej po przeszczepieniu zwierzętom doświadczalnym. Komórki macierzyste pochodzące z łożyska ludzkiego wydają się wartościową populacją komórek dla medycyny regeneracyjnej oraz w leczeniu wielu chorób, do tej pory nieuleczalnych.

SŁOWA KLUCZOWE

komórki macierzyste, łożysko ludzkie, hAEC, hAMSC, hCMSC

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr hab. n. med. Piotr Czekaj
Zakład Histologii Katedry Morfologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Medyków 18
40-752 Katowice
tel. 32 208 83 74
e-mail: pcz@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 5-6, 80-89
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

ABSTRACT

Such a large organ as human placenta could be potentially a very efficient source of stem cells. In addition, taking of this organ is not invasive and controversial process. Isolation of cells from different layers of the placenta is divided into several stages. From fetal part of human placenta hAEC (human amniotic epithelial cells), hAMSC (human am-

niotic mesenchymal stromal cells), hCMSC (human chorionic mesenchymal stromal cells) and hCTC (human chorionic trophoblastic cells) can be isolated. Among these cells are present stem cells, which are characterized by pluripotency. Stem cells derived from placenta express markers specific for embryonic stem cells (SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81), and they have the ability to differentiate towards cells representing three germ layers: mesoderm, endoderm and ectoderm, for example: adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, endotheliocytes, skeletal muscle cells, cardiomyocytes, neurons, glial cells, pancreatic cells and hepatocytes. Cells isolated from human placenta are also characterized by low immunogenicity and tumorigenicity after implantation to the animals. Placenta-derived stem cells seem to be valuable population of cells for regenerative medicine and in a treatment of terminal diseases.

KEY WORDS

stem cells, human placenta, hAEC, hAMSC, hCMSC

WSTĘP

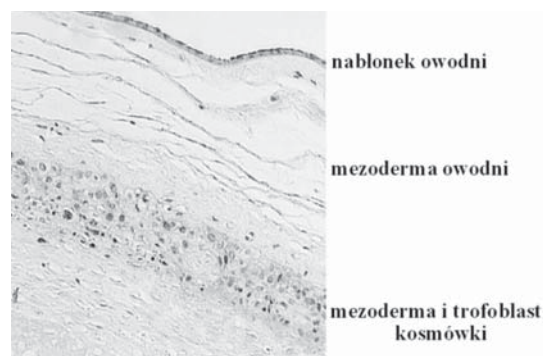
Komórki macierzyste (KM) dzięki swym unikalnym cechom stwarzają nadzieję na opracowanie skutecznych metod terapii chorób nieuleczalnych. Takie cechy, jak potencjalnie nieograniczona liczba podziałów oraz możliwość różnicowania do wyspecjalizowanych typów komórek reprezentujących każdy z trzech listków zarodkowych mogą spowodować, że KM staną się podstawowym narzędziem w medycynie regeneracyjnej. Wymaga to jednak efektywnych i prostych metod izolacji dużej liczby komórek oraz sterowania ich proliferacją i różnicowaniem [1,2]. Współcześnie KM pobiera się z wielu tkanek, m.in. ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej, krwi obwodowej, tkanki łącznej, mięśni szkieletowych czy miazgi zęba [2,3,4]. Ze względu na zdolności różnicowania, KM dzieli się na totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne i unipotencjalne [5]. Tylko embrionalne KM w początkowym stadium rozwoju są totipotencjalne, czyli zdolne do różnicowania do wszystkich typów komórek organizmu oraz popłodu [5]. Pobieranie KM zarodkowych na etapie blastocysty wywołuje jednak wiele problemów natury etycznej, religijnej i prawnej, ponieważ przerywa naturalny rozwój życia ludzkiego. Dlatego poszukuje się niezarodkowych KM, cechujących się pluripotencjalnością. Ograniczeniem stosowania KM pozazarodkowych są inwazyjne metody pobierania, mała liczba komórek, która zmniejsza się dodatkowo z wiekiem, oraz ryzyko zanieczyszczenia komórkami matczynymi. Zastosowanie w praktyce medycznej KM pochodzących z łożyska ludzkiego mogłoby zapobiec wielu problemom, towarzyszącym

wdrożeniu zarodkowych KM do terapii komórkowej [2,4,6].

Łożysko ludzkie umożliwia rozwój płodu, biorąc udział w wymianie gazowej, odżywianiu, usuwaniu szkodliwych metabolitów i wydzielaniu hormonów. Pod koniec trwania ciąży ma ono kształt dysku o średnicy 15–20 cm, grubości 2–3 cm i wadze 0,5–0,6 kg. Tak duży narząd jest potencjalnie bardzo wydajnym źródłem komórek. Pobieranie łożyska nie budzi kontrowersji moralnych i etycznych [2,4].

IZOLACJA, HODOWLA I MORFOLOGIA KOMÓREK Z CZĘŚCI PŁODOWEJ ŁOŻYSKA

W części płodowej łożyska wyróżnia się owodnię pokrytą nabłonkiem i zrosniętą z kosmówką, wraz z którą tworzy płytę kosmówkową.

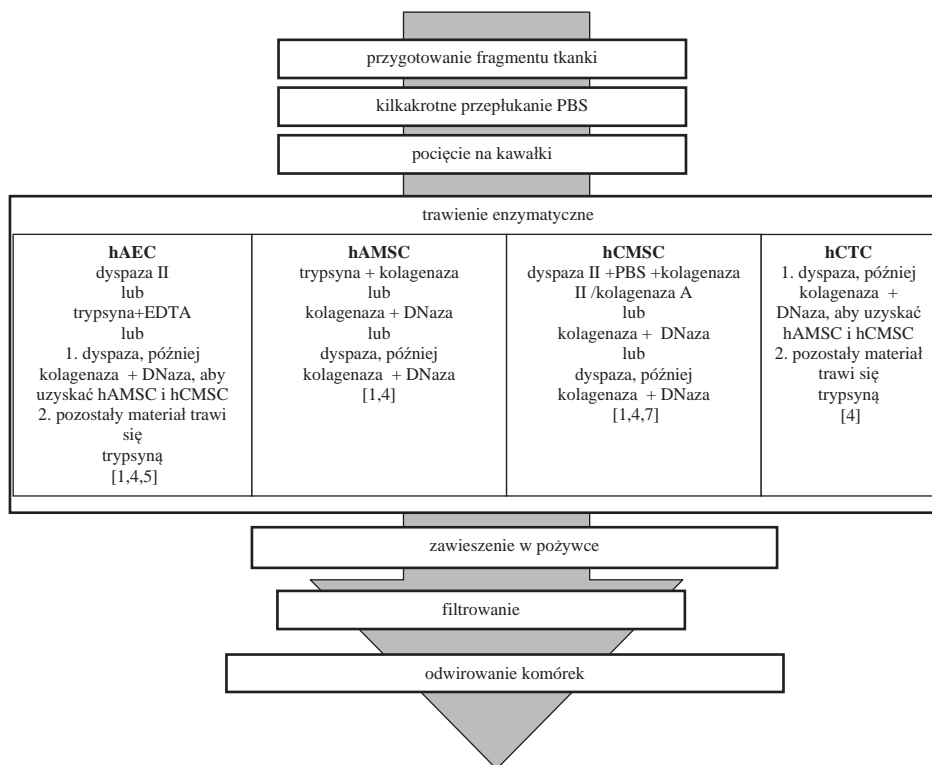


Ryc. 1. Płyta kosmówkowa łożyska ludzkiego (barwienie hematoksyliną i eozyną) będąca miejscem lokalizacji komórek hAEC (nabłonek owodni), hAMSC (mezoderma owodni), hCMSC (mezoderma kosmówki) i hCTC (trofoblast kosmówki).

Fig. 1. The chorionic plate of the human placenta (hematoxylin/eosin staining), which is the location of cells hAEC (amniotic epithelium), hAMSC (amniotic mesoderm), hCMSC (chorionic mesoderm) and (chorionic trophoblast).

Z tkanek tych można wyizolować kilka populacji komórek, takich jak: pochodzące z epiblastu komórki nabłonka owodni (*human amniotic epithelial cells* – hAEC); mezenchymalne komórki podścieliska owodni (*human amniotic mesenchymal stroma cells* – hAMSC); mezenchymalne komórki podścieliska kosmówki (*chorionic mesenchymal stromal cells* – hCMSC) pochodzące z hipoblastu oraz komórki trofoblastu kosmówki (*chorionic trophoblastic cells* – hCTC) (ryc. 1) [1,2]. Błona owodni ma powierzchnię od 700 do 1200 cm² [6]. Komórki nabłonka owodni w trakcie rozwoju są oddalone od centrum organogenezy, nie otrzymują czynników wzrostu, odpowiednich sygnałów do różnicowania i dlatego najdłużej zachowują cechy pluripotencjalności [7]. W celu izolacji komórek łożysko powinno być pobrane w trakcie cesarskiego cięcia, ponieważ wykazano mniejsze ryzyko zanieczysz-

czenia bakteriami tak pobranego narządu, w przeciwieństwie do łożyska pobranego w trakcie porodu naturalnego [1]. Izolowanie komórek z łożyska przebiega w kilku fazach (ryc. 2). Jednym z podstawowych etapów jest trawienie enzymatyczne, przy czym izolacja komórek z poszczególnych warstw łożyska może różnić się zastosowanymi enzymami, takimi jak: dyspaza, trypsyna czy kolagenaza, ich stężeniami oraz czasem inkubacji z enzymem. Hodowle KM *in vitro* prowadzone są z zastosowaniem różnych pożywek oraz czynników wzrostu [4,8,9]. Hodowlę przeprowadza się zwykle w temperaturze 37°C przy zawartości 5% CO₂ w atmosferze inkubatora [8]. Odpowiednia gęstość komórek w hodowli, wynosząca od 1 do 1,2 x 10⁵/cm², umożliwia interakcje między nimi, a także powoduje spowolnienie procesu starzenia się. W hodowli stosuje się pożywkę



Ryc. 2. Schemat izolacji komórek z części płodowej łożyska ludzkiego. Początkowo mechanicznie oddziela się owodnię od kosmówki, a następnie materiał oczyszcza się z krwi przez kilkakrotne przepłukanie PBS z penicyliną i streptomycyną. W dalszych etapach tkanki tną się na małe kawałki, które traktuje się odpowiednimi enzymami. Uzyskany materiał z poszczególnych procesów enzymatycznych filtruje się przez sito i odwirowuje w temperaturze 4°C. Wykazano, że z pojedynczego łożyska można otrzymać 24 ± 10 x 10⁶ hAMSC, 147 ± 42 x 10⁶ hAEC, 21 ± 14 x 10⁶ hCMSC, 184 ± 61 x 10⁶ hCTC [4,9,10].

Fig. 2. Isolation scheme of cells from fetal part of human placenta. Initially, amnion from the chorion is separated mechanically, then the material is purified from the blood by flushing several times with PBS, penicillin and streptomycin. In further stages the tissue is cut into small pieces, which are treated with respective enzymes. The resulting material from various enzymatic processes, is filtered through the sieve and centrifuged at 4°C. It was shown that from the single placenta can be obtained 24 ± 10 x 10⁶ hAMSC, 147 ± 42 x 10⁶ hAEC, 21 ± 14 x 10⁶ hCMSC, 184 ± 61 x 10⁶ hCTC [4,9,10].

DMEM lub K-DMEM z dodatkiem pirogronianu sodu, płodowej surowicy bydłowej (5–10%), L-glutaminy, 2-merkaptetanolu, antybiotyków, antymykotyków, aminokwasów endogennych i czynników wzrostu, m.in. naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor* – bFGF) lub transformującego czynnika wzrostu (*transforming growth factor* – TGF) [9]. Komórki nabłonka owodni proliferują od 2 do 6 pasaży i charakteryzują się średnią wielkością i sześciennym kształtem [1]. Po barwieniu barwnikiem May-Grunwalda-Giemsy uwidaczniają się centralnie lub ekscentrycznie położone jądro z 1–2 jąderkami oraz obfita cytoplazma zawierająca wakuole. hAEC wykazują homogeną morfologię, ale heterogeny fenotyp, co może świadczyć o obecności różnych subpopulacji komórek [2]. Natomiast hAMSC i hCMSC proliferują od 5 do 10 pasaży, przy czym dłużej z tkanki pobranej w trymestrze I niż w III [10]. Proliferacja hAMSC już po 2 pasaży ulega spowolnieniu [1]. hCMSC i hAMSC wykazują morfologię fibroblastów, która utrzymuje się do końca proliferacji [4].

hAEC i hAMSC wydają się być lepszym źródłem KM niż hCTC, ponieważ zawierają tylko komórki pochodzenia płodowego. Badania polimorfizmu *locus* D1580 wykazały bowiem, że populacje hCTC zawierały zarówno płodowe, jak i matczyne allele, a hAMSC i hAEC tylko allele płodowe. Co ciekawe, hCMSC początkowo wykazywały obecność tylko alleli płodowych, lecz po 2–3 tygodniach hodowli pojawiły się także matczyne. Obecność allelu matczynego świadczy o możliwości zanieczyszczenia krwią matki podczas izolacji lub aktywnej inwazji komórek matki do kosmówki w trakcie ciąży [4].

Dodanie do hodowli czynników wzrostu pełni bardzo ważną funkcję, podobnie jak podczas trwania fizjologicznej ciąży, której towarzyszy wzrost poziomu EGF w płynie owodniowym. Komórki w obecności czynników wzrostu szybko tworzą pojedynczą warstwę przylegającą do naczynia, a średni czas podwojenia komórek w tym wypadku wynosi 38,4 godziny. Bez czynnika wzrostu proliferacja ustaje i tworzą się olbrzymie komórki wielojądrowe (*giant multinuclear cells*). Silny wzrost komórek *in vivo* może być hamowany przez IL-6, dlatego postuluje się, że za proliferację może odpowiadać równowaga między EGF a IL-6 [3,6,11].

MARKERY KOMÓREK IZOLOWANYCH Z ŁOŻYSKA LUDZKIEGO

W 2006 r. The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society of Cellular Therapy przyjęło następujące kryteria definiujące ludzkie mezenchymalne KM: zdolność do adhezji do podłoża, występowanie specyficznych antygenów powierzchniowych, różnicowanie w kierunku jednej lub więcej linii komórkowych, np. w kierunku komórek kości, komórek chrzęstnych, adipocytów i komórek naczyń oraz zdolność formowania kolonii fibroblastów (*fibroblast colony forming units* – CFU-F) [12]. Wprowadzono także definicję immunofenotypową dla ludzkich mezenchymalnych KM, która określa, że przynajmniej 95% populacji tych komórek powinno wykazywać ekspresję markerów CD105 (białko E9), CD73 (L-VAP-2) i CD90 (Thy1), a antygeny CD45 (LCA – *leukocyte common antigen*), CD34 (gp105-120), CD14 (LPS-R), CD11, CD79 α (Ig- α), CD19 (Leu-12) i HLA klasy II (antygen głównego układu zgodności tkankowej człowieka) powinny być obecne w mniej niż 2% tej populacji [11].

W 2008 r. objęto tymi kryteriami także komórki wyizolowane z łożyska, przyjmując że zanieczyszczenie materiałem matczynym w próbce nie powinno przekraczać 1% [1]. Komórki macierzyste z łożyska charakteryzują się ekspresją markerów zarówno mezenchymalnych, hematopoetycznych, jak i zarodkowych. Jednak poszczególne komórki reagują w różnym stopniu z przeciwciałami przeciw określonym antygenom, co sugeruje, że znajdują się na różnych etapach zróżnicowania [6].

W badaniach komórek izolowanych z łożysk ludzkich wykazano, że zarówno na hAEC, jak i na hAMSC oraz hCMSC pojawiają się takie markery, jak CD105, CD90, CD73, CD44 (ECMR 3 – *extracellular matrix receptor-3*), CD29 (VLA-beta – *very late activation antigen-beta*), HLA-ABC, CD13(gp150), CD10 (gp100), CD166 (ALCAM – *activated leukocyte cell adhesion molecule*), CD49e (VLA-5 – *very late activation antigen 5*). Wszystkie te populacje cechuje brak ekspresji dla CD14, markera charakterystycznego dla monocytów, CD34, CD45, HLA-DR i CD133 (PROML1 – *prominin-like-1*), które znajdują się na komórkach glioblastomy, a także CD117 (c-kit) oraz CCR4 (CC – *chemokine receptor 4*). Nieobecność ekspresji CD34 świadczy o braku zanieczyszczenia hematopoetycznymi KM pochodzącymi

z krwi pępowinowej [1,3,10]. Ekspresja CD90 (Thy-1) w świeżo wyizolowanych hAEC jest na niskim poziomie, jednak szybko wzrasta podczas hodowli i już po 6 dniach jest obecna na 50% komórek [3,6]. Świeżo wyizolowane hAEC nie wykazują ekspresji wimentyny, która jest uznawana za marker fibroblastów, miocytów, komórek śródbłonka i komórek nerwowych, jednak w trakcie trwania hodowli reagują one z przeciwciałem przeciw temu antygenowi. Cytokeratyna, będąca markerem komórek nabłonka, a także CD9 (p24) oraz integryny $\alpha 6$ i $\beta 1$ występują w prawie wszystkich komórkach nabłonka owodni [6]. Dodatkowo na hAEC obecne są FOXD3 (*forkhead box D3*), GDF3 (*growth/differentiation factor-1*), CD349, POU5F1 (*POU domain, class 5, transcription factor 1*), CFC1 (FRL-1), DPPA3 (*developmental pluripotency-associated protein 3*), PROM1 (*prominin 1*), PAX6 (*paired box 6*), CD140b (PDGFRB – *provided platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide*), GCTM2, ABCG2/BCRP (*ATP-binding cassette transporter G2, BCRP1*), CD9, CD24 (SCLC – *surface antigen cluster-4*), E-kadheryna (CD324) oraz c-met (receptor HGF) [1,3,6,10]. Takie markery, jak CD54 (ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule 1*), CD349, CD140b i CD271 (PDL1 – *programmed death-1 ligand 1*) wykazują ekspresję tylko na hAMSC i hCMSC. Ponadto hAMSC i hCMSC charakteryzują się brakiem ekspresji CD3, CD31 (PECAM-1 – *platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*) oraz CD324. Ekspresja antygenów CD49d (integryna $\alpha 4$), CD49c (integryna $\alpha 3$) i CD71 (OKT9) na hAMSC odróżnia je od hAEC [1,8,10].

Potencjalnym markerem mezenchymalnych KM jest CD271 (*LNGFR-low-affinity nerve growth factor receptor*), ponieważ komórki cechujące się jego ekspresją charakteryzuje wysoki potencjał klonogenny i różnicowania do komórek kości i tkanki tłuszczowej. Wykazano, że ekspresja antygeny CD271 w hAMSC i hCMSC była na zmiennym poziomie. Ekspresja CD271 w populacji mezenchymalnych KM szpiku kostnego (BM-MSC – *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) była z reguły na wyższym poziomie w porównaniu z komórkami łożyskowymi. Podczas trwania hodowli hAMSC i hCMSC ekspresja CD271 zanikała, hCTC i hAEC w ogóle nie wykazywały ekspresji tego markera. BM-MSC, cechujące się ekspresją CD271, wykazują zwiększoną zdolność do formowania jednostki CFU-F w porównaniu z komórkami niewykazującymi ekspresji

CD271. Podobne wyniki uzyskano dla hAMSC i hCMSC. W większości przypadków hAMSC i hCMSC charakteryzujące się obecnością antygeny CD271 cechuje zwiększona zdolność różnicowania w kierunku komórek kości [4]. Z porównania ekspresji markerów KM zarodkowych z markerami obecnymi w populacji hAEC wynika, że wykazują one podobny profil ekspresji. KM zarodkowe wykazują ekspresję SSEA (*stage-specific embryonic antigens*), TRA (*tumor rejection antigen*), Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*, POU5F1), SOX2 (SRY – *sex determining region Y-box 2*), Lefty-A (*lefty-2 – left-right determination factor*), TDGF-1 (*teratocarcinoma-derived growth factor-1*), Nanog, FGF-4 (*fibroblast growth factor-4*), REX-1 (Zfp-42) oraz telomerazy i aktyniny [3,6]. Obecnością SSEA1 charakteryzuje się 20% populacji komórek zarodkowych, a 50–80% komórek wykazuje ekspresję SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60 oraz TRA1-81 [6]. Te same antygeny występują w populacji hAEC. Oct-4, SOX-2 oraz Nanog są uważane za markery pluripotencjalnych KM [3]. Jedynym markerem komórek embrionalnych obecnym w hAMSC jest Oct-4. Ekspresja Oct-4 jest wyższa w hAMSC niż w BM-MSC [13]. Natomiast tylko mała część populacji hCMSC charakteryzuje się ekspresją antygeny SSEA-4 [1]. Wykazano, że komórki kosmówki są negatywne dla TRA1-60 i TRA1-81 [7].

Oct-4 należy do regulatorów transkrypcji i wraz z antygenem Nanog jest odpowiedzialny za pluripotencjalność i samoodnawianie ludzkich komórek zarodkowych. Ekspresję tego markera wykazują KM embrionalne, komórki raka zarodkowego, oocyty i spermatogonie. W hAEC, antygen Oct-4 lokuje się zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie [6]. Przy wysokiej gęstości komórek hAEC ekspresja Oct-4 i Nanog wzrasta w ciągu 12–15 dni hodowli [3]. Około 10–20% populacji hAEC cechuje się obecnością TRA1-60 i TRA1-81. Komórki wykazujące ekspresję tych antygenów są równomiernie rozmieszczone w hodowli, nie tworzą grup i nie ma też związku między ekspresją tych markerów a częścią łożyska, z którego komórki te zostały wyizolowane [7]. Charakterystyczne epitopy R-3GalNAc α 1-3Gal α 1-4Ra dla antygeny SSEA-3 oraz NeuAca2-3Gal α 1-3GalNAc α 1-3Gal α 1-4R dla SSEA-4, wykazujących ekspresję w hAEC, są odpowiedzialne za wzrost aktywności integryn [14]. Integryny wchodzi w interakcje z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth fac-*

tor receptor – EGFR) i angażują się w proliferację i proces starzenia się komórek [6]. Sugeruje się, że różnice między epitopami antygenów SSEA-3 i SSEA-4 wskazują na inny etap zróżnicowania komórek [7].

W hodowli hAEC nad pojedynczą warstwą komórek przylegających do naczynia, można zauważyć powstanie tzw. małych grudek (*small clusters*), struktur podobnych do kul zarodkowych (*embryoid bodies*) powstających z embrionalnych KM. Komórki „małych grudek” charakteryzują się nieobecnością telomerazy, prawidłowym kariotypem, brakiem onkogenności, a składniki odżywcze z innych komórek nie są niezbędne do utrzymania w nich ekspresji Oct-4 i Nanog. Odwrotna sytuacja dotyczy kul zarodkowych, które cechują się aneuploidią, posiadają telomerazę, a po wszczępieniu ich do organizmu tworzą potworniaki. Wykazano, że w hodowli ekspresja markerów KM, m.in. Oct-4 i Nanog, ujawnia się głównie w „małych grudkach” [6]. Takie markery, jak SSEA-3, SSEA-4 oraz TRA1-60 i TRA1-81 ulegają ekspresji w 2% populacji komórek przylegających do naczynia. Jednak prawie 100% „małych grudek” cechuje się ekspresją SSEA-4, a 5–15% z nich wykazuje obecność SSEA-3, TRA1-60 oraz TRA1-81. Wydaje się, że bardziej zróżnicowane komórki przylegające do naczynia tracą markery na skutek zmniejszonej ekspresji (*down regulation*). Prawdopodobnie warstwa komórek przylegająca do naczynia pełni funkcję żywiciela, wspomagając różnicowanie lub utrzymując komórki w stanie niezróżnicowanym poprzez wydzielanie czynników wzrostu [3]. W innym badaniu zarodkowe KM były hodowane na populacji hAEC. Komórki zarodkowe utrzymywały niezróżnicowany charakter, ponieważ wykazywały ekspresję markera Oct-4 i były zdolne do różnicowania do komórek trzech listków zarodkowych. Wydaje się, że interakcje między KM, a komórkami warstwy odżywczej mogą być wykorzystane do utrzymywania cech macierzystości [6].

Badania ostatnich lat dowiodły, że komórki łożyska zawierają ograniczoną liczbę antygenów głównego układu zgodności tkankowej, które są niezbędne do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Dzięki temu nie są one rozpoznawane przez układ odpornościowy, nie wywołują reakcji immunologicznej i mogą zostać użyte klinicznie do przeszczepu allogenicznego. hAMSC, hCMSC z I i III trymestru oraz hAEC charakteryzują się niskim poziomem ekspresji HLA-A, B i C, klasy Ia oraz brakiem ekspresji

HLA-DR, klasy II. Dodatkowo komórki owodni wykazują ekspresję antygeny HLA-G, klasy Ib, który hamuje odpowiedź immunologiczną. HLA-G łączy się bezpośrednio z hamującym receptorem na komórkach NK oraz posiada peptyd wiążący HLA-E, co pozwala hamować komórki NK (*natural killer*). HLA-G indukuje także apoptozę aktywowanych limfocytów T CD8+ (CD8 = Leu2) oraz zwalnia proliferację limfocytów T CD4+ (CD4 = Leu3) [1,15].

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK ŁOŻYSKOWYCH

Komórki hAEC, hAMSC i hCMSC są zdolne do różnicowania w kierunku komórek wszystkich trzech listków zarodkowych, co świadczy o ich pluripotencjalności (tab. I). Największe zdolności różnicowania wykazują populacje hAEC i hAMSC. Można kierować tym różnicowaniem przez zastosowanie odpowiedniej pożywki indukcyjnej [1,16].

hAEC zróżnicowane *in vitro* w kierunku hepatocytów charakteryzują się ekspresją czynników transkrypcyjnych HNF (*hepatocyte nuclear factors*): HNF3 γ , HNF 4 α , HNF-1, CEBP α i β (*CCAAT-enhancer-binding proteins α and β*), PXR (*pregnane X receptor*), CAR (*constitutive androstane receptor*) oraz obecnością wątrobowo-specyficznych genów takich, jak geny dla albuminy, α 1-antytrypsyny, glukozo-6-fosfatazy, aminotransferazy tyrozyny, syntazy glutaminy, transtyretyny, CPS-1 (*carbamoyl phosphate synthase I*), PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) i genów odpowiedzialnych za metabolizm leków (CYP: 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4, 3A7 i 7A1 – *cytochrome P450*) [1,6,17,18]. 33% hAEC zróżnicowanych do hepatocytów wykazuje ekspresję genów albumin i HNF4 α , a 60% – genu CYP1A, czyli tak jak w ludzkich hepatocytach. Komórki wykazujące ekspresję genu dla albumin posiadają dwa jądra i przypominają hepatocyty prawdziwej wątroby [3]. Zidentyfikowano w nich także geny białek transportowych dla: P-glikoproteiny, MRP1/ABCC1 (*multidrug resistance protein 1*), ABCG2, BSEP (*bile salt export pump*), UGT1A1 (*uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1*) i OTC (*ornithine transcarbamylase*) oraz ekspresję nabłonkowych cytokeratyn 8 i 18 [1,8].

Udało się także zróżnicować hAEC do hepatocytów, po wprowadzeniu ich do wątroby myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID – *severe combined immunodeficiency*). Podobnie jak w badaniach *in vitro*,

Tabela I. Przykładowe czynniki indukujące różnicowanie poszczególnych populacji komórek izolowanych z części płodowej łożyska ludzkiego. Czynniki egzogenne, czynniki wzrostu lub związki chemiczne indukują zmiany w ekspresji genów i morfologii komórek, co wpływa na różnicowanie danego typu komórek w określonym kierunku [6]. W hodowlach żywkę indukującą różnicowanie wymienia się okresowo (np. co 3 dni) w 90 % [9]

Table I. Examples of factors which can induce differentiation of cell populations isolated from the fetal part of human placenta. Exogenous factors, growth factors or chemical compounds induce changes in the gene expression and cell morphology, thus inducing the differentiation of the cells [6]. Culture medium inducing the differentiation is exchanged periodically (e.g. every 3 days) in 90% [9]

Komórki łożyska	Hepatocyty	Komórki nerwowe	Kardio-miocyty	Komórki trzustki	Adipocyty	Komórki kości	Komórki mięśni szkieletowych	Komórki chrząstki	Śródbłonek
hAEC	HGF, FGF-2, onkostatyna, deksametazon, sól sodowa heparyny [16]	ATRA (ang. <i>trans-all-retinoic acid</i>) [17]	kwask askorbinowy [3]	merkaptioetanol, pirogronian sodu, nikotynamid, pokrycie naczyń do hodowli kolagenem I [8]	IBMX (izobutylo-metoksyksantyna), deksametazon, insulina, indometacyna [8]	deksametazon, 1- α , 25-dehydroksy-witamina D3, kwas askorbinowy, β -glicero-fosfataza [8]	hydrokortyzon [8]	insulina, TGF β 1, kwas askorbinowy [17]	-
hAMSC	ATRA [8]	-	HBR (mieszanka estru hialuronianu, kwasu masłowego i retinowego) [19]	nikotynamid [20]	indometacyna, insulina, deksametazon, IBMX, amfoterycyna B, po 3 dniach zamienia się na żywkę utrzymującą adipocyty bez zawartości IBMX i hoduje się przez 14 dni [9]	β -glicero-fosfataza, kwas askorbinowy, 1,25-(OH) $_2$ D3, deksametazon, amfoterycyna B [9]	deksametazon, hydrokortyzon [8]	insulina, TGF β 1, kwas askorbinowy [8]	VEGF, 2% FBS [13]
hCMSC	jak dla hAMSC	-	-	-	jak dla hAMSC	jak dla hAMSC	jak dla hAMSC	jak dla hAMSC	-

uzyskane komórki produkowały i uwalniały albuminy, α 1-antytrypsynę i AFP (*α -fetoprotein*) oraz magazynowały glikogen. Albumina była wykrywana zarówno w surowicy, jak i płynie otrzewnowym. Badane hepatocyty charakteryzowały się ekspresją HNF3 γ , HNF4 α , CEBP α i β oraz ekspresją genów cytochromu P450 [6,19].

Wszystkie typy komórek łożyskowych opisanych w niniejszej pracy wykazują możliwość zróżnicowania się w kierunku komórek układu nerwowego zarówno *in vitro* [19], jak i *in vivo* [20]. Hodowane w żywce indukującej, hAEC wykazują ekspresję genów markerów charakterystycznych dla komórek nerwowych i glejowych (nestyna, GAD – *glutamic acid decarboxylase*, GFAP – *glial fibrillary acidic protein*), produkują specyficzne białka, a także mają zdolność do syntezy i uwalniania neurotransmiterów, takich jak: acetylocholina, katecholaminy i dopamina oraz neurotrofiny (BDNF – *brain-derived neurotrophic factor*) [3,20,21]. Wykazano, że aż 90% tych komórek reaguje z przeciwciałem przeciw GFAP, a 5% z CNP

(*cyclic nucleotide phosphodiesterase*) [3]. W badaniach na małpach, którym przecięto rdzeń kręgowy, udowodniono, że hAEC bez stosowania immunosupresji wspierały regenerację aksonów, zapobiegały śmierci przeciętych aksonów i nie wywoływały stanu zapalnego przez około 120 dni. Zwierzęta wykazywały stopniową poprawę funkcji ruchowej według skali BBB (*Basso, Beattie and Bresnahn*), osiągając wynik 19 punktów, czyli tylko o 2 punkty mniej niż zwierzęta zdrowe, co świadczy o neuroprotektynym działaniu hAEC w ostrej fazie urazu, naprawie drogi piramidowej, korowo-rdzeniowej i pozapiramidowej, w pniu mózgu, odpowiedzialnych za poruszanie się. Wydaje się, że korzystne efekty występują dzięki wydzielaniu czynników neurotroficznych [1].

W innym badaniu wszczepiono hAEC szczurowi w modelu doświadczalnym choroby Parkinsona i udowodniono hamujący wpływ tych komórek na śmierć komórek nerwowych [20,22]. Z kolei hAEC po podaniu ich do prądkowia myszy w podobnym modelu doświadczalnym

chorobę Parkinsona działały neuroprotekcynie, funkcjonowały jak komórki nerwowe oraz poprawiały funkcje behawioralne zwierząt doświadczalnych [23]. hAEC były także podawane szczurom z niedrożnością tętnicy środkowej mózgu i wykrywano je w miejscu niedokrwionego obszaru. Okazało się, że również w tym przypadku poprawiały one funkcje nerwowe i przyczyniły się do zmniejszenia wielkości zawału [24]. W innym eksperymencie wykazano, że hAEC po wszczepieniu do niedokrwionego hipokampa różnicują się do komórek o cechach komórek nerwowych. Ludzkie mezenchymalne komórki owodni i kosmówki są także zdolne do tworzenia komórek neuronopodobnych, lecz pełnienie przez nie charakterystycznych funkcji nerwowych nie zostało do tej pory udowodnione [25].

Komórki hAMSC można różnicować *in vitro* w kierunku komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Utrzymywane w pożywce indukującej zmieniały morfologię już w 4 godzinie, a struktury podobne do kapilar pojawiały się po 20 godzinach. Po podaniu VEGF (*vascular endothelial growth factor*) różnicowanie nasilało się w 2, 4 i 20 godzinie. W komórkach zróżnicowanych do śródbłonna wykazano ekspresję receptora VEGF-1, VEGF-2, ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule receptor 1*) i CD34 oraz wykryto w cytoplazmie ziarnistości zawierające czynnik von Willebranda [13].

Poprzez indukowanie różnicowania hAEC i hAMSC uzyskano komórki kardiomiocytopodobne [3,26]. Hodowane na odpowiednich pożywkach hAEC wykazywały ekspresję genów specyficznych dla komórek ściany przedsiionka i komór serca m.in. lekkich łańcuchów miozyny 2 (*myosin light chain-2A and 2V* – MLC-2A i MLC-2V) oraz czynników transkrypcyjnych GATA-4 (*GATA binding protein 4*) i NKX 2.5 (*NK2 transcription factor related*), a w badaniu immunohistochemicznym wykazano obecność α -aktyniny, której poziom był taki sam, jak w kardiomiocytach pochodzących z embrionalnych KM [3,6]. Udowodniono także zdolność różnicowania hAMSC w kierunku kardiomiocytów *in vivo*, wszczepiając je do serca szczura po zawale, gdzie wykazały zdolność do przeżycia przez około dwa miesiące. Ludzkie komórki owodni i kosmówki traktowano mieszaniną estru hialuronianu, kwasu masłowego i retinowego (HBR – *mixed ester of hyaluronan, butyric and retinoic acids*). Użyty czynnik zwiększał ekspresję genów charakterystycznych dla mięśnia sercowego, takich

jak: GATA4 i NKX 2.5 oraz produkcję białek, łańcuchów ciężkich miozyny i α -aktyny, a także ekspresję czynnika von Willebranda. Przeszczepienie tych komórek szczurowi z zawałem mięśnia sercowego spowodowało zwiększenie liczby kapilar, normalizację funkcji lewej komory, zmniejszenie powstałej blizny oraz ograniczyło wielkość zawału. Postuluje się, że zmiany powstające po transplantacji ludzkich komórek owodni i kosmówki były wywołane lokalną sekrecją czynników angiogenezy, anty-apoptozy i mitogenezy [27].

Wykazano ponadto, że hAEC hodowane przez 2–4 tygodnie w obecności amidu kwasu nikotynowego przekształcają się w komórki trzustki. Zróżnicowane w ten sposób hAEC wszczepiono do trzustki myszy obciążonej cukrzycą indukowaną streptozotocyną. Podanie zróżnicowanych komórek wpłynęło na uregulowanie hiperglikemii [28]. hAEC zróżnicowane do komórek trzustki charakteryzowały się ekspresją genów insuliny i glukagonu oraz Nkx 2.2 (*NK2 homeobox 2*), PDX-1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) i PAX-6 (*paired box 6*). Nie wykryto do tej pory aktywności proinsuliny i c-peptydu [3].

Wszystkie trzy typy komórek – hAEC, hAMSC i hCMSC – są zdolne do różnicowania w kierunku komórek tkanki łącznej, co łatwo wykazać stosując odpowiednie barwienia. Po trzech tygodniach hodowli w pożywce indukcyjnej w kierunku adipocytów hCMSC i hAMSC charakteryzowały się obecnością lipidów zabarwionych sudanem czerwonym [4]. Po zastosowaniu pożywki indukującej w kierunku komórek kości, w hodowli trwającej od 3 do 4 tygodni [8], hAMSC i hCMSC zawierały złogi wapnia, które uwidacznia barwienie von Kossa [29]. Zróżnicowane hCMSC charakteryzowały się obecnością aktywnej fosfatazy zasadowej. hAMSC były zdolne przekształcać się w kierunku komórek kości tylko w trakcie trwania pierwszego pasażu. Po indukcji do komórek kości hAMSC i hCMSC cechowały się ekspresją osteopontyny [4].

Natomiast w komórkach mezenchymalnych owodni i kosmówki, po indukcji w kierunku komórek mięśni szkieletowych, w hodowli trwającej także od 3 do 4 tygodni, zidentyfikowano w badaniu RT-PCR czynniki transkrypcyjne MyoD i miogeninę; MyoD w komórkach pojawiał się po 7 dniach, a miogenina po 2 tygodniach. Barwienie metodami immunohistochemicznymi wykazało po 3 tygodniach hodowli obecność desminy [10].

Po 3 tygodniach hodowli w pożywce indukującej różnicowanie w kierunku komórek chrząstki, hAMSC i hCMSC cechowały się obfitą macierzą pozakomórkową barwiącą się błękitem toluidyny i wykazującą metachromazję, a znakowanie immunohistochemiczne ujawniało obecność kolagenu typu II [4,10].

ZASTOSOWANIE MEDYCZNE KOMÓREK Z ŁOŻYSKA LUDZKIEGO

Wykorzystanie błon płodowych w celach medycznych ma już 100-letnią tradycję. Pierwsze doniesienia o ich zastosowaniu pochodzą z 1910 r., kiedy użyto ich do zastąpienia ubytków skóry. Potem stosowano je także do leczenia oparzonej i owrzodzonej skóry oraz uszkodzonej spojówki. Obecnie podejmowane są próby stosowania błon płodowych w medycynie regeneracyjnej, a ich celem jest poprawienie lub przywrócenie funkcji komórek uszkodzonych narządów [25].

Błona owodni cechuje się wieloma wartościowymi cechami ułatwiającymi jej zastosowanie kliniczne, m.in. niską immunogennością, działaniem antybakteryjnym, przeciwzapalnym i antywłóknieniowym. Komórki owodni syntetyzują i uwalniają liczne cytokiny, takie jak TNF (*tumor necrosis factor*), IFN (*interferon*), TGF α i β (*transforming growth factor α and β*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), Il-4 (*interleukin-4*), Il-6 (*interleukin-6*), Il-8 (*interleukin-8*), inhibitory metaloproteinaz, β -defensyny oraz prostaglandyny [30]. Hamują proliferację limfocytów T oraz różnicowanie monocytów [31], nie powodują ostrego odrzucania po allotransplantacji i przy braku leczenia immunosupresyjnego [25], a w badaniach krótkoterminowych nie wywołują rozwoju nowotworów [6].

Komórki owodni można stosować w chirurgii narządu wzroku, w zespole Stevensa-Johnsona, w leczeniu ostrych oparzeń, zarówno termicznych, jak i alkalicznych, w pemfigoidzie ocznym bliznowaciejącym, przy operacji skrzydlika, w leczeniu ran skóry, w przewlekłych owrzodzeniach podudzi oraz w zabiegach chirurgicznych (zapobieganie zrostom) [6]. Błona owodni jest także stosowana w rekonstrukcji powierzchni oka w celu pobudzenia rozwoju prawidłowej rogówki i nabłonka bez stosowania immunosupresji. Wydaje się, że komórki owodni wydzielają odpowiednie czynniki wzrostowe promujące regenerację własnych KM rogówki pacjenta [18]. Błona owodni

może służyć też jako rusztowanie dla migracji komórek [6]. W badaniach na zwierzętach wykazano możliwość leczenia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (*graft versus host disease* – GVHD) w jej fazie ostrej [32].

Prawdopodobnie hAEC będą mogły być stosowane w terapii komórkowej w chorobach wątroby [1], a także w toksykologii, w odkrywaniu i ocenianiu metabolizmu nowych leków oraz badaniu ich pod kątem bezpieczeństwa, co zmniejszy liczbę zastosowanych zwierząt eksperymentalnych [6,18]. Uważa się, że hAEC mogą być wszczepiane do chorej wątroby, ponieważ posiadają wiele genów wątrobowych i mogą podjąć funkcje komórek tego narządu. Hepatocyty powstałe z hAEC cechują się ekspresją ponad 30 genów charakterystycznych dla wątroby, wśród których ekspresję wykazują geny dla: A1AT (α 1-antytrypsyna), CPS-1 i UGT1A1. Jest to bardzo ważne, ponieważ mutacje w tych genach najczęściej są odpowiedzialne za schorzenia wątroby, które są obecnie korygowane drogą transplantacji narządu. Zastosowanie hAEC powinno być korzystne w chorobach wątroby związanych z ubytkiem A1AT albo niezdolnością metabolizowania i wydalania amoniaku lub bilirubiny [1]. Populacja hAEC może być także przydatna w leczeniu wrodzonych chorób wątroby poprzez zastosowanie ich jako nośnika genów [25]. Pierwsze próby leczenia lizosomalnych chorób spichrzeniowych wypadły jednak niezadowolająco, a powstałe zmiany miały charakter przejściowy. Tym niemniej wykazano brak reakcji odrzucania oraz objawów rozwoju nowotworu [6].

Po usprawnieniu hodowli, hAEC mogą stać się także źródłem komórek serca i wątroby, co pozwoliłoby na realistyczną ocenę kardiotoxyczności i hepatotoxyczności, a także umożliwiłoby prześledzenie metabolizmu leków i ich wpływu zarówno na ekspresję genów, jak i regulację cytochromu P450 [18]. Przeprowadza się również badania nad zastosowaniem komórek z łożyska w takich schorzeniach, jak choroba Parkinsona, mukopolisacharydoza typu VII, udar niedokrwieny, urazy rdzenia kręgowego, choroba niedokrwienna i zawał mięśnia sercowego, kardiomiopatia rozstrzeniowa oraz cukrzyca typu 1 [1,2,28].

Komórki wyizolowane z łożyska mogą znaleźć szerokie zastosowanie w leczeniu ciężkich chorób. Wydaje się, że KM pobrane z tego narządu są optymalną populacją komórek dla medycyny regeneracyjnej, z racji braku problemów

natury etycznej, niskiej ekspresji antygenów ścią różnicowania się do komórek trzech list-
 zgodności tkankowej oraz posiadania zdolno- ków zarodkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Parolini O, Alviano F, Bagnara G.P. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 300–311.
2. Insausti C.L., Blanquer M., Bleda P. et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol. Histopathol.* 2010; 25: 91–98.
3. Miki T, Lehman T, Cai H. et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1549–1559.
4. Soncini M., Vertua E., Gibelli L. et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1: 296–305.
5. Machaliński B.: Nieembrionalne komórki macierzyste a regeneracja układu nerwowego. *Via Medica* 2008; 4: 15–19.
6. Miki T, Strom S.C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2006; 2: 133–142.
7. Miki T, Mitamura K, Ross M.A. et al. Identification of stem cell marker – positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J. Repr. Immun.* 2007; 75: 91–96.
8. Hwang J.H., Seok O.S., Song H.R. et al. HOXC10 as a Potential Marker for Discriminating between amnion- and decidua-derived mesenchymal stem cells. *Clon. Stem Cells.* 2009; 2: 269–279.
9. Miki T, Marongiu F., Ellis E. et al. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 2007; 1E.3.1–1E.3.8.
10. Portmann-Lanz C.B., Schoeberlein A., Huber A. et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006; 194: 664–673.
11. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis A.K. et al.: Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998; 282: 2072–2075.
12. Dominici M., Le Blanc K, Mueller I. et al. Minimal Criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317.
13. Alviano F., Fossati V., Marchionni C. et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev. Biol.* 2007; 7:11; doi: 10.1186/1471–213X-7-11.
14. Hakomori, S. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj. J.* 2004; 21: 125–137.
15. Hunt J.S., Petroff M.G., McIntire R.H. et al. GLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 2005; 19: 681–693.
16. Ilancheran S, Michalska A, Peh G. et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multi-lineage differentiation potential. *Biol. Reprod.* 2007; 77: 577–588.
17. Takashima S, Ise H, Zhao P. et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell. Struct. Funct.* 2004; 29: 73–84.
18. Matikainen T., Laine J. Placenta-an alternative source of stem cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; S544–S549.
19. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T. et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 171–176.
20. Kakishita K, Elwan M.A., Nakao N. et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp. Neurol.* 2000; 165: 27–34.
21. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M. et al. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci. Lett.* 1996; 209: 9–12.
22. Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N. et al. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* 2003; 980: 48–56.
23. Kong X.Y., Cai Z., Pan L. et al. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice. *Brain Res.* 2008; 1205: 108–115.
24. Liu T, Wu J, Huang Q. et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Shock* 2008; 29: 603–611.
25. Evangelista M., Soncini M., Parolini O. Placenta -derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 2008; 58: 33–42.
26. Zhao P., Ise H, Hongo M. et al. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005; 79: 528–535.
27. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F. et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 14243–14252.
28. Wei J.P., Zhang T.S., Kawa S. et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant.* 2003; 12: 545–552.
29. Steigman S.A., Fauza D.A. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Amniotic Fluid and Placenta. *Stem Cell Biol.* 2007; Chapter 1: Unit 1E.2. DOI: 10.1002/9780470151808.sc01e02s1.
30. Li H, Niederkorn J.Y., Neelam S. et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; 46: 900–907.
31. Changdong L, Weiyuan Z., Xiaoxia J. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cell. *Cell. Tissue Res.* 2007; 330: 437–446.
32. Dazzi F, Marelli -Berg F. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: Close encounters with T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38: 1479–1482.

