

Amnijska membrana v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini

Amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine

Mateja Erdani Kreft, Urška Dragin

Univerza v Ljubljani,
Medicinska fakulteta,
Inštitut za biologijo
celice, Lipičeva 2,
SI-1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Doc. dr. Mateja Erdani Kreft
Univerza v Ljubljani,
Medicinska fakulteta,
Inštitut za biologijo
celice,
Lipičeva 2, SI-1000
Ljubljana
Tel.: +386 1 543 76 93
Fax: +386 1 543 76 81
Email: mateja.erdani@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

amnijska membrana,
tkivno inženirstvo,
nosilec (podlaga),
amnijske matične celice,
regenerativna medicina

Key words:

amniotic membrane,
tissue engineering,
supporting matrix
(scaffold), amniotic
stem cells, regenerative
medicine

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010;
79: 707–15

Izvleček

Izhodišča: Tkivno inženirstvo postaja vse bolj pomembno področje regenerativne medicine, saj terapevtski izdelki tkivnega inženirstva ponujajo možnosti za učinkovito zdravljenje ali obnovo poškodovanih ali okvarjenih tkiv. Zaradi primarne naloge, da štiti razvijajoči se plod pred izsušitvijo in zagotavlja primerno okolje za razvoj ploda, ima amnijska membrana številne biološke in mehanske lastnosti, ki so za tkivno inženirstvo izrednega pomena.

Zaključki: Pričujoči prispevek opisuje lastnosti amnijske membrane, kot so nizka imunogenost, antimikrobno delovanje, pospeševanje epitelizacije in zaviranje brazgotinjenja tkiva, ter mehanske lastnosti, ki so za dober nosilec v tkivnem inženirstvu nujne. Amnijska membrana je tudi vir matičnih celic, ki so podobno kot embrionalne matične celice pluripotentne, a ne tumorogene. Prav te številne zelo zaželenne lastnosti dajejo amnijski membrani velike možnosti za uporabo v tkivnem inženirstvu in tudi regenerativni medicini.

Uvod

Amnijska membrana (amnion) je ekstraembrionalna (plodova) ovojnica, ki obdaja s plodovnico napolnjeno amnijsko votlino, v kateri plava plod. V evoluciji je ključno prispevala k razvoju kopenskih vretenčarjev – amniotov (plazilcev, ptičev in sesalcev),

Abstract

Background: Tissue engineering is becoming an increasingly important field of regenerative medicine as it develops the biological substitutes for the purpose of restoring, maintaining or improving tissue function. Since the primary function of amniotic membrane is to surround and protect an embryo, the amniotic membrane's biological and mechanical properties categorize it as an attractive biomaterial for tissue engineering.

Conclusions: We describe the properties of amniotic membrane, which has low immunogenicity, anti-microbial, anti-fibrotic, anti-scarring, as well as reasonable mechanical properties and epithelialization stimulating effects. The amniotic membrane is also a source of stem cells, which like the embryonic stem cells are pluripotent, but not tumorigenic. These various properties render the amniotic membrane a suitable source of cells or matrix for tissue engineering and regenerative medicine.

saj omogoča od vodnega okolja neodvisen razvoj. Njena osnovna naloga je zaščita ploda pred izsušitvijo ter zagotavljanje okolja, v katerem se le-ta lahko razvija brez čezmernih vplivov iz okolice.¹ Zgrajena je iz *epitela amnijske membrane*, ki meji na plod, debelejšje *bazalne lamine* in avaskularne strome iz *kompaktne, fibroblastne in gobaste*

Prispelo: 26. feb. 2010,
Sprejeto: 4. maj 2010

Uporabo amnijske membrane za raziskavo z naslovom »Gojenje urotelijskih celic na amnijski membrani ter izolacija in diferencijacija amnijskih matičnih celic v urotelijske celice« je odobrila Komisija za medicinsko etiko na seji 15. decembra 2009.

plasti (Slika 1). Enoskladen epitel amnijske membrane gradijo amnijske epitelne celice (AEC). Amnijska membrana ne vsebuje žil in živcev. Vse hranilne snovi ter kisik prehajajo z difuzijo iz amnijske tekočine oziroma iz spodaj ležečega endometrija (decidualne membrane). Bazalna lamina amnijske membrane je ena najdebelejših lamin v človeškem telesu in v času nosečnosti predstavlja oporo za plod. Avaskularna stroma, ki meji na bazalno lamino, se nadalje deli na kompaktno plast s številnimi vzporedno nameščenimi kolagenskimi vlakni (prevladujejo kolageni tipa I, III, V in VI), plast fibroblastov, v kateri fibroblasti kolagen sintetizirajo, ter gobasto plast. Slednja, ki je zaradi velike množine proteoglikanov in glikoproteinov gobastega izgleda, meji na horion, najbolj zunanjo plodovo ovojnico (Slika 1). Poveza med membranama je rahla, zato je ločitev amnijske membrane od spodaj ležečega horiona enostavna.²

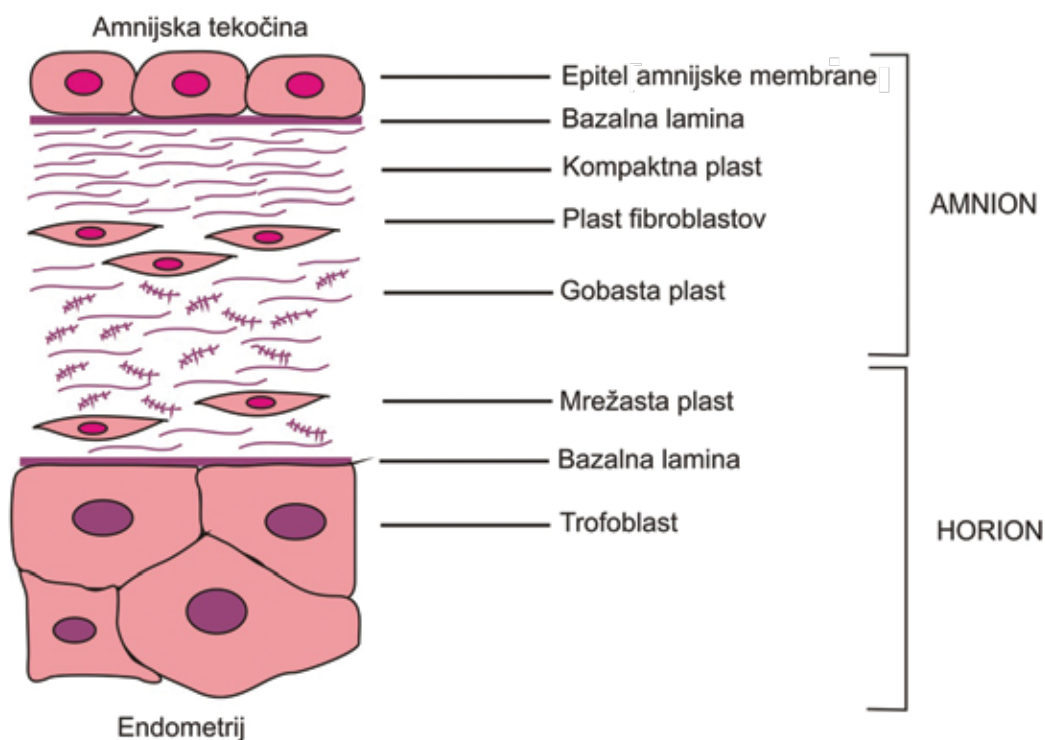
Tkivno inženirstvo je interdisciplinarno razvojno-raziskovalno področje, ki z namenom razvoja tkivnih ali organskih nadomestkov združuje različne naravoslovne vede. Tkivno inženirstvo postaja vse bolj pomembna oblika regenerativne medicine, saj terapevtski izdelki tkivnega inženirstva

ponujajo možnosti za učinkovito zdravljenje ali obnovo poškodovanih ali okvarjenih tkiv. Razvoj kompleksnih tridimenzionalnih struktur *in vitro*, ki jih lahko uporabimo za obnovo, vzdrževanje ali izboljšanje nekaterih funkcij tkiv ali organov, so omogočila predvsem najnovejša znanstvena spoznanja in dosežki v celični in molekularni biologiji, fiziologiji, imunologiji, biokemiji, kirurgiji in tehnologiji polimerov. Vodilo tkivnega inženirstva je zagotoviti rast in diferenciacijo tkivno specifičnih celic na različno oblikovanih nosilcih iz biološko skladnih (biokompatibilnih) in biološko razgradljivih (biodegradabilnih) materialov (Slika 2).

Lastnosti amnijske membrane

Amnijska membrana ima številne biološke lastnosti, ki so za tkivno inženirstvo izrednega pomena. Med drugim ima nizko imunogenost, zavira razvoj mikrobov, pospešuje epitelizacijo, preprečuje brazgotinjenje tkiva ter ima primerne mehanske lastnosti.²

Najpomembnejši dejavnik pri izbiri primerne nosilca za uporabo v tkivnem inženirstvu je biokompatibilnost s tem se izognemo morebitnim zavrnitvenim reakcijam.³ Pomembne so tudi mehanske lastnosti



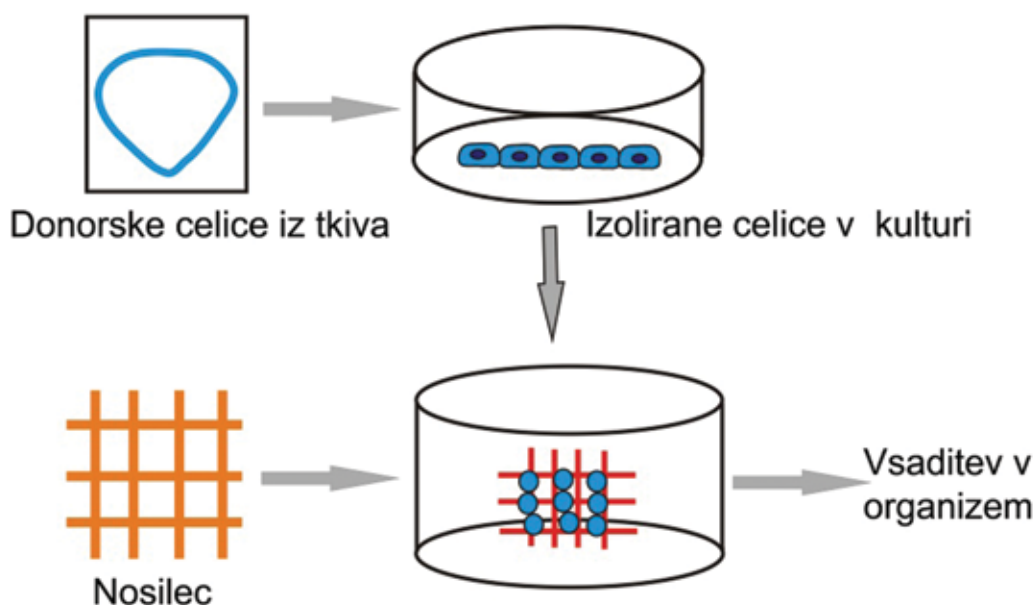
Slika 1: Shematski prikaz zgradbe dveh plodovih ovojnic, amniona in horiona.

nosilca – stabilnost, elastičnost, prepustnost in plastičnost⁴ ter lastnosti, ki omogočajo pritrditev celic ter sproščanje različnih rastnih faktorjev.⁵

Pritrditev celic na nosilec je v veliki meri odvisna od komponent zunajceličnega matriksa nosilca. Prisotnost ali odsotnost določenih molekul zunajceličnega matriksa, kot so kolagen, laminin in fibronektin, ima velik vpliv na pritrditev in rast matičnih celic.² Celice se na molekule zunajceličnega matriksa pritrdijo preko receptorskih molekul, integrinov. Zunajcelična domena teh transmembranskih receptorjev se povezuje z molekulami zunajceličnega matriksa, medtem ko je znotrajcelična domena povezana s citoskeletom, ki se nato povezuje z jedro ovojnice, membranami organelov ter z različnimi encimi. Integrini so pomembni tako pri samem pritrditvi celic kot pri prenosu signala v notranjost celice. Vplivajo na procese pomembne pri celičnem transportu, torej endocitozi in eksocitozi, ter na celično proliferacijo in diferenciacijo⁶. Zunajcelični matriks, ki ga izločajo AEC, oblikuje bazalno lamino. Le-ta vsebuje vse pomembne ligandne molekule, ki omogočajo povezavo z integrini, npr. kolagen tipa III in IV, ter laminin, fibronektin, entaktin, kar pomeni, da predstavlja *ugoden substrat za pritrditev in nadaljnjo delitev celic*.

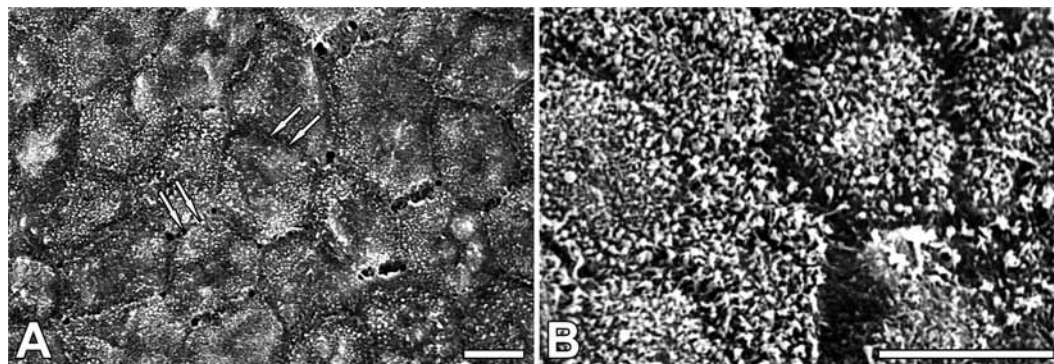
Pomembna značilnost amnijske membrane kot nosilca je, da *zavira vnetno reak-*

cijo ter brazgotinjenje tkiva. Amnijska membrana zavira delovanje transformirajočega rastnega faktorja beta (TGF- β). Ta normalno povzroči aktiviranje fibroblastov, kar nadalje vodi v fibrozo in nastanek brazgotine. Omenjeno delovanje amnijske membrane ne razloži le dejstva, da amnijska membrana kot nosilec uravnava celjenje poškodb ter obenem pospešuje rekonstrukcijo tkiva, ampak tudi zakaj se morebitne poškodbe zaradi med nosečnostjo zacelijo brez nastanka brazgotin.⁷ Največja ovira pri presaditvah tkiv ali organov je zavrnitvena reakcija, pri kateri imunski sistem prejemnika prepozna presadek kot tujek ter ga napade, kar vodi v vnetni odziv. V primeru rekonstrukcije tkiv s presaditvijo amnijske membrane pa do vnetja ne pride. Ugotovili so, da amnijska membrana na več načinov zavira vnetne reakcije. Tako na primer stroma amnijske membrane zavira izražanje potencialnih vnetnih proteinov, kot sta citokina interlevkin-1 α in interlevkin-1 β .⁸ Epitel amnijske membrane pa izraža različne protivnetne proteine, kot so npr. antagonist receptorja za interlevkin-1, inhibitorji metaloproteinaz – TIMP -1, -2, -3, -4 ter protivnetni citokin interlevkin-10.⁹ Pri zaviranju vnetne reakcije je ključno tudi delovanje hialuronske kisline, ki je v amnijski membrani prisotna v velikih količinah. Hialuronska kislina deluje kot ligand za določene receptorje, npr. receptorje CD44 na limfocitih ter tako igra pri rekon-



Slika 2: Shematski prikaz razvoja tkivnega nadomestka *in vitro*.

Slika 3: Amnijske epitelne celice (AEC), slikane z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri (A) manjši in (B) večji povečavi. Površina AEC je povečana z mikrovilom podobnimi izrastki. Puščice označujejo prekinjene tesne stike. Takšne prekinitve lahko povzročajo različni dejavniki, med drugim glukokortikoidi, ki se nahajajo v amnijski tekočini v pozni nosečnosti.²² Merilce 10 µm.



strukciji tkiv pomembno vlogo pri »lovljenju« celic imunskega sistema.¹⁰

Amnijska membrana *deluje* tudi *antimikrobno*. AEC namreč sintetizirajo in izločajo β 3-defenzin.¹¹ Ta spada med antimikrobne peptide, ki jih na svojih površinah navadno izražajo epitelne celice in levkociti ter je pomemben del prirojenega imunskega odziva.¹²

K spoznanju o *nizki imunogenosti* amnijske membrane so pomembno prispevale študije imunskih odzivov med nosečnostjo. Glede na to, da polovico genoma zigote sestavlja DNA očeta, ima zarodek semialogene antigene. To pomeni, da telo matere zarodek lahko prepozna kot tujek in ga izloči. Kljub temu v večini primerov pride do normalne vzpostavitve nosečnosti. Iz tega lahko sklepamo, da verjetno obstajajo mehanizmi, ki ščitijo zarodek pred imunskim odzivom materinega telesa. Ugotovili so, da je glavni dejavnik, ki preprečuje zavrnitev trofoblasta antigen HLA-G. Izražata ga trofoblast ter AEC, najdemo pa ga tudi v amnijski tekočini. Menijo, da antigen HLA-G s tem, da deluje kot ligand za inhibitorne receptorje na naravnih celicah ubijalkah in makrofagih, povzroča imunsko toleranco.¹³ K preprečevanju zavrnitve zarodka prispeva tudi dejstvo, da tako celice trofoblasta kot AEC ne izražajo polimorfnih antigenov HLA-A, -B, -C. Ti bi namreč, s tem ker antigene predstavljajo citotoksičnim limfocitom T, lahko izzvali specifični imunski odziv.¹³ Zaradi specifičnega delovanja antigena HLA-G ter odsotnosti antigenov HLA-A, -B, -C je v primeru zdravljenja s presaditvijo amnijske membrane kot nosilca možnost zavrnitve tkiva zaradi imunske reakcije manjša.²

Pri izbiri nosilca so pomembne tudi njegove mehanske lastnosti. Tako na primer

večja elastičnost nosilca poveča moč le-tega, kar je ključnega pomena pri premagovanju stresa, ki nastane zaradi rasti tkiva.¹⁴ Elastičnost ter druge biomehanske lastnosti zunajceličnega matriksa so odvisne od razmerja med kolageni, proteoglikani ter elastini.¹⁵ Za amnijsko membrano je značilna *velika elastičnost in posledično moč*, saj mora med nosečnostjo prenesti hidrostatski pritisk amnijske tekočine.¹⁶

Priprava in uporaba intaktne in gole amnijske membrane

Amnijska membrana se kot nosilec lahko uporablja z epitelom (intaktna amnijska membrana) ali brez epitela (gola amnijska membrana). Odločitev, ali uporabiti intaktno ali golo amnijsko membrano, je odvisna od različnih dejavnikov, med drugim tudi od tipa celic oziroma tkiva, ki ga želimo gojiti.² Tako je na primer prisotnost epitela amnijske membrane pomembna predvsem zaradi različnih rastnih faktorjev, ki jih te celice izločajo¹⁷ (Slika 3). Po drugi strani, pa so mnogi mnenja, da epitelne celice ovirajo enotno razprostiranje celičnih nadomestkov ter zmanjšajo možnost tvorbe hemidezmosomov, ki so pomembni za pritrditev celic na bazalno lamino.¹⁸

Za pripravljanje gole amnijske membrane se trenutno uporabljajo tri metode. Pri prvi se za rahljanje povezav med celicami epitela in bazalno lamino uporablja kelator dvovalentnih (kovinskih) ionov etilendiaminotetraacetna kislina (EDTA), pri drugi pa se uporablja encim dispaza, ki razgradi sestavine bazalne lamine, ki se povezujejo s celicami epitela. Po obeh postopkih je nato potrebno še mehansko odstranjevanje (strganje) epitelnih celic.¹⁹ V raziskavi,

kjer so primerjali različne tehnike razgaljanja amnijske membrane, so ugotovili, da nobena od dveh tehnik ni optimalna, saj v obeh primerih pride do poškodb bazalne lamine.¹⁹ Dispaza sicer učinkovito odstrani epitelne celice, vendar s specifičnim delovanjem na proteine bazalne lamine kot so laminin, kolagen IV in fibronektin, poruši integriteto amnijske membrane²⁰ in jo tako naredi manj primerno za nadaljnjo uporabo. Uporaba EDTA pa naj bi bila v preveliki meri odvisna od kasnejšega mehanskega strganja celic epitela.¹⁹ Ker sta se obe tehniki, predvsem zaradi kasnejšega strganja, za katerega se je izkazalo, da najbolj poškoduje površino bazalne lamine, izkazali za neprimerni, so raziskovalci ponudili tretjo, primernejšo metodo – uporabo encima termolizina. Ta, brez potrebe po kasnejšem strganju, učinkovito odstrani AEC in ob tem ohranja integriteto bazalne lamine. Sklepajo, da termolizin v primerjavi z dispazo deluje bolj specifično, zaradi česar so poškodbe amnijske membrane manjše.²¹

Pridobivanje in shranjevanje amnijske membrane

Amnijsko membrano odvezamemo v sterilnih razmerah pri načrtovanih porodih s carskim rezom. Posteljico takoj po carskem rezu izpiramo s sterilno pripravljeno fiziološko raztopino z dodanimi antibiotiki in antitumotiki, nato pa notranjo amnijsko plast ločimo od horiona.²³ V primeru, da bi radi uporabili le epitelne celice amnijske membrane AEC, jih osamimo po eni od opisanih metod razgaljanja amnijske membrane.

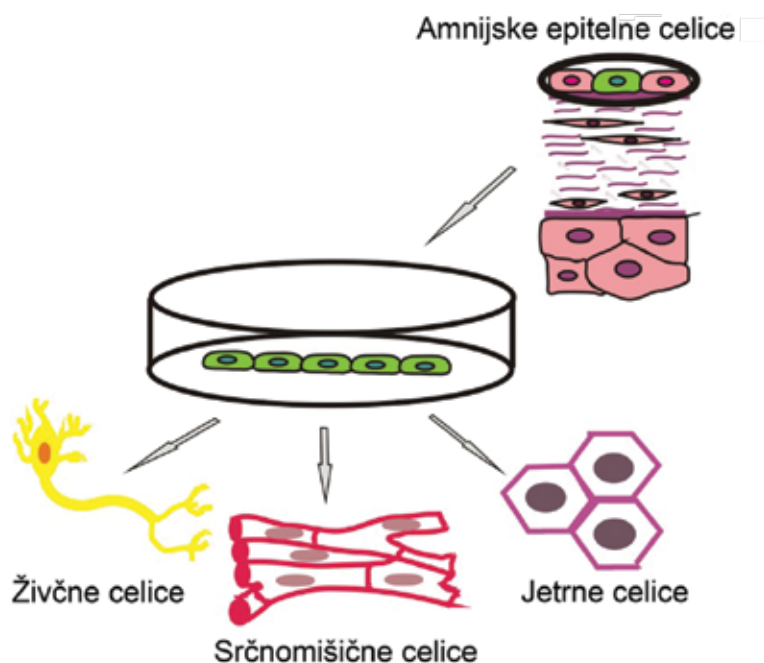
Čeprav je v uporabi tudi sveža amnijska membrana, je za zagotovitev primerne kakovosti in ohranjenosti membrane priporočljiva posebna obdelava in sterilizacija le-te. Za ohranjanje in shranjevanje amnijske membrane je v uporabi več različnih metod, kot so na primer hipotermično shranjevanje pri 4 °C ali pri –80 °C, suho zamrzovanje in γ -sterilizacija.² Določenih postopkov shranjevanja, kot je na primer shranjevanje s pomočjo glicerola pri 4 °C, celice amnijske membrane ne preživijo.²⁴ Viabilnost celic amnijske membrane je odvisna tako od sestave medija kot tudi od temperature, pri

kateri je membrana shranjena.²⁵ Raziskave so pokazale, da se viabilnost celic amnijske membrane med shranjevanjem manjša.²⁴

Splošno mnenje je, da so AEC v amnijski membrani shranjeni pri –80 °C, v primerjavi z AEC v amnijski membrani takoj po porodu manj imunogene, zato se veliko raziskovalcev poslužuje tako shranjene amnijske membrane. Po drugi strani pa pri takem načinu shranjevanja po dveh mesecih preživi le nekaj več kot 50 % celic.²⁶ Da bi se izognili takšnim problemom, so razvili nov način shranjevanja. S pomočjo dolgovolvnih infrardečih valov ter mikrovalov so pripravili suho amnijsko membrano. V primerjavi z amnijskimi membranami, ki so na temperaturi –80 °C lahko shranjene nekaj manj kot 3 mesece, lahko suho amnijsko membrano neomejeno dolgo hranimo kar na sobni temperaturi.¹

Amnijska membrana kot nosilec za rast in diferenciacijo urotelijskih celic

Urotelij je epitel, ki prekriva večino spodnjega dela sečil, to je proksimalno sečnico, sečni mehur, sečevod in ledvični mehur.²⁷ Urotelijske celice že več let tudi uspešno gojijo v razmerah *in vitro*, kjer lahko celice dosežejo visoko stopnjo diferenciacije.^{28–32} V primeru različnih poškodb ali prirojenih anomalij sečnega mehurja je za rekonstrukcijo sečnega mehurja potrebno dodatno tkivo. Ponavadi se v takem primeru uporablja segment črevesne stene (enterocistoplastika) oziroma različni sintetični materiali.³³ V zadnjih letih se je kot primeren matriks za rast in proliferacijo urotelijskih celic začel uporabljati kolagen,³⁴ vedno bolj obetavna pa postaja tudi uporaba amnijske membrane. Sharifiaghadas s sod.³⁵ je v raziskavi primerjal rast urotelijskih celic na brezceličnem kolagenskem matriksu z rastjo celic na amnijski membrani in peritoneju. Ugotovil je, da je proliferacija celic, gojenih na kolagenskem matriksu, intenzivna in da celice že v 3. dnevu dosežejo plato. Nato se začne vakuolizacija, ki ji sledi apoptoza. V nasprotju s kolagenom je bila proliferacija celic na peritoneju v prvih treh dneh precej manjša,



Slika 4: Med amnijskimi epitelnimi celicami so matične celice (obarvane zeleno), ki so pluripotentne. Amnijske matične celice se lahko razvijejo v celice vseh treh zarodnih plasti.

na amnijski membrani pa le malo slabša. Samo na amnijski membrani so urotelijske celice razvile nekatere lastnosti normalnega urotelija, tudi apoptoza se je pojavila šele po 14 dneh gojenja. Epitel je bil dvoskladen, z dezmosomi med sosednjimi celicami ter hemidezmosomi med celicami in bazalno lamino. Da gre za urotelij, so potrdile histološke in imunohistokemične raziskave. Uspešna vzpostavitev in rast kulture urotelijskih celic na amnijski membrani kaže na možnost klinične uporabe s tkivnim inženirstvom vzgojenega urotelija v regenerativni medicini sečnega mehurja, sečevodov in proksimalne sečnice.

Klinična uporaba amnijske membrane

Zaradi mnogih zaželenih lastnosti, kot so pospeševanje epitelizacije, zaviranje vnetnih reakcij in brazgotinjenja ter inhibicije angiogeneze se amnijska membrana vedno pogosteje uporablja tudi v klinične namene, predvsem pri rekonstrukciji očesne površine, ustne sluznice ter kože.^{1,23,36-38}

Najpogostejša je uporaba amnijske membrane za rekonstrukcijo očesne površine. Amnijsko membrano v tem primeru lahko uporabimo kot presadek (tehnika „inlay“)^{37,38} ali kot terapevtsko kontaktno lečo (tehnika „overlay“).³⁷ Če amnijsko mem-

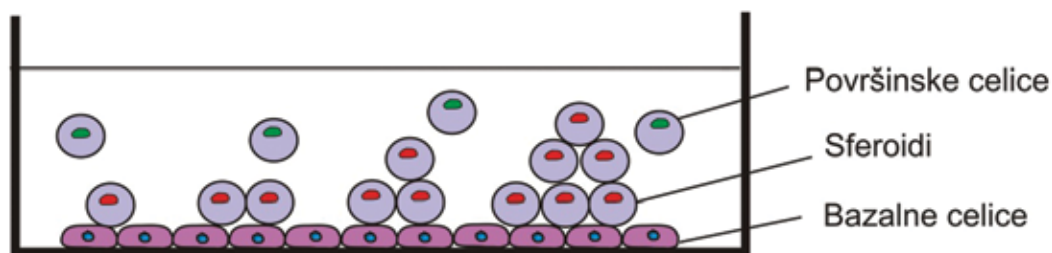
brano uporabimo kot presadek, je velikost membrane le nekoliko večja od velikosti spremembe, ki jo želimo prekriti. Membrano obrnemo z epitelno stranjo navzgor – tako ima funkcijo bazalne lamine, po kateri se lahko razraščajo epitelne celice.²³ Pri globokih ulkusih roženice, ki segajo tudi v stromo roženice, lahko uporabimo več plasti amnijske membrane, s katerimi lahko zapolnimo poškodbo roženice ne glede na usmerjenost notranjih plasti amnijske membrane. Na koncu vrzel prekrijemo z amnijsko membrano, obrnjeno z epitelno plastjo navzgor.³⁷ V primeru, da amnijsko membrano uporabimo kot terapevtsko kontaktno lečo, pa z amnijsko membrano pokrijemo celotno sprednjo površino očesa skupaj z roženico, limbusom (stikom med roženico in beločnico) in veznico ob limbusu. V tem primeru je usmerjenost amnijske membrane manj pomembna.²³ Amnijska membrana se lahko uporablja tudi kot nosilec, ki pomaga pri razširjanju in diferenciaciji epitelnih celic roženice *in vitro*. Po 3–4 tednih, ko se celice v kulturi dovolj namnožijo, jih skupaj z amnijsko membrano prenesejo na očesno površino, kjer pride do vzpostavitve normalnega epitela roženice.³⁷ Amnijsko membrano že od leta 2000 v očesni kirurgiji uspešno uporabljajo tudi na Očesni kliniki v Ljubljani.

Epitel amnijske membrane je vir pluripotentnih matičnih celic

Amnijske epitelne celice so možni vir matičnih celic za uporabo v tkivnem inženirstvu. Nedavne študije so pokazale, da nekatere AEC izražajo podobne površinske označevalce kot matične celice ter so prav tako kot embrionalne matične celice pluripotentne.^{39,40} To pomeni, da se iz njih lahko razvijejo celice vseh treh zarodnih plasti. Iz amnijskih matičnih celic so tako *in vitro* že uspeli razviti ektodermalne živčne celice, mezodermalne srčnomišične celice ter endodermalne celice jeter in trebušne slinavke (Slika 4).

Poleg tega so amnijske matične celice klonogene, torej lahko tvorijo kolonijo klonov, ki imajo enake lastnosti kot izvorna ce-

Slika 5: Epitelne celice amnijske membrane v primarni celični kulturi oblikujejo tri populacije celic: bazalne, vmesne (sferoidi) in površinske celice.



lica, ter ob transplantaciji ne tvorijo teratomov.⁴⁰ Miki in sodelavci³⁹ predvidevajo, da amnijske matične celice niso tumorogene zato, ker za razliko od embrionalnih matičnih celic ne izražajo telomeraze.

V primerjavi z embrionalnimi matičnimi celicami je pridobivanje amnijskih matičnih celic razmeroma nezahtevno. V razmerah *in vitro* AEC oblikujejo tri populacije celic: 1. bazalne celice, ki se pritrjajo na podlago; 2. vmesne celice, ki tvorijo hiperplastične skupke celic (t.i. sferoide); ter 3. površinske celice, ki so prosto v mediju (Slika 5).

Predvideva se, da bazalne AEC služijo kot substrat za pritrnitev ter po vsej verjetnosti z izločanjem različnih faktorjev pomagajo pri indukciji oziroma vzdrževanju nediferenciranih vmesnih AEC v sferoidih. Z imunoznačevanjem so prav v celicah, ki tvorijo sferoide, dokazali prisotnost označevalcev matičnih celic. Na plazmalemi amnijskih matičnih celic so dokazali prisotnost SSEA-3 in SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen), specifičnih ogljikohidratnih antigenov na glikolipidih in glikoproteinih. Prisotna sta bila tudi TRA 1–60 in TRA 1–81 (Trafalgar) ogljikohidratna antigena na proteoglikanih. V amnijskih matičnih celicah sta bila izražena transkripcijska dejavnika Oct-4 in nanog, ki sta nujna za samoobnovo in pluripotentnost.³⁹

Amnijske matične celice imajo pomembne prednosti v primerjavi z embrionalnimi in odraslimi matičnimi celicami (Tabela 1).

Med drugim je bilo ugotovljeno, da je v sklopu ene amnijske membrane več kot 100 milijonov AEC.³⁹ Torej bi bilo v primeru uporabe amnijske membrane za tkivno inženirstvo potencialnih matičnih celic več kot dovolj. Poleg tega je pridobivanje in uporaba amnijskih matičnih celic etično sprejemljivejša od pridobivanja in uporabe embrionalnih matičnih celic.

Zaključki

V prispevku smo opisali številne lastnosti amnijske membrane, zaradi katerih je primerna za uporabo v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini. Poleg tega, da je amnijska membrana primerna kot nosilec, vsebuje tudi matične celice, ki so pluripotentne, imajo visok proliferacijski potencial, a so za razliko od embrionalnih matičnih celic netumorogene. Amnijska membrana je torej pomemben vir matičnih celic, ki jim pri zdravljenju različnih bolezni pripisujejo vse večji pomen. Zelo obetajočo uporabo amnijske membrane pri zdravljenju poškodovanih in prizadetih tkiv bo omogočilo predvsem skupno delo strokovnjakov različnih strok, tako medicinskih kot bioloških, kemijskih in inženirskih.

Tabela 1: Primerjava amnijskih matičnih celic z embrionalnimi in odraslimi matičnimi celicami.

	Embrionalne matične celice	Odrasle matične celice	Amnijske matične celice
Proliferacijski potencial	visok	nizek	visok
Zavrnitvena reakcija	da	ne	ne
Tumorska transformacija	verjetna	manj verjetna	ni prisotna

Zahvala

Avtorici se zahvaljujeva prof. dr. Kristijan Jezerniku za vso pomoč in nasvete pri pisanju članka.

Literatura

1. Toda A, Motonori O, Yoshida T, Nikaido T. The potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J Pharmacol Sci* 2007; 195: 215–28.
2. Niknejad H, Habibollah P, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008; 15: 88–99.
3. Young MJ, Borrás T, Walter M, Ritch R. Tissue bioengineering: potential applications to glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 1725–31.
4. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001; 7: 679–89.
5. Walgenbach KJ, Voigt M, Raibikhin AW, Andree C, Schaefer DJ, Galla TJ, idr. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec* 2001; 263: 372–8.
6. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 372–86.
7. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999; 179: 325–35.
8. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 444–9.
9. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19: 348–52.
10. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005; 24: 206–12.
11. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenne J, Bocking A, Challis J. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28: 161–9.
12. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998; 66: 4222–8.
13. Sargent IL. Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp Clin Immunogenet* 1993; 10: 85–102.
14. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001; 22: 2581–93.
15. Kiviranta P, Rieppo J, Korhonen RK, Julkunen P, Töyräs J, Jurvelin JS. Collagen network primarily controls Poissons ratio of bovine articular cartilage in compression. *J Orthop Res* 2006; 24: 690–9.
16. Bitar RE, Yamasaki AA, Sasaki S, Zugaib M. Cervical fetal fibronectin in patients at increased risk for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 178–81.
17. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20: 173–7.
18. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan VS. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Bank* 2004; 5: 161–75.
19. Hopkinson A, Vijay A, Gray T, Jeung AM, Lowe J, James DK, idr. Optimization of amniotic membrane denuding for tissue engineering. *Tissue Eng* 2008; 14: 371–81.
20. Spurr SJ, Gipson IK. Isolation of corneal epithelium with dispase II or EDTA. Effects on basement membrane zone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 818–27.
21. Germain L, Guignard R, Rouabhia M, Auger FA. Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or dispase. *Burns* 1995; 21: 175–80.
22. Kobayashi K, Kadohira I, Tanaka M, Yoshimura Y, Ikeda K, Yasui M. Expression and distribution of tight junction proteins in human amnion during late pregnancy. *Placenta* 2010; 31: 158–62.
23. Mikek K, Pfifer V, Drnovšek-Olup B. Uporaba amnijske membrane v očesni kirurgiji. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 419–22.
24. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 2007; 8: 1–8.
25. Branski RE, Kulp G, Jeschke MG, Norbury W, Herndon D. Amniotic membrane as wound coverage: the effects of irradiation and different processing methods on growth factor content. *J Surg Res* 2007; 137: 339.
26. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1539–46.
27. Romih R, Korosec P, de Mello W Jr, Jezernik K. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res* 2005; 320: 259–68.
28. Sterle M, Kreft ME, Batista U. The effect of epidermal growth factor and transforming growth factor beta 1 on proliferation and differentiation of urothelial cells in urinary bladder explant culture. *Biol Cell* 1997; 89: 263–71.
29. Kreft ME, Romih R, Sterle M. Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Cell Biol Int* 2002; 26: 63–74.
30. Kreft ME, Hudoklin S, Sterle M. Establishment and characterization of primary and subsequent subcultures of normal mouse urothelial cells. *Folia Biol (Praha)* 2005; 51: 126–32.
31. Kreft ME, Sterle M, Veranic P, Jezernik K. Urothelial injuries and the early wound healing response:

- tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochem Cell Biol* 2005; 123: 529–39.
32. Kreft ME, Romih R, Kreft M, Jezernik K. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation* 2009; 77: 48–59.
33. Atala A. Tissue engineering in urologic surgery. *Urol Clin North Am* 1998; 25: 39–50.
34. Falke G, Caffaratti J, Atala A. Tissue engineering of the bladder. *World J Urol* 2000; 18: 36–43.
35. Sharifiaghdas F, Hamzehiesfahani N, Moghadasali R, Ghaemimanesh F, Baharvant H. Human amniotic membrane as a suitable matrix for growth of mouse urothelial cells in comparison with human peritoneal and omentum membranes. *Urol J* 2007; 4: 71–8.
36. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303–12.
37. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, Sadeq N, Romero TR, Samson CM, idr. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 659–63.
38. Tseng SC. Amniotic membrane transplantation of ocular surface reconstruction. *Biosci Rep* 2001; 21: 481–9.
39. Miki T, Lehmann T, Chi H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1549–59.
40. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007; 77: 577–88.