

Arkadiusz Gawryluk¹, Bartłomiej Noszczyk²

Właściwości i kliniczne możliwości zastosowania ludzkich komórek nabłonka owodni (HAEC)

Properties and clinical application of human amniotic epithelial cells (HAEC)

Свойства и клинические возможности применения эпителиальных клеток амниотической оболочки человека (HAEC)

¹ Klinika Ginekologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, Polska

² Zakład Chirurgii Plastycznej Endoskopowej, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny im. prof. W. Orłowskiego Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Polska
Adres do korespondencji: Arkadiusz Gawryluk, Klinika Ginekologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. W.K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa, e-mail: arkadiuszgawryluk@interia.pl

¹ Department of Gynecologic Oncology, Maria Skłodowska-Curie Institute of Oncology in Warsaw, Poland

² Department of Endoscopic Plastic Surgery, Prof. W. Orłowski Independent Teaching Hospital, Medical Centre for Postgraduate Education, Warsaw, Poland

Correspondence: Arkadiusz Gawryluk, Department of Gynecologic Oncology, Maria Skłodowska-Curie Institute of Oncology in Warsaw, W.K. Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland, e-mail: arkadiuszgawryluk@interia.pl

Streszczenie

Współczesna medycyna coraz większe nadzieje pokłada w niezróżnicowanych komórkach progenitorowych różnego pochodzenia i o różnym stopniu plastyczności. Ich najbardziej zasobnym, odnawialnym i niekontrowersyjnym źródłem wydają się tkanki łożyska i krew pępowinowa. Jedynie w tej grupie komórki nabłonkowe pochodzą z owodni, wykorzystywane często w całości jako allogeniczny opatrunek biologiczny. Mają one szereg niezwykłych cech, takich jak względny brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej, plastyczność (umożliwiająca różnicowanie w cały szereg komórek nabłonkowych i mezenchymalnych) oraz brak zdolności do nowotworzenia. Komórki nabłonka owodni są jedynymi nabłonkowymi komórkami łożyska. Uważa się, że nawet w donoszonej ciąży zachowują właściwości progenitorowe (pluripotencjalne). Wynika to prawdopodobnie z faktu, iż pomijają różnicowanie towarzyszące gastrulacji. Cechy te przejawiają zresztą wszystkie komórki łożyska, różniące się od komórek nabłonka owodni jedynie nienabłonkowym pochodzeniem. W hodowli komórki nabłonka owodni charakteryzują się dużą plastycznością: ulegają stymulacji do różnicowania w kierunku adypocytów, chondrocytów, osteocytów, miocytów, kardiomiocytów, neurocytów, komórek trzustki i hepatocytów. Dotychczas nie udało się jednak skierować ich rozwoju w kierunku naskórka. Uzyskanie nabłonka wielowarstwowego w hodowli komórek nabłonka owodni miałyby ogromne znaczenie dla inżynierii tkankowej opatrunków biologicznych. Błony owodniowe wykorzystywane są w tym celu od wielu lat, jednak wskutek złożonej struktury i wymagań metabolicznych nie ulegają wżganiu – wysychają po położeniu na powierzchni rany. Niektóre badania wskazują natomiast, że nabłonek izolowany z owodni mógłby się wżgać, nadawałby się zatem do allogenicznych przeszczepów.

Słowa kluczowe: komórki nabłonka owodni, owodnia, inżynieria tkankowa, hodowle komórkowe, opatrunki biologiczne

Abstract

In the contemporary medicine, undifferentiated progenitor cells of various origin and various degree of plasticity have become highly promising. Their most abundant, renewable and uncontroversial sources are placental tissues and umbilical blood. The only epithelial cells in this group come from the amnion which is used as a whole as an allogenic biological dressing. They have a range of unusual properties, such as the relative lack of histocompatibility antigens, plasticity (enabling their differentiation into a number of epithelial and mesenchymal cells) and the lack of neoplastic capacity. Amniotic epithelial cells are the only epithelial cells of the placenta. It is believed that they retain their progenitor (pluripotent) properties even in term pregnancies. This probably results from the fact that they omit the differentiation that accompanies gastrulation. Such features are typical of all placental cells which differ from amniotic epithelial cells

only in their non-epithelial origin. In culture conditions, amniotic epithelial cells are characterized by a considerable plasticity: they can be stimulated to differentiate into adipocytes, chondrocytes, osteocytes, myocytes, cardiomyocytes, neurocytes, pancreatic cells and hepatocytes. To date, however, the attempts to direct their development towards the epidermis have not been successful. Obtaining multilayer epidermis in amniotic epithelial culture would be of considerable importance for tissue engineering of biological dressings. Amniotic membranes have been used for this purpose for many years, but because of their complex structure and metabolic requirements, they do not heal but dry up when applied to the wound. Some reports, however, indicate that the epithelium isolated from the amnion could be able to heal thus being suitable for allogenic grafts.

Key words: amniotic epithelial cells, amniotic membrane, tissue engineering, cell culture, biological dressing

Содержание

Современная медицина все большие надежды возлагает на неделимые клетки-предшественники различного происхождения и уровня пластичности. Их наиболее распространенным, возобновляемым и непротиворечивым источником являются ткани плаценты и пуповинная кровь. Единственные из этой группы эпителиальные клетки происходят из амниона, часто используемого в качестве аллогенной биологической перевязки. Они имеют ряд необычных черт, таких как относительное отсутствие экспрессии антигенов гистосовместимости, пластичность (позволяющая разделение на целый ряд эпителиальных и мезенхимальных клеток) и отсутствие способности к канцерогенезу. Эпителиальные клетки амниона являются единственными эпителиальными клетками плаценты. Считается, что даже в доношенной беременности они сохраняют свойства клеток-предшественников (плюрипотентных). Это, по всей вероятности, следует из того факта, что связано с тем, что опускают деление, сопровождающую гастрюляцию. Эти черты демонстрируют все клетки плаценты, отличающиеся от эпителиальных клеток амниона только не эпителиальным происхождением. В выращивании эпителиальных клеток амниона характеризуются высокой пластичностью: подвергаются стимуляции разделения в направлении адипоцитов, хондроцитов, остеоцитов, миоцитов, кардиомиоцитов, невроцитов, клеток поджелудочной железы и гепатоцитов. До этого времени не удалось направить их развития в сторону эпидермиса. Получение многослойного эпителия в выращивании эпителиальных клеток амниона будут иметь большое значение для тканевой инженерии биологических перевязок. Амниотические мембраны используются с этой целью уже многие годы, однако в следствии сложной структуры и метаболических требований не приживаются – высыхают после положения на поверхности раны. Некоторые исследования все же показывают, что эпителий, полученный из амниона мог бы приживаться, следовательно, подходил бы для аллотрансплантатов.

Ключевые слова: эпителиальные клетки амниона, амнион, тканевая инженерия, выращивание клеток, биологические перевязки

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI BŁONY OWODNIOWEJ

Owodnia to cienka (0,02–0,5 mm) i przezroczysta błona, zbudowana z kilku warstw. Najbardziej wewnętrzną warstwą w stosunku do jamy owodni jest jednowarstwowy nabłonek, sześcienny bądź cylindryczny, pokrywający grubą błonę podstawną. Poniżej znajduje się tkanka łączna, która składa się z warstw: zbitej, fibroblastów oraz gąbczastej (ryc. 1). We wczesnej fazie rozwoju zawiera ona bardzo cienkie włókna srebrochłonne, zastępowane kilkoma typami kolagenu produkowanego przez fibroblasty. Błona podstawna owodni jest jedną z najgrubszych błon znalezionych w ludzkiej tkance. Histochemicznie bardzo przypomina spojówkę. Dzięki swojej integralności, elastyczności i przezroczystości może mieć szerokie spektrum zastosowań, m.in. jako materiał dla zewnętrznej rekonstrukcji gałki ocznej. Jest idealnym substratem wspierającym wzrost komórek progenitorowych nabłonka poprzez przedłużanie ich życia i zapobieganie apoptozie⁽¹⁾. Błona owodniowa produkuje transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*, TGF), mogący pobudzać

STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE AMNION

The amnion is a thin (0.02–0.5 mm) and transparent membrane that consists of several layers. The innermost layer in relation to the amniotic cavity is single-layer cuboidal or cylindrical epithelium that covers a thick basement membrane. Below, there is the connective tissue that consists of several layers: compact, fibroblast and spongy (Fig. 1). At the early stage of development, it contains very thin argyrophilic fibers which are replaced by several types of collagen produced by fibroblasts. The basement layer of the amnion is one of the thickest membranes found in human tissues. It bears a histochemical resemblance to the conjunctiva. Thanks to its integrity, flexibility and transparency, it can be broadly used e.g. as a material for outer ocular surface restoration. It is an ideal substrate for progenitor epithelial cell culture by prolonging their lifespan and preventing apoptosis⁽¹⁾. The amnion produces transforming growth factor (TGF) that is able to promote epithelialization as well as modulate fibroblast proliferation and differentiation⁽²⁾. It does not demonstrate histocompatibility

epitelializację, modulować rozmnażanie i różnicowanie fibroblastów⁽²⁾. Nie wykazuje ekspresji antygenów zgodności tkankowej, co pozwala na jej przeszczepianie bez dodatkowego stosowania immunosupresji i ryzyka odrzucenia. Dzięki działaniu przeciwzapalnemu błona stymuluje procesy reepitelializacji i reinerwacji⁽³⁾. Poza tym z łatwością się przyjmuje – tworzy nową błonę powierzchniową chroniącą tkanki, które pokrywa. Redukuje proliferację fibroblastów i bliznowacenie oraz stymuluje apoptozę komórek zapalnych. Ma silne właściwości antybakteryjne, co przekłada się na niskie ryzyko powikłań pooperacyjnych⁽⁴⁾. Bardzo ważnymi cechami błony owodniowej są łatwa dostępność i prawie nieograniczone możliwości jej uzyskania.

PRÓBY KLINICZNEGO WYKORZYSTANIA OWODNI

Do pierwszego odnotowanego zastosowania błony owodniowej w medycynie doszło już w 1910 roku, kiedy to Davis użył błon płodowych w leczeniu oparzeń termicznych⁽⁵⁾. W 1913 roku Sabella wykorzystał błonę w leczeniu oparzeń i owrzodzeń skóry. Zaobserwował m.in. brak zakażeń, zmniejszenie bólu i wzrost tempa reepitelializacji uszkodzonych powierzchni skóry⁽⁶⁾.

Podjęto również szereg prób wykorzystania owodni przy rekonstrukcji jamy ustnej i pęcherza moczowego czy wytwarzaniu sztucznej pochwy oraz w różnorodnych zabiegach operacyjnych w obrębie głowy, szyi i jamy brzusznej.

W 1940 roku de Rötth jako pierwszy przedstawił pracę, w której opisał zastosowanie błony owodniowej wraz z kosmówką w leczeniu zrostów spojówki powiekowej i gałkowej⁽⁷⁾. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań – potwierdziły one użyteczność owodni w leczeniu schorzeń okulistycznych i ujawniły jej wyjątkowe właściwości. Jednym z nowszych i bardziej interesujących doniesień w okulistyce było wykorzystanie owodni jako nośnika pozbawionego komórek do hodowli rąbkowych komórek macierzystych. Wiadomo, iż nabłonek regeneruje się z progenitorowych komórek macierzystych umiejscowionych

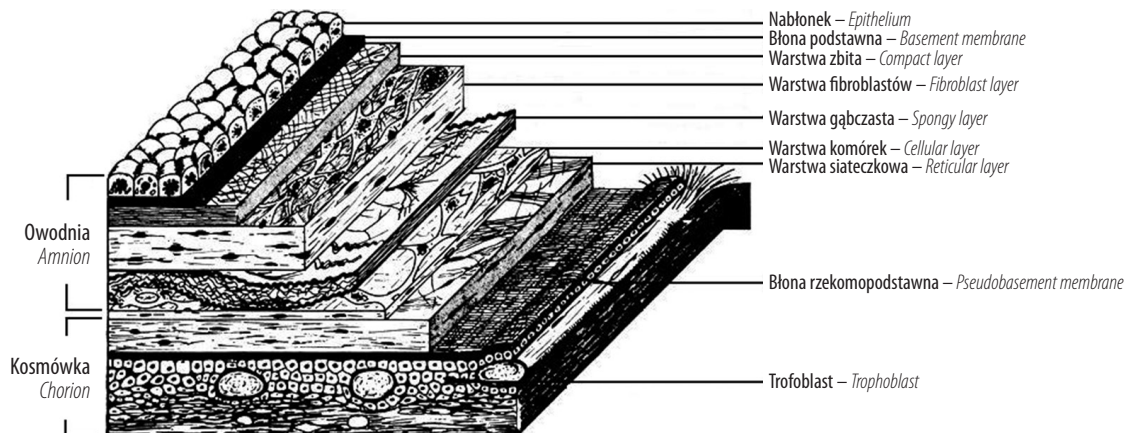
antigen expression thereby being suitable for grafting with no additional use of immunosuppression and without a risk of rejection. Owing to its anti-inflammatory properties, the membrane promotes re-epithelialization and re-innervation processes⁽³⁾. Moreover, it is accepted easily – it forms a new surface layer protecting tissues underneath. It reduces fibroblast proliferation and scar formation, and stimulates inflammatory cell apoptosis. It exhibits potent antibacterial properties, which translates to a low risk of postoperative complications⁽⁴⁾. The availability and nearly unrestricted possibilities of obtaining the amniotic membrane are ones of its important features.

CLINICAL APPLICATIONS OF THE AMNION

The amniotic membrane was used in medicine for the first time in 1910 by Davis who treated thermal burns⁽⁵⁾. In 1913, Sabella used the membrane for treating skin burns and ulcerations. He observed no infections, pain reduction and faster epithelialization of damaged skin surfaces⁽⁶⁾.

Moreover, it was also attempted to use the amnion for the reconstruction of the oral cavity and urinary bladder or for producing an artificial vagina as well as in a range of surgical procedures within the head, neck and abdomen.

In 1940, de Rötth was the first to publish a paper that described the usage of the amnion and chorion in treating adhesions between the bulbar and palpebral conjunctiva⁽⁷⁾. Since then, numerous studies have been conducted which have confirmed the usefulness of the amnion in treating ocular diseases and revealed its exceptional properties. One of the latest and more interesting reports in the field of ophthalmology concerns the use of the amnion as a cell-free carrier for limbal stem cell culture. It is known for a fact that the epithelium regenerates from progenitor stem cells located near the corneal limbus. They are a source of migrating and differentiating daughter cells. Schwab *et al.* have used this method to perform limbal cell transplantation in 18 patients with ocular surface defects;



Ryc. 1. Schemat dojrzałej, wielowarstwowej błony owodniowo-kosmówkowej
Fig. 1. Mature multilayer amniochorionic membrane

w pobliżu rąbka (rogówka), od których migrują i różnicują się nowe komórki potomne. Schwab i wsp. przy użyciu tej metody przeprowadzili przeszczep komórek rąbkowych u 18 pacjentów z powierzchownym uszkodzeniem gałki ocznej – 75% z nich wyleczono bez żadnych powikłań⁽⁸⁾. Inna grupa badaczy w testach preklinicznych wykorzystwała komórki macierzyste z jednego oka, namnażając je w laboratorium na specjalnym podłożu (mikroczipie), a następnie na błonie owodniowej pozbawionej komórek. W efekcie została ona porośnięta warstwą komórek macierzystych. Drugim ważnym etapem było kliniczne sprawdzenie funkcjonalności tak uzyskanych komórek macierzystych na królikach z uszkodzoną rogówką. Dzięki autologicznemu przeszczepowi około 60% królików skutecznie wyleczono. Ponadto w okulistyce błonę owodniową stosowano m.in. w leczeniu oparzeń chemicznych, bliznowaciejącego zapalenia spojówek, wrzodów rogówki, pemfigoidu pęcherzowego, zespołu Stevensona–Johnsona, skrzydlika i ciężkich zespołów suchego oka⁽⁹⁾.

Nowe możliwości regeneracji chorych lub uszkodzonych tkanek dostępne dzięki metodom inżynierii tkankowej (*tissue engineering*, TE) sprawiają, iż błona owodniowa znajduje coraz więcej zastosowań w medycynie. Do rekonstrukcji uszkodzonych tkanek i narządów służy zazwyczaj metoda polegająca na namnożeniu wyizolowanych komórek z tkanki biorcy w warunkach *in vitro* (np. keratynocytów), a następnie – wysianiu ich na rusztowania (skafoldy) i dalszej hodowli. Rusztowania przygotowuje się z odpowiednich biozgodnych materiałów, które ulegają powolnej degradacji i resorpcji w organizmie. Większość zapewnia hodowli trójwymiarową przestrzeń, gdzie komórki mogą rosnąć i się dzielić. Podjęto szereg prób wykorzystania błony owodniowej w inżynierii tkankowej. Jej specyficzna struktura i biologiczna żywotność dały podstawy, by uznać ją za idealne źródło do tworzenia biologicznego rusztowania (po jej uprzednim przetworzeniu i usunięciu komórek).

Do tej pory przeprowadzono kilka eksperymentów z użyciem błony owodniowej jako rusztowania. Wykazano przydatność substancji zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix*, ECM) owodni w regeneracji nerwów obwodowych. Ponadto stwierdzono, iż błona owodniowa jest biodegradowalnym skafoldem z unikalnymi właściwościami biochemicznymi i mechanicznymi sprzyjającymi regeneracji nerwowej⁽¹⁰⁾. Przedstawiono również możliwość wykorzystania owodni pozbawionej komórek jako warstwy odżywiającej dla części komórek macierzystych potrzebnych do różnicowania neuronów⁽¹¹⁾. Może ona także służyć jako nośnik dla chondrocytów i być wykorzystywana w regeneracji chrząstki⁽¹²⁾. Podczas wysiewania komórek nabłonkowych i mezenchymalnych na rusztowania komórkowe powstałe z błony owodniowej zaobserwowano intensywne łączenie komórek i wykazano ich zdolność do przenikania substancji gąbczastej owodniowego skafoldu. To potencjalnie obiecujące podejście do leczenia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych⁽¹³⁾.

the diseases were treated in 75% of patients with no complications⁽⁸⁾. Other researchers have used stem cells of one eye in preclinical tests and replicated them in a laboratory on a special medium (microchip) and then on the acellular amniotic membrane. As a result, it became overgrown with stem cells. The second important stage was the clinical evaluation of the functionality of the stem cells obtained on rabbit models with corneal defects. Thanks to autologous skin grafts, approximately 60% of rabbits were effectively treated. Moreover, the amniotic membrane has been used in ophthalmology to treat: chemical burns, cicatricial conjunctivitis, corneal ulcers, bullous pemphigoid, Stevenson–Johnson syndrome, pterygium and severe dry eye syndrome⁽⁹⁾.

New possibilities of regenerating damaged or pathologically altered tissues available thanks to tissue engineering (TE) make the amnion more and more useful in medicine. Damaged tissues and organs are usually repaired using a method that consists in the *in vitro* multiplication of isolated host cells (e.g. keratinocytes) followed by their placement on scaffolds and further culture. Scaffolds are made of appropriate biocompatible materials that undergo slow degradation and resorption in the organism. Most of them enable a three-dimensional culture space where cells can grow and divide. There have been multiple attempts of using the amniotic membrane in tissue engineering. Its specific structure and biological viability renders it an ideal material for creating a biological scaffold (after its processing and cell removal).

To date, several experiments with the use of the amnion as a scaffold have been carried out. The amniotic extracellular matrix (ECM) has been proven useful in peripheral nerve regeneration. Moreover, it has been established that the amnion is a biodegradable scaffold with unique biochemical and mechanical properties conducive to nervous regeneration⁽¹⁰⁾. Another paper reports the usage of acellular amniotic membrane as a feeder layer for some stem cells needed for neuronal differentiation⁽¹¹⁾. It can also serve as a chondrocyte carrier and may be used for cartilage regeneration⁽¹²⁾. When inoculating amnion scaffolds with epithelial and mesenchymal cells, it was observed that cells connected intensively and were able to permeate the spongy layer of the scaffold. This is a potentially promising approach to the treatment of premature rupture of the fetal membranes⁽¹³⁾.

Moreover, it has also been attempted to use the amnion in wound healing. Allogenic amniotic grafts are currently used in the treatment of severe burns, lower limb ulceration as well as laryngological, urological and ophthalmological wounds⁽¹⁴⁾. Tyszkiewicz *et al.* have developed a method for the processing, storing and sterilization of human amniotic allografts prepared as biological dressings for skin burns. They suggested that, following chorion separation, the epithelial side of the amnion should be placed directly on polyester. After application to the wound, the epithelial side with the basement membrane

Podjęto również próby wykorzystania owodni w gojeniu ran. Allogeniczne przeszczepy owodniowe są obecnie używane do leczenia ciężkich oparzeń, owrzodzeń kończyn dolnych, ran laryngologicznych, urologicznych i okulistycznych⁽¹⁴⁾. Tyszkiewicz i wsp. opracowali metodę obróbki, przechowywania i sterylizacji ludzkich allograftów owodniowych przygotowywanych jako bioopatrunki do pokrywania oparzeń skóry. Zasugerowali, aby po oddzieleniu kosmówki stroną nabłonkową owodni umieścić bezpośrednio na poliestrze. Po pokryciu rany strona nabłonkowa z błoną podstawną staje się stroną zewnętrzną. Pobudza ona migrację, zapewnia umocowanie i rozprzestrzenianie się komórek gospodarza, a w efekcie przyspiesza epitelializację. Badacze zauważyli, że liofilizowane, napromieniane przeszczepy są wchłaniane w ciągu kilku dni, podczas gdy głęboko zamrożone lepiej przylegają do rany i utrzymują się do 3 tygodni po przeszczepieniu⁽¹⁵⁾. *In vivo* biokompatybilność błony owodniowej została oszacowana przez podskórne wszczepienie owodni pozbawionej komórek myszom – na okres 3 miesięcy. Analiza próbek pobranych od myszy wykazała, iż owodnia pozbawiona komórek ulega zasiedleniu niewielką liczbą komórek T oraz znaczną liczbą fibroblastów, makrofagów i komórek endotelialnych, co dowiodło skuteczności klinicznej. Bezkomórkowa owodnia wspomaga przyleganie i namnażanie ludzkich fibroblastów i keratynocytów. Poza tym błona owodniowa może dostarczać allogenicznych komórek do leczenia owrzodzenia stopy cukrzycowej, ubytków rogówki i ciężkich oparzeń skóry⁽¹⁶⁾.

KOMÓRKI PROGENITOROWE OWODNI

Współcześnie zainteresowanie błoną owodniową w transplantologii zmalało na korzyść komórek nabłonkowych i mezenchymalnych owodni. Komórki nabłonka owodni, podobnie jak szereg innych komórek izolowanych z łożyska i pępowiny, przyciągają ostatnio uwagę świata nauki ze względu na potwierdzoną plastyczność, czyli zdolność do zastępowania brakujących komórek innego rodzaju. Ta cecha charakteryzuje komórki macierzyste. Mają one zdolność do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów oraz różnicowania się do innych typów komórek. Ze względu na te właściwości dzielą się na: totipotentjalne (embrionalne komórki macierzyste, wyodrębnione z zarodka na etapie blastocysty, które mogą dać początek całemu organizmowi), pluripotentjalne (embrionalne komórki macierzyste, które mogą się różnicować w każdy typ wyspecjalizowanej komórki, z wyjątkiem komórek rozrodczych), multipotentjalne (somatyczne komórki macierzyste, mające możliwość stałego wytwarzania nowych komórek, które mogą się różnicować w różne typy komórek o podobnych właściwościach), unipotentjalne, czyli komórki prekursorowe (mogą się różnicować tylko do jednego typu komórek). Biorąc pod uwagę pochodzenie, komórki macierzyste dzieli się na somatyczne (dorosłe) i embrionalne. Embrionalne komórki macierzyste

becomes the outer side. It promotes migration, attachment and spreading of host cells, thus accelerating epithelialization. The authors observed that lyophilized irradiated grafts were resorbed within several days whereas the deep frozen ones adhered to the wound better and persisted for 3 weeks after grafting⁽¹⁵⁾. The *in vivo* biocompatibility of the amnion has been evaluated on the basis of subcutaneous cell-free amnion implantation to mice for the period of 3 months. The analysis of murine samples revealed that the acellular amnion was settled with a low number of T cells and a considerable number of fibroblasts, macrophages and endothelial cells, which proved its clinical efficacy. The acellular amnion supports the attachment and proliferation of human fibroblasts and keratinocytes. What is more, it can deliver allogenic cells to treat diabetic foot ulcers, corneal defects, and severe skin burns⁽¹⁶⁾.

AMNIOTIC PROGENITOR CELLS

Currently, the interest in the use of the amnion in transplantology has somewhat extinguished to the benefit of epithelial and mesenchymal amniotic cells. As other cells isolated from the placenta and umbilicus, amniotic epithelial cells are of interest to scientists worldwide because of their confirmed plasticity, i.e. the ability to replace the missing cells of a different type. This is a characteristic of stem cells. They are capable of potentially non-restricted division and differentiation into other cell types. Owing to these properties, they are divided into: totipotent cells (embryonic stem cells isolated from an embryo during the blastocyst stage; they can give rise to the entire organism), pluripotent cells (embryonic stem cells that can differentiate into any specialized cells except for reproductive cells), multipotent cells (somatic stem cells that have the potential to continuously create new cells which can differentiate into a variety of cells with similar properties) and unipotent i.e. precursor cells (which can differentiate into only one cell type). When considering the origin, stem cells are divided into somatic and embryonic ones. Embryonic stem cells can be totipotent (when they originate from a several-cell embryo) or pluripotent (when they originate from the inner cell mass of a blastocyst).

When cells of umbilical blood, amniotic fluid and umbilical cord are excluded, human amniotic epithelial cells (HAECs) are the only non-mesenchymal fetal cells isolated from the placenta. They differentiate from the epiblast, which is the source of all three germ layers, approximately 8 days after fertilization when it still has the pluripotent properties. That is why some authors are of the opinion that HAECs omit the differentiation that accompanies gastrulation (15th–17th day) thereby retaining partial pluripotency⁽¹⁷⁾.

A blastocyst consists of compact cells, which form the inner cell mass or embryoblast, and flat cells that form the outer layer of a blastocyst (trophoblast). The trophoblast develops into the chorion and subsequently – the placenta.

mogą być totipotencjalne (gdy pochodzą z kilkukomórkowego embrionu) lub pluripotencjalne (gdy pochodzą z węzła zarodkowego blastocysty).

Jeśli nie uwzględnimy komórek krwi pępowinowej, płynu owodniowego i nabłonka sznura pępowinowego, komórki nabłonkowe owodni (*human amniotic epithelial cells*, HAEC) są jedynymi komórkami o niemezenchymalnym pochodzeniu płodowym izolowanymi z łożyska. Różnicują się one z epiblastu, który jest źródłem wszystkich trzech listków zarodkowych, około 8. dnia po zapłodnieniu, gdy wciąż zachowuje on właściwości pluripotencjalne. Stąd zdaniem części autorów HAEC pomijają różnicowanie towarzyszące gastrulacji (15.–17. dzień), zachowując przynajmniej częściową pluripotencjalność⁽¹⁷⁾.

Blastocysta składa się ze skupionych komórek, które tworzą węzeł zarodkowy lub embrioblast, oraz ze spłaszczonych komórek ułożonych na obwodzie blastocysty – stanowiących trofoblast. Trofoblast przekształca się w kosmówkę, a następnie w łożysko. Około 7.–8. dnia po zapłodnieniu rozpoczyna się proces implantacji blastocysty w głąb warstwy zbitnej błony śluzowej macicy i dalszy rozwój łożyska. Na tym etapie rozwoju trofoblast ma dwie warstwy: wewnętrzną, czyli komórek cytotrofoblastu, oraz zewnętrzną, czyli komórek syncytiotrofoblastu. Około 8. dnia rozwoju embrioblast także różnicuje się na dwie warstwy komórek: wewnętrzną (hipoblast) oraz zewnętrzną (epiblast) (ryc. 2). Epiblast jest źródłem wszystkich trzech listków zarodkowych i ostatecznie kształtuje rozwijający się embrion. Zarodek, pępowina i nabłonek owodni wywodzą się z epiblastu. W tym samym czasie szczeliny pomiędzy komórkami cytotrofoblastu i epiblastu zlewają się w jamkę – jamę owodni, a pojawiające się w jej górnym biegunie komórki to komórki owodniotwórcze (amnioblasty). Amnioblasty wyściełają całą jamę owodni, po czym różnicują się do komórek nabłonka owodni. Warstwę zewnętrzną owodni tworzy mezoderma pozazarodkowa, która wnika między trofoblast a warstwę amnioblastów^(18,19).

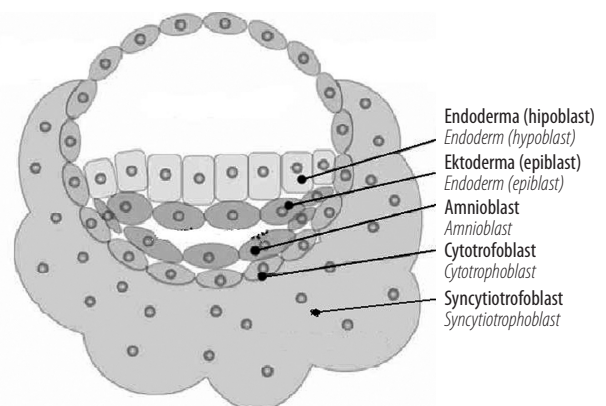
IZOLACJA HAEC

Izolację komórek HAEC opisano w kilku protokołach, w których wystąpiły pewne różnice⁽²⁰⁾. W skrócie wygląda ona następująco: łożyska były pozyskiwane z elektywnych cięć cesarskich niepowikłanych ciąży. Układano je matczyną powierzchnią na sterylnym stoliku operacyjnym, następnie odcinano sznur pępowiny i nacinano powierzchnię owodniową łożyska na krzyż. Z każdej części zdejmowano owodnię (rozpoczynano od strony położonego w środku kikutu pępowiny). Błony po wypłukaniu umieszczono na 10 minut w naczyniu z roztworem 0,05% trypsyny z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) w celu usunięcia reszty krwinek. Po przełożeniu do kolejnego naczynia z trypsyną pozostawiono je na kolejne 40 minut. Po tym czasie blokowano enzym pożywką. Jeżeli liczba uzyskanych komórek nie była zadowalająca, błony przekładano ponownie do świeżej trypsyny na

About 7–8 days after fertilization, the blastocyst begins its implantation process into a compact layer of the endometrium and continues the development of the placenta. At this stage, the trophoblast consists of two layers: inner, i.e. cytotrophoblast, and outer, i.e. syncytiotrophoblast cells. Approximately on the 8th day of development, the embryoblast also differentiates into two cell layers: the inner (hypoblast) and outer (epiblast) one (Fig. 2). The epiblast constitutes the source of three germ layers and ultimately shapes the developing embryo. The embryo, umbilicus and amniotic epithelium derive from the epiblast. At the same time, gaps between cytotrophoblast and epiblast cells fuse to form the amniotic cavity, and cells that appear on its upper pole are amnioblasts (amnion forming cells). Amnioblasts line the entire amniotic cavity and then differentiate into amniotic epithelial cells. The outer amniotic layer is composed of the extraembryonic mesoderm which reaches between the trophoblast and the amnioblast layer^(18,19).

HAEC ISOLATION

HAEC isolation has been described in several slightly differing protocols⁽²⁰⁾. In short, the procedure is as follows: term placentas were obtained from elective cesarean section procedures terminating uncomplicated pregnancies. They were placed on a sterile field with the maternal surface facing down. Subsequently, the umbilical cord was trimmed and an X-shaped incision was performed on the amniotic surface of the placenta. From each part, the amnion was peeled (starting from the area of the umbilical stump located in the center). After washing, amnion membranes were placed in a tube with 0.05% trypsin with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 10 minutes in order to remove the remaining blood cells. Subsequently, the amnion was transferred to another tube with trypsin and incubated for 40 minutes. After this, the enzyme was blocked with a medium. If the cell count was not satisfactory, the membranes were transferred to fresh trypsin



Ryc. 2. Budowa ludzkiego embrionu około 8. dnia po zapłodnieniu

Fig. 2. Human embryo approximately 8 days after fertilization

następne 40 minut. Odwirowany osad z obu naczyń zbierano do jednej probówki i filtrowano. Według autorów zaletą tej metody izolacji HAEC jest ich ogromna liczebność (ponad 100 milionów komórek pobranych z jednej owodni). Hodowle komórkowe zakładano na pożywkę DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z dodatkiem naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF), na której komórki się rozmnażały, ujawniając typową morfologię nabłonka jednowarstwowego, sześciennego. Przed ostatecznym starzeniem komórki można było pasażować 2–5 razy⁽²¹⁾.

CHARAKTERYSTYKA HAEC

W hodowlach namnażające się HAEC tworzą populacje komórek nabłonkowych o jednolitej morfologii. Nawet morfologicznie homogeniczne kultury mogą jednak zawierać typy komórek o różnym potencjale wzrostu i różnicowania. Świeżo po wyizolowaniu HAEC wykazują ekspresję takich samych markerów powierzchniowych komórek jak inne komórki macierzyste: SSEA-3 i SSEA-4 (*stage specific embryonic antigen*), TRA-1-60, TRA-1-81 (*tumor rejection antigen*). Ponadto wykazują ekspresję markerów charakterystycznych dla pluripotencjalnych komórek macierzystych: OCT-4 (*octamer-binding protein 4*), SOX-2 (*SRY-related HMG-box gene 2*) oraz białka Nanog⁽²²⁾. OCT-4 jest jednym z czynników transkrypcji odgrywających główną rolę w utrzymywaniu pluripotencjalności i możliwości samoodnowy. Należy do rodziny POU (*Pit-Oct-Unc*) regulatorów transkrypcji oraz reguluje pluripotencjalność ludzkich i mysich embrionalnych komórek macierzystych (*embryonic stem cells*, ESC)⁽²³⁾. Epiblast, który preadresowuje początek rozwojowy HAEC, wykazuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego do momentu różnicowania. Tamagawa i wsp. założyli linie komórkowe z komórek pochodzących w całości z owodni. Linie zawierały komórki nabłonkowe owodni i mezenchymalne fibroblasty. Zmieszano je następnie z wczesnymi mysimi komórkami zarodkowymi, aby utworzyć chimerę. Rozwijający się embrion utrzymano do czasu uformowania trzech listków zarodkowych, w których komórki ksenogeniczne rozwijały się tak samo jak płodowe komórki gospodarza. Doniesienie Tamagawy to istotny dowód na istnienie pluripotencjalności *in vitro*⁽²⁴⁾.

Aktywność telomerazy jest wykrywalna w ESC, MAPC (*multipotent adult progenitor cells*), komórkach zarodkowych i 80% próbek ludzkich guzów. Telomerazoaktywne embrionalne komórki macierzyste (*human embryonic stem cells*, HESC) wstrzyknięte domięśniowo myszom z ciężkim niedoborem odporności tworzą guzy. Z kolei po wstrzyknięciu 0,5–2 milionów HAEC około 50 myszom i obserwacji średnio przez około 60 dni (maksymalnie 516) żaden przeszczep nie doprowadził do rozwoju guza u myszy z głębokim upośledzeniem odporności. Wysoce prawdopodobne, że brak aktywności telomerazy w HAEC może się przyczyniać do hamowania nowotworzenia⁽²⁵⁾.

again for 40 minutes. The centrifuged sediment was collected into one tube and filtered. The authors of this method claim that it enables a huge number of HAECs to be isolated (over 100 million cells from one amnion), which is an advantage of this method. Cell cultures were established on a DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with epidermal growth factor (EGF) where cells proliferated revealing the typical morphology of one-layer cuboidal epithelium. The cells could be subcultured 2–5 times before ageing⁽²¹⁾.

HAEC CHARACTERISTICS

In culture conditions, proliferating HAECs create epithelial cell populations of homogeneous morphology. However, even morphologically homogeneous cultures can contain cell types of various potential for growth and differentiation. Directly after isolation, HAECs demonstrate the expression of the same surface markers as in other stem cells: SSEA-3 and SSEA-4 (stage specific embryonic antigen) as well as TRA-1-60 and TRA-1-81 (tumor rejection antigen). Moreover, they show the expressiveness of the markers characteristic of pluripotent stem cells: OCT-4 (octamer-binding protein 4), SOX-2 (SRY-related HMG-box gene 2) and Nanog protein⁽²²⁾. OCT-4 is one of the transcription factors that play a key role in maintaining pluripotency and the ability to self-regenerate. It belongs to the POU family (Pit-Oct-Unc) of transcription regulators and regulates the pluripotency of human and murine embryonic stem cells (ESCs)⁽²³⁾. The epiblast, which readresses the initial development of HAECs, demonstrates the expression of a transcription factor to the moment of differentiation. Tamagawa *et al.* established cell lines of stem cells derived entirely from the amnion. The lines contained amniotic epithelial cells and mesenchymal fibroblasts. Subsequently, they were mixed with early murine embryonic cells to create a chimera. The developing embryo was sustained until the formation of three germ layers in which xenogeneic cells developed identically to the host fetal cells. The report of Tamagawa constitutes significant evidence for the presence of *in vitro* pluripotency⁽²⁴⁾.

The activity of telomerase is detectable in ESCs, MAPCs (multipotent adult progenitor cells), embryonic cells and in 80% of human tumor samples. Human embryonic stem cells (HESCs) that express telomerase develop into tumors when injected intramuscularly to severely immunocompromised mice. By contrast, after injection of 0.5–2 million HAECs to approximately 50 mice and after their observation for about 60 days (maximum 516 days), no graft led to the development of a tumor in severely immunocompromised mice. It is highly likely that the lack of telomerase activity in HAECs can contribute to the blocking of neoplastic processes⁽²⁵⁾. A simple karyotype analysis has shown no cytogenetic anomalies of cultured HAECs, and their safety in transplantology has been confirmed clinically.

Nie stwierdzono żadnych cytogenetycznych anomalii hodowlanych HAEC w prostej analizie kariotypu, a ich bezpieczeństwo w transplantologii zostało potwierdzone klinicznie.

Badacze przeszczepili również HAEC na przedramiona ochotników. Nie zauważyli żadnej reakcji immunologicznej, w żadnym przypadku nie stwierdzili też rozwoju guza⁽²⁶⁾. Wiadomo, iż HAEC wykazują ekspresję monomorficznego, nieklasycznego antygenu HLA-G (*human leukocyte antigens*)⁽²⁷⁾, natomiast nie mają na swoich powierzchniach polimorficznych antygenów zgodności tkankowej HLA-A, HLA-B (klasa Ia) oraz HLA-DR (klasa II)⁽²⁸⁾. Powstało kilka prac poświęconych immunogenności HAEC. Jak wykazano, supernatanty HAEC wytwarzają czynniki, które znacząco hamują aktywność chemotaktyczną neutrofilów i makrofagów względem MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*). Ponadto redukują proliferację limfocytów T i B po mitogenicnej stymulacji oraz pobudzają ich apoptozę. W przeciwieństwie do limfocytów makrofagi i neutrofile są odporne na apoptozę indukowaną przez HAEC, jednak HAEC hamują migrację makrofagów *in vitro*⁽²⁹⁾. Porównywano również efekty immunosupresyjne dwóch odrębnych typów komórek macierzystych z owodni. Pomimo odmiennej morfologii i ekspresji markerowej komórki nabłonkowe i mezenchymalne owodni mają zbliżony potencjał modulacji reakcji immunologicznych *in vitro*⁽³⁰⁾. Powyższe obserwacje prowadzą do wniosku, że HAEC nie są rozpoznawane przez system immunologiczny oraz że allogeniczne przeszczepy z HAEC mogą przeżyć przez czas nieokreślony.

Na podstawie analiz immunohistochemicznych i genetycznych stwierdzono, iż HAEC mają potencjał różnicowania się do komórek wszystkich trzech listków zarodkowych *in vitro*: endodermy (wątroba, trzustka), mezodermy (kardiomiocyty) i ektodermy (komórki nerwowe)⁽³¹⁾. Jak dowiedli Sakuragawa i wsp., hodowlane HAEC wykazują ekspresję markerową glejowych i neuronowych komórek progenitorowych⁽³²⁾.

Dalsze badania w tej dziedzinie wykazały, iż da się pobudzić różnicowanie HAEC do komórek mogących syntetyzować i uwalniać acetylocholinę⁽³³⁾, katecholaminy⁽³⁴⁾ i dopaminę⁽³⁵⁾. Amnioblast jest przypisywany do owodniowej ektodermy, stąd tendencja HAEC do różnicowania w kierunku linii nerwowej (ektodermalnej). Komórki HAEC mają także potencjał różnicowania w kierunku endodermy. W 2000 roku Sakuragawa i wsp. zademonstrowali wytwarzanie albuminy (Alb) i α -fetoproteiny (AFP) przez HAEC w modelu hodowlanym i potwierdzili ich potencjał wątrobowy⁽³⁶⁾. HAEC mają też inne cechy komórek wątrobowych, np. możliwość magazynowania glikogenu, ekspresję wątrobowych czynników transkrypcji HNF3 γ (*hepatocyte nuclear factor*), HNF4 α , CEBP α i β (CCAAT/enhancer-binding protein) oraz kilka genów metabolizujących leki (cytochrom P450)⁽³⁷⁾. Wei i wsp. założyli hodowlę HAEC z obecnością nikotynamidu na 2–4 tygodnie w celu stymulacji różnicowania trzustkowego⁽³⁸⁾. Udowodnili, iż HAEC mogą się różnicować do w pełni funkcjonalnych komórek

Furthermore, scientists have also transplanted HAECs into volunteer forearms. They did not observe any immune reaction; tumor growth was not observed in any case⁽²⁶⁾. It is known that HAECs demonstrate the expression of monomorphic nonclassical HLA-G antigen (human leukocyte antigens)⁽²⁷⁾, but they do not have polymorphic histocompatibility antigens HLA-A, HLA-B (class Ia) or HLA-DR (class II) on their surface⁽²⁸⁾. There are several papers on the immunogenicity of HAECs. It has been demonstrated that supernatant HAECs produce factors that considerably inhibit the chemotactic activity of neutrophils and macrophages with respect to MIP-2 (macrophage inflammatory protein). Moreover, they reduce T and B lymphocyte proliferation following mitogenic stimulation and promote their apoptosis. By contrast with lymphocytes, macrophages and neutrophils are resistant to HAEC-induced apoptosis, but HAECs inhibit macrophage migration *in vitro*⁽²⁹⁾. Moreover, immunosuppressive effects of two separate amniotic stem cell types have been compared. Despite different morphology and marker expression, amniotic epithelial and mesenchymal cells present a similar potential to modulate immune reactions *in vitro*⁽³⁰⁾. The observations discussed above lead to a conclusion that HAECs are not recognized by the immune system and that allogenic grafts with HAECs can have an unspecified lifespan.

Based on immunohistochemical and genetic analyses, it has been concluded that HAEC can differentiate *in vitro* into cells of all three germ layers: endoderm (liver, pancreas), mesoderm (cardiomyocytes) and ectoderm (neurons)⁽³¹⁾. Sakuragawa *et al.* have demonstrated that cultured HAECs show marker expression of glial and neuronal progenitor cells⁽³²⁾.

Other studies in this area have revealed that HAECs can be stimulated to differentiate into cells that can synthesize and release acetylcholine⁽³³⁾, catecholamines⁽³⁴⁾ and dopamine⁽³⁵⁾. An amnioblast is associated with the amniotic ectoderm and therefore HAECs tend to differentiate towards the nerve lineage (ectoderm). HAECs also have a potential to differentiate into the endoderm. In 2000, Sakuragawa *et al.* demonstrated the production of albumin (Alb) and α -fetoprotein (AFP) by cultured HAECs and confirmed their hepatic potential⁽³⁶⁾. HAECs also exhibit other features of hepatocytes, such as the ability to store glycogen as well as the expression of hepatic transcription factors: HNF3 γ (hepatocyte nuclear factor), HNF4 α , CEBP α and β (CCAAT/enhancer-binding protein) and several drug metabolizing genes (cytochrome P450)⁽³⁷⁾. Wei *et al.* established a culture of HAECs with nicotinamide for 2–4 weeks in order to stimulate pancreatic differentiation⁽³⁸⁾. They have proven that HAECs can differentiate *in vitro* to fully functional insulin producing cells. The transplantation of HAECs demonstrating insulin expression to mice with streptozotocin-induced diabetes compensated for hyperglycemia and corrected body weight⁽³⁸⁾. In an analogous experiment, HAMSCs (human

produkcujących insulinę *in vitro*. Przeszczepienie HAEC wykazujących insulinową ekspresję myszom z cukrzycą indukowaną streptozotocyną wyrównało hiperglikemię i masę ciała⁽³⁸⁾. W analogicznie przeprowadzonym doświadczeniu HAMSC (*human amniotic mesenchymal stromal cells*) były nieaktywne, co potwierdza multipotencjalność HAEC. Ponadto istnieje możliwość różnicowania HAEC w kierunku komórek pochodzenia mezodermalnego, np. do miocytów, osteocytów, adypocytów. Miki i wsp. po raz pierwszy zastosowali w hodowli HAEC takie same warunki jak podczas indukcji różnicowania HESC w kierunku kardiomyocytów⁽³⁹⁾. Choć nie przeprowadzono funkcjonalnych analiz, kardiomyocyty wywodzące się z nabłonka owodni wykazywały ekspresję kardiospecyficznych genów i białka α -aktyniny.

Bardzo ważną cechą HAEC jest ich łatwa biologiczna dostępność. To ważne źródło komórek macierzystych do celów transplantacyjnych, które nie wywołuje etycznych, religijnych ani politycznych kontrowersji. Łożyisko po porodzie jest traktowane jako produkt odpadowy, a przecież zgodnie z wyżej wymienionymi doniesieniami mogłoby stanowić niezwykle biologiczny materiał wtórny.

KLINICZNE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA HAEC

Perspektywy klinicznego wykorzystania HAEC wydają się ogromne. Naukowcy z Instytutu Biochemii w Szanghaju dokonali transfekcji HAEC z glejopochodnym czynnikiem neurotroficznym (*glial cell-line derived neurotrophic factor*, GDNF), jak również z genem zielonego białka fluoryzującego (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP) za pomocą wektorów lentiwirusowych. Komórki te zostały następnie przeszczepione do mózgów szczurów z przejściowym zatorem tętnicy środkowej. HAEC migrowały do obszarów niedokrwionych oraz znacząco złagodziły zaburzenia czynności behawioralnych i zmniejszyły rozmiar niedokrwienia⁽⁴⁰⁾. Ze względu na niektóre właściwości zbliżone do komórek nerwowych i glejowych HAEC były testowane pod kątem możliwości naprawy uszkodzeń rdzenia kręgowego u małp i szczurów. Znakowane komórki przeszczepiono do uszkodzonych miejsc w rdzeniu kręgowym. Efekty analizowano 15 i 60 dni po przeszczepieniu. Aksony biorcy przenikały przeszczepione komórki HAEC. W miejscach uszkodzonych nie wykształciła się blizna glejowa. Z tych pilotażowych badań wynika, że HAEC przeżywają w środowisku, do którego zostały przeszczepione. Poza tym wspierają wzrost aksonów biorcy oraz zapobiegają tworzeniu się blizny glejowej i śmierci komórek nerwowych⁽⁴¹⁾. Jak już wspomniano, HAEC mają potencjał różnicowania się do komórek syntetyzujących katecholaminy, m.in. dopaminę (DA). W ten sposób prowadzono badania nad możliwością wykorzystania HAEC jako donatora dopaminy w leczeniu choroby Parkinsona. Analizowano produkcję dopaminy przez HAEC *in vitro*, przeżywalność i funkcjonowanie przeszczepionych komórek nabłonkowych owodni

(amniotic mesenchymal stromal cells) were inactive, which confirms the multipotency of HAECs. Moreover, HAECs can also differentiate into mesodermal cells, e.g. myocytes, osteocytes and adipocytes. Miki *et al.* were the first to conduct an HAEC culture in conditions identical to those in inducing HESC differentiation into cardiomyocytes⁽³⁹⁾. Although functional analyses have not been conducted, cardiomyocytes originating from the amniotic epithelium demonstrated the expression of cardio-specific genes and α -actinin.

The fact that HAECs are easily available is their very important feature. This is an important source of stem cells for transplantation purposes that does not evoke ethical, religious or political controversy. The placenta following labor is treated as a waste product. However, the above-mentioned reports indicate that it could be an exceptional secondary biological material.

CLINICAL APPLICATIONS OF HAECs

The possibilities of the clinical use of HAECs are great. The researchers from the Institute of Biochemistry in Shanghai have transfected HAECs with glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) and with enhanced green fluorescent protein (EGFP) using lentiviral vectors. These cells were then transplanted into the brains of rats with transient middle cerebral artery occlusion. The HAECs migrated to the ischemic areas, and significantly ameliorated behavioral dysfunction and reduced the volume of ischemia⁽⁴⁰⁾. Owing to some properties similar to neurons and glial cells, HAECs have been tested for their ability to repair spinal cord injuries in monkeys and rats. The labeled cells were transplanted into the damaged areas in the spinal cord. The effects were analyzed after 15 and 60 days post-transplantation. The HAEC graft was penetrated by the host axons. There was no glial scar at the damaged site. This pilot study indicates that HAECs survive in the environment to which they are transplanted. Moreover, they support the growth of host axons and prevent the formation of a glial scar and nerve cell death⁽⁴¹⁾. As has already been mentioned, HAECs have a potential to differentiate into cells that synthesize catecholamines, including dopamine (DA). It has been therefore investigated whether HAECs as dopamine donors can be used in the treatment of Parkinson's disease. *In vitro* dopamine production by HAECs as well as survival and functionality of amniotic epithelial cell grafts were tested on the rat model with Parkinson's disease. Amniotic epithelial cells transduced with *Escherichia coli lacZ* (*beta-gal*) gene were transplanted to the dopamine-free striatum of rats that had previously been subjected to immunosuppression. Two weeks later, HAECs were found to have survived with no signs of overgrowth, and *beta-gal*-positive cells were detected in the transplanted material. The results obtained evidently suggest that dopamine producing HAECs can survive in the brain and improve its function⁽⁴¹⁾.

szczurzym modelu choroby Parkinsona. Transdukowane ze znakowanym genem *Escherichia coli lacZ* (beta-gal) komórki nabłonkowe owodni przeszczepiono do opróżnionego z dopaminy prądkowia szczurów poddanych wcześniej immunosupresji. Dwa tygodnie później stwierdzono przetrwanie HAEC bez cech przerostu oraz wykazano obecność beta-gal-dodatnich komórek wewnątrz przeszczepionego materiału. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, iż HAEC produkujące dopaminę mogą przeżyć w mózgu i poprawić jego funkcjonowanie⁽⁴¹⁾.

W badaniach klinicznych przeprowadzono próbę wykorzystania HAEC w odbudowie uszkodzonej powierzchni gałki ocznej. U pacjentów z długotrwałym uszkodzeniem nabłonka rogówki opornym na leczenie zastosowano kolagenowe osłonki na rogówkę zawierające HAEC, podtrzymywane przez miękkie soczewki kontaktowe. Po 72 godzinach kolagenowe osłonki uległy wchłonięciu, a soczewki kontaktowe usunięto. Takie postępowanie stosowano co tydzień, aż do uzyskania wygojenia. Grupę kontrolną stanowili ci sami pacjenci, którym tydzień wcześniej założono kolagenowe osłonki niezawierające HAEC. U chorych, których leczono osłonkami z HAEC, nastąpiło zagojenie rogówki, podczas gdy w grupie kontrolnej nie zaobserwowano poprawy⁽⁴²⁾. Kolejną próbą klinicznego wykorzystania HAEC było ich przeszczepienie pacjentom z różnymi lizosomalnymi chorobami spichrzeniowymi. W przypadku choroby Gauchera zaobserwowano kliniczną poprawę wraz ze wzrostem beta-glukozydazy. U pacjentów z innymi chorobami spichrzeniowymi poprawa nie wystąpiła, co skłania do dalszych badań w tym kierunku⁽⁴³⁾.

Komórki nabłonkowe owodni są już wykorzystywane w inżynierii tkankowej, przykładowo podczas tworzenia tzw. warstw komórkowych CS (*cell sheets*). Konfluentna warstwa komórek w hodowli tradycyjnej nie może być oddzielana od dna naczynia inaczej niż przez trawienie enzymem niszczącym jej spistość. W celu uzyskania warstwy nierozdzielonych komórek opracowano nową metodę pokrycia powierzchni hodowli z wykorzystaniem elastycznego białka na bazie polimeru. Poprzez obniżenie temperatury przy dodatkowej pomocy błony PVDF (*polyvinylidene difluoride*, polifluorek winylidenu) można zdjąć pierwszorzędową warstwę komórkową z pokrytej powierzchni. Odzyskaną warstwę HAEC można przenosić, przylepiać i rozmnażać na kolejnych powierzchniach⁽⁴⁴⁾, np. na kolagenowo-włóknikowej biomatrycy, zaprojektowanej w celu leczenia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych⁽⁴⁵⁾.

Dotychczas udało się wykazać, że HAEC w warunkach hodowli przyjmują część cech adypocytów, chondrocytów, osteocytów, miocytów, kardiomiocytów, neurocytów, komórek trzustki i hepatocytów, ale nie podjęto prób kierowania hodowlanych HAEC do keratynocytów. Udowodniono jednak, że mogą one różnicować się w tym kierunku *in vivo*⁽⁴⁶⁾. Wykazano również, iż bliźniacze im komórki nabłonka sznura pępowinowego mogą wykazywać część cech komórek naskórka, m.in. po przeszczepieniu na mysz⁽⁴⁷⁾. Zagadnienie to ma potencjalnie duże znaczenie kliniczne,

Furthermore, the role of HAECs in the restoration of the damaged eyeball has been evaluated in clinical trials. Patients with persistent and therapy-refractory corneal defects were treated with collagen shields containing HAECs supported by soft contact lenses. The collagen shields were absorbed by 72 hours, and the contact lenses were removed. This procedure was repeated every week until healing was observed. A control group consisted of the same patients who had collagen shields without HAECs placed a week before the actual treatment. The cornea of patients treated with the use of HAEC shields healed whereas no improvement was observed in the controls⁽⁴²⁾. Another attempt of a clinical use of HAECs was their transplantation into patients with various lysosomal storage diseases. In Gaucher disease, the treatment resulted in a clinical improvement with an increase in beta-glucosidase. No improvement was observed in patients with other storage disorders, which prompts further studies in this area⁽⁴³⁾.

Amniotic epithelial cells are already being used in tissue engineering, for instance for making so-called cell sheets (CS). The confluent cell layer in a conventional culture can be detached from the vascular bed only by digestion with an enzyme that damages its integrity. In order to obtain unseparated cells, a novel method for culture surface coating with elastic protein-based polymer has been developed. By reducing the temperature using a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, the primary cell sheet can be detached from the coated surface. The recovered HAEC sheet can be transferred and can adhere and proliferate on subsequent surfaces⁽⁴⁴⁾, e.g. on a collagen and fibrin biomatrix designed for the treatment of premature rupture of membranes⁽⁴⁵⁾.

To date, it has been demonstrated that cultured HAECs adopt certain features of adipocytes, chondrocytes, osteocytes, myocytes, cardiomyocytes, neurocytes, pancreatic cells and hepatocytes, but there have been no attempts to direct their differentiation towards keratinocytes. However, it has been proven that such a differentiation is possible *in vivo*⁽⁴⁶⁾. It has also been shown that their equivalent umbilical cord epithelial cells of rats can have certain epidermal features e.g. when transplanted into mice⁽⁴⁷⁾. Potentially, this problem is of high clinical significance since HAECs exhibit immunomodulating properties and could become a valuable source of allogenic material for tissue engineering. Assuming that they can differentiate into epidermal cells, HAECs could function as the basic epithelial tissue used in skin substitutes.

It is common knowledge that numerous stem cells are capable of crossing beyond their own tissue barrier and even their germ layer. For example, stem cells of the dermis can, in appropriate conditions, restore the circulatory system and blood⁽⁴⁸⁾. It is believed that the destiny of stem cells primarily depends on their surroundings and only secondarily on gene expression. Stem cells are stored in the neighborhood of the basement membranes of adjacent cells and extracellular matrix. Such an environment, called a niche,

ponieważ komórki HAEC wykazują właściwości immunomodulacyjne, stąd też mogłyby się stać wartościowym źródłem materiału allogenicznego do inżynierii tkankowej. Przy założeniu, że możliwe jest ich różnicowanie w kierunku naskórka, komórki HAEC pełniłyby funkcję podstawowej tkanki nabłonkowej wykorzystywanej w substytutach skóry.

Powszechnie wiadomo, iż wiele komórek macierzystych ma zdolność przekraczania bariery swojej tkanki, a nawet listka zarodkowego. Na przykład komórki macierzyste skóry właściwej w odpowiednich warunkach odbudowują układ krwiotwórczy i krew⁽⁴⁸⁾. Uważa się, że los komórek macierzystych zależy przede wszystkim od ich otoczenia, a w mniejszym stopniu od ekspresji genowej. Komórki macierzyste są przechowywane w sąsiedztwie błon podstawnych komórek otaczających i substancji zewnątrzkomórkowej. Taka okolica, zwana niszą, podtrzymuje i umożliwia teoretycznie nieskończone podziały kilku somatycznych komórek macierzystych⁽⁴⁹⁾. Nisze komórek macierzystych naskórka znajdują się w mieszczkach włosowych w okolicy określanej jako wyrzyszenie⁽⁵⁰⁾. W ich sąsiedztwie znajdują się również komórki macierzyste skóry właściwej. Ostatnie badania naukowe dowodzą, iż genetycznie znakowane komórki macierzyste mieszczków włosowych mogą odtwarzać wszystkie kompartmenty skóry i jej przydatków^(51,52). Stąd też ogromne zainteresowanie komórkami HAEC jako potencjalnym źródłem komórek macierzystych oraz wskazywanie na ich kluczową rolę w morfogenezie skóry i jej przydatków⁽⁵³⁾.

Komórki HAEC mogą wytwarzać wiele biologicznie aktywnych substancji. Produkują m.in. wcześniej wspomniane katecholaminy, acetylocholinę i czynnik neurotroficzny, jak również prostaglandyny⁽⁵⁴⁾, transformujący czynnik wzrostu (TGF- α)⁽⁵⁵⁾, czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*, TNF), interferony oraz interleukiny (IL-4, IL-8)⁽⁵⁶⁾. Tsubota i wsp. oraz Tseng i wsp. dowiedli, iż przeszczepy komórek HAEC poprawiają gojenie powierzchni gałki ocznej poddanej chirurgii rekonstrukcyjnej. Mechanizm tego procesu nie został ostatecznie wyjaśniony. Część badaczy uznaje, iż komórki HAEC wykazują ekspresję mRNA dla różnych czynników wzrostu, w tym naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF) i czynnika wzrostu keratynocytów (*keratinocyte growth factor*, KGF), które stymulują proliferację keratynocytów i wytwarzanie nabłonka^(57,58). Dlatego też hipoteza, iż komórki HAEC mogłyby odgrywać rolę podstawowej tkanki nabłonkowej wykorzystywanej w substytutach skóry, wydaje się coraz bardziej zasadna.

Komórkom HAEC poświęca się dużo uwagi również dlatego, iż mogą pełnić funkcję komórek odżywiających (*feeder layers*) oraz stanowić podłoże dla rozwoju różnych typów komórek macierzystych. Wytwarzają np. warstwę odżywiającą, która wspiera wzrastanie nabłonkowych, progenitorowych komórek rąbkowych *ex vivo*⁽⁵⁹⁾. Komórki odżywiające HAEC wykazują także zdolność utrzymywania embrionalnych komórek macierzystych (*embryonic stem*, ES)

supports and enables theoretically infinite divisions of several somatic stem cells⁽⁴⁹⁾. Epidermal stem cell niches are located in hair follicles in the area defined as a bulge⁽⁵⁰⁾. They are surrounded by stem cells of the dermis. The latest research proves that genetically labelled stem cells of hair follicles can restore all skin compartments and appendages^(51,52). That is the reason for such a great interest in HAECs as a potential source of stem cells and for highlighting their crucial role in the morphogenesis of the skin and its appendages⁽⁵³⁾.

HAECs can produce multiple biologically active substances. Among others, they produce already mentioned catecholamines, acetylcholine and neurotrophic factors as well as prostaglandins⁽⁵⁴⁾, transforming growth factor (TGF- α)⁽⁵⁵⁾, tumor necrosis factor (TNF), interferons and interleukins (IL-4, IL-8)⁽⁵⁶⁾. Tsubota *et al.* and Tseng *et al.* have demonstrated that HAEC grafts facilitate ocular surface healing after repair surgeries. The mechanism of this process has not been fully elucidated. Some researchers believe that HAECs exhibit mRNA expression for various growth factors, including epidermal growth factor (EGF) and keratinocyte growth factor (KGF), which promote keratinocyte proliferation and epidermis formation^(57,58). That is why the hypothesis that HAECs could play a role of the basic epithelial tissue used in skin substitutes seems justified.

HAEC cells are given a lot of attention also because they can hold the function of feeder layers and be a medium for the growth of various types of stem cells. For instance, they produce a feeder layer that promotes the *ex vivo* expansion of limbal epithelial progenitor cells⁽⁵⁹⁾. Moreover, feeder HAECs demonstrate the ability to maintain embryonic stem (ES) cells in an undifferentiated state⁽⁶⁰⁾. Additionally, they have been proven to accelerate the differentiation into neurons and speed up axon growth. The latest reports suggest that HAECs can be treated as components of a neural stem cell (NSC) niche⁽⁶¹⁾.

There are few Polish reports from HAEC studies, which encourages investigations in this area. Szukiewicz *et al.* investigated β -defensin 3 (HBD-3) production by amniotic epithelial cells after activation of TLR4 (toll-like receptor) in chorioamnionitis. The latest reports suggest that the placental part of the amnion functions as an active barrier that reacts to pathogenic factors by the toll-like receptor. TLR4 identifies lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin associated with Gram-negative bacteria. HAECs produce antibacterial β -defensin, particularly HBD-3. The study material was divided into two groups. Group 1 ($n = 12$) consisted of fetal membranes obtained from pregnancies complicated with premature rupture of membranes, and group 2 ($n = 12$) included fetal membranes obtained from term pregnancies terminated with a cesarean section. The concentration of HBD-3 considerably increased in group 1 compared with group 2, whereas the basic values of HBD-3 without LPS were similar in both groups. These results suggest that LPS induces TLR-4 in chorioamnionitis, and its activation causes increased HBD-3 production by amniotic epithelial cells⁽⁶²⁾.

w niezróżnicowanym stanie⁽⁶⁰⁾. Udowodniono poza tym, iż przyspieszają różnicowanie w kierunku neuronów i wzrost neurytów. Ostatnie doniesienia sugerują, że wolno potraktować HAEC jako komponent niszy nerwowych komórek macierzystych (*neural stem cells*, NSC)⁽⁶¹⁾.

Literatura polska dotycząca HAEC jest skąpa, co sprzyja zainteresowaniu pracami badawczymi dotyczącymi tej tematyki. Szukiewicz i wsp. badali wytwarzanie β -defensyny 3 (HBD-3) przez komórki nabłonkowe owodni po aktywacji TLR4 (*toll-like receptor*) w stanach zapalnych kosmówki i owodni. Ostatnie doniesienia sugerują, iż łożyskowa część owodni pełni funkcję aktywnej bariery, reagującej na czynniki chorobotwórcze przez *toll-like receptor*. TLR4 rozpoznaje zaś lipopolisacharyd (LPS), endotoksynę kojarzoną z bakteriami Gram-ujemnymi. HAEC produkują antybakteryjną β -defensynę, w szczególności HBD-3. Badany materiał podzielono na dwie grupy. Grupę I ($n = 12$) stanowiły błony płodowe z cięż powikłanych zapaleniem z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych, grupę II ($n = 12$) – błony płodowe z cięż fizjologicznych, donoszonych, ukończonych cesarskim cięciem. Stężenie HBD-3 znacząco wzrosło w grupie I w porównaniu z grupą II, podczas gdy wartości podstawowe HBD-3 bez LPS były podobne w obu grupach. Wyniki te sygnalizują, iż LPS indukuje receptor TLR-4 w zapaleniu kosmówki i owodni, a jego aktywacja jest przyczyną wzrostu produkcji HBD-3 przez komórki nabłonkowe owodni⁽⁶²⁾.

Do tej pory żadne komórki macierzyste nie wykazywały zdolności różnicowania się *in vitro* do terapeutycznie użytecznych typów komórek bądź też ich różnicowanie się nie było wystarczająco kontrolowane. Potrzebne są zatem dalsze badania w tym kierunku. Ze względu na unikalne cechy, takie jak łatwa biologiczna dostępność niebudząca etycznych kontrowersji, pluripotencjalność, niska immunogenność i brak nowotworzenia, komórki macierzyste pochodzące z nabłonka owodni wydają się obiecującym źródłem komórek w inżynierii tkankowej.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

Piśmiennictwo/References

1. Grueterich M, Tseng SC: Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane *ex vivo*. Arch Ophthalmol 2002; 120: 783–790.
2. Sato H, Shimazaki J, Shinozaki N *et al.*: Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: S428.
3. Sangwan VS, Burman S, Tejwani S *et al.*: Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. Indian J Ophthalmol 2007; 55: 251–260.
4. Marangon FB, Alfonso EC, Miller D *et al.*: Incidence of microbial infection after amniotic membrane transplantation. Cornea 2004; 23: 264–269.

To date, no stem cells have demonstrated the capacity to differentiate *in vitro* into therapeutically applicable cell types or their differentiation was not controlled to a sufficient degree. Further research on this issue is therefore needed. Owing to unique features of these cells, such as biological availability that does not raise ethical controversy, pluripotency, low immunogenicity and no neoplastic capacity, stem cells that originate from the amniotic epithelium constitute a promising source of cells for tissue engineering.

Conflict of interest

The authors do not report any financial or personal links with other persons or organizations, which might affect negatively the content of this publication or claim authorship rights to this publication.

5. Davis JW: Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. Johns Hopkins Med J 1910; 15: 307–396.
6. Sabella N: Use of fetal membranes in skin grafting. Med Records NY 1913; 83: 478–480.
7. de Rötth A: Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. Arch Ophthalmol 1940; 23: 522–525.
8. Schwab IR: Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. Trans Am Ophthalmol Soc 1999; 97: 891–986.
9. Kruse FE, Cursiefen C: Surgery of the cornea: corneal, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation. Dev Ophthalmol 2008; 41: 159–170.
10. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E *et al.*: Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. Plast Reconstr Surg 2000; 105: 660–666.
11. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T *et al.*: Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. Stem Cells 2004; 22: 433–440.
12. Jin CZ, Park SR, Choi BH *et al.*: Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. Tissue Eng 2007; 13: 693–702.
13. Portmann-Lanz CB, Ochsenbein-Kölbl N, Marquardt K *et al.*: Manufacture of a cell-free amnion matrix scaffold that supports amnion cell outgrowth *in vitro*. Placenta 2007; 28: 6–13.
14. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M *et al.*: Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. Eur Cell Mater 2008; 15: 88–99.
15. Tyszkiewicz JT, Uhrzynowska-Tyszkiewicz IA, Kaminski A *et al.*: Amnion allografts prepared in the Central Tissue Bank in Warsaw. Ann Transplant 1999; 4: 85–90.
16. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J *et al.*: Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. Tissue Eng Part A 2008; 14: 463–472.
17. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP *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.
18. Bartel H: Embriologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
19. Miki T, Strom SC: Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. Stem Cell Rev 2006; 2: 133–142.
20. Miki T, Marongiu F, Ellis E *et al.*: Isolation of amniotic epithelial stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol 2007; Chapter 1: Unit 1E.3.
21. Terada S, Matsuura K, Enosawa S *et al.*: Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. Cell Transplant 2000; 9: 701–704.

22. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS *et al.*: Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002; 20: 329–337.
23. Pesce M, Schöler HR: Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271–278.
24. Tamagawa T, Ishiwata I, Saito S: Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers *in vitro*. *Hum Cell* 2004; 17: 125–130.
25. Mosquera A, Fernández JL, Campos A *et al.*: Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells. *J Med Genet* 1999; 36: 494–496.
26. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI *et al.*: Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2: 1003–1005.
27. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P *et al.*: Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol* 2000; 61: 1095–1101.
28. Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H: Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. *Cell Transplant* 1995; 4: 343–346.
29. Li H, Niederkorn JY, Neelam S *et al.*: Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 900–907.
30. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M *et al.*: Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007; 13: 1173–1183.
31. Miki T, Lehmann T, Cai H *et al.*: Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1549–1559.
32. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizoguchi M *et al.*: Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 1996; 209: 9–12.
33. Sakuragawa N, Misawa H, Ohsugi K *et al.*: Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett* 1997; 232: 53–56.
34. Elwan MA, Sakuragawa N: Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997; 8: 3435–3438.
35. Kakishita K, Elwan MA, 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.
36. 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.
37. Wei JP, Zhang TS, Kawa S *et al.*: Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12: 545–552.
38. Hou Y, Huang Q, Liu T *et al.*: Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; 40: 830–839.
39. Takahashi T, Lord B, Schulze PC *et al.*: Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107: 1912–1916.
40. 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.
41. Sankar V, Muthusamy R: Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003; 118: 11–17.
42. Parmar DN, Alizadeh H, Awwad ST *et al.*: Ocular surface restoration using non-surgical transplantation of tissue-cultured human amniotic epithelial cells. *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 299–307.
43. Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M: Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain Dev* 1992; 14: 7–11.
44. Zhang H, Iwama M, Akaike T *et al.*: Human amniotic cell sheet harvest using a novel temperature-responsive culture surface coated with protein-based polymer. *Tissue Eng* 2006; 12: 391–401.
45. Bilic G, Hall H, Bittermann AG *et al.*: Human preterm amnion cells cultured in 3-dimensional collagen I and fibrin matrices for tissue engineering purposes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1724–1732.
46. Fliniaux I, Viallet JP, Dhouailly D *et al.*: Transformation of amnion epithelium into skin and hair follicles. *Differentiation* 2004; 72: 558–565.
47. Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y *et al.*: Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. *J Dermatol Sci* 2005; 37: 29–39.
48. Lako M, Armstrong L, Cairns PM *et al.*: Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J Cell Sci* 2002; 115: 3967–3974.
49. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T: Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98–104.
50. Tumber T, Guasch G, Greco V *et al.*: Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004; 303: 359–363.
51. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A *et al.*: Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004; 118: 635–648.
52. Morris RJ, Liu Y, Marles L *et al.*: Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 411–417.
53. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W *et al.*: Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 158–164.
54. Blumenstein M, Hansen WR, Deval D *et al.*: Differential regulation in human amnion epithelial and fibroblast cells of prostaglandin E₂ production and prostaglandin H synthase-2 mRNA expression by dexamethasone but not tumour necrosis factor- α . *Placenta* 2000; 21: 210–217.
55. Tahara M, Tasaka K, Masumoto N *et al.*: Expression of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF α), and EGF receptor in human amnion cells: possible role of TGF α in prostaglandin E₂ synthesis and cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 138–146.
56. Denison FC, Kelly RW, Calder AA *et al.*: Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum Reprod* 1998; 13: 3560–3565.
57. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ *et al.*: Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20: 173–177.
58. Ito A, Takizawa Y, Masashige S *et al.*: Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2003; 95: 589–593.
59. Chen YT, Li W, Hayashida Y *et al.*: Human amniotic epithelial cells as novel feeder layers for promoting *ex vivo* expansion of limbal epithelial progenitor cells. *Stem Cells* 2007; 25: 1995–2005.
60. Ito Y, Kawamorita M, Yamabe T *et al.*: Chemically fixed nurse cells for culturing murine or primate embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007; 103: 113–121.
61. Meng XT, Chen D, Dong ZY *et al.*: Enhanced neural differentiation of neural stem cells and neurite growth by amniotic epithelial cell co-culture. *Cell Biol Int* 2007; 31: 691–698.
62. Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M *et al.*: Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. *Inflamm Res* 2008; 57 Suppl 1: S67–S68.