

Mgr Zofia Grzywocz

## Streszczenie

Wpływ czynników wzrostu uwalnianych przez ludzką owodnię na komórki śródbłonna pępowiny (HUVEC), komórki jednojądrzaste szpiku oraz komórki nowotworowe linii Jurkat

PROMOTOR: Prof. dr hab. Jerzy Kawiak  
PROMOTOR POMOCNICZY: Dr n przyr. Grażyna Hoser



Zakład Cytologii Klinicznej CMKP  
POIG 01.01.02-00-109/09  
„Zastosowanie komórek macierzystych w medycynie”

WARSZAWA 2015

Owodnia jest cienką, membraną znajdującą się po wewnętrznej stronie łożyska i otacza embriion/płód. W owodni można wyróżnić 2 populacje komórek: nabłonkowe komórki owodni (AEC- Amnion Epithelial Cells) oraz mezenchymalne komórki owodni (AMSC- Amnion Mesenchymal Stem Cells).

Błona owodniowa (AM) wydziela czynniki, pełniące różnorodne funkcje. W warunkach *in vitro* owodnia wydziela czynniki odpowiedzialne za odnawianie nabłonka, czynniki angiogenne i przeciwnowotworowe oraz czynniki immunomodulujące i przeciwzapalne. Z danych literaturowych wiadomo, że niektóre z wydzielanych przez owodnię czynników wzrostu mogą być wykorzystane do celów leczniczych.

Celem pracy była: analiza wyizolowanych komórek ludzkiej owodni oraz czynników wzrostu i ich receptorów wydzielanych przez komórki w trakcie hodowli owodni; zbadanie wpływu nadsączy z nad całych owodni i z nad izolowanych populacji komórek na hodowle komórek śródbłonka ludzkiej pępowiny (HUVEC), na ludzkie izolowane komórki jednojądrzaste szpiku oraz na ludzkie komórki linii nowotworowej T limfocytowej - Jurkat.

Początkowo analizowano cytometrycznie fenotyp, uzyskanych po trawieniu enzymatycznym dwóch frakcji komórek owodni. Dodatkowo w trakcie hodowli 24h-48h tych komórek analizowano także ich przeżycie i proliferacje *in vitro* w podłożu minimalnym. We Frakcji 1 dominowały komórki o fenotypie CD73+ (86%), komórki mezenchymalne. We Frakcji 2 przeważały komórki cytokeratynododatnie (98,4%), komórki nabłonkowe. Wśród wymienionych populacji opisano także zmienny osobniczo odsetek komórek o markerach macierzystości: SSEA4, CDw338, Oct3/4, Nanog 1. Komórki te stanowiły średnio ok. 1-2% w opisanych frakcjach. Hodowle komórek obydwu frakcji nie wykazały proliferacji tych komórek w podłożu minimalnym. Podłoże nie miało także wpływu na przeżywalność komórek Frakcji 2 oraz minimalnie obniżało żywotność komórek Frakcji 1 do 48h hodowli.

W nadsączach z owodni badano za pomocą mikromacierzy białkowych obecność i zmiany stężeń czynników wzrostu i ich receptorów w punktach czasowych 3h, 6h, 24h, 48h. Zbadano 40 wybranych czynników wzrostu i ich receptorów. Były to: czynniki wzrostu komórek epidermalnych i fibroblastów (EGF, FGF); czynnik wzrostu

hepatocytów (HGF); czynniki naczyniotwórcze (VEGF, PLGF); czynniki wzrostu nerwowe i glejowe (NGF, GDNF); czynniki krwiotwórcze (G-CSF, GM-SCF, M-CSF, SCF); czynniki insulinopodobne (IGF i IGFBP); płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF); transformujący czynnik wzrostu (TGF). Wszystkie opisane czynniki wykryto w nadsączach. Wraz z wydłużaniem czasem hodowli zwiększało się stężenie: EGF-R, IGF-2, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, M-CSF, M-CSF-R, PDGF-AB, PLGF, G-CSF, NT-4, stężenie pozostałych czynników pozostawało bez zmian. Najwyższe stężenia badanych czynników wzrostu i ich receptorów uzyskano w 24h z nad całej owodni (24h hAM).

W dalszych badaniach obserwowano wpływ nadsączu 24h hAM na migrację komórki HUVEC. Obserwacje wykonane przy pomocy obrazowania komórek w czasie rzeczywistym wykazały wpływ nadsączu na przyspieszenie migracji komórek do podłoża z nadsączem 24h hAM. Komórki migrowały ok. 2 razy szybciej do podłoża z nadsączem w porównaniu do komórek migrujących do podłoża hodowlanego bez nadsączu.

Badania wpływu nadsączu na proliferację komórek HUVEC wykonane przy użyciu obrazowania komórek w czasie rzeczywistym oraz za pomocą technik cytometrii przepływowej nie wykazały wpływu nadsączu na proliferację stymulowanych komórek HUVEC. Cytometryczne test przeżycia komórek HUVEC także nie wykazały różnic pomiędzy komórkami stymulowanymi nadsączami 24h hAM, a nie stymulowanymi.

Badania wpływu nadsączu na migrację komórek jednojądrzastych szpiku kostnego, w komorze Boydena ujawniły wpływ nadsączu na migracje komórek. Komórki migrowały 1,5 raza szybciej w kierunku podłoża zawierającego nadsącz 24h hAM. Badania cytometryczne markerów proliferacji komórek stymulowanych nadsączami lub nie stymulowanych hodowanych w podłożu minimalnym nie ujawniły wpływu nadsączu na proliferację. Natomiast badanie różnicowania komórek szpiku przeprowadzonych w metylocelulozie (CFU-Assay) wykazały większą o 6,5 raza liczbę komórek linii erytroidalnej w stosunku do komórek nie stymulowanych nadsączami 24h hAM. Badania cytometryczne komórek szpiku stymulowanych nadsączami nie wykryły wpływu nadsączu na przeżywalność komórek jednojądrzastych.

Badania wpływu nadsączu 24h hAM przeprowadzone na komórkach Jurkat, nie ujawniły wpływu nadsączu na migrację, proliferację i aktywację oraz przeżycie komórek Jurkat. Wyniki były podobne jak w odpowiednich kontrolach.

Otrzymane wyniki sugerują, że nadsącz z owodni może być źródłem czynników wzrostu. Czynniki te mogą spełniać funkcje chemotaktyczne dla wybranych komórek. Uważa się, że reperfuzja naczyń krwionośnych jest spowodowana przede wszystkim migracją komórek śródbłonna, nadsącz z owodni więc mógłby wspomagać ten proces. Właściwości chemotaktyczne nadsączu mogłyby mieć także zastosowanie w regeneracji ran. Niektóre badania sugerują udział komórek hematopoetycznych w gojeniu ran. Nadsącz mając właściwości chemotaktyczne dla komórek jednojądrzastych szpiku, mógłby być wykorzystywany w celu lepszego gojenia rany. O bezpieczeństwie użycia nadsączu mogą natomiast sugerować wyniki przeprowadzone na komórkach Jurkat. Nadsącz nie miał wpływu na te białaczkowe komórki co może sugerować, jego bezpieczne użycie nawet u potencjalnych pacjentów nowotworowych.