

Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych

Umbilical cord blood as a source of nerve and stem cells

Izabela Winkler¹, Teresa Kamińska², Agnieszka Bojarska-Junak³, Marek Gogacz¹,
Tomasz Rechberger¹, Aneta Adamiak¹, Jacek Tabarkiewicz⁴, Martyna Kandefer-Szerszeń²

¹ II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

² Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMCS, Lublin, Polska

³ Katedra i Zakład Immunologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

⁴ Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Wydział Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem naszych badań była ocena zdolności proliferacyjnej komórek macierzystych krwi pępowinowej i możliwości ich różnicowania się w hodowli *in vitro*.

Materiał i metody: Materiałem do badań było 14 próbek krwi pępowinowej (10-15ml) pobranych z żyły pępowinowej natychmiast po przecięciu sznura pępowinowego (w przebiegu naturalnych porodów) do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant. Próbkę przechowywano w temperaturze od 4°-8° nie dłużej niż 24 godziny. Komórki jednojądrzaste izolowano z krwi pępowinowej metodą wirowania na gradiencie gęstości na Lymphoprep (Axis-Shield), a następnie z interfazy izolowano komórki CD34 przy użyciu sortera VarioMACS i przeciwciał anti-CD34 (Caltag Laboratories). Hodowle długoterminowe prowadzono w podłożu IMDM (Sigma) lub IMDM+ Neurobasal (Gibco) z dodatkiem GM-CSF (10ng/ml) i NGF (10ng/ml). Identyfikację jakościową komórek z krwi pępowinowej przeprowadzono metodą barwienia May-Grünwalda-Giemsy, przy pomocy zdjęć wykonanych mikroskopem konfokalnym, oraz metodą immunoenzymatyczną.

Wyniki: Komórki macierzyste CD34+ w pełnej krwi pępowinowej w naszych badaniach stanowiły 1,16% komórek jednojądrzastych, zaś po wirowaniu na lymphoprepie 0,37% leukocytów. Nawet po 60 dniach prowadzenia hodowli bez dodatku czynników wzrostu komórki CD34+ były obecne we frakcji komórek adherentnych. Część komórek krwi pępowinowej po stymulacji GM-CSF i NGF przekształcała się w komórki nerwowe (wykazano obecność neuronospecyficjnej enolazy), a także w komórki o morfologii zbliżonej do fibroblastów i komórek dendrytycznych.

Wnioski: Komórki krwi pępowinowej po stymulacji mieszaniną cytokin GM-CSF i NGF dzielą się w hodowlach długoterminowych, przekształcają w komórki nerwowe oraz w komórki o morfologii zbliżonej do fibroblastów i komórek dendrytycznych

Słowa kluczowe: **komórki macierzyste / komórki nerwowe / krew pępowinowa /**

Adres do korespondencji:

Izabela Winkler

II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie,

ul. Jaczewskiego 9, 20-954, Lublin, Polska

e-mail: ikochans@interia.pl

Otrzymano: 18.12.2014

Zaakceptowano do druku: 26.02.2015

Izabela Winkler et al. *Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych.*

Abstract

Objectives: The aim of the study was to assess proliferative ability of the stem cells in the umbilical cord blood and their potential to differentiate in in vitro culture.

Material and methods: The material consisted of 14 samples of umbilical cord blood collected from the umbilical cord vein. Mononuclear cells were isolated using the method of density gradient medium. Next, CD34 cells were isolated from the interphase with the use of the VarioMACS sorter and anti-CD34 antibodies. Long-term cultures were conducted on Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM) with addition of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and nerve growth factor (NGF). Qualitative identification was performed using the May-Grünwald-Giemsa staining method, taking photographs with a confocal microscope, and with the immunoenzymatic method.

Results: In our research, CD34+ stem cells constituted 1.16% of the mononuclear cells, and after centrifugation in medium 0.37% of leukocytes in whole umbilical cord blood. Even after 60 days of culture without addition of the growth factors, CD34+ cells were present in the fraction of adherent cells. After stimulation with GM-CSF and NGF, a part of the umbilical cord blood cells were transformed into nerve cells (presence of neuron-specific enolase was shown) and into cells morphologically similar to fibroblast and dendritic cells.

Conclusions: After stimulation with GM-CSF and NGF cytokines, the umbilical cord blood cells proliferate in long-term medium, transform into nerve cells and into cells similar to fibroblast and dendritic cells.

Key words: **umbilical cord blood / stem cells / nerve cells /**

Wykaz używanych skrótów:

- CD** – (cluster of differentiation) marker różnicowania
CFU-GM – (colony-forming units – granulocyte and macrophage) komórki tworząca kolonie granulocytowe i makrofagowe
DC – (dendritic cells) komórki dendrytyczne
Epo – (erythropoietin) erytropoetyna
FACS – (fluorescent erythropoietin activated cell sorter) urządzenie służące do izolacji komórek posiadających określony antygen na powierzchni komórki
FCS – (fetal calf serum) płodowa surowica bydlęca
FITC – (fluorescein isothiocyanate) izotiocyanian fluorosceiny
GFAP – (glial fibrillary acid protein) kwaśne białko glejowe
GFP – (green fluorescence protein) zielone białko fluorosceinyjne
GM-CSF – (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych
HLA-DR – (human leukocytes antigens – DR) ludzkie antygeny leukocytarne zgodności tkankowej - DR
IL – (interleukin) interleukina
IMDM – (Iscove's modified Dulbecco medium) podłoże Dulbecco modyfikowane przez Iscove'a
MIP-1 α – (macrophage inflammatory protein 1) białko zapalne makrofagów 1
MGG – (reagent May-Grünwald Giemsa) odczynnik May-Grünwalda Giemsa
NGF – (nerve growth factor) czynnik wzrostu nerwów
PBS – (phosphate buffered saline) buforowany roztwór soli fizjologicznej
PE – (phycoerythrin) fikoerytryna
RA – (retinoic acid) kwas retinowy
SCF – (stem cell factor) czynnik wzrostu komórek macierzystych
TGF- β – (transforming growth factor β) transformujący czynnik wzrostu β
TNF – (tumor necrosis factor) czynnik wzrostu nowotworów

Wstęp

W 1989 roku Broxmeyer wykazała, że krew pępowinowa jest bogatym źródłem hematopoetycznych komórek macierzystych. Różnią się one składem, liczbą jak i właściwościami biologicznymi od komórek krwi obwodowej i szpiku kostnego [1]. Łączny odsetek komórek macierzystych identyfikowany na podstawie obecnego na ich powierzchni antygeny CD34 wynosi około 1% komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej, 1-3% komórek szpiku kostnego oraz 0,01% komórek krwi obwodowej

osób dorosłych [2]. Mayani i wsp. wykazali, że komórki krwi pępowinowej tworzą więcej kolonii hodowli in vitro, a po stymulacji cytokinami IL-3, IL-6, SCF, Epo i GM-CSF wytwarzają 8-11 razy więcej komórek potomnych [2]. Cairo i wsp. stwierdzili, że komórki te cechują się większą zdolnością samoodnowy niż komórki macierzyste z pozostałych źródeł [3]. Unikalna dla krwi pępowinowej jest obecność populacji limfocytów T CD3-/CD8- stanowiących prekursorów dojrzałych limfocytów T CD4+ i CD8+. Mniejsza jest także ogólna liczba limfocytów CD4+/CD8+ we krwi pępowinowej. Dodatkowo krew ta ma większą liczbę komórek CD45RA+, ale mniejszą liczbę dojrzałych komórek T CD45 RO+ w porównaniu do krwi obwodowej osób dorosłych. Aktywowane komórki krwi pępowinowej mają mniejszą niż komórki osób dorosłych zdolność do wytwarzania takich cytokin jak: G-CSF, GM-CSF, IL-3, M-CSF, TGF- β , MIP-1[3]. Mayani i wsp. udowodnili też, że około 6% komórek CD34+ krwi pępowinowej posiada samoistną zdolność tworzenia kolonii bez dodatku czynników wzrostu [2].

Krwiotwórcze komórki macierzyste krwi pępowinowej mają morfologię podobną do małego limfocytu o gęstym, skondensowanym jądrze i skąpej cytoplazmie. Charakteryzują się fenotypem: CD34+, c-kit R+, CD38-, CD33-, Thy-1+, CD71-, HLA-DR-, CD45RA-. Słabo gromadzą rodaminę, co dowodzi ich małej aktywności metabolicznej oraz słabo wybarwiają się barwnikiem Hoechst co dowodzi, że krwiotwórcze komórki macierzyste mają skondensowany i niereplikujący się DNA.

Ze względu na konieczność zachowania niezmienionej puli komórek macierzystych, dzieląca się komórka macierzysta otwiera jedną komórkę potomną, a druga zaś może różnicować się w kierunku krwiotwórczej komórki ukierunkowanej, która traci zdolność do samoodnowy. Nabywa za to możliwość proliferowania i tworzenia klonów komórek potomnych jednej lub kilku linii krwiotwórczych. Komórki macierzyste krwi pępowinowej są pod wieloma względami unikalne, mają długie telomery oraz aktywny enzym telomerazę. Posiadają zdolność pozostawania w fazie G₀ cyklu komórkowego, dzięki czemu mają 1000 razy większą zdolność tworzenia komórek progenitorowych niż komórki w fazie G₁ [4].

Izabela Winkler et al. *Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych.*

Ostatnie badania wskazały, że komórki macierzyste krwi pępowinowej także *in vitro* są zdolne do różnicowania się w różne typy komórek. Mimo, iż pochodzą z mezenchymy mogą tworzyć komórki endodermy (np. hepatocyty) i ektodermy (np. neurony) [5]. Podczas prowadzenia hodowli stwierdzono, że część komórek przykleja się do podłoża stałego (komórki adherentne), reszta zaś pozostaje w zawieszynie (komórki nieadherentne). Komórki adherentne generowane z krwi pępowinowej można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich charakteryzuje się obecnością markerów hematopoetycznych (np. makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne), zaś druga wykazuje ekspresję innych markerów niż hematopoetyczne (komórki mięśniowe, fibroblasty, osteoklasty, adipocyty, neurony).

Cel pracy

Celem naszych badań była: ocena zdolności proliferacyjnych komórek macierzystych krwi pępowinowej jak również możliwości różnicowania się uzyskanych komórek macierzystych w komórki dendrytyczne, nerwowe, fibroblasty oraz identyfikacja jakościowa i ilościowa komórek powstałych w trakcie hodowli.

Materiał i metody

Materiałem do badań było 14 porcji krwi pępowinowej (10-15ml) pobranych z żyły pępowinowej natychmiast po przecięciu sznura pępowinowego (w przebiegu porodów siłami natury) do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant. Próbkę przechowywano w temperaturze 4°-8°C nie dłużej niż 24 godziny.

Metody

Izolacja komórek jednojądrzastych

Pozyskaną krew pępowinową rozcieńczono zbufozowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS, Biomed, Lublin) w stosunku 1:1. Tak przygotowaną krew nawarstwiano na płyn do izolacji Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegia), po czym wirowano przez 20 minut z prędkością kątową 2800 obrotów/minutę. Po odwirowaniu powstała interfaza zawierająca leukocyty przenoszono za pomocą sterylnej pipety pasteurowskiej do probówki i dwukrotnie płukano. W trakcie pierwszego płukania, komórki zawieszono w PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} w ilości 10 ml, wirowano przez 5 minut z prędkością 2800 obrotów/min. W trakcie drugiego płukania komórki zawieszano ponownie w PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} jednakże w ilości 5 ml i wirowano z prędkością kątową 2800 obrotów/min. Supernatant odrzucano a powstały osad komórek zawieszano w 0,5 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} .

Izolacja komórek CD34+ z krwi pępowinowej przy użyciu sortera VarioMACS (Miltenyi Biotec, GmbH, Niemcy)

Do osadu komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi pępowinowej metodą wirowania na gradiencie gęstości przy użyciu Lymphoprepu dodawano 10 μ l (na 10⁸ komórek) odczynnika blokującego receptor FcR przeciwciała IgG w celu uniknięcia niespecyficznego wiązania przeciwciał. Równocześnie dodawano 10 μ l przeciwciała anti-CD34 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) związanego z mikrokulkami. Mieszaninę inkubowano w lodówce (4°C) przez 30 minut, płukano w buforze MACS i przenoszono na kolumnę MS+/RS+ umieszczoną w sorterze magne-

tycznym VarioMACS. Komórki wyznakowane przeciwciałem anti-CD34 pozostawały na kolumnie a pozostałe komórki (negatywna frakcja) spływały z kolumny do probówki. Komórki CD34 wyplukiwano buforem MACS z kolumny, po wyjęciu z separatora. Następnie komórki CD34 zawieszono w buforze MACS wirowano przez 5 minut z prędkością 2800 obrotów/min. Powstały w ten sposób osad zawieszano w 1 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} .

Hodowla komórek krwi pępowinowej w obecności cytokin GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) i NGF (ang. *nerve growth factor*).

Wyizolowane komórki, zawieszano w podłożu IMDM (ang. *Iscove's modified Dulbecco medium*, Sigma, Niemcy) z dodatkiem 20% FCS (ang. *fetal calf serum*, Gibco BRL, USA) w proporcji 1x10⁵ komórek/ml podłoża i umieszczano w 8-dołkowych płytkach hodowlanych z dodatkiem antybiotyków: 100 U/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny (Sigma-Aldrich, Niemcy). Hodowlę kontrolną stanowiły komórki bez dodatku cytokin. Do części hodowli komórkowych dodawano cytokinę GM-CSF (Life Technology, USA) o stężeniu 10 ng/ml a do pozostałej części hodowli dodano mieszaninę cytokin GM-CSF i NGF (R&D Systems, USA), każda o stężeniu 10 ng/ml. Hodowlę prowadzono przez okres 4-8 tygodni w cieplarni (temp 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Co 7 dni z każdego dołka hodowlanego odbierano połowę płynu hodowlanego i uzupełniano nowym z odpowiednim stężeniem cytokin. Przez cały czas prowadzenia hodowli komórki oceniano w mikroskopie świetlnym i identyfikowano po wykonaniu preparatów barwionych metodą MGG (May-Grünwald Giemsa, Sigma, Niemcy).

Analiza komórek w mikroskopie konfokalnym

Do wyizolowanych komórek CD34 zawieszonych w 1 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} dodawano 2 μ l zielonego białka fluorescencyjnego – GFP (ang. *green fluorescence protein*), który wnikał do żywych komórek. Następnie inkubowano przez 5 minut i płukano dwukrotnie PBS przez 5 min z prędkością 2800 obrotów/min. Supernatant odrzucano a osad komórkowy zawieszano w 200 μ l PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Na odfuszczone szkiełko podstawowe dodawano kroplę zawiesiny komórek i oglądano w mikroskopie konfokalnym (Carl Zeiss, Niemcy). Skanowanie komórek CD34+ odbywało się przy użyciu obiektywu Plan Apo-chromat x 63 i olejku immersyjnego-Immersol 518N. Do analizy komórek użyto program LSM 5 Pascal Software.

Analiza cytometryczna komórek krwi pępowinowej po izolacji na Lymphoprepie

Do probówek zawierających po 100 μ l komórek jednojądrzastych wyizolowanych na Lymphoprepie dodawano 5 μ l przeciwciał CD34-PE (Caltag Laboratories, USA) – próbka badana i taką samą objętość przeciwciał IgG1-FITC/IgG2a-PE (Caltag Laboratories, USA) do sporządzenia kontroli. Komórki inkubowano przez 20 minut w ciemności. Po inkubacji wirowano komórki przez 5 minut z prędkością 2800obrotów/min. Supernatant odrzucano a osad zawieszano w 100 μ l PBS i bezpośrednio analizowano w cytometrze przepływowym FACS Calibur (Becton Dickinson, USA).

Izabela Winkler et al. *Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych.*

Analiza cytometryczna pełnej krwi pępowinowej

Do próbki zawierającej 100µl pełnej krwi pępowinowej dodawano 5µl stężonego przeciwciała CD34-PE a do drugiej zawierającej tę samą ilość krwi dodawano 5µl IgG1-FITC/Ig2a-PE (kontrola). Następnie inkubowano przez 20 minut bez dostępu światła. Po inkubacji dodawano 2ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i wirowano przez 5 minut z prędkością 2800 obrotów/min. Następnie w celu eliminacji erytrocytów dodawano 2 ml płynu lizującego (Ortho Diagnostic Systems, A Johnson&Johnson Company, USA), pozostawiając próbki przez 10 minut w ciemności. Następnie wirowano przez 5 min z prędkością 2800 obrotów/min, supernatant odrzucano, a osad zawieszano w 100µl PBS i bezpośrednio analizowano w cytometrze przepływowym.

Analiza cytometryczna komórek adherentnych z hodowli prowadzonej przez 60 dni

Po usunięciu zawiesiny komórek nieadherentnych, kilkakrotnie przepłukano dołki PBS (1 dołek – komórki inkubowane z GM-CSF, 2 dołek – komórki inkubowane z GM-CSF+NGF) a następnie dodawano 1 ml roztworu trypsyny z EDTA pozostawiając odczynnik na kilka sekund. Po zebraniu trypsyny z EDTA dodawano 1 ml PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i energicznie pipetowano w celu rozbicia agregatów komórek. Następnie odklejone komórki adherentne zawieszono w PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} wirowano przez 10 minut z prędkością 5000 obrotów/min. Po wirowaniu supernatant odrzucano a osad zawieszano w 200µl PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Otrzymaną zawiesinę komórek rozdzielano na dwie porcje komórek. Do 1 próbki dodawano 2µl przeciwciała anti-CD34-PE, a do 2 próbki dodawano IgG1-FITC/Ig2a-PE (kontrola). Komórki inkubowano przez 20 minut bez dostępu światła, wirowano przez 5 minut z prędkością 2500 obrotów/min, a następnie osad zawieszano w 100µl PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i analizowano w cytometrze przepływowym FACS Calibur.

Barwienie preparatów metodą MGG (May-Grünwald-Giemsa)

Wysuszone preparaty krwi pępowinowej na szkiełkach podstawowych zalewano nierozcieńczonym odczynnikiem May-Grünwalda (Sigma, Niemcy) w celu ich utrwalenia. Po 2 minutach dodawano taką samą ilość wody destylowanej i pozostawiano na dalsze 2 minuty. Odczynnik zlewano ze szkiełka, a następnie utrwalony preparat zalewano barwnikiem Giemsa (Sigma, Niemcy) (rozcieńczonym 20 razy). Po upływie 10-15 minut odczynnik zlewano a preparat spłukiwano dużą ilością wody destylowanej, suszono i oglądano w mikroskopie świetlnym.

Identyfikacja komórek nerwowych i macierzystych metodą immunocytochemiczną

Metoda identyfikacji służy do wykrywania charakterystycznych antygenów komórkowych. Składa się z kilku etapów. Pierwszy ma na celu redukcję niespecyficznych oddziaływań między komórkami poprzez inkubację z wodą utlenioną, a następnie z surowicą. Kolejny etap to wiązanie się przeciwciał monoklonalnych z określonym antygenem, po czym są przyłączane kolejne przeciwciała związane z substratem, który jest przekształcany przez kompleks enzymatyczny w barwny produkt ukazujący miejsce lokalizacji antygeny.

W celu utrwalenia komórek aspirowano płyn z hodowli, następnie dodawano schłodzoną mieszaninę metanolu i kwasu

octowego (3 ml metanolu i 1 ml kwasu octowego) i inkubowano przez 5 minut. Następnie delikatnie ściągano w/w mieszaninę i preparat przepłukiwano 3-krotnie PBS. Po ostatnim płukaniu, komórki barwiono według przepisu podanego przez firmę Serotec, stosując przeciwciała przeciwko neuronospecyficznej enolazie (Chemicon International, Temecula, CA, USA) - marker komórek nerwowych, anti-CD34+ (Serotec, Niemcy) - marker komórek macierzystych oraz system wybarwiający Star 2000 Streptavidin Detection System Mouse/Dab, Serotec, Niemcy. Preparat następnie suszono i analizowano w mikroskopie świetlnym przy zastosowaniu programu komputerowego Analysis.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników obejmowała wyliczenie wartości: średniej (M), mediany (Med), minimalnej (min), maksymalnej (max), odchylenia standardowego (SD) i 95% przedziału ufności (p). Ponieważ parametry te w większości nie wykazywały rozkładu normalnego, dlatego też do weryfikacji hipotez statystycznych użyto testów nieparametrycznych, takich jak:

- test Friedmana zastosowany do oceny istotnych różnic między średnimi gęstościami komórek (10^5 i 10^4 komórek/ml) w poszczególnych grupach badanych (kontrola, GM-CSF, GM-CSF+NGF) po 7, 14, 28, 56 dniach prowadzenia hodowli
- test *post hoc* do oceny czy średnie gęstości komórek w poszczególnych hodowlach różnią się między sobą,
- test Wilcoxa użyty do porównania istotnych różnic w hodowli komórkowej o gęstości 10^5 komórek/ml i o gęstości 10^4 komórek/ml w 7,14,28,56 dniu prowadzenia hodowli.

Za istotne statystycznie przyjęte zostały wyniki, których poziom istotności *p* był nie większy od 0,05. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono stosując program komputerowy Statistica 10.0PL (StatSoft, Inc, USA).

Wyniki

Do założenia hodowli użyto 14 próbek krwi pępowinowej (7 hodowli o gęstości $\times 10^5$ komórek/ml, 6 hodowli o gęstości $\times 10^4$ komórek/ml, hodowlę o numerze 12 nie wykorzystano do obliczeń statystycznych ze względu na słaby potencjał proliferacyjny), wszystkie próby wyprowadzenia hodowli powiodły się. (Tabela I). Pełna krew pępowinowa (11ml) zawierała 1293 (1,16%) komórek CD34+ wśród 111 941 wszystkich uzyskanych komórek jednojądrzastych, zaś krew po izolacji na Lymphoprep zawierała 212 (0,37%) komórek CD34+ wśród 57 812 mononuklearów krwi pępowinowej. (Tabela II, Ryc.1).

Hodowle prowadzono w dwóch wariantach: w pierwszym wyjściowa gęstość wynosiła 1×10^5 komórek/ml, natomiast w drugim 1×10^4 komórek/ml. W pierwszym wariantcie największy przyrost liczby komórek stwierdzono w hodowli z dodatkiem mieszaniny cytokin GM-CSF + NGF. (Tabela III). Oprócz tego hodowla ta szybciej proliferowała, osiągając najwyższą średnią gęstość $2,9 \pm 2,0 \times 10^5$ komórek/ml w 28 dniu hodowli. Test *post hoc* wykazał także istotnie wyższą gęstość komórek w 14 dniu prowadzenia hodowli bez czynników wzrostu i w hodowli z dodatkiem GM-CSF+NGF w porównaniu do 56 dnia ($p=0,05$). Istotnie wyższą gęstość wykazano także w hodowli komórkowej z dodatkiem GM-CSF w 14 i 28 dniu hodowli w porównaniu do 56 dnia hodowli (test *post hoc*, $p=0,05$).

Izabela Winkler et al. *Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych.***Tabela I.** Dane dotyczące krwi pępowinowej wykorzystanej w doświadczeniu.

Numer krwi	Godzina pobrania	Czas między pobraniem a preparatyką	Gęstość [komórek/ml]	Obserwacje
1	1 ⁴⁰	7h	2,6x10 ⁵	Hodowla rosła wolno, widoczne były pojedyncze formy fibroblastów
2	3 ²⁵	5h	8,6x10 ⁵	Hodowla o dużych zdolnościach proliferacyjnych, rosła bardzo szybko, podłoże zmieniane co trzy dni
3	1 ²⁵	7h	2,6x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych, po 35 dniach widoczne były komórki kształtu igielkowatego
4	6 ⁵⁰	2h	3,6x10 ⁵	Hodowla o słabych zdolnościach proliferacyjnych, rosła powoli ale po 30 dniach wytworzyły się komórki wydłużone
5	1 ³⁰	7h	2,75x10 ⁵	Hodowla o bardzo dużych zdolnościach proliferacyjnych, rosła szybko, po 7 dniach widoczne igielkowate formy
6	23 ⁴⁵	9h	4,3x10 ⁵	Hodowla o słabych zdolnościach proliferacyjnych
7	1 ²⁰	7h	4,9x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych, już po 14 dniach komórki wytwarzają liczne wypustki
8	3 ⁴⁰	5h	4,5x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych
9	5 ²⁵	3,5h	6x10 ⁵	Hodowla o dużych zdolnościach proliferacyjnych, po około 21 dniach pojawiają się komórki z rozgałęzieniami, a po 57 dniach tworzą się komórki neuronopodobne
10	5 ⁴⁵	3h	1,7x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych, pierwsze podziały po 30 dniach
11	4 ⁵⁰	4h	2x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych, po około 30 dniach pojawiają się komórki rozdęte o licznych ziarnistościach w cytoplazmie
12	2 ³⁵	6h	4,3 x10 ⁵	Hodowla o słabych zdolnościach proliferacyjnych
13	2 ³⁵	5h	2,6x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych, po 25 dniach pojawiają się komórki z pojedynczymi wypustkami
14	0 ⁴⁰	7h	6,3 x10 ⁵	Hodowla o średnich zdolnościach proliferacyjnych,

Tabela II. Analiza cytometryczna leukocytów izolowanych z krwi pępowinowej.

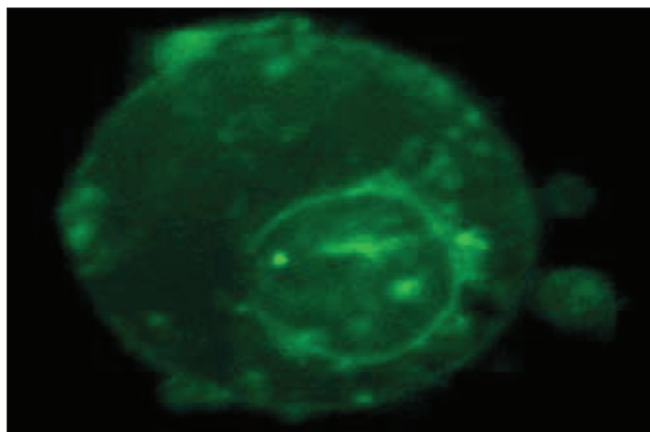
	Ogółem komórek	Liczba limfocytów	Liczba CD34+ wśród limfocytów	% CD34 wśród limfocytów
Krew pełna	401 115	111 941	1293	1,16
Leukocyty po izolacji na Lymphoprepie	71 520	57 812	212	0,37

Tabela III. Różnice pomiędzy średnią gęstością hodowli komórkowych (10⁵ komórek/ml) z dodatkiem GM-CSF i GM-CSF+NGF w poszczególnych dniach prowadzenia hodowli.

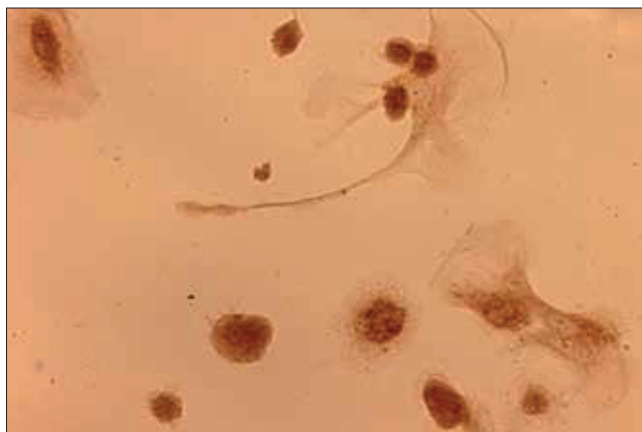
Parametry	Kontrola (10 ⁵ komórek/ml) Średnia±SD	GM-CSF (10 ⁵ komórek/ml) Średnia±SD	GM-CSF+NGF (10 ⁵ komórek/ml) Średnia±SD	Test Friedmana p
7 dni	1,17±0,1	1,5±0,4	1,7±0,3	0,0009
14 dni	1,3±0,2	1,9±0,6	2,6±0,7	0,001
28 dni	1,0±0,2	2,3±1,9	2,9±2,0	0,0009
56 dni	1,5±0,2	1,0±0,5	1,3±0,7	0,0009
Test Friedmana p	0,0003	0,01	0,05	

SD – odchylenie standardowe; GM-CSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych; NGF – czynnik wzrostu nerwów

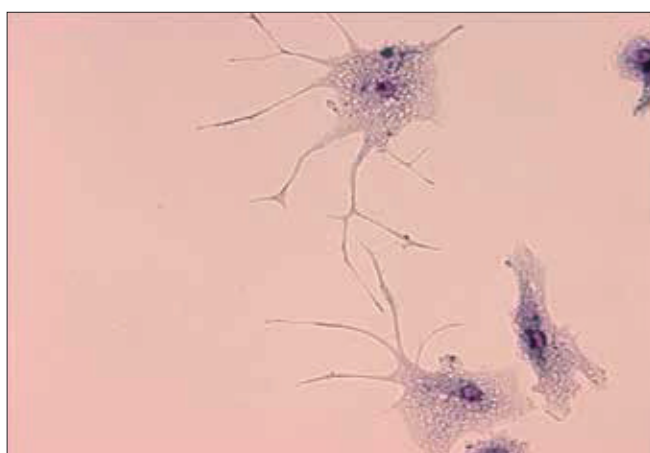
Izabela Winkler et al. Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych.



Rycina 1. Komórki CD34 po wyizolowane przy użyciu MACS o inkubacji z barwnikiem GFP, mikroskop konfokalny – powiększenie x 63.



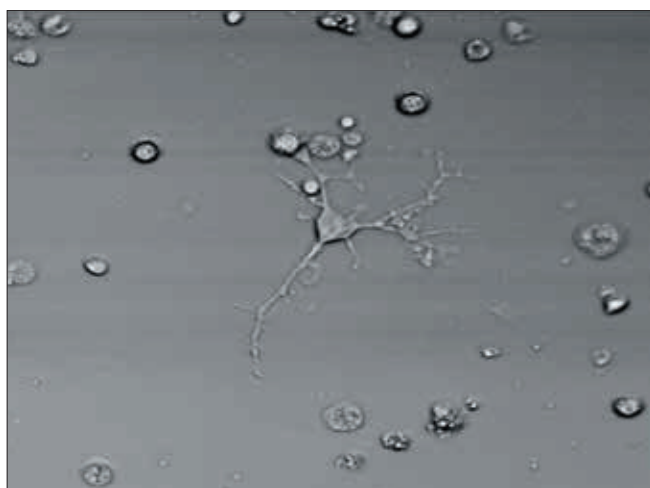
Rycina 4. Komórki charakteryzujące się obecnością neuronospecyficznego enolazy, mikroskop świetlny – powiększenie x 200.



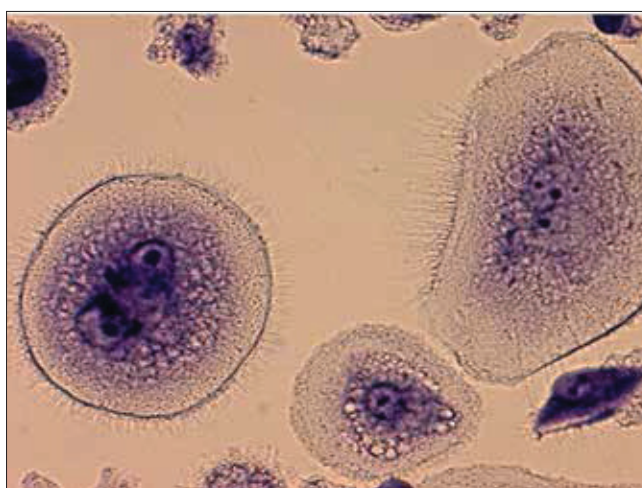
Rycina 2. Komórki neuronopodobne, 6-tydzień hodowli, barwienie MGG, mikroskop świetlny – powiększenie x 200.



Rycina 5. Komórki kształtem zbliżone do fibroblastów, hodowla 25 dniowa, mikroskop świetlny – powiększenie x 100.



Rycina 3. Komórka neuronopodobna, 3-tydzień hodowli, mikroskop konfokalny – powiększenie x 63.



Rycina 6. Komórki kształtem zbliżone do komórek dendrytycznych, Hodowla 7 dniowa, mikroskop świetlny – powiększenie x 400.

W przypadku drugiego wariantu także hodowla z mieszaniną cytokin proliferowała szybciej i osiągała największą koncentrację komórek tj. w 28 dniu prowadzenia hodowli średnia gęstość wynosiła $2,8 \times 10^4$ komórek/ml. (Tabela IV). Analiza testem *post hoc* wykazała istotnie wyższą gęstość komórek w 14 dniu hodowli

bez dodatku czynników wzrostu i z dodatkiem GM-CSF+NGF w porównaniu do 56 dnia prowadzenia hodowli ($p=0,05$). Także w przypadku hodowli z dodatkiem GM-CSF wyższa gęstość komórkowa występowała po 14 i 28 dniach prowadzenia hodowli niż po 56 dniach hodowli (test *post hoc*, $p=0,05$).

Tabela IV. Różnice pomiędzy średnią gęstością hodowli komórkowych (10⁴ komórek/ml) z dodatkiem GM-CSF i GM-CSF+NGF w poszczególnych dniach prowadzenia hodowli.

Parametry	Kontrola (10 ⁴ komórek/ml) Średnia±SD	GM-CSF (10 ⁴ komórek/ml) Średnia±SD	GM-CSF+NGF (10 ⁴ komórek/ml) Średnia±SD	Test Friedmana p
e7 dni	1,1±0,1	1,4±0,1	1,6±0,2	0,003
14 dni	1,2±0,1	1,4±0,6	2,3±0,5	0,008
28 dni	1,2±0,2	2,4±0,9	2,8±1,0	0,0004
56 dni	0,2±0,1	0,9±0,4	1,0±0,4	0,002
Test Friedmana p	0,003	0,002	0,002	

Tabela V. Analiza cytometryczna hodowli długoterminowej komórek krwi pępowinowej prowadzonej przez 60 dni.

	Ogólna liczba komórek	Liczba CD34+ wśród ogólnej liczby komórek	% CD34+ wśród ogólnej liczby komórek
Komórki adherentne po stymulacji GM-CSF	9882	16	1,6
Komórki adherentne po stymulacji GM-CSF i NGF	8038	18	2,2

Test Wilcoxon wykazał istotnie wyższą dynamikę proliferacji komórek w hodowli o gęstości $\times 10^5$ komórek/ml w 56 dniu prowadzenia hodowli niż w przypadku hodowli o gęstości wyjściowej $\times 10^4$ komórek/ml ($p=0,04$). Stwierdzono, że dodatek mieszaniny cytokin oraz większa gęstość wyjściowa komórek sprzyjała wzrostowi komórek.

Hodowlę leukocytów krwi pępowinowej z GM-CSF i GM-CSF + NGF prowadzono przez 60 dni. Komórki adherentne inkubowano z przeciwciałami anti-CD34 i analizowano w cytometrze przepływowym. W hodowlach stymulowanych GM-CSF + NGF stwierdzono 18 komórek CD34+ w ml objętości, zaś po stymulacji samym GM-CSF liczba komórek CD34+ wynosiła 16. (Tabela V).

W przypadku hodowli o większej gęstości wyjściowej komórki nerwowe stwierdzono po 21 dniach prowadzenia hodowli, zaś o mniejszej gęstości wyjściowej komórki nerwowe obecne były po 57 dniach prowadzenia hodowli. Obecność komórek nerwowych obserwowano za pomocą barwienia May-Grünwald-Giemsa, i w mikroskopie konfokalnym oraz potwierdzono metodą immunoenzymatyczną (wykazano obecność neuronospecyficznej enolazy). (Rycina 2, 3 i 4).

Podczas prowadzenia hodowli zaobserwowano, że prawdopodobnie z komórek CD34+ wytworzyły się komórki kształtem zbliżone do fibroblastów i komórek dendrytycznych. (Rycina 5 i 6).

Dyskusja

Krew pępowinowa jest cennym materiałem do badań oraz przeszczepów łatwo pozyskiwanym bez stwarzania jakiegokolwiek zagrożenia dla matki lub dziecka. Skład komórkowy krwi pępowinowej różni się od składu krwi dorosłych i próbek szpiku kostnego w zakresie występowania we krwi pępowinowej komórek macierzystych, które charakteryzują się dużym potencjałem proliferacyjnym, co jest z powodzeniem wykorzystywane w transplantologii hematologicznej.

Identyfikacji komórek macierzystych krwi pępowinowej dokonuje się na podstawie obecności antygenu powierzchniowego CD34+ odkrytego przez Civina w 1982 roku. W naszej pracy izolowano komórki CD34 wykorzystując metodę separacji komórek. Antygen CD34+ występuje na 0,4%–1,6% komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają te dane. Liczba komórek CD34+ w naszym doświadczeniu stanowiła 1,16% w pełnej krwi pępowinowej oraz 0,37% po izolacji na Lymphoprepie. Podczas prowadzenia hodowli wykazaliśmy, że po 60 dniach prowadzenia hodowli komórki CD34 były obecne we frakcji komórek adherentnych. Według Yoo i wsp. to właśnie komórki CD34 generują warstwę komórek adherentnych o morfologii przypominającej komórki śródbłonna. Stwierdzili oni, że w 35 dniu prowadzenia hodowli liczba komórek CD34 wynosiła $3,5 \times 10^4$ na $13,2 \times 10^4$ komórek adherentnych [5]. W naszym badaniu liczba komórek CD34 w 60 dniu prowadzenia hodowli wynosiła 16 lub 18 wśród $8,0$ – $9,8 \times 10^3$ komórek adherentnych. Przypuszczamy, że mniejsza liczba komórek CD34 w naszym modelu doświadczalnym mogła być spowodowana dłuższym czasem hodowli i różnicowaniem komórek CD34+ w komórki ukierunkowane.

Kolejnym etapem badań było założenie długoterminowych hodowli z leukocytów krwi pępowinowej. Z 14 próbek krwi pępowinowej założono hodowle z dodatkiem cytokin GM-CSF lub GM-CSF+NGF. Mimo różnic w warunkach przechowywania próbek krwi i innych parametrach takich jak warunki przebiegu porodu, wszystkie próby założenia hodowli powiodły się. Model hodowlany z zastosowaniem mieszaniny cytokin okazał się efektywniejszy w uzyskaniu proliferacji komórek, a gęstość 1×10^5 komórek/ml była korzystniejsza dla proliferacji. W 28 dniu hodowli o tej gęstości wyjściowej otrzymano średnią gęstość komórek- $2,9 \times 10^5$ komórek/ml, natomiast w przypadku mniejszej gęstości wyjściowej (1×10^4 komórek/ml), maksymalną liczbę komórek otrzymano także w 28 dniu prowadzenia hodowli – $2,8 \times 10^4$ komórek/ml. Według Huss większa gęstość wyjściowa

Izabela Winkler et al. *Krew pępowinowa jako źródło komórek nerwowych i macierzystych.*

komórek zapewnia lepsze środowisko warunkujące wzrost i różnicowanie komórek [6]. Nie bez znaczenia jest także wpływ czynników warunkujących jakość pozyskanego materiału jak: czas przechowywania krwi, czas preparatyki, użyty antykoagulant, wiek pacjentek czy długość pierwszej fazy porodu, która według Shlebak i wsp. koreluje z ilością kolonii CFU-GM [7]. Stojko i wsp. stwierdzili, że żywotność komórek macierzystych krwi pępowinowej wzrastała wraz ze spadkiem pH i pCO₂ [8]. Natomiast sposób ukończenia ciąży nie wpływał istotnie na żywotność komórek macierzystych. Model hodowlany z zastosowaniem GM-CSF mimo, iż okazał się mniej efektywny w stymulacji proliferacji komórek w porównaniu do modelu hodowlanego z zastosowaniem mieszanki GM-CSF + NGF, to w modelu tym stwierdzono większą liczbę komórek adherentnych. Według Guittierrez-Rodriguez i wsp. właśnie GM-CSF jest cytokiną mającą największy wpływ na wzrost liczby komórek adherentnych w hodowli [9]. Można przypuszczać, że NGF może mieć wpływ hamujący (przeciwstawny do GM-CSF) na proliferację komórek jednocześnie zwiększając ich adhezję.

Wielu autorów opisywało możliwość różnicowania się krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej w inne typy komórek [9, 10, 11, 12]. W naszych doświadczeniach oprócz wpływu na proliferację komórek stwierdzono także różnicowanie CD34+ do komórek o morfologii zbliżonej do komórek dendrytycznych (DC) i fibroblastów. Canguie i wsp. sugerują, że z komórek krwi pępowinowej można otrzymywać DC w wyniku ekspozycji na GM-CSF [10]. Jak wykazał Guittierrez-Rodriguez i wsp. rozwój komórek dendrytycznych jest uwarunkowany obecnością czynnika martwicy nowotworów (TNF) wytwarzanego przez komórki adherentne [9]. Komórki dendrytyczne generowane z komórek krwi pępowinowej zasługują na szczególną uwagę badaczy, ponieważ po ich uczuleniu antygenami nowotworowymi in vitro i podaniu pacjentowi indukują odpowiedź przeciwnowotworową. Komórki adherentne produkują także czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCF), który stymuluje wzrost fibroblastów. W naszych badaniach stwierdziliśmy obecność komórek podobnych do fibroblastów, zaś grupa badaczy pod kierunkiem Gutierrez-Rodriguez i wsp. nie stwierdziła ich występowania [9].

Z komórek krwi pępowinowej oprócz komórek dendrytycznych i fibroblastów można otrzymywać komórki nerwowe. Według Bużańskiej i wsp. krew pępowinowa zawiera multipotencjalne komórki nerwowe, które tworzą zróżnicowaną populację komórek nerwowych i glejowych, wykazujące ekspresję nestyny [11]. Także Sanchez-Ramos i wsp. stwierdzili komórki nerwowe wykazujące ekspresję markerów Musasashi-1 i β-tubuliny III w hodowli komórek z krwi pępowinowej z dodatkiem czynnika wzrostu nerwów (NGF) i kwasu retinowego (RA) [12]. W naszym doświadczeniu uzyskano komórki nerwowe wykazujące obecność neuronospecyficznego enolazy.

Terapia oparta na komórkach macierzystych krwi pępowinowej jest obecnie stosowana jako obiecująca alternatywa leczenia wielu chorób, w tym zawału mięśnia sercowego i dystrofii mięśniowej Duchenne'a ale także różnych chorób neurodegeneracyjnych. Ostatnio Ghaffaripour i wsp. wykazali selektywną migrację komórek macierzystych krwi pępowinowej do obszaru niedokrwiennego oraz zmniejszenie jego wielkości co wskazuje na potencjał komórek macierzystych do redukcji neurologicznych deficytów związanych z niedokrwieniem i niedotlenieniem [13].

Wnioski

Stymulacja proliferacji komórek jednojądrzastych mieszaną cytokin GM-CSF + NGF, jest korzystna dla wzrostu komórek w długoterminowych hodowlach oraz pozwala na otrzymanie komórek nerwowych, komórek o morfologii zbliżonej do fibroblastów i komórek dendrytycznych. W hodowli o dużej gęstości wyjściowej komórki nerwowe pojawiały się szybciej.

Duża wyjściowa gęstość hodowli była korzystna dla ekspansji komórek, gdyż pozwalała dłużej zachować żywotność i zdolność komórek do podziałów.

Krew pępowinowa zawiera komórki macierzyste charakteryzujące się antygenem CD34, które obecne były we frakcji komórek adherentnych nawet w 60 dniu prowadzenia hodowli.

Oświadczenie autorów

1. Izabela Winkler – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, wykonanie oznaczeń, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Teresa Kamińska – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, przygotowanie manuskryptu.
3. Agnieszka Bojarska-Junak – współautor tekstu pracy, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych.
4. Marek Gogacz – przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
5. Aneta Adamiak – przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
6. Tomasz Rechberger – przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
7. Jacek Tabarkiewicz – przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
8. Martyna Kandefers-Szerszeń – autor koncepcji i założeń pracy, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

Źródło finansowania: Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Broxmeyer H, Douglas GW, Hangoc G, [et al.]. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, 86 (10), 3828-3832.
2. Mayani H, Lansdorpb PM. Biology of human umbilical cord blood derived hematopoietic stem/progenitor cell. *Stem Cells*. 1998, 16 (3), 153-165.
3. Cairo M. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*. 1997, 90 (12), 4665-4678.
4. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, [et al.]. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells*. 2003, 21 (2), 217-227.
5. Yoo ES, Lee KE, Seo JW, [et al.]. Adherent cells generated during long-term culture of human umbilical cord blood CD34+ cells have characteristics of endothelial cells and beneficial effect on cord blood ex vivo expansion. *Stem Cells*. 2003, 21 (2), 228-235.
6. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cell from various sources. *Stem Cells*. 2000, 18, 1-9.
7. Shlebak AA, Roberts IA, Stevens TA, [et al.]. The impact of antenatal and perinatal variables on cord blood haemopoietic stem/progenitor cell yield available for transplantation. *Br J Haematol*. 1998, 103 (4), 1167-1171.
8. Stojko R, Jendyk C, Droszol-Cop A, [et al.]. Wpływ pH i pCO₂ krwi pępowinowej uzyskiwanej okoloporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych. *Ginekol Pol*. 2014, 85, 582-588.
9. Gutierrez-Rodriguez M, Maldonado-Reyes E, Mayani H. Characterization of adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2000, 18 (1), 46-52.
10. Canque B, Camus S, Dalloul A, [et al.]. Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+)CD7(+)CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2000, 96 (12), 3748-3756.
11. Bużańska L, Machaj EK, Zablocka B, [et al.]. Human cord blood-derived attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci*. 2002, 115, 2131-2138.
12. Sanchez-Ramos JR, Song SR, Kamath SG, [et al.]. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*. 2001, 171 (1), 109-115.
13. Ghaffaripour HA, Jalali M, Nikraves MR, [et al.]. Neuronal Cell Reconstruction with Umbilical Cord Blood Cells in the Brain Hypoxia-Ischemia. *Iran Biomed J*. 2015, 19 (1), 29-34.