

Received: 27.04.2017
Accepted: 29.05.2019
Published: 9.12.2019

Przygotowanie przeszczepów z błon płodowych i możliwości ich klinicznego wykorzystania

Preparation and clinical application possibilities of human amniotic membrane grafts

Agnieszka Klama-Baryła^{1,2}, Wojciech Smętek¹, Wojciech Łabuś¹, Diana Kitala^{1,2}

¹Centrum Leczenia Oparzeń im dr. Stanisława Sakiela, Siemianowice Śląskie, Polska

²Śląska Wyższa Szkoła Medyczna, Katowice, Polska

Streszczenie

W większości oddziałów ginekologiczno-położniczych łożysko jest odpadem biologicznym. Przekazanie łożyska do banku tkanek umożliwia wykorzystanie go jako źródła tkanek do przeszczepów. W transplantologii najczęściej jest wykorzystywana błona owodniowa. Właściwości błony owodniowej decydują o jej przydatności w ochronie organizmu przed zakażeniami bakteryjnymi, redukcji utraty białek, płynów, elektrolitów, zmniejszenia bolesności miejsc oparzonych i przyspieszenia gojenia. Owodnia jest bogata w składniki odżywcze i ma niewielką immunogenność, dlatego często jest stosowana jako substytut skóry. W Polsce owodnia ludzka jest przygotowywana w bankach tkanek jako przeszczep biostatyczny lub biowitalny. Opracowano różne metody przygotowania przeszczepów owodniowych tak, aby były skuteczne w leczeniu chirurgicznym i nie stwarzały ryzyka przeniesienia chorób zakaźnych. W artykule przedstawiono obecne zastosowanie kliniczne owodni ludzkiej i innych rodzajów przeszczepów przygotowanych z łożyska, przede wszystkim w leczeniu ran o różnej etiologii. Opisano również nowe możliwości wykorzystania przeszczepów owodniowych w innych schorzeniach. Przeszczepy takie są często alternatywną terapią w sytuacji, gdy standardowe leczenie nie przynosi pożądaných wyników. Mają one szczególne zalety w stosunku do wielu innych dostępnych bioaktywnych terapii, takie jak m.in. niski koszt, łatwość manipulacji, zdolność do promowania migracji komórek i ich proliferacji oraz stymulacji aktywności komórek macierzystych. Poza ludzkim materiałem tkankowym do ich przygotowania mogą być wykorzystane łożyska pozyskane od zwierząt jako alternatywne źródło tkanek do przeszczepów.

Słowa kluczowe:

łożysko • błona owodnia • kosmówka • komórki macierzyste • leczenie ran • przeszczepy biostatyczne • przeszczepy biowitalne

Summary

In the majority of obstetric and gynaecological wards, the fetal membranes along with the rest of the placenta are usually discarded as medical waste. However, donating placenta to the Tissue Bank may provide a highly valuable source of graft material. One of the most common tissues used in clinical transplantation is amniotic membrane. The unique properties of amnion make it highly beneficial not only in preventing bacterial infections, protein loss, fluids and electrolytes disturbances, but also in reducing burn wound pain and accelerating healing processes. Due to its abundance of nutrients and low immunogenicity, it is often used as a skin substitute. Human amnion may be prepared in tissue banks, as biostatic or biovital grafts. In order to increase surgical treatment efficiency and to prevent the risk of potential

	transmission of infectious diseases, a number of methods of amniotic graft preparation have been developed. This paper presents the current clinical possibilities of applying human amnion and other types of placenta tissue grafts in the treatment of wounds of various etiology. It also describes new application areas of fetal membranes for other diseases. Placental grafts are extensively used as an alternative therapy in situations when standard treatment does not produce desirable outcomes. The properties of placental grafts including i.a. low cost, easy manipulation, capability of promoting cell migration and proliferation and stimulation of stem cell activity, making them highly beneficial in comparison to many other bioactive therapies. The alternative source of graft preparation may also be harvested from animal placenta, which makes it an alternative source of supply to human tissues.
Keywords: GICID DOI: Word count: Tables: Figures: References:	placenta • amniotic membrane • amniotic mesenchymal • stem cells • wound healing • biostatic grafts • biovital grafts 01.3001.0013.6286 10.5604/01.3001.0013.6286 3742 – 1 29

Adres autorki: Dr n. med. Agnieszka Klama-Baryła, Centrum Leczenia Oparzeń im dr. Stanisława Sakiela w Siemianowicach Śląskich, ul. Jana Pawła II 2, 41-100 Siemianowice Śląskie; e-mail: aklama@clo.com.pl

WSTĘP

W większości oddziałów ginekologiczno-położniczych łożysko jest odpadem biologicznym. Przekazanie go do banku tkanek umożliwia wykorzystanie go jako źródła tkanek do przeszczepów. Urodzone w trzeciej fazie porodu łożysko ma kształt okrągłego worka o średnicy 15–20 cm i grubości 3 cm [19]. Średnio waży 500 g, a proporcja w stosunku do masy dziecka wynosi 1:6 i zajmuje około 30% macicy. Jest zbudowane z dwóch części: płodowej i matczynej. Część płodowa składa się z kosmówki pokrytej od wewnątrz gładką i przezroczystą błoną owodniową. Od tej części łożyska odchodzi pępowina, umiejscowiona w środkowej części. Matczyzna część jest gąbczastą i chropowatą błoną doczesną. W transplantologii najczęściej jest wykorzystywana błona owodniowa. Jest to cienka, półprzepuszczalna tkanka, w życiu płodowym od wewnątrz wypełniona płynem owodniowym. Grubość owodni to 0,02–0,5 mm [19]. Składa się z trzech warstw: nabłonka, błony podstawnej i beznaczyniowej warstwy komórek mezenchymalnych. Pojedyncza warstwa komórek nabłonkowych, spoczywająca na błonie podstawnej, obmywana jest płynem owodniowym. Błona podstawowa jest zbudowana z kolagenu typu I, II i V oraz proteoglikanów. Mezenchymalne fibroblastopodobne komórki, otoczone substancją międzykomórkową, budują warstwę owodni, bogatą w kolagen. Ze względu na dużą zawartość proteoglikanów, glikoprotein i obecność sieci niewłóknistego kolagenu typu III, ta warstwa owodni (granicząca bezpośrednio z kosmówką), przypomina w budowie histologicznej gąbkę o dużej

wytrzymałości. Budowa ta sprawia, że w procesie przygotowania przeszczepów łożyskowych można łatwo oddzielić mechanicznie owodnie od kosmówki [19].

PRZYGOTOWANIE PRZESZCZEPÓW OWODNIOWYCH DO WYKORZYSTANIA KLINICZNEGO

Przeszczepy w bankach tkanek mogą być przetwarzane różnymi metodami. Wiele alloprzeszczepów (pozyskanych od dawców tkankowych) i ksenograftów (uzyskanych z tkanek zwierzęcych) jest całkowicie pozbawiana komórek. Proces usuwania komórek ma na celu wyeliminowanie immunoreaktywnych składników komórkowych i czynników białkowych, pozostawiając nienaruszony strukturalnie szkielet (biologicznie obojętny). Szkielet jest zbudowany z matrycy zewnątrzkomórkowej. Taki zabieg zmniejsza ryzyko odrzucenia zarówno heteroprzeszczepów, jak i przeszczepów allogenicnych (np. ludzkiej skóry właściwej).

Natomiast owodnia i inne przeszczepy przygotowane z tkanek łożyska pochodzą z immunologicznie obojętnej tkanki. Tkanki płodowe zawierają niewielkie ilości antygenów HLA (ludzki antygen leukocytarny) i nie wywołują odpowiedzi immunologicznej. W związku z tym wystarczy jedynie delikatne ich oczyszczenie w celu usunięcia krwi i zbędnych pozostałości tkankowych, przy zachowaniu naturalnej aktywności biologicznej przeszczepu, bez całkowitego usuwania komórek.

W celu zapewnienia skutecznego wykorzystania omawianych przeszczepów, w leczeniu chirurgicznym

i minimalizacji ryzyka przeniesienia chorób zakaźnych, opracowano różne metody przygotowania przeszczepów z tkanek płodowych.

Łożysko rodzi się w trzeciej fazie porodu i w większości jednostek medycznych klasyfikowane jest jako odpad biologiczny. Matka może zdecydować się na oddanie łożyska do banku tkanek wówczas, gdy nie zagraża to zdrowiu jej ani dziecka. Łożyska są zazwyczaj pozyskiwane podczas cięć cesarskich. Dzięki tej procedurze można uzyskać materiał tkankowy w warunkach aseptycznych bez przechodzenia przez kanał rodny. Dawczynie muszą zostać przebadane w kierunku chorób zakaźnych, w tym HIV (ludzki wirus niedoboru odporności), zapalenia wątroby typu B i C oraz kiły, zgodnie z obowiązującymi wymogami prawnymi.

Pozyskane łożyska są płukane w roztworze soli fizjologicznej, po czym umieszczone w dokładnie opisanym pojemniku transportowym wypełnionym płynem transportowym. Płyn to roztwór soli fizjologicznej i antybiotyków. Skład mieszaniny antybiotyków jest odpowiednio dobrany zgodnie z aktualną sytuacją mikrobiologiczną szpitala. Pojemnik transportowy z materiałem tkankowym musi zostać oznakowany w sposób jednoznacznie pozwalający na identyfikację. Do czasu transportu do banku tkanek materiał tkankowy, powinien być przechowywany w specjalnej lodówce w temperaturze +4°C.

Następny etap to końcowa kwalifikacja materiału tkankowego, przeprowadzana po uzyskaniu wszystkich niezbędnych danych, w tym wyników badań wirusologicznych dawczyń. Po zakończeniu kwalifikacji pozyskane łożysko jest transportowane do pomieszczenia banku tkanek, w celu dalszej preparatyki. W laboratorium przeznaczonym do obróbki materiału tkankowego, w warunkach sterylnych pod komorą laminarną są przygotowywane przeszczepy owodniowe (ryc. 1). Owodnia jest poddawana pięciokrotnemu cyklowi płukania w roztworze soli fizjologicznej na wytrząsarce w temperaturze +4°C. Każde płukanie trwa 5 minut. Po przeniesieniu owodni pod komorę laminarną następuje ręczne oddzielenie owodni od warstwy kosmówkowej. Owodnię należy wypłukać w roztworze soli fizjologicznej o temperaturze +4°C. Płukanie powtarza się do czasu uzyskania czystego roztworu. Następnie owodnię rozkłada się na szklanej płytce stomatologicznej i sterylnymi gazikami usuwa nadmiar krwi i śluzu. Kolejny etap preparatyki polega na odcięciu skalepek nierównych fragmentów, a następnie na zmierzeniu powierzchni przeszczepów. Tak przygotowane przeszczepy są pakowane próżniowo do trzech sterylnych woreczków. Na drugim worku opakowaniowym naklejana jest etykieta z kodem znakowania tkanek ISBT 128 (International Standard for Blood Transfusion). Kod zawiera takie informacje jak: nazwa przeszczepu, numer donacji, powierzchnię przeszczepu oraz dane teleadresowe banku tkanek, w którym przeszczep został wypreparowany. Na etykietce znajduje się również wskaźnik przeprowadzenia procesu sterylizacji. Tak oklejone i oznaczone przeszczepy zapakowane w potrójne woreczki, są przechowywane

w temperaturze -80°C do czasu transportu materiału na sterylizację radiacyjną. Przeszczepy transportuje się w temperaturze -70°C zapewnionej przez suchy lód wypełniający pojemnik transportowy.

Po sterylizacji przeprowadza się badania mikrobiologiczne mające na celu dopuszczenie przygotowanych biostatycznych przeszczepów owodni do użytku klinicznego. Po uzyskaniu ujemnych wyników badań mikrobiologicznych oraz dopuszczeniu do użytku klinicznego na podstawie dokumentacji medycznej dawcy, przeszczepy mogą być wykorzystane.

Najczęstszym sposobem konserwacji przeszczepów tkankowych, w celu zapobiegania ich degradacji, jest kriokonserwacja, czyli zamrażanie w niskich temperaturach. Zamrażanie to może zapobiec zniszczeniu tkanek, przez obniżenie aktywności enzymatycznej i chemicznej, przy jednoczesnym hamowaniu wzrostu mikroorganizmów. Kriokonserwowane przeszczepy wymagają jednak specjalistycznego transportu i przechowywania oraz nadzoru temperaturowego tych procesów. Do tego celu konieczne jest wykorzystanie ciekłego azotu, suchego lodu lub niskotemperaturowych zamrażarek często w temperaturze -80 lub -150°C. W kriokonserwacji konieczne jest zastosowanie krioprotektantów, takich jak dimetylosulfotlenek (DMSO) czy gliceryna, w celu zmniejszenia formowania się kryształów lodu w komórkach. Lód wewnątrz komórek może zniszczyć ich błony i uszkodzić macierz zewnątrzkomórkową. Zastosowanie krioprotektantów może jednak być cytotoksyczne w wysokich stężeniach lub przy dłuższym czasie ekspozycji, co wymaga starannego wypłukania ich z tkanek przed przeszczepem.

Coraz bardziej popularną alternatywą dla kriokonserwacji jest odwodnienie tkanek, które można przeprowadzić przez ich liofilizację, czyli suszenie sublimacyjne. Odwodnienie chroni tkanki, bez konieczności zamrażania ich w suchym lodzie czy ciekłym azocie. Istnieje jednak ryzyko, że proces ten może zmienić mikrostrukturę tkanek i ich macierz zewnątrzkomórkową.

Przeszczepy owodniowe mogą być dodatkowo wyjaławiane, aby zmniejszyć ryzyko chorób zakaźnych pochodzących z tkanki dawcy. Wprawdzie są one przygotowywane w warunkach aseptycznych, lecz nie zapewnia to całkowitego bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Dlatego w celu zmniejszenia ryzyka zakażenia bakteryjnego lub wirusowego, przeprowadzana jest sterylizacja np. promieniowaniem gamma albo napromieniowaniem wiązką elektronów. Wysokie poziomy promieniowania mogą potencjalnie sieciować i wywoływać denaturację białek w obrębie tkanki podanej napromieniowaniu. Podstawową jednak zaletą tego procesu jest zachowanie aktywności biologicznej wyjałowionych tkanek zarówno klinicznie, jak i w badaniach *in vitro* [15, 28]. Dane te sugerują, że sterylizacja znacząco nie zmniejsza aktywności biologicznej przeszczepów owodniowych, a dodatkowo zapewnia maksymalne bezpieczeństwo pacjentów [9, 15, 28].

Każda technika przygotowania przeszczepów owodniowych ma swoje zalety i wady. Jednak jej podstawowym celem jest przetwarzanie tkanek w sposób zapewniający maksymalne bezpieczeństwo pacjentów. Procedura przygotowania przeszczepów musi dodatkowo zachować naturalne właściwości i aktywność biologiczną przeszczepów, co zapewnia maksymalną ich skuteczność, w tym wspomaganie gojenia ran.

ZASTOSOWANIE KLINICZNE PRZESZCZEPÓW PRZYGOTOWANYCH Z ŁOŻYSKA

Dotychczasowe zastosowania kliniczne udowodniły niezwykłą skuteczność przeszczepów, które można przygotować z łożyska. Najczęściej jest wykorzystywana błona owodniowa. Jednowarstwową owodnię stosuje się od wielu lat w celu gojenia powierzchni oczu.

ZASTOSOWANIE BŁONY OWODNIOWEJ W LECZENIU RAN

W Polsce wykorzystanie owodni w leczeniu rozległych ran skóry ogranicza się do jednego monospecjalistycznego szpitala. Związane jest to z istnieniem w strukturze tego szpitala Banku Tkanek, w którym przygotowywane są przeszczepy owodniowe o dużej powierzchni, dostosowane do leczenia rozległych ubytków skóry. Bank Tkanek przygotowuje zarówno przeszczepy o wymaganej powierzchni, jak również o określonych właściwościach (krioprezerowane lub liofilizowane, biostatyczne lub biowitalne), w zależności od indywidualnego zapotrzebowania klinicznego [27]. Poza zaopatrywaniem rozległych ubytków skóry, o wiele częściej leczenia miejscowego wymagają płytkie rany. U pacjentów z płytkimi ubytkami skóry, powstałymi w wyniku oparzeń (termicznych, chemicznych), urazów mechanicznych, czy toksycznej epidermolizy naskórka (TEN), przeszczep owodni jest podstawową chirurgiczną metodą leczenia [11, 25]. Dzięki właściwościom błony owodniowej jest alternatywną metodą leczenia poważnych ubytków skóry, w stosunku do standardowego leczenia z wykorzystaniem przeszczepów własnych pacjenta [3, 4, 7, 18].

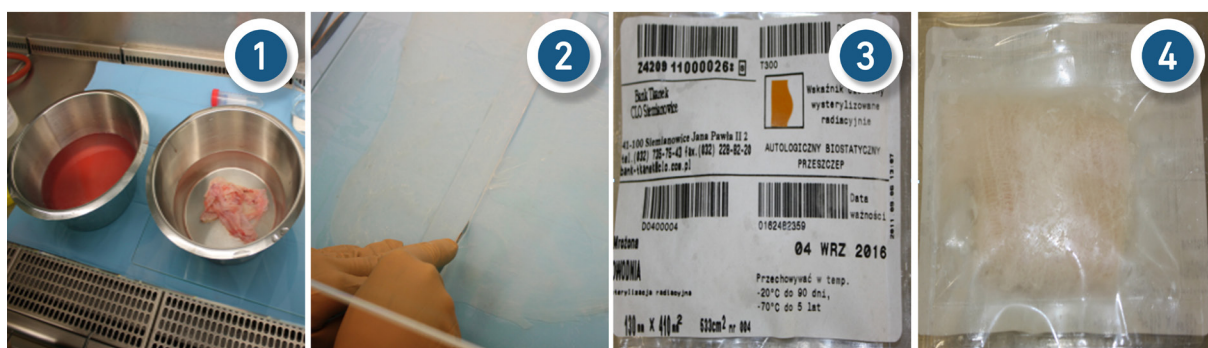
Dane literaturowe wskazują na skuteczność zastosowania przeszczepu owodniowego w leczeniu owrzodzeń stopy cukrzycowej (DFUs – diabetic foot ulcer) [7]. W badaniach tych połączono zastosowanie przeszczepu owodniowego z opatrunkami typu Total Contact Cast (TCC). TCC to dobrze dopasowane, częściowo usztywniające stopę, opatrunki z lekkiego gipsu, pozwalające na odciążenie chorej stopy bez większych ograniczeń. Do ich wykonania stosuje się szybko utwardzalne włókna syntetyczne, których ułożenie wokół stopy daje równomierny rozkład nacisku, zarówno na skórę nieuszkodzoną, jak i bezpośrednio na ranę i jej najbliższe otoczenie. Rana musi być wcześniej prawidłowo oczyszczona i zabezpieczona. Zastosowanie owodni w połączeniu z TCC, doprowadziło do zamknięcia rany w przebiegu DFUs u wszystkich badanych, w tym u pacjentów ze skomplikowanym owrzodzeniem stopy cukrzycowej, trwającym co najmniej 1 rok, u których nie uzyskano pozytywnych wyników, stosując standardowe leczenie [1].

ZASTOSOWANIE BŁONY OWODNIOWEJ W REGENERACJI NERWÓW I CHRZĄSTKI

Wykazano przydatność substancji zewnątrzkomórkowej owodni w regeneracji nerwów obwodowych [22]. Ponadto stwierdzono, iż błona owodniowa jest biodegradowalnym szkieletem z unikalnymi właściwościami biochemicznymi i mechanicznymi sprzyjającymi regeneracji nerwowej [22]. Przedstawiono również możliwość wykorzystania owodni pozbawionej komórek jako warstwy odżywiającej dla części komórek macierzystych potrzebnych do różnicowania neuronów [20]. Może ona także służyć jako nośnik chondrocytów i być wykorzystywana w regeneracji chrząstki [12].

ZASTOSOWANIE BŁONY OWODNIOWEJ W GINEKOLOGII

Zespół Ashermana cechuje się obecnością zrostów macicy powstałych podczas gojenia się endometrium, co może doprowadzić do częściowej lub całkowitej niedrożności jamy macicy [19]. Objawia się to u pacjentek skąpyimi miesiączkami (utrata krwi poniżej 30 ml) lub brakiem miesiączek, niepłodnością lub innymi komplikacjami okołoporodowymi. Zwłóknienia te leczy się histerosko-



Ryc. 1. Wybrane etapy produkcji allogenicznych, biostatycznych przeszczepów owodni ludzkiej: 1 – etap płukania pozyskanej błony płodowej, 2 – etap przycinania nierównych fragmentów i pomiar powierzchni przeszczepów, 3 – oznakowanie przeszczepów w systemie znakowania tkanek – ISBT 128, 4 – pakowanie przeszczepu przed sterylizacją radiacyjną

powo, jednak dodatkowe zastosowanie błon owodniowych polepsza regenerację endometrium. W badaniach, które obejmowały ocenę bezpieczeństwa i skuteczności przeszczepu błony owodniowej po leczeniu histeroskopowym, udowodniono zmniejszenie nawrotów zrostów i lepszą regenerację endometrium [19].

ZASTOSOWANIE BŁONY OWODNIOWEJ W STOMATOLOGII

Błona owodniowa została również wykorzystana w leczeniu choroby Millera klasy I i II recesji dziąseł. W badaniach tych porównano skuteczność błony owodniowej z przeszczepem autologicznego nabłonka jamy ustnej. Wyniki tych badań wykazały, że zastosowanie zamiast autologicznego przeszczepu błony śluzowej jamy ustnej – błony owodniowej, ma porównywalne działanie, eliminując przy tym konieczność powstania rany w miejscu dawczym, co ma decydujący wpływ na samopoczucie pacjenta. Przedstawione badania przemawiają za zastosowaniem błony owodniowej, jako alternatywy dla przeszczepu autologicznego [16]. Błona owodniowa została również wykorzystana w leczeniu stanów zapalnych przyzębia [13]. W badaniach klinicznych porównano skuteczność błony owodniowej w połączeniu z odbiałczoną, zmineralizowaną kością wołową (BBM – bovine bone mineral), w stosunku do membrany kolagenowej (CM – collagen membrane) z BBM. Wykazano, że zarówno zastosowanie błony owodniowej, jak również membrany kolagenowej w połączeniu z odbiałczoną zmineralizowaną kością wołową BBM, poprawia stany przyzębia u badanych pacjentów. Błona owodniowa nie powodowała znaczącej recesji dziąsła. Dzięki swym właściwościom jest rozpatrywana jako nowa membrana barierowa w leczeniu tych schorzeń [14]. Innym schorzeniem z zakresu chirurgii szczękowo-twarzowej jest pourazowe zeszywnienie stawu skroniowo-żuchwowego, ograniczające funkcję żuchwy. Błona owodniowa ze względu na zdolność do dopasowania anatomicznego, nieimmunogeny charakter i niski koszt pozyskania została wykorzystana w leczeniu następstw urazu, które są odpowiedzialne za ograniczenie funkcjonalności żuchwy. W badaniu wykazano, że błona owodniowa jest biozgodnym materiałem mogącym znaleźć zastosowanie w chorobie zeszywnienia stawu skroniowo-żuchwowego, aby zapobiec nawrotom i doprowadzić do odzyskania zadawalającej funkcjonalności [2].

WYKORZYSTANIE BŁONY OWODNIOWEJ W CHOROBIE NOWOTWOROWEJ

W badaniach *in vitro* wykazano przydatność błony owodniowej w leczeniu chorych nowotworowo ze względu na jej właściwości, takie jak zahamowanie angiogenezy i wydzielania czynników proapoptotycznych. Badanie miało na celu ocenę: wpływu kriokonserwowanej błony owodniowej na indukcję śmierci komórek nowotworowych i jej właściwości antyangiogenne. Komórki nowotworowe traktowano świeżą i zamrożoną błoną, oceniając ich angiogenezę, a także poziomy czynników antyangiogennych. Wykazano, że żywotność hodowanych komórek

nowotworowych nie miała istotnych statystycznie różnic między świeżą i zamrożoną błoną owodniową. Te obiecujące wyniki wskazują, że właściwości indukcji śmierci komórek nowotworowych i antyangiogeniczne właściwości błony owodniowej są utrzymywane nawet w przypadku błony kriokonserwowanej [21].

ZASTOSOWANIE BŁONY OWODNIOWEJ W ZAPOBIEGANIU POWSTAWANIA BLIZN

Inną obiecującą cechą błony owodniowej jest zdolność do redukcji tkanki bliznowatej – jako tkanka płodu znacznie minimalizuje bliznowacenie [17]. Wykazano, że ludzkie komórki nabłonka pochodzenia owodniowego sprzyjają gojeniu się ran i hamują powstawanie blizn w mechanizmie parakrynnym [29]. Mikropęcherzyki błonowe (egzosomy), pochodzące z ludzkich komórek nabłonka owodniowego, wykorzystano w leczeniu ran i hamowaniu powstawania blizn na modelu zwierzęcym. Udowodniono zmniejszenie odkładania się macierzy pozakomórkowej (ECM – extracellular matrix), przy zastosowaniu egzonów pochodzenia owodniowego (w stężeniu 100 µg/ml). Proces ten prawdopodobnie był spowodowany zwiększeniem ilości metaloproteinazy-1 (MMP-1) w skórze [29]. Leczenie to znacząco poprawiło gojenie się ran skóry u badanych zwierząt, dzięki tworzeniu się uporządkowanych włókien kolagenowych [29].

WYKORZYSTANIE KLINICZNE WIELOWARSTWOWEGO PRZESZCZEPU OWODNI I KOSMÓWKI (DHACA)

Przeszczepy przygotowane z łożyska mogą zawierać pojedynczą warstwę tkanki owodniowej albo owodnia może być połączona z warstwą kosmówki, tworząc wielowarstwowy przeszczep. Połączenie błony owodniowej i kosmówki jest wykorzystywane w przygotowaniu grubszych przeszczepów.

Porównano skuteczność aseptycznie przygotowanej owodni i kosmówki (dHACA – dehydrated human amnion and chorion allograft), ze standardowym leczeniem niegojących się przewlekłych owrzodzeń stopy cukrzycowej DFUs. Udowodniono, że aseptycznie przygotowany opatrunek owodni i kosmówki leczy rany w stopie cukrzycowej istotnie szybciej niż standardowe leczenie. Po 6 i 12 tygodniach stosowania dHACA dochodziło do wyleczenia ran, z minimalnymi stratami przeszczepu [8].

WYKORZYSTANIE KLINICZNE INNYCH RODZAJÓW PRZESZCZEPÓW ŁOŻYSKOWYCH

Wprawdzie badania naukowe i kliniczne koncentrowały się głównie na błonie owodniowej, coraz częściej inne tkanki łożyskowe budzą znaczące zainteresowanie jako przeszczepy tkankowe, wspierające gojenie się ran. Ze względu na strukturalne i funkcjonalne różnice, tkanki łożyskowe mogą dostarczać alternatywnych produktów wykorzystywanych w leczeniu ubytków skóry różnego pochodzenia. Budowa strukturalna i biologiczny skład białkowy i płynu owodniowego wskazuje, iż podob-

nie jak błona owodniowa, mogą z powodzeniem zostać zastosowane klinicznie. Przeszczepy o większej grubości sprawdzają się w przypadkach, gdy istnieje konieczność przysycia ich do rany. Przeszczepy płynne stwarzają natomiast możliwość implantacji do miejsca docelowego przez iniekcję. Oprócz pepowiny również galareta Whartona może być wykorzystana klinicznie.

Zarówno pepowina, jak i galareta Whartona mają dużą zawartość kwasu hialuronowego i liczne regulatorowe czynniki wzrostu i cytokiny. Ze względu na większą grubość pepowiny w stosunku do błony owodniowej, pepowina może być łatwiejsza do manipulacji, w sytuacji, gdy pożądanym jest grubszy przeszczep do leczenia głębokich ran. Warto zwrócić również uwagę, iż skład białek regulatorowych przyspieszających gojenie – zawartych w pepowinie jest porównywalny do występującego w owodni.

Płyn owodniowy może być podany do rany w postaci płynnego przeszczepu przez iniekcję. Zawiera czynniki wzrostu, cytokiny, białka, węglowodany, lipidy, hormony, elektrolity, kwas hialuronowy, a także inne składniki odżywcze, pełniące funkcję ochronną i regulatorową procesu zapalnego i promując procesy regeneracyjne [6, 10, 26]. Mimo nielicznych danych literaturowych dotyczących płynu owodniowego, istnieją badania wskazujące, że wstrzyknięcie płynu owodniowego jest bezpieczne, zmniejsza odczuwanie bólu u pacjentów i wspomaga gojenie ran [5, 24]. Na modelach przedklinicznych w badaniach *in vivo* wykazano, że płyn owodniowy ułatwia gojenie się ran oparzeniowych czy ubytków chrząstki, kości, ścięgna i urazów nerwów [3, 23]. Urazy powstałe podczas uprawiania sportów można leczyć z wykorzystaniem iniekcji płynnych przeszczepów, uzyskanych z tkanek łożyska. Leczenie takie stosowano w łagodzeniu bólu i do przyspieszania gojenia tkanek miękkich, jak również w stanach zapalnych w urazach powięzi podeszwy [28].

ŁOŻYSKO JAKO ŹRÓDŁO KOLAGENU

Łożysko jest również bogatym źródłem kolagenu, zwłaszcza kolagenu typu I. Dlatego też kolagen pochodzenia łożyskowego jest obecnie przedmiotem badań jako źródło do opracowania rusztowań kolagenowych w postaci gąbki lub jako wypełniacz pustych przestrzeni w istniejących matrycach (np. AmnioFill™, MiMedx Group, Inc.). Ponadto w niezwiązanej postaci, oczyszczony kolagen pochodzenia łożyskowego, stosuje się również do wytwarzania usieciowanych włókien kolagenowych, do produkcji nici i materiałów stosowanych w regeneracji ścięgien (np. CollaFix™, MiMedx Group, Inc.).

ŁOŻYSKA ODZWIĘRZĘCE JAKO NOWE ŹRÓDŁO TKANEK DO PRZESZCZEPY

Mimo coraz większej świadomości społecznej, która zwiększa ludzkie dawstwo owodni, w ośrodkach oparzeniowych brakuje błon owodniowych do przeszczepu. Spowodowane jest to wzrastającym zapotrzebowaniem

klinicznym na przeszczepy. Alternatywnym źródłem tkanek do przeszczepów mogą być łożyska pobrane od zwierząt. Nasz zespół badawczy przeprowadził wstępne badania, w ramach których pozyskano łożyska od świni transgenicznych, wypreparowując z nich przeszczepy owodniowe. Z badań tych wynika, że preparatyka owodni świńskiej nie różni się w większym stopniu od preparatyki owodni ludzkiej. W wyniku przeprowadzonych badań, z jednego pobrania łożysk od zwierząt transgenicznych przygotowano znacząco więcej przeszczepów w porównaniu do przeszczepów przygotowanych z materiału ludzkiego, co stanowi znaczną przewagę łożysk zwierzęcych w stosunku do tkanek ludzkich. Należy jednak zaznaczyć, że jest to jedynie alternatywne źródło i nie powinno zastąpić łożysk pochodzenia ludzkiego.

PODSUMOWANIE

Łożyska mają ogromny potencjał jako źródło tkanek do przygotowania przeszczepów biostatycznych i biowitalnych. Ich preparatyka jest przeprowadzana w bankach tkanek, zgodnie z obowiązującymi standardami i według opracowanych procedur. Tkanki łożyska są immunologicznie uprzywilejowane jako błony łączące matkę z płodem i wykazujące dużą tolerancję immunologiczną. Wyniki badań klinicznych wskazują, że zapewniają znaczącą poprawę procesu gojenia przez dostarczenie cytokin, które zmieniają środowisko rany i stymulują komórki endogenne, promując naturalny proces gojenia się ubytków skóry. Unikalne cechy tych przeszczepów wpływają na ich kliniczne wykorzystanie w leczeniu ran przewlekłych, oparzeń, w zespole Lyella, w chirurgii plastycznej i rekonstrukcyjnej, a także w wielu innych dziedzinach medycyny, m.in. w medycynie sportowej. Przeszczepy łożyskowe są często alternatywną terapią w sytuacji, gdy standardowe leczenie nie przynosi pożądanego wyniku. Przeszczepy te mają szczególne zalety w stosunku do wielu innych dostępnych bioaktywnych terapii, w tym niski koszt, łatwość manipulacji, niską immunogenność i antibakteryjne właściwości, modulację stanu zapalnego, zdolność do promowania migracji komórek i ich proliferacji oraz stymulacji aktywności komórek macierzystych. Te reakcje komórkowe wpływają pozytywnie na proces gojenia ran przez przyspieszanie przebudowy tkanek i hamowanie bliznowacenia. Niski koszt przygotowania przeszczepów, brak dylematów etycznych, sprzyja coraz większemu klinicznemu wykorzystaniu tkanek łożyskowych. Coraz częściej, mimo wzrastającej świadomości społecznej kobiet, a co za tym idzie zwiększenia dawstwa owodni, kliniczne zapotrzebowanie na tego typu przeszczepy przewyższa ich dostępność. Z powodu wykazanych wyżej zalet przeszczepów łożyskowych, konieczne jest podjęcie działań mających na celu upowszechnienie i zwiększenie wiedzy na temat możliwości ich klinicznego wykorzystania oraz zbudowanie sieci współpracy między szpitalami ginekologiczno-położniczymi a bankami tkanek.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abdo R.J.: Treatment of diabetic foot ulcers with dehydrated amniotic membrane allograft: a prospective case series. *J. Wound Care*, 2016; 25: S4-S9
- [2] Akhter M., Ahmed N., Arefin M.R., Sobhan M.U., Molla M.R., Kamal M.: Outcome of amniotic membrane as an interpositional arthroplasty of TMJ ankylosis. *Oral Maxillofac. Surg.*, 2016; 20: 63-71
- [3] Bazrafshan A., Owji M., Yazdani M., Varedi M.: Activation of mitosis and angiogenesis in diabetes-impaired wound healing by processed human amniotic fluid. *J. Surg. Res.*, 2014; 188: 545-552
- [4] Benirschke K., Burton G.J., Baergen R.N.: *Pathology of the Human Placenta*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2012
- [5] Bhattacharya N.: Clinical use of amniotic fluid in osteoarthritis: a source of cell therapy. W: *Regenerative Medicine Using Pregnancy-Specific Biological Substances*, red.: N. Bhattacharya, P. Stubblefield. Springer-Verlag, London 2011, 395-403
- [6] Burns C., Hall S.T., Smith R., Blackwell C.: Cytokine levels in late pregnancy: Are female infants better protected against inflammation? *Front. Immunol.*, 2015; 6: 318
- [7] Chen C.P., Aplin J.D.: Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. *Placenta*, 2003; 24: 316-325
- [8] DiDomenico L.A., Orgill D.P., Galiano R.D., Serena T.E., Carter M.J., Kaufman J.P., Young N.J., Zelen C.M.: Aseptically processed placental membrane improves healing of diabetic foot ulcerations: Prospective, randomized clinical trial. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*, 2016; 4: e1095
- [9] Fetterolf D.E., Snyder R.J.: Scientific and clinical support for the use of dehydrated amniotic membrane in wound management. *Wounds*, 2012; 24: 299-307
- [10] Hui A.Y., McCarty W.J., Masuda K., Firestein G.S., Sah R.L.: A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury and disease. *Wiley. Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2012; 4: 15-37
- [11] Inge E., Talmi Y.P., Sigler L., Finkelstein Y., Zohar Y.: Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*, 1991; 12: 285-288
- [12] Jin C.Z., Park S.R., Choi B.H., Lee K.Y., Kang C.K., Min B.H.: Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng.*, 2007; 13: 693-702
- [13] Kiany F., Moloudi F.: Amnion membrane as a novel barrier in the treatment of intrabony defects: a controlled clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 2015; 30: 639-647
- [14] Kim E.Y., Lee K.B., Kim M.K.: The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Rep.*, 2014; 47: 135-140
- [15] Koob T.J., Rennert R., Zabeck N., Massee M., Lim J.J., Temenoff J.S., Li W.W., Gurtner G.: Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing. *Int. Wound J.*, 2013; 10: 493-500
- [16] Lafzi A., Abolfazli N., Faramarzi M., Eyvazi M., Eskandari A., Salehsaber F.: Clinical comparison of coronally-advanced flap plus amniotic membrane or subepithelial connective tissue in the treatment of Miller's class I and II gingival recessions: A split-mouth study. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Den. Prospects*, 2016; 10: 162-168
- [17] Leavitt T., Hu M.S., Marshall C.D., Barnes L.A., Lorenz H.P., Longaker M.T.: Scarless wound healing: finding the right cells and signals. *Cell Tissue Res.*, 2016; 365: 483-493
- [18] Mahmoudi-Rad M., Abolhasani E., Moravvej H., Mahmoudi-Rad N., Mirdamadi Y.: Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2013; 38: 646-651
- [19] Mamede A.C., Carvalho M.J., Abrantes A.M., Laranjo M., Maia C.J., Botelho M.F.: Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res.*, 2012; 349: 447-458
- [20] Miyamoto K., Hayashi K., Suzuki T., Ichihara S., Yamada T., Kano Y., Yamabe T., Ito Y.: Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2004; 22: 433-440
- [21] Modaresifar K., Azizian S., Zolghadr M., Moravvej H., Ahmadiani A., Niknejad H.: The effect of cryopreservation on anti-cancer activity of human amniotic membrane. *Cryobiology*, 2017; 74: 61-67
- [22] Mohammad J., Shenaq J., Rabinovsky E., Shenaq S.: 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
- [23] Ozgenel G.Y., Samli B., Ozcan M.: Effects of human amniotic fluid on peritendinous adhesion formation and tendon healing after flexor tendon surgery in rabbits. *J. Hand Surg.*, 2001; 26: 332-339
- [24] Shimberg M.: The use of amniotic-fluid concentrate in orthopaedic conditions. *J. Bone Joint Surg.*, 1938; 20: 167-177
- [25] Tehrani F.A., Ahmadiani A., Niknejad H.: The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology*, 2013; 67: 293-298
- [26] Underwood M.A., Gilbert W.M., Sherman M.P.: Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J. Perinatol.*, 2005; 25: 341-348
- [27] Wilshaw S.P., Kearney J.N., Fisher J., Ingham E.: Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng.*, 2006; 12: 2117-2129
- [28] Zelen C.M., Serena T.E., Denozziere G., Fetterolf D.E.: A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *Int. Wound J.*, 2013; 10: 502-507
- [29] Zhao B., Zhang Y., Han S., Zhang W., Zhou Q., Guan H., Liu J., Shi J., Su L., Hu D.: Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J. Mol. Histol.*, 2017; 48: 121-132

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.