

Komórki macierzyste – biologiczne aspekty medycyny regeneracyjnej

Stem cells – biological aspects of the regenerative medicine

© GINEKOLOGIA I POŁOŻNICTWO 4 (10) 2008

Artykuł poglądowy/Review article

EWA BAUM, MICHAŁ MUSIELAK

Katedra Nauk Społecznych, Wydział Nauk o Zdrowiu,
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. Michał Musielak

Adres do korespondencji/Address for correspondence
Katedra Nauk Społecznych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań, Poland
tel./fax 061-8546911, e-mail: ebaum@ump.edu.pl

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count	3355/3116
Tabele/Tables	0
Ryciny/Figures	0
Piśmiennictwo/References	60

Received: 25.02.2008
Accepted: 07.07.2008
Published: 02.12.2008

Streszczenie

Wiek XXI jest okresem gwałtownego rozwoju nauk biologicznych. Odkrycia naukowe stają się oparciem dla opracowywania nowych technologii medycznych, między innymi stosowania komórek macierzystych w transplantologii, co się określa mianem medycyny regeneracyjnej. Komórki macierzyste, które występują nie tylko w zarodkach ludzkich, ale także w krwi pępowinowej i łożysku, czy u osobników dorosłych służą do naprawy uszkodzonych tkanek i narządów. Stan badań dotyczących rozwoju medycyny regeneracyjnej wskazuje na znaczny postęp w opracowaniu technik izolacji, hodowli i reimplantacji komórek macierzystych, co umożliwi naprawę uszkodzonych organów. Jednak stosowanie komórek macierzystych w transplantologii jest również przyczyną dylematów etycznych wynikających z faktu przekazywania materiału biologicznego od dawcy do biorcy. Uważa się, że przyszłość komórek macierzystych w transplantologii zależy nie tylko od postępu biologii, ale w równym stopniu od rozwiązania problemów etycznych wynikających z tej terapii.

Słowa kluczowe: medycyna regeneracyjna, komórki macierzyste, zarodkowe komórki macierzyste, płodowe komórki macierzyste, komórki macierzyste z krwi pępowinowej, komórki macierzyste dorosłych osób

Summary

XXI century is definitely a decade of a rapid development in biological science. Scientific discoveries are a base for new medical techniques development, especially for the use of stem cells in transplantology, what is defined as regenerative medicine. Stem cells found not only in human embryos but also in placenta and cord blood as well as in adults, are used for damaged tissues and organs regeneration. Regenerative medicine studies show a significant progress in the invention of isolation techniques, cells cultures and stem cells reimplantation what enables for damaged organs repair. However, stem cells application in transplantology might cause ethical dilemmas due to a donor-recipient biological material transfer. It is thought that the future of stem cells application in transplantology is dependant not only on progress in biological science but also on solving the ethical dilemmas of that therapy.

Key words: regenerative medicine, stem cells, embryonic stem cells, fetal stem cells, cord blood stem cells, adults stem cells

WSTĘP

Regeneracja polega na odtworzeniu części lub całego narządu z pozostałych komórek organizmu. Jednak zdolność ta jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia wyspecjalizowania organizmu: występuje u prymitywnych beztkankowych zwierząt wodnych, w mniejszym stopniu u stawonogów posiadających zdolność regeneracji odnóży, a w jeszcze bardziej w ograniczonym zakresie u kręgowców, gdzie przykładem regeneracji jest odtwarzanie oderwanego ogona przez jaszczurki [1].

U ssaków, a szczególnie u ludzi, zdolność do regeneracji tkanek, czy narządów jest ograniczona. Jest ona również zależna od okresu życia: większa zdolność do regeneracji występuje w okresie płodowym i bezpośrednio po urodzeniu. W kolejnych latach życia potencjał regeneracyjny organizmu ulega zmniejszeniu. Ponadto efektywność regeneracji nie jest jednakowa dla wszystkich tkanek i narządów. U ludzi wątroba jest narządem wykazującym dużą zdolność do odtwarzania, co jest znane od wieków. W klasycznej mitologii greckiej karą dla Prometeusza za wykradzenie ognia była codzienna tortura polegająca na wydziobywaniu jego wątroby przez orła, po czym narząd każdorazowo odrastał. Okazuje się, że w świetle współczesnej nauki ten mit grecki nie jest pozbawiony prawdy. Obecnie wiadomo, że nawet po usunięciu około $\frac{3}{4}$ części wątroby dochodzi w stosunkowo krótkim czasie do jej regeneracji [2]. Już w kilka godzin po usunięciu lub zniszczeniu części miększej wątroby pozostałe w niej hepatocyty proliferują, co powoduje odbudowę tego narządu. Proces ten jest regulowany przez wiele czynników, część stymulujących, innych ograniczających jego postęp. Dokładne poznanie tych mechanizmów może w przyszłości ułatwić regenerację tego narządu w oparciu o autologiczne komórki. W odróżnieniu od innych narządów człowieka, które wykazują zdolność do regeneracji (np. szpik kostny, skóra) odtwarzanie wątroby oparte jest na rozroście dojrzałych, wysoce zróżnicowanych komórek wątrobowych. Nie ogranicza to jednak w sposób istotny zdolności wątroby do regeneracji. Wykazano w badaniach doświadczalnych, że nawet po dwunastokrotnych częściowych resekcjach tkanki wątrobowej u szczurów dochodzi do odtwarzania tego narządu [3]. Hepatocyty są jednak pewnym wyjątkiem i w innych narządach dorosłych osobników regeneracja po uszkodzeniu tkanki oparta jest głównie na obecności komórek macierzystych, które posiadają zdolność do wzrostu i różnicowania w kierunku wyspecjalizowanych komórek poszczególnych tkanek. Jakkolwiek wykazano obecność komórek macierzystych w różnych narządach dorosłego organizmu człowieka, np. szpik kostny, skóra, drzewo oskrzelowe płuc, mięsień sercowy, trzustka, ich ilość jest znikoma, co może częściowo tłumaczyć słabe zdolności regeneracyjne obserwowane u ludzi.

INTRODUCTION

Regeneration denotes renewal of a part or lost organ from the remaining cells. However, that ability is inversely proportional to the degree of cells specialization: it occurs in primitive aquatic protozoa, to a smaller degree in arthropods (limbs regeneration) and in limited range in vertebrates (detached tail regeneration in lizards) [1].

In mammals, especially in humans, ability of damaged tissues or organs is limited. It is also dependant on life span with higher regeneration ability in fetal and post-birth period. The regenerative capability is reduced in time. Additionally, the effectiveness of regeneration is different for different tissues and organs. Liver has a great ability to regenerate, what was known for centuries. In Greek mythology Prometheus, for stealing the fire, has been punished by having an eagle of Zeus feast daily on his liver. Although it is only a myth, it is true in a way. It is widely known that the liver will restore within days after a resection of 75% of tissue [2]. After a few hours post resection or post trauma the remaining lobes enlarge and reconstitute the original size of the liver. The process is governed by regulatory growth factors both stimulatory and inhibitory. Knowing the mechanism of that restoration may in future facilitate hepatic regeneration based on autologous cells. Contradictory to other human organs regeneration (skin bone marrow), hepatic restoration is based on proliferation of mature, highly differentiated cells. However, it does not restrict significantly the regenerative capacity of the liver. Experimental studies on rats showed that even after 12 times repeated partial hepatectomy the capacity of regeneration in liver was not distorted [3]. However, hepatocytes are an exception; in other organs of adults the regeneration is possible due to presence of stem cells having the ability to grow and differentiate into specialized cells of different tissues. Although stem cells were detected in various human organs, e.g. bone marrow, skin, bronchial tree, myocardium, pancreas, the slender quantity of such cells does not allow for effective regeneration in humans.

MEDYCYNĄ REGENERACYJNA

Medycyna regeneracyjna – jest dziedziną medycyny, której celem jest odtwarzanie uszkodzonych tkanek i narządów ludzkiego organizmu.

Jeden z pionierów tego kierunku, doktor Yannas twierdzi, że w przypadku uszkodzenia jakiegokolwiek części ludzkiego ciała cały wysiłek organizmu jest ukierunkowany na proces gojenia i ograniczania reakcji systemowych, kosztem uszkodzonego narządu, który ulega zanikowi [4]. Taka reakcja jest uwarunkowana znikomą zdolnością regeneracyjną ludzkiego ciała, dlatego poszukiwano od wielu lat sposobów przezwyciężenia tej słabości organizmu ludzkiego, co było jedną z przyczyn rozwoju transplantologii. Postęp w tej dziedzinie zależał nie tylko od sprawności chirurgów, ale również znajomości immunologii, niezbędnej dla zahamowania odrzucania przeszczepionego narządu.

Pierwszą próbą transplantacji było wykonanie w 1954 roku przeszczepu nerek u bliźniaków, a w kolejnych latach wątroby (1963), trzustki (1966) i serca (1967) [5]. Kolejna transplantacja wykonana w 1968 roku dotyczyła szpiku kostnego i znaczenie tego zabiegu było szczególne. W przeciwieństwie do poprzednich przeszczepów, które dotyczyły dojrzałych, w pełni rozwiniętych morfologicznie i czynnościowo narządów, podczas przeszczepu szpiku wprowadza się do organizmu dawcy niezróżnicowane komórki pierwotne szpiku, które w organizmie biorcy ulegają przekształceniu w zróżnicowane komórki krwi [5]. Można przyjąć, że przeszczepianie szpiku było pionierskim, jakkolwiek może nieświadomym, pierwowzorem wykorzystania komórek macierzystych w medycynie.

Wraz z rozwojem transplantologii dokonano znacznego postępu w technikach hodowli komórek w warunkach *in vitro*, co zapoczątkowało rozwój nowej gałęzi medycyny regeneracyjnej, określanej mianem **inżynierii tkankowej**. Termin ten został wprowadzony w 1985 roku przez doktora Funga z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Diego, USA [5]. Podejmowano próby jednoczesowej, wspólnej hodowli różnych typów komórek dla wytworzenia w warunkach *in vitro* żywej tkanki, która mogłaby być przeszczepiona do żywego organizmu. W ten sposób została wyhodowana tzw. „sztuczna biologiczna skóra”, która została dopuszczona w 1998 roku w USA do użycia w praktyce klinicznej. Różne odmiany tego produktu pojawiały się w kolejnych latach. Alternatywnym podejściem było wytwarzanie podłoży składających się z biologicznych komponentów tkanki łącznej (glikozaminoglikany, kolagen), które po wszczepieniu do organizmu stawały się podłożem dla wzrostu autologicznych komórek skóry gospodarza, co zostało wprowadzone do praktyki klinicznej w 2002 roku, pod nazwą Integra®. Początkowe sukcesy na polu inżynierii tkankowej były impulsem do dalszych badań dotyczących innych tkanek i narządów. Jednym z bardziej spektakularnych projektów, ze względu na oczekiwania milionów ludzi cho-

REGENERATIVE MEDICINE

Regenerative medicine is a branch of medicine focused on the repair, replacement, or regeneration of cells, tissues, or human organs.

Doctor Yannas, the pioneer in regenerative medicine claims that in case of tissue damage the human organism will concentrate on healing process and will reduce systemic reactions, at the cost of damaged organ that atrophies [4]. It is due to limited regenerative capacity of a human body so effective strategies to overcome that weakness were taken, what constitute a basis for transplantology development. The progress on that field depended not only on surgical skills but also on immunological knowledge necessary for preventing the rejection of a graft.

The first kidney transplantation was performed in 1954 on genii and than liver transplantation in 1963, pancreas in 1966 and heart in 1967 [5]. Bone marrow transplantation in 1968 was particularly important. In contrast to previous procedures in which mature and developed morphologically and functionally organs were transplanted, in bone marrow transplantation undifferentiated primeval cells are transferred into the recipient body. Then they transform into differentiated blood cells [5]. It may be assumed that bone marrow transplantation was a pioneering but innocent prototype of stem cells application in medicine.

While rapid progress in field of *in vitro* cell culture techniques was made, the new branch of regenerative medicine begun, namely tissue engineering. The term was introduced by doctor Fung from University of California, San Diego, USA in 1985 [5]. The experiments on simultaneous common different cells culture to form *in vitro* vivid tissue that could be transferred to human body were taken. The artificial biological skin was made in that process and approved in 1998 for clinical application in 1998. A large variety of that skin was available in the next years. The other option was formation of the medium consisting of biological components of connective tissue (collagen, glycosaminoglycans), that, after application to donor's organism, was a basis for autologous recipient skin cells growth and was introduced for clinical practice as Integra in 2002. The success in tissue engineering stimulates further researches on other tissues and organs. A hybrid artificial pancreas project was one of the most spectacular due to high expectations of diabetic patients. The research started in 70-ties and concentrated on culturing pancreatic cells that could be, after application to donors body, a source of insulin [6]. At the turn of the last century extreme optimistic approach to the possibility of forming new organs *in vitro* was observed. In 2000 The Times claimed tissue engineering as the most interesting science that in the future could lead to developing new options in treatment of different disorders. It was optimistically supposed that *in vitro* human organs culturing will be shortly possible enabling their successful transplantation to a living human

rych na cukrzycę, były badania zapoczątkowane już w połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia, dotyczące hodowli komórek trzustki, które po wszczepieniu do organizmu mogłyby być źródłem insuliny dla organizmu gospodarza [6]. Przełom stulecia był okresem bardzo optymistycznego podejścia do możliwości wyhodowania w warunkach *in vitro* nowych narządów. W 2000 roku tygodnik *Time* uznał inżynierię tkankową za najbardziej atrakcyjną dziedzinę nauki, która w kolejnych latach miała dostarczyć nowatorskich rozwiązań w leczeniu wielu chorób. Nadzieje były bardzo duże i wielu optymistycznie zakładało, że możliwe będzie w niedalekiej przyszłości wyhodowanie narządów w warunkach hodowli *in vitro*, a następnie umieszczenie ich w organizmie człowieka, gdzie miałyby zastąpić uszkodzone tkanki, narządy [7]. Jednak wbrew tym oczekiwaniom, pomimo znacznych funduszy zaangażowanych w badania doświadczalne i kliniczne, odległe efekty terapeutyczne nie były zadawalające. Niektóre preparaty skóry ulegały degradacji w organizmie biorcy inicjując proces rozrostu tkanki łącznej i bliznowacenia, a próby wyhodowania komórek trzustki, które miały być źródłem insuliny w żywym organizmie spełzły na niczym [8]. W efekcie, wobec faktu, że ponad 90% funduszy na dotychczasowe badania z zakresu inżynierii tkankowej pochodziło od prywatnych inwestorów, brak spodziewanych klinicznych efektów tych prac skłaniał te firmy do wycofywania swojego zainteresowania tego typu działalnością. Brak funduszy oznaczał znaczne zahamowanie dalszych badań naukowych dotyczących inżynierii tkankowej. Jednocześnie zrozumiano, że nie jest możliwa pełna imitacja warunków jakie występują w żywym organizmie, z wielokrotnymi wzajemnymi oddziaływaniami na siebie wielu typów komórek, w stosunkowo prostym układzie hodowli *in vitro*.

W momencie załamywania się nadziei związanych z inżynierią tkankową dokonano odkryć biologicznych, które pośrednio lub bezpośrednio stworzyły nowe możliwości rozwoju medycyny regeneracyjnej. W 1996 roku w Szkocji sklonowano owcę Dolly [9], a następnie opublikowano pierwsze doniesienia opisujące wyizolowanie ludzkich komórek, embrionalnych komórek macierzystych [10,11]. Komórki macierzyste stały się na początku XXI wieku kolejną nadzieją medycyny regeneracyjnej.

KOMÓRKI MACIERZYTE – DEFINICJE

Podczas rozwoju organizmu człowieka, zapoczątkowanego powstaniem zygoty w wyniku zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik, dochodzi do szybkiego narastania liczby komórek z równoczesnym ich różnicowaniem w kierunku tkanek i narządów. Komórki we wczesnym stadiach rozwojowych organizmu charakteryzują się zdolnością do różnicowania w kierunku dowolnych tkanek, jednak w trakcie postępującej ich specjalizacji te właściwości ulegają stopniowemu zanikowi. Takie komórki określamy mianem **komórek**

being [7]. Despite those high expectations and large funds invested in that field, distant outcomes were not satisfactory. Some skin preparations degenerated in recipient body causing connecting tissue proliferation and scarring. Similarly, the researches on pancreas cells cultures collapsed [8]. Due to the lack of expected results, companies investing in tissue engineering (90% of the studies costs were sponsored by private investors) withdrew their funds what resulted in further researches discontinuation. It was also understood that in *in vitro* cultures the reconstruction of the conditions that were seen in living organisms with mutual cells interactions was not possible.

While the tissue engineering expectation were fading away, biological discoveries that directly or indirectly enables for further development of regenerative medicine, were made. Dolly sheep was cloned in 1996 in Scotland [9] and the results of the preliminary study on human embryonic stem cells isolation were published [10,11]. Stem cells were thus the next expectancy at the beginning of the new millennium.

STEM CELLS – DEFINITION

During human development that begins from the zygote formed as a result of fertilization a fast cellular proliferation with simultaneous differentiation to a different tissues and organs occurs. Cells in early developmental stages are able to differentiate to any type of tissue. However, this ability decreases gradually during the process of cells specialization. Those cells are named "stem cells" and are characterized by the following features:

- Ability to unlimited proliferation
- Ability to differentiate into other highly specialized cells

macierzystych lub **komórek pnia** (ang *stem cells*), których podstawowymi cechami są:

- zdolność do nieograniczonej liczby podziałów komórkowych,
- zdolność różnicowania się do innych wyspecjalizowanych komórek.

Nasilenie ekspresji tej drugiej cechy nie jest identyczne we wszystkich komórkach macierzystych i dlatego na tej podstawie można je podzielić na następujące grupy:

- A. Komórki totipotencjalne**, które mogą ulec zróżnicowaniu do każdego typu komórki; najlepszym przykładem tego typu komórek jest zygota.
- B. Komórki pluripotencjalne**, które mogą przekształcić się w dowolny typ komórek, z wyjątkiem totipotencjalnych. Takie właściwości posiadają komórki węzła zarodkowego blastocysty, które mogą dać początek komórkom multipotencjalnym i komórkom macierzystym poszczególnych listków zarodkowych: endodermy, ektodermy lub mezodermy.
- C. Komórki multipotencjalne**, przekształcające się do komórek o podobnym pochodzeniu embrionalnym (ektodermalnym, endodermalnym, mezodermalnym) i właściwościach.
- D. Komórki unipotencjalne**, które ulegają przekształceniu tylko do jednego typu komórek; występują one w poszczególnych tkankach/narządach i mogą różnicować się do dojrzałych komórek danej tkanki/narządu. Przykładem mogą być komórki unipotencjalne dla układu krwiotwórczego, wątroby, czy kanalików nerkowych.

Wyodrębnia się następujące źródła pochodzenia komórek macierzystych:

- A. Zarodkowe (embrionalne) komórki macierzyste** występujące podczas embriogenezy, posiadają one właściwości komórek totipotencjalnych i pluripotencjalnych.
- B. Płodowe komórki macierzyste** uzyskiwane z tkanek płodów i krwi mają właściwości multipotencjalnych komórek macierzystych.
- C. Komórki macierzyste z krwi pępowinowej;** mają właściwości multipotencjalnych komórek macierzystych.
- D. Komórki macierzyste tkanek dorosłych organizmów**, które mają właściwości komórek multipotencjalnych i unipotencjalnych.

Zarodkowe komórki macierzyste

Zarodkowe komórki macierzyste można stosunkowo łatwo namnażać w hodowli *in vitro*, a wysoka aktywność enzymu telomerazy powoduje, że nie ulegają one starzeniu podczas hodowli, co upodabnia je do komórek nowotworowych [12]. Mogą się one różnicować do każdego rodzaju komórek somatycznych. Ta cecha powoduje, że ten rodzaj komórek macierzystych może zostać wykorzystany dla odtworzenia każdego rodzaju

The potential of differentiation is not identical in all stem cells what constitute a basis for their classification:

- A. Totipotent:** have the potential to become all other types of cells in the body. A fertilized egg is totipotent.
- B. Pluripotent:** stem cells that produce any type of cell in the body except totipotent cells. The examples are: inner cell mass (ICM) of the blastocyst that can differentiate into multipotent cells, multipotent cells of germ layer (ectoderm, endoderm and mesoderm)
- C. Multipotent:** a small number of stem cells can produce the same embryonic origin (ectoderm, endoderm and mesoderm) or features cells
- D. Unipotent:** may transform only to one type of cells, they are present in particular tissues/organs and may differentiate into mature cells of that tissue/organ. The examples are unipotent cells of hematopoietic system, liver and renal tubes.

The following sources of stem cells were identified:

- A. Embryonic stem cells** – are present during embryogenesis and are totipotent and pluripotent.
- B. Fetal stem cells** – isolated from fetal tissues and blood and are multipotent.
- C. Cord blood stem cells** – are multipotent.
- D. Adult stem cells** – are multipotent and unipotent.

Embryonic stem cells

Embryonic stem cells can be relatively easily grown in *in vitro* culture. High telomerase activity results in inhibition of aging what makes them similar to carcinoma cells [12]. They may differentiate to all somatic cells type and thus can be used to restore every type of tissue. However, a potential threat exists - embryonic stem cells have the ability to differentiate in expected cells (e.g. hepatocytes) but some mixed culture of different type of cells disturbing the organs functions may also develop. Application of mice embryonic stem cells may lead to teratoma (a tumor containing different types of cells lacking the proper structure and function) [13]. The other risk is formation of stem cells of carcinoma cell line what is a direct life-threatening state for recipient. Carcinoma stem cells were seen within tumors of hematopoietic system [14], central nervous system [15] and mammary gland [16]. Tumor relapse might thus be due to a lack of those cells elimination during the therapy [17].

tkanki. Jednak stwarza ona również potencjalne zagrożenia, ponieważ zarodkowe komórki macierzyste mogą w organizmie różnicować się w kierunku pożądanym (np. przekształcanie w komórki wątrobowe), ale również tworzyć wzajemnie wymieszane komórki innych tkanek, co może zaburzać funkcje narządów. Wszczepienie zarodkowych komórek macierzystych myszy może prowadzić do powstawania potworniaka, czyli guza zawierającego różne typy komórek i tkanek bez zachowania jednak ich prawidłowej struktury i czynności [13]. Innym potencjalnym zagrożeniem jest wykształcenie się z komórek macierzystych linii komórek nowotworowych, co staje się bezpośrednim zagrożeniem dla zdrowia i życia biorcy. Obecność komórek macierzystych inicjujących wykształcenie się tkanki nowotworowej opisano w guzach występujących w układzie krwiotwórczym [14], ośrodkowym układzie nerwowym [15] oraz gruczole piersiowym [16]. Brak eliminacji macierzystych komórek rakowych podczas terapii nowotworowej może być jedną z przyczyn nawrotu guza [17].

Pod koniec ubiegłego wieku dokonano wielu odkryć, które przybliżyły możliwość wykorzystania embrionalnych komórek macierzystych w terapii chorób. Wyizolowano embrionalne komórki macierzyste od myszy [18], a potem człowieka [10] i opracowano metody ich hodowli w warunkach *in vitro*. Możliwe jest stworzenie takich warunków hodowli komórkowej, które inicjują różnicowanie się ludzkich komórek macierzystych w kierunku bardziej wyspecjalizowanych komórek [10]. W przypadku komórek macierzystych pochodzących od myszy udało się nawet wyhodowanie haploidalnej komórki jajowej [19]. Jednak opracowanie metody izolacji, hodowli komórek macierzystych i ich różnicowania w warunkach *in vitro* jest jedynie wstępnym krokiem potwierdzającym ich potencjalną przydatność w medycynie regeneracyjnej. Istotne jest również przeżycie i funkcjonowanie tych zróżnicowanych komórek po wszczepieniu do organizmu biorcy. Obecnie dostępne są techniki różnicowania ludzkich embrionalnych komórek macierzystych w kierunku wyspecjalizowanych komórek [20], jednak możliwość testowania ich właściwości po ponownym wszczepieniu do żywego organizmu ludzkiego jest ograniczona z przyczyn etycznych. Pozostają więc obserwacje z eksperymentów na zwierzętach, których wyniki z ostrożnością można odnosić do warunków ludzkiego organizmu. Wydaje się, że pierwsze obserwacje z badań doświadczalnych są obiecujące. Krótki opis wyników wybranych badań eksperymentalnych na zwierzętach z zastosowaniem embrionalnych komórek macierzystych przedstawiono poniżej:

– wszczepienie kardiomiocytów powstałych ze zróżnicowanych embrionalnych komórek macierzystych dystroficznym myszom doprowadza do wbudowania tych komórek do mięśnia sercowego zwierząt i podjęcia czynności skurczowej. Przez cały okres obserwacji (7 tygodni) stwierdzano obecność tych sprawi-

At the end of the last millennium many discoveries were made what facilitates the application of stem cells in clinical therapy. Mice and then human embryonic stem cells were isolated [18,10] and *in vitro* techniques to grow cultures were introduced. Currently creating culture conditions that enable for differentiation into specialized cells is possible [10]. Additionally, oocytes were derived from mouse embryonic stem cells [19]. However, inventing methods of isolating, culturing and differentiation of stem cells is only a beginning thus confirming its potential application in regenerative medicine. Survival and functioning of those cells in recipient body is, however, crucial. Techniques for human embryonic stem cell differentiation into specialized cells are currently available [20] but testing their feature after reimplantation to living human organism is limited due to ethical dilemmas. Animal experiments are though the only reasonable way for observation although the results can not be directly extrapolated to humans. First observations seem to be promising. A short description of selected animal experiments with embryonic stem cells is shown below:

– Implantation of cardiomyocytes derived from differentiated stem cells into dystrophic mice led to incorporation of those cells into cardiac muscle and assuming the contractive function. During the 7 weeks of observation the presence of those functioning cells were confirmed with no carcinoma transformation presence. The authors claim that preserving functional cardiomyocytes in *in vitro* culture is though possible at least through 11 month [21],

- nych czynnościowo komórek w mięśniu sercowym, bez cech transformacji nowotworowej. Autorzy twierdzą, że jest możliwe utrzymanie kardiomiocytów w hodowli *in vitro* przez okres, co najmniej 11 miesięcy, przy zachowaniu ich wydolności skurczowej [21],
- Min i współpracownicy wykazali na doświadczalnym modelu martwicy mięśnia sercowego u szczura, że wszczepienie embrionalnych komórek macierzystych do uszkodzonego mięśnia doprowadziło do poprawy jego kurczliwości [22],
 - embrionalne komórki mały po zróżnicowaniu do komórek śródbłonka w warunkach hodowli *in vitro* i wszczepieniu pod skórę zwierząt inicjują tworzenie nowych naczyń krwionośnych i pobudzają wzrost pozostałych komórek endotelialnych [23],
 - mysie embrionalne komórki macierzyste po poddaniu różnicowaniu w warunkach *in vitro* nabierają zdolności do produkcji insuliny. Wszczepienie tych komórek myszom z doświadczalnie wywołaną cukrzycą powoduje normalizację poziomu glukozy i ciężaru ciała [24].
 - embrionalne komórki macierzyste myszy po różnicowaniu w warunkach *in vitro* do hepatocytów zostały wszczepione zwierzętom z ostrym uszkodzeniem wątroby po zatruciu czterochlorkiem węgla. Stwierdzono wbudowanie tych komórek w strukturę miększu wątroby i podjęcie czynności metabolicznych charakterystycznych dla tego narządu [25].

Rozwój technik nowoczesnej biologii umożliwia obecnie dokonanie klonowania terapeutycznego embrionalnych komórek macierzystych, które posiadają materiał genetyczny dawcy. Jakkolwiek zabieg taki jest obciążony nadal ryzykiem biologicznym, a przede wszystkim zastrzeżeniami natury etycznej, uzyskane wyniki w trakcie prowadzonych badań naukowych mogą w przyszłości być potencjalnie wykorzystane w mniej kontrowersyjnych okolicznościach. Procedura ta polega na wprowadzeniu jądra komórkowego pobranego z komórki uzyskanej od dorosłego pacjenta do komórki jajowej pozbawionej jądra, a następnie pobudzenie embriogenezy. Powstały embrion posiada komórki macierzyste identyczne genetycznie i immunologicznie z dorosłym dawcą, co umożliwia ich wykorzystanie do naprawy uszkodzonych tkanek, czy narządów u tego osobnika [26]. Obecnie dostępne są wyniki badań potwierdzające skuteczność tej metody w odniesieniu do komórek ludzkich, z których materiałem genetycznym wyhodowano pluripotencjalne komórki, dzielące się hodowli *in vitro* (ponad 70 pasaży) i nie wykazujące zmian w kariotypie, a także wykazujące zdolność do różnicowania w kierunku wyspecjalizowanych komórek [27]. Zaletą tej techniki jest możliwość wyhodowania autologicznych, pluripotencjalnych komórek macierzystych, co zmniejsza ryzyko reakcji immunologicznej biorcy w stosunku do przeszczepu.

- Min et al. showed using the experimental model of cardiac muscle necrosis in rats that implantation of embryonic stem cells into the damaged muscle will improve its contractility [22],
- Embryonic monkey stem cells after differentiation into endothelial cells in *in vitro* cultures and subcutaneous implantation in animal recipient initiate angiogenesis and stimulate remaining endothelial cells [23],
- Mouse embryonic stem cells after *in vitro* differentiation are capable of releasing insulin. Implantation of those cells into mice with experimental diabetes normalizes glycaemic levels and body mass [24],
- Mouse embryonic stem cells after *in vitro* differentiation into hepatocytes were implanted in animals with acute liver dysfunction due to carbon tetrachloride intoxication. Incorporation of those cells into a hepatic parenchyma and assuming liver-characteristic metabolic functions was observed [25].

The progress in biological science allow currently for therapeutic cloning of embryonic stem cells with recipients DNA. Although the procedure has still a biological risk, and more importantly, ethical reservations, the results obtained in scientifically experiments might be used in future for less controversial purposes. The procedure involves transfer of the nucleus from the adult donor into enucleated oocyte followed by embryogenesis stimulation. Formed embryo has stem cells genetically and immunologically identical to adult donor and might be used for repair of damaged tissues or organs of the donor [26]. The researches confirming the effectiveness of that procedure in human - pluripotent cells were grown in that way. They proliferated in *in vitro* cultures (over 70 passages) and did not show karyotype changes or ability to differentiate into specialized cells [27]. The possibility of growing autologous, pluripotent cells is an advantage of that method what reduces the risk of immunological graft rejection.

Plodowe komórki macierzyste

Tkanki płodów i krew, szczególnie w I trymestrze ciąży, są źródłem komórek macierzystych o charakterze multipotencjalnym. Znajdują się one głównie w szpiku kostnym, wątrobie, trzustce, nerkach, płucach, ośrodkowym układzie nerwowym i łożysku [28]. Pozyskiwanie tych komórek jest jednak ograniczone, przede wszystkim z powodu zastrzeżeń etycznych, ponieważ najczęściej pochodzą one z planowanych aborcji. Alternatywnym podejściem jest pobieranie krwi płodowej podczas ciąży, co jest już możliwe i stosowane dla diagnostyki prenatalnej, gdy wielkość płodu jest na tyle duża, że umożliwia takie postępowanie. Zastosowanie tej techniki do 12 tygodnia ciąży, dla diagnostyki podczas ciąży zagrożonych hemoglobinopatiami spowodowało utratę około 5% ciąży [29]. Płodowe komórki macierzyste charakteryzują się słabszą ekspresją antygenów zgodności tkankowej, co zmniejsza ryzyko odrzucenia ich przeszczepu przez układ immunologiczny gospodarza [30]. Ze względu na większą zdolność do różnicowania, płodowe komórki macierzyste są bardziej przydatne w medycynie regeneracyjnej od podobnych komórek, ale izolowanych od dorosłych osobników. Obecnie otwiera się nowa możliwość zastosowania allogenicznych płodowych komórek macierzystych w okresie płodowym dla korekcji defektów rozwojowych organizmu gospodarza [28]. Jak dotychczas większość prób takich przeszczepów kończyła się niepowodzeniem [31] z powodu silnej reakcji odrzucenia ze strony biocy. Jednak w ostatnich latach dokonano postępu w tym zakresie, czego dowodem są zakończone sukcesem przeszczepy płodowych komórek wątrobowych u płodów z niedoborami immunologicznymi [32]. Innym potencjalnym przyszłościowym wykorzystaniem macierzystych komórek płodowych jest ich modyfikacja genetyczna po wyodrębnieniu z organizmu i zwrotny przeszczep, co może mieć znaczenie dla korekcji niektórych zaburzeń metabolicznych [33]. Zwraca się jednak uwagę, że wdrożenie tak nowatorskich metod wykorzystywania płodowych komórek macierzystych musi być poprzedzone rozwiązaniem podstawowych problemów etycznych wynikających z podejmowania tego rodzaju terapii [28].

Komórki macierzyste z krwi pępowinowej

Pozyskiwanie embrionalnych komórek macierzystych jest ograniczone wieloma czynnikami. Przede wszystkim są to względy etyczne, ale również ograniczona dostępność zarodków, które mogłyby służyć jako źródło komórek macierzystych. Jest bardzo ważne, aby uzyskiwane komórki były jak najmniej zróżnicowane, a tym samym posiadały zdolność przekształcania się w komórki różnych tkanek. Alternatywnym, w stosunku do zarodków, źródłem takich komórek jest krew pępowinowa, która zawiera stosunkowo wysoki, porównywalny do szpiku, odsetek komórek macierzystych [34]. Cechują się one relatywnie dużą zdolnością do podziałów oraz małymi wymaganiami warunków hodow-

Fetal stem cells

Fetal tissues and blood, especially in the first trimester of the pregnancy, are the source of multipotent stem cells. They are mainly located in bone marrow, liver, pancreas, kidneys, lungs, central nervous system and placenta [28]. Acquiring of those cells is though limited mostly due to ethical reservations because the majority derives for planned abortions. Fetal blood collection (cordocentesis) during pregnancy might be an alternative if the fetus is large enough for performing such a procedure. However, cordocentesis from 12 weeks gestation, for diagnosing hemoglobinopathies, was complicated by 5% rate of pregnancy lost [29]. The fetal stem cells are characterized by weaker expression of major histocompatibility complex (MHC) what reduces the risk of rejection [30]. Due to higher differentiative potential fetal stem cells are more useful in regenerative medicine compared to similar cells isolated from adults. Currently allogeneic fetal stem cells might be used during fetal period for correcting developmental defects in host organism [28]. However, most of such transplantations were unsuccessful [31] due to a graft acute rejection. The progress in that area has been recently made - a successful transplantation of fetal liver cells in fetus with immunodeficiency was reported [32]. Other possible application of fetal stem cells is genetic modification of isolated cells followed by reimplantation what might be used for metabolic defects correction [33]. It has to be noted that introduction of this novel methods into clinical practice should be preceded by solving ethical dilemmas concerning the therapy [28].

Cord blood stem cells

Acquiring cord blood stem cells is limited by different factors. Firstly, by the ethical consideration, secondly – embryos as a source of stem cells availability. It is important that the acquired cells were as low-differentiated as possible due to obtain the greatest ability of differentiating into various types of cells. The alternative source of fetal stem cells is the cord blood that contains, similarly to bone marrow, low number of cells [34]. Those cells have a relatively high proliferative potential and do not require a special culture conditions. Additionally they have a weaker antigenicity what reduces the risk of graft rejection [35]. Originally those cells were used for repopulating bone marrow in therapy of the neoplastic diseased of the blood [36]. The cord blood transplantations have been performed since 60-ties although the low stem cells count in cord blood compared to the donors demands limited the procedures; collection of cells from few donors was thus required. The first successful cord blood stem cells transplantation was performed in patient with Fanconi anemia in France more than 20 years ago [37]. Such procedure has been frequently repeated since that time. However, some risk with this kind of transplantation exists. Slower elevation of basophil and platelets count

li. Ponadto wykazują one słabszą antygenowość, co zmniejsza ryzyko odrzucenia przeszczepu przez układ immunologiczny biorcy [35]. Pierwotnie komórki te były wykorzystywane głównie do repopulacji szpiku kostnego w leczeniu chorób nowotworowych krwi [36]. Próby dokonania przeszczepu krwi pępowinowej były podejmowane już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku, jednak głównym czynnikiem ograniczającym była stosunkowo mała ilość komórek w stosunku do zapotrzebowań biorcy; wymagało to pobierania komórek od kilku dawców. Pierwszego, zakończonego sukcesem, przeszczepu komórek macierzystych krwi pępowinowej dokonano blisko dwadzieścia lat temu, we Francji, u pacjenta z niedokrwistością Fanconiego [37]. Od tego czasu na świecie dokonano wiele przeszczepów wykorzystujących krew pępowinową. Istnieją jednak niebezpieczeństwa wynikające ze stosowania komórek macierzystych do przeszczepu szpiku. Obserwuje się wolniejsze, niż w przypadku przeszczepu szpiku, narastanie granulocytów obojętnochłonnych i płytek krwi, co sprzyja powikłaniom, szczególnie infekcjom [38]. Pomimo tych potencjalnych powikłań krew pępowinowa jest coraz częściej stosowana w leczeniu chorób układu krwiotwórczego. Komórki macierzyste z krwi pępowinowej są szczególnie wykorzystywane podczas przeszczepów wykonywanych u dzieci, ponieważ w takich przypadkach potrzebna jest mniejsza ilość komórek, a tym samym łatwiej dobrać dawkę. Przeprowadza się ją w Japonii, gdzie około 50% przeszczepów szpiku u dzieci i dorosłych jest wykonywane przy użyciu krwi pępowinowej, w USA około 50% przeszczepów u dzieci i około 20% u dorosłych jest także wykonywanych tą metodą [39]. Wzrost zapotrzebowania na krew pępowinową spowodował powstawanie banków przechowujących próbki krwi, które potencjalnie mogą zostać wykorzystane do przeszczepów, także dla osób o podobnym zestawie antygenów (np. rodzeństwo), lub dla osób niespokrewnionych [40]. Rzadziej dokonuje się przeszczepów autologicznych [41].

Niezależnie od stosowania macierzystych komórek krwi pępowinowej do repopulacji szpiku badano możliwość różnicowania tych komórek w kierunku innych tkanek. Te prace zakończyły się sukcesem na początku bieżącego stulecia, kiedy wykazano obecność we krwi pępowinowej komórek zdolnych do różnicowania się w komórki nerwowe [42]. Otworzyło to nowe pole badań naukowych dotyczących komórek macierzystych z krwi pępowinowej i nadzieje na możliwość ich wykorzystania w regeneracji innych, niż szpik kostny narządów. Stwierdzono obecność we krwi pępowinowej progenitorowych mezenchymalnych komórek, które w hodowli *in vitro* ulegały przekształceniu w komórki mezenchymalne lub osteoklasty [43]. Autorzy tej pracy podkreślają, że ilość takich komórek we krwi pępowinowej jest odwrotnie proporcjonalna do czasu trwania ciąży. Inni badacze wykazali możliwość różnicowania komórek progenitorowych komórek mezenchymalnych nie tylko do osteoklastów, ale również komórek

is observed what might increase the risk of complications, especially infections [38]. Despite the potential risk of those complications, the cord blood is widely used in hematopoietic system diseases therapy. The cord blood stem cells are especially applicable for transplantation in children because for that procedure smaller number of cells is required and thus the donor might be easier matched. Japan is the leader in the number of procedures performed (up to 50% of transplantations in children), followed by USA (approximately 50% of transplantations in children and 20% in adults) [39]. The increase in the number of transplantations resulted in cord blood banking development where donated blood might be potentially used for transplantations in recipients with similar antigenicity (siblings) or unrelated [40]. The autologous transplantations are rarely performed [41].

The potential ability of fetal stem cells for differentiating into other lines was studied independently of their use for repopulation of bone marrow. At the beginning of this millennium the ability of fetal stem cells for differentiating into neurons was confirmed [42]. It was an impulse for further research in that field, especially in studies on application of fetal stem cells in regeneration of tissues other than bone marrow. Mesenchymal progenitor cells were detected in cord blood; they transform in *in vitro* culture into mesenchymal cells and osteoclasts [43]. The authors underline that the number of those cells in cord blood is inversely proportional to gestational week. Other researchers showed that mesenchymal progenitor cells may differentiate not only to osteoclasts, adipocytes and, as previous papers by Sanchez-Ramos reported, to neurons [44]. Improvement in techniques of isolation and growing of mesenchymal progenitor cells derived from cord blood led to inventing of techniques for their differentiation into specialized cells of all three germ layers [45].

tłuszczowych i jak już wcześniej wykazał Sanchez-Ramoz ze współpracownikami, do komórek nerwowych [44]. W miarę ulepszania technik izolacji i hodowli progenitorowych komórek mezenchymalnych z krwi pępowinowej udało się opracować techniki ich różnicowania do różnych wyspecjalizowanych komórek pochodzących ze wszystkich listków zarodkowych [45].

Komórki macierzyste dorosłych osób

W organizmie dorosłego człowieka występują komórki macierzyste o cechach multipotencjalnych i unipotentnych. Zlokalizowane są one w szpiku kostnym, układzie nerwowym, wątrobie, trzustce, nabłonku jelitowym, nabłonku dróg oddechowych, skórze oraz mięśniach [46]. Najlepiej są poznane komórki macierzyste szpiku, gdzie występują ich dwa rodzaje: macierzyste komórki układu krwiotwórczego, które ulegają podczas całego życia przekształceniu do elementów morfologicznych krwi oraz komórki pochodzenia mezenchymalnego, które w odpowiednim środowisku ulegają różnicowaniu do komórek innych tkanek i narządów. Po przeszczepieniu tych komórek do organizmu doświadczalnych zwierząt obserwowano ich przekształcanie we włókna mięśniowe [47], hepatocyty [48], komórki tkanki glejowej [49], czy tkanki nerwowej [50]. Komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego są obecne także we krwi obwodowej dorosłych osobników. Wykazano podczas doświadczeń na zwierzętach, że po stymulacji odpowiednimi cytokinami te komórki biorą udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych [51], również w uszkodzonym martwicą mięśni sercowym [52]. Źródłem komórek macierzystych u dorosłego osobnika jest również tkanka tłuszczowa, co w sytuacji, gdy na świecie przeprowadza się coraz więcej zabiegów kosmetycznych polegających na odsysaniu tłuszczu, dostępność tych komórek znacznie wzrasta [53]. Podczas każdego zabiegu usuwa się od 0.1 litra do nawet 3 litrów tłuszczu, który może być wykorzystany do izolacji komórek macierzystych. Macierzyste komórki uzyskane z tkanki tłuszczowej w zależności od składu czynników biologicznych i chemicznych, na które są eksponowane ulegają różnicowaniu do komórek mięśniowych, śródbłonna, osteoblastów, chondrocytów, czy struktur mających pewne cechy tkanki nerwowej [53].

Skuteczność komórek macierzystych uzyskanych od osobników w życiu popłodowym została już sprawdzona w pierwszych badaniach klinicznych. Najczęściej autologiczne multipotencjalne progenitorowe komórki macierzyste są pobierane z organizmu gospodarza, namnażane w warunkach hodowli *in vitro* i zwrótnie przeszczepiane do ustroju dawcy [54]. Wstępne wyniki badań doświadczalnych i klinicznych wydają się być obiecujące. Horwitz i współpracownicy łączyli poprawę stanu tkanki kostnej u dzieci z wrodzoną łamliwością kości z przeszczepem komórek macierzystych szpiku [54]. W innych badaniach stwierdzono, że po przeszczepie macierzystych komórek szpiku pojawia-

Adults stem cells

Multipotent and unipotent stem cells are present in adult humans. They are localized in bone marrow, nervous system, liver, pancreas, intestinal endothelium, respiratory system endothelium, skin and muscles [46]. Bone marrow stem cells are the most known. They are divided into 2 categories: hematopoietic system stem cells transferring into blood elements and mesenchymal cells that may, in specific conditions, differentiate into other organs and tissues cells. After transferring of those cells into a recipient organism in animal experimental model, they differentiated into cardiomyocytes [47], hepatocytes [48], glial cells [49] or neuronal tissue [50]. Bone marrow stem cells are also identified in peripheral blood of adult human. After stimulation by cytokines they take part in angiogenesis [51], especially in necrotic cardiac muscle [52], what was confirmed in animal models. Adipose tissue might be also a source of stem cells [53]. Adipose-derived stem cells, depending on biological and chemical factors they are exposed, may differentiate into cardiomyocytes, endothelium, osteoclasts, chondrocytes, and neuron-like tissue [53].

The effectiveness of stem cells derived from the client during fetal stage has been proved in first clinical trials. Usually the autologous progenitor stem cells are acquired for the host, grown *in vitro* and then reimplanted into donor's body [54]. The preliminary results of experimental and clinical studies seem promising. Horwitz et al. showed a correlation of bone tissue regeneration in children with fragile bone syndrome with bone marrow stem cells transplantation [54]. In other studies presence of hepatocytes and bile tubes epithelial cells derived from transplanted bone marrow stem cells was reported [56,57]. Transplanted cells may also differentiate into neurons of central nervous system [58]. Intracoronary administration of autologous stem cells derived from bone marrow into infarcted myocardium led to decrease of the hypoxic area and contractility improvement [59].

ły się one w wątrobie, w postaci hepatocytów, lub komórek nabłonkowych kanalików żółciowych [56,57]. Przeszczepione komórki macierzyste szpiku ulegają także różnicowaniu do neuronów ośrodkowego układu nerwowego [58]. Podanie pacjentom z zawałem serca autologicznych komórek macierzystych uzyskanych ze szpiku kostnego do tętnicy objętej zawałem doprowadza do zmniejszenia obszaru niedokrwienia i poprawy czynności skurczowej mięśnia sercowego [59].

PERSPEKTYWY

Rozwój w ostatnich latach badań dotyczących komórek macierzystych i ich wykorzystania w medycynie regeneracyjnej buduje wielkie oczekiwania. Należy pamiętać jednak o poprzednich nadziejach, wzlotach i upadkach medycyny regeneracyjnej [5,7]. Zastosowanie komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej obarczone jest nie tylko zastrzeżeniami i ograniczeniami natury etycznej [60]. Istotne są również ograniczenia biologiczne. Skuteczność przeszczepu komórek macierzystych uzależniona jest między innymi od ich ilości, co wymaga opracowania technik szybkiego ich namnażania w hodowli *in vitro*. Nadal nie wiemy jaki jest optymalny stopień zróżnicowania komórek macierzystych, w którym powinny być one przeszczepione do organizmu biorcy i jaki jest czas ich przeżycia po przeszczepie. Ten drugi czynnik zależy przede wszystkim od odpowiedniego doboru dawcy oraz skutecznej kontroli reakcji odrzucenia przez organizm biorcy. Konieczna jest eliminacja potencjalnego ryzyka zakażenia lub wprowadzenia komórek o genotypie sprzyjającym powstaniu tkanki nowotworowej. Sprawą przyszłości jest stwierdzenie, w jakim stopniu przeszczepione komórki macierzyste mogą być wykorzystane nie tylko do zastąpienia zniszczonych tkanek biorcy, ale również działania parakrynnego stymulującego aktywność endogennych komórek macierzystych. Aktualnie dostępna technika modyfikacji genetycznej komórek umożliwia zmianę genotypu i fenotypu komórek macierzystych w celu ich przystosowania do indywidualnych potrzeb biorcy. Ilość problemów biologicznych związanych ze stosowaniem w medycynie komórek macierzystych jest prawie równa nadziejom wynikającym z postępu w zakresie nauk biologicznych. Jednak ostatecznym czynnikiem weryfikującym możliwość zastosowania nowych technik terapeutycznych w medycynie musi być ich zgodność z ogólnie przyjętymi zasadami etycznymi.

PERSPECTIVES

The progress in research on stem cells and their application in regenerative medicine is promising. However, one has to remember the previous history of regenerative medicine [5,7]. The use of stem cells in regenerative medicine is limited due to ethical dilemmas [60] but also biological restrictions. The effectiveness of the transplantation depends on the quantity of transplanted cells what requires introducing a modern technique allowing for quick grow of cells in *in vitro* cultures. The optimal differentiation stage as well as the survival time after the transplantation has not been established yet. The potential risk of infection elimination is needed. The future studies should reveal if transplanted stem cells might not only be used to replace damaged tissues but also for paracrine stimulation of endogenous stem cells. Contemporary techniques of genetic engineering allow for stem cells genotype and phenotype changing to meet the individual donor requirements. The amount of biological problems in case of medical application of stem cells is similar to the expectation for further progress in biological science. The clinical application of a new therapeutic technique will be possible only if ethical rudiments are followed.

Piśmiennictwo / References:

1. **Brockes JP, Kumar A.** Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* 2005; 310:1919-1923.
2. **Ankoma-Sey V.** Hepatic regeneration – revisiting the myth of Prometheus. *News Physiol Sci* 1999;14:149-155.
3. **Stocker E, Wullstein HK, Brau G.** Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1973; 14:93-103.
4. **Yannas IV.** Regenerative Medicine, Springer NY, USA, 2005.
5. **Kemp P.** History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. *Regenerative Medicine* 2006;1:653-669.
6. **Chick WL, Like AA, Lauris V et al.** A hybrid artificial pancreas. *Trans Am Soc Artif Organs* 1975; 21:8-15.
7. **Kratz G, Huss F.** Tissue engineering – body parts from the Petri dish. *Scand J Surg* 2003; 92:241-247.
8. **Lysaght MJ, Hazlehurst AL.** Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Eng* 2004; 10:309-320.
9. **Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J et al.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385:810-813.
10. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocytes. *Science* 1998; 282:1145-1147.
11. **Shamblott MJ, Axelman J, Wang S et al.** Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 3726-13731.
12. **Mantell LL, Greider CW.** Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *EMBO J* 1994; 13:3211-3217.
13. **Morange M.** What history tells us VII. Twenty-five years ago: the production of mouse embryonic stem cells. *J Biosci* 2006; 31:537-541.
14. **Dick JE.** Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1044: 1-5.
15. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki I et al.** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-5828.
16. **Li Y, Rosen JM.** Stem/progenitor cells in mouse mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10: 17-24.
17. **Jordan CT, Guzman ML, Noble M.** Cancer Stem Cells *N Engl J Med* 2006; 355:1253-1261.
18. **Martin GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7634-7638.
19. **Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK et al.** Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300:1251-1256/
20. **Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al.** Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227:271-278.
21. **Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY et al.** Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells for stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98:216-224.
22. **Min JY, Yang Y, Converso KL et al.** Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 2002; 92: 288 – 296.
23. **Kaufman DS, Lewis RL, Hanson ET et al.** Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. *Blood* 2003; 103:1325-1332.
24. **Soria B, Roche E, Berna G et al.** Insulin- secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49:157-162.
25. **Yamamoto H, Quinn G, Asari A et al.** Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003; 37:983-993.
26. **Wobus AM, Boheler KR.** Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005; 85:635-678.
27. **Hwang WS, Ryu YJ, Park JH et al.** Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303:1669-1674.
28. **O'Donoghue K, Fisk NM.** Fetal stem cells. *Best Practice & Res. Clin Obst and Gynecol* 2004; 18:853-875.
29. **Orlandi F, Damiani G, Jakil C et al.** The risks of early cordocentesis (12-21 weeks): analysis of 500 procedures. *Prenatal Diagnosis* 1990; 10:425-428.
30. **Rebel VI, Miller CL, Thornbury GR et al.** A comparison of longterm repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse. *Experimental Hematology* 1996; 24:302-307.
31. **Westgren M, Ringden O, Eik-Nes S et al.** Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. *Transplantation* 1996; 61:1176-1179.
32. **Westgren M, Ringden O, Bartman P et al.** Prenatal T-cell reconstitution after in utero transplantation with fetal liver cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Obstet & Gynecol* 2002; 187:475-482.
33. **Shields LE, Lindton B, Andrews RG et al.** Fetal hematopoietic stem cell transplantation: a challenge for the twenty-first century. *J Chemotherapy and Stem Cell Res* 2002; 11:617-631.
34. **Pojda Z, Machaj EK, Gajkowska A i wsp.** Badanie potencjalnej przydatności klinicznej komórek macierzystych uzyskiwanych z krwi pępowinowej. *Postępy Biologii Komórki* 2003; 30, suppl.21:127-137.
35. **Barker JN, Wagner JE.** Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev In Oncol Hematol* 2003; 48:35-43.
36. **Madlambayan G, Rogers I.** Umbilical cord-derived stem cells for tissue therapy: current and future uses. *Regenerative Med* 2006;1:777-787.
37. **Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al.** Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Eng J Med* 1989; 321:1174-1178.
38. **Gratwohl A, Brand R, Frassoni F et al.** Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in early leukemias: an EBMY analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36:757-769.
39. **Rubinstein P.** Why cord blood? *Human Immunol* 2006; 67:398-404.

40. **Warwick R.** Cord blood banking. Best Practice & Res. *Clin Obst and Gynecol* 2004; 18:995-1011.
41. **Ferreira E, Pasternak J, Bacal N et al.** Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1999; 24:1041.
42. **Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG et al.** Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001;171:109-115.
43. **Erices A, Conget P, Minguell JJ et al.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Brit J Haematol* 2000; 109:235-242.
44. **Goodwin H, Bickense A, Chien S et al.** Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7:581-588.
45. **Lee OK, Kuo TK, Chen WM et al.** Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103:1669 – 1675.
46. **Korbling M, Estrov Z.** Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349:570-582.
47. **Ferrari G, Cusella-DeAngelis C,G, Coletta M et al.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
48. **Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al.** Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1168-1170.
49. **Eglitis MA, Mezey E.** Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4080-4085.
50. **Brazelton T, Rossi FM, Keshet GI et al.** From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290:1775-1779.
51. **Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al.** Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5:434-438.
52. **Kocher AA, Schuster MD, Sabolcs MJ et al.** Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-436.
53. **Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA.** Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100:1249-1260.
54. **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-49.
55. **Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al.** Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5:309-313.
56. **Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al.** Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32:11-16.
57. **Allison MR, Poulson R, Jeffrey R et al.** Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406:257.
58. **Weimann JM, Charlton GA, Brazelton TR et al.** Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:2088-2093.
59. **Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al.** Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106:1913-1918.
60. **Weissman IL.** Stem cells- scientific, medical and political issues. *N Engl J Med* 2002; 346:1576-1579.