



Biotechnologia w medycynie regeneracyjnej i reprodukcyjnej

Kinga Kamieniarz¹, Robert Nawrot¹, Katarzyna Grajek²,
Anna Goździcka-Józefiak¹

¹Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Biotechnology in regenerative and reproductive medicine

Summary

Rapid progress in molecular biology, genetics, and mammalian biotechnology has revolutionized diagnostic, therapeutic and reproductive cloning in mammals. Recently, several human gene products have been able to be pharmaceutically explored in transgenic organisms and employed for medical applications.

When organs or tissues are irreparably damaged, they may be also replaced with an artificial device or donor organ. Promising and also controversial application for therapeutic and regenerative medicine is stem cells engineering.

Key words:

regenerative medicine, stem cells, diagnosis.

Adres do korespondencji

Anna Goździcka-Józefiak,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Instytut Biologii
Eksperymentalnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

biotechnologia

2 (73) 31–48 2006

1. Wstęp

Gwałtowny rozwój w ostatnim dwudziestolecu biologii molekularnej, genetyki, technik inżynierii genetycznej i biotechnologii, stworzył doskonale podstawy do rozwoju diagnostyki i terapii szeregu schorzeń człowieka. Wywarło to także ogromny wpływ na rozwój przemysłu farmaceutycznego. Na uwagę zasługuje doskonalenie, na drodze inżynierii genetycznej, licznych mikroorganizmów, zdolnych do produkcji substancji o działaniu farmakologicznym, np. antybiotyków czy cytostatyków. Możliwe

stało się także konstruowanie organizmów transgenicznych zawierających geny, których produkty mają właściwości lecznicze, jak np. bakterie zdolne do syntezy ludzkiej insuliny czy zwierzęta transgeniczne wykorzystywane jako bioreaktory do produkcji białek człowieka (1). W ten sposób uzyskano np. krowy wytwarzające wraz z mlekiem białka człowieka (erytropoetynę i laktoferynę), czy owce wytwarzające mleko z czynnikami krzepliwości krwi (2). Produkowane związki próbuje się także tak modyfikować, z użyciem metod inżynierii genetycznej, aby polepszyć ich właściwości farmakologiczne. Wprowadzane modyfikacje przedłużają trwałość wielu leków, umożliwiają specyficzne kierowanie ich do miejsc w organizmie, gdzie zachodzi proces chorobowy, zwiększają zdolność ich pobierania przez właściwe komórki oraz zmniejszają ich toksyczne działanie względem prawidłowych komórek organizmu (1,2). W wyniku rozwoju genomiki oraz bioinformatyki powstała również nowa gałąź w farmacji – farmakogenomika, pozwalająca na programowanie i opracowanie nowych leków oraz testów genetycznych, umożliwiających wczesne rozpoznanie wielu chorób i ich leczenie na drodze terapii genowej (3).

Osiągnięcia w biologii molekularnej i biotechnologii mają również ogromny wpływ na postęp w rozwoju medycyny regeneracyjnej (4,5).

2. Medycyna regeneracyjna

Regeneracja komórek krwi czy komórek nabłonkowych zachodzi podczas całego życia człowieka. Ze znacznie mniejszą częstością ulegają regeneracji kości, wątroba, mięśnie, naczynia krwionośne, natomiast bardzo ograniczone możliwości mają komórki mózgu. Niekiedy w wyniku choroby uszkodzenie narządów bywa jednak tak duże, że organizm nie jest zdolny do ich regeneracji i muszą być zastąpione poprzez transplantację – komórek, części tkanek lub całych narządów. Stało się to podstawą do poszukiwania nowych sposobów ich odbudowy. Rozwój medycyny regeneracyjnej zachodzi na różnych płaszczyznach, które obejmują:

- poszukiwanie czynników stymulujących organizm do samonaprawy;
- implantację komórek, tkanek lub narządów (przeszczepy autologiczne i allogeniczne oraz ksenotransplantacje);
- poszukiwanie metod pozwalających na regenerację starych tkanek;
- zastępowanie brakujących tkanek lub narządów materiałami sztucznymi (4-7).

2.1. Czynniki stymulujące organizm do samonaprawy

Dla medycyny regeneracyjnej ważne znaczenie ma poznanie czynników odpowiedzialnych za proliferację komórek, ich wzrost i różnicowanie. Na podstawie wyników dotychczasowych badań wskazuje się, że zdolność komórek do różnicowania się w komórki różnych typów i samoodtworzenia tkanek zależy od środowiska w ja-

kim się one znajdują i obecnych tam licznych czynników tworzących specyficzną „niszę”. Charakter tych czynników jest słabo poznany. Niewiele wiadomo o ich wzajemnym oddziaływaniu i współdziałaniu. Ważne znaczenie przypisuje się czynnikom wzrostu, białkom biorącym udział w przekazie sygnału do komórki i w komórce oraz białkom macierzy zewnątrzkomórkowej (8). Wykazano np., że oddziaływanie białek komórkowych z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej za pośrednictwem integryn wpływa na ekspresję cząsteczek sygnałowych BMP-4 (ang. *bone morphogenic protein 4*) i Wnt-1 (od nazw ang. *wingless* i *int*). Z kolei podwyższona ekspresja Wnt-1, a obniżona BMP-4 sprzyja różnicowaniu się komórek w komórki nerwowe, natomiast wysoka ekspresja BMP-4, a niska Wnt-1 w komórki mięśniowe (8), natomiast angiogeneza może być regulowana przez FGF2 (ang. *fibroblast growth factor*), TGF beta 1 (ang. *transforming growth factor beta 1*), Flk1 (ang. *fetal liver kinase 1*), VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) (9,10). Czynnikiem, którego wpływ na wzrost i mineralizację kości jest stosunkowo dobrze poznany jest ludzki hormon wzrostu hGH (ang. *human growth hormone*). Wykazano, że stymuluje on chondrocyty do proliferacji przez uwalnianie insulinopodobnych czynników wzrostu oraz syntezę białek macierzy zewnątrzkomórkowej (głównie kolagenu). Ponadto ma wpływ na metabolizm i dynamikę mięśnia sercowego, oddziałuje na układ endokrynnny i rozwój narządów płciowych (11). Dlatego GH próbowano stosować jako czynnik przyspieszający regenerację kości, skóry, neuronów, naczyń krwionośnych oraz w badaniach nad różnicowaniem się komórek macierzystych w komórki różnych typów. Hormon ten z uwagi na ważne znaczenie farmakologiczne był jednym z pierwszych peptydów produkowanych metodami biotechnologicznymi na potrzeby medycyny regeneracyjnej (2,12-14). hGH udało się także otrzymać z wykorzystaniem transgenicznych zwierząt. Swój udział mają w tym również polscy naukowcy, którzy uzyskali transgenicznego królika, produkującego ten hormon i wydzielającego go wraz z mlekiem (15). Następnie wykazano, że inne czynniki, w tym BMP (ang. *bone morphogenic proteins*), odpowiedzialne za morfogenezę kości oraz podobny do nich OP-1 (ang. *osteogenic protein-1*), stymulują gojenie się złamań kości z takim samym powodzeniem jak przeszczep kości, a czynnik 2 wzrostu keratynocytów (Repifermin) znacznie przyspiesza gojenie się wrzodów na nogach (16). Z kolei, białko MPlF (ang. *myeloid progenitor inhibitory factor*) odpowiedzialne za kontrolę produkcji komórek krwi w organizmie człowieka okazało się doskonałym czynnikiem redukującym toksyczny wpływ chemioterapii na komórki krwi (2,17). Obecnie białka te oraz inne czynniki o ważnym znaczeniu farmakologicznym są produkowane metodami biotechnologicznymi (tab. 1). Ich podawanie reguluje funkcjonowanie organizmu i znacznie przyspiesza regenerację wielu tkanek.

Tabela 1

Leki produkowane metodami biotechnologicznymi (wg 2)

Produkt	Zastosowanie w leczeniu
alfa1-antytrypsyna	mukowiscydoza, rozedma
białko CFTR	mukowiscydoza
alfa glukozydaza	zaburzenia w magazynowaniu glikogenu
antytrypsyna III	zator
kolagen	reumatyzm
hemoglobina	talasemia
czynnik VIII I IX	hemofilia
białko C	regulator krzepliwości krwi
tPA	zawał serca, niedokrwistość
fibrynogen	zapalenia
LDL-receptor	hipercholesterolemia
dystrofina	dystrofia mięśniowa (Duchenne'a)
laktoferyna	dodatek do pokarmów dla dzieci
przeciwciała	terapię antynowotworową
antygeny	niedobory immunologiczne
enzymy (alfa galaktozydaza, glukocerebrozydaza, alfa iduronidaza, beta heksoaminidaza)	niedobory enzymatyczne
hGH	terapię hormonalną

2.2. Regeneracja tkanek

Niekiedy ubytek komórek i tkanek jest tak duży, że wymaga transplantacji części tkanek lub całych organów. Dlatego jednym z celów medycyny regeneracyjnej jest poszukiwanie sposobów syntetyzowania nowych tkanek człowieka poza organizmem – *ex vivo*. Badania takie rozpoczęto od próby syntezy skóry, tak bardzo potrzebnej do leczenia oparzeń, czy wrzodów powstałych wskutek zakażenia bakteriami, uszkodzonych i ulegających martwicy tkanek, często występujących u diabe-tyków. Skóra jest tkanką bardzo złożoną. Składa się z komórek różnych typów, budujących skórę właściwą (dermis) oraz naskórek (epidermis). Ponadto jest trudna do transplantacji, ponieważ ma własny układ odpornościowy. Badania nad jej pozyskaniem poza organizmem rozpoczęto od namnażania w hodowli ludzkich fibroblastów, które przenoszono następnie na podłoże sztuczne (złożone np. z polimerów kwasu mlekowego) lub naturalne (np. żełe kolagenowe) zawierające dodatkowo cząsteczki stymulujące wzrost i namnażanie się komórek, po czym hodowano w bioreaktorze. Hodowlę taką prowadzono przez kilka tygodni aż do uzyskania

tkanki przypominającej wewnętrzną warstwę skóry (dermis), którą następnie zamrażano i stosowano jako opatrunki w leczeniu uszkodzeń skóry. Zamrażanie takiego produktu znacznie ułatwiało jego dalszą obróbkę.

Drugi z produktów skórnych jaki udało się otrzymać zawierał nie tylko komórki skóry właściwej, ale także naskórka. W tym przypadku skórne fibroblasty zanurzono w kolagenowym żelu, wzbogaconym w czynniki wspomagające wzrost komórek, który pokryto warstwą komórek naskórka – keratynocytów. Produkt taki implantowany w uszkodzone miejsce w skórze znacznie przyspieszał gojenie się rany i stopniowo był zastępowany przez zregenerowaną skórę chorego. W procesie tym biorą udział czynniki wytwarzane przez zawarte w nim komórki skóry. Ponadto chroni on uszkodzone miejsce przed infekcją.

Fibroblasty, keratynocyty, jak również fragmenty tkanek pobiera się do hodowli w warunkach sterylnych oraz przeprowadza się ich badania w celu wykluczenia tych, które zainfekowane są czynnikami chorobotwórczymi. Nie mogą być one także toksyczne dla organizmu i wywoływać odpowiedzi układu odpornościowego (18).

W efekcie próby uzyskania skóry ludzkiej poza organizmem zakończyły się zsyntetyzowaniem w roku 1997 półsyntetycznej skóry – TransCyte, stosowanej do leczenia oparzeń, oraz Dermagraftu, wykorzystywanych w próbach klinicznych do leczenia wrzodów skóry u diabetyków. TransCyte stanowi polimerową błonę, na której hodowane są ludzkie fibroblasty. Dermagraft, podobnie jak TransCyte, otrzymano z fibroblastów pochodzących z ludzkiej skóry, które hodowano na odpowiednim rusztowaniu, utworzonym z porowatego materiału bioabsorbującego. Z kolei z komórek ludzkiej skóry oraz komórek nabłonkowych napletka utworzono sztuczną skórę, tzw. Apligraf, który zawiera komórki skóry właściwej i naskórka, natomiast brak w nim komórek układu odpornościowego. Dlatego w trakcie leczenia nie występują problemy z odrzuceniem przeszczepu (7,19,20). Stworzono także półsyntetyczną skórę o nazwie INTEGRA, gdzie jako podłoże do hodowli komórek skóry wykorzystano żel kolagenowy zawierający siarczan chondroityny. Ponadto taki produkt jest dodatkowo pokryty polimerową błoną zapobiegającą jego wysychaniu w trakcie leczenia (21). W dalszych badaniach nad hodowlą ludzkich komórek i tkanek poza organizmem doprowadzono do stworzenia syntetycznej tkanki, o nazwie Corticel. Zawiera ona ludzkie chondrocyty, pobrane ze złamanych kości, które hoduje się na odpowiednim polimerowym podłożu. Corticel planuje się wykorzystać do leczenia pęcherza moczowego, we wrodzonych defektach pęcherza u dzieci i w chorobach nietrzymania moczu u dorosłych. Podobnym produktem jak Corticel jest Chondrogel, który stanowi mieszaninę autologicznych chondrocytów hodowanych na hydrożelowym podłożu. Preparaty te znajdują się obecnie w II lub III fazie badań klinicznych (7), a próby ich produkcji podjęto w licznych firmach biotechnologicznych na świecie (tab. 2).

Tabela 2

Preparaty produkowane przez firmy biotechnologiczne na potrzeby medycyny regeneracyjnej

Nazwa firmy biotechnologicznej	Regenerowana tkanka / organ	Produkt / nazwa produktu
tkanki i organy człowieka		
Advanced Tissue Sciences (La Jolla, CA)	skóra	TransCyte, Dermagraft
Organogenesis (Canton, MA)	skóra	Apligraf
LifeCell (Branchburg, NJ)	skóra	Alloderm
GenzymeBioSurgery (Cambridge, MA)	chrząstka	Corticeal
Curis (Cambridge)	chrząstka	Chondrogel (III faza badań)
czynniki wzrostu		
Human Genome Sciences (Rockville, MD)	układ krwionośny i immunologiczny	Repifermin (II faza badań)
The Genetics Institute (Cambridge, MA)	regeneracja kości	rhBMP-2 (I faza badań)
Curis (Cambridge, MA)	regeneracja kości	OP-1
komórki macierzyste – badania przedkliniczne		
Geron (Menlo Park, CA)	różne tkanki	–
Layton Bioscience (Sunnyvale, CA)	komórki nerwowe	–
Aegera Therapeutics (Montreal, PQ, Kanada)	skóra	komórki macierzyste skóry
Ixion Biotechnologies (Alachua, FL)	trzustka	komórki macierzyste wysp trzustki
MorphoGen Pharmaceutical (San Diego, CA)	różne tkanki	komórki pluripotencjalne („wielopotencjalne”)
Cell Based Delivery (Providence, RI)	serce	komórki do regeneracji mięśnia sercowego
ksenotransplantacje		
PPL Therapeutics (Edinburgh, UK oraz Blacksburg, VA)	–	komórki i tkanki transgenicznych świń
Biotransplant (Charlestown, MA)	–	komórki i tkanki świń transgenicznych wolne od wirusów RERV
macierze i biomateriały do hodowli		
Advanced Materials Design (New York)	mięśnie i kości	polimery do hodowli mięśni i kości
Interpore International (Irvine, CA)	kości	ProOsteon – szkielety koralaki do hodowli kości
Protein Polymer Technologies (San Diego, CA)	–	rekombinowane polimery, hydrożele
Selective Genetics (San Diego, CA)	–	macierze do przenoszenia DNA i innych zastosowań

Jako podłoże do hodowli komórek i tkanek człowieka najczęściej stosuje się poza wspomnianymi żelami kolagenowymi i hydrożelami zbudowanymi z cyklicznych dimerów kwasu mlekowego (polilaktyd):

- polimery kwasu glikolowego (poligid);
 - polimery kwasu alginowego (alginian)
- oraz różne kopolimery;
- np. polietylenoglikol-poliekaprolakton-polietylenoglikol (PEG-PCL-PEG) (22-26).

Dodatkowym składnikiem podłoży są białka i czynniki wzrostu pochodzące z macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki łącznej, krwionośnej, nabłonka jelit (27-33).

Doskonałym podłożem do wzrostu komórek skóry jest chitozan – polikationowy biopolimer, otrzymany w wyniku N-deacylacji chityny. Chityna jako homopolimer jest zbudowana z N-acetyl-D-glukoaminowych cząsteczek połączonych wiązaniami beta 1-4 glikoaminowymi (31). Chitozan ulega biodegradacji i jest nietoksyczny dla człowieka i zwierząt.

Trójwymiarowe podłoża porowate stosowane w hodowli tkankowej stanowią nie tylko rusztowanie do wzrostu komórek, ale również zapewniają im dostęp czynników do tego niezbędnych. Ponadto umożliwiają różnicowanie się komórek i ich organizowanie się w tkanki, sprzyjają rozwojowi naczyń krwionośnych i nie wywołują reakcji immunologicznej.

Ostatnio do regeneracji złamań kości próbuje się także wykorzystać szkielety koralu lub gąbek, wszczepianych w miejsce złamania wraz z komórkami zrębowymi chorego, które wydzielają czynniki stymulujące proliferację i różnicowanie się komórek kostnych, przyspieszając regenerację kości. Korale protezy są po kilku tygodniach wchłaniane przez organizm człowieka i zastępowane właściwymi komórkami budującymi kości. Trójwymiarowe podłoża utworzone ze szkieletów gąbek czy włókien kolagenowych wykorzystano również jako „pułapki” dla wektorów (plazmidowych lub wirusowych) zawierających gen terapeutyczny – GAM (ang. *gene activated matrix*), oraz leków i białek, wstrzykiwanych w miejsce, które ma być zregenerowane (34-37). Do przenoszenia leków oraz cząsteczek DNA do komórek ssaków wykorzystuje się także ich mikrokapsułkowanie chitozanem. Wydajność przenoszenia jest jednak bardzo niska i zależy od typu komórki (38). Z różnymi sposobami przenoszenia leków i genów terapeutycznych do komórek można zapoznać się w oddzielnym opracowaniu (3).

2.3. Pozyskiwanie komórek i tkanek do przeszczepów

Jeden z ważkich problemów w medycynie regeneracyjnej polega na pozyskaniu do przeszczepu odpowiednich komórek czy tkanek. Źródłem takich implantów są komórki i tkanki własne biorcy (autologiczne) (39-41) lub pobrane od dawcy wykazującego zgodność antygenów tkankowych z biorcą (przeszczepy allogeniczne) (42-44). Duże nadzieje, z uwagi na trudności z pozyskaniem właściwego przeszczepu, wiąże się z ksenotransplantacjami, czyli przeszczepianiem choremu człowiekowi komórek, tkanek i organów zwierzęcych. Tkanki zwierzęce do przeszczepu po raz pierwszy wykorzystano w XVII w., kiedy ubytek kości w czaszce człowieka zastąpiono

fragmentem kości psa. Następnie próbowano człowiekowi przeszczepić także skórę żaby, nerki i serce szympanśów, wątrobę oraz komórki odpornościowe pawiana czy neurony świni. Zabiegi te nie powiodły się w wyniku reakcji odrzucenia przeszczepu oraz infekcji. Najdłużej w ciele człowieka utrzymywały się przeszczepione neurony pobrane od świni (do 7 miesięcy), natomiast świńskie serce i nerki przeszczepione małpom – odpowiednio 35 i 78 dni (45-49). Z tego też względu dla ksenotransplantacji ważne znaczenie mogą mieć zwierzęta transgeniczne.

Ostatnio dużo uwagi poświęca się genetycznie modyfikowanym świniom, których komórki pozbawione są na powierzchni alfa 1,3 galaktozylo-galaktozy (6,50). Komórki takie układ odpornościowy człowieka traktuje jako własne. Odrzucaniu przeszczepów może także zapobiec zidentyfikowanie na komórkach świń innych specyficznych antygenów, rozpoznawanych przez ludzkie przeciwciała. Ich poznanie pozwoli na wprowadzenie do genomu świni genów, które u świni zastąpione będą ludzkim antygenem lub na ich wyeliminowaniu, wprowadzając np. niszczące je enzymy. Jednym ze sposobów zapobiegania odrzutom jest okrywanie przeszczepianych komórek lub tkanek syntetyczną błoną, półprzepuszczalną, przez którą mogą przedostawać się do organizmu substancje przez nie produkowane w celu terapeutycznym, natomiast jest ona nieprzepuszczalna dla komórek układu odpornościowego biorcy. W ten sposób komórki wątrobowe człowieka (Hep G2), jak również śledziony, dostarczające właściwych enzymów, otoczono polimerem alginino-poliL-lizyny (ALP) przed ich wprowadzeniem do organizmu (51). Z kolei, do leczenia glejaka próbuje się wykorzystać endostatynę. Jest ona produkowana przez komórki zarodkowe nerki człowieka, które otoczone żelazem algininowym usieciowanym jonami wapnia wstrzyknięto do guza mózgu u szczura i wykazano znaczny spadek jego masy oraz regresję nowotworu (52). Komórki jajnika chomika (CHO, ang. *hamster ovary cell*), wydzielające apolipoproteinę E (apoE3), otoczone polimerem algininy z polilizyną lub polietylenoiminą, zamierza się zastosować do leczenia miażdżycy u ludzi (53). Polimery te są również wykorzystywane do mikrokapsułkowania komórek zwierzęcych wytwarzających insulinę, w celu leczenia cukrzycy u ludzi (54,55). Innym ze sposobów zapobiegania odrzucaniu ksenotransplantów jest tworzenie chimerycznego układu odpornościowego. Polega to na wprowadzeniu do organizmu człowieka komórek szpiku kostnego pobranego od zwierząt, odpowiednio przygotowanego. Ze szpiku usuwa się przede wszystkim limfocyty T, krwinki czerwone oraz osocze. Dodatkowym problemem przy ksenotransplantacjach są endogenne wirusy, które w organizmach zwierzęcych nie wywołują infekcji, natomiast po przeszczepie z ksenotransplantem mogą być przyczyną silnego zakażenia u biorcy (56-58).

W tym przypadku istotne znaczenie ma produkowanie zwierząt transgenicznych wolnych od patogenów. Ważna jest także odpowiednia diagnostyka, pozwalająca na szybką identyfikację patogenów u zwierząt i wyeliminowanie z ksenotransplantacji tych, które są ich nosicielami.

Wiele emocji towarzyszy perspektywie zastosowania w medycynie regeneracyjnej komórek macierzystych (59).

3. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste są to totipotencjalne komórki, zdolne do podziałów, samoodtworzenia i różnicowania się w komórki różnych tkanek organizmu. Wyróżnia się dwa ich rodzaje:

- zarodkowe, pierwotne komórki macierzyste – występujące na etapie życia płodowego;
- komórki macierzyste tkanek – obecne w tkankach dorosłego organizmu człowieka (m.in. w szpiku, jelitach, naskórku, tkance nerwowej, krwi, siatkówce oka) oraz we krwi pępowinowej.

Najmniej ukierunkowane są, a przez to mają najwięcej możliwości różnicowania, zarodkowe komórki macierzyste. W późniejszym okresie życia komórki macierzyste występują głównie w tych tkankach, w których istnieje potrzeba ciągłego wytwarzania nowych komórek i regeneracji tkanek.

3.1. Zarodkowe komórki macierzyste

Zarodkowe komórki macierzyste – komórki ES (ang. *embryonic stem cells*) można uzyskać z wewnętrznej masy komórek ICM (ang. *inner cell mass*) blastocysty podczas gastrulacji. Po wyizolowaniu ICM od reszty blastocysty można ją utrzymywać w odpowiednich pożywkach w niezróżnicowanym stanie. Linie ludzkich komórek ES można otrzymać poprzez selekcję i namnożenie indywidualnych kolonii ICM o jednolitej i niezróżnicowanej morfologii. Komórki ES pozostają diploidalne oraz zachowują swój zarodkowy i proliferacyjny charakter w czasie wielu podziałów komórkowych w hodowli. Mają one praktycznie nieograniczone zdolności do samoodnowy i różnicowania, będąc prekursorami wszystkich linii komórkowych dorosłego organizmu.

Zarodki potrzebne do wyhodowania komórek ES można pozyskać dwiema drogami: w wyniku zapłodnienia komórki jajowej plemnikiem poza organizmem – *in vitro*, lub metodą klonowania somatycznego. Klonowanie somatyczne wykonuje się techniką transplantacji jąder komórkowych. W tym przypadku do komórki jajowej, pozbawionej jądra komórkowego, wprowadza się jądro z komórki somatycznej. Otrzymane obu sposobami zarodki hoduje się wstępnie na odpowiednich pożywkach do stadium blastocysty, z której można następnie izolować wewnętrzną masę komórek (ICM) do celów terapeutycznych (klonowanie terapeutyczne). Zarodki wyhodowane do stadium blastocysty w przypadku klonowania reprodukcyjnego wprowadza się do macicy odpowiedniej matki biorczyni w celu ich dalszego rozwoju prenatalnego. Transfer jądrowy umożliwia teoretycznie otrzymanie autologicznego źródła własnych komórek ES o pełnej zgodności immunologicznej, idealnych do terapii regeneracyjnej. We wstępnych badaniach wykazano, że izolowane z blastocyst komórki macierzyste hodowane *in vitro* mają takie same antygeny układu zgod-

ności tkankowej jak komórki osobnika, od którego pochodziły jądra komórkowe. Stwarza to realną szansę ich wykorzystania w przyszłości do celów terapeutycznych. Wydajność tego typu klonowania jest jednak bardzo niska, a koszty całej procedury bardzo wysokie. Na przykład przy wykorzystaniu ok. 200 oocytów rozwija się najwyżej 30 blastocyst. Trudności wynikają również ze sposobu pozyskiwania samych oocytów. Kobiety, dawczynie oocytów, poddawane są silnej stymulacji hormonalnej, która może być przyczyną wielu schorzeń wątroby, udaru mózgu, a nawet nowotworów. Do końca nie wiadomo także jakie komórki są optymalne do pobierania jąder komórkowych do transplantacji. Dodatkowym czynnikiem jest słabo poznane piętno genomowe, warunkujące prawidłowe różnicowanie się komórek i rozwój zarodka. Dlatego pod znakiem zapytania stoi jakość otrzymanywanych w ten sposób komórek macierzystych. Ponadto klonowanie zarodków ludzkich budzi wiele wątpliwości i problemów natury etycznej (2,59).

3.2. Komórki macierzyste tkanek

W odróżnieniu od komórek zarodkowych, stosowanie komórek macierzystych uzyskiwanych od dorosłego człowieka w celach terapeutycznych spotyka się z powszechną akceptacją. Większość tkanek, jak wspomniano, zawiera niewielką liczbę niezróżnicowanych komórek macierzystych, funkcjonujących jako komórki rodzielskie dla bardziej wyspecjalizowanych komórek danej tkanki. Najlepiej poznane są komórki macierzyste szpiku kostnego. Przeszczepianie szpiku jest szeroko stosowanym leczeniem w wielu schorzeniach układu krwiotwórczego. Do niedawna sądzono, że różnicowanie się komórek jest procesem nieodwracalnym. W ostatniej serii odkryć podważa się jednak ten pogląd, wykazując, że niektóre populacje komórek mogą się różnicować w komórki swoiste dla innych tkanek. Tak na przykład z komórek szpiku kostnego udało się otrzymać tak różnorodne komórki, jak: neurony, hepatocyty, komórki mięśnia sercowego czy mięśni szkieletowych (60).

Chociaż większość badań prowadzi się obecnie nad komórkami macierzystymi szpiku kostnego (głównie krwiotwórczymi i mezenchymalnymi), dużym zainteresowaniem cieszą się również komórki macierzyste innych tkanek (m.in. mięśni szkieletowych, tkanki nerwowej oraz uzyskane z krwi pępowinowej). Spośród komórek macierzystych tkanek najbardziej pierwotne są komórki macierzyste krwi pępowinowej. Do ich zalet należy też niskie ryzyko zanieczyszczenia patogenami i wystąpienia reakcji immunologicznej oraz możliwość pobrania bez ryzyka dla dawcy. Z tego względu próbuje się leczyć nimi białaczki oraz niektóre inne choroby nowotworowe, a także anemię aplastyczną i sierpowatą oraz ciężkie niedobory odporności. Główną wadą krwi pępowinowej jest stosunkowo niska liczba otrzymanywanych z niej komórek macierzystych, co utrudnia ich zastosowanie w leczeniu (60-63).

3.3. Wykorzystanie komórek macierzystych w terapii chorób człowieka

Mimo że nasza wiedza dotycząca rozwoju i różnicowania się komórek macierzystych jest niewystarczająca, w wielu klinikach na całym świecie, w tym także w Polsce, przeprowadza się już zabiegi, które mają na celu regenerację mięśnia sercowego z udziałem tych komórek (64). Nie ma jednej procedury, ani nawet jednego określonego typu komórek stosowanych ogólnie; nikt nie potrafi też do końca wyjaśnić, na czym polega ich terapeutyczne działanie.

Komórki mięśnia sercowego nie dzielą się, dlatego obumarłe w wyniku zawału lub choroby wieńcowej serca nie są zastępowane nowymi i tworzą tkankę nekrotyczną. Obecnie stosowane są dwie główne metody terapii komórkowej serca: bezpośrednie wstrzykiwanie komórek macierzystych do serca oraz podawanie leków powodujących namnażanie się komórek macierzystych w szpiku i ich przekazywanie do krwiobiegu chorego (m.in. G-CSF, stosowany również w Polsce) (65,66).

W innej proponowanej terapii komórkowej pacjentom próbuje się wszczepić do uszkodzonego mięśnia sercowego niedojrzałe komórki jego własnych mięśni szkieletowych. W przeciwieństwie do mięśnia sercowego, mięśnie szkieletowe mają zdolność odnowy po uszkodzeniu, ponieważ posiadają komórki prekursorowe – mioblasty. Terapia komórkowa z użyciem mioblastów była poprzedzona kilkunastoletnimi badaniami nad zwierzętami i zapowiadała się obiecująco. Po zastosowaniu tej terapii u ludzi następowała poprawa kondycji mięśnia sercowego. W kilku przypadkach stwierdzono jednak, że we wczesnym okresie pooperacyjnym wystąpiła arytmia serca. Istnieją przypuszczenia, że komórki pochodzące z mięśnia szkieletowego mogą mieć inny rytm kurczenia się w stosunku do komórek serca (64,66-68).

Ze względów etycznych, w leczeniu pozawałowym nie stosuje się ludzkich zarodkowych i płodowych komórek macierzystych, jakkolwiek w modelach zwierzęcych dają one obiecujące wyniki. Wobec dostępności różnych komórek ksenogenicznych oraz mniejszych zagadnień natury etycznej towarzyszących ich zastosowaniu, alternatywnym podejściem w regeneracji mięśnia sercowego może być ksenotransplantacja komórkowa. W tym przypadku główną przeszkodą jest jednak odpowiedź układu odpornościowego przeciw przeszczepowi, i aby temu zapobiec konieczność zastosowania immunosupresji (61).

Zastosowanie komórek macierzystych nie ogranicza się do leczenia pozawałowego. Komórki te mają bowiem potencjalnie zdolność regeneracji wszelkich tkanek i narządów. Terapię komórkową próbuje się zastosować pomocniczo w leczeniu nowotworów (np. choroby Hodgkina) lub nawet jako podstawę leczenia przeciwnowotworowego (np. w złośliwym raku nerki) (69,70). Mezenchymalne komórki macierzyste mogą być wszczepiane lokalnie, w celu wspomaganie zrostu złamanej kości, w leczeniu osteoporozy oraz w przeszczepach kości (60,71). Z kolei kompleksowa terapia genowo-komórkowa, z użyciem czynników neurotroficznych, jest jedną ze strategii stosowanych w celu regeneracji uszkodzeń rdzenia kręgowego oraz mózgu w licznych schorzeniach neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinsona,

Alzheimera, stwardnienie rozsiane) (71). Prowadzone są także intensywne badania nad sposobem regeneracji wysp trzustkowych uszkodzonych u chorych z cukrzycą (72).

Komórki macierzyste mają niewątpliwie ogromny potencjał terapeutyczny i będą odgrywać znaczącą rolę w medycynie przyszłości. Zanim jednak będziemy mogli w pełni korzystać z ich możliwości, należy wykonać jeszcze wiele podstawowych badań.

4. Biotechnologia w medycynie reprodukcyjnej

Rozwój biologii molekularnej, genetyki oraz technik zapłodnienia *in vitro* stworzył także możliwości otrzymywania nowych organizmów na drodze klonowania. W wielu badaniach wskazuje się jednak, że klonowane zarodki ssacze mogą być obciążone licznymi wadami. Wady te można wykryć stosując przedimplantacyjną diagnostykę genetyczną PGD (ang. *preimplantation genetic diagnosis*) klonowanych zarodków. Dzięki tej metodzie możliwe jest sprawdzenie, czy w zarodku nie występują wady genetyczne, jeszcze przed wprowadzeniem go do macicy przyszłej matki (75). Szczególnie ważne jest to w klonowaniu reprodukcyjnym dla par obciążonych wrodzonymi anomaliami chromosomowymi i chorobami genetycznymi (76). PGD może też okazać się pomocna dla starszych kobiet planujących macierzyństwo, u których znacznie zwiększone jest ryzyko wystąpienia w oocytach aneuploidii chromosomowej (76). W ostatnio przeprowadzonych badaniach wskazuje się, że metoda ta pozwala także na wykrycie dziedzicznych predyspozycji do zapadania na nowotwory, na przykład związanych z mutacją genu supresora nowotworów – p53 (76).

Pełen cykl PGD obejmuje kilka etapów. Pierwszym jest wywiad genetyka klinicznego z przyszłymi rodzicami i przeprowadzenie odpowiednich badań ich DNA, wyizolowanego z komórek krwi obwodowej. Badanie to umożliwi ustalenie stopnia ryzyka obciążenia schorzeniem genetycznym przyszłego potomstwa badanej pary. Kolejnym krokiem jest pobór oocytów od kobiety poddanej hiperstymulacji hormonalnej i ich zapłodnienie poza ustrojem. Aktualnie stosowane są dwie techniki wspomaganego rozrodu. Pierwsza z nich zwana IVF (ang. *in vitro fertilization*) polega na zapłodnieniu komórki jajowej plemnikiem w warunkach *in vitro*, odpowiadających środowisku naturalnemu. Druga z metod ICSI (ang. *intracytoplasmic sperm injection*) to bezpośrednie wprowadzenie plemnika do cytoplazmy komórki jajowej. W metodzie tej pominięte zostają procesy związane z zapłodnieniem takie jak kapacytacja, reakcja akrosomalna, czy reakcja osłonki przejrystej. W obu przypadkach trzeciego dnia po zapłodnieniu, kiedy zarodki osiągają wielkość 8-12 komórek, pobiera się z nich, metodą mikromanipulacji, jedną lub dwie komórki, w celu wykonania analiz genetycznych. Zarodki tymczasem dalej rozwijają się w inkubatorze. Pobranie jednej lub dwóch komórek zarodka na tym etapie rozwoju nie ma wpływu na jego żywotność, tempo podziałów, czy rozwój do stadium blastocysty (74). Po wykonaniu testów ge-

netycznych wybierane są te z zarodków, które nie mają wad genetycznych i wprowadza się je do macicy przyszłej matki, maksymalnie po dwa z nich.

Obecnie PGD jest oferowana w ponad 20. krajach. Dzięki niej wykrywa się znaczną liczbę defektów pojedynczych genów oraz aberracje chromosomowe (tab. 3). Możliwe jest także zbadanie płci zarodka, jeśli istnieje ryzyko choroby związanej z płcią (2). Dotychczas urodziło się ponad 1000 zdrowych dzieci po zabiegach PGD, co pośrednio potwierdza skuteczność i bezpieczeństwo stosowanych procedur (77).

Tabela 3

Niekóre choroby dziedziczne wykrywane w preimplantacyjnej diagnostyce genetycznej PGD (2)

Choroba dziedziczna	Nieprawidłowy gen	Mutacja	Metody detekcji
<i>Autosomalna recesywna</i>			
mukowiscydoza	transbłonowy regulator mukowiscydozy (CFTR)	delecja 3 nt Δ F508 w eksonie 10 genu CFTR	analiza heterodupleksów
choroba Tay-Sachsa	heksosaminidaza A	insercja 4 nt w eksonie 11	trawienie restrykcyjne; analiza heterodupleksów
zespół Lesch-Nyhana	fosforybozylotransferaza hipoksantyny (HPRT)	punktowa mutacja w eksonie 3	trawienie restrykcyjne
β -talasemia	β -globina	różne punktowa mutacja w eksonie 5	polimorfizm konformacji pojedynczej nici (SSCP); allelospecyficzna hybrydyzacja oligonukleotydów
rdzeniowy zanik mięśni (SMN, ang. <i>spinal muscular atrophy</i>)	kilka prawdopodobnych genów	delecja eksonów 7 i 8-telomerowej kopii SMN	trawienie restrykcyjne
<i>Autosomalna dominująca</i>			
syndrom Marfana	fibrilina (FBN1)	nie wykryto mutacji	RT-PCR
dystrofia miotoniczna	kinaza białkowa miotoniny	powtórzenia CTG i powiązany polimorfizm	elektroforeza w żelu i trawienie restrykcyjne
pląsawica Huntingtona	huntingina	powtórzenia tripletowe	fluorescencyjny PCR i analiza automatyczna
rodzinna polipowatość gruczołakowata jelita grubego	APC	insercja T w eksonie 15B i powiązany polimorfizm	amplifikacja całego genomu poprzez PEP, następnie SSCP
<i>Związana z chromosomem X recesywna</i>			
dystrofia mięśniowa Duchenne'a	dystrofina	delecja eksonów 3-18	detekcja produktów eksonu 17
<i>Związana z chromosomem X dominująca</i>			
zespół kruchego chromosomu X	FMR1	powtórzenia CGG	zmodyfikowany nested PCR i denaturujący żel sekwencyjny

W badaniach korzysta się z metod biologii molekularnej, genetyki i biotechnologii. Umożliwia to analizę kariotypów, identyfikowanie w nich zmian zarówno w liczbie jak i strukturze chromosomów. Najczęściej stosowaną techniką jest porównawcza hybrydyzacja genomowa CGH (ang. *comparative genomic hybridisation*). W metodzie tej testowany DNA oraz DNA zdrowej komórki znakuje się różnymi fluorochromami, (np. czerwonym i zielonym), i hybryduje z DNA chromosomów metafazowych z komórki prawidłowej. Analiza powstałych hybrydów pozwala na ocenę zmian w całym zestawie chromosomów równocześnie (74,78).

W celu zbadania płci oraz wad chromosomowych w PGD stosowana jest również metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*-FISH (ang. *fluorescence in situ hybridisation*), z użyciem sond molekularnych znakowanych fluorochromami, specyficznych dla określonych chromosomów lub sekwencji DNA na danym chromosomie (73). Do badania mutacji w pojedynczych genach, odpowiadających za powstawanie dziedzicznych chorób genetycznych, używana jest metoda łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (ang. *polymerase chain reaction*) wraz z analizą heterodupleksów oraz SSCP (ang. *single-strand conformation polymorphism*) i RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) (tab. 3).

Obecnie opisano prawie 600 chorób genetycznych (2).

W przypadku choroby związanej z chromosomem męskim X, efekt fenotypowy pojawia się tylko u płci męskiej (XY), natomiast zdrowe są zarodki żeńskie, mające jeden prawidłowy allel ojcowski i drugi obciążony wadą genetyczną od matki (XX), jednak są one nosicielami nieprawidłowego allelu. W takim przypadku do macicy przenoszone są tylko zarodki płci żeńskiej.

Poznano także wiele chorób związanych z nieprawidłową strukturą genów zlokalizowanych na chromosomach autosomalnych.

Pierwszym takim defektem genowym, który udało się z sukcesem wykryć, była trójnukleotydomowa delecja $\Delta F508$ w eksonie 10. genu kodującego białko kanału chlorokowego komórek nabłonkowych – CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane regulator*), będącego przyczyną najczęstszej choroby autosomalnie recesywnej – mukowiscydozy (tab. 3). Metodą użytą w tym przypadku była analiza heterodupleksów (74).

Diagnostykę przedimplantacyjną należy odróżnić od konwencjonalnych badań prenatalnych, podczas których badania genetyczne wykonuje się na komórkach płodu pobranych wraz z płynem owodniowym podczas zabiegu amniocentezy dopiero około 15. tygodnia ciąży lub z komórek pobranych z kosmków kosmówki CVS (ang. *chorionic villus sampling*) około 11. tygodnia (2). Uważa się, że dzięki PGD wiele par może uniknąć dylematów i cierpień wywołanych trudną decyzją przerwania lub pozostawienia zaawansowanej ciąży, gdzie u płodu wykryto wadę genetyczną. Przedimplantacyjna diagnostyka genetyczna wzbudza jednak wiele wątpliwości etycznych. Chrześcijanie uważają, że życie ludzkie rozpoczyna się w chwili zapłodnienia, stąd niedopuszczalne jest odrzucanie zarodków, nawet tych z wykrytą wadą genetyczną. W wielu krajach europejskich sugeruje się, że technika ta może być użyta

w celach eugenicznych. Prowadzi to do uchwalania restrykcyjnych aktów prawnych i moratoriów na użycie PGD (61,74).

Innymi czynnikami ograniczającymi rozwój PGD są wysokie koszty przeprowadzenia zapłodnienia *in vitro* oraz stosunkowo niski współczynnik ciąż po transferze prawidłowych zarodków do macicy (61). Wydaje się jednak, że rozwój przedimplanacyjnej diagnostyki genetycznej będzie postępował wraz z coraz większym jej upowszechnieniem oraz zwiększeniem liczby centrów, w których może być wykonywana, przez co ma szansę stać się alternatywnym podejściem do diagnostyki prenatalnej (74,79).

5. Uwagi końcowe

Postęp w rozwoju metod biotechnologii oraz inżynierii genetycznej, zabiegi genetyczne na oocytach, jak również możliwości ich zapłodnienia pozaustrojowego stworzyły także podstawy do podjęcia prób nad klonowaniem komórek człowieka. Badania takie ze względów etycznych budzą duży sprzeciw społeczny i wiele krajów zabroniło prawnie ich prowadzenia. Mimo to w kilku krajach próby takie, w celu pozyskania nie tylko ludzkich komórek macierzystych do celów terapeutycznych, ale również w celach reprodukcyjnych, były podejmowane.

Dlatego ważnym zagadnieniem dla medycyny regeneracyjnej stało się poznanie czynników stymulujących komórki tkanek do samoodnowy oraz opóźniające proces starzenia się organizmu człowieka. Jednym ze sposobów, jakie w tym celu próbuje się wykorzystać, jest podawanie czynników, których produkcja zaczyna z wiekiem zanikać. W tym celu stosuje się ludzki hormon wzrostu, insulinopodobny czynnik wzrostu, zastępczą terapię hormonalną dla kobiet, jak również podawanie testosteronu i jego pochodnych.

Mimo ogromnego postępu biotechnologii w medycynie, wiele tkanek i narządów człowieka nie da się jednak usprawnić z użyciem opisanych metod, toteż pomocne są w tym przypadku sztuczne implanty. O ile jednak z dużym powodzeniem stosuje się sztuczne tętnice z poliestru czy endoprotezy z tytanu lub ceramiki, to zastąpienie implantami wątroby bądź śledziony jest niemożliwe. W sytuacjach takich uszkodzone narządy będzie można, zapewne, w przyszłości odbudować, stosując podawanie komórek macierzystych. Niewykluczone, że w podobny sposób zostanie podjęta regeneracja także innych narządów i tkanek.

Literatura

1. Chmiel A., (2002), *Biotechnologia*, 4, (59), 56-78.
2. Illmensee K., (2002), *Differentiation*, 69, 167-173.
3. Szala S., (2003), *Terapia genowa*, PWN, Warszawa.
4. Stocum D. L., (2002), *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2(3), 270-273.

5. Petit-Zeman S., (2001), *Nature Biotechnology*, 3 (19), 201-206.
6. Fodor W. L., (2003), *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 13 (1), 102-113.
7. Mironov V., Visconti R. P., Markwald R. R., (2004), *Expert Opin. Biol. Ther.*, 4(6), 73-81.
8. Czyż J., Wobus A. M., (2001), *Differentiation*, 68, 167-174.
9. Conconi M. T., Nico B., Mangieri D., Tommasini M., di Liddo R., Parnigotto P. P., Nussdoref G. G., Ribatti D., (2004), *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cel. Evol. Biol.*, 281(2), 1303-1307.
10. Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogaw M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K., Nishikawa S., (2000), *Nature*, 2(408), 92-96.
11. Obrępańska-Stęplowska A., Durzyński Ł., Goździcka-Józefiak A., (2005), *Postępy Biochemii*, 1(51), 69-79.
12. Knematsu A., Yamamoto S., Ozeki M., Noguchi T., Kanatani I., Ogara T., Tabata Y., (2004), *Biomaterials*, 25 (18), 4513-4520.
13. Salgado A. J., Coutinho O. P., Reis R. L., (2004), *Macromol. Biosci.*, 4 (8), 743-765.
14. Ripamonti U., Tasker J. R., (2000), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, (1), 47-55.
15. Lipinski D., Jura J., Kalak R., Plawski A., Kala M., Szalata M., Jarmus M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Groniek P., Smorag Z., Pienkowski M., Słomski R., (2003), *J. App. Genet.*, 44(2), 165-174.
16. Saito N., Takaoka K., (2003), *Biomaterials*, 24(13), 2287-2293.
17. Nardelli B., Morahan D. K., Bomg G. W., Semenuk M. A., Kreider B. L., Garotta G., (1999), *J. Leukoc. Biol.*, 65(6), 822-828.
18. Griffith L. G., Naughton G., (2002), *Science*, 295, 1009-1013.
19. Eaglstein W. H., Falanga V., (1998), *Adv. Wound Care*, 11, 1-8.
20. Bello Y. M., Falabella A. F., Eaglstein W. H., (2001), *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2(5), 305-313.
21. Kremer M., Lang E., Berger A. C., (200), *Br. J. Plast. Sur.*, 53(6), 459-465.
22. Kim J. H., Bac Y. H., (2004), *Eur. J. Pharm. Sci.*, 23(3), 245-251.
23. Hwang M. J., Suh J. M., Bac Y. H., Kim S. W., Jeony B., (2005), *Biomacromolecules*, 6(2), 885-890.
24. Najafi F., Sarbolouki M. N., (2003), *Biomaterials*, 24(7), 1175-1182.
25. Chu C. R., Coutts R. D., Yoshioka M., Harwood F. L., Monosow A. Z., Amiel D., (1995), *J. Biomater. Res.*, 29 (9), 1147-1154.
26. Takezawa T., Ozaki K., Nitani A., Takabayashi Ch., Shimo-Oka T., (2004), *Cell Transplant*, 13, 463-473.
27. Jeringan T. W., Croce M. A., Cagiannos C., Shell D. H., Handorf C. R., Fabian T. C., (2004), *Ann. Surg.*, 239(5), 733-738.
28. Compton C. C., Butler C. E., Yannas I. V., Warland G., Orgill D. P., (1998), *J. Invest. Dermatol.*, 110(6), 908-916.
29. Butler C. E., Yannas I. V., Compton C. A., Orgill D. P., (1999), *Br. J. Plast. Surg.*, 52(2), 127-132.
30. McDevitt C. A., Wildey G. M., Cutrone R. M., (2003), *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 67(2), 637-640.
31. Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Gurny R., (2004), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57(1), 35-52.
32. Haque T., Chen H., Ouyang W., Martoni C., Lawuyi B., Urbanska A. M., Prakash S., (2005), *Mol. Pharm.*, 2(1), 29-36.
33. Varshosaz J., Sadrai H., Alingari R., (2004), *J. Microencapsul.*, 21(7), 761-774.
34. Pratt A. B., Weber F. E., Schmoekel H. G., Muller R., Hubbell J. A., (2004), *Biotechnol. Bioeng.*, 86(1), 27-36.
35. Tieliewuhan Y., Hirata I., Sasaki A., Minagi H., Okazaki M., (2004), *Dent Mater J.*, 23(3), 258-264.
36. Gu D. L., Nguyen T., Gonzalez A. M., Printz M. A., Pierce G. F., Sosnowski B. A., Phillips M. L., Chandler L. A., (2004), *Mol. Ther.*, 9(5), 699-711.
37. Backstrom K. C., Bertone A. L., Wisner E. R., Weisbrode S. E., (2004), *Am. J. Vet. Res.*, 65(9), 1223-1232.
38. Daston T., Turank K., (2004), *J. Pharm. Sci.*, 7(2), 205-214.
39. Grande D. A., Pitman M. J., Peterson L., Menche D., Klein M., (1999), *J. Orthop. Res.*, 7, 208-218.
40. King P. J., Bryant T., Minas T., (2002), *J. Knee Sur.*, 15, 177-184.
41. Peterson L., Brittberg M., Kiviranta J., Akerlund E. L., Lindahl A., (2002), *Am. J. Sports. Med.*, 30, 2-12.

42. Pereti G. H., Caruso E. M., Randolph M. A., Zaleske D. J., (2001), *J. Orthop. Res.*, 19, 278-285.
43. Briscoe D. M., Dharnidharka V. R., Isaacs C., Downing G., Prasky S., Shew P., Parentean N. L., Hardin Young J., (1999), *Transplantation*, 67, 1590-1599.
44. Watanabe T., Kawano Y., Watanabe A., Tahane Y., (1999), *Haematology*, 7, 137-143.
45. Moscoso I., Hermida-Prieto M., Manez R., Lopez-Pelaez E., Centeno A., Diaz T. M., Domenech N., (2005), *Transplantation*, 29(7), 777-782.
46. Platt I. J., (2000), *Transpl. Int. Suppl.*, 1.S, 7-10.
47. Dai Y., Vaught T. D., Booke J., Chen S. H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. A., Jobst P. M., McCreath K. J., Lambom A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Odman A., Polejaeva I. A., Agares D. L., (2002), *Nature Biotechnol.*, 20, 251-255.
48. Fodor W. L., Williams B. L., Matis L. A., Madri J. A., Rollins S. A., Knight J. W., Velandar W., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 11153-11157.
49. Lai L., Kolberg-Simonds D., Park K. W., Cheong H. T., Greenstein J. L., Im G. S., Samuel M., Bonk A., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J., Prather R. S., (2002), *Science*, 295, 1089-1092.
50. Yu L., Miao H., Guo L., (2005), *DNA Cell Biol.*, 24 (3) 180-188.
51. Aoki T., Umekara Y., Ferrareso C., Sugiyama N., Middleton Y. A., Inderbitzin D., Demetron A. A., Rozga J., (2002), *Cell Transplant.*, 11(6), 553-561.
52. Bjerkvig R., Read T. A., Vajkoczy P., Aebischer P., Pralony W., Pratt S., Melvik J. E., Hagen A., Dornish H., (2002), *Acta Neurochir. Suppl.*, 88, 131-141.
53. Tagalakis A. D., Diakonov J. A., Graham I. R., Heald K. A., Harris J. D., Mulcaty J. V., Dickson G., Owen J. S., (2005), *Biochim. Biophys. Acta*, 1686(3), 190-199.
54. Schaffellner S., Stadlbauer V., Stiegler P., Hauser D., Halwachs G., Lackner C., Iberer F., Tscheliessnig K. H., (2005), *Transplant. Proc.*, (3791), 248-252.
55. Orłowski T. M., Godlewska E., Tarchalska M., Kiniasiewicz J., Antosiak M., Sabbat M., (2005), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 53(2), 180-184.
56. Levy M. F., Crippin J., Sutton S., Netto G., McCormack J., Curiel T., Goldstein R. M., Newman J., Diamond L. E., Byrne G., Logan J., Klintmalm G. B., (2000), *Transplantation*, 69, 272-280.
57. Switzer W. M., Steinhoff G., Kiessig V., Chikobava M., Anssar M., Morschheuser T., Lapin B., (1998), *Transpl. Int.*, 11, 247-251.
58. Martin V., Steinhoff G., Kiessig V., Chikobava M., Anssar M., Morschheuser T., Lapin B., (1998), *Transpl. Int.*, 11, 247-251.
59. Malcom R. A., Poulson R., Forbes S., Wright N. A., (2002), *J. Pathol.*, 197, 419-423.
60. Sylvester K. G., Longaker M. T., (2004), *Arch. Surg.*, 139, 93-99.
61. Xia Y., Min J., Morgan J. P., (2004), *Annals Thor. Surg.*, 77, 737-744.
62. Kyba M., Daley G. Q., (2003), *Exp. Hematology*, 31, 994-1006.
63. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P., (2001), *Nature*, 410, 701-701.
64. Siminiak T., Kurpisz M., (2003), *Circulation*, 108, 1167-1171.
65. Balsam L. B., Wagers A. J., Christensen J. L., Kofidis T., Weissman I. L., Robbins R. C., (2004), *Nature*, 428, 668-673.
66. Murry C. E., Soonpaa M. H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H. O., Rubart M., Pasumarthi K. B., Virag J. I., Bartelmez S. H., Poppa V., Bradford G., Dowell J. D., Williams D. A., Field L. J., (2004), *Nature*, 428, 664-668.
67. Chien K. R., (2004), *Nature*, 428, 607-608.
68. Couzin J., Vogel G., (2004), *Science*, 304, 192-194.
69. Schmitz N., Sureda A., (2004), *Semin. Oncol.*, 31, 27-32.
70. Fishman M. N., Antonia S. J., (2003), *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 3(6) 837-849.
71. Gamradt S. C., Lieberman J. R., (2003), *Clin Orthop.*, 417, 183-194.
72. Hendriks W. T., Ruitenberg M. J., Blits B., Boer G. J., Verhagen J., (2004), *Prog. Brain Res.*, 146, 451-476.
73. Soria B., (2001), *Differentiation*, 68, 205-219.
74. Brown K., (2001), *Genomy*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.

75. Handyside A. H., Delhanty J. D., (1997), *Trends Genet.*, 13(7), 270-275.
76. Kuliev A., Verlinsky Y., (2003), *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 15(3), 233-238.
77. Rechitsky S., Verlinsky O., Chistokhina A., Sharapova T., Ozen S., Masciangelo C., Kuliev A., Verlinsky Y., (2002), *Reprod. Biomed. Online*, 5(2), 148-155.
78. Wells D., Sherlock J. K., Handyside A. H., Delhanty J. D. A., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 27(4), 1214-1218.
79. Kuliev A., Verlinsky Y., (2004), *Reprod. Biomed. Online*, 8(2), 229-235.
80. Kuliev A., Verlinsky Y., (2002), *Reprod. Biomed. Online*, 5(3), 294-299.