VIA MEDICA

Artykuł przeglądowy • Review article

NOWOTWORY Journal of Oncology
2012, volume 62, number 1, 34–41
© Polskie Towarzystwo Onkologiczne
ISSN 0029-540X
www.nowotwory.edu.pl

Regeneracja narządów metodami inżynierii tkankowej u pacjentów dotkniętych chorobami nowotworowymi stanowi istotny problem. Rozważania na przykładzie raka pęcherza moczowego

Anna Bajek[1], Marta Pokrywczyńska[1], Tomasz Drewa[2]

Regeneracja i rekonstrukcja dróg moczowych skupiają zainteresowanie wielu badaczy. Najtrudniejszym wyzwaniem jest regeneracja pęcherza moczowego. Wiele chorób, np. rak pęcherza moczowego, uniemożliwia wykorzystanie autologicznego źródła komórek do regeneracji. Postęp w badaniach dotyczących inżynierii tkankowej stał się alternatywą do obecnie stosowanych metod leczenia. Coraz powszechniej wskazuje się również na możliwość wykorzystania komórek macierzystych jako narzędzia w rekonstrukcji dróg moczowych. Na szczególną uwagę zasługują komórki macierzyste mieszków włosowych i mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego. Cele niniejszej pracy to przegląd aktualnego piśmiennictwa i rozważania na temat możliwości regeneracji narządów za pomocą technik inżynierii tkankowej u osób z chorobami nowotworowymi.

Regeneration of tissue engineered organs for patients suffering from cancer is an important issue. Reflections based on the example of bladder cancer

Regeneration and reconstruction of the urinary tract has been a subject of interest to many researchers. Regeneration of the bladder wall is the most difficult challenge. Many diseases, such as bladder cancer, prevent the use of autologous cell source for regeneration. Progress in studies of tissue engineering has become an alternative to current treatments. There is also a growing body of data indicating the possibility of using stem cells in the reconstruction of the urinary tract. Particularly noteworthy are hair follicle stem cells and mesenchymal stem cells isolated from bone marrow. The aim of this study is a review of the current literature and reflections on the possibilities of organ regeneration using tissue engineering techniques in patients suffering from cancer.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2012; 62, 1: 34–41

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, komórki macierzyste, regeneracja dróg moczowych
Key words: tissue engineering, stem cells, urinary tract regeneration

Regeneracja dróg moczowych metodami inżynierii tkankowej

Regeneracja i rekonstrukcja dróg moczowych jest bardzo skomplikowanym zadaniem. Prace w tym zakresie mają długą historię. W 1888 roku Tizzoni i Poggi rozpoczęli badania doświadczalne nad możliwością odbudowy dróg moczowych, a w 1917 roku Neuhof odbudował ludzki pęcherz moczowy z wykorzystaniem powięzi [1]. Niestety, te pionierskie prace zostały przerwane na okres 40 lat. W latach 50. XX wieku Bricker, Kock i wsp. przedstawili różne możliwe drogi odbudowy i regeneracji dróg moczowych. W 1985 roku Studer z zespołem zaprezentowali zrekonstruowany za pomocą jelita krętego pęcherz moczowy, co stało się najbardziej popularnym przykładem pęcherza ortotopowego [2, 3]. Z wykorzystaniem jelita do regeneracji dróg moczowych wiąże się jednak wiele powikłań [4].

W 1991 roku Vacanti, Vacanti i Narem zdefiniowali pojęcie inżynierii tkankowej jako interdyscyplinarną dziedzinę, w któ-

[1] Zakład Inżynierii Tkankowej, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
[2] Oddział Urologii Onkologicznej, Centrum Onkologii w Bydgoszczy

rej stosuje się zasady rządzące inżynierią i hodowlą komórek w celu wytworzenia biologicznych materiałów zastępczych, mogących odbudować, utrzymać lub poprawić funkcję tkanek [5]. Historia inżynierii tkankowej sięga ponad 100 lat. Prace eksperymentalne Harrisona, Carrela i Rousa wykazały możliwość hodowania komórek poza organizmem żywym [6–8]. Metody inżynierii tkankowej wprowadzili do praktyki klinicznej Green, Ricordi, Brittberger i wielu innych [9–11].

Przy użyciu metod inżynierii tkankowej można zregenerować kilka odcinków dróg moczowych; natrudniejszym wyzwaniem jest regeneracja pęcherza moczowego. W 1999 roku Oberpenning wraz z zespołem przedstawili wyniki rekonstrukcji pęcherza moczowego na modelu psim [12]. Siedem lat później Atala i wsp. powtórzyli to doświadczenie na modelu ludzkim [13].

Wiele chorób, jak na przykład rak pęcherza moczowego czy śródmiąższowe zapalenie pęcherza moczowego, uniemożliwia wykorzystanie autologicznego źródła komórek do regeneracji i rekonstrukcji dróg moczowych. Rak pęcherza moczowego jest najczęstszym wskazaniem do cystektomii u mężczyzn. Coraz powszechniej wskazuje się na możliwość wykorzystania komórek macierzystych (mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego, komórek macierzystych mieszków włosowych) jako narzędzia w regeneracji i rekonstrukcji dróg moczowych. Przyszłość pokaże, czy przypuszczenie to okaże się słuszne [14].

Teorie dotyczące pochodzenia i rodzaju komórek macierzystych

Postęp w badaniach dotyczących komórek macierzystych spowodował, że wiąże się z nimi nadzieje wyleczenia wielu dotąd nieuleczalnych chorób człowieka. W związku z możliwością pokierowania różnicowaniem komórek macierzystych mogą one być wykorzystane w leczeniu chorób układu krwiotwórczego, chorób neurodegeneracyjnych, cukrzycy oraz prób regeneracji narządów. Komórki macierzyste mają zdolność wzbudzenia ekspresji białek w innych komórkach. Sugeruje się również, że komórki macierzyste, a dokładniej komórki macierzyste nowotworów, mogą być celem leczenia chorób nowotworowych, zwłaszcza o charakterze rozsianym [15–19].

Komórki macierzyste klasyfikuje się w zależności od ich potencjału do podziału i różnicowania w inne komórki, tkanki, narządy czy wreszcie cały organizm. Potencjał ten obejmuje zakres od totipotencjalności do pluripotencjalności i od multipotencjalności do unipotencjalności. Totipotencjalne komórki macierzyste mają zdolność różnicowania w komórki zdolne do zbudowania całego organizmu. Pluripotencjalne macierzyste komórki zarodkowe wyizolowane z węzła zarodkowego blastocysty mogą dać początek komórkom wszystkich trzech listków zarodkowych, ale nie są źródłem komórek pozazarodkowych, dlatego też nie są w stanie uformować organizmu. Komórki macierzyste wyizolowane z listków zarodkowych lub narządów z nich powstałych mają zdolność, poza samoodnową, do różnicowania w komórki charakterystyczne dla danego listka zarodkowego lub narządu. Te komórki nazywa się multipotencjalnymi. Komórki progenitorowe lub prekursorowe to takie, które wykazują ograniczoną zdolność do samoodnowy, a ich różnicowanie w warunkach fizjologicznych zachodzi w kierunku tylko jednego zdefiniowanego typu komórek. Są to komórki unipotencjalne. Zarówno komórki multipotencjalne, jak i unipotencjalne są izolowane z tkanek organizmów dojrzałych, dlatego też często określa się je wspólnie terminem *adult stem cells* [15]. Z drugiej strony sugeruje się obecność komórek o właściwościach pluripotecjalnych w organizmach dojrzałych, a także neguje się przedstawiony powyżej hierarchiczny podział komórek macierzystych [20–22].

Inżynieria tkankowa — eksperymentalna metoda regeneracji ściany dróg moczowych

Metody inżynierii tkankowej stwarzają możliwości konstruowania tkanek *in vitro* w celu ich późniejszego przeszczepiania. W 1999 roku przedstawiono wytworzony *in vitro* model zwierzęcy mięśnia wypieracza pęcherza moczowego. Źródłem komórek użytych do rekonstrukcji był pęcherz moczowy. Kontynuacja tych badań zaowocowała rekonstrukcją *in vitro* autologicznego mięśnia wypieracza pęcherza moczowego dla siedmiu pacjentów. Jest to jedyny na świecie eksperyment przedstawiający możliwość rekonstrukcji *in vitro* mięśnia wypieracza pęcherza moczowego u człowieka. Rekonstrukcje przeprowadzono za pomocą autologicznych komórek nabłonkowych i mięśniowych (zróżnicowanych) pobranych z pęcherza moczowego. Rekonstrukcje te wykonano z powodu zaburzeń czynności pęcherza moczowego [12, 13].

Najczęściej operacje wytwórcze dróg moczowych wykonuje się u pacjentów z rakiem pęcherza. Sposobem zastąpienia pęcherza moczowego u chorych z naciekającym rakiem pęcherza moczowego po jego wycięciu jest wytworzenie zbiornika z izolowanego na krezce fragmentu jelita i połączenie go z kikutem cewki moczowej. Inne metody odprowadzenia moczu po wycięciu pęcherza z powodu raka to wykonanie szczelnego zbiornika jelitowego lub wszycie moczowodów do skóry za pomocą wstawki z jelita bądź bezpośrednio do skóry. Metody te, stosowane w urologii rekonstrukcyjnej od ponad 100 lat, są jednak obarczone wieloma działaniami niepożądanymi. Najczęściej występują zaburzenia elektrolitowe i równowagi osmotycznej, niedobory witamin, zaburzenia neurologiczne, osteoporoza, zakażenia układu moczowego, kamica moczowa, nowotworzenie w obrębie nabłonka jelita oraz w miejscach zespolenia z nabłonkiem dróg moczowych. Liczne są również powikłania związane z techniką operacji, takie jak zwężenie lub rozejście zespoleń, rozdęcie zbiorników, pęcherzy i wsta-

wek aż do ich pęknięcia [23–28]. Odtworzenie dolnych dróg wyprowadzających mocz (pęcherza moczowego) bez użycia fragmentu jelita jest największym wyzwaniem urologii rekonstrukcyjnej. Wyróżnia się dwie podstawowe metody cystoplastyki pęcherza za pomocą technik inżynierii tkankowej. Pierwsza technika polega na użyciu biodegradowalnych materiałów pozbawionych komórek. Tkanka jest regenerowana *in vivo* poprzez komórki gospodarza, które migrują do wszczepu. Wszczepiony materiał spełnia początkowo rolę rusztowania dla wzrastającej tkanki, z czasem ulegając przebudowie i degradacji. W drugiej metodzie wykorzystuje się przygotowane *in vitro* rusztowania przestrzenne wysiane komórkami. Namnożone *in vitro* komórki, wysiane na biodegradowalne materiały, formują pseudotkankę *in vitro*, a następnie tkankę *in vivo*. Matryca, na której wysiano komórki również ulega degradacji, ustępując miejsca wzrastającej tkance [29]. Poza komórkami nabłonkowymi i mięśniowymi do eksperymentalnych rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego używano z dobrym efektem jedynie zróżnicowanych komórek naskórka (keratynocytów), komórek macierzystych szpiku kostnego i fibroblastów [30–36].

Rusztowania wykorzystywane w inżynierii tkankowej mają nie tylko spełniać funkcje podporowe, czy też zastąpić funkcje fizjologiczne uszkodzonych tkanek, ale przede wszystkim pobudzać regenerację tkanek w miejscu uszkodzenia [37]. Nowym trendem w inżynierii tkankowej pęcherza moczowego jest stosowanie matryc wzbogaconych o egzogenne czynniki wzrostowe. W licznych badaniach doświadczalnych wykazano, że wysycenie matrycy BAM zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), naczyniowo-śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) czy czynnikiem wzrostu nerwów (NGF, *nerve growth factor*) korzystnie wpływa na procesy regeneracji naczyń krwionośnych oraz nerwów w obrębie rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego [38–40].

Mimo wielu zalet wynikających z użycia bezkomórkowych matryc, materiał ten nie pozwala na skuteczną i powtarzalną regenerację ściany pęcherza moczowego. Rekonstrukcja pęcherza moczowego wymaga regeneracji warstwy mięśniowej, ponieważ jego funkcja jako zbiornika moczu zależy głównie od podatności i kurczliwości mięśni gładkich wypieracza. Regenerację mięśni pęcherza moczowego wspomaga się poprzez zasiedlenie wszczepu komórkami mięśniowymi lub komórkami macierzystymi mającymi zdolność do różnicowania w komórki mięśniowe [13, 41, 42].

Choroby pęcherza moczowego dyskwalifikujące jego komórki do celów rekonstrukcyjnych

Komórki nabłonkowe oraz mięśniowe pęcherza moczowego charakteryzują się dużymi zdolnościami proliferacyjnymi. Te właściwości komórek urotelialnych i mięśniowych pozwalają na przeprowadzenie wielu zabiegów rekonstrukcyjnych w obrębie dróg moczowych, w których gojenie zachodzi dzięki wspomnianym właściwościom komórek. Komórki pochodzące z układu moczowego spełniają wszelkie warunki do tego, aby użyć ich do rekonstrukcji tkanek z wykorzystaniem osiągnięć inżynierii tkankowej zarówno *in vitro,* jak i *in vivo* [43–46].

Istnieje jednak wiele chorób pęcherza, w których pobranie komórek z pęcherza do hodowli jest niemożliwe z powodu dysfunkcji komórek. Wzrost takich komórek jest nieprawidłowy w hodowli *in vitro*, a także — prawdopodobnie — po przeszczepieniu ich choremu. Do takich schorzeń należą: śródmiąższowe zapalenie pęcherza moczowego, inne postacie przewlekłego zapalenia pęcherza moczowego, gruźlica, idiopatyczna nadczynność mięśnia wypieracza oraz urotelialny rak pęcherza moczowego. Wymienione choroby są stanami, które najczęściej wymagają rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego w celu zwiększenia jego objętości bądź rekonstrukcji całego pęcherza moczowego [47].

Komórki nabłonka wydzielają wiele cytokin destrukcyjnie wpływających na całą warstwę nabłonka u pacjentów ze śródmiąższowym zapaleniem pęcherza moczowego [48]. Uważa się, że mechanizmy sensoryczne przypisywane warstwie nabłonkowej pęcherza moczowego mają istotne znaczenie w patogenezie śródmiąższowego zapalenia pęcherza [49]. Nabłonek pęcherza pełni funkcje wydzielnicze. Dysfunkcja bariery nabłonkowej w pęcherzu moczowym spowodowana zaburzeniami neurogennymi (*neurogenic cystitis*) wiąże się z reakcją zapalną indukowaną przez czynnik martwicy nowotworu (TNF, *tumor necrosis factor*), który powoduje chemotaksję komórek żernych i zmiany zapalne w blaszce właściwej, co doprowadza do uszkodzeń nabłonka i przerwania jego ciągłości [50, 51]. Komórki żerne wydzielają TNF, który indukuje apoptozę w komórkach nabłonkowych pęcherza moczowego, powodując uszkodzenie bariery nabłonkowej i zmiany zapalne w całej ścianie pęcherza moczowego [50]. Zmiany podobne do opisanych w ścianie pęcherza moczowego u chorych z śródmiąższowym zapaleniem mogą występować w ścianie pęcherza u chorych z uszkodzeniem rdzenia kręgowego i zmianami opisywanymi jako dysfunkcja neurogenna pęcherza [48, 52, 53].

Koncepcja aktywnego udziału warstwy nabłonkowej w przewodzeniu impulsów nerwowych oraz generowaniu reakcji zapalnych w pęcherzu moczowym skłoniła do rozważenia możliwości występowania zaburzeń unerwienia pęcherza moczowego oraz uszkodzenia warstwy nabłonkowej (komórek urotelialnych), a także całej ściany pęcherza jako zjawisk ściśle ze sobą powiązanych [54–56]. Uszkodzenie bariery, którą tworzy nabłonek pęcherza, wynika z modulującego wpływu EGF i HB-EGF na prądy jonowe zależne od potasu [57]. Uważa się, że potas jest jednym z czynników wyzwalających reakcje zapalne w ścianie pęcherza moczowego. Parsons przypuszcza, że uszkodzenie bariery nabłonkowej obejmuje całe drogi moczowe [58]. Połączenia ścisłe

między komórkami urotelialnymi u pacjentów z śródmiąższowym zapaleniem pęcherza moczowego charakteryzują się zmniejszoną ekspresją białek budujących połączenia międzykomórkowe, a warstwa śluzowa charakteryzuje się zwiększoną przepuszczalnością [59]. Spostrzeżenia te potwierdzają badania Keay i wsp. [60], którzy obserwowali obniżoną proliferację komórek nabłonkowych pobranych z warstwy śluzowej od pacjentów z śródmiąższowym zapaleniem pęcherza moczowego. Autorzy tłumaczą obniżoną proliferację komórek nabłonkowych wpływem czynnika antyproliferacyjnego na wewnątrzkomórkowy mechanizm zależny od receptora dla wiążącego heparynę podobnego do naskórkowego czynnika wzrostu (HB-EGR, *heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*) [60–63]. Keay i wsp. wykazali, że komórki urotelialne pacjentów z śródmiąższowym zapaleniem pęcherza moczowego wykazują zmniejszoną ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację [60]. Fakt ten doświadczalnie potwierdzili Southgate i wsp. [47], porównując potencjały proliferacyjne komórek urotelialnych uzyskanych od pacjentów z śródmiąższowym zapaleniem pęcherza czy idiopatyczną nadczynnością mięśnia wypieracza. U pacjentów z przewlekłymi procesami zapalnymi, takimi jak śródmiąższowe zapalenie pęcherza moczowego, stwierdza się zaburzone wydzielanie czynników angiogennych [64]. Opisywane zmiany w komórkach pęcherza moczowego dyskwalifikują pęcherz moczowy jako źródło autologicznych komórek do budowy graftu ściany pęcherza dla chorych z uszkodzeniem rdzenia kręgowego i przewlekłymi chorobami zapalnymi pęcherza moczowego.

Pacjenci, u których w przeszłości rozpoznano i wyleczono powierzchownego raka pęcherza moczowego albo raka urotelialnego górnych dróg moczowych, są obarczeni ryzykiem nowotworzenia w każdej komórce nabłonka układu moczowego. Powierzchowny rak urotelialny pęcherza moczowego, a także powierzchowny rak urotelialny górnych dróg moczowych są chorobami wyleczalnymi. Jest całkiem prawdopodobne, że pacjenci wyleczeni z wyżej wymienionych nowotworów będą w przyszłości wymagali rekonstrukcji ściany i powiększenia pęcherza moczowego. Wskazania do powiększenia pęcherza moczowego mogą wynikać z licznych elektroresekcji, które powodują bliznowacenie ściany pęcherza moczowego [65]**.** Częściowa resekcja ściany pęcherza moczowego w leczeniu radykalnym raka zyskuje zwolenników, dlatego też w takich przypadkach może zachodzić konieczność rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego [66].

Dlaczego komórki urotelium u osób wyleczonych z raka nie mogą być pobrane do celów rekonstrukcyjnych przy zastosowaniu technik inżynierii tkankowej, m.in. poprzez namnażanie komórek nabłonka *in vitro*? Powody ku temu są co najmniej dwa, przy czym oba nie są do końca zdefiniowane. Po pierwsze, nie rozstrzygnięto, czy rak pęcherza jest chorobą całego nabłonka (panurotelialną), czy też jest zjawiskiem miejscowym. Nie wiadomo również, jaki udział w rozwoju urotelialnego raka pęcherza moczowego mają czynniki dziedziczne. Wiele danych wskazuje na to, że w niektórych przypadkach skłonność do powstania nowotworu dotyczy wszystkich komórek urotelialnych u danego osobnika. Solsona i wsp. [67] odnotowali, że nawet u 41% pacjentów z nawracającym i wieloogniskowym powierzchownym rakiem pęcherza może występować choroba panurotelialna, czyli ryzyko nowotworzenia w całym nabłonku urotelialnym. W grupie pacjentów z naciekającym rakiem pęcherza moczowego leczonych radykalnie odsetek osób z chorobą panurotelialną jest niższy i jeżeli mierzony jest częstością nawrotów raka w obrębie cewki moczowej wynosi około 3–7% [68–70]. Należy jednak z całym naciskiem podkreślić, że nabłonek cewki moczowej różni się od nabłonka urotelialnego, w związku z czym przedstawiona hipoteza nie może wiarygodnie odzwierciedlać skłonności osobniczej do rozwoju raka urotelialnego. Opisane właściwości raka urotelialnego nie pozwalają na bezpieczne użycie autologicznych komórek pęcherza moczowego do celów rekonstrukcyjnych. Stało się to przyczyną poszukiwań alternatywnych źródeł komórek do rekonstrukcji. Do tej pory z dobrym efektem stosowano zarówno komórki zróżnicowane, takie jak keratynocyty, fibroblasty, jak również komórki macierzyste takie jak mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (MSCs, *mesenchymal stem cells*), komórki macierzyste adipocytów (ADSCs, *adipocyte derived stem cells*), komórki macierzyste mieszków włosowych oraz embrionalne komórki macierzyste [31, 41, 42, 59, 71, 72].

Komórki macierzyste mieszków włosowych i ich znaczenie w inżynierii tkankowej

Mieszki włosowe, a tym bardziej cała skóra, to siedlisko bardzo dużej liczby różnorodnych komórek macierzystych. Komórki macierzyste, które są odpowiedzialne za regenerację naskórka znajdują się w warstwie podstawnej naskórka. Komórki te mają ograniczone zdolności do podziałów i różnicowania. Są zdolne do odbudowy naskórka w warunkach fizjologicznych. Uważa się, że są unipotencjalne. W przypadku konieczności odbudowy skóry po urazach i oparzeniach za regenerację całego naskórka odpowiadają komórki macierzyste mieszków włosowych. W mieszkach znajdują się komórki macierzyste o większym potencjale do różnicowania oraz podziałów niż w warstwie podstawnej naskórka. Obecne są tam komórki macierzyste pochodzące z neuroektodermy, które regenerują naskórek, włos oraz gruczoł łojowy i potowy. W obrębie mieszka włosowego znajdują się również komórki macierzyste o potencjale dorównującym komórkom embrionalnym; są to komórki pochodzące prawdopodobnie bezpośrednio z grzebienia nerwowego. W warunkach fizjologicznych biorą one udział w regeneracji melanocytów i zakończeń nerwów w skórze. Zarówno w okolicy mieszka, jak i w nim samym znajdują

się również komórki pochodzenia mezodermalnego; są to komórki macierzyste brodawki włosa oraz różnego typu fibroblasty znajdujące się w okolicy torebki włóknistej włosa i bezpośrednio z nią związane miofibroblasty, które biorą udział w procesach gojenia. Nisza komórek macierzystych mieszków włosowych jest też bogata w inne komórki pochodzenia mezodermalnego, takie jak komórki mięśniowe, budujące naczynia krwionośne i komórki odpornościowe [73–79]. Ta różnorodność komórek macierzystych skupionych na stosunkowo niewielkim obszarze mieszka włosowego jest zaletą tej niszy komórek macierzystych, ale równocześnie powoduje pewne utrudnienia, związane z dokładnym dobraniem właściwych markerów charakterystycznych dla konkretnego typu komórek macierzystych mieszka włosowego oraz trudnościami w izolacji i hodowli poszczególnych linii komórek macierzystych. Komórki macierzyste mieszków włosowych pochodzenia ektodermalnego znajdujące się w rejonie zgrubienia wykazują obecność różnych markerów, takich jak Oct-4, Pax3, Sox1,2,3, i 9, nestyny, β-kateniny, p63, CD34, CD71, CD200, keratyny 15, integryny α6β1, oraz białek związanych bezpośrednio z cyklem komórkowym i śmiercią komórki np. cyklina D1 i bcl-2. Istnieją znaczne różnice międzygatunkowe w ekspresji poszczególnych markerów. Trudno, więc porównywać badania eksperymentalne z badaniami klinicznymi. W hodowli *in vitro* komórki zachowują się inaczej niż w swojej fizjologicznej niszy. W czasie intensywnego pasażowania mogą zmieniać lub tracić ekspresję poszczególnych antygenów [76, 80–91].

Hodowla komórek macierzystych mieszków włosowych nastręcza wiele trudności. W celu izolacji komórek macierzystych mieszków włosowych łączy się metody trawienia enzymatycznego tkanek z technikami mikrochirurgicznymi i laserowymi. Bliskie sąsiedztwo nisz komórek macierzystych pochodzących z różnych listków zarodkowych wymaga odpowiedniego preparowania. Wykazano, co prawda, że światło lasera nie uszkadza macierzystych komórek nabłonkowych, a nacięcie brodawki włosa pozwala uwolnić macierzyste komórki mezodermalne. Obecnie jednak niemożliwe jest stosowanie tych metod na szeroką skalę [92–95]. Obiecująca jest praca Gho i wsp. [96] dotycząca możliwości hodowania komórek macierzystych mieszka włosowego izolowanych z wyrwanego włosa.

Z praktycznego punktu widzenia komórki macierzyste brodawek mieszków mogą stanowić cenne uzupełnienie macierzystych komórek nabłonkowych mieszka włosowego. Prawdopodobnie łączne zastosowanie obu rodzajów komórek macierzystych, tj. pochodzących z ektodermy oraz mezodermy stworzy szansę regeneracji całych narządów. Komórki macierzyste brodawki włosowej mogą się różnicować w kierunku komórek tłuszczowych czy też komórek kostnych [97]. Komórki te mogą odbudować szpik kostny w warunkach doświadczalnych [98]. Komórki macierzyste brodawek mieszków mają zdolność do regeneracji mieszka włosowego w przeszczepach zarówno alo-, jak i ksenogenicznych [99–102]. Plastyczność komórek macierzystych mieszków włosowych stwarza duże nadzieje i daje możliwości zastosowania tych komórek w medycynie regeneracyjnej. Te nadzieje wiążą się z faktem, że mieszki włosowe są jedną z nielicznych nisz w organizmie dorosłego ssaka, w tym również człowieka, z których można izolować komórki macierzyste o charakterze pluripotencjalnym. Bardzo obiecujące są doświadczenia, w których wykazano, że możliwe jest odzyskanie funkcji uszkodzonego rdzenia kręgowego po przeszczepieniu w miejsce urazu komórek macierzystych mieszków włosowych. Te pojedyncze na razie eksperymenty potwierdzające pluripotencjalność komórek macierzystych mieszków włosowych stwarzają możliwość zastosowania ich w medycynie regeneracyjnej. Wydaje się, że regeneracja ściany pęcherza moczowego szczura za pomocą komórek macierzystych potwierdza ich pluripotencjalność [97, 103–113].

Mezenchymalne komórki macierzyste jako potencjalne narzędzie regeneracji ściany pęcherza moczowego konstruowanego *in vitro*

Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w 1960 roku przez E. Cullocha i J. Tilla [114]. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, *mesenchymal stem cells*) są izolowane nie tylko ze szpiku kotsnego, ale także z tkanki tłuszczowej, krwi pępowinowej, płynu owodniowego, mięśni szkieletowych i wielu innych tkanek [115]. Jednak największym zainteresowaniem obdarza się komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego, ze względu na nieskomplikowaną metodę izolacji i hodowli. Co więcej, mają one potencjał do różnicowania się w kierunku osteocytów, adipocytów, chondrocytów, hepatocytów i miocytów [116]. Komórki MSC nie wykazują ekspresji MHC klasy II, czyniąc je nieimmunogennymi, co ogranicza konieczność stosowania leków immunosupresyjnych po przeszczepach allogenicznych [115]. Mimo wielu badań klinicznych prowadzonych z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych nie zidentyfikowano uniwersalnego markera opisującego te komórki. Badania te jednak przyczyniły się do poznania możliwości komórek MSC w regeneracji mięśnia sercowego, chrząstki, kości czy rdzenia kręgowego [117, 118]. Wskazuje to na zdolność rozpoznania przez mezenchymalne komórki macierzyste miejsca uszkodzenia poprzez wydzielane czynniki o charakterze chemotaktycznym [119]. Wydzielanie przez komórki MSC bioaktywnych czynników w odpowiedzi na uszkodzenie zmniejsza stan zapalny i sprzyja regeneracji [115]. Sekrecja tych czynników nie tylko wpływa na zainicjowanie wewnętrznych szlaków, ale także bezpośrednio pobudza sąsiadujące komórki do wydzielania związków biologicznie czynnych [120]. Zahamowanie procesu apoptozy, inicjowanie angiogenezy, jak również stymulowanie uszkodzonych

tkanek i komórek do róznicowania się to wyniki działania czynników bioaktywnych.

Mezenchymalne komórki macierzyste znalazły zastosowanie w regeneracji licznych tkanek i narządów, jednak niewiele uwagi poświęca się tym komórkom w kontekście regeneracji układu moczowo-płciowego. Ze względu na potencjał komórek MSC do wielokierunkowego różnicowania jest to obiecujące źródło komórek do regeneracji pęcherza moczowego. Mezenchymalne komórki macierzyste hodowane w kondycjonowanym medium, otrzymanym z hodowli komórek mięśni gładkich, wykazywały ekspresję α-aktyny mięśni gładkich, miozyny i kalponiny — będących specyficznymi markerami komórek mięśniowych [121, 122]. Hodowanie komórek MSC w obecności innych miogennych czynników również prowadzi do profilu fenotypowego typowego dla mięśni gładkich [123]. Ponadto, urotelium może indukować różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku mięśni gładkich [115]. Tian i wsp. zaindukowali także różnicowanie się komórek MSC w urotelium pod wpływem kondycjowanego medium, uzyskanego z hodowli urotelium [116]. Doniesienia na temat możliwości wykorzystania komórek MSC w odbudowie ściany pęcherza moczowego są niezwykle istotne w kontekście badań *in vivo*.

Podsumowanie

Rekonstrukcja dróg moczowych, a szczególnie pęcherza moczowego, u pacjentów dotkniętych rakiem pęcherza moczowego stanowi duże wyzwanie dla urologów. Niestety, u chorych z rakiem pęcherza wykorzystanie autologicznych komórek nabłonkowych i mięśniowych jest niemożliwe. Obecnie jedyną metodą zastąpienia usuniętego pęcherza jest wykorzystanie fragmentu jelita, z czym wiąże się wiele skutków ubocznych. Rozwój zagadnień związanych z biologią komórek macierzystych sprawił, że stają się one atrakcyjnym narzędziem w rekonstrukcji pęcherza moczowego u pacjentów ze schorzeniami układu moczowego.

Dr n. med. Anna Bajek
Zakład Inżynierii Tkankowej
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
ul. M. Karłowicza 24, 85–092 Bydgoszcz
e-mail: a_bajek@wp.pl

Otrzymano: 14 kwietnia 2011 r.
Przyjęto do druku: 9 sierpnia 2011 r.

Piśmiennictwo

1. Neuhof H. Some observation in spinal cord surgery. *Ann Surg* 1917; 4: 410–437.
2. Bricker EM. Substitution for the urinary bladder by the use of isolated ileal segments. *Surg Clin North Am* 1956: 1117–1130.
3. Studer UE, deKernion JB, Zimmern PE. A model for a bladder replacement plasty by ileal reservoir-an experimental study in dogs. *Urol Res* 1985; 13: 243–247.
4. Carrion R, Arap S, Corcione G i wsp. A multi-institutional study of orthotopic neobladders: functional results in men and women. *BJU Int* 2004; 93: 803–836.
5. Vacanti J, Vacanti Ch, Narem R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Enf* 1991; 113: 143–151.
6. Harrison R. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J Exp Zool* 1910; 9: 787–846.
7. Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 1912; 15: 516–528.
8. Rous P. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues. *J Exp Med* 1916; 23: 549–555.
9. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975; 5: 19–27.
10. Ricordi C, Kneteman NM, Scharp DW i wsp. Transplantation of cryopreserved human pancreatic islets into diabetic nude mice. *World J Surg* 1988; 12: 861–865.
11. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A i wsp. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889–895.
12. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ i wsp. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 149–155.
13. Atala A, Bauer SB, Soker S i wsp. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006; 367: 1241–1246.
14. Drewa T. Using hair-follicle stem cells for urinary bladder-wall regeneration. *Regen Med* 2008; 3: 939–944.
15. Becker C, Jakse G. Stem cells for regeneration of urological structures. *Eur Urol* 2007; 51: 1217–1228.
16. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 27–49.
17. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 252–264.
18. Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models – a conceptual approach. *Cells Tissues Organs* 2002; 171: 8–26.
19. Styczynski J, Drewa T. Leukemic stem cells: from metabolic pathways and signaling to a new concept of drug resistance targeting. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 717–726.
20. Kucia M, Reca R, Campbell FR i wsp. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857–869.
21. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W i wsp. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; 21: 860–867.
22. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* 2005; 23: 719–726.
23. N'Dow J, Pearson J, Neal D. Mucus production after transposition of intestinal segments into the urinary tract. *World J Urol* 2004; 22: 178–185.
24. Riddick AC, Turner WH, Mills RD. Bowel function after urinary diversion. *World J Urol* 2004; 22: 210–214.
25. Roosen A, Gerharz EW, Roth S i wsp. Bladder, bowel and bones-skeletal changes after intestinal urinary diversion. *World J Urol* 2004; 22: 200–209.
26. Tanrikut C, McDougal WS. Acid-base and electrolyte disorders after urinary diversion. *World J Urol* 2004; 22: 168–171.
27. Wolski Z. The patient presenting with requirements for a urinary diversion or reservoir. W: *Supportive care for the urology patient*. R.W. Norman, D.C. Currow (red.). New York: Oxford University Press 2005: 217–226.
28. Wolski Z, Mikulska-Jovanovic M. Naciekanie narządu rodnego u kobiet z rakiem pęcherza moczowego poddanych radykalnej cystektomii. *Urol Pol* 2002; 55: 55–59.
29. Stanasel I, Mirzazadeh M, Smith JJ. Bladder tissue engineering. *Urol Clin North Am* 2010; 37: 593–539.
30. Borówka A. Filling of extensive defects of the bladder with collagen membrane. *Pol Tyg Lek* 1981; 36: 1525–1527.
31. Brehmer B, Rohrmann D, Rau G i wsp. Bladder wall replacement by tissue engineering and autologous keratinocytes in minipigs. *BJU Int* 2006; 97: 829–836.
32. Chung SY, Krivorov NP, Rausei V i wsp. Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. *J Urol* 2005; 174: 353–359.
33. Drewa T, Wolski Z, Gałązka P i wsp. Uzupełnienie w warunkach doświadczalnych ubytku ściany pęcherza moczowego wszczepem wytworzonym metodą inżynierii tkankowej. *Urol Pol* 2004; 57: 52–57.

34. Zhang Y, Frimberger D, Cheng EY i wsp. Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model. *BJU Int* 2006; 98: 1100–1005.
35. Kanematsu A, Yamamoto S, Ogawa O. Changing concepts of bladder regeneration. *Int J Urol* 2007; 14: 673–678.
36. Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M i wsp. Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials* 2004; 25: 4513–4520.
37. O'Brien FJ. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 2011; 14: 88–95.
38. Youssif M, Shiina H, Urakami S i wsp. Effect of vascular endothelial growth factor on regeneration of bladder acellular matrix graft: histologic and functional evaluation. *Urology* 2005; 66: 201–207.
39. Kikuno N, Kawamoto K, Hirata H i wsp. Nerve growth factor combined with vascular endothelial growth factor enhances regeneration of bladder acellular matrix graft in spinal cor injury-induced neurogenic rat bladder. *BJU Int* 2009; 103: 1424–1428.
40. Loai Y, Yeger H, Coz C i wsp. Bladder tissue engineering: tissue regeneration and neovascularization of HA-VEGF-incorporated bladder acellular constructs in mouse and porcine animal models. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94: 1205–1215.
41. Zhu WD, Xu YM, Feng C, Fu Q, Song LJ, Cui L. Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. *World J Urol* 2010; 28: 493–498.
42. Sharma AK, Bury MI, Marks AJ i wsp. A non-human primate model for urinary bladder regeneration utilizing autologous sources of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2010; 29: 241–250.
43. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 7–19.
44. Li Y, Liu W, Hayward SW i wsp. Plasticity of the urothelial phenotype: effects of gastro-intestinal mesenchyme/stroma and implications for urinary tract reconstruction. *Differentiation* 2000; 66: 126–135.
45. Oottamasathien S, Wang Y, Williams K i wsp. Directed differentiation of embryonic stem cells into bladder tissue. *Dev Biol* 2007; 304: 556–166.
46. Staack A, Hayward SW, Baskin LS i wsp. Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation* 2005; 73: 121–133.
47. Southgate J, Varley CL, Garthwaite MA i wsp. Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. *BJU Int* 2007; 99: 1506–1516.
48. Birder LA. Role of the urothelium in urinary bladder dysfunction following spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2006; 152: 135–146.
49. Birder LA, de Groat WC. Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 2007; 4: 46–54.
50. Chen EH, Grote E, Mohler W i wsp. Cell-cell fusion. *FEBS Lett* 2007; 581: 2181–2193.
51. Chen MC, Keshavan P, Gregory GD i wsp. RANTES mediates TNF-dependent lamina propria mast cell accumulation and barrier dysfunction in neurogenic cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1372–F1379.
52. Khera M, Somogyi GT, Kiss S i wsp. Botulinum toxin A inhibits ATP release from bladder urothelium after chronic spinal cord injury. *Neurochem Int* 2004; 45: 987–993.
53. Moore CK, Goldman HB. The bladder epithelium and overactive bladder: what we know. *Curr Urol Rep* 2006; 7: 447–449.
54. Groat (de) WC. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? *Urology* 2004; 64 (supl. 1): 7–11.
55. Chai TC, Zhang C, Warren JW i wsp. Percutaneous sacral third nerve root neurostimulation improves symptoms and normalizes urinary HB-EGF levels and antiproliferative activity in patients with interstitial cystitis. *Urology* 2000; 55: 643–646.
56. Chai TC, Zhang CO, Shoenfelt JL i wsp. Bladder stretch alters urinary heparin-binding epidermal growth factor and antiproliferative factor in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2000; 163: 1440–1444.
57. Sun Y, Chen M, Lowentritt BH i wsp. EGF and HB-EGF modulate inward potassium current in human bladder urothelial cells from normal and interstitial cystitis patients. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C106–C114.
58. Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology* 2007; 69 (supl.): S9–S16.
59. Zhang CO, Wang JY, Koch KR i wsp. Regulation of tight junction proteins and bladder epithelial paracellular permeability by an antiproliferative factor from patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2005; 174: 2382–2387.
60. Keay S, Zhang CO, Shoenfelt JL i wsp. Decreased in vitro proliferation of bladder epithelial cells from patients with interstitial cystitis. *Urology* 2003; 6: 1278–1284.
61. Keay S, Seillier-Moiseiwitsch F, Zhang CO i wsp. Changes in human bladder epithelial cell gene expression associated with interstitial cystitis or antiproliferative factor treatment. *Physiol Genomics* 2003; 14: 107–115.
62. Keay SK, Zhang CO, Shoenfelt J i wsp. Sensitivity and specificity of antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor as urine markers for interstitial cystitis. *Urology* 2001; 57 (supl. 1): 9–14.
63. Sun Y, Chai TC. Augmented extracellular ATP signaling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C27–C34.
64. Ueda T, Tamaki M, Ogawa O i wsp. Over expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in patients with interstitial cystitis and bladder carcinoma. *J Urol* 2002; 167: 347–351.
65. Zietman AL, Sacco D, Skowronski U i wsp. Organ conservation in invasive bladder cancer by transurethral resection, chemotherapy and radiation: results of a urodynamic and quality of life study on long-term survivors. *J Urol* 2003; 170: 1772–1776.
66. Kassouf W, Swanson D, Kamat AM i wsp. Partial cystectomy for muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder: a contemporary review of the M. D. Anderson Cancer Center experience. *J Urol* 2006; 175: 2058–2062.
67. Solsona E, Iborra I, Ricos JV i wsp. Clinical panurothelial disease in patients with superficial bladder tumors: therapeutic implications. *J Urol* 2002; 167: 2007–2011.
68. Stein JP, Clark P, Miranda G i wsp. Urethral tumor recurrence following cystectomy and urinary diversion: clinical and pathological characteristics in 768 male patients. *J Urol* 2005; 173: 1163–1168.
69. Akkad T, Gozzi C, Deibl M i wsp. Tumor recurrence in the remnant urothelium of females undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: long-term results from a single center. *J Urol* 2006; 175: 1268–1271.
70. Sanderson KM, Cai J, Miranda G i wsp. Upper tract urothelial recurrence following radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: an analysis of 1,069 patients with 10-year followup. *J Urol* 2007; 177: 2088–2094.
71. Drewa T, Sir J, Czajkowski R i wsp. Scaffold seeded with cells is essential in urothelium regeneration and tissue remodeling in vivo after bladder augumentation using in vitro engineered graft. *Transplant Proc* 2006; 38: 133–135.
72. Drewa T, Joachimiak R, Kaznica A i wsp. Hair stem cells for bladder regeneration in rats: preliminary results. *Transplant Proc* 2009; 41: 4345–4351.
73. Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 2004; 72: 387–795.
74. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci* USA 2003; 100 (supl. 1): 11830–11835.
75. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 339–373.
76. Ohyama M. Advances in the study of stem-cell-enriched hair follicle bulge cells: a review featuring characterization and isolation of human bulge cells. *Dermatology* 2007; 214: 342–351.
77. Roh C, Roche M, Guo Z i wsp. Multi-potentiality of a new immortalized epithelial stem cell line derived from human hair follicles. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008; 44: 236–244.
78. Roh C, Tao Q, Photopoulos C i wsp. In vitro differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1099–1105.
79. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 2004; 117: 667–675.
80. Kai-Hong J, Jun X, Kai-Meng H i wsp. P63 expression pattern during rat epidermis morphogenesis and the role of p63 as a marker for epidermal stem cells. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 154–159.
81. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O i wsp. P63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci* USA 2001; 98: 3156–3161.
82. Fiuraskova M, Brychtova S, Kolar Z i wsp. Expression of beta-catenin, p63 and CD34 in hair follicles during the course of androgenetic alopecia. *Arch Dermatol Res* 2005; 297: 143–146.
83. Li L, Mignone J, Yang M i wsp. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci* USA 2003; 100: 9958–9961.
84. Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD i wsp. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 501–511.
85. Parsa R, Yang A, McKeon F i wsp. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1099–1105.
86. Mikkola ML. P63 in skin appendage development. *Cell Cycle* 2007; 6: 285–290.

87. Laurikkala J, Mikkola ML, James M i wsp. P63 regulates multiple signaling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development* 2006; 133: 1553–1563.
88. Tiede S, Kloepper JE, Bodò E i wsp. Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol* 2007; 86: 355–376.
89. Xu X, Lyle S, Liu Y i wsp. Differential expression of cyclin D1 in the human hair follicle. *Am J Pathol* 2003; 163: 969–978.
90. Poblet E, Jiménez F, Godínez JM i wsp. The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: a comparative study with the bulge marker CK15. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31: 807–812.
91. O'Shaughnessy RF, Yeo W, Gautier J i wsp. The WNT signalling modulator, Wise, is expressed in an interaction-dependent manner during hair-follicle cycling. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 613–621.
92. Orringer JS, Hammerberg C, Lowe L i wsp. The effects of laser-mediated hair removal on immunohistochemical staining properties of hair follicles. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 402–427.
93. Navsaria HA, Ojeh NO, Moiemen N i wsp. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles microgrefted into a tissue-engineered dermal template (Integra). *Plast Reconstr Surg* 2004; 113: 978–981.
94. Magerl M, Kauser S, Paus R i wsp. Simple and rapid method to isolate and culture follicular papillae from human scalp hair follicles. *Exp Dermatol* 2002; 11: 381–385.
95. Wu JJ, Liu RQ, Lu YG i wsp. Enzyme digestion to isolate and culture human scalp dermal papilla cells: a more efficient method. *Arch Dermatol Res* 2005; 297: 60–67.
96. Gho CG, Braun JE, Tilli CM i wsp. Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture. *Br J Dermatol* 2004; 150: 860–868.
97. Richardson GD, Arnott EC, Whitehouse CJ i wsp. Cultured cells from the adult human hair follicle dermis can be directed toward adipogenic and osteogenic differentiation. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 1090–1091.
98. Lako M, Armstrong L, Cairns PM i wsp. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J Cell Sci* 2002; 115: 3967–3974.
99. Lin CM, Li Y, Ji YC i wsp. Microencapsulated human hair dermal papilla cells: a substitute for dermal papilla? *Arch Dermatol Res* 2008; 300: 531–535.
100. Wu JJ, Zhu TY, Lu YG i wsp. Hair follicle reformation induced by dermal papilla cells from human scalp skin. *Arch Dermatol Res* 2006; 298: 183–190.
101. McElwee KJ, Kissling S, Wenzel E i wsp. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1267–1275.
102. Jahoda CA, Oliver RF, Reynolds AJ i wsp. Trans-species hair growth induction by human hair follicle dermal papillae. *Exp Dermatol* 2001; 10: 229–237.
103. Amoh Y, Li L, Katsuoka K i wsp. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle* 2008; 7: 1865–1869.
104. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1459–1468.
105. Drewa T. Bladder acellular matrix seeded with hair follicle epithelial cells for urinary bladder wall reconstruction, an animal study. *Regen Med* 2007; 2: 534–535.
106. Gharzi A, Reynolds AJ, Jahoda CA. Plasticity of hair follicle dermal cells in wound healing and induction. *Exp Dermatol* 2003; 12: 126–136.
107. Hoffman RM. The pluripotency of hair follicle stem cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 232–233.
108. Hoffman RM. The potential of nestin-expressing hair follicle stem cells in regenerative medicine. *Exp Opin Biol Ther* 2007; 7: 289–291.
109. Oshima H, Rochat A, Kedzia C i wsp. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001; 104: 233–245.
110. Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 888–899.
111. Raposio E, Guida C, Baldelli I i wsp. Characterization of multipotent cells from human adult hair follicles. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 320–323.
112. Tausche AK, Skaria M, Böhlen L i wsp. An autologous epidermal equivalent tissue-engineered from follicular outer root sheath keratinocytes is as effective as split-thickness skin autograft in recalcitrant vascular leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2003; 11: 248–252.
113. Yu H, Fang D, Kumar SM i wsp. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 2006; 168: 1879–1888.
114. Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Meth Mol Biol* 2009; 482: 281–294.
115. Drzewiecki BA, Thomas JC, Tanaka ST. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. *Stem Cells Int* 2010; 2010: 1–5.
116. Tian H, Bharadwaj S, Liu Y i wsp. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tiss Eng A* 2010; 16: 1769–1779.
117. Assis ACM, Carvalho JL, Jacoby BA i wsp. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transpl* 2010; 19: 219–230.
118. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D i wsp. Marrow stromal cells from guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *PNAS* 2002; 99: 2199–2204.
119. Sordi V. Mesenchymal stem cell homing capacity. *Transpl* 2009; 87: S42–S45.
120. Caplan AI, Dennis JE: Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076–1084.
121. Kanematsu A, Yamamoto S, Iwai-Kanai E i wsp. Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 565–573.
122. Sharma AK, Fuller NJ, Sullivan RR i wsp. Defined populations of bone marrow derived mesenchymal stem and endothelial progenitor cells for bladder regeneration. *J Urol* 2009; 82: 1898–1905.
123. Ross JJ, Hong Z, Willenbring B i wsp. Cytokine-induced differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional smooth muscle cells. *J Clin Invest* 2006; 116: 3139–3149.