

Received: 2016.02.25
Accepted: 2016.11.18
Published: 2017.12.31

Właściwości komórek macierzystych, regulacje prawne oraz zastosowanie w medycynie

Stem cell properties, current legal status and medical application

Ilona Szabłowska-Gadomska^{1,2,3}, Leonora Bużańska⁴, Maciej Małecki¹

¹Katedra Farmacji Stosowanej i Bioinżynierii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Zakład Farmakologii, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

³Laboratorium Badawcze-Bank Komórek, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

⁴Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

Streszczenie

Komórki macierzyste (stem cells - SC) cechuje unikalna zdolność do samoodnawiania i różnicowania w różne typy komórek, dlatego odgrywają istotną rolę w procesie regeneracji i naprawy. Izolowane z wężła zarodkowego blastocysty mają charakter pluripotencjalny - mogą różnicować się we wszystkie komórki organizmu i noszą nazwę zarodkowych komórek macierzystych. Pluripotencjalne komórki macierzyste można otrzymywać również z komórek zróżnicowanych w wyniku procesu reprogramowania (indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste). SC izolowane z tkanek (somatyczne lub „dorosłe”) wykazują bardziej ograniczoną zdolność do różnicowania, dlatego określamy je mianem multipotencjalnych. Gwałtowny wzrost liczby badań klinicznych z zastosowaniem tkankowych SC jest związany z ich udowodnionym, w badaniach podstawowych i przedklinicznych, bezpieczeństwem terapeutycznym i właściwościami parakrynnymi. Wzbudza to entuzjazm i daje nadzieję pacjentom, dla których tradycyjna medycyna jest mało efektywna lub nieskuteczna. Przełom technologiczny w otrzymywaniu ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych z komórek somatycznych umożliwia wyprowadzenie *in vitro* określonych modeli chorób, a także personalizację diagnostyki i w przyszłości terapii. W artykule przedstawiono charakterystykę różnych typów komórek macierzystych, ich potencjalne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej oraz obowiązujące w Polsce regulacje prawne dotyczące terapii komórkowej.

Słowa kluczowe:

komórki macierzyste • medycyna regeneracyjna • terapia komórkowa • regulacje prawne terapii komórkowej

Summary

Stem cells due to their unique properties of self-renewal and differentiation play a potential role in the process of damaged tissue repair. Isolated from the inner cell mass of the blastocyst have pluripotential properties and are called embryonic stem cells (ESC). Pluripotential stem cells can be also generated from the differentiated cells by the process of reprogramming and are called induced pluripotent stem cells (iPSC). Stem cells isolated from tissues (somatic or adult stem cells) are more restricted in their differentiation potential and referred as multipotent. The rapid rise in number of clinical trials using somatic stem cells is due to their proved in basic and preclinical studies therapeutic safety and paracrine properties to modulate microenvironment. Increased translation to the clinic of studies using adult stem cells provide

Key words:	hope for patients with diseases for which traditional medicine is powerless .or ineffective. On the other hand progress in iPSC technology allows to derive disease models and personalize future clinical diagnosis and treatment. This paper will focus on characteristics of stem cells, potential application in regenerative medicine, and the current legal status of cell therapy. stem cells • regenerative medicine • cell therapy • legal status of cell therapy
GICID:	01.3001.0010.7733
DOI:	10.5604/01.3001.0010.7733
Word count:	5877
Tables:	1
Figures:	–
References:	124

Adresy autorek: dr Ilona Szablowska-Gadomska, Katedra Farmacji Stosowanej i Bioinżynierii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: igadomska@wum.edu.pl; prof. Leonora Bużańska, Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, e-mail: buzanska@imdik.pan.pl

Wykaz skrótów: **ASC** – tkankowe „dorosłe” komórki macierzyste (adult stem cells); **ATMP** – produkt leczniczy terapii zaawansowanej (advanced-therapy medicinal product); **DNMT** – metylotransferaza DNA (DNA-methyltransferase); **EC** – rak zarodkowy (embryonal carcinoma); **EPC** – endotelialne komórki progenitorowe (endothelial progenitor cells); **ESC** – zarodkowe komórki macierzyste (embryonic stem cells); **HSCT** – transplantacje hematopoetycznych komórek macierzystych (hematopoietic stem cells transplantation); **MSC** – mezenchymalne komórki macierzyste/mezenchymalne komórki zrębu (mesenchymal stem cells/mesenchymal stromal cells); **SC** – komórki macierzyste (stem cells); **SGZ** – strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (subgranular zone); **SSC** – somatyczne komórki macierzyste/tkankowe komórki macierzyste (somatic stem cells); **SVZ** – strefa okołokomorowa komórki bocznych (subventricular zone).

WPROWADZENIE

Terapia komórkami macierzystymi jest jedną ze strategii prężnie rozwijającej się w ostatnich latach medycyny regeneracyjnej. Termin medycyna regeneracyjna odnosi się do badań biomedycznych skupiających się na rozwoju nowych terapii pozwalających na zastąpienie, odbudowę i regenerację chorych lub uszkodzonych tkanek i narządów [23]. Transplantacja komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego (hematopoetycznych komórek macierzystych) jest procedurą znaną i stosowaną od wielu lat w leczeniu np. chorych z białaczkami i chłoniakami [48,52].

Trwają intensywne badania nad wykorzystaniem potencjału komórek macierzystych do leczenia innych schorzeń m.in. chorób neurodegeneracyjnych czy chorób o podłożu immunologicznym. Obecnie na świecie według danych serwisu U.S. National Institutes of Health (clinicaltrial.gov, słowo kluczowe – „stem cells”) prowadzonych jest około 6 tysięcy badań klinicznych z wykorzystaniem komórek macierzystych. Najwięcej, ponad 3200 odnotowano w USA. W Europie pod względem prowadzenia badań klinicznych z użyciem komórek macierzystych prym wiodą Francja (381),

Niemcy (375), Włochy (279) i Wielka Brytania (251). Dla porównania w Polsce serwis „clinicaltrial.gov” odnotował 79 badań [19]. Według danych Departamentu Badań Klinicznych Produktów Leczniczych (Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych) w Polsce w Centralnej Ewidencji Badań Klinicznych od 1996 roku, czyli od początków jej istnienia zarejestrowano ponad 8000 badań w tym 12 badań z produktami leczniczymi pochodzenia komórkowego (badany produktu leczniczy do somatycznej terapii komórkowej/badany produkt leczniczy inżynierii tkankowej) [stan z dnia 19.04.2017].

W pracy, poza podsumowaniem wiadomości o komórkach macierzystych i ich zastosowaniu, przytaczamy obowiązujące w Polsce regulacje prawne dotyczące terapii z zastosowaniem komórek macierzystych.

CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Komórki macierzyste, na tle innych komórek budujących organizm człowieka, wyróżniają dwie podstawowe cechy: zdolność do samoodnowy (self-renewal) oraz do wielokierunkowego różnicowania. Dzięki tym cechom komórki macierzyste odgrywają fundamentalną rolę

zarówno w rozwoju organizmu, jak i w utrzymaniu jego homeostazy. Historia nazwy „komórki macierzyste” (niem. Stammzelle) w literaturze naukowej sięga XIX w. Termin ten używany był przez niemieckiego badacza Ernesta Haeckela w różnym znaczeniu, m.in. w odniesieniu do organizmu jednokomórkowego, jako przodka organizmów wielokomórkowych jak też do zapłodnionej komórki jajowej dającej początek wszystkim komórkom nowego organizmu [85]. Popularyzatorem nazwy „komórki macierzyste” (stem cells - SC) był Edmund B. Wilson. W swojej książce powołał się na pracę Häckera i Boveriego, którzy również znacząco przyczynili się do rozwoju definicji. W tym samym czasie prowadzono liczne badania nad hematopoezą. Dlatego również i w tym kontekście pojawiało się określenie SC, odnosiło się do komórek, które dają początek zarówno białym, jak też czerwonym komórkom krwi. W dzisiejszym znaczeniu definicji, za „prototyp” komórek macierzystych można uznać hematopoetyczne komórki macierzyste. Mają prawie nieograniczoną zdolność samoodnawiania oraz dają początek wyspecjalizowanym komórkom linii hematopoetycznych [105,106]. Dzisiaj ten termin nie ogranicza się tylko do komórek hematopoetycznych, ale odnosi się również do komórek macierzystych innych tkanek i narządów [52,72].

Cechy „macierzystości” komórek, czyli zdolność do samoodnawiania i wielokierunkowego różnicowania determinuje możliwość podejmowania podziałów komórkowych asymetrycznych, które prowadzą do powstania dwóch różnych komórek: identycznej z komórką wyjściową (komórką matką) i drugiej częściowo zróżnicowanej. Komórki macierzyste mogą podlegać również podziałom symetrycznym. W tym przypadku dwie komórki potomne zachowują właściwości komórki macierzystej lub powstają dwie częściowo zróżnicowane, tzw. komórki progenitorowe, różniące się od określonego fenotypu [72]. W celu zapewnienia ciągłości występowania i namnożenia komórek macierzystych w hodowli *in vitro*, korzystne jest zachowanie warunków pozwalających na podziały, w wyniku których powstają komórki o właściwościach komórek macierzystych. Hodowla komórkowa *in vitro* z przewagą podziałów symetrycznych, prowadzących do powstawania tylko komórek progenitrowych, podlega starzeniu, ponieważ populacja SC ulega wyczerpaniu. W warunkach *in vivo* pula komórek SC nie wyczerpuje się całkowicie, ale podejrzewa się, że z wiekiem ich liczba się zmniejsza [6].

Organizm dorosłego człowieka może być zbudowany nawet z miliarda komórek tworzących tkanki i organy [52]. Czas życia pojedynczych komórek, których jest około 260 typów jest ograniczony [83]. Nowo powstałe komórki, które zastępują obumarłe, pochodzą z różnicowania tkankowych komórek macierzystych. W warunkach fizjologicznych potencjał organizmu do tworzenia komórek macierzystych jest nieograniczony (z różnym tempem w różnych tkankach) przez całe życie. Na szczególnie uwagę zasługuje układ krwiotwórczy, rozrodczy

męski, czy naskórek. Oszacowano, że największa liczba komórek macierzystych występuje w naskórku, którego całkowita odnowa odbywa się co 4 tygodnie [58]. Najszybciej dzielącymi komórkami macierzystymi są jednak SC rezydujące w nabłonku jelita, dzięki ich właściwościom wymiana całkowita populacji komórek u dorosłego człowieka w tym obszarze zachodzi w ciągu 3-5 dni [63,108].

Swoiste dla tkanki mikrośrodowisko, w którym znajdują się somatyczne komórki macierzyste nazywa się niszą komórek macierzystych (stem cell niche). Nisza SC odgrywa ważną rolę w procesach rozwojowych m.in. smoodnawiania, różnicowania, proliferacji i migracji, ponieważ pełni funkcje regulatora sygnałów docierających do znajdujących się w niej komórek. Właściwości biofizyczne i biochemiczne elementów zarówno strukturalnych (m.in. białek macierzy zewnątrzkomórkowej, komórek sąsiadujących itp.), jak i rozpuszczalnych (m.in. białka sygnalizacyjne, czynniki wzrostowe, hormony, neuroprzekazniki) decydują o charakterze tych oddziaływań [6,14,15].

Somatyczne komórki macierzyste i progenitory komórkowe, które podlegają podziałom występują w większości tkanek i organów postnatalnych ssaków. Liczba komórek i ich dostępność zależy jednak od lokalizacji i ogólnego stanu, w jakim znajduje się organizm. Najbardziej powszechnym źródłem, z którego izoluje się komórki macierzyste w celach terapeutycznych, jest szpik kostny. Zabieg pozyskiwania komórek ze szpiku kostnego może spowodować działania niepożądane: zwykle kostne dolegliwości bólowe oraz jest obciążony ryzykiem infekcji. Alternatywnym źródłem pozyskiwania komórek macierzystych jest krew pępowinowa oraz tkanki odrzucone po porodzie (łożysko, sznur pępowinowy). Krew pępowinowa jest bogatym źródłem w różnego typu komórki macierzyste mobilizowanych z tkanek płodu do krwi w wyniku stresu porodowego [13,67]. Komórki macierzyste krwi pępowinowej są łatwo dostępne i otrzymywane w sposób nieinwazyjny dla dawcy, są mniej dojrzałe oraz mniej immunogenne w porównaniu z komórkami izolowanymi ze szpiku kostnego [24,52,120] oraz wykazują większe zdolności proliferacyjne [2]. Ponadto, dzięki możliwości przechowywania przez wiele lat, bez utraty podstawowych właściwości (banki komórek macierzystych), nie muszą być użyte od razu po wyizolowaniu i mogą stanowić swego rodzaju „materiał asekuracyjny” do przeszczepów auto- i allogenicznych.

Nowym, cennym źródłem komórek macierzystych do zastosowania w medycynie regeneracyjnej i estetycznej jest obecnie tkanka tłuszczowa. Otrzymane w wyniku liposukcji autologiczne „mieszanki komórek” z udziałem populacji mezenchymalnych komórek macierzystych (mesenchymal stem cells - MSC), stosuje się w ortopedii i traumatologii, do leczenia stanów zapalnych (ostrych i przewlekłych), zwyrodnień i podczas rekonstrukcji w obrębie np. tkanki chrzęstnej lub

kostnej. Komórki regeneracyjne pochodzące z tkanki tłuszczowej są również stosowane z pozytywnym skutkiem w zatwierdzonych przez Lokalne Komisje Etyczne eksperymentach medycznych związanych z leczeniem schorzeń neurologicznych. Należy jednak pamiętać, że dla schorzeń układu nerwowego nie istnieje jeszcze autoryzowana terapia komórkami macierzystymi, objęta przez system publicznej opieki zdrowia. Wciąż najpopularniejszym rezerwuarem komórek macierzystych, „złotym standardem”, pozostaje ludzki szpik kostny, w którym podobnie jak w krwi pępowinowej znajdują się zarówno hematopoetyczne SC, jak też mezenchymalne komórki zrębu [3,45,48].

Komórki macierzyste rezydujące w tkankach somatycznych (np. hematopoetyczne komórki macierzyste, neuralne komórki macierzyste) w warunkach fizjologicznych występują zwykle w stanie tzw. uśpienia (faza G0 cyklu komórkowego) i mogą przebywać w nim przez długi czas [76,92]. Takie czynniki jak stres, wysiłek fizyczny, czy uraz aktywują mitotycznie SC i zwiększają pulę komórek uwalnianych ze szpiku do krwi obwodowej [67]. Stosując hematopoetyczne czynniki wzrostu np. G-CSF lub syntetyczny Pteryksafor (czynnik stymulujący kolonie granulocytarne) można dodatkowo zwiększyć liczbę krążących we krwi obwodowej komórek macierzystych, które następnie są zbierane za pośrednictwem leukaferezy i wykorzystywane w transplantologii [45,71]. Badania wielu zespołów dowiodły, że zjawisko migracji SC jest związane m.in. z obecnością molekuł adhezyjnych oraz strukturą i składem macierzy zewnątrzkomórkowej [15,45]. Obecność określonych receptorów na powierzchni błony komórkowej SC (np. chemokine receptor type 4 - CXCR4), umożliwia im migrację w odpowiedzi na związki działające jako atraktanty (np. chemokina SCF), które są uwalniane z miejsc uszkodzenia [91].

Namnażanie, potencjał do różnicowania i migracji SC są związane ze swoistymi warunkami środowiska, w którym się znajdują. Zaburzenie równowagi układu może się przyczyniać do zaburzenia procesu regeneracji, niekontrolowanego wzrostu liczby komórek, zaburzeń homeostazy tkankowej lub nawet do powstania nowotworu.

Podczas rozwoju osobniczego (ontogenezy) właściwości komórek macierzystych, a zwłaszcza ich zdolność do wielokierunkowego różnicowania ulegają zmianom [63]. Obserwowane zawężanie potencjału rozwojowego znalazło odzwierciedlenie w klasyfikacji SC na toti-, pluri-, multi- lub unipotencjalne [57]. Przykładem komórek totipotencjalnych jest zygota, podobnie jak pierwsze komórki budujące zarodek (do stadium 8 komórek). Komórki mogą się różnicować we wszystkie typy komórek nowego organizmu oraz tkanek pozazarodkowych, tzw. płodu (łożyska, pępowiny i błon płodowych). Pluripotencjalne komórki wężła zarodkowego blastocysty mogą dawać początek nowemu organizmowi, ale nie są już zdolne do tworzenia tka-

nek pozazarodkowych. Jeszcze mniejszy potencjał do różnicowania mają komórki multipotencjalne: mogą tworzyć komórki tylko w obrębie określonego listka zarodkowego, np. w komórki ektodermy, mezodermy, endodermy lub określonej tkanki. W tkankach występują też komórki „unipotencjalne”, różnicujące się tylko do jednego typu komórek, np. komórki satelitowe mięśni szkieletowych, czy progenitory makrofagów. Ścisłe określona zdolność do różnicowania komórek zależy od swoistego wzoru ekspresji genów związanych z „macierzystością” komórek i ich kierunkiem różnicowania. Fenotyp komórek występujących w tkankach jest zdefiniowany przez określony wzór ekspresji genów swoistych dla danego kierunku różnicowania oraz modyfikacje epigenetyczne, wpływające na strukturę chromatyny i funkcje genomu [9,14,63].

Innym kryterium podziału komórek macierzystych, poza kryterium rozwojowym, jest ich pochodzenie. Według tej klasyfikacji wyróżnia się zarodkowe komórki macierzyste (embryonic stem cells - ESC) i somatyczne/tkankowe komórki macierzyste - SSC (somatic stem cells, nazwane również dorosłymi komórki macierzystymi (adult stem cells - ASC). Ta ostatnia nazwa, choć szeroko przyjęta jest dyskusyjna, ponieważ sugeruje wykluczenie z tej klasyfikacji komórek pochodzących z tkanek organizmu rozwijającego się. Dlatego dla terminu „dorosłe komórki macierzyste” proponuje się wymiennie termin „komórki macierzyste tkankowe”, co w sposób jednoznaczny odróżnia SC z rozwijających się i dorosłych tkanek od SC zarodkowych, które izolować można jedynie z wężła zarodkowego w stadium blastocysty rozwijającego się organizmu. To właśnie zastosowanie zarodkowych SC stwarza kontrowersje etyczne, ponieważ ich pozyskiwanie łączy się ze zniszczeniem zarodka. Takiego źródła SC nie należy łączyć z niekontrolowanym etycznie wykorzystaniem tkankowych komórek macierzystych. Tkankowe SC są klasyfikowane w zależności od umiejscowienia niszy, w której się znajdują np. komórki macierzyste mięśni, komórki macierzyste naskórka lub neuralne komórki macierzyste itd.

Niżej zamieszczono charakterystykę komórek pluripotencjalnych oraz wybranych, tkankowo-swoistych typów komórek macierzystych, które dzięki unikatowym cechom mogą być użyteczne w badaniach biologicznych, jak również mogą znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej.

KOMÓRKI PLURIPOTENCJALNE

Istotny wkład w rozwój dziedziny biologii komórek macierzystych wniosły badania zarodków mysich, w tym grupy prof. Andrzeja Tarkowskiego z Uniwersytetu Warszawskiego [103]. Badania z zastosowaniem transferu jądra komórki somatycznej do oocytu (somatic nuclear transfer - SNT), które zapoczątkowały współczesne klonowanie ssaków [42] oraz opracowanie metod izolowania ludzkich zarodkowych

komórek macierzystych [104] stały się przełomowymi wydarzeniami, które doprowadziły zespół kierowany przez prof. Shinya Yamanakę do otrzymania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (induced pluripotent stem cells - iPS). Eksperymenty z zastosowaniem fibroblastów mysich i ludzkich wykazały, że za pomocą czynników transkrypcyjnych można zmienić program rozwojowy komórek i rozpocząć odróżnicowanie do etapu reprezentowanego przez komórki zarodkowe (proces odwrotny od różnicowania zwany reprogramowaniem komórkowym). Reprogramowanie sposobem Yamanki zakłada uzyskanie komórek pluripotencjalnych bez użycia zarodków i oocytów [100,101]. Do otrzymania komórek o właściwościach zbliżonych do komórek ES konieczne jest wymuszanie ekspresji genów związanych z pluripotencjalnością. Ponad dwadzieścia lat wcześniej były już prowadzone doświadczenia związane z wymuszaniem ekspresji pojedynczych genów [20], jednak dopiero Yamanaka i wsp. osiągnęli sukces. W celu otrzymania komórek pluripotencjalnych przetestowali 24 czynniki transkrypcyjne związane ze stanem niezróżnicowanym komórek i wyłonili cztery, których połączenie wystarczyło do osiągnięcia zamierzonego celu. Pierwsze komórki iPS otrzymano z mysich fibroblastów, do których z użyciem retrowirusów wprowadzono Oct4, Sox2, c-Myc i Klf 4 (OSMK) [101]. Późniejsze doświadczenia dowiodły, że materiałem wyjściowym mogą być dowolne komórki somatyczne, a postęp w pracy nad otrzymaniem bezpiecznej terapeutycznie ludzkiej populacji komórek iPS przebiega dwutorowo. Z jednej strony dotyczy opracowania bezpiecznych wektorów i sposobów wprowadzania do komórki czynników reprogramujących, a z drugiej strony redukcji i zmiany wprowadzanych czynników. Obecnie znanych jest wiele sposobów uzyskiwania komórek iPS. Metody można podzielić na dwie grupy. Jedną zakłada używanie wirusów, jako nośników do wprowadzania czynników reprogramujących (viral - based methods) oraz druga grupa, która dotyczy metod niezwiązanych z wirusami (non-viral methods). Wektory wirusowe (np. lenti- i retrowirusy) umożliwiają wbudowanie wprowadzanych informacji (transgeny) do genomu gospodarza i jego ekspresję. Skuteczność metody jest względnie duża, jednak otrzymane iPS są obciążone ryzykiem losowego miejsca wbudowania transgeny i możliwości jego reaktywacji, co w niesprzyjających okolicznościach może prowadzić do wystąpienia zmian nowotworowych. Istnieją systemy regulacji aktywności transgeny (np. system tetracyklinowy), jednak znacznie bezpieczniejsze są metody niezwiązane z integracją z genomem gospodarza (integration - free methods). Są to metody z użyciem np. adenowirusów, policistronowych wektorów episomalnych, mRNA, miRNA lub antygeny T wirusa SV40 oraz białek reprogramujących [5,87]

. Stosowane białka zawierają reszty poliargininowe, umożliwiające przechodzenie przez błony komórkowe. Niestety, większość wymienionych metod nieintegrujących transgeny z genomem gospodarza cechuje bar-

dzo niska wydajność, dlatego wymagają powtarzania lub działania czynników wspomagających. W procesie reprogramowania komórek coraz częściej naukowcy sięgają po tzw. „małe związki” (small molecules lub chemical compounds). Należą do nich m.in. inhibitory metylotransferaz DNA i deacetylaz histonowych oraz inhibitory drogi przekazywania sygnału TGF- β , czy kinazy ERK-MAP [64,98,118]. Rola większości z nich polega na wspomaganie procesu reprogramowania lub zastępowaniu udziału czynników reprogramujących, których nadekspresja może być potencjalnie niebezpieczna dla organizmu. Dzięki temu liczbę czynników transkrypcyjnych reprogramujących można zmniejszyć nawet do jednego lub zupełnie wyeliminować [22,95,97,98]. Charakterystyka ludzkich komórek iPS jest zbliżona do komórek izolowanych z wczesnego zarodka (blastocysty) pluripotencjalnych komórek zarodkowych (ESC). Komórki te zawierają stosunkowo duże jądro i małą ilość cytoplazmy, ponadto wykazują dużą aktywność telomerazy i obecność alkalicznej fosfatazy [104]. W błonie komórkowej komórek pluripotencjalnych dowiedziono obecność m.in. antygenów powierzchniowych SSEA3, SSEA4 (stage-specific embryonic antygen -SSEA), TRA-1-60 i TRA-81(tumor rejection antigen) oraz antygenów CD (cluster of differentiation - CD) CD9, CD24, CD90, CD133, CD117. Część wymienionych antygenów nie jest wyłączną cechą ESC, ale również komórek raka zarodkowego (embryonal carcinoma - EC) oraz innych komórek macierzystych [119]. Ponadto do markerów komórek pluripotencjalnych zalicza się również białka OCT4 i NANOG, których ekspresja wiąże się z utrzymywaniem stanu niezróżnicowanego [121, 122].

Główną cechą komórek pluripotencjalnych w warunkach *in vitro* jest ich potencjał do różnicowania w komórki trzech listków zarodkowych, a w doświadczeniach *in vivo* (z myszami z dysfunkcją układu odpornościowego) zdolność do tworzenia teratom (łagodnych guzów - potworniaków, zawierających tkanki charakterystyczne dla trzech listków zarodkowych) [100,101]. Utrzymanie komórek w stanie niezróżnicowanym wiąże się również z aktywnością wielu genów (m.in. Oct4, Sox2, Nanog (OSN) [11] oraz szlaków sygnalizacyjnych (np. Notch, Shh i Wnt) [84]. W komórkach pluripotencjalnych OSN tworzą główny mechanizm molekularny odpowiedzialny za hamowanie różnicowania komórek. Zaobserwowano, że ekspresja O i N wpływa na aktywność Dnmt1 (metylotransferazy DNA 1, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1), która hamuje ekspresję p16 i p21 oraz genów związanych z rozwojem i różnicowaniem. Mimo wielu badań rola genów Oct4 i Nanog w procesie samoodnawiania i utrzymywania komórek macierzystych w stanie nieróżnicowanym jest jeszcze niepoznana [107]. Niedawno udowodniono, że zdefiniowany poziom transkryptu genu Oct4 w stosunku do poziomu transkryptu genu Nanog „kontroluje”, kiedy komórka podejmuje decyzję rozwojową o wyjściu z „naiwnego” stanu pluripotencjalności i rozpoczęciu różnicowania [84].

Komórki iPS dzięki pluripotencjalnym właściwościom ulegają spontanicznemu różnicowaniu lub mogą być różnicowane kierunkowo w dowolny typ komórek dorosłego organizmu. Ukierunkowane (poddane działaniu czynników różnicujących) komórki pacjenta mogą służyć do spersonalizowanych testów farmakologicznych i toksykologicznych, ale także mogą znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Biopsje skóry są potencjalnym źródłem komórek wykorzystywanych w spersonalizowanej, tj. przeznaczonej dla potrzeb określonego pacjenta terapii komórkowej [94,100]. Komórki przeznaczone do przeszczepu autologicznego dla pacjenta, od którego zostały pobrane obniżają ryzyko ostrej odpowiedzi immunologicznej organizmu i odrzucania przeszczepu. Ponadto w przypadku chorób o podłożu genetycznym przeszczep mógłby być poprzedzony korektą „defektu genetycznego” w hodowli *in vitro*. Postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej dostarcza nowych narzędzi, tzw. „nowych systemów edycji materiału genetycznego” do korekty defektów genetycznych w komórkach iPS [54,117]. Komórki iPS są szansą dla pacjentów z nieuleczalnymi chorobami m.in. z wrodzonymi dermatozami, jak również chorobami neurodegeneracyjnymi [97]. Obecnie na świecie prowadzone są dwie próby kliniczne z zastosowaniem przeszczepianych komórek iPS zróżnicowanych do komórek bezpiecznych terapeutycznie:

- w Japonii próba prowadzona przez dr Masayo Takahashi w terapii starczego zwyrodnienia plamki żółtej (age-related macular degeneration - AMD) [68] oraz
- również w Japonii otrzymywanie do celów terapeutycznych płytek krwi z komórek iPS [73].

Ponadto są prowadzone zaawansowane prace nad zastosowaniem neuronów dopaminergicznych otrzymanych z komórek iPS pacjentom z chorobą Parkinsona [43,124]. Mimo pierwszych, optymistycznie rozpoczętych prób klinicznych zbyt mało jeszcze wiadomo na temat właściwości komórek iPS oraz ewentualnych ich działań niepożądanych w organizmie człowieka, żeby mogły być powszechnie stosowane. Jednak już mogą służyć jako komórkowe modele do badań *in vitro* wielu chorób, których lista jest bardzo długa, począwszy od chorób neurodegeneracyjnych, przez choroby serca, trzustki i układu krwionośnego [94]. Komórki iPS są powszechnie wykorzystywane w badaniach podstawowych do śledzenia rozwoju i specjalizacji komórek ze stanu pluripotencjalnego. Wydaje się jednak, że etap zastosowania komórek iPS jako nośnika terapii spersonalizowanej i powszechnie dostępnej jest jeszcze stosunkowo odległy.

HEMATOPOETYCZNE KOMÓRKI MACIERZYTE

Najlepiej poznane spośród tkankowych komórek macierzystych są hematopoetyczne komórki macierzyste HSC (hematopoietic stem cells), których najważniejszą rolą jest udział w utrzymaniu hematopoezy i funkcjonowaniu układu krwiotwórczego i immunologicznego. HSC są obecne w szpiku kostnym, krwi pępowino-

wej i mobilizowanej krwi obwodowej. W szpiku kostnym tworzą 0,5-0,05% frakcji komórkowej [40]. W krwi obwodowej (bez interwencji farmakologicznej) odsetek komórek macierzystych jest 50-100 razy niższy niż w szpiku kostnym [45]. Pionierami w doświadczeniach *in vivo* nad regeneracją (uszkodzonego naświetlaniem) układu krwiotwórczego biorcy z użyciem komórek ze szpiku kostnego dawcy byli w latach sześćdziesiątych ub.w. Till i McCulloch [105,106]. Zaawansowanie technologiczne nie pozwalało wówczas na pełną charakterystykę populacji komórek HSC, które jak wielokrotnie później udowodniano, są klonogenne i dają początek komórkom krwi. Dziś wiadomo, że ludzkie komórki HSC charakteryzuje określony wzór antygenów: CD34⁺, CD38⁻, CD59⁺, CD90⁺, CD117⁺. Większość wymienionych antygenów nie jest swoista tylko dla HSC. Dotyczy to m.in. glikoproteiny CD34 (sialomucyny) obecnej również na powierzchni komórek śródbłonna i komórek satelitowych mięśni [47,117]. Mimo szerszego zakresu ekspresji, CD34⁺ jest podstawowym markerem identyfikującym komórki HSC. Obecność CD34⁺ jest podstawowym kryterium brany pod uwagę np. podczas kwalifikacji/oceny komórek do transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych (hematopoietic stem cells transplantation - HSCT). Poznanie antygenów powierzchniowych komórek HSC pozwoliło na rozwój technik ich izolacji za pomocą m.in. kolumny magnetycznej i przeciwciał skierowanych przeciwko CD34. Zastosowanie innych przeciwciał monoklonalnych i metody FACS (fluorescence activated cell sorting) umożliwiło wyodrębnienie i określenie kolejnych, ukierunkowanych populacji komórek progenitorowych w zależności od obranej przez nie ścieżki różnicowania: np. kierunek różnicowania erytroidalnego (erytropoetycznego) może być ustalony dzięki użyciu dodatkowego przeciwciała anti-CD71 [45]. Wykazano ponadto, że komórki HSC aktywnie usuwają barwnik Hoechst 33342, używany do znakowania jąder komórkowych i DNA oraz rodaminę 123 (stosowaną do znakowania mitochondriów), co stało się podstawą do opracowania określonej metody ich izolacji (side population sorting) [41]. Dodatkową cechą HSC jest duża aktywność dehydrogenazy aldehydowej [40].

Hematopoetyczne SC są najlepiej poznany i opisanymi (m.in. pod względem morfologicznym, molekularnym, jak też funkcjonalnym) komórkami macierzystymi. Multipotencjalność oraz zdolność do samoodnowy (self-renewal) komórek HSC wyróżnia je spośród wszystkich komórek układu hematopoetycznego oraz gwarantuje ciągłość jego funkcjonowania [92]. W czasie podziałów i różnicowania z komórek HSC powstają komórki multipotencjalne (np. CFU-blast, CFU-L itp.), później komórki ukierunkowane (dla mielo- i limfopoezy B i T): mielopoetyczne i limfopoetyczne komórki macierzyste, a następnie prekursorzy (np. granulocytów kwasochłonnych, zasadochłonnych), które dają początek limfocytom, monocytom, granulocytom, erytrocytom i płytkom krwi [56].

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste

Macierzystość mezenchymalnych komórek zrębu (mesenchymal stromal cells) jest niejednoznaczna i czasami podważana, głównie ze względu na dużą heterogenność różnych populacji MSC i brak wystarczających dowodów na spełnianie wszystkich kryteriów „macierzystości” [10]. Mimo tych zastrzeżeń, nazwa mezenchymalne komórki macierzyste jest powszechnie stosowana [25,28,81]. Mianem komórek MSC określa się komórki o morfologii wrzecionowatej, przypominającej fibroblasty, charakteryzujące się w warunkach *in vitro* przyleganiem do powierzchni naczyń hodowlanych, potencjałem do różnicowania w tkanki: chrzęstną, kostną i tłuszczową oraz obecnością antygenów powierzchniowych CD73 CD90 CD105 i jednocześnie brakiem CD45 CD34 CD11b CD79a CD19, HLA-DR [25]. Jak już wspomniano, komórki MSC tworzą bardzo heterogenną grupę izolowaną z różnych typów tkanki łącznej, cechującą brak swoistych markerów, a ich cechą wspólną jest zdolność do modulowania funkcji tkanki biorcy po przeszczepie [10]. W zależności m.in. od wieku, źródła pochodzenia (lokalizacji niszy, z której je pozyskano), a w przypadku hodowli *in vitro*, również pasażu, wykazują bardzo różną charakterystykę (potencjał do różnicowania, proliferacji itp.) [38,44,53]. Komórki MSC wyizolowano po raz pierwszy ze szpiku kostnego, ale wiele lat później okazało się, że można je pozyskać z różnych źródeł np. galarety Whartona sznura pępowinowego, krwi pępowinowej oraz tkanki tłuszczowej [26,66]. U dorosłych osobników, podobnie jak w HSC, przez wiele lat głównym źródłem pozyskiwania komórek był szpik kostny. MSC w szpiku kostnym stanowią małą frakcję ($1/10^4$ - 10^5) komórek jednojądrzastych. Alternatywnym i bardziej wydajnym źródłem komórek MSC może być tkanka tłuszczowa (1 g tkanki tłuszczowej zawiera 5×10^3 MSC, co stanowi 500 razy większą frakcją niż w szpiku kostnym) [28,36,53,55]. Udowodniono, że z komórki MSC, poza wcześniej wspomnianym różnicowaniem w określone trzy typy komórek w obrębie mezodermy (chondrocyty, adipocyty i osteoblasty), można różnicować inne typy komórek. W hodowli *in vitro* uzyskano m.in. neurony (komórki pochodzenia ektodermalnego) czy hepatocyty (komórki pochodzenia endodermalnego) [27,28,49,123]. Tendencja do różnicowania w określone typy komórek, ale także niejednakowa liczba pozyskanych komórek oraz trudność ich izolacji zależą od umiejscowienia [3]. Ponadto wykazano, że komórki MSC po przeszczepieniu nie wywołują niepożądanego odpowiedzi immunologicznej, w układzie auto- i allogenicznym. Wyniki badań z przeszczepianiem autologicznych komórek MSC ze szpiku nie indukowały nowotworu ani infekcji u żadnego z 41 pacjentów [119]. Podobne wyniki uzyskano z badań 1012 uczestników (obejmujących różne grupy wiekowe, różne schorzenia oraz zdrowych ochotników) [59]. Sugeruje się, że komórki MSC mogą mieć właściwości immunosupresyjne. Prawdopodobnie odbywa się to przez wpływ komórek MSC na stan aktywności limfocytów T i B, makrofagów, komórek NK (naturalnych

zabójców) i komórek dendrytycznych [34]. Dzięki zdolności do wyciszania/tłumienia reakcji immunologicznej, komórki MSC są wykorzystywane w leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym, jak również mogą się okazać przydatne podczas transplantacji narządów [21,34,77]. Komórki MSC dzięki stosunkowo łatwej izolacji (w porównaniu do innych komórek macierzystych), mnogości źródeł ich pozyskania oraz łatwości namnażania w warunkach *in vitro*, dostarczają bardzo wielu pozytywnych wyników w układach *in vitro*, jak również w badaniach przedklinicznych *in vivo* na zwierzętach. Wyniki te jednak czasami pozostają w sprzeczności z brakiem pozytywnych efektów terapeutycznych w niektórych próbach klinicznych [10], dlatego konieczna jest kontrola funkcjonalna i fenotypowa kompetentnych terapeutycznie MSC w fazie przedimplantacyjnej [61]. Zainteresowanie właściwościami komórek mezenchymalnych odzwierciedla wzrastająca liczba rejestrowanych badań klinicznych z ich udziałem.

Mimo prowadzonych wielu badań, mechanizm terapeutycznego działania komórek MSC nie jest dokładnie poznany. Sugeruje się, że podane systemowo wydzielają czynniki parakryne, które pełnią funkcję adiuwantów, natomiast komórki wprowadzone w miejsce uszkodzenia w pewnych warunkach mogą się różnicować w komórki określonej tkanki i pełnić rolę rekonstrukcyjną. Dotyczy to jednak tylko tkanek pochodzenia mezodermalnego (np. tkanka chrzęstna lub kostna). Zwykle jednak, to właśnie dzięki właściwościom parakrynnym pełnią rolę koordynatora naprawy tkankowej [10,74,81].

NEURALNE KOMÓRKI MACIERZyste

Tkanka nerwowa wydaje się najbardziej trudną do regeneracji w porównaniu z innymi tkankami organizmu człowieka. Dogmat, który ustalił Ramon y Cajal prawie 100 lat temu [86] „w dorosłych centrach nerwowych drogi są ustalone, zakończone, niezmiennie”, obalono dowodami na podziały komórek i powstawaniem nowych neuronów w mózgu dorosłego człowieka [35] dopiero w 1998 roku. Dzisiaj znane są dowody nie tylko na istnienie procesu neurogenezy w dojrzałym mózgu w strefach neurogennych, ale również na jej aktywację przez określone czynniki rozwojowe w odpowiedzi na uszkodzenie mózgu [39,79]. W mózgu dorosłych ssaków zlokalizowano dwie strefy neurogenne: strefa okołokomorowa komórki bocznych – SVZ (subventricular zone) oraz podziarnista zakrętu zębatego hipokampa – SGZ (subgranular zone) [4,35,65,128]. Odkrycie neuralnych komórek macierzystych NSC (neural stem cells) oraz stref aktywnej i ciągłej neurogenezy w ośrodkowym układzie nerwowym zmieniło spojrzenie na plastyczność i regenerację mózgu. Jednocześnie zrodziła się nadzieja wykorzystania multipotentjalnych właściwości komórek NSC do leczenia różnego rodzaju urazów i chorób neurodegeneracyjnych. W warunkach *in vitro* ludzkie komórki NSC są zdolne do długotrwałego samopowielania, proliferacji oraz różnicowania

w komórki neuronalne, astrocytarne i oligodendrocytarne [12,13,90]. Głównym markerem komórek NSC jest nestyna (filament pośredni klasy VI), białko, które podlega ekspresji w komórkach niezróżnicowanych OUN, ale też w guzach OUN i w proliferujących endotelialnych progenitorach (endothelial progenitor cells – EPC) [96]. Naukowcy zachęteni potencjałem neuralnych komórek macierzystych upatrują w nich materiał do terapii komórkowej w leczeniu wielu schorzeń związanych z utratą funkcji neuronów lub komórek glijowych m.in. w: udarze mózgu, chorobach Parkinsona, Alzheimer, Huntingtona, stwardnieniu zanikowym bocznym i stwardnieniu rozsianym [17,18,69,91]. W wielu modelach zwierzęcych tych chorób stosowano transplantacje komórek macierzystych lub progenitorów, obserwując poprawę.

Jednak pozyskiwanie ludzkich NSC z obszarów neurogenicznych mózgu z oczywistych względów jest ograniczone, dlatego otrzymywanie komórek o podobnym potencjale z alternatywnych źródeł jest przedmiotem badań wielu zespołów naukowych. Jednym z takich łatwo dostępnych, bezpiecznych i niekontrowersyjnych etycznie źródeł pozyskiwania komórek, które można różnicować *in vitro* w komórki neuralne są: krew pępowinowa i galaretka Whartona ze sznura pępowinowego [13,24,26,61,70]. Wykazano również możliwość uzyskania komórek o fenotypie neuralnym w warunkach *in vitro* z komórek MSC np. z użyciem egzosomów (exosomes – małe pęcherzyki zawierające białka funkcjonalne i materiał genetyczny: m.in. miRNA, mRNA), mieszaniny neuralnych czynników indukujących (neural inducing factors) lub w obecności nanowłókien tworzących trójwarstwowe rusztowanie [26, 27, 82, 102]. Trzeba jednak podkreślić, że te komórki o charakterze neuralnym otrzymano z MSC jedynie w warunkach *in vitro*. Jak już wspomniano obecnie potrafimy otrzymywać komórki typowe dla tkanki nerwowej i innych tkanek dzięki opracowaniu metody reprogramowania (reprogramowania) komórek somatycznych do komórek iPS [101] i możliwości ich różnicowania do określonego fenotypu. Inną możliwą otrzymywania komórek o właściwościach neuralnych jest konwersja zarodkowych i postnatalnych fibroblastów do funkcjonalnych neuronów z udziałem trzech czynników transkrypcyjnych (*Acl1*, *Brn2* i *Myt1*), tzw. „konwersja fenotypowa bezpośrednia”. Powstałe w ten sposób neurony - iN wykazywały ekspresję swoistych białek i tworzyły funkcjonalne synapsy [118]. Możliwość otrzymywania komórek iPS oraz iNSC poszerza potencjalne źródła otrzymywania komórek neuralnych dla potrzeb medycyny regeneracyjnej, ale wciąż nie rozwiązuje problemu bezpieczeństwa ich wykorzystania w klinice. Wykazano jednak, że podawanie komórek NSC wywodzących się z komórek pluripotencjalnych (ESC lub iPS) w stadium zróżnicowanym nie tworzy teratom [43]. Zachęcające są również wyniki I fazy badań klinicznych z wykorzystaniem allogenicznych płodowych ludzkich NSC u pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym [69]. Komórki NSC wykorzystuje się również w badaniach klinicznych w uszkodzeniu rdzenia kręgowego oraz w udarze niedokrwiennym [17,19]. W Polsce

przeprowadzono pierwszy na świecie, monitorowany klinicznie eksperyment medyczny, w którym autologiczne komórki NSC otrzymane z krwi pępowinowej podano do OUN pacjenta z ciężkim uszkodzeniem mózgu w wyniku nagłego zatrzymania krążenia [51]. Pięcioletnia obserwacja wykazała, że zabieg był bezpieczny i korzystny dla pacjenta. Od tego czasu rozpoczęły się w Polsce kolejne eksperymenty medyczne z wykorzystaniem komórek macierzystych w chorobach OUN. Spektakularnym przykładem sukcesu takiej terapii jest zastosowanie komórek autologicznych pobranych z opuszki węchowej do regeneracji rdzenia kręgowego [99].

KOMÓRKI MACIERZYTE NASKÓRKA

Naskórek, jest nabłonkiem wywodzącym się z ektodermalnego listka zarodkowego (skóra właściwa i tkanka podskórna pochodzą z mezodermalnego listka zarodkowego i grzebienia nerwowego), jest tkanką narażoną bezpośrednio na działanie czynników środowiska i w związku z tym ulega nieustanej regeneracji [78,80]. W warunkach fizjologicznych wymiana starych obumarłych komórek naskórka i tworzenie nowych jest procesem ciągłym i odbywa się dzięki komórkom macierzystym, które w nim rezydują. Poza homeostazą, komórki macierzyste naskórka, uczestniczą również w procesach naprawczych spowodowanych urazami [7,75]. W skórze zidentyfikowano komórki macierzyste naskórka (epidermal stem cells) w ściśle określonych miejscach: w przedziałach międzymieszkowych w warstwie podstawnej i w wybrzuszeniach mieszka włosowego oraz gruczołów łojowych [116]. Wskazuje się, że w procesie regeneracji w warunkach fizjologicznych główną rolę odgrywają komórki macierzyste z warstwy podstawnej naskórka. W procesie ostrego gojenia ran są prawdopodobnie zaangażowane komórki macierzyste wybrzuszenia mieszka włosowego, których uszkodzenie funkcji nie wpłynęło na odnowę naskórka [46]. Wydaje się, że komórki macierzyste naskórka wywodzące się z różnych miejsc mogą spełniać odmienne funkcje. Komórki macierzyste z mieszka włosowego mają większy potencjał do różnicowania i samoodnowy niż SC izolowane z przedziałów międzymieszkowych [50]. Charakteryzuje je odmienny zestaw markerów służących do ich identyfikacji. Komórki epidermalne naskórka izolowane z przedziałów międzymieszkowych odznaczają się m.in. wysoką ekspresją β 1-integriny i α 6-integriny, obniżoną ekspresją CD71 i keratyny-15. Komórki macierzyste z mieszków włosowych wyróżnia m.in. ekspresja keratyny-19 i oraz obecność antygenów CD200 i CD271 [7,116]. W mieszkach włosowych występują również inne populacje komórek macierzystych np. w brodawce włosa i torebce włóknistej wykazano obecność mezenchymalnych komórek macierzystych [43]. Komórki macierzyste i progenitorowe naskórka tworzą bardzo niejednorodne populacje komórek, charakteryzujące się różnymi właściwościami, tj. potencjałem proliferacyjnym i zdolnościami do różnicowania [1,62]. Łatwa dostępność i cechy „macierzystości” umożliwiają ich wykorzystanie zarówno w badaniach bio-

logicznych, jak też w medycynie regeneracyjnej [93]. Komórki macierzyste naskórka stosuje się m.in. do leczenia trudno gojących się ran, rozległych oparzeń skóry i owrzodzeń. Pobrany od pacjenta niewielki fragment zdrowej skóry jest źródłem keratynocytów. Keratynocyty warstwy podstawnej naskórka dają początek komórkom o wysokim potencjale proliferacyjnym, przejściowo namnażającym się (transient amplifying). Kolonie keratynocytów SC zwane holoklonami, namnażane w warunkach *in vitro*, po 2-3 tygodniach formują następne warstwy komórek naskórka (sheets of epidermal cells), które są materiałem tkankowym, gotowym do przyczepu na ubytki powłok ciała [60,75]. Potencjał komórek macierzystych naskórka do regeneracji i różnicowania w połączeniu z hodowlą *in vitro* oraz terapią genową może też być szansą dla pacjentów z chorobami dermatologicznymi o podłożu genetycznym np. pęcherzykowe oddzielanie naskórka związane z defektem genu kodującego np. kolagen typu VII (COL7A1) [29]. Łatwa dostępność i skala występowania komórek macierzystych naskórka, ich właściwości immunomodulacyjne w układzie allogenicznym oraz wysoki stopień plastyczności powodują, że są cennym materiałem klinicznym [8,23,62].

REGULACJE PRAWNE TERAPII KOMÓRKOWEJ OBOWIĄZUJĄCE W POLSCE

Formalny status komórek macierzystych i regulacje dotyczące zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych nie są jednoznaczne i ciągle podlegają dyskusji.

W odniesieniu do komórek macierzystych mogą mieć zastosowanie akty prawne m.in. ustawa o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów [111, 112] oraz Dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2004/23/WE, Dyrektywy Komisji, 2006/17/WE, 2006/86/WE [28,30, 32, 33]. Jeśli komórki spełniają wymagania zawarte w definicji produktu leczniczego oraz warunki wskazane w Rozporządzeniu nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady to mogą być traktowane jako tzw. „produkty lecznicze terapii zaawansowanej” - ATMP (advanced-therapy medicinal product) [31,88,109,110]; tabela 1.

Wątpliwości badaczy budzi już sam proces klasyfikowania komórek macierzystych. Według Rozporządzenia (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady produkty lecznicze somatycznej terapii komórkowej, jak również produkty inżynierii tkankowej są grupą produktów leczniczych terapii zaawansowanych. Produkty mogą mieć właściwości regeneracyjne, naprawcze lub zastępujące ludzkie tkanki. Wspomniana regulacja europejska definiuje modyfikacje, jakim komórki mogą podlegać w celu spełnienia funkcji jako produktu leczniczego. Taka klasyfikacja powoduje, że komórki macierzyste, w badaniach klinicznych traktowane jako produkty lecznicze terapii zaawansowanej powinny spełniać wymogi dobrej praktyki klinicznej oraz dobrej praktyki wytwarzania. Rozporządzenie powstało z myślą o ATMP wytwarzanych metodami przemysłowymi lub powstającymi w oparciu o metodę obejmującą swym zakre-

sem proces przemysłowy. W tym znaczeniu wprowadzenie do terapii komórek macierzystych powinno podlegać takim samym regułom jak wprowadzenie nowego leku. Nie dotyczy to jednak komórek przygotowanych na potrzeby pojedynczego pacjenta, których podawanie może się odbywać w szpitalu na wyłączną odpowiedzialność lekarza przeprowadzającego zabieg [88]. Należy jednak zaznaczyć, że przypadki wyłączenia szpitalnego z zastosowaniem ATMP wymagają nadal uzyskania zgody głównego inspektora farmaceutycznego, wydawanej na podstawie decyzji [rozdział 3, art. 38a; 109]. Komórki macierzyste, które nie podlegają przedtransplantacyjnym procedurom hodowlanym mogą być traktowane jako materiał transplantacyjny, a ich zastosowanie wymaga zgody lokalnej komisji bioetycznej oraz pozwolenia ministra zdrowia. Jeśli podmiot ma zamiar wykonywać czynności związane z gromadzeniem, przetwarzaniem, sterylizacją, przechowywaniem i dystrybucją komórek, to powinien uzyskać pozwolenie ministra zdrowia jako bank tkanek i komórek zgodnie z ustawą z dnia 1 lipca 2005, art. 25 [111]. Wniosek o uzyskanie pozwolenia należy złożyć do Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek, natomiast pozwolenia na okres 5 lat udziela minister właściwy do spraw zdrowia na wniosek Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek, po zaopiniowaniu przez Krajową Radę Transplantacyjną.

Jeśli dotyczy to np. pobierania komórek od żywych dawców, pobieranie może się odbywać wyłącznie w zakładach opieki zdrowotnej i wymagane jest również uzyskanie pozwolenia ministra zdrowia na podstawie art. 36 tejże ustawy. W celu uzyskania pozwolenia postępuje się jak wyżej, z tym że zadania i czynności Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek wykonuje Centrum Organizacyjno-Koordinacyjne do spraw Transplantacji „Poltransplant” a minister właściwy do spraw zdrowia przed wydaniem pozwolenia również zasięga opinii Krajowej Rady Transplantacyjnej [1,37,111].

Postępowanie polegające na testowaniu komórek, tkanek i narządów może być podejmowane wyłącznie w medycznym laboratorium diagnostycznym w rozumieniu przepisów ustawy o diagnostyce laboratoryjnej [113], mającym pozwolenie ministra właściwego do spraw zdrowia na wykonywanie tych czynności [1,37,111]. Ponadto, jeśli komórki mają być stosowane u ludzi w ramach nawet eksperymentu badawczego/leczniczego, należy je stosować zgodnie z wymogami, jakie powinien spełniać system zapewnienia jakości banku tkanek i komórek zgodnie z Rozporządzeniem ministra zdrowia z dnia 9 października 2008 r. [89].

Obiekcje budzi interpretacja definicji eksperymentu medycznego oraz badania klinicznego i ich implikacje. Ustawa z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty [114,115] wprowadza różniczenie eksperymentu medycznego przeprowadzanego na ludziach na eksperyment leczniczy i badawczy, podając definicję obu eksperymentów. Przeprowadzenie eksperymentu może się odbyć jedynie po uzyskaniu

Tabela 1. Najważniejsze akty prawne dotyczące zastosowania komórek w terapii

DYREKTYWA 2004/23/WE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 31 marca 2004 r.	w sprawie ustalenia norm jakości i bezpiecznego oddawania, pobierania, testowania, przetwarzania, konserwowania, przechowywania i dystrybucji tkanek i komórek ludzkich.
DYREKTYWA KOMISJI 2006/17/WE z dnia 8 lutego 2006 r.	wprowadzająca w życie dyrektywę 2004/23/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do niektórych wymagań technicznych dotyczących dawstwa, pobierania i badania tkanek i komórek ludzkich.
DYREKTYWA KOMISJI 2006/86/WE z dnia 24 października 2006 r.	wykonująca dyrektywę 2004/23/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w zakresie wymagań dotyczących możliwości śledzenia, powiadamiania o poważnych i niepożądanych reakcjach i zdarzeniach oraz niektórych wymagań technicznych dotyczących kodowania, przetwarzania, konserwowania, przechowywania i dystrybucji tkanek i komórek ludzkich.
DYREKTYWA KOMISJI 2015/565 z dnia 8 kwietnia 2015 r.	zmieniająca dyrektywę 2006/86/WE w odniesieniu do niektórych wymagań technicznych dotyczących kodowania tkanek i komórek ludzkich.
DYREKTYWA KOMISJI 2009/120/WE z dnia 14 września 2009 r.	zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi w zakresie produktów leczniczych terapii zaawansowanej (dotyczy komórek traktowanych jako produkty lecznicze).
ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z dnia 29 września 2016 r.	w sprawie szczegółowych warunków pobierania, przechowywania i przeszczepiania komórek, tkanek i narządów Dz.U. poz. 1674 (m.in. kompetencje i uprawnienia personelu pobierającego i warunków podmiotów gdzie następuje pobranie).
ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z dnia 20 listopada 2006 r.	w sprawie wymagań fachowych i sanitarnych dla banków tkanek i komórek Dz.U. poz 1598.
ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z dnia 20 marca 2015 r.	Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 września 2016 r. w sprawie szczegółowych warunków pobierania, przechowywania i przeszczepiania komórek, tkanek i narządów
ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z dnia 29 czerwca 2011 r.	w sprawie wzoru wniosku o wydanie zgody na wytwarzanie produktów leczniczych terapii zaawansowanej
ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z dnia 9 listopada 2015 r.	W sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania Dz.U. 2005 poz. 1979.
ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA 1169 z dnia 9 października 2008 r.	w sprawie wymagań, jakie powinien spełniać system zapewnienia jakości w bankach tkanek i komórek. Dz.U. 2008 poz. 1169 z późniejszymi zmianami Dz.U. 2014 poz. 772.
Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 16 czerwca 2015 r	w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie wymagań, jakie powinien spełniać system zapewnienia jakości w bankach tkanek i komórek Dz.U. 2015 poz. 967.
ROZPORZĄDZENIE (WE) NR 1394/2007 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 13 listopada 2007 r.	w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004 (dotyczy m.in. komórek traktowanych jako produkty lecznicze).
USTAWA z dnia 6 września 2001 r. Ustawa Prawo farmaceutyczne	Ustawa Prawo farmaceutyczne. Dz.U. 2001 Nr 126 poz. 1381, Dz.U.2008 nr 45 poz. 271 z późn. zm.
USTAWA z dnia 9 kwietnia 2015 r. o zmianie ustawy Prawo farmaceutyczne oraz niektórych innych ustaw. Dz.U. 2015 poz. 788	Ustawa o zmianie ustawy Prawo farmaceutyczne oraz niektórych innych ustaw. (dotyczy m.in. komórek traktowanych jako produkty lecznicze).
Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 7 grudnia 2016 r.	w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy – Prawo farmaceutyczne Dz.U. 2016 poz. 2142.
USTAWA z dnia 1 lipca 2005 r.	o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów Dz.U.2005 nr 169 poz. 1411.
USTAWA z dnia 17 lipca 2009 r.	o zmianie ustawy o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów oraz o zmianie ustawy – Przepisy wprowadzające. Kodeks karny: Dz.U. 2009 r. nr 141, poz. 1149.
USTAWA z dnia 23 marca 2017 r.	o zmianie ustawy o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów Dz.U. 2017 poz. 798.
USTAWA z dnia 5 grudnia 1996	o zawodach lekarza i lekarza dentystry Dz. U. z 2008 r. Nr 136, poz. 857, z późn. zm.
USTAWA z dnia 28 kwietnia 2011 r.	o zmianie ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentystry Dz.U.2011.113.658.
USTAWA z dnia 24 lutego 2017 r.	o zmianie ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentystry oraz ustawy o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów Dz.U. 2017 poz. 767.

pozytywnej opinii komisji bioetycznej. Ponadto, o ile ustawa o prawie farmaceutycznym precyzyjnie definiuje badanie kliniczne produktu leczniczego: „...jest eksperymentem medycznym z użyciem produktu leczniczego przeprowadzanym na ludziach”, o tyle już granica, kiedy eksperyment medyczny staje się badaniem klinicznym nie jest jednoznaczna [109,110].

PODSUMOWANIE

Komórki macierzyste dzięki zdolnościom do różnicowania i samopowieliania w warunkach fizjologicznych zapewniają utrzymanie homeostazy tkankowej, a także mogą brać udział w regeneracji uszkodzeń powstałych w wyniku choroby lub urazu. W bardzo rozległych uszkodzeniach, w warunkach naturalnych, obecne w tkankach somatycznych komórki macierzyste występują w zbyt małej liczbie, żeby zagwarantować całkowitą regenerację. Dlatego opracowanie skutecznych, bezpiecznych i efektywnych metod pozyskiwania i zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych rodzi nadzieje na leczenie lub poprawę funkcjonowania nieuleczalnie chorych pacjentów.

Stosowanie pluripotencjalnych zarodkowych komórek macierzystych uzyskiwanych z zarodków ludzkich jest etycznie kontrowersyjne, a w przypadku bezpośredniego przeszczepiania wiąże się z zagrożeniem występowania teratom – niełośliwych rozrostów nowotworowych. Możliwość otrzymania komórek iPS eliminuje zastrzeżenia etyczne, ale podobnie jak w przypadku ESC narzuca konieczność różnicowania komórek do bezpiecznych populacji, niedających ryzyka tworzenia teratom, dlatego obecnie zastosowanie komórek pluripotencjalnych jest jeszcze w fazie badań eksperymentalnych i przedklinicznych. Leczenie za pomocą autologicznych lub allogenicznych HSC i progenitorów hematopoetycznych jest już standardem klinicznym w różnego typu chorobach krwi. Prowadzi się również doświadczenia w celu wykorzystania komórek szpiku kostnego w regeneracji mięśnia sercowego. Liczne są też doniesienia o próbach stosowania komórek macierzystych w regeneracji uszkodzonego układu nerwowego, ale jedynie potwierdzony wynik ich stosowania polega na poprawie czynnościowej wywołanej prawdopodobnie przez neuroprotektynne czynniki troficzne wydzielane przez przeszczepione SC [67,74,91]. Obecnie, ze względu na właściwości immunosupresyjne/immunomodulacyjne, wiele uwagi kieruje się na MSC pod kątem ich zastosowania w transplantologii oraz w chorobach autoimmunologicznym, np. Leśniowskiego-Crohna lub schorzeniach neurodegeneracyjnych [16,37].

Standaryzacja metod otrzymywania i hodowli komórek macierzystych jest jednym z podstawowych wyzwań współczesnej terapii komórkowej, a protokoły izolacji komórek macierzystych w celu zwiększenia efektywności i czystości otrzymanych populacji oraz bezpieczeństwa ich stosowania (dawki i sposób podawania) nadal

wymagają dopracowania. Głównym problemem jest to, że wyjściowa populacja komórek jest heterogenna i mimo postępu (automatyzacji) metod wciąż brakuje skutecznych markerów dla SC terapeutycznie kompetentnych.

Stosowanie komórek macierzystych w medycynie należy analizować wielopłaszczyznowo. Jedną płaszczyznę tworzą same unikalne właściwości biologiczne komórek macierzystych, które wciąż podlegają badaniom eksperymentalnym (szczególnie w układzie *in vivo*). Trudności związane są również ze sposobem monitorowania ich w organizmie, aczkolwiek odnotowuje się duży postęp technologiczny w tej dziedzinie. Drugą płaszczyznę jest oszacowanie, jaka liczba (zasobność organizmu, wydajność metod izolacji, mnogość źródeł) i jakość wyizolowanych komórek (charakterystyka populacji terapeutycznej, heterogenność populacji) jest niezbędna do osiągnięcia pozytywnego skutku terapeutycznego. Innym problemem jest czas potrzebny do namnożenia i ewentualnej manipulacji genetycznej (terapia genowa). W rozważaniach na temat zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych nie sposób pominąć też kosztów, jakie za sobą pociąga procedura (np. izolacja, ewentualna manipulacja i hodowla *in vitro*) związana z ich użyciem. Bardzo ważnym aspektem możliwości stosowania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej jest stworzenie jednoznacznych przepisów regulujących status komórek macierzystych, a jednocześnie gwarantujących bezpieczeństwo i monitorowanie każdego etapu ich stosowania zarówno w laboratorium, jak i w klinice. W Polsce przepisy są związane z koniecznością otrzymywania zezwoleń ministerstwa zdrowia na otrzymywanie i zastosowanie SC do celów terapeutycznych w oparciu o ustawę z 1 lipca 2005 r., z późniejszymi zmianami [111,112], która bezpośrednio nie precyzuje statusu komórek macierzystych i nie odnosi się do długotrwałych procedur hodowlanych związanych z przygotowaniem komórek terapeutycznie kompetentnych. Jednak biorąc pod uwagę możliwość traktowania takich komórek jako ATMP, podlegają one regulacjom głównego inspektora farmaceutycznego oraz regulacjom instytucji europejskich: Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency - EMA) i działającemu przy niej Komitetowi ds. Terapii Zaawansowanych (Committee for Advanced Therapies - CAT).

Wspomniane trudności powodują, że z wyjątkiem komórek hematopoetycznych zastosowanie komórek macierzystych w rutynowej terapii jest coraz bliższą i realną, ale nadal przyszłością.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy Pani prof. dr hab. Krystynie Domańskiej-Janik za pomoc i cenne uwagi merytoryczne oraz Pani Ewie Ołdak za udzielone informacje dotyczące rejestracji badań klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abbas O., Mahalingam M.: Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses. *B.J.D.*, 2009; 161: 228-236
- [2] Aktas M., Buchheiser A., Houben A., Reimann V., Radke T., Jeltsch K., Maier P., Zeller W.J., Kogler G.: Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy*, 2010; 12:338-348
- [3] Al-Nbaheen M., Vishnubalaji R., Ali D., Bouslimi A., Al-Jassir F., Megges M., Prigione A., Adjaye J., Kassem M., Aldahmash A.: Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.*, 2013; 9:32-43
- [4] Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M.: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 2002; 1; 22:629-34
- [5] Augustyniak J., Zychowicz M., Podobinska M., Barta T., Buzanska L.: Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2014; 74:373-382
- [6] Bahney C.S and Mclau T.: Therapeutic potential of stem cells in orthopedics. *Indian J. Orthop.*, 2012; 46: 4-9
- [7] Balpain C., Fuchs E.: Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2009; 10: 207-217
- [8] Barthel R. I., Aberdam D.: Epidermal stem cells. *J.Eur.Acad. Dermatol. Venerol.*, 2005; 19:405-413
- [9] Bernstein B.E., Meissner A., Lander E.S. Mammalian Epigenome. *Cell*, 2007; 128:669-681
- [10] Bianco P.: "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev. Biol.*, 2014; 30:677-704
- [11] Boheler K.R.: Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol.*, 2009; 221:10-17
- [12] Buzanska L., Jurga M., Stachowiak E.K., Stachowiak M.K., Domanska-Janik K.: Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.*, 2006; 3:391-406
- [13] Buzanska L., Machaj E.K., Zablocka B., Pojda Z., Domanska-Janik K.: Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci.*, 2002; 15:2131-2138
- [14] Buzanska L., Szablowska-Gadomska I., Zychowicz M.: Neuralne komórki macierzyste: podejmowanie decyzji rozwojowych. W: Glej XXIX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN., Kraków, 2012; 19-34
- [15] Buzanska L., Zychowicz M., Sarnowska A., Domańska-Janik K.: Bioinżynieria niszy neuralnych komórek macierzystych. *Postepy Biochem.*, 2013; 59:175-186
- [16] Canesi M., Giordano R., Lazzari L., Isalberti M., Isaias I.U., Benti R., Rampini P., Marotta G., Colombo A., Cereda E., Dipaola M., Montemurro T., Viganò M., Budelli S., Montelatici E., Lavazza C., Cortelezi A., Pezzoli G.: Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: mesenchymal stromal cells for progressive supranuclear palsy. *J Transl Med.*, 2016; 10:1-11
- [17] Casaarosa S., Bozzi Y., Conti L.: Neural stem cells: ready for therapeutic applications? *Mol Cell Ther.*, 2014; 1:2-31
- [18] Chou Ch-H., Fan H-Ch., Hueng D-Y.: Potential of Neural Stem Cell-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease.*, 2015; 1:1-9
- [19] ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health <https://clinicaltrials.gov/><https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=%22stem+cells%22> (10.04.2017)
- [20] Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B.: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.*, 1987; 24:987-1000
- [21] de Vasconcellos Machado C., Dias da Silva Telles P., Oliveira Nascimento I.L.: Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter.*, 2013; 35:62-67
- [22] Deng X.Y., Wang H., Wang T., Fang X.T., Zou L.L., Li Z.Y., Liu C.B.: Non-viral methods for generating integration-free, induced pluripotent stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2015; 10:153-158
- [23] Dieckmann C., Renner R., Milkova L., Simon J.C.: Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Exp Dermatol.*, 2010 19:697-706
- [24] Domanska-Janik K., Buzanska L., Lukomska B.: A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells. *Int J Dev Biol.*, 2008; 52:237-248
- [25] Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement., *Cytotherapy*. 2006; 8, 4:315-317
- [26] Drela K., Lech W., Figiel-Dabrowska A., Zychowicz M., Mikula M., Sarnowska A., Domanska-Janik K.: Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy*, 2016; 18:497-509
- [27] Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, Lukomska B, Domanska-Janik K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 2014; 16:881-892
- [28] Drela K., Siedlecka P., Sarnowska A., Domanska-Janik K.: Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp.*, 2013; 73:38-56
- [29] Droz-Georget Lathion S., Rochat A., Knott G., Recchia A., Martinet D., Benmohammed S., Grasset N., Zaffalon A., Besuchet Schmutz N., Savioz-Dayer E., Beckmann J.S., Rougemont J., Mavilio F., Barrandon Y.: A single epidermal stem cell strategy for safe ex vivo gene therapy. *EMBO Mol Med.*, 2015; 27:380-393
- [30] Dyrektywa Komisji 2006/86/WE z dn. 24 października 2006 wykonująca dyrektywę 2004/23/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w zakresie wymagań dotyczących możliwości śledzenia, powiadamiania o poważnych i niepożądanych reakcjach i zdarzeniach oraz niektórych wymagań technicznych dotyczących kodowania, przetwarzania, konserwowania, przechowywania i dystrybucji tkanek i komórek ludzkich
- [31] Dyrektywa Komisji 2009/120/WE z dn. 14 września 2009 zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi w zakresie produktów leczniczych terapii zaawansowanej
- [32] Dyrektywy Komisji, 2006/17/WE z dn. 8 lutego 2006 wprowadzająca w życie dyrektywę 2004/23/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do niektórych wymagań technicznych dotyczących dawstwa, pobierania i badania tkanek i komórek ludzkich
- [33] Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2004/23/WE z dn. 31 marca 2004 w sprawie ustalenia norm jakości i bezpiecznego oddawania, pobierania, testowania, przetwarzania, konserwowania, przechowywania i dystrybucji tkanek i komórek ludzkich
- [34] English K., French A., Wood K.J.: Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell.*, 2010; 8:431-342

- [35] Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk – Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Petreson D.A., Gage F.H.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.*, 1998; 4:1313-1317
- [36] Fraser J.K, Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M.H.: Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 2006; 24:150-154
- [37] Gao F., Chiu S.M., Motan D.A., Zhang Z., Chen L., Ji H.L., Tse H.F., Fu Q.L., Lian Q.: Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.*, 2016; 7:1:11
- [38] Gimble J.M., Guilak F., Sathishkumar M.S., Vidal M., Bunnell B.A.: In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother.*, 2008; 35:228-238
- [39] Goldman S.: Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol.*, 2005; 23:862-871
- [40] Gonzalez M.A. and Bednad A.: Characteristics of adult stem.W: Advances in experimental medicine and biology v. 741; Stem Cell Transplantation, Red.: R. López-Larrea, A. López-Vázquez., B. Suárez-Álvarez. Landes Bioscience and Springer Science+Business Mediacapter, USA 2012; 1:103-120
- [41] Goodell M.A.: Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP). *Curr Protoc Cytom.*, 2005; 9:9-18
- [42] Gurdon J.B., Elsdale T.R., Fischberg M.: Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature.*, 1958; 182:64-65
- [43] Hallett P.J., Deleidi M., Astradsson A., Smith G.A., Cooper O., Osborn T.M., Sundberg M., Moore M.A., Perez-Torres E., Brownell A.L., Schumacher J.M., Spealman R.D., Isacson O.: Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 2015; 16(3):269-74
- [44] Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R.: Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling.*, 2011; 9:1-14
- [45] Hass R., Kronenwett R.: Hematopoetyczne komórki macierzyste – pytania i odpowiedzi. Podstawowe informacje, wskazania i korzyści terapeutyczne. MedPharm Polska, Wrocław 2009
- [46] Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R.J., Cotsarelis G.: Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005; 11:1351-1354
- [47] Jankowski R.J., Deasy B.M., Cao B., Gates C., Huard J.: The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *J Cell Sci.*, 2002; 15:4361-4374
- [48] Jedrzejczak W.W.: Translational research in regenerative medicine: an example of bone marrow transplantation. *Postepy Biochem.* 2013; 59:198-204
- [49] Jezierska-Woźniak K., Nosarzewska D., Tutas A., Mikołajczyk A., Okliński M., Jurkowski M.K.: Wykorzystanie tkanki tłuszczowej jako źródła mezenchymalnych komórek macierzystych. *Postepy Hig Med Dosw*, 2010; 64:326-332
- [50] Joachimiak R., Bajek A., Drewna T.: Mieszki włosowe nowym źródłem komórek macierzystych. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2012; 66:181-186
- [51] Jozwiak S., Habich A., Kotulska K., Sarnowska A., Kropiwnicki T., Janowski M., Jurkiewicz E., Lukomska B., Kmiec T., Walecki J., Roszkowski M., Litwin M., Oldak T., Boruczowski D., Domanska-Janik K.: Intracerebroventricular Transplantation of Cord Blood-Derived Neural Progenitors in a Child With Severe Global Brain Ischemic Injury. *Cell Medicine, Part B of Cell Transplantation*, 2010; 1:71-80
- [52] Kawiak J.: Komórki macierzyste organizmu dorosłego w biologii i medycynie. *Postepy Biol. Kom.*, 2009; 36: 99-110
- [53] Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.*, 2006; 24:1294-1301
- [54] Kim D.S., Ross P.J., Zaslavsky K., Ellis J.: Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. *Front Cell Neurosci.*, 2014, 8:1-16
- [55] Kitagawa Y.K.M., Toriyama K., Kamei Y., Torii S.: History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical applications. *Jpn J Plast Reconstr Surg.*, 2006; 49:1097-1104
- [56] Kozłowska-Skrzypczak M., Komarnicki M.: Hematopoetyczne komórki macierzyste i krwiotworzenie. *Diagnostyka Laboratoryjna Journal of Laboratory diagnostics.* 2008; 44:231-239
- [57] Kubiak J.Z., Ciemerych, M.A.: From Gurdon to Yamanaka - a brief history of cell reprogramming . *Postepy Biochem.*, 2013; 59:124-130
- [58] Kucia M., i Drukała J.: Postępy w metodach hodowli komórek dla transplantologii Komórki macierzyste. *Postepy Biol. Kom.*, 2002; 2:257-268
- [59] Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C., Fergusson D., Winston B.W., Marshall J.C., Granton J., Duncan J.S.: Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS ONE*, 2012; 7:1-21
- [60] Lapouge G., Blanpain C.: Medical applications of epidermal stem cells. 2008 Nov 15. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27047/> (01.08.2015)
- [61] Lech W., Figiel-Dąbrowska A., Sarnowska A., Drela K., Obtulowicz P., Bartłomiej Henryk Noszczyk B.H., Buzanska L., Domanska-Janik K.: Phenotypic, functional and safety control at pre-implantation phase of MSC-based therapy. *Stem Cell International*, 2016;
- [62] Li J., Zhen G., Tsai S.-Y., Jia X.: Epidermal Stem Cells in Orthopaedic Regenerative Medicine *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14:11626-11642
- [63] Li X., Zhao X.: Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem cells and dev.*, 2008; 17, 1043-1052
- [64] Lin T., Ambasudhan R., Yuan X., Li W., Hilcove S., Abujarour R., Lin X., Hahm H.S., Hao E., Hayek A., Ding S.: A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.*, 2009; 6:805-808
- [65] Lois, C., and Alvarez-Buylla, A.: Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.*, 1994; 264: 1145-1148
- [66] Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K.M., Leung V.Y.: Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.*, 2014; 32:1408-1419
- [67] Machaliński B.: Nieembrionalne komórki macierzyste a regeneracja układu nerwowego. *Polski Przegląd Neurologiczny*, 2008; 4:15-19
- [68] Masayo Takahashi awarded inaugural Ogawa-Yamanaka Stem Cell Prize http://www.cdb.riken.jp/en/news/2015/topics/0911_7778.html (18.09.2015)
- [69] Mazzini L., Gelati M., Profico D.C., Sgaravizzi G., Progetti Pensi M., Muzi G., Ricciolini C., Rota Nodari L., Carletti S., Giorgi C., Spera C., Domenico F., Bersano E., Petruzzelli F., Cisari C., Maglione A., Sarnelli M.F., Stecco A., Querin G., Masiero S., Cantello R., Ferrari D., Zalfa C., Binda E., Visioli A., Trombetta D., Novelli A., Torres B., Bernardini L., Carriero A., Prandi P., Servo S., Cerino A., Cima V., Gaiani A., Nasuelli N., Massara M., Glass J., Sorarù G., Boullis N.M., Vescovi A.L.: Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. *J Transl Med.* 2015; 27:13-17
- [70] McGuckin C.P., Forraz N., Allouard Q., Pettengell R.: Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res.*, 2004; 1:350-359
- [71] Mimeault M., Batra S.K.: Great promise of tissue –residet adult stem/progenitor cells in transplantation and cancer therapies; *Stem Cell Transplantation*, Red.: R. López-Larrea, A. López-Vázquez., B. Suárez-Álvarez. Landes Bioscience and Springer Science+Business Mediacapter, USA 2012, 1:171-187

- [72] Molofsky A.V, Pardal R., Morrison S.J.: Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol.*, 2004; 16 6 :700-707
- [73] Nakamura S., Takayama N., Hirata S., Seo H., Endo H., Ochi K., Fujita K., Koike T., Harimoto K., Dohda T., Watanabe A., Okita K., Takahashi N., Sawaguchi A., Yamanaka S., Nakauchi H., Nishimura S., Eto K.: Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.*, 2014; 3:535-548
- [74] Obtulowicz P., Lech W., Strojek L., Sarnowska A., Domanska-Janik K.: Induction of Endothelial Phenotype From Wharton's Jelly-Derived MSCs and Comparison of Their Vasoprotective and Neuroprotective Potential With Primary WJ-MSCs in CA1 Hippocampal Region Ex Vivo. *Cell Transplant.*, 2016; 25:715-727
- [75] Ojeh N., Pastar I., Tomic-Canic M., Stojadinovic O.: Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2015; 23:25476-25501
- [76] Oki T, Nishimura K., Kitaura J., Togami K., Maehara A., Izawa K., Sakae-Sawano A., Niida A., Miyano S., Aburatani H., Kiyonari H., Miyawaki A., Kitamura T.: A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. *Sci Rep.*, 2014; 4:1-10
- [77] Opiela J.: Mezenchymalne komórki macierzyste w transplantologii. *Wiadomości Zootechniczne, R. L.* 2012; 3:37-43
- [78] Panich U., Sittithumcharee G., Rathviboon N., Jirawatnotai S.: Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging. *Stem Cells Internat.*, 2016; 1:1-14
- [79] Park K.I., Teng Y.D., Snyder E.Y.: The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstruct lost tissue. *Nat Biotechnol.*, 2002; 20:1111-1117
- [80] Pikula M., Trzonkowski P.: Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2009; 63:449-456
- [81] Pojda Z., Machaj E., Kurzyk A., Mazur S., Debski T., Gilewicz J., Wysocki J.: Meznchymalne komórki macierzyste. *Postepy Biochem.*, 2013; 59:187-197
- [82] Prabhakaran M.P., Venugopal J.R., Ramakrishna S.: Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials.*, 2009; 30:4996-5003
- [83] Przybycień K., Komacewicz-Jach Z., Machaliński B.: Komórki macierzyste w klinicznych badaniach kardiologicznych. *Kardiologia Polska*, 2011; 69:601-609
- [84] Radziszewska A., Chia Gle B., dos Santos R.L., Theunissen T.W., Castro L.F., Nichols J., Silva J.C.: A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol.*, 2013; 15:579-590
- [85] Ramalho-Santos M., Willenbring H.: On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*, 2007; 7:35-38
- [86] Ramon y Cajal S.: Degeneration and Regeneration of the Nervous System. *Journal of Neurology and Psychopathology*, 1929; 9:378-379.
- [87] Rao M.S., Malik N.: Assessing iPSC Reprogramming Methods for Their Suitability in Translational Medicine *J Cell Biochem.*, 2012; 113:3061-3068
- [88] Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004 http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2007_1394/reg_2007_1394_pl.pdf (28.08.2015)
- [89] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2008 r. w sprawie wymagań, jakie powinien spełniać system zapewnienia jakości w bankach tkanek i komórek. *Dz.U.* 2008 nr 190 poz. 1169 z późn. zm *Dz.U.* 2014 poz. 772
- [90] Santilli G., Lamorte G., Carlessi L., Ferrari D., Rota Nodari L., Binda E., Delia D., Vescovi A.L., De Filippis L.: Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*, 2010; 5:1-12
- [91] Sarnowska A., Habich A., Maksymowicz W., Domańska-Janik K.: Terapia komórkowa w neurologii - obawy i nadzieje. *Polski Przegląd Neurologiczny*, 2014; 10:1-14
- [92] Seita J., Weissman I.L.: Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, 2010; 2:640-653
- [93] Shen Q., Jin H., and Wang X.: Epidermal Stem Cells and Their Epigenetic Regulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14:17861-17880
- [94] Siller R., Greenhough S., Park I.H., Sullivan G.J.: Modelling human disease with pluripotent stem cells *Curr Gene Ther.*, 2013; 13:99-110
- [95] Son M.Y., Lee M.O., Jeon H., Seol B., Kim J.H., Chang J.S., Cho Y.S.: Generation and characterization of integration-free induced pluripotent stem cells from patients with autoimmune disease. *Exp Mol Med.*, 2016; 13: 1-10
- [96] Suzuki S., Namiki J., Shibata S., Mastuzaki Y., Okano H.: The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58:721-730
- [97] Szablowska-Gadomska I., Górską A., Małecki M.: Induced pluripotent stem cells (iPS) for gene therapy. *Developmental Period Medicine.* 2013; 3:191-195
- [98] Szablowska-Gadomska I., Sypecka J., Zayat V., Podobinska M., Pastwinska A., Pienkowska-Grela B., Buzanska L.: Treatment with small molecules is an important milestone towards the induction of pluripotency in neural stem cells derived from human cord blood. *Acta Neurobiol Exp.*, 2012; 72:337-350
- [99] Tabakow P., Jarmundowicz W., Czapięga B., Fortuna W., Miedzybrodzki R., Czyż M., Huber J., Szarek D., Okurowski S., Szewczyk P., Gorski A., Raisman G.: Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2013; 22:1591-1612
- [100] Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.*, 2007; 30:861-872
- [101] Takahashi K., Yamanka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.*, 2006; 126:663-676
- [102] Takeda Y.S., Xu Q.: Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Exosomes Derived from Differentiating Neuronal Cells. *PLoS One.*, 2015; 10:1-26
- [103] Tarkowski A.K., Maleszewski M., Rogulska T., Ciemerych M., Borsuk E.: Mammalian and avian embryology at the University of Warsaw (Poland) from XIX century to the present. *Int J Dev Biol.* 2008; 52:121-134
- [104] Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 6:1145-1147
- [105] Till J.E., McCulloch E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.*, 1961; 14:213-222
- [106] Till J.E, McCulloch E. A., Siminovitch L.: A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1964; 51:29-36
- [107] Tsai C.C., Su P.F., Huang Y.F., Yew T.L., Hung S.C.: Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnm1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell.*, 2012; 27:169-182
- [108] Umar S.: Intestinal Stem Cells. *Curr Gastroenterol Rep.*, 2010; 12: 340-348

- [109] Ustawa z dn. 6 września 2001 Prawo farmaceutyczne Dz.U.2001 nr 126 poz.1381
- [110] Ustawa z dn. 9 kwietnia 2015 Ustawa o zmianie ustawy Prawo farmaceutyczne oraz niektórych innych ustaw Dz.U. 2015 poz.788
- [111] Ustawa z dnia 1 lipca 2005 r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów Opracowano na podstawie: Dz. U. z 2005 r. Nr 169, poz. 1411, z 2009 r. Nr 141, poz. 1149
- [112] Ustawa z dnia 17 lipca 2009 r o zmianie ustawy o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów oraz o zmianie ustawy - Przepisy wprowadzające Kodeks karny. Dz.U. 2009 nr 141 poz. 1149
- [113] Ustawa z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej Dz.U. 2014 poz. 1384
- [114] Ustawa z dnia 28 kwietnia 2011 r o zmianie ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentystry Dz.U.2011.113.658
- [115] Ustawa z dnia. 5 grudnia 1996 O zawodach lekarza i lekarza dentystry Dz. U. z 2008 r. Nr 136, poz. 857, z późn. zm.
- [116] Uzarska M, Porowińska D, Bajek A, Drewa T.: Komórki macierzyste naskórka - biologia i potencjalne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. *Postępy Biochem.*, 2013; 59:219-226
- [117] Vasileva E.A., Shuvalov O.U., Garabadiu A.V., Melino G., Barlev N.A.: Genome-editing tools for stem cell biology. *Cell Death Dis.*, 2015; 1831:1-8
- [118] Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M.: Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.*, 2010; 25:1035-1041
- [119] Wakitani S., Okabe T., Horibe S., Mitsuoka T., Saito M., Koyama T., Nawata M., Tensho K., Kato H., Uematsu K., Kuroda R., Kurosaka M., Yoshiya S., Hattori K., Ohgushi H.: Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med.*, 2011; 5:146-150
- [120] Wang M., Yang Y., Yang D., Luo F., Liang W., Guo S., Xu J.: The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology*, 2009; 126:220-232
- [121] Wang X., Chen X., Zhang H., Qin W., Xue Y., Zeng F.: Shared gene regulation during human somatic cell reprogramming. *J Genet Genomics.*, 2012; 20:613-623
- [122] Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N.: Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.*, 2012; 10:440-454
- [123] Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B.: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.*, 2000; 15:364-70
- [124] Yamanaka Interview on Clinical Use of Pluripotent Stem Cells [https://www.ipsell.com/2014/10/yamanaka-interview-on-clinical-use-of-pluripotent-stem-cells/\(08.12.2015\)](https://www.ipsell.com/2014/10/yamanaka-interview-on-clinical-use-of-pluripotent-stem-cells/(08.12.2015))
- [125] Yin H., Price F., Rudnicki M.A.: Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev.*, 2013; 93:23-67
- [126] Zhang Z., Wu W.S.: Sodium butyrate promotes generation of human induced pluripotent stem cells through induction of the miR302/367 cluster. *Stem Cells Dev.*, 2013; 15:2268-2277
- [127] Zhao W., Ji X., Zhang F., Li L., Ma L.: Embryonic stem cell markers. *Molecules.*, 2012; 25:6196-6236
- [128] Ziemka-Nałęcz M., Zalewska T.: Endogenous neurogenesis induced by ischemic brain injury or neurodegenerative diseases in adults. *Acta Neurobiol Exp.*, 2012; 72:309-324