

ANNA SARNOWSKA¹, BOGUSŁAW MACHALIŃSKI²,
KLAUDIA RADOSZKIEWICZ¹, LEONORA BUŻAŃSKA³

Fakty i kontrowersje związane z terapią komórkową w medycynie regeneracyjnej

Wstęp

Szybki postęp, jaki nastąpił w ostatnich latach w badaniach nad komórkami macierzystymi, dał solidne podstawy do ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej. W ciągu ostatnich kilkunastu lat zainicjowano setki badań klinicznych w szerokim panelu wskazań. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że tylko w nielicznych zastosowaniach tj. okulistyka, dermatologia, ortopedia czy hematologia możemy mówić o udowodnionej terapii, w której przeszczepione komórki wbudowują się w regenerowaną tkankę i podejmują właściwe dla niej funkcje. Stosowanie terapii komórkowej we wszystkich innych gałęziach medycyny jest jednak nadal terapią eksperymentalną, a decyzja o jej zastosowaniu w klinice podyktowana jest na ogół brakiem innych, bardziej skutecznych możliwości terapeutycznych. Powodzenie terapii komórkowej zależy jednak od wielu czynników szeroko poruszanych w literaturze, a rzadko branych pod uwagę przez potencjalne „wytwórnice” komórkowe, tj. odpowiedni dobór źródła komórek adekwatny do patologii leżącej u podłoża choroby, funkcjonalna optymalizacja komórek podczas hodowli (np. dobór warunków środowiska, dobór pożywek hodowlanych), dobór najwłaściwszej drogi podania, jak również sumienne i klarowne przedstawienie pacjentowi możliwych do osiągnięcia efektów terapeutycznych. Obecnie na rynku zdrowia pojawiły się oferty odpłatnych terapii eksperymentalnych, przeprowadzanych przez kliniki, które nie posiadają ekspertyzy i doświadczenia badawczego w prowadzeniu takiego leczenia. Jest to niezgodne z zasadami „medycyny opartej na faktach” oraz polskim prawem. Autorzy artykułu są przeciwni komercjalizacji leczenia, które jest w fazie eksperymentalnej.

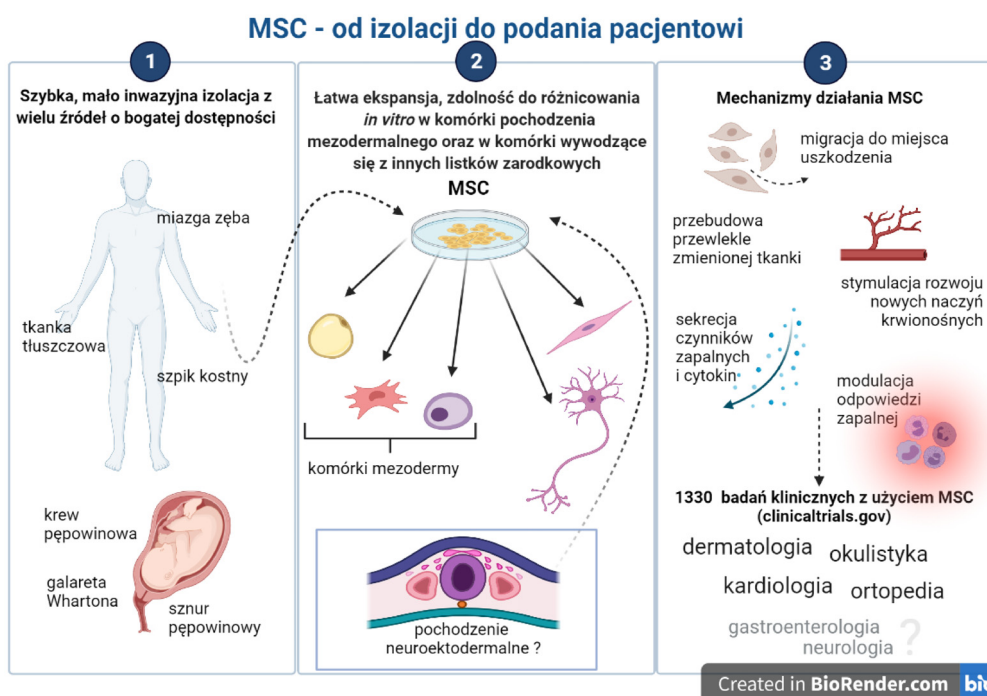
¹ Dr hab. Anna Sarnowska, prof. IMDiK; mgr Klaudia Radoszkiewicz – Platforma Badań Translacyjnych w Zakresie Medycyny Regeneracyjnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

² Prof. dr hab. Bogusław Machaliński, Katedra Fizjopatologii i Zakład Patologii Ogólnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny

³ Prof. dr hab. Leonora Bużańska, (buzanska@imdik.pan.pl), Zakład Bioinżynierii Komórek Macierzystych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Konieczne jest jednak prowadzenie wielośrodkowych badań klinicznych z wykorzystaniem dobrze udokumentowanych wieloletnich badań podstawowych i przedklinicznych.

Mimo wielu kontrowersji i dyskusji obecnie prowadzonych, według dostępnych danych statystycznych i baz klinicznych, większość zarejestrowanych badań klinicznych dotyczących terapii komórkowych była przeprowadzona z zastosowaniem tzw. komórek mezenchymalnych (populacji komórek, w której skład wchodzi głównie mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne (ang. *mezenchymal stem/stromal cells*), MSC, zdefiniowane wg Horwitz i wsp., 2005, otrzymanych z ludzkich tkanek somatycznych lub płodu (łożysko razem z błonami płodowymi i pępowiną). Według bazy „Clinicaltrials” czas obserwacji pacjentów w pojedynczych badaniach wynosi obecnie kilkanaście lat. Również w Unii Europejskiej, wg EU Clinical Trials Register, zarejestrowane są obecnie 173 badania kliniczne z zastosowaniem komórek mezenchymalnych. Działanie rekonstrukcyjne MSC (wbudowanie w strukturę tkanki i podjęcie funkcji komórek tkanki) zostało potwierdzone dla tkanek pochodzenia mezodermalnego, w innych przypadkach potwierdzony mechanizm działania MSC głównie dotyczy parakrynnego wspomaganie regeneracji. Charakterystykę i zastosowanie MSC w medycynie regeneracyjnej przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mezenchymal Stem Cells*, MSC):
1 – źródła otrzymywania, 2 – właściwości w hodowli *in vitro*, 3 – mechanizmy działania parakrynnego (adiuwacyjne) lub rekonstrukcyjne

Należy podkreślić, że komórki macierzyste znacząco różnią się właściwościami terapeutycznymi w zależności od ich pochodzenia, sposobu izolacji i hodowli. MSC są bardzo heterogenną populacją komórek i nawet drobne zmiany w procedurze izolacji lub hodowli wpływają na ich końcowe właściwości terapeutyczne. Stąd też niezwykle istotne wydaje się prowadzenie badań przedklinicznych mających na celu ustalenie szczegółowych protokołów przygotowania komórek do zastosowania w konkretnej jednostce chorobowej.

W medycynie regeneracyjnej stosowane są również komórki macierzyste specyficzne dla określonych tkanek, np. multipotencjalne (hematopoetyczne lub neuralne komórki macierzyste), czy też unipotencjalne np. komórki macierzyste naskórka. Podejmowane są także próby podawania heterogennych populacji komórkowych zawierających w swoim składzie swoisty „koktail” somatycznych komórek macierzystych, progenitorowych i prekursorowych, wykazujących wspólne cechy fenotypowe, np. CD34+, AC133+, Lin- itp. (de Wynter i wsp., 1998).

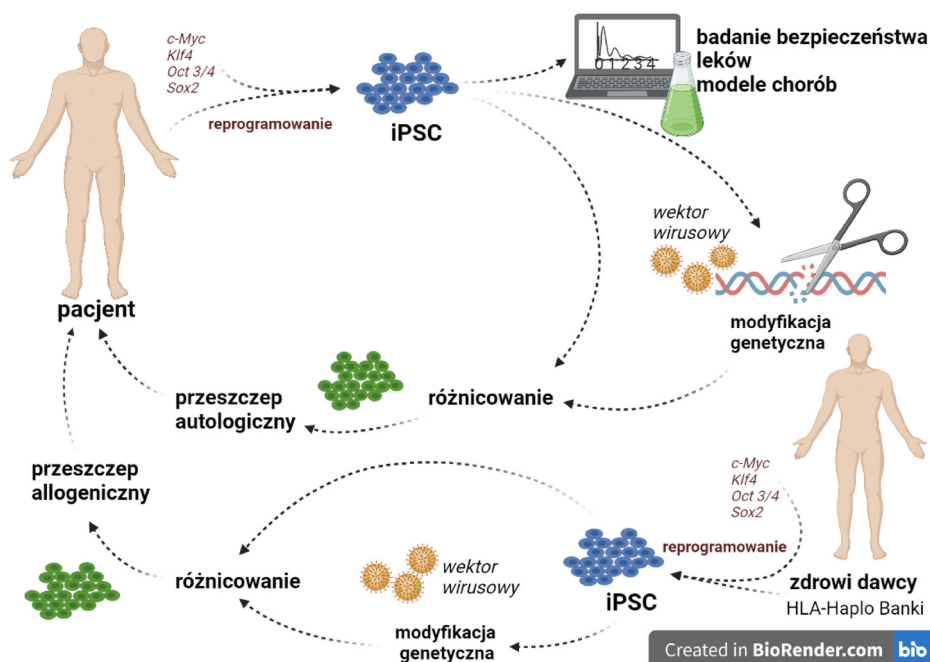
Coraz częściej wraz z terapią komórkową stosuje się terapię genową. Dotyczy to głównie chorób monogenetycznych, w których komórki pobrane od pacjenta poddawane są korekcie fenotypowej metodami edycji genomu, a następnie po namnożeniu *in vitro* w warunkach GMP (ang. *Good Manufacturing Practice*) są przeszczepiane autologicznie. Stosując taką metodę, uzyskano spektakularny efekt terapeutyczny w leczeniu pęcherzowego oddzielania się naskórka (*epidermidis bullosa*) przy zastosowaniu genetycznie modyfikowanych komórek naskórka pacjenta (Hirsch i wsp. 2017).

Do innowacyjnych terapii komórkowych, ale nadal bardzo rzadko stosowanych w badaniach klinicznych, należy zaliczyć terapie z zastosowaniem komórek pluripotencjalnych, takich jak ludzkie zarodkowe komórki pluripotencjalne (ang. *human Embryonic Stem Cells*, hESC) oraz ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *human induced Pluripotent Stem Cells*, hiPSC), po ich wstępnym różnicowaniu

Pluripotencjalne komórki macierzyste charakteryzuje potencjał do nieograniczonego wzrostu oraz różnicowania się w komórki typowe dla tkanek wywodzących się z trzech listków zarodkowych: ektodermy, mezodermy i endodermy. Komórki hiPSC otrzymuje się przez reprogramowanie i odróżnicowanie komórek somatycznych organizmu (Takahashi i wsp. 2006), dlatego w przeciwieństwie do hESC użycie hiPSC nie jest kontrowersyjne etycznie i może być spersonalizowane zarówno w przypadku badań przedklinicznych, jak i klinicznych. Takie zdolności do ekspansji i różnicowania komórek pluripotencjalnych oraz zastosowania w medycynie „precyzyjnej” w przypadku hiPSC decydują o ich potencjale terapeutycznym. Rycina 2 przedstawia możliwości zastosowania hiPSC zarówno w badaniach *in vitro*, jak i translacji do kliniki.

Wyzwaniem pozostają rygorystyczne warunki bezpieczeństwa przeszczepianego materiału. Komórki hESC (mimo kontrowersji etycznych) znalazły zastosowanie w nie-

licznych próbach klinicznych (sześciu obecnie trwających) w zakresie medycyny regeneracyjnej: choroby Parkinsona (ang. *Parkinson Disease*, PD); starczego zwyrodnienia plamki żółtej (ang. *Age-related Macular Degeneration*, AMD); zwyrodnienia barwnikowego siatkówki (ang. *Retinosis Pigmentosa*, iRERP); stwardnienia zanikowego bocznego – (ang. *Amylootrophic Lateral Sclerosis*, ALS).



Ryc. 2. Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) – zastosowanie w badaniach *in vitro* oraz translacja do kliniki. W wyniku reprogramowania czynnikami transkrypcyjnymi komórek somatycznych pacjenta lub zdrowego dawcy otrzymujemy komórki pluripotencjalne iPSC. Komórki iPSC w badaniach *in vitro* można stosować do modelowania chorób oraz analiz toksykologicznych i farmakologicznych. Terapia komórkowa może być prowadzona po korekcie fenotypu (głównie w chorobach monogenetycznych w wyniku modyfikacji genomu) lub bez takiej korekty po wcześniejszym precyzyjnym różnicowaniu do określonego typu komórek. Dotyczy to przeszczepów autologicznych (tzw. medycyna precyzyjna z zastosowaniem komórek pobranych od pacjenta), jak i allogenicznych, po uprzednim dopasowaniu antygenów zgodności tkankowej dawcy i biorcy, stosując komórki iPSC zdeponowane w tzw. HLA-Haplo Bankach

Komórki hiPSCs po raz pierwszy zastosowano klinicznie do regeneracji siatkówki, w przypadku AMD, już po sześciu latach od ich odkrycia (Mandai et al., 2017). Obecnie znanych jest 12 zarejestrowanych i czynnych prób klinicznych w zakresie medycyny regeneracyjnej z zastosowaniem iPSC, głównie zarejestrowanych w Japonii i Europie. Terapie komórkowe schorzeń, w których nastąpiła translacja do kliniki iPSC to (poza

wymienionymi powyżej dla ESC: PD, AMD, RP i ALS) regeneracja rogówki, serca oraz chrząstki (Yamanaka, 2020). W tabeli 1 zamieszczono spis obecnie trwających prób klinicznych, w których znalazły zastosowanie komórki pluripotencjalne.

Tabela 1. Czynne próby kliniczne (rok 2021) w zakresie medycyny regeneracyjnej z zastosowaniem komórek pluripotencjalnych

Źródło komórek	Komórki ESC	Komórki iPSC
Choroba Parkinsona (PD)	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03119636	https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi
Starcze zwyrodnienie siatkówki (AMD)	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02286089 , https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02590692	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04339764 ,
Zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (iRERP)	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03944239	https://jrct.niph.go.jp/en-latest-detail/jRCTa050200027
Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03482050	
Schorzenia rogówki		https://jrct.niph.go.jp/en-latest-detail/jRCTa050190084
Schorzenia serca (kardiomiopatie)		https://jrct.niph.go.jp/en-latest-detail/jRCT2053190081 , https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04396899 https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03763136
Ubytki tkanki chrzęstnej		https://jrct.niph.go.jp/en-latest-detail/jRCTa050190104
Uszkodzenie rdzenia kręgowego		https://jrct.niph.go.jp/en-latest-detail/jRCTa031190228

W chorobach ogólnoustrojowych charakteryzujących się znaczącą komponentą zapalną należy stosowane są komórki o właściwościach przeciwzapalnych, immunomodulujących i regeneracyjnych (Duma i wsp., 2019). Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że takie właściwości ma np. świeżo wyizolowana heterogenna populacja komórek izolowanych z krwi pępowinowej lub komórek pochodzących z tkanki tłuszczowej. Wraz z czasem hodowli właściwości te maleją na korzyść zdolności komórek do różnicowania i wydzielania typowych dla danego typu komórek cytokin, chemokin i czynników wzrostowych (Dąbrowska i wsp., 2018).

W przypadku wrodzonych zaburzeń jednogenowych lub wielogenowych leczenie prowadzone jest zwykle z zastosowaniem komórek allogenicznych, aby uniknąć genetycznego piętna choroby. Jednak nawet w chorobach o podłożu genetycznym pacjenci mogą pozytywnie reagować na autologiczną terapię komórkową MSC w mechanizmie tłumienia towarzyszących objawów zapalnych i immunologicznych (Gavina i wsp., 2006) i coraz więcej dowodów wskazuje na przeważający efekt parakryny, a nie repopulacyjny przeszczepionych komórek mezenchymalnych. Jednocześnie w chorobach o po-

dłożu autoimmunologicznym należy zachować szczególną ostrożność, gdyż w niektórych jednostkach (np. toczeń rumieniowaty układowy) podanie MSC w układzie autologicznym może pogorszyć przebieg schorzenia (Cheng i wsp., 2019)

Pochodzenie i heterogeniczność MSC

MSC z definicji są komórkami multipotencjalnymi, ukierunkowanymi w swoim różnicowaniu w stronę tkanek wywodzących się z mezodermy (Sensebé i wsp., 2010). Ten temat jest obecnie wielce dyskusyjny i budzi liczne kontrowersje. Od lat bowiem badacze z różnych ośrodków naukowych opisują różnicowanie *in vitro* MSC w kierunku tkanek wywodzących się z ektodermy lub endodermy, opierające się nie tylko na ekspresji typowych białek, ale i testach funkcjonalnych. Zdolność MSC do różnicowania np. w kierunku neuralnym jest wyraźniej widoczna w komórkach pochodzących z tkanek wczesnych rozwojowo (tzw. tkanek popłodu), jednakże jest znacząco słabiej wyrażona w porównaniu z komórkami zarodkowymi lub iPSC. Zdolność do różnicowania się MSC poza listek mezodermalny jest najczęściej interpretowana przez przeciwników tej teorii jako błąd techniki badawczej lub fenomen związany z hodowlą w sztucznych warunkach. Zjawisko to można jednak tłumaczyć tzw. przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT), do jakiego dochodzi w trakcie rozwoju zarodkowego. Komórki macierzyste grzebienia nerwowego (ang. *Neural Crest Cells*, NCC), zwane czwartym listkiem zarodkowym, mają potencjał do różnicowania w komórki różnych tkanek, m.in. neuroendokrynne, melanocyty lub komórki chrząstki i kości. Po migracji z cewy nerwowej podczas rozwoju płodu rozprzestrzeniają się po całym organizmie (Takashima i wsp., 2007). W zarodku NCC są wykrywane na granicy płytki nerwowej i ektodermy nienerwowej po gastrulacji. Granice płytki nerwowej (fałdy nerwowe) zbiegają się w grzbietowej linii środkowej, tworząc cewę nerwową podczas neurulacji. Następnie NCC, które migrowały z cewy nerwowej, podlegają przejściu nabłonkowo-mezenchymalnemu (EMT) (Huang i wsp., 2004). Po EMT NCC opuszczają cewę nerwową grzbietową i migrują do innych tkanek zarodkowych. Analiza losów rozwojowych z użyciem myszy transgeniczných wykazała, że MSC częściowo pochodzą z NCC, tworząc bardzo nieliczną subpopulację MSC o cechach bardziej prymitywnych (preMSC) i zasiedlając różne nisze komórkowe w całym organizmie (Morikawa i wsp. 2009). Nadal poszukiwany jest marker, który umożliwiłby odróżnienie preMSC od całej heterogennej populacji komórek stromalnych. Jednym z takich kandydatów jest receptor alfa czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGFR α) (CD140a) (Takashima i wsp., 2007). Morikawa i in. opisali preMSC jako subpopulację MSC, charakteryzujących się kombinacją markerów powierzchniowych PDGFR α +Sca-1+CD45⁻Ter119⁻ (P α S) (antygen komórek macierzystych-1Sca-1; białko aktywacji limfocytów Ly-6). Dezawa i wsp. (2021) zaproponowali wyodrębnienie tej subpopulacji przez kombinację dwóch innych markerów: *stage-specific embryonic*

antigen 3 (SSEA-3) i typowego dla komórek mezenchymalnych: CD105, nazywając tak wyizolowane komórki „*muse cells*” (*multi-lineage differentiating stress enduring cells*). Dowodem na neuroektodermalne pochodzenie subpopulacji MSC może być ekspresja nestyny przez te komórki i zdolność do tworzenia sfer. Populacja pozytywna pod względem występowania nestyny (NES+) wyizolowana ze szpiku kostnego szczura zawierała zarówno komórki, w których ekspresji podlegały zarówno markery typowe dla MSC, jak i Neural Crest Stem Cells (Morikawa i wsp., 2016; Niibe i wsp., 2016; Coste i wsp., 2017). Według innych autorów, proliferujące, pochodzące z mezodermy, negatywne pod względem występowania nestyny (NES-) MSC uczestniczą w szkieletogenezie płodu i tracą aktywność MSC wkrótce po urodzeniu. W przeciwieństwie do tego, nieaktywne komórki, w których ekspresji podlega nestyna, pochodzące z grzebienia nerwowego, zachowują aktywność MSC, ale nie wytwarzają chondrocytów płodowych, zamiast tego różnicują się w MSC i pomagają w ustanowieniu niszy HSC przez wydzielanie Cxcl12 (Isern i wsp., 2014).

W dyskusji dotyczącej zdolności różnicowania MSC w innym kierunku niż mezodermalny często pada stwierdzenie, że uzyskane dotychczas dowody przeprowadzone były w środowisku *in vitro*, czyli znacznie odbiegającym od naturalnego środowiska komórek. W roku 2017 Uchida i wsp. przeprowadzili eksperymenty *in vivo* przeszczepiając *muse cells* wyizolowane ze szpiku kostnego do uszkodzonego ogniskowo mózgu myszy z niedoborem odporności. Przy pomocy wyznakowania dekstranem śledzono tworzenie się połączeń między neuronami gospodarza a przeszczepionymi komórkami w uszkodzonej korze ruchowej i rogu przednim rdzenia. Wykazano, że po transplantacji w podostrej fazie uszkodzenia przeszczepione komórki różnicowały się w komórki nerwowe i wbudowywały w uszkodzone drogi piramidowe.

Skąd zatem tak różne obserwacje i wątpliwości dotyczące zdolności do różnicowania MSC? Drobne i pozornie nieistotne zmiany w technice izolacji i warunkach hodowli powodują, że z niezmiernie heterogenicznej populacji MSC otrzymuje się inną, znacząco różną subpopulację komórek. Wykazano, że wybór metody izolacji wpływa na jakość MSC. Często stosowana ze względu na niższe koszty i krótszy czas enzymatyczna metoda izolacji komórek WJ-MSK skutkuje uzyskaniem subpopulacji MSC szybciej starzejącej się, o mniejszym potencjale proliferacyjnym i klonogennym niż subpopulacja wyizolowana metodą mechaniczną (Lech i wsp., 2016). Ponadto świeżo wyizolowane MSC wykazują się innym potencjałem sekrecyjnym niż komórki pasażowane (Dąbrowska i wsp., 2018). MSC hodowane w warunkach 2D ekspresjonują nieco inne markery niż te same komórki hodowane w warunkach 3D (Kaminska i wsp., 2021). Nawet drobna zmiana pożywki z medium zawierającego 10% lizat płytkowy na 20% surowicę cielęcą (Czapla i wsp., 2019) lub zmiana warunków tlenowych hodowli powoduje wyselekcjonowanie MSC o innych właściwościach wydzielniczych (Tomecka i wsp., 2021).

Terapie komórkowe w ortopedii

Ortopedia jest jedną z gałęzi medycyny, w których terapia komórkowa została zastosowana dość wcześnie i niestety równie szybko skomercjalizowana. Z tego powodu pojawiają się duże wątpliwości co do rzetelności prowadzonych badań i skuteczności interwencji medycznych z nią związanych. W odróżnieniu do poniżej opisywanych terapii, w neurologii i dermatologii, podane w miejsce objęte procesem chorobowym mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne mają za zadanie przede wszystkim odtworzyć uszkodzoną tkankę, a dodatkowo zadziałać immunomodulatoryjnie i proangiogenicznie (Oryan i wsp., 2017).

W trakcie procesu regeneracji kości dochodzi do kolejno po sobie występujących etapów: stanu zapalnego, angiogenezy, chondrogenozy, kalcyfikacji i przebudowy kostnej. W przebiegu procesu zapalnego wydzielane są cytokiny prozapalne takie jak np. Il-1 β , Il-6, TNF α , skutkujące mobilizacją endogennych MSC oraz progenitorów komórek kostnych z ich nisz. W wyniku resorpcji uszkodzonej kości dochodzi do uwolnienia czynników wzrostowych, które aktywują proliferację, różnicowanie i odkładanie matrix zewnątrzkomórkowego przez endogenne MSC oraz progenitory komórek kostnych. MSC przez wydzielanie czynników przeciwzapalnych oraz wzrostowych ograniczają fazę zapalną (Lin i wsp., 2017). Początkowo MSC różnicują się do chondrocytów, które tworząc chrząstkę łączącą końce uszkodzonej tkanki, tworzą tkankę pierwotną (ang. *soft callus*). W wyniku powolnej angiogenezy i różnicowania do osteoblastów napływających MSC i progenitorów komórek kostnych następuje mineralizacja tkanki pierwotnej, czego efektem jest utworzenie tkanki twardej/wtórnej (ang. *hard callus*). W celu przyspieszenia fizjologicznych procesów naprawczych lub w sytuacji zaburzenia tych procesów podawane MSC mają służyć jako terapia wzmacniająca endogenne procesy naprawcze. Obecnie mezenchymalne komórki macierzyste stosowane są w badaniach klinicznych dotyczących leczenia m.in. trudno zrastających się złamań (ang. *Non Union Fracture*), stawów rzekomych, złamań w przebiegu osteoporozy, złamań żuchwy oraz przy rekonstrukcji twarzoczaszki lub choroby zwyrodnieniowej stawów (Rodriguez i wsp., 2021).

Przeprowadzona ostatnio metaanaliza dotycząca terapii komórkowej pod postacią iniekcji dostawowych MSC u pacjentów bez innej terapii wspomagających w chorobie zwyrodnieniowej stawów kolanowych wskazuje na jej skuteczność. Uwzględniono 19 zarejestrowanych badań klinicznych o sile dowodów 1 lub 2, w których przeprowadzono w sumie 440 interwencji do stawu kolanowego. Dostawowe wstrzyknięcia MSC bez żadnych terapii wspomagających zmniejszyły statystycznie zespół bólowy. Istotnie lepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu MSC izolowanych ze szpiku kostnego w porównaniu do MSC pozyskanych z tkanki tłuszczowej oraz w przypadku MSC hodowanych *in vitro* przed zabiegiem w porównaniu do komórek świeżo wyizolowanych (Tan i wsp., 2021).

W dyskopatii wielopoziomowej (chorobie zwyrodnieniowej kręgosłupa) uwzględniono 17 badań. Wszystkie były jednorodne pod względem wskazań do zabiegu: dysko-geny ból krzyża od co najmniej 3–6 miesięcy, niepowodzenie leczenia zachowawczego, objawy zwyrodnienia krążka w rezonansie magnetycznym. Łącznie do badania zostało włączonych 182 pacjentów. Wszyscy pacjenci odnotowali znaczną poprawę funkcjonalną oraz złagodzenie zespołu bólowego. Nie zgłoszono poważnych powikłań ani działań niepożądanych. Jednakże w badaniach radiologicznych nie wykazano po leczeniu odbudowy uszkodzonych krążków międzykręgowych (DI Martino i wsp., 2021).

Terapia komórkowa stosowana jest również w leczeniu schorzeń ścięgien. Przeprowadzając analizę czterech prospektywnych badań klinicznych wykazano, że leczenie MSC poprawiło wszystkie analizowane aspekty, w tym ból, ocenę czynnościową, parametry radiologiczne (obraz rezonansu magnetycznego lub ultrasonografia) oraz wyniki artroskopowe. W analizie metaregresji zaobserwowano istotną odpowiedź zależną od dawki komórek w łagodzeniu bólu (Cho i wsp. 2021). W przypadku podania komórek macierzystych w celu gojenia ścięgien nie zgłoszono działań niepożądanych. Pamiętaj należy jednak, że w przypadku komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego i ASC w szczególnych okolicznościach istnieje ryzyko powstania kości ektopowej i guza (van den Boom i wsp. 2020)

Autorzy artykułu chcą wyraźnie podkreślić, że zanim terapie oparte na komórkach macierzystych będą mogły być zalecane jako rutynowe leczenie kliniczne urazów i chorób ścięgien, potrzebne są dalsze badania przedkliniczne i translacyjne.

Nadal bez definitywnej odpowiedzi pozostają pytania takie, jak: (1) Które źródło komórek macierzystych ma największy potencjał terapeutyczny? (2) Czy w heterogenicznej populacji komórek MSC występują subpopulacje o szczególnym potencjale regeneracyjnym? (3) Czy czynniki biologiczne pochodzące z komórek macierzystych takie jak np. mikropęcherzyki mogą wywoływać efekt terapeutyczny porównywalny z obserwowanymi po podaniu komórek macierzystych?

Badania mające na celu odpowiedź na wyżej postawione i inne pytania dotyczące mechanizmu działania MSC i ich bezpieczeństwa stanowią krytyczny element ustalenia standardowych metod i protokołów (ang. *Standard Operating Procedures*, SOP) do przeprowadzania terapii regeneracyjnej z zastosowaniem komórek macierzystych.

Terapie komórkowe w hematologii

Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) definiowane są jako komórki multipotencjalne, zdolne do samoodnowy, posiadające zdolność długoterminowej rekonstrukcji zarówno linii mieloidalnej, jak i limfoidalnej szpiku kostnego. Komórki macierzyste rzadko wchodzą w podział komórkowy, w przeciwieństwie do komórek progenitorowych, które w warunkach *in vitro* tworzą ekspansywne kolonie (np. CFU-GM, CFU-

Meg, CFU-E, BFU-E), lecz nie są w stanie trwale odtworzyć pełnej hematopoezy. Nie opracowano dotychczas wiarygodnych testów *in vitro* identyfikujących w sposób prosty i pewny populację KKM. Morfologicznie, fenotypowo i funkcjonalnie wskazuje się, że są to małe komórki jednojądrzaste z ekspresją antygenów CD34 i CD133 na powierzchni, brakiem antygenów liniowo-specyficznych (Lin-), z dużą aktywnością dehydrogenazy aldehydowej oraz niegromadzące w cytoplazmie barwników fluorescencyjnych, takich jak Rhodamina123 czy Hoechst342. Zarówno u ludzi, jak też u wielu gatunków zwierząt wykazano, że komórki CD34+ wszczepiają się do szpiku kostnego i podejmują trwale czynność krwiotwórczą, co dowodzi, że w tej populacji komórkowej znajdują się rzeczywiste KKM. Podejmowane były badania ukierunkowane na identyfikację komórek pluripotencjalnych rezydujących w szpiku kostnym, zdolnych do odtwarzania/regeneracji komórek mięśniowych, osteoblastów, hepatocytów, komórek nerwowych i innych komórek tworzących mózg. Dotychczas jednak nie udało się z całą pewnością wykazać ich obecności czy też zjawiska tzw. plastyczności KKM, polegającej na ich transformacji w inne tkankowo-specyficzne komórki macierzyste.

Pierwsze zakończone sukcesem przeszczepienie komórek szpiku, identycznych w zakresie antygenów zgodności tkankowej (HLA), przeprowadzono w 1968 r. u pacjenta z niedoborami immunologicznymi. W 1970 r. zespół Thomasa wykonał z powodzeniem pierwszą allogeniczną transplantację u biorcy z zaawansowaną białaczką, a w następnym roku u chorych z anemią aplastyczną. Pierwsze efektywne przeszczepienie komórek szpiku od dawcy niespokrewnionego przeprowadził Hansen z zespołem w 1979 r. u pacjenta z białaczką. W Polsce pierwszego udanego przeszczepienia allogenicznego od dawcy rodzinnego dokonał zespół prof. Jędrzejczaka w roku 1984, a od dawcy niespokrewnionego zespół prof. Hołowieckiego w 1997 r.

Od czasu tych pionierskich dokonań, na całym świecie przeprowadzono ponad milion przeszczepień komórek krwiotwórczych pozyskiwanych z mobilizowanej krwi obwodowej, szpiku kostnego i krwi pępowinowej, po kondycjonowaniu mieloablacyjnym lub ze zredukowaną intensywnością (ang. *reduced intensity conditioning*, RIC), w różnorodnych wskazaniach hematologicznych i hematologicznych. Odnotowano postępy w leczeniu powikłań potransplantacyjnych, m.in. ostrych i przewlekłych zespołów „przeszczep przeciw gospodarzowi” (ang. *graft versus host disease*, GVHD), przez immunomodulację polegającą np. na selektywnej deplecji limfocytów T czy podawaniu cyklofosfamid w okresie potransplantacyjnym. Coraz większe są doświadczenia z użyciem komórek krwi pępowinowej, a wprowadzenie strategii polegającej na pozyskiwaniu komórek od dawców haploidentycznych w znaczący sposób wyeliminowało problem doboru dawca-biorca. Często podejmuje się również procedury transplantacji autologicznej w leczeniu pacjentów z chorobami z autoagresji, u których nie powiodła się standardowa terapia. Wprowadza się nowoczesne kombinacje leków w kondycjonowaniu

przed przeszczepieniem, cechujące się mniejszą toksycznością w porównaniu z wcześniejszymi schematami. Rozszerzanie wskazań do przeprowadzenia transplantacji komórek krwiotwórczych, jak też lepsza dostępność materiału komórkowego od potencjalnych dawców powoduje, że liczba prowadzonych procedur transplantacyjnych wciąż wzrasta. Ocenia się, że każdego roku ponad 60 tys. pacjentów na świecie ze schorzeniami hematologicznymi i nienowotworowymi leczonych jest za pomocą przeszczepienia KKM. Poprawa w zakresie opieki potransplantacyjnej, lepsza profilaktyka i leczenie infekcji przyczyniają się do zwiększenia populacji biorców przeszczepów krwiotwórczych z wieloletnim przeżyciem bez choroby. Ostatnie estymacje pokazują, że takich pacjentów jest w chwili obecnej w skali świata ponad pół miliona. Wszystko to sprawia, że terapię komórkową w hematologii należy traktować jako ustalone, sprawdzone i standardowe postępowanie terapeutyczne (Sault i wsp., 2018).

W ostatnim czasie podejmowane są także próby wykorzystania komórek krwiotwórczych w adiuwantowych terapiach ukierunkowanych na spowolnienie procesu progresji niektórych, nieuleczalnych dotychczas schorzeń neurodegeneracyjnych. Warto wspomnieć o próbach klinicznych z użyciem autologicznych komórek krwiotwórczych liniowo ujemnych (Lin-) szpiku kostnego podawanych sekwencyjnie do kanału rdzenia kręgowego u pacjentów z ALS. Ideą takiego postępowania jest wsparcie troficzne mikrośrodowiska neuronu ruchowego i poprzez ten mechanizm zmniejszenie dynamiki progresji choroby. Wykazano w nich, oprócz bezpieczeństwa takiej procedury, także przejściową poprawę, przede wszystkim w zakresie mowy i połykania, u części badanych pacjentów. Wskazuje się, że efekt kliniczny związany był z aktywnością parakrynną aplikowanych komórek (Sobuś i wsp. 2020).

Terapie komórkowe w okulistyce

Obecność komórek macierzystych w strukturach oka wykazano wiele lat temu, z chwilą gdy opublikowano pionierskie badania Davengera i Evensena w 1971 r., którzy jako pierwsi opisali rąbkowe komórki macierzyste (ang. *limbal epithelium stem cells*, LESC), rezydujące w palisadach Vogta w rąbku zlokalizowanym w obwodowej części rogówki. Następnie w 2005 r. rozpoznano obecność rąbkowych krypt, które stanowią nisze dla LESC. Sugeruje się, że również nabłonek spojówki może być miejscem zakotwiczenia komórek macierzystych, jednak precyzyjna lokalizacja wciąż nie jest do końca jasna. Podjęto też poszukiwania komórek macierzystych w innych strukturach oka. Nie jest jasne, czy część nerwowa siatkówki lub nabłonek barwnikowy siatkówki (ang. *Retinal Pigment Epithelium*, RPE) posiadają potencjał regeneracyjny, wskazuje się jednak, że komórki glejowe Mullera mogą wykazywać takie właściwości (Liu i wsp., 2019).

Wzrok jest najważniejszym i złożonym w funkcji zmysłem odbierającym bodźce pochodzące z zewnątrz. Większość odbieranych informacji dochodzi poprzez jakąś for-

mę światła. Ścieżka świetlna przechodzi przez przednie struktury oka, soczewkę i skupia się na siatkówce. Mechaniczne, optyczne, neurologiczne, chemiczne i elektryczne właściwości oka wymagają utrzymania fizjologicznej równowagi, by przekazywać jasny obraz otoczenia. Medycyna regeneracyjna w okulistyce ogniskuje się na odtworzeniu zdolności przenikania światła przez rogówkę, soczewkę oraz utrzymaniu prawidłowej architektury siatkówki. Niezależnie od naturalnej obecności somatycznych komórek macierzystych w strukturach oka wymagających regeneracji podejmuje się próby aplikacji heterogennej populacji komórek macierzystych w formie zawiesiny lub hodowanych *ex vivo*, w różnych lokalizacjach gałki ocznej, w nadziei ich proliferacji i zastąpienia uszkodzonej tkanki, do czego mogłyby predysponować warunki mikrośrodowiska z lokalnymi czynnikami troficznymi. Podkreśla się również rolę działania parakrynnego podawanych komórek. W ostatnich 10 latach przeprowadzono 56 badań klinicznych, z których 39 obejmowało rogówkę, a 17 siatkówkę oka (Samoila i wsp., 2021).

Obecnie metoda rekonstrukcji nabłonka rogówki wydaje się klinicznie zwalidowana. Zgromadzono bowiem wystarczająco danych klinicznych umożliwiających pewną formę standaryzacji procedur transplantacji komórek macierzystych. Na świecie zastosowanie znalazły hodowane rąbkowe nabłonkowe komórki macierzyste (ang. *cultivated limbal epithelial stem cells*, CLET), izolowane komórki rąbkowe (ang. *simple limbal epithelial stem cells*, SLET), a także przeszczepy komórek śluzówki jamy ustnej. Większość doniesień raportuje uzyskanie anatomicznego sukcesu u 60-80% pacjentów. Spektakularny sukces u 90% pacjentów odniosły autologiczne przeszczepy komórek rąbka rogówki w układzie trójwymiarowym szkieletu z biomateriałów biodegradowalnych. Badania te doprowadziły do powstania pierwszego na świecie produktu ATMP (*advanced therapy medicinal product*) na bazie komórek macierzystych o nazwie Holocar® (Pellegrini i wsp. 2016). Sukces kliniczny regeneracji rogówki definiowany jest jako uzyskanie trwałego, stabilnego nabłonka rogówkowego, przeziernego i nieunaczynionego.

Regeneracja siatkówki oka stanowi zdecydowanie większe wyzwanie, ponieważ siatkówka w porównaniu z rogówką jest znacznie bardziej skomplikowaną, wielowarstwową strukturą anatomiczną, która jest częścią ośrodkowego układu nerwowego OUN. Dlatego mniej pacjentów poddanych jest badaniom ukierunkowanym na rekonstrukcję siatkówki oka, z mniej spektakularnym sukcesem anatomicznym i klinicznym. Aplikacja do-
szklistkowa, podsiatkówkowa czy nadnaczyniówkowa komórek macierzystych napotyka bowiem na specyficzne wyzwania (Samoila i wsp., 2021).

Rekonstrukcję siatkówki podjęto jako cel w 17 badaniach klinicznych prowadzonych w ostatnich 10 latach. Wśród wskazań do takich działań wyróżniono zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (ang. *age-related macular degeneration*, AMD), dystrofię Stargarda, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (*retinitis pigmentosa*), choroby naczyniowe, zanik nerwu wzrokowego, neuropatię Lebera. Różne typy komórek macierzystych (me-

zenchymalne, zarodkowe, iPSC) podawane doszkliskowo, do przestrzeni podsiatkówkowej (za pomocą witrektomii tylnej) lub przestrzeni nadnaczyniówkowej (z zewnętrznego podejścia do oka). Wyniki kliniczne i anatomiczne oceniane były za pomocą OCT (ang. *optical coherent tomography*) lub wieloogniskowego ERG (mERG). Jako sukces definiowano obecność komórek w badaniu OCT z towarzyszącą poprawą elektrofizjologiczną i kliniczną (poprawa pola widzenia i ostrości wzroku). Jednak wyniki tych badań nie są do końca satysfakcjonujące i znacząco się różnią, od pogorszenia widzenia do jego poprawy. Istotną kwestią zatem jest bezpieczeństwo samego zabiegu podania komórek. Opisane powikłania terapii komórkowej obejmują wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego, powstanie błony nasiatkówkowej lub trakcyjne odwarstwienie siatkówki. Przyczyną powstania powikłań mogą być uszkodzenie siatkówki, miejscowa reakcja zapalna lub niedokrwienna siatkówki. Szczególnie duże ryzyko wiąże się z podawaniem allogenicznych komórek mezenchymalnych. Są to komórki o silnych właściwościach adherentnych i proliferacyjnych, a w sytuacji ograniczonego stresu w środowisku wewnątrzgałkowym mogą przejść transformację do komórek miofibroblastów, wywołując witreoretinopatię proliferacyjną. Po podsiatkówkowym podaniu tych komórek zaobserwowano obecność neowaskularyzacji potwierdzonej badaniami optycznej koherentnej tomografii, angiografii fluoresceinowej i indocyjaninowej (Machalińska A., 2020).

W ostatnim czasie podjęto badania z zastosowaniem autologicznych, szpikowych komórek Lin-, które podawano doszkliskowo pacjentom z *retinitis pigmentosa*. Wykazano w nich poprawę obiektywnych parametrów elektrofizjologicznych i morfologicznych u części chorych (Wiącek i wsp., 2021).

Warto podkreślić fakt, że wiele badań klinicznych, które są w trakcie realizacji, obejmuje różne drogi aplikacji komórek: doszkliskową, podsiatkówkową i nadnaczyniówkową. Zastąpienie nabłonka barwnikowego siatkówki, odbudowa fotoreceptorów lub ich wymiana wymagają nowych technik, które są w stadium opracowywania. Jedną z innowacyjnych technik już wprowadzanych w badaniach klinicznych jest otrzymywanie *in vitro* nabłonka barwnikowego siatkówki (RE) z zastosowaniem komórek pluripotencjalnych i szkieletów biomateriałowych. Pierwsza na świecie próba kliniczna z zastosowaniem ludzkich iPSC dotyczyła przeszczepu autologicznego RE u pacjenta z AMD i zakończyła się sukcesem pomimo wątpliwości związanych z obecnością pojedynczych niezróżnicowanych komórek w przeszczepianym materiale (Mandai i wsp., 2017). Obecnie prowadzone są próby kliniczne dotyczące przeszczepów allogenicznych z zastosowaniem linii komórek ESC oraz HLA-Haplo Banków Komórek iPSC. Obecnie w obowiązujących standardach bezwzględne bezpieczeństwa przeszczepianego materiału komórkowego jest on weryfikowany pod względem tumorogenności, immunogenności oraz heterogenności (Yamanaka, 2021).

Terapie komórkowe w dermatologii i gastroenterologii

Bardzo prosty sposób podania komórek macierzystych, a co za tym idzie niewielkie ryzyko powikłań, dotyczy dermatologii.

Populacją pacjentów, która jako pierwsza została poddana terapii komórkowej, były osoby z tzw. trudno gojącymi się ranami np. po radioterapii lub z wieloletnią cukrzycą. W tej grupie chorych występuje opóźnione gojenie, często z tworzeniem rozległych blizn lub jego brak. W takich przypadkach mezenchymalne komórki macierzyste okazały się bardzo obiecującą terapią. Udowodniono, że migracja, angiogeneza, epitelializacja i tworzenie ziarniny są pobudzane przez MSC, prowadząc jednocześnie do zmniejszenia się blizn (Hu i wsp., 2018). Zarówno w przypadku ran ostrych, jak i przewlekłych, MSC mogą być podawane bezpośrednio na ranę przez jej ostrzykiwanie, a nawet spryskiwanie (Falanga i wsp., 2007). W mechanizmie działania parakrynnego komórek dochodzi do wzmożonej reepitelializacji i angiogenezy.

Podobny mechanizm terapeutyczny jest wykorzystywany u pacjentów z rozległymi poparzeniami. W tym jednak przypadku coraz częściej dochodzi do połączenia terapii komórkowej i inżynierii tkankowej. W ostatnich latach powstały tzw. substytuty skóry złożone z komórek allogenicznych lub autologicznych, uzyskanych w wyniku ekspansji progenitorów naskórka *in vitro*. Nieodłączną trudnością w pracy z kilkoma typami komórek jest ich prawidłowa organizacja przestrzenna w celu odtworzenia złożonej struktury skóry i zapewnienia funkcjonalnej integracji przeszczepu. Obiecujące wyniki uzyskano przy użyciu trójwymiarowych szkieletów, do których używa się tzw. biotuszu do tworzenia układu naczyniowego 3D. Tak otrzymane substytuty skóry mogą składać się z kilku warstw, odwzorowując naturalną budowę skóry. Sztuczne substytuty skóry można podzielić na naskórkowe, skórne i skórno-naskórkowe (Horch i wsp., 2005).

Naskórek (epiderma), czyli nabłonek pokrywający zewnętrzne powłoki ciała, jest tkanką pozbawioną unaczynienia. Podczas gojenia rany główną rolą nabłonka jest pokrycie uszkodzonego obszaru, chroniąc ranę przed odwodnieniem i infekcjami. Współczesne przeszczepy skóry naskórkowej mają zazwyczaj postać cienkiej błony, która wspomaga przyleganie i proliferację keratynocytów. Z tkanki pacjenta izoluje się autologiczne keratynocyty, które następnie namnaża się *in vitro* na powierzchni błony na bazie biomateriałów naturalnych np. kolagenu-GAA (Liu i wsp., 2008) lub glicerolowanej ludzkiej błony owodniowej (Klama-Baryła i wsp., 2020). Również do regeneracji skóry właściwej i rekonstrukcji blizn w ranach głębokich stosowana jest matryca na bazie kolagenu (Integra), zasiedlana autologicznymi fibroblastami lub komórkami stromalnymi tkanki tłuszczowej (ADSC) (Piejko i wsp., 2020). Niestety wytworzenie autologicznego naskórka lub skóry właściwej jest procesem długotrwałym (trwa zwykle 2–3 tygodnie). Zastosowanie naturalnych biopolimerów jako błon do hodowli komórek, takich jak fibryna, chitozan lub kwas hialuronowy (HA), nieznacznie skraca czasie potrze-

bny do produkcji komórek do 1–2 tyg. Jest to nadal okres za długi. W związku z tym rozpoczęto poszukiwanie alternatywnych metod, tworząc tzw. banki allogenicznych keratynocytów.

Substytuty skórne są często wykonane z matrycy opartej na biomateriałach bez zasiedlających je komórek, działając jako szkielet dla migrujących fibroblastów i komórek śródbłonna. Skórno-naskórkowe substytuty skóry składają się z keratynocytów obecnych na powierzchni, sąsiadujących z fibroblastami, zasiedlającymi dwuwarstwowe biomateriały. Takim przykładem jest Grafix™. To substytut ludzkiej skóry wytwarzany z błon łożyskowych człowieka, składający się z macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) oraz fibroblastów i komórek nabłonka. W Grafix™ MSC wykorzystywane są w związku z ich działaniem parakrynnym, immunomodulującym i proangiogennym, a więc pełnią funkcję adiuwantową. MSC przyspieszają odkładanie kolagenu, neowaskularyzację i infiltrację komórek, jednocześnie wpływają na zmniejszenie stanu zapalnego zależnego od TNF- α , wyzwalając produkcję TGF- β 1 oraz powodując wzrost liczby makrofagów M2, co prowadzi do powstania miofibroblastów (Nuschke i wsp., 2014).

Obecnie prowadzonych jest 78 badań klinicznych z zastosowaniem MSC w chorobach skóry. W 47 (29 w USA i Europie) sponsorem jest ośrodek publiczny. W EU „Clinical Trials Register” zarejestrowanych jest obecnie 15 badań klinicznych w leczeniu ran, 4 w leczeniu oparzeń i 7 w pęcherzowym oddzieleniu się naskórka.

Pochodną wyników uzyskanych w leczeniu chorób skóry są pozytywne wyniki w chorobach nieswoistych jelit. W przebiegu tych chorób często dochodzi do tworzenia przetok, które prowadzą do opornych na antybiotyki zakażeń ogólnoustrojowych. W tym wskazaniu MSC podawane są najczęściej punktowo, w postaci iniekcji wokół przetoki, z myślą o mechanizmie działania opisywanym wcześniej, przy procesie gojenia ran. Według najnowszej metaanalizy, do której włączono dwadzieścia dziewięć artykułów przedstawiających wyniki z terapii 1252 pacjentów, wykazano, że grupa poddana terapii komórkowej miała wyższy wskaźnik gojenia przetoki w porównaniu z grupą placebo u pacjentów z przetoką Leśniowskiego-Crohna (61,75% vs 40,46%, OR 2,21, 95% CI 1,19 do 4,11, $P < 0,05$). Efekt był dawko-zależny. Wskaźniki gojenia pacjentów z przetokami okołodbytniczymi i przezzwieraczowymi (77,95%, 76,41%) były wyższe niż u pacjentów z przetokami odbytniczo-pochwowymi. Ponadto częstość występowania zdarzeń niepożądanych związanych z leczeniem pacjentów komórkami macierzystymi była znacznie niższa niż w grupie placebo (RR 0,58, 95% CI 0,30 do 1,14) (Cao, i wsp. 2021). Dotychczasowe wyniki były na tyle sugestywne, że zarejestrowano preparat Cuspitem® zawierający komórki MSC allogeniczne izolowane z krwi pępowinowej w chorobie Leśniowskiego-Crohna, a w 2009 EMA zaopiniowała pozytywnie preparat allogenicznych MSC z tk. tłuszczowej Darvadstrocel® w leczeniu przetok okołodbytniczych.

Terapie eksperymentalne komórkowe w neurologii

Choroby neurodegeneracyjne układu nerwowego wciąż pozostają wyzwaniem dla medycyny regeneracyjnej z powodu braku satysfakcjonującego leczenia farmakologicznego. Najbardziej optymalne do zastosowania w celu zastąpienia uszkodzonych komórek wydają się być ludzkie neuralne komórki macierzyste, izolowane zwykle z płodów po spontanicznych poronieniach (Mazzini i wsp. 2019). Posiadają one zdolność do różnicowania w dojrzałe i funkcjonalne neurony i komórki glejowe, a ich los jest zdeterminowany rozwojowo i nie stwarza ryzyka tworzenia nowotworów. Jednakże ich wykorzystanie jest ograniczone wieloma czynnikami. Źródło tych komórek jest kontrowersyjne etycznie, a sama izolacja i namnożenie odpowiedniej ilości do przeszczepu bardzo problematyczne. Komórki pluripotencjalne: hESC i hiPSC również mogą pełnić funkcję rekonstrukcyjną po zróżnicowaniu w dojrzałe komórki OUN, niemniej zarówno wątpliwości etyczne (w przypadku hESC), jak i bezpieczeństwo terapeutyczne nie są do końca wyjaśnione. Populacją komórek obecnie najczęściej wykorzystywanych w terapii klinicznej OUN są mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne (MSC) (Morata-Tarifa i wsp. 2021), choć w przypadku MSC brak dowodów na ich działanie rekonstrukcyjne.

MSC stosowane są u pacjentów cierpiących na nieuleczalną chorobę, stwardnienie zanikowe boczne (SLA). Obecnie zarejestrowanych w bazie clinicaltrials.gov jest 27 badań (8 w USA, 3 w Europie), w tym 17 prowadzonych przez instytucje państwowe. Główny wniosek z większości badań klinicznych dotyczy bezpieczeństwa terapii. W badaniu Sykovej i wsp., (2017) w którym BM-MSCs przeszczepiono dokanałowo, korzystny wynik terapii był widoczny u części pacjentów, polegał na spowolnieniu progresji choroby i ograniczał się do krótkiego czasu po transplantacji. Przyczyną takiego wyniku może być krótki czas przeżycia komórek po wszczepieniu lub stan zróżnicowania przeszczepionych komórek MSC. Zgodnie z coraz liczniejszymi publikacjami kluczowe znaczenie dla osiągnięcia lepszych wyników ma powtarzanie podawania MSC, najprawdopodobniej z uwagi na wygasający wraz z liczbą żywych komórek ich efekt parakryny. Podnoszony jest również problem związany z miejscem podania komórek. Według niektórych autorów, komórki powinny być podawane zarówno w miejsce toczącego się procesu chorobowego (do kanału kręgowego), jak również w obszar efektorów, czyli w tym wypadku zanikających mięśni. BM-MSCs przeszczepione domięśniowo i dooponowo przyczyniło się do pewnej regresji choroby u połowy pacjentów w okresie kolejnych 6 miesięcy. Warto podkreślić, że w 2020 roku opublikowano wyniki badania Fazy 3 badania NurOwn® w SLA. NurOwn był pierwszym randomizowanym, kontrolowanym, prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby z placebo badaniem opartym na komórkach macierzystych w SLA. Przeprowadzono je w sześciu ośrodkach klinicznych: University of California Irvine, Centrum Medyczne Cedars-Sinai, California Pacific Medical Center Massachusetts General Hospital University of Massachusetts Medical School

i Mayo Clinic. (Berry JD 2019). Stwierdzono, że przeszczep pojedynczej dawki komórek MSC-NTF był bezpieczny i wykazywał wczesne obiecujące oznaki skuteczności. Rozpoczęto pracę nad wielodawkowym, randomizowanym badaniem klinicznym. Obecnie w Mayo Clinic trwa badanie kliniczne dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności leczenia dokanałowego mezenchymalnymi komórkami macierzystymi, izolowanymi z tkanki tłuszczowej u pacjentów z SLA, podawanymi co 3 miesiące, łącznie 4 iniekcje w ciągu 12 miesięcy.

Warto też wspomnieć o próbach klinicznych z użyciem autologicznych komórek liniowo ujemnych (Lin-) szpiku kostnego, podawanych sekwencyjnie dokanałowo (trzykrotnie w odstępach 6-tygodniowych). Wykazano w nich, oprócz bezpieczeństwa takiej adiuwantowej terapii, także przejściową poprawę, przede wszystkim w zakresie mowy i połykania, u części badanych pacjentów (Sobuś i wsp. 2018). Wskazuje się, że efekt kliniczny związany był z aktywnością parakrynną aplikowanych komórek (Sobuś i wsp. 2020).

Najczęściej rekrutowaną grupą pacjentów do badań klinicznych z zastosowaniem terapii komórkowej są osoby z rozpoznaniem stwardnieniem rozsianym. Obecnie w bazie clinicaltrials.gov zarejestrowane są 32 badania (1 w Kanadzie, 6 w USA i 12 w Europie), w tym 24 prowadzonych przez instytucje państwowe. Wśród najnowszych doniesień warto wymienić opublikowane przez Burt i wsp. w 2019 r. wyniki z randomizowanej próby klinicznej, która obejmowała 110 pacjentów z nawracająco-ustępującym stwardnieniem rozsianym (MS). Pacjenci byli leczeni niemieloablacyjnym HSCT, a progresję choroby porównywano z terapią modyfikującą przebieg choroby (DMT). Spośród 110 zrandomizowanych pacjentów 103 pozostało w badaniu. Progresja choroby wystąpiła u 3 pacjentów w grupie HSCT i 34 pacjentów w grupie DMT. Pierwszorzędownym punktem końcowym była progresja choroby, opisana jako wzrost wyniku w skali EDSS po 1 roku o 1,0 punkt lub więcej. W tym wstępnym badaniu niemieloablacyjny HSCT był skuteczniejszy niż terapia modyfikująca przebieg choroby u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią SM.

Komórki macierzyste mezenchymalne były stosowane również w udarze niedokrwiennym mózgu. Obecnie zarejestrowanych jest 29 badań klinicznych (5 w USA i 6 w Europie), w tym 17 prowadzonych przez instytucje publiczne (uniwersytety, instytuty). W roku 2020 Muir i wsp. opisali wyniki badania klinicznego u pacjentów w fazie podostrej udaru, po implantacji domózgowej allogenicznej ludzkiej linii komórek nerwowych macierzystych CTX0E03. Stwierdzono poprawę funkcji kończyny górnej u pacjentów z umiarkowanym niedowładem, ale poprawy takiej nie obserwowano u chorych z porażeniem tej kończyny. Wykazana częściowa poprawa funkcji ruchowych w wyodrębnionej grupie chorych w tym badaniu (PISCES II) skłoniła FDA (U.S. Food and Drug Administration) do zatwierdzenia randomizowanego, kontrolowanego bada-

nia klinicznego fazy IIb (PISCES III) z placebo, obejmującego ok. 130 pacjentów z 40 ośrodków w USA.

Przeszczep zmodyfikowanych MSC pochodzących ze szpiku kostnego (SB623) u pacjentów po przebytych w okresie krótszym niż 6 miesięcy udarze mózgu, w badaniu fazy 2a, wykazał poprawę neurologiczną, ale nie wykazał statystycznie istotnej poprawy w porównaniu z grupą kontrolną w badaniu fazy 2b.

Kolejną jednostką chorobową, w której medycyna regeneracyjna znalazła zastosowanie jest choroba Parkinsona. Obecnie w bazie *clinical.trials* zarejestrowanych jest 12 badań klinicznych z zastosowaniem terapii komórkowej (w tym 6 w USA, w Europie obecnie brak), z których 7 prowadzonych jest przez ośrodki publiczne. W 2020 r. Schweitzer i wsp. donieśli, że po transplantacji do śródmózgowia pacjentów z idiopatyczną chorobą Parkinsona dopaminergicznych komórek progenitorowych, uzyskanych z autologicznych indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), objawy choroby ustabilizowały się lub uległy poprawie po 18–24 miesiącach od implantacji, a pozytonowa tomografia emisyjna z użyciem fluoru-18-L-dihydroksyfenyloalaniny potwierdziła przeżycie przeszczepu (Schweitzer i wsp., 2020).

Obecnie w chorobach neurologicznych zarejestrowanych jest ok. 220 badań klinicznych, z czego 83 prowadzone są w Ameryce Północnej i Europie, a w 138 badaniach sponsorem jest jednostka publiczna. W konkretnych jednostkach chorobowych (poza wymienionymi) prowadzone są pojedyncze badania kliniczne. Yang i wsp. w 2020 r. przeszczepiali ludzkie mezenchymalne komórki zrębu pępowiny do przestrzeni podpajęczynówkowej z powodu przewlekłego uszkodzenia rdzenia kręgowego (SCI) raz w miesiącu przez cztery miesiące. Wyniki obserwacji w porównaniu z wartościami wyjściowymi wykazały, że leczenie było bezpieczne i skuteczne oraz doprowadziło do znacznej poprawy dysfunkcji neurologicznych i poprawy jakości życia (Yang i wsp., 2020).

Aspekty prawne dotyczące terapii komórkowych

Terapie komórkowe w Polsce są w większości terapiami eksperymentalnymi i podlegają procedurom, które są określone aktami prawnymi z różnych obszarów prawa medycznego. Trzy akty prawne dotyczące terapii komórkowych to: 1) Ustawa Transplantacyjna – określa proces przeszczepiania komórek. Procedura przeszczepu musi być zaakceptowana przez „Poltransplant” – Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji, a przeszczepiany preparat komórkowy (produkt) przez „KCBTiK” – Krajowe Centrum Bankowania i Komórek, 2) Prawo Farmaceutyczne – reguluje proces wytwarzania produktu leczniczego, w tym produktu terapii zaawansowanej (ATMP), np. preparatu komórkowego, który poddany był tzw. istotnej manipulacji, w tym namnażaniu w hodowli *in vitro*, 3) Ustawa o zawodach lekarza i lekarza dentyisty odnosi się do eksperymentu medycznego, który może być przeprowadzony, jeżeli spodziewana

korzyść lecznicza lub poznawcza ma istotne znaczenie, a przewidywane osiągnięcie tej korzyści oraz celowość i sposób przeprowadzenia eksperymentu są zasadne w świetle aktualnego stanu wiedzy i zgodne z zasadami etyki lekarskiej. Jeżeli terapia komórkowa przeprowadzana jest w ramach badania klinicznego, to podlega również Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej regulującego przeprowadzenie badania klinicznego. Eksperyment medyczny może być przeprowadzony wyłącznie po wyrażeniu pozytywnej opinii o projekcie przez niezależną komisję bioetyczną.

W świetle obowiązującego prawa produkt komórkowy stosowany w większości terapii jest produktem terapii zaawansowanych (ATMP). Istnieje również pojęcie HE-ATMP, czyli wyjątku szpitalnego, jeżeli produkt jest wytworzony dla konkretnego pacjenta, t.j. przygotowywany w sposób niesystematyczny, ale zgodnie z normami jakości. Produkt ten może być stosowany tylko na wyłączną odpowiedzialność zawodową lekarza w warunkach szpitalnych i w tym samym państwie. ATMP-HE może być stosowany w ramach eksperymentu leczniczego pod warunkiem uzyskania zgody Komisji Bioetycznej, a także Głównego Inspektora Farmaceutycznego. Terapie obejmujące większą grupę pacjentów nie są terapiami w ramach wyjątku szpitalnego.

1 stycznia 2021 r. weszły w życie przepisy modyfikujące zasady prowadzenia eksperymentu medycznego w rozumieniu przepisów ustawy z 05.12.1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (zwanej dalej u.zaw.lek.). Według obecnych regulacji eksperymentem medycznym jest eksperyment leczniczy lub badawczy, związany z przeprowadzeniem badań materiału biologicznego dla celów naukowych (art. 21 ust. 4 u.zaw.lek.). Eksperyment leczniczy dotyczy wprowadzenia nowych, albo tylko częściowo wypróbowanych metod diagnostycznych, leczniczych lub profilaktycznych, w celu osiągnięcia bezpośredniej korzyści dla zdrowia pacjenta. Aktualnie eksperymentem medycznym może kierować lekarz posiadający specjalizację w dziedzinie medycyny, która jest szczególnie przydatna ze względu na charakter lub przebieg eksperymentu z odpowiednio wysokimi kwalifikacjami zawodowymi i badawczymi (art. 23 ust. 1 u.zaw.lek.). W poprzednim brzmieniu przepisu eksperymentem medycznym kieruje lekarz posiadający odpowiednio wysokie kwalifikacje. W przypadku eksperymentu badawczego zawierającego część niemedyzną lekarz kierujący takim eksperymentem współpracuje z inną osobą posiadającą kwalifikacje niezbędne do przeprowadzenia części niemedyznej (art. 23 ust. 2 u.zaw.lek.). Ustawa z 16 lipca 2020 r. wprowadza również zakaz stosowania zachęt lub gratyfikacji finansowych, z wyjątkiem rekompensaty poniesionych przez pacjenta kosztów. W nowelizacji ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentystry z lipca 2020 r. nadal nie wprowadzono obowiązującego przepisu, który zabrania pokrywania kosztów eksperymentu leczniczego przez chorego lub jego bliskich. Autorzy publikacji są za wproprowadzeniem takiego zapisu. Problem pobierania opłat od uczestnika badania

nie dotyczy eksperymentu badawczego, którego głównym celem jest zdobycie nowej wiedzy medycznej.

Produkty terapii komórkowej są definiowane w Unii Europejskiej jako leki od roku 2003, dlatego powinny być wytwarzane zgodnie z wytycznymi i w reżimie dobrej praktyki wytwarzania (*Good Manufacturing Practice, GMP*). Oznacza to objęcie procesu wytwarzania leku kontrolą jakości biologicznego materiału wyjściowego, odczynników i materiałów eksploatacyjnych stosowanych w całym procesie ekspansji MSC *in vitro*, aż do uzyskania wymaganego produktu. Cały proces musi przebiegać w warunkach aseptycznych, a więc pomieszczenia i urządzenia muszą posiadać odpowiednie certyfikaty, procesy produkcji muszą zostać zweryfikowane przez właściwe organy (w Polsce GIF), a personel powinien zostać odpowiednio przeszkolony. Finalnie otrzymany produkt na bazie MSC musi być wytworzony zgodnie z wymogami GMP oraz spełniać wszystkie wymagania wymienione w prawie farmaceutycznym oraz zalecane przez EMA.

W ostatnich latach toczy się gorąca debata dotycząca stosowania MSC w terapii komórkowej niehomologicznej dla MSC, czyli tkanek innego pochodzenia niż mezodermalne. Dyskutowane są w niej dwa różne aspekty: finansowy i naukowy. Autorzy publikacji stają na stanowisku, że dopóki terapia komórkowa prowadzona jest w ramach eksperymentu medycznego, pacjent nie powinien ponosić żadnych jej kosztów. Uważamy jednak, że MSCs są ważnym elementem terapii komórkowej w regeneracji tkanek i narządów wywodzących się z również innych niż mezoderma listków zarodkowych, do czego upoważniają nas udokumentowane i przekonujące dane naukowe z wielu ośrodków na świecie (Yao i wsp. 2020, Radhakrishnan S. i wsp., 2019; Bueno, Martinez, 2021), a ich zastosowanie w ramach eksperymentu medycznego w prowadzonych próbach klinicznych jest niezbędne i uzasadnione merytorycznie. Do dzisiaj przeprowadzono liczne doświadczenia będące podstawą do rozpoczęcia terapii z zastosowaniem MSC w regeneracji schorzeń OUN, wszakże pod pewnymi warunkami. Eksperyment medyczny powinien być prowadzony na podstawie opracowanych w badaniach przedklinicznych i opublikowanych procedurach. Miejszem optymalnym do przeprowadzenia terapii eksperymentalnej jest referencyjny dla danego schorzenia oddział kliniczny zapewniający:

- prawidłową rekrutację pacjentów (prawidłowe rozpoznanie),
- wnikliwie przeprowadzoną i krytyczną obserwację chorych w czasie terapii,
- wykonanie najnowszych badań diagnostycznych obiektywizujących efekt terapii

Niewątpliwie wartością dodaną jest współpraca ośrodka klinicznego z centrum badań przedklinicznych, zapewniająca przepływ informacji i dowodów naukowych oraz wniosków z obserwacji klinicznych, skorelowanych z zastosowanym materiałem komórkowym.

Poza wszelką dyskusją kwestią jest stosowanie terapii preparatami o nieznanym charakterystyce i niezgodnie procedurami leczniczymi obowiązującymi w Polsce i na świecie.

cie, czemu autorzy tej pracy są zdecydowanie przeciwni. Co więcej, uważamy, że przed podjęciem terapii eksperymentalnej należy identyfikować jej potencjalne zagrożenia, które dla ciał decyzyjnych (Komisji Bioetycznych) i pacjentów powinny być czynnikiem branym pod uwagę przed wydaniem zgody na jej stosowanie.

Podsumowanie

Terapia komórkowa w zakresie medycyny regeneracyjnej, stosowana obecnie w klinice, dotyczy komórek macierzystych izolowanych z różnych źródeł. Mimo wielu dyskusji i zastrzeżeń związanych z MSC, w świetle dotychczasowych doniesień i wieloletnich obserwacji klinicznych wydaje się, że jest to podstawowe źródło komórek stosowane obecnie w próbach klinicznych medycyny regeneracyjnej, a mechanizm ich działania w zależności od tkanki podlegającej terapii może być adiuwacyjny lub rekonstrukcyjny. Zdolność do różnicowania MSC w komórki wywodzące się z innych listków zarodkowych niż mezoderma może wynikać z obecności w tej populacji (komórek postgastrulacyjnych) pewnej subpopulacji komórek wykazujących cechy pluripotencji i aktywowanych do różnicowania w określonych warunkach mikrośrodowiska. Ponadto MSC nie wykazują niestabilności genetycznej i związanej z tym tumorogenności typowej dla ESC, co jest dodatkową cechą sprzyjającą ich zastosowaniu w terapii komórkowej.

Dlatego w wielu uznanych na świecie placówkach medycznych, prowadzone są badania kliniczne z użyciem MSC, zatwierdzone przez FDA (w Stanach Zjednoczonych) i EMA (w Europie). MSC są zarejestrowane w Japonii oraz warunkowo w Kanadzie i Nowej Zelandii w leczeniu ostrej choroby – przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGVHD). Inne dotychczas zarejestrowane preparaty oparte na MSC to: Clartistem® w leczeniu zwyrodnienia stawów, Cuspitem® w chorobie Leśniowskiego-Crohna, Hear-tiCellgram-AMI® i TEMCELL HS® w zawale mięśnia serca. Oprócz leków przedstawionych powyżej, w USA FDA dopuściło do zastosowania w ortopedii produkty z allogenicznymi MSC tj.: OsteoCel® (Nu-Vasive), Trinity (Orthofix), Allostem® (AlloSource) i LiquidGen® (Skye Ortodoncja).

Przykłady preparatów pozytywnie zaopiniowanych przez EMA, opartych na allogenicznych mezenchymalnych komórkach macierzystych, to komórki ABCB5(+), jako leku sierocego w leczeniu pęcherzowego oddzielania się naskórka (*epidermidis bullosa*), czy MSC z tkanki tłuszczowej Alofisel/Darvadstrocel® w leczeniu przetok okołoodbytniczych. Obecnie w europejskim rejestrze badań klinicznych (EU Clinical Trials Register; EudraCT protocol) widnieje 158 badań z zastosowaniem MSC, w tym 53 zakończone, 7 w fazie czwartej.

Zarodkowe komórki macierzyste oraz otrzymywane na drodze reprogramowania komórek somatycznych indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste ze względu na bezpieczeństwo biologiczne i nowotworowe stosowane są głównie w badaniach labora-

toryjnych i pierwszych badaniach klinicznych. Zaznaczyć jednak należy, że w związku z szybkim postępowaniem badań podstawowych w tej dziedzinie i metodyki stabilnego, w pełni powtarzalnego różnicowania końcowego, zarówno ESC, jak i iPSC mogą w przyszłości stanowić cenny materiał do wielonarządowych terapii regeneracyjnych.

Polemiczna opinia krytycznie odnosząca się do aspektu bezpieczeństwa lub racjonalności prowadzenia terapii z zastosowaniem MSC jest bardzo wskazana. Należy jednak rozważnie formułować opinie, aby określone stanowisko nie było tzw. jedynym słusznym. Zgodnie z mottem Królewskiego Towarzystwa Naukowego „nullius in verba” („nie wierz nikomu na słowo”) badania zarówno przedkliniczne, jak i kliniczne powinny być prowadzone w celu potwierdzenia lub obalenia danej tezy, z zachowaniem opisywanych wcześniej zasad prawnych i etyki zawodowej, zwracając przede wszystkim uwagę na dobro pacjenta.

Bibliografia

- Berry J.D., Cudkowicz M.E., Windebank A.J., et al. *NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS: Safety, clinical, and biomarker results*. *Neurology*. 2019 Dec 10; 93(24): e2294-e2305. doi: 10.1212/WNL.00000000000008620. Epub 2019 Nov 18. PMID: 3174054
- van den Boom N.A.C., Winters M., Haisma H.J., Moen M.H. *Efficacy of Stem Cell Therapy for Tendon Disorders: A Systematic Review*. *Orthop. J. Sports Med.* 2020; 8(4): 2325967120915857. Published 2020 Apr 30. doi: 10.1177/2325967120915857
- Bueno C., Martinez-Marga M., Garcia-Bernal D., et al. (2021) *Differentiation of human adult-derived stem cells towards a neural lineage involves a dedifferentiation event prior to differentiation to neural phenotypes*. *Scientific Reports* 8; 11(1): 12034. doi: 10.1038/s41598-021-91566-9
- Bueno C., Martinez S. (2021) *Neurogenesis similarities in different human adult stem cells*. *Neural Regen. Res.* 16: 123–124.
- Burt R.K., Balabanov R., Burman J., et al. *Effect of Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation vs Continued Disease-Modifying Therapy on Disease Progression in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Randomized Clinical Trial*. *JAMA*. 2019 Jan 15; 321(2): 165–174. doi: 10.1001/jama.2018.18743. PMID: 30644983
- Cao, Y., Su, Q., Zhang, B., et al. (2021). *Efficacy of stem cells therapy for Crohn's fistula: a meta-analysis and systematic review*. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02095-7>
- Cheng R.J., Xiong A.J., Li Y.H., et al. *Mesenchymal Stem Cells: Allogeneic MSC May Be Immunosuppressive but Autologous MSC are Dysfunctional in Lupus Patients*. *Front Cell Dev. Biol.* 2019 Nov 15; 7: 285. doi: 10.3389/fcell.2019.00285. PMID: 31799252; PMCID: PMC6874144
- Cho W.S., Chung S.G., Kim W., et al. *Mesenchymal Stem Cells Use in the Treatment of Tendon Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Clinical Studies*. *Ann. Rehabil. Med.* 2021 Aug; 45(4): 274–283. doi: 10.5535/arm.21078. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34496470; PMCID: PMC8435464

- Coste C., Neirinckx V., Sharma A., et al. *Human bone marrow harbors cells with neural crest-associated characteristics like human adipose and dermis tissues*. PLoS One. 2017 Jul 6; 12(7): e0177962. doi: 10.1371/journal.pone.0177962. PMID: 28683107; PMCID: PMC5500284.
- Czapla, J., Matuszczak, S., Kulik, K. et al. *The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells*. Stem Cell Res. Ther. 10, 235 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1331-9>
- Dabrowska S., Sypecka J., Jablonska A., et al. *Neuroprotective Potential and Paracrine Activity of Stromal Vs. Culture-Expanded hMSC Derived from Wharton Jelly under Co-Cultured with Hippocampal Organotypic Slices*. Mol. Neurobiol. 2018 Jul; 55(7): 6021-6036. doi: 10.1007/s12035-017-0802-1.
- de Wynter E.A., Buck D., Hart C., et al. *CD34+ AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors*. Stem Cells. 1998; 16(6): 387. doi: 10.1002/stem.160387. PMID: 983 1864
- DI Martino A., Barile F., Fiore M., et al. *Are injectable regenerative therapies effective in the treatment of Degenerative Disc Disease? A systematic literature review*. J. Neurosurg. Sci. 2021 Aug 3. doi: 10.23736/S0390-5616.21.05389-3. Epub ahead of print. PMID: 34342196
- Dezawa M. *Muse Cells Provide the Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells: Direct Contribution of Muse Cells to Tissue Regeneration*. Cell Transplantation. May 2016: 849-861. doi: 10.3727/096368916X690881
- Duma C., Kopyov O., Kopyov A. et al. *Human intracerebroventricular (ICV) injection of autologous, non-engineered, adipose-derived stromal vascular fraction (ADSVF) for neurodegenerative disorders: results of a 3-year phase 1 study of 113 injections in 31 patients*. Mol. Biol. Rep. 2019 Oct; 46(5): 5257–5272. doi: 10.1007/s11033-019-04983-5
- Engle S.J., Blaha L., Kleiman R.J. *Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons*. Neuron. 2018 Nov 21; 100(4): 783-797. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.033. PMID: 30465765
- Falanga V., Iwamoto S., Chartier M., et al. *Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds*. Tissue Eng. 2007 Jun; 13(6): 1299–312. doi: 10.1089/ten.2006.0278. PMID: 17518741
- Gavina M., Belicchi M., Rossi B., et al. *VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation*. Blood. 2006 Oct 15; 108(8): 2857–2866. doi: 10.1182/blood-2006-04-018564. Epub 2006 Jun 29. PMID: 16809613
- Hirsch T., Rothoef T., Teig N., et al. *Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells*. Nature. 2017 Nov 16; 551(7680): 327–332.
- Horch R.E., Kopp J., Kneser U., et al. *Tissue engineering of cultured skin substitutes*. J. Cell Mol. Med. 2005 Jul-Sep; 9(3): 592-608. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x. PMID: 16202208; PMCID: PMC6741320.
- Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., et al. *International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy. 2005; 7(5): 393-5. doi: 10.1080/14653240500319234. PMID: 16236628
- Huang X., Saint-Jeannet J.P. *Induction of the neural crest and opportunities of life on the edge*. Dev Biol. 2004 Nov 1; 275(1): 1–11. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.033. PMID: 15464 568

- Hu M.S., Borrelli M.R., Lorenz H.P., et al. *Mesenchymal Stromal Cells and Cutaneous Wound Healing: A Comprehensive Review of the Background, Role, and Therapeutic Potential*. *Stem Cells Int.* 2018 May 20; 2018: 6901983. doi: 10.1155/2018/6901983. PMID: 29887893; PMCID: PMC5985130
- Isern J., García-García A., Martín A.M., et al. *The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function*. *Elife*. 2014 Sep 25; 3: e03696. doi: 10.7554/eLife.03696. PMID: 25255216; PMCID: PMC4381911.
- Kaminska A., Wedzinska A., Kot M., Sarnowska A. *Effect of Long-Term 3D Spheroid Culture on WJ-MSC*. *Cells*. 2021 Mar 24; 10(4): 719. doi: 10.3390/cells10040719. PMID: 33804895; PMCID: PMC8063822.
- Klama-Baryła A., Kitala D., Łabuś W., et al. *Wykorzystanie ludzkiej błony owodniowej jako nośnika antyseptyków w leczeniu zakażonych ran przewlekłych*; *Forum Leczenia Ran* 2020; 1(1): 11–15 Doi: dx.doi.org/10.15374/FLR2020009
- Lech W., Figiel-Dabrowska A., Sarnowska A., et al. (2016). *Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy*. *Stem cells international*, 2016, 2514917. <https://doi.org/10.1155/2016/2514917>
- Lin W., Xu L., Zwingenberger S., et al. *Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing*. *J. Orthop. Translat.* 2017 Mar 29; 9: 19-27. doi: 10.1016/j.jot.2017.03.002. eCollection 2017 Apr. PMID: 29662796
- Liu P., Deng Z., Han S., et al. (2008). *Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds*. *Artif. Organs*. 32, 925. doi: 10.1111/j.1525-1594.2008.00654
- Liu Y., Wang C., Su G., *Cellular Signaling in Müller Glia: Progenitor Cells for Regenerative and Neuroprotective Responses in Pharmacological Models of Retinal Degeneration*. *J. Ophthalmol.* 2019; 2019: 5743109. Published 2019 Mar 19. doi: 10.1155/2019/5743109
- Magrelli F.M., Merra A., Pellegrini G. *Front Bioeng Biotechnol. Surgery Versus ATMPs: An Example From Ophthalmology*. 2020 Jun 10; 8: 440. doi: 10.3389/fbioe.2020.00440. eCollection 2020.
- Mandai M., Watanabe A., Kurimoto Y., et al. (2017). *Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration*. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046.
- Mazzini L., Gelati M., Profico D.C., et al. *ALS-NSCs Trial Study Group. Results from Phase I Clinical Trial with Intraspinal Injection of Neural Stem Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Long-Term Outcome*. *Stem Cells Transl. Med.* 2019 Sep; 8(9): 887–897. doi: 10.1002/sctm.18-0154. Epub 2019 May 18. PMID: 31104357
- Mehat M.S., Sundaram V., Ripamonti C., et al. *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration*. *Ophthalmology*. 2018 Nov; 125(11): 1765–1775.
- Morata-Tarifa C., Azkona G., Glass J., et al. *Looking backward to move forward: a meta-analysis of stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis*. *NPJ Regen. Med.* 2021 Apr 1; 6(1): 20. doi: 10.1038/s41536-021-00131-5
- Morikawa S., Mabuchi Y., Niibe K., et al. *Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 Feb 20; 379(4): 1114–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.031. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19161980
- Muir K.W., Bulters D., Willmot M., et al. *Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2)*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2020 Apr; 91(4): 396-401. doi: 10.1136/jnnp-2019-322515. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32041820; PMCID: PMC7147186.

- Morikawa S., Ouchi T., Shibata S., et al. *Applications of Mesenchymal Stem Cells and Neural Crest Cells in Craniofacial Skeletal Research*. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 2849879. doi: 10.1155/2016/2849879. Epub 2016 Feb 24. PMID: 27006661; PMCID: PMC4783549.
- Niibe K., Zhang M., Nakazawa K., et al. *The potential of enriched mesenchymal stem cells with neural crest cell phenotypes as a cell source for regenerative dentistry*. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 2017 May; 53(2): 5–33. doi: 10.1016/j.jdsr.2016. 9.001. Epub 2016 Nov 5.
- Nuschke A. *Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing*. *Organogenesis*. 2014 Jan 1; 10(1): 29–37. doi: 10.4161/org.27405. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24322872; PMCID: PMC4049892
- Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baghaban Eslaminejad M. *Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence?* *Cells Tissues Organs*. 2017; 204(2): 59–83. doi: 10.1159/000469704. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28647733.
- Pellegrini G., Lambiase A., Macaluso C., et al. *From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU*. *Regen. Med.* 2016 Jun; 11(4): 407–20. doi: 10.2217/rme-2015-0051. Epub 2016 Apr 19.
- Piejko M., Radziun K., Bobis-Wozowicz S., et al. *Adipose-Derived Stromal Cells Seeded on Integra® Dermal Regeneration Template Improve Post-Burn Wound Reconstruction*. *Bioengineering (Basel)*. 2020 7(3): 67. doi: 10.3390/bioengineering7030067. PMID: 32630660
- Radhakrishnan S., Trentz O.A., Reddy M.S., et al. (2019) *In vitro transdifferentiation of human adipose tissue-derived stem cells to neural lineage cells – a stage-specific incidence*. *Adipocyte* 8: 164–177.
- Rodríguez-Fuentes D.E., Fernández-Garza L.E., Samia-Meza J.A., et al. *Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review*. *Arch. Med. Res.* 2021 Jan; 52(1): 93–101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32977984.
- Sault R.B., Appelbaum F.R. *Hematopoietic Cell Transplantation*. s. 2223–2223. [w:] Wintrobe's *Clinical Hematology*, 14e; 2018
- Samoila O., Samoila L. *Stem Cells in the Path of Light, from Corneal to Retinal Reconstruction*. *Biomedicines*. 2021 Jul 23; 9(8): 873. doi: 10.3390/biomedicines9080873. PMID: 34440077; PMCID: PMC8389604
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., et al. (2010), *Mesenchymal stem cells for clinical application*. *Vox Sanguinis*, 98: 93–107. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x>
- Sharma K., Mubarak A., Mujawar M.A., Kaushik A., *State-of-Art Functional Biomaterials for Tissue Engineering*, *Front. Mater.*, 24 July 2019 <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00172>
- Schweitzer J.S., Song B., Herrington T.M., et al. *Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease*. *N. Engl. J. Med.* 2020 May 14; 382(20): 1926–1932. doi: 10.1056/NEJMoa1915872. PMID: 32402162; PMCID: PMC7288 982
- Sobuś A., Baumert B., Pawlukowska W., et al. *Humoral Influence of Repeated Lineage-Negative Stem/Progenitor Cell Administration on Articulatary Functions in ALS Patients*. *Stem Cells Int.* 2020 Dec 14; 2020: 8888271.
- Sobuś A., Baumert B., Litwińska Z., et al. *Safety and Feasibility of Lin-Cells Administration to ALS Patients: A Novel View on Humoral Factors and miRNA Profiles*. *Int. J. Mol. Sci.* 2018 Apr 27; 19(5): 1312. doi: 10.3390/ijms19051312. PMID: 29702606; PMCID: PMC5983708.
- Stern J.H., Tian Y., Funderburgh J., et al. *Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision*. *Cell Stem Cell*. 2018 Jun 1; 22(6): 834–849. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.013
- Syková E., Rychmach P., Drahorádová I., et al. *Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial*. *Cell*

- Transplant. 2017 Apr 13; 26(4): 647–658. doi: 10.3727/096368916X693716. Epub 2016 Nov 7. PMID: 27938483; PMCID: PMC5661219
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. (2007). *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell 131, 861–872.
- Takashima Y., Era T., Nakao K., et al. *Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation*. Cell. 2007 Jun 29; 129(7): 1377–88. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.028. PMID: 17604725
- Tan S.H.S., Kwan Y.T., Neo W.J., et al. *Intra-articular Injections of Mesenchymal Stem Cells Without Adjuvant Therapies for Knee Osteoarthritis*. The American Journal of Sports Medicine. 2021; 49(11): 3113–3124. doi: 10.1177/0363546520981704
- Tomecka E., Lech W., Zychowicz M., et al. *Assessment of the Neuroprotective and Stemness Properties of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells under Variable (5% vs. 21%) Aerobic Conditions*. Cells. 2021 Mar 24; 10(4): 717. doi: 10.3390/cells10040717. PMID: 33804841; PMCID: PMC8063843
- Uchida H., Niizuma K., Kushida Y., et al. *Human Muse Cells Reconstruct Neuronal Circuitry in Subacute Lacunar Stroke Model*. Stroke. 2017 Feb; 48(2): 428–435. doi: 10.1161/STROKE.AHA.116.014950. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27999136; PMCID: PMC5262965
- Yamanaka S. *Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges*. Cell Stem Cell. 2020 Oct 1; 27(4): 523-531. doi: 10.1016/j.stem.2020.09.014. PMID: 33007237
- Yao P., Zhou L., Zhu L., et al. *Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases*. Eur. Neurol. 2020; 83(3): 235–241. doi: 10.1159/000509268
- Wiącek M.P., Goślowski W., Grabowicz A., et al. *Long-Term Effects of Adjuvant Intravitreal Treatment with Autologous Bone Marrow-Derived Lineage-Negative Cells in Retinitis Pigmentosa*. Stem Cells Int. 2021 Jun 2; 2021: 6631921.

Cell therapy for regenerative medicine: facts and controversy

Cellular therapy, as a part of regenerative medicine, implies to the treatment of human disorders with cells as a medical product, so called – “living drugs”. Usually such therapy is applied when other alternative efficient pharmacological therapies are not available. Stem cells of different origin: 1) tissue specific e.g. hematopoietic, epithelial, neuronal, limbal; 2) mesenchymal stem cells (MSC) harvested from variety of tissues; 3) pluripotent stem cells: embryonic stem cells (ESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) – serve as a source of cells for regenerative medicine application, depending upon disease and application requirements. Currently MSC are the type of stem cells that are most frequently used in registered regenerative medicine clinical trials. In this paper we provide the information on the application of cell therapy in orthopedics, hematology, ophthalmology, dermatology, gastrology and neurology. The influence of origin of MSCs and iPSCs on their mode of action as therapeutic, regenerative agents are discussed. Advantages and disadvantages of application of different cell types for cell therapy are underlined. Last, but not least current low regulations in Poland and requirements of European regulatory bodies for cell therapy are pointed out and discussed.

Key words: cell therapy, regenerative medicine, human mesenchymal stem cells, human induced pluripotent stem cells