

Kantasolujen kaupallinen tuotanto ja sen laatutekijät

ADA OJUVA

TkK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
03/2023
Ada Ojuva

TIIVISTELMÄ

TURUN YLIOPISTO

Biotekniikka

ADA OJUVA: Kantasolujen kaupallinen tuotanto ja sen laatutekijät

Tutkielma, 17 s.

Biotekniikka

Maaliskuu 2024

Kantasolut pystyvät erilaistumaan eri kudostyyppien soluiksi ja jakautumaan itsenäisesti, siksi niiden uskotaan mullistavan regeneratiiviset lääketieteelliset hoitomuodot. Kantasolujen tuotanto on kuitenkin hyvin haastavaa ja siksi sitä on ollut vaikeaa soveltaa kaupalliseen tuotantoon. Tuotanto keskittyy tällä hetkellä vain pieniin tuotantomääriin erilaisissa tutkimuksissa ja yksittäisten potilaiden hoitamiseen. Laajaan kaupalliseen tuotantoon siirtyminen vaatisi kantasolujen tuotannon standardisointia ja laadunvarmistuksen parantamista.

Tällä hetkellä kantasoluja käytetään korjaamaan vajaatoimintaisia ja vaurioituneita elimiä, kohdennettuun soluhoidon ja kudosten tuottamiseen. Merkittävin kantasolutyyppi on kuitenkin indusoidut pluripotentit kantasolut niiden erilaistumispotentiaalin ja saatavuuden takia. Niiden laadun säilyttämisessä tuotantoprosessin aikana on haasteita kuten happipitoisuuden säätely, mekaaniset ärsykkeet, leikkausjännitystasot ja puhtaus. Näiden pienikin muutos saattaa aiheuttaa solun toiminnan tai rakenteen muuttumisen.

Suurin osa tutkimuksista käsittelee kantasolutuotannon haasteita ja niille mahdollisia ratkaisuja. Tulosten mukaan kantasolutuotannon standardisoinnin mahdollinen ratkaisu olisi sellaisen bioreaktorin käyttö, jolla pystyttäisiin seuraamaan kaikkia solun kasvuun vaikuttavia parametrejä jatkuvasti ja luotettavasti sekä havainnoimaan pienimmätkin muutokset. Bioreaktorilla pitäisi olla myös mahdollisuus standardisoida yksittäisten solujen kasvuympäristöä. Ratkaisu tulee löytymään todennäköisesti tekoölyn ja koneoppimisen sovelluksista.

Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on selvittää, mitä haasteita kantasolujen tuotannossa on ja mitä eri laatutekijöitä tulee ottaa huomioon. Tavoitteena on kerätyn tiedon avulla selvittää, mitä eri laadunvalvontamenetelmiä tällä hetkellä on käytössä, ja miten niitä tulisi kehittää tulevaisuudessa kantasolujen tuotannon kaupallistamiseksi.

Asiasanat: kantasolut, bioreaktori, laatu järjestelmät, kirjallisuuskatsaus

Sisällys

1 Johdanto	1
2 Kantasolujen määritelmä ja ominaisuudet	2
3 Nykyiset sovellukset	4
4 Kantasolujen viljely	7
5 Kantasolujen valmistuksen suurimmat haasteet.....	10
6 Kantasolupohjaisten tuotteiden laadunvalvontamenetelmät	12
7 Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät	15
8 Lähdeluettelo.....	16

1 Johdanto

Kantasolut pystyvät suorittamaan elimistölle parempia fysiologisia ja metabolisia tehtäviä ja reaktioita, kuin mihin mikään mekaaninen laite, proteiini tai muu kemiallinen yhdiste pystyy. Siksi kantasolujen tutkimus ja kehitys on suuntautunut erityisesti toiminnallisten vaurioiden tai kudosten korjaamiseen solusiirtojen avulla. (Wang ja muut 2013) Koska kantasolut pystyvät erikoistumaan eri kudostyyppisiin ja jakautumaan itsenäisesti, niiden arvo lääketieteessä on noussut valtavasti (Oh ja Kim 2002). Tällainen soluterapia on jatkuvasti kasvava tutkimusalue, jonka avulla pystytään parantamaan sellaisia potilaiden vammoja ja sairauksia, joihin perinteisemmät lääkkeet ja hoidot eivät kykene. (Wang ja muut 2013) Erityisesti pluripotentit eli PSC kantasolut ovat mahdollistaneet regeneratiivisen hoitomuodon uudella tavalla niiden suuren erilaistumispotentialin ansiosta. Pluripotentteihin kantasoluihin ei myöskään liity samanlaisia eettisiä kysymyksiä kuin alkioiden kantasolujen hyödyntämiseen hoidoissa tai mahdollisia kehon hylkimisreaktioita. (Coronnello ja Francipane 2022) Regeneratiivisen hoitomuotojen tavoitteena on erilaisten synnynnäisten häiriöiden ja pahanlaatuisten sairauksien vaurioittamien kudosten ja elinten uudelleenrakentaminen ja korjaaminen. Kantasolujen käyttö hoitomuotona eroaa muista hoidoista siinä, että se yrittää keskittyä elimen tai kudoksen toiminnan ylläpitämiseen eikä sairauden tai prosessin hallintaan. (Nazim ja Ahmad 2023)

Kantasolujen tutkimus on vasta alkutaipaleella, jolloin niiden laatu lääketieteessä ja eri hoitomuodoissa on vielä epävakaata. (Oh ja Kim 2002) Tutkimukset keskittyvät niin hoitomuotojen löytämiseen kuin biologian ja patogeneesin ymmärtämiseen. (Nazim ja Ahmad 2023) Kantasolujen tuotannon laadunvalvonta perustuu tällä hetkellä pääasiassa yksittäisten soluviljelyasiantuntijoiden silmämääräiseen tarkastukseen, jolloin kantasoluviljelmien standardointi ja valmistus on haastavaa lääketieteellisiin sovelluksiin. Kantasoluja pystytään tällä hetkellä tutkimaan käyttämällä yksisoluista kloonianalyysiä, mutta se on kuitenkin kallista, aikaa vievää ja hankalaa. Tällä hetkellä on tarve automatisoidulle järjestelmälle, joka pystyy soluseurantaan samalla tarkkuudella kuin manuaalinen seuranta kliinisissä ja teollisissa sovelluksissa. (Hirose ja muut 2021) Yksi isoimmista tekijöistä kantasolujen laaduntarkkailussa on tekoälyn hyödyntäminen. Sen avulla voidaan seurata kantasolun karakterisointia sen eri vaiheissa. (Coronnello ja Francipane 2022)

Tässä kirjallisuuskatsauksessa perehdytään tähänhetkisiin kantasolujen sovelluksiin ja niiden tulevaisuuden näkyymiin sekä niiden suurimpiin haasteisiin. Selvitetään mitkä ovat kaupallisen tuotannon suurimmat haasteet ja laatutekijät kantasolujen tuotannossa ja miten niiden tuotannon laatua pystytään parantamaan.

2 Kantasolujen määritelmä ja ominaisuudet

Kantasolut ovat elimistön erikoistumattomia soluja, jotka pystyvät erilaistumaan eri organismin soluiksi. Kantasoluilla on myös kyky uusiutua itsenäisesti. Kantasoluja löytyy niin alkioista kuin aikuisten soluista. Erilaisia kantasolutyyppejä ovat totipotentit, pluripotentit, multipotentit, oligopotentit ja unipotentit kantasolut. Nämä kantasolutyypit jaetaan niiden erilaistumiskyvyn perusteella. (Zakrzewski ja muut 2019)

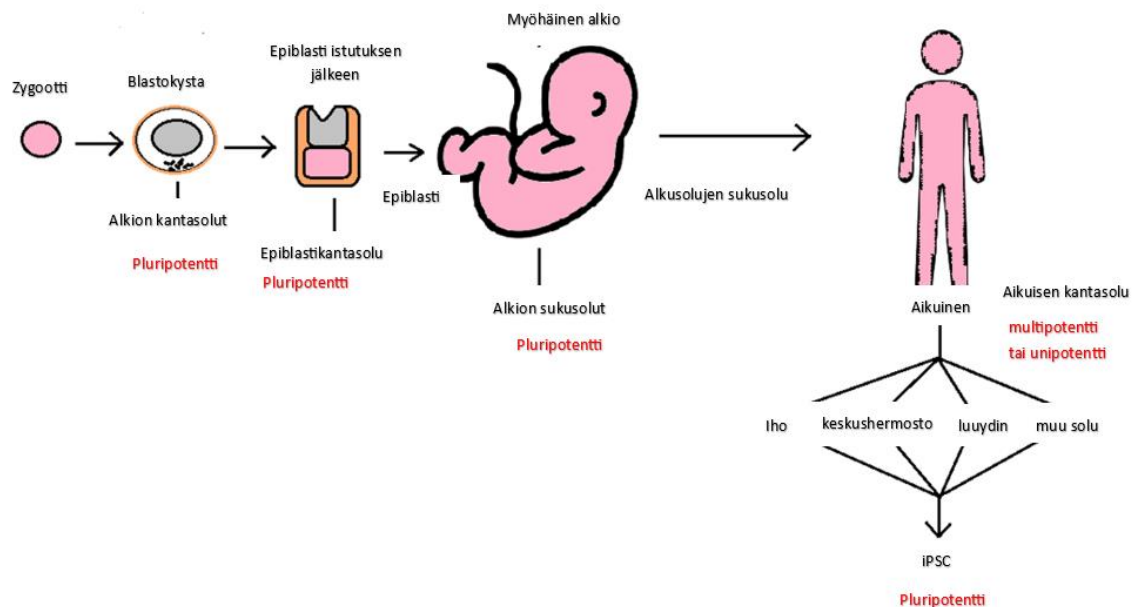
Totipotentit kantasolut pystyvät jakautumaan ja erilaistumaan kaikiksi organismin soluiksi. Näillä kantasoluilla on siis suuri erilaistumispotentialiaali, jonka ansiosta solut pystyvät muodostamaan alkion ja alkion ulkopuolisia rakenteita. Tsygootit ovat totipotenttisiä soluja, jotka muodostuvat siittiön hedelmöittäessä munasolun. Tämän jälkeen solut pystyvät kehittymään joksikin kolmesta sukukerroksesta tai istukaksi. Tämän takia totipotenttisiä soluja kutsutaan kaikkikykyisiksi. Totipotentin blastokystan solumassa muuttuu pluripotentteiksi soluiksi neljän päivän jälkeen. (Zakrzewski ja muut 2019)

PSC-solut ovat ihmisen soluja, joihin kuuluu erityisiä solutyyppejä kuten ihmisen alkion kantasoluja (hESC) ja indusoituja pluripotentteja kantasoluja (iPSC) (Lee ja muut 2020). Pluripotentit kantasolut (PSC) pystyvät muodostamaan sukukerrosten kaikkia soluja. Ne eivät kuitenkaan pysty muodostamaan alkion ulkoisia rakenteita, esimerkiksi alkion kantasoluja (ESC), joista esimerkiksi istukka rakentuu. Nämä ESC-solut syntyvät ennen istutusta alkioden sisäisestä solumassasta. Toinen esimerkki pluripotentteista kantasoluista on indusoidut pluripotentit kantasolut (iPSC). Nämä PSC-kantasolut syntyvät istutettujen alkioden epiblastikerroksesta. iPSC-soluja voidaan tuottaa somaattisista soluista keinotekoisesti, ja ne toimivat samalla tavalla kuin PSC-solut. iPSC-solujen käytön ja viljelyn kehitys vaikuttavat hyvältä regeneratiivisen lääketieteen kannalta. Näiden solujen pluripotenttius päättyy vähemmän potentiaalisiiin multi-, oligo- tai unipotentteihin soluihin. Näiden solujen aktiivisuutta ja spektriä voidaan arvioida teratooma muodostuskokeella. (Zakrzewski ja muut 2019)

Multipotentit kantasolut eivät ole yhtä kykeneviä erilaistumiseen kuin esimerkiksi PSC-solut. Jotkin multipotentin solut pystyvät erilaistumaan myös toisiinsa liittymättömiksi solutyypeiksi ja sen takia niitä voidaan kutsua pluripotentteiksi soluiksi. Multipotenttien kantasolujen erilaistumisspektri on kapeampi, mutta ne silti pystyvät erilaistumaan tiettyjen solulinjojen soluiksi. Esimerkiksi hematopoieettit kantasolut voivat kehittyä erilaisiksi verisolutyypeiksi. Kun hematopoetit ovat erilaistuneet, niistä syntyy oligopotentteja soluja. Näiden syntyneiden oligopotenttien solujen erilaistumiskyky on hyvin rajallinen. Ne pystyvät erilaistumaan vain tietyn kudoksen soluiksi. (Zakrzewski ja muut 2019)

Kaikista vähiten erilaistumiskykyä on oligopotentilla ja unipotentilla kantasoluilla. Oligopotentit kantasolut voivat erilaistua muutamaksi solutyypiksi. Esimerkiksi myeloidinen kantasolu voi erilaistua valkosoluksi, mutta ei kuitenkaan punasoluksi. Unipotentilla kantasoluilla on kaikista rajallisin erilaistumiskyky, mutta ominaisuus jakautua toistuvasti. Jakautuminen mahdollistaa niiden tehokkaan hyödyntämisen terapeuttisessa regeneratiivisessa lääketieteessä. Unipotentit solut pystyvät muodostamaan vain yhtä solutyypistä kuten lihassoluja. (Zakrzewski ja muut 2019)

Kantasoluja voidaan eristää useista eri lähteistä kuten kuvasta 1 voidaan huomata. Kantasoluja voidaan eristää luuytimeä, verestä, napanuoran verestä, rasvakudoksesta ja alkioista. Normaalit solut voidaan ohjelmoida uudelleen indusoiduiksi pluripotentiksi kantasoluiksi eli iPS-soluiksi. (Zakrzewski ja muut 2019)



Kuva 1. Kantasolun erilaistumispotentiaali muuttuu ihmisen kehityksen aikana. Erilaistumispotentiaali vaihtelee blastokystan pluripotenttisista soluista aina aikuisen ihmiskehon tietyn kudoksen esimerkiksi ihon, keskushermoston tai luuytimen, unipotentteihin soluihin. Muokattu lähteestä (Zakrzewski ja muut 2019).

3 Nykyiset sovellukset

Kantasolut kykenevät uudistumaan ja erilaistumaan erilaisiksi solulinjoiksi. Viime aikoina kantasolujen käyttö on keskittynyt erityisesti niiden ominaisuuksien hyödyntämiseen regeneratiivisessa lääketieteessä ja tutkimuksissa. Kantasolujen kehitys lääketieteessä on jakautunut kolmeen osaan. Kantasoluhoidoja käytetään ensinnäkin muuttamaan muiden solujen käyttäytymistä tai niillä voidaan korvata ikääntymisen, sairauksien tai geneettisen muuntelun aiheuttamia vaurioita tai korvata tuhoutuneita soluja terveillä soluilla. Toinen lääketieteen suuntaus kantasoluilla on erilaistuneiden kudosten tuottaminen *in vitro* -tautimallien tutkimuksilla. Tällä tavalla voidaan parantaa sairauksia ja niiden hoidon molekyyli-tietämystä. Kolmas lääketieteen kehitys suunta on farmakologi eli lääketieteen ala, joka tutkii lääkeaineiden vaikutusta elimistöön. (Nazim ja Ahmad 2023)

Luuydin on tärkein kantasolujen lähde aikuisilla. Se on myös laajimmin tutkittu ja ymmärretty aikuisten kantasolujen populaatio. Luuydin sisältää multipotentteja mesenkymaalaisia kantasoluja (MSC -solut). Näillä soluilla on niin sanotusti ”kotiutumiskyky” eli kyky kulkea tulehtuneeseen tai vaurioituneeseen kudokseen tai kasvaimen muokkaamalla immuunijärjestelmän reaktioita ja vapauttamalla kasvutekijöitä. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää erilaisissa kliinisten sairauksien kohdennetuissa hoidoissa. (Nazim ja Ahmad 2023)

Vajaatoimintaisia ja vaurioituneita elimiä voidaan korvata terveillä elimillä, jotka saadaan luovuttajalta. Eläviä ja kuolleita luovuttajia on kuitenkin hyvin vähän saatavilla. Siksi halutaankin kehittää vaihtoehtoisia lähestymistapoja elinten tuottamiseen kudosspesifisillä kantasoluilla. Erityisesti iPSC-solujen sovellusten ansiosta regeneratiivisten hoitoja on parannettu. (Coronnello ja Francipane 2022) iPSC-solut ovat aikuisten somaattisia soluja, joita voidaan muuttaa pluripotentiksi kantasoluiksi. Kypsyneitä soluja muutetaan epäkypsiksi ilmentämällä geenitekniikan keinoin transkriptiotekijöitä, jotka luontaisesti ilmenevät alkion kantasoluissa. Tätä muutosprosessia kutsutaan uudelleenohjelmoinniksi. Tällä uudelleenohjelmoinnilla voidaan kasvattaa vaurioituneen kudoksen tilalle uutta tervettä kudosta (Nazim ja Ahmad 2023)

Kantasoluilla kudosten tuottaminen *in vitro* -menetelmällä antaa vaihtoehdon kudosten jälleenrakentamiseen ilman elinsiirtoa. Tällainen kudostekniikka yhdistää solubiologian ja materiaalitieteen ja siihen käytettävät biomateriaalit voidaan jakaa luonnosta saataviin materiaaleihin, luonnollisiin biologisiin huokosiin ja synteettisiin materiaaleihin. Autologisten kantasolujen tuottamalla materiaaleilla voidaan myös välttää elinsiirrossa ilmenevät ongelmat kuten hylkimisongelma tai immunosuppressiivisten lääkkeiden käytön ei-toivotut sivuvaikutukset.

iPS-soluteknologian avulla kantasolujen käyttö paikallisessa hoidossa voi johtaa ongelmiin. Kantasolut saattavat siirtyä keuhkokapillaarin pohjaan, mikä johtaa tukkeutumiseen, kaasunvaihdon heikentymiseen ja hemodynaamiseen häiriöön. (Nazim ja Ahmad 2023)

Turvallisuus ja tuotannon tehokkuus ovat ratkaisevia tekijöitä pluripotenteista soluista peräisin olevien terapeuttisten lääkkeiden ja hoitojen rutiinikäytössä ja kliinisissä sovelluksissa. Tällä hetkellä terapeuttisia kliinisiä tutkimuksia tehdään pääasiassa vain iPSC- tai ESC-soluille. Taulukossa 1. on listattu iPSC- ja ESC-solujen viimeaikaisia kliinisiä tutkimuksia ja niiden tulokset. (Colter ja muut 2021)

Taulukko 1. iPSC- ja ESC-solujen viimeaikaisia kliinisiä tutkimuksia. Muokattu lähteestä (Colter ja muut 2021)

Johdettu solutyyppi	Bioprosessien ominaisuudet	Populaation karakterisointistrategiat	Tulokset /kokeen tila
hESC-peräinen verkkokalvon pigmentti epiteeli (allogeeninen)	hiiren hESC 2D-viljelyssä, erilaistamisstrategiaa ei julkistettu, prosessin aikaista seurantaa ei julkistettu. GMP:n noudattaminen.	Morfologia, solujen lukumäärä, pigmentaatio, solujen toimintamääritykset, steriilisyystestaus, mykoplasmatestaus, endotoksiinianalyysi.	Vaihe I saatettu päätökseen, tuloksia pidetään suotuisina
iPSC-soluista johdetut mesenkymaaliset kantasolut (allogeeninen)	Cymerus-alusta (2D-järjestelmä) syöttölaite, vapaissa olosuhteissa, prosessin seurantaa ei ole kerrottu.	mRNA qPCR, vasta-ainevärjäys virtausytometriä, vertaileva genomihybridisaatio, yhden nukleotidin polymorfismianalyysi, globaali transkriptomianalyysi, GMP-vaatimusten mukainen valmistus.	Vaihe I on saatu päätökseen. Lyhyen aikavälin turvallisuus varmistettu. Häiriötekijät peittivät alleen mahdollisen tehokkuuden
hESC-peräiset sydän- ja verisuonitautien esiasteet (allogeeninen)	hESC hiiren syöttölaitteella staattinen 2D-viljely, prosessin aikaista seurantaa ei ole kerrottu.	Morfologia, solujen lukumäärät, markkerivärjäykset, mikroskooppinen kuvantaminen, FACS (hESC/sydänten esiasteiden markkerit), HLA-fenotyypin määrittäminen, GMP:n noudattaminen.	Vaihe I saatu päätökseen, lyhytaikainen turvallisuus varmistettu, oireiden lievästi parantuneet tulokset.

iPSC:stä peräisin olevat verkkokalvon pigmenttiepiteelilevyt (autologiset)	2D iPSC-viljely, kylväminen kollageenin tyyppi I -geeliin, monokerroksen muodostaminen, prosessin aikainen seuranta ei ole kerrottu.	Morfologia, pigmentaatio, RPE-markkereiden RT-PCR, kasvutekijöiden määritykset (ELISA), mikrosirujen genomiikka, DNA-metylaatiotestaus, kopiolukuvariaatioanalyysi, GMP-vaatimusten noudattaminen.	Tutkimus keskeytettiin kahden potilaan jälkeen. Todettiin tehottomaksi ja turvallisuuteen liittyviä huolenaiheita.
ESC-peräiset astrozyytit (allogeeniset)	Ei julkaistu	Ei julkaistu	Koe on päättynyt, tuloksia ei ole julkaistu
ESC:stä peräisin olevat neuraaliset esisolut (NPC) (allogeeniset)	EB-neuraalinen erilaistumisstrategia, jota ei ole julkistettu prekliinisten ihmisen ESC-johdannaisten osalta.	Ei julkaistu	Ei tiedossa

in vitro – tautimallin avulla suoritetuilla iPSC-solujen tutkimuksilla voidaan huomata kehitys ja potentiaali solujen kliinisessä käytössä. iPSC-solujen puutteet ja kriittiset vaiheet korostuvat myös. Esimerkiksi tutkimuksissa on ollut valtavasti häiriötekijöitä ja mahdollisia hidasteita. Tulokset ovat epävarmoja tai laatu ei ole halutulla tasolla. (Colter ja muut 2021)

Kantasoluhoidojen ja -tuotteiden sääntely on todella tärkeää, mutta siitä huolimatta monet kantasoluklinikat tarjoavat huonosti tutkittuja hoitoja ilman selkeää ymmärrystä ja antavat epärealistisia toiveita. Yhdysvalloissa ainoat säätelyviranomaisen hyväksymät kantasoluhoidot ovat hematopoeettisia kantasoluja veri- ja immuunisairauksien ja tiettyjen syöpien hoitoon. Silmän kantasoluihin perustuva hoito on hyväksytty Euroopassa. Tällä hoidolla voidaan parantaa sarveiskalvon vaurioita. Muut kantasoluhoidot ovat vasta hyvin kokeellisia. (Nazim ja Ahmad 2023)

4 Kantasolujen viljely

Aikuisten neuraalisten kantasolujen viljely on tärkeää, kun halutaan tarkastella kantasolujen ominaisuuksia, erilaistumispotentiaalia ja ymmärtää laajemmin solujen toimintaa. (Ahmed ja muut 2021) Bioprosessitekniikka ja sen käytännöt ovat kehittyneet jo sen verran pitkälle, että voidaan tuottaa kliinisesti toimivia pluripotentteja kantasoluja myös isompia määriä solu- ja kudoslähdemateriaaliksi kliinisiin tutkimuksiin ja terveydenhuoltoon. Prosessit ovat edelleen heterogeenisiä, mutta kehitystä tapahtuu jatkuvasti. (Colter ja muut 2021) Kantasolujen bioprosessoinnissa voidaan tuottaa laajoja automatisoituja valmistusprosesseja kantasolupohjaisille lääkkeille. Tämän mahdollistamiseksi ja laadun varmistamiseksi bioreaktorijärjestelmiä pitää kehittää niin, että niillä pystytään hallitsemaan ja tarkastelemaan jokaista solua erikseen. Bioreaktorit pitää suunnitella jäljittelemään *in situ* -kantasolujen mikroympäristöä, happipitoisuutta ja fysiologisia ominaisuuksia. (Cha ja muut 2019)

Erityisesti happi on tärkeässä osassa solujen aineenvaihdunnassa ja siksi yksi tärkeimmistä tekijöistä kantasolujen ympäristössä. Matala happipitoisuus viljelyn aikana vaikuttaa linjaspesifiseen erilaistumiseen säätelyn aikana. Jos ihmisen mesenkymaaliset kantasolut kasvatetaan matalassa happipitoisuudessa (1–5 %), ne muodostavat suuremmalla todennäköisyydellä soluryppäitä. Matalassa happipitoisuudessa kasvaneet solut ilmentävät enemmän kantasolujen ominaisuuksia kuin normaalissa happipitoisuudessa (10–21 %) kasvaneet solut. Mesenkymaalisten solujen uudistumiskyky säilyttää erilaistumispotentiaalin hypoksisissa olosuhteissa. Tällaisissa olosuhteissa ilmenevät erilaiset sytokiinit ovat myös suoraan yhteydessä lisääntymis- ja erilaistumiskyvyn paranemiseen soluissa. Hapensaanti vaikuttaa myös alkion kantasolujen erilaistumispotentiaaliin. Bioreaktoreissa pystytään säätämään happipitoisuutta hyvinkin tarkasti myös eri mittakaavoissa. Modulaarisessa bioreaktorissa on pystytty luomaan eristettyjä happigradienteja, joissa ruston kehittyminen tehostuu. Rasvasolujen muodostaminen vaatii reaktorissa 20 % happipitoisuuden. Näistä tuloksista pystytään muodostamaan matemaattisia mallinnuksia, joilla voidaan laajentaa bioprosessien suunnittelua ja toteutusta kantasoluterapioiden tuotantoa varten. (Cha ja muut 2019)

Mekaaniset ärsykkeet on otettava huomioon soluviljelyssä, koska ne vaikuttavat *in vivo* -mikroympäristöön. Mekaaniset voimat säätelevät esimerkiksi luun, ruston, lihaksen ja sydän- ja verisuonikudosten kudoskehitystä ja kudostenmuutosta. Mekaaniset rasitukset voivat vaikuttaa merkittävästi solun ulkoihin matriiseihin. Solun pinta saattaa muuttua, kuten myös solun pinnan integriinejä sitovat kohdat saattavat muuttua. Mekaaniset voimat voivat vaikuttaa solujen erilaistumisreitteihin. Tätä on sovellettu laajasti kudosten morfogeneesin ohjaamiseen kantasoluista. (Cha ja muut 2019) Esimerkiksi myofibroblasteja kasvatettiin bioreaktorissa, jossa

käytettiin myös syklistä mekaanista venytystä, jonka ansiosta solut erilaistuivat sileiksi lihassoluiksi. On kehitetty bioreaktori, jolla voidaan toteuttaa mekaanisissa olosuhteissa kasvavien solujen ympäristö, esimerkiksi keinotekoisien ruston valmistamiseksi. (Hung ja muut 2004) Toinen kehittynyt bioreaktori mukaillee nivelsidekudoksen fysikaalista mikroympäristöä kasvuympäristöä, kuten dynaamista jännitystä ja vääntöä. Edellä mainitut bioreaktorit jäljittelevät fysiologisia kuormitusympäristöjä. Tämän ansiosta on saatu lisää selvyyttä kantasolujen käyttäytymisestä sekä uusia tekniikoita toiminnallisen kudoksen muokkaamiseen. (Cha ja muut 2019)

Leikkausjännitystasot vaikuttavat verisuonten endoteeli- ja sileiden lihassolujen toiminnallisiin ominaisuuksiin. Kun valmistetaan indusoituneista pluripotentista kantasoluista peräisin olevia endoteelisoluja, pitää bioreaktorissa olla mahdollisuus simuloida verenvirtausta ja antaa biomimeettistä leikkausstressiä. Tämän ansiosta virtausbioreaktorissa on kasvatettu ihmisen indusoiduista pluripotentista kantasoluista peräisin olevat endoteelisolut valtimon soluiksi vain 24 tunnissa. Tästä on myös kehitetty bioreaktori, jossa voidaan luoda verisuonikudoksen mekaanista kuormitusta mallintava ympäristö, jolloin MSC-solut altistettiin leikkausjännitteelle ja syklistä venytykselle. MSC-solut erilaistuivat enterokromaffiinisoluiksi eli ruoansulatuskanavan ja keuhkojen soluiksi. Virtauksen leikkausjännitys voidaan tuottaa myös perfuusion avulla. Suora perfuusio on kantasoluille hyväksi, koska solutiheys ja soluväliaineen (extracellular matrix, ECM) tuotto lisääntyy, mikä edistää ravinteiden ja hapen kuljettamista kaikkiin solun osiin. Korkeilla leikkausjännitteillä on myös huonot puolet. Liian korkeana se voi aiheuttaa pyörteitä, jotka vuorovaikuttavat solupinnan kanssa ja aiheuttavat vaurioita. Siksi pyörimisnopeus on määritettävä tarkasti, jotta hydrodynaamista leikkausjännitystä syntyisi mahdollisimman vähän. (Cha ja muut 2019)

Bioreaktorissa pyritään pitämään jatkuva tuotanto ja sen prosessointi tasaisena. Jatkuva prosessointi on myös tärkeää ja hyödyllistä bioprosessien ja tuotettujen kantasolujen laadunvalvonnan, toistettavuuden, validoinnin ja turvallisuuden kannalta. Automatisointi on helpompi yhdistää tuotantoon ja silloin voidaan vähentää ihmisen toimenpiteitä. Onttokuituperfuusiobioreaktori (HFPB) mahdollistaa reaaliaikaisesti viljelyparametrien seurannan bioprosessin aikana. Sillä voidaan tuottaa kliinisessä mittakaavassa ihmisen luuytimestä peräisin olevia kantasoluja. Väli tuotteiden seuranta auttaa käsittelemään erien välistä vaihtelua esimerkiksi ravinteiden tarvetta ja optimaalista keräysajankohtaa. (Cha ja muut 2019)

PSC-soluja voi tasoviljellä, jolloin ne kiinnittyvät pintasubstraatteihin ja kasvavat yhdessä kerroksessa. Suspensiobioreaktoreissa PSC-solut kasvavat yhteen muodostaen pallomaisia soluagregaatteja. Soluagregaatit ovat tärkeitä myöhempää erilaistumista varten. (Lee ja muut

2020) Viljelyyn voidaan valita kiinteä kantaja, johon solut kiinnittyvät tai suspensoituvat. Viljelypinta tai pinnan muuttuminen vaikuttaa merkittävästi solun rakenteellisiin ja morfologisiin ominaisuuksiin. Se muuttaa solun geenien säätelyreittejä ja näin vaikuttaa fenotyyppiin. (Colter ja muut 2021)

Kantasolujen bioprosessoinnissa on hallittava useita parametrejä samaan aikaan, otettava huomioon kliiniset perusvaatimukset kuten terapeuttinen teho, puhtaus, stabiilisuus, turvallisuus ja laatuun. Yhtä skaalautuvaa bioreaktorijärjestelmää, joka pystyisi kontrolloituaan fysikaaliskemialliseen viljely-ympäristöön ja tehokkaaseen viljelyparametrien valvontaan, ei ole vielä kehitetty. (Cha ja muut 2019) Jos kantasoluja halutaan tulevaisuudessa valmistaa luotettavasti ja varmasti suuremmalla tuotannolla potilaille on tehtävä useita optimoituja operaatioita, tuotannon laadun varmistamiseksi. Laadunvarmistuksessa on otettava huomioon valmistusprosessi, soluviljelyn siemennys, solumäärän suurentamisvaihe, erilaistuminen, solujen kerääminen, pesu, konsentroidi, täyttö ja loppukäsittelyt. Erityisesti soluviljelyprosessit ovat haastava pullonkaula, johon tulee kiinnittää huomiota. (Colter ja muut 2021)

5 Kantasolujen valmistuksen suurimmat haasteet

Tällä hetkellä kantasolujen tuotannon suurimpia haasteita ovat laadunvarmistus, tuotannon standardisointi, viljelyaikojen pituus, solujen työläs karakterisointi ja kallis tuotanto. Näiden haasteiden takia on tullut tarvetta nopeammille ja laadukkaimmille menetelmille kantasolujen tuotannossa, solujen identiteetin ja toiminnan vahvistamiseksi erityisesti iPSC-valmistusprosesseissa ja niiden erivaiheissa. (Coronnello ja Francipane 2022)

Erityisesti solujen tasoviljelytekniikat ovat nykypäivänä hyvin riittämättömiä. Niitä on käytetty pienissä tutkimuksissa ja joissain varhaisen vaiheen kliinisissä kokeissa. Tätä tuotantotapaa ei voi kuitenkaan soveltaa isommassa mittakaavassa, myöhäisimpiin kliinisiin tutkimuksiin tai kaupalliseen valmistukseen. Kertakäyttöiset bioreaktorit ovat mahdollisesti toimiva ratkaisu tähän ongelmaan, mutta ne on optimoitava PSC:n tuotannon prosessivaatimuksille sopiviksi. Tämän takia allogeenisten soluterapiatuotteiden kaupallisen valmistuksen haasteita ovat skaalautuva valmistusteknologia, jolla voidaan luotettavasti valmistaa myös PSC-kantasoluja, jotta laatu ja saanto olisivat riittävän korkealla tasolla. Bioreaktoreissa muodostuneiden soluaggregaattien koolla on myös vaikutusta kantasolujen laatuun. Ravinteet, kasvu- ja erilaistumistekijät eivät välttämättä siirry tasaisesti aggregaattien sisälle, jos solu aggregaatit ovat liian isoja. Tämä johtaa ei toivottuihin solukuolemiin. Vastaavasti liian pienet PSC aggregaatit eivät laajene tai erilaistu yhtä tehokkaasti, jolloin saanto pienenee. Elinkelpoisimman PSC-aggregaatin halkaisijan tulisi olla noin 300 µm seitsemän päivän kasvatuksella. Soluaggregaatin yksilöllinen optimaalinen koko riippuu useasta tekijästä, kuten laajentumis- tai erilaistumisprosessin vaiheista. Myös solun ulkoiset tekijät vaikuttavat solujen kehittymiseen ja laatuun. (Lee ja muut 2020)

iPSC-protokollien suurimpia haasteita ovat erilaistumistehokkuus sekä niiden uudelleenohjelmoinnin tehokkuus. iPSC-solujen tuotannon erilaistumisvaiheessa saattaa syntyä monia erilaisia fenotyyppisiä ja silloin erilaistumistulokset vaihtelevat suuresti. iPSC-solujen viljelyn alussa soluilla on epigeneettinen muisto kudoksesta, josta solu on eristetty ja/tai johdettu. Tämän takia solujen on mahdollista palata alkuperäsoluikseen. Uudelleenohjelmoinnissa genomit ovat hyvin epävakaita ja niissä tapahtuu pieniä vaihteluja viljelyn edetessä. Nämä muutokset voivat vaikuttaa iPSC-solun vasteeseen erilaistumiselle, jolloin sen toiminnasta saattaa tulla erilainen kuin on tavoite. Epäkypsyä sikiövaihe on hyvin lähellä iPSC-solujen tuotannon lopputuotetta. Jos jokin tuotannossa ei onnistu, solutuotteen kontaminaatiojäännökset, eli erilaistumattomat iPSC-solut, voivat haitata merkittävästi iPSC-pohjaisten hoitojen tehokkuutta sekä aiheuttaa komplikaatioita hoitojen vastaanottajalle. (Coronnello ja Francipane 2022)

Kantasolujen tunnistaminen ja eristäminen potilaasta tai luovuttajasta ei ole yksinkertaista. Vaikka immunologinen hylkiminen ei ole kovinkaan yleistä, se saattaa myös vaikuttaa kantasolusiirron onnistumiseen. Koska kantasolujen valmistus- ja siirtoprosessi on haastava ja vaativa, on vaikea varmistaa tuotteen johdonmukaisuus ja karakterisoituminen turvalliseksi tuotteeksi. Kantasolun farmakokineettistä käyttäytymistä on seurattava tarkasti prekliinisissä tutkimuksissa. Hylkimisreaktion muodostumiseen voi myös vaikuttaa tietämättömyys kantasolun täydestä vaikutusmekanismista käytettyyn sairauteen. Kantasolut erittävät kasvutekijöitä ympäristöönsä, joiden avulla ne voivat käynnistää erilaistumisensa. Aikuisten multipotenteilla kantasoluilla ei ole yksilöllisiä epitooppeja, jonka takia homogeenisten kantasolupopulaatioiden eristäminen on melkein mahdotonta. Solujen siirtyminen ympäröiviin kudoksiin esimerkiksi aivoissa tai sydämessä on myös todella haastavaa. (Nazim ja Ahmad 2023)

Aikuisten kantasolut saattavat muuttua epigeneettisesti. Kantasolujen geneettinen epävakaus voi johtaa kromosomipoikkeavuuksiin ja sen seurauksena syöpäkasvaimen syntyyn. Ennen kantasolupohjaisen terapian aloittamista on tehtävä tuotteelle geneettinen analyysi. Esimerkiksi syöpäkantasolut voivat muodostaa kasvaimen tai edistää olemassa olevan kasvaimen kasvua. Mutageenisuus voi johtua myös viruksen genomien integroitumisesta iPSC-soluun, koska näitä soluja ohjelmoidaan muun muassa retro- ja lentivirustekniikoilla. Vakavissa sairauksissa kantasoluhoidot saattavat olla kannattavia, mutta lievemmissä sairauksissa kantasoluhoidot saattavat myös pahentaa tilannetta. (Nazim ja Ahmad 2023)

6 Kantasolupohjaisten tuotteiden laadunvalvontamenetelmät

Kantasolupohjaisia tuotteita valmistetaan kliinisiin ja teollisiin sovelluksiin ja siitä johtuen on iso tarve kehittää laadunvalvontaa valmistuksen standardoimiseksi. Laadulla on tärkeä osa regeneratiivisen lääketieteen sovellusten onnistumisessa ja siksi kantasolujen valmistuksen valvontaa on tehostettava *ex vivo* -olosuhteissa huolellisesti. Tällä hetkellä laadunvalvonta perustuu pääasiassa yksittäisten soluviljelyasiantuntijoiden suorittamaan visuaaliseen analysointiin ja tarkastukseen. (Hirose ja muut 2021)

Kantasolujen spesifinen tunnistaminen viljelyssä on rajoittava tekijä eri sovelluksille, koska vielä ei ole pystytty kehittämään luotettavia merkkiaineita solupinnalle. On kuitenkin vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä, kuten kloonianalyysi keratinosyytti kantasoluille. Tämä yksisolainen kloonianalyysimenetelmä on hyvin aikaa vievä ja kallis menetelmä. (Hirose ja muut 2021). Solutuotteet pitää erityisesti arvioida tuotannon eri vaiheissa ja se on edellytys turvalliselle ja tehokkaalle autologiselle solujen korvaamiselle. Tällä hetkellä arviointi tapahtuu koulutettujen soluviljelyasiantuntijoiden harkinnalla. Asiantuntijat määrittävät esimerkiksi iPSC:n solun sisäisten muutosten ja linjamarkkerien perusteella solujen laatua. Tämä on erittäin työlästä ja yksipuolista tarkastelua, jossa saattaa aiheutua useita virheitä. Tämän takia terapeuttien kantasolulinjojen laaduntarkastus ei saisi olla pelkästään manuaalisen laadunvalvonnan varassa. Seulontaa tehdään useassa tuotannon vaiheessa. Ensin uudelleenohjelmoinnin vaiheessa, jolloin voidaan valita erityisesti somaattiset solut, jotka ovat täysin iPSC-soluja. Seuraavaksi seulotaan laajentumisvaiheessa, jolloin soluerästä voidaan seuloa pois kaikki epävakaa ja epäonnistuneet solut. Viimeinen seulonta tapahtuu erilaistumisvaiheessa, jossa valitaan toiminnalliset ja valmiit solut hoitoja varten. (Coronnello ja Francipane 2022) Solujen maksimaalinen lisääntyminen, fenotyypin merkkiaineet ja leikkausjännityksen käyttö eivät ole tarpeeksi tarkkoja, jotta solupopulaation laatu voitaisiin päätellä näiden parametrien avulla. (Colter ja muut 2021)

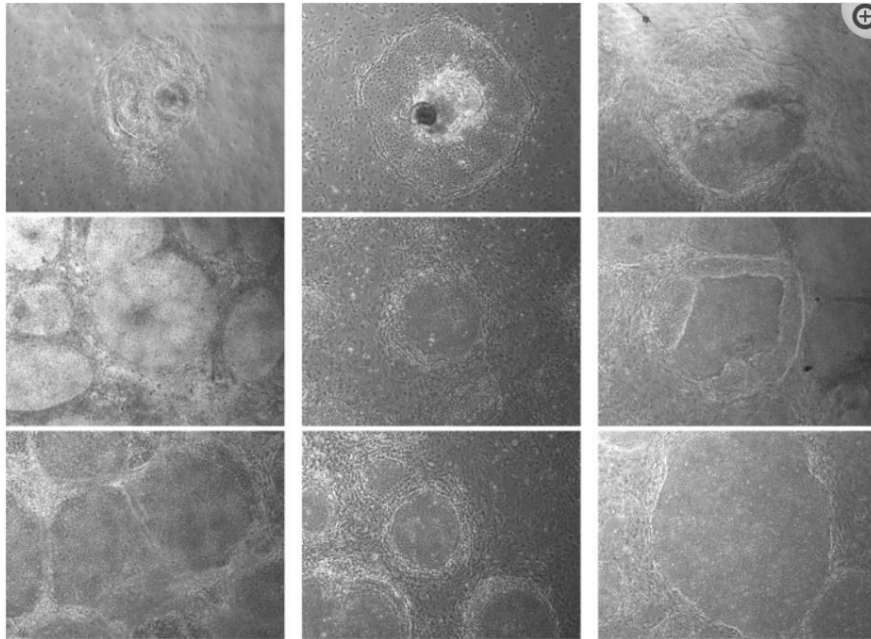
Kuva-analyysin ja digitalisoitumisen myötä on kehitelty useita menetelmiä solujen kuvantamiseen ja luokitteluun. Laskennallisen kuva-analyysin tuottama data solukuvista on todella moniulotteista, joten tekoälyä ja koneoppimisen algoritmeja on hyödynnetty yhä enemmän erityisesti luokittelumenetelmissä. Nämä menetelmät pystyvät luomaan ennusteita syötteiden perusteella ja suurista datajoukoista. Koneoppimisen algoritmeilla voidaan vaikuttaa bioprosessien tehokkuuteen ja tuoton lisäämiseen. (Coronnello ja Francipane 2022)

iPSC teknologian avulla pyritään korjaamaan elimiä. Tämän saavuttamiseksi solutuotteiden laatu ja turvallisuus täytyy pystyä todentamaan. iPSC- solujen kliinisessä käytössä on useita epävakauksia ja hidastuksia. Laatua ja turvallisuutta pitäisi pystyä standardisoimaan eri

protokollien mukaisesti ja toiminnan erilaistumisen käynnistämiseksi. Yksi suurimmista tekijöistä edesauttamaan kantasolujen tuotannon standardisointia on tekoälyn hyödyntäminen tuotannon erivaiheissa. Eräessä tutkimuksessa, koneoppimismenetelmällä seurattiin mikroskooppikuvista iPSC-solujen erikoistumista. Kun tutkimuksen kuvantamisesta oli kulunut 3-5 päivää, kaikki iPSC-solut ja kudoksen muut solut merkittiin jälkikäteen mikroskopiavideoon. Soluissa tarkasteltiin solun yhtätoista erilaista morfologista ominaisuutta kuten tilavuutta, pinta-alaa, pallomaisuutta, liikkumisnopeutta sekä tuman ja sytoplasman tilavuuden suhdetta. Nämä ominaisuudet voitiin mallintaa kuvantamisen eri ajankohtina. Lopulta ennustemallin rakentamiseen käytettiin kuutta parasta ominaisuutta ja aikaikkunaa. Tällaisen ennustemallin rakentamiseen hyödynnetään XGBoost-algoritmia. (Coronnello ja Francipane 2022)

Kantasolujen laadun tarkastusta voidaan tarkastella myös iPSC pesäkkeiden avulla. Pesäkkeiden laatua voidaan seurata kontrollikuvilla, jonka jälkeen ominaisuuksien tarkastelu voidaan suorittaa SIFT:llä (Scaled Invariant Feature Transformation). Tässä kuvantamisessa hyödynnetään syöttösoluja. Solut jaetaan kolmeen luokkaan: hyvä, kohtalainen ja huono, jotka näkyvät kuvassa 2. Tällaista menetelmää voidaan parantaa hyödyntämällä ECOC (an error-correcting output code) tekoälymenetelmää. Toinen mahdollinen tapa mallintaa pesäkkeiden laatua on käyttää kirkkaan kentän mikroskooppien kuvantamista ja CNN:ien (Convolutional neural network) yhdistelmää. CNN-mallin avulla voidaan etsiä kaikki merkitsemättömät iPSC-pesäkkeet ja havaita niiden koko ja reunat. Tästä voidaan piirtää kasvukäyrä, kun pesäkkeistä mitataan pinta-ala eri aikoina uudelleenohjelmoinnin induktion jälkeen. Kaikki epänormaalisti kasvavat pesäkkeet, kuten ylikasvaneet tai vajaiksi jääneet täytyy määrittää manuaalisesti. Normaaleista pesäkkeistä voidaan HMM (Hidden Markov Model) -mallin avulla ennustaa oikea aikaikkuna, milloin on paras aika kantasolujen keräämiselle. Vektoripohjainen CNN luokittelee terveet ja epäterveet pesäkkeet ottaen huomioon tekstuurin ja morfologiset ominaisuudet. Tekstuuripiirteitä voidaan valita tarkasteluun yli sataviisikymmentä kappaletta ja ne, määritellään kvantitatiivisesti segmentoiduista solupesäkkeiden alueista koneoppimisen lukijoiden avulla. Tällaisella lähestymistavalla saadaan luotettava luokittelutarkkuus, joka on noin 82,5-92,7%. Koneoppimista voidaan hyödyntää myös esimerkiksi iPSC-solujen rakenneosien selvittämisessä. iPSC-solujen osat voidaan myös tunnistaa kolmiulotteisissa kudoksissa CNN-pohjaisella Cell Profiler 3.0 -

ohjelmistolla, joka tukee koko tilavuuden ja 3D-kuvapinojen analyysiä. (Coronnello ja Francipane 2022)



Kuva 2: Esimerkki kuva iPSC-pesäkkeiden luokittelusta. Ensimmäinen rivin solut ovat huonoja, toisen rivin kohtalaisia ja kolmannella rivillä ovat hyviä. (Joutsijoki ja muut 2016)

Koneoppimismenetelmät voivat tunnistamisen ja luokittelun lisäksi arvioida iPSC-peräisten solujen erilaistumista ja toimintaa. CNN:t voidaan ohjelmoida ennustamaan laatua vain morfologian perusteella, josta voidaan arvioida sisältääkö esimerkiksi iPSC-alkuperäisiä endoteelisoluja. Ennusteet voidaan perustaa esimerkiksi pan-endoteelin merkkiaineeseen tai immunofluoresenssivärjäykseen. iPSC-peräisten solujen laadun arvioimiseen käytetään myös kirkaskenttämikroskopiaa, jonka avulla solut voidaan luokitella normaaleiksi tai epänormaaleiksi. Kirkaskenttämikroskopian ja koneoppimistekniikan yhdistämisellä voidaan havaita muun muassa kantasolujen mahdollisia morfologisia muutoksia, kun ne altistetaan jollekin lääkeyhdisteelle.

Koneoppimismenetelmät toimivat hyvin solujen erikoitumisreittien ja vaurioiden analyyseissä. Ei kuitenkaan ole vielä löytetty yhtä tiettyä toimivaa menetelmää, jolla voidaan varmistaa kantasolujohdannaisten tuotteiden laatu. Laatu on suoraan kytköksissä tehokkaaseen erilaistumiseen, siksi viljelyvaiheessa on tehtävä tarkkoja päätöksiä esimerkiksi siitä, milloin on oikea aika siirtää soluaggregaatti ja mikä on paras solutiheys *in vitro* -olosuhteissa. On päädytty kuitenkin siihen tulokseen, että tekoäly, joka soveltaa koneoppimista ongelmien ratkaisuun, voisi olla paras tapa lähestyä näitä laatuksymyksiä.

7 Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät

Kantasolujen tuotanto on kehittynyt vuosien varrella paljon, mutta se ei tarkoita sitä, että kantasolut olisivat jo kokonaan valmis terapeuttinen tuote tai hoitomuoto. Kantasolutuotteiden rakenteen ja toiminnan ymmärtäminen vie aikaa. Sellaisen kasvuympäristön luominen kantasoluille, jossa voidaan olla varmoja, että kantasolujen laatu on homogeeninen läpi jokaisen erän, on tällä hetkellä lähes mahdotonta. Jokainen solu on yksilö ja ne vaativat yksilölliset kasvuolosuhteet.

Kantasolutoiminta aiheuttaa, jonkun verran myös vastustusta. Alkion kantasolujen käyttöön liittyy esimerkiksi eettisiä kysymyksiä, jotka varjostavat niiden käyttöä kliinisessä tutkimuksessa. Onneksi iPSC-solujen tuotanto mahdollistaa alkionkantasolujen siirtämisen pois kliinisestä käytöstä. Eettisten kysymysten lisäksi tämä kantasolujen merkitys lääketieteenkehitykselle on osittain jopa vaarallista ja on johtanut jopa tieteellisiin huijauksiin. Lääketieteellinen aikakauslehti Lancet, on joutunut vetämään takaisin artikkeleitaan niiden puutteellisuuden takia. (Nazim ja Ahmad 2023)

Ehkä kaikista huolestuttavinta kantasolujen valmistamisessa on sen laadunvarmistuksen puutteellisuus ja epäluotettavuus. Jos kantasolujen laadun varmistus perustuu pääasiassa vain asiantuntijoiden suorittamaan visuaaliseen tarkastamiseen, on vaikea uskoa, että laadunvarmistus voi olla millään tavalla luotettavaa. Uskon, että ennen kuin toimivien kaupallisten suurten erien kantasolutuotantoa kehitetään pidemmälle, on ensin keskityttävä kantasolujen laadunvalvonnan kehittämiseen. Tekoälyn avulla on pystytty tekemään merkittäviä parannuksia menetelmien nopeuteen, laatuun ja kustannuksiin. Näin ollen on mahdollista, että iPSC-solujen valmistus voi siirtyä muutamien vuosien kuluessa kunnolla kaupalliseen vaiheeseen. Nykyaikaiset tekoälymenetelmät, kuten koneoppiminen, voivat paitsi toimia apuna ihmisen toiminnalle, myös jonain päivänä tukea tai jopa korvata päätöksentekoa. Tarvitaan kuitenkin vielä paljon pohjatyötä, ennen kuin näitä menetelmiä voidaan soveltaa kliiniseen käyttöön.

8 Lähdeluettelo

- Ahmed, A., Isaksen, T. & Yamashita, T. (2021) Protocol for mouse adult neural stem cell isolation and culture. *STAR PROTOCOLS* **2**.
- Cha, J., Lee, M. & Hong, J. (2019) Bioreactor systems are essentially required for stem cell bioprocessing. *PRECISION AND FUTURE MEDICINE* **3**:19–23.
- Colter, J., Murari, K., Biernaskie, J. & Kallos, M. S. (2021) Induced pluripotency in the context of stem cell expansion bioprocess development, optimization, and manufacturing: A roadmap to the clinic. *NPJ REGENERATIVE MEDICINE* **6**.
- Coronnello, C. & Francipane, M. (2022) Moving Towards Induced Pluripotent Stem Cell-based Therapies with Artificial Intelligence and Machine Learning. *STEM CELL REVIEWS AND REPORTS* **18**:559–569.
- Hirose, T., Kotoku, J., Toki, F., Nishimura, E. & Nanba, D. (2021) Label-free quality control and identification of human keratinocyte stem cells by deep learning-based automated cell tracking. *STEM CELLS* **39**:1091–1100.
- Hung, C. T., Mauck, R. L., Wang, C. C. B., Lima, E. G. & Ateshian, G. A. (2004) A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. *Ann Biomed Eng* **32**:35–49.
- Joutsijoki, H., Haponen, M., Rasku, J., Aalto-Setälä, K. & Juhola, M. (2016) Error-Correcting Output Codes in Classification of Human Induced Pluripotent Stem Cell Colony Images. *Biomed Res Int* **2016**:3025057.
- Lee, B., Borys, B., Kallos, M., Rodrigues, C., Silva, T. & Cabral, J. (2020) Challenges and Solutions for Commercial Scale Manufacturing of Allogeneic Pluripotent Stem Cell Products. *BIOENGINEERING-BASEL* **7**.

- Nazim, S. & Ahmad, S. (2023) Stem cell research, regenerative medicine and challenges. *JOURNAL OF THE PAKISTAN MEDICAL ASSOCIATION* **73**:S143–S147.
- Oh, I. & Kim, D. (2002) Three-dimensional approach to stem cell therapy. *JOURNAL OF KOREAN MEDICAL SCIENCE* **17**:151–160.
- Wang, Y., Xu, C. & Ow, H. (2013) Commercial Nanoparticles for Stem Cell Labeling and Tracking. *THERANOSTICS*. PO BOX 4546, LAKE HAVEN, NSW 2263, AUSTRALIA: IVYSPRING INT PUBL.
- Zakrzewski, W., Dobrzynski, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. (2019) Stem cells: Past, present, and future. *STEM CELL RESEARCH & THERAPY* **10**.