



**INSTYTUT
GENETYKI CZŁOWIEKA**
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Magdalena Murzyn

**Opracowanie produktu leczniczego
terapii zaawansowanej opartego na
mezenchymalnych komórkach stromalnych
w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego**

Rozprawa doktorska przygotowana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN

Promotor: dr hab. n. med. Natalia Rozwadowska, prof. IGC PAN

Opiekun/promotor pomocniczy: dr n. biol. Tomasz Ołdak

Praca została zrealizowana w ramach:

- III edycji programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Doktorat wdrożeniowy”, DWD/3/27/2019; Przedsiębiorca biorący udział w programie: Polski Bank Komórek Macierzystych sp. z o.o.
- projektu „Opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartego na komórkach mezenchymalnych galarety Whartona w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego”, POIR.01.02.00-00-0024/17-00 (NCBiR, Program sektorowy InnoNeuroPharm w ramach działania 1.2 „Sektorowe programy B+R” w ramach I osi priorytetowej „Wsparcie prowadzenia prac B+R przez przedsiębiorstwa” Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020, projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego). Beneficjent: Polski Bank Komórek Macierzystych sp. z o.o.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	3
WYKAZ SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	14
SUMMARY	18
1. WSTĘP.....	22
1.1. Stwardnienie zanikowe boczne	22
1.1.1. Aktywacja mikrogleju w odpowiedzi na stres lub uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w ALS.....	25
1.1.2. Zaburzenia układu odpornościowego w ALS	27
1.1.3. Diagnostyka i leczenie ALS	29
1.1.4. Biomarkery – możliwość szybkiej i łatwej diagnozy oraz predykcji terapii ALS	31
1.2. Komórki MSC jako produkt terapii komórkowej	33
2. CELE PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY	41
3.1. Utworzenie banku produktów ATMP (ang. <i>advanced therapy medicinal products</i> , produkt leczniczy terapii zaawansowanej) opartych na allogenicznym komórkach mezenchymalnych z galarety Whartona zgodnie z obowiązującymi normami Dobrej Praktyki Produkcyjnej cGMP (ang. <i>current Good Manufacturing Practice</i> , aktualna Dobra Praktyka Produkcyjna)	41
3.1.1. Izolacja WJ-MSK z ludzkiej pępowiny (materiał wyjściowy).....	43
3.1.2. Ekspansja <i>ex vivo</i> komórek WJ-MSK	43
3.1.3. Formułacja produktu komórkowego i jego kriokonserwacja	44
3.1.4. Charakterystyka i zwolnienie produktów WJ-MSK zgodnie z ustaloną specyfikacją produktu końcowego	44
3.2. Rozszerzona charakterystyka banku z produktami WJ-MSK i jego klasteryzacja	46
3.2.1. Test komórkowy jednostek tworzących kolonie (CFU) z rozmrożonych produktów komórkowych.....	47

3.2.2.	Ekspresja wybranych genów dla 14 linii komórkowych WJ-MSC opartego na tzw. teście panelu bezpieczeństwa molekularnego (zgłoszenie patentowe nr P.433374 pt. <i>Zastosowanie zestawu genów do określania potencjału teratogennego komórek mezenchymalnych</i> , które uzyskało patent 2 sierpnia 2022 r.).....	48
3.2.3.	Izolacja całkowitego RNA z produktów komórkowych WJ-MSC – oczyszczanie, pomiar stężenia oraz kontrola jakości RNA.....	48
3.2.4.	Odwrotna transkrypcja RNA przy użyciu Maxima H Minus Kit.....	49
3.2.5.	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) na bazie zaprojektowanych płytek PrimePCR Custom Plate 96W wraz z oceną testu panelu bezpieczeństwa molekularnego produktu komórkowego WJ-MSC.....	50
3.2.6.	Oznaczenie rozszerzonego fenotypu WJ-MSC z zastosowaniem cytometrii przepływowej	53
3.2.7.	Analiza profilu wydzielniczego (sekretomu) linii WJ-MSC	55
3.2.8.	Test immunomodulacji oparty na kohodowli WJ-MSC z komórkami jednojądrzastymi wyizolowanymi z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego zdrowego dawcy.....	56
3.3.	Klasteryzacja	59
3.4.	Badanie kliniczne	60
3.4.1.	Pobranie, zabezpieczenie i badania materiału biologicznego pacjentów ALSTEM	64
3.4.2.	Statystyczna analiza danych	68
4.	WYNIKI	69
4.1.	Bank produktów komórkowych WJ-MSC	69
4.2.	Rozszerzona charakterystyka banku produktów WJ-MSC	71
4.2.1.	Test jednostek tworzących kolonie – CFU (ang. <i>colony forming unit</i>)	72
4.2.2.	Analiza obecności antygenów nieklasycznych dla komórek WJ-MSC – fenotyp rozszerzony	73
4.2.3.	Ocena ekspresji panelu genów oceniających bezpieczeństwo produktów komórkowych WJ-MSC	75
4.2.4.	Ocena aktywności wydzielniczej WJ-MSC (sekretom)	77
4.2.5.	Test oparty na kohodowli sprawdzający zdolności immunomodulacyjne komórek WJ-MSC	78
4.3.	Klasteryzacja banku produktów WJ-MSC	87
4.3.1.	Etap I klasteryzacji produktów komórkowych WJ-MSC	88
4.3.2.	Etap II klasteryzacji produktów komórkowych WJ-MSC	89
4.4.	Badanie kliniczne	93
4.4.1.	Pacjenci ze stwardnieniem zanikowym bocznym w badaniu klinicznym ALSTEM	94
4.4.2.	Rozkład podstawowych parametrów życiowych podczas obserwacji pacjentów	98

4.4.3. Rozkład parametrów biochemicznych krwi podczas obserwacji pacjentów ALSTEM.....	103
4.4.4. Rozkład subpopulacji leukocytów we krwi obwodowej podczas obserwacji grup pacjentów ALSTEM	121
4.4.5. Wpływ terapii WJ-MSC na wybrane parametry w osoczu krwi obwodowej	138
4.4.6. Wpływ terapii WJ-MSC na wybrane parametry w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF)	150
4.4.7. Biologiczny marker progresji choroby ALS – p75 ^{ECM}	162
4.4.8. Identyfikacja czynników predykcyjnych umożliwiających ocenę potencjalnej skuteczności terapii komórkowej WJ-MSC u danego pacjenta	163
5. DYSKUSJA.....	166
6. PODSUMOWANIE	187
7. WNIOSKI KOŃCOWE.....	189
8. LISTA PROCEDUR powstała w ramach doktoratu wdrożeniowego.....	192
9. SPIS PIŚMIENNICTWA	193

WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
A-375		linia komórkowa wykazująca morfologię nabłonka
A-549		linia komórkowa wyizolowana z tkanki płuc objętej nowotworem
ACT- β		β -aktyna
ALOX15	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>	15-lipooksygenaza arachidonianu
ALS	<i>amyotrophic lateral sclerosis</i>	stwardnienie zanikowe boczne
ALT		aminotransferaza alaninowa
API	<i>active pharmaceutical ingredient</i>	substancja czynna badanego produktu leczniczego
AST		aminotransferaza asparaginianowa
ATMP	<i>advanced therapy medicinal product</i>	badany produkt leczniczy terapii zaawansowanej
BDNF	<i>brain-derived neurotropic factor</i>	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
BM-MSC	<i>bone marrow mesenchymal/stromal cells</i>	mezenchymalne komórki stromalne pochodzące ze szpiku kostnego
BMI	<i>body mass index</i>	wskaźnik masy ciała
BPL		badany produkt leczniczy
C9ORF72	<i>chromosome 9 open reading frame 72</i>	otwarta ramka odczytu 72 chromosomu 9
CAT	<i>Committee for Advanced Therapies</i>	Komitet ds. Terapii Zaawansowanych
cDNA	<i>complementary DNA</i>	komplementarny DNA

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
CFU	<i>colony-forming unit</i>	jednostka tworząca kolonię
cGMP	<i>Current Good Manufacturing Practice</i>	aktualne certyfikaty Dobrej Praktyki Produkcyjnej
CLDN1		klaudyna-1
CPLX2	<i>complexin 2</i>	
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>	płyn mózgowo-rdzeniowy
CXCL-9	<i>C-X-C motif ligand 9</i>	monokina indukowana przez interferon gamma
CXCL-10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>	białko 10 indukowane interferonem gamma
CXCL-11	<i>C-X-C motif chemokine 11</i>	chemoatraktant alfa komórek T indukowany interferonem
DC	<i>dendritic cell</i>	komórki dendrytyczne
DMBX1	<i>diencephalon/mesencephalon homeobox 1</i>	
DMSO		roztwór sulfotlenku dimetylu
DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta</i>	DNA-metylotransferaza 3 beta
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o calcium, magnesium</i>	buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco bez jonów wapnia, magnezu
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	Europejska Agencja Leków
EMG		elektromiografia
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>	siateczka śródplazmatyczna
ESM1	<i>endothelial cell specific molecule 1</i>	cząsteczka 1 specyficzna dla komórek śródbłónka

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
fALS	<i>familial amyotrophic lateral sclerosis</i>	rodzinne stwardnienie zanikowe boczne
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Agencja Żywności i Leków
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	czynnik wzrostu fibroblastów
FOXA	<i>forkhead box protein</i>	czynnik jądrowy hepatocytów 3-alfa
Foxp3+	<i>forkhead box P3</i>	czynnik transkrypcyjny
FUS		heterogenna rybonukleoproteina jądrowa P2
FUT3	<i>fucosyltransferase 3</i>	galaktozydowa 3(4)-L-fukozylotransferaza
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>	czynnik wzrostu kolonii granulocytów
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych
GIF		Główny Inspektorat Farmaceutyczny
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>	Dobra Praktyka Wytwarzania
GVHD	<i>graft-versus-host disease</i>	choroba przeszczep przeciw gospodarzowi
HAND2	<i>heart and neural crest derivatives expressed 2</i>	

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
HBV	<i>hepatitis B virus</i>	wirus zapalenia wątroby typu B
HCV	<i>hepatitis C virus</i>	wirus zapalenia wątroby typu C
HEY1	<i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1</i>	
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>	czynnik wzrostu hepatocytów
hIPS	<i>human induced pluripotent stem cells</i>	indukowane ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>	ludzki wirus niedoboru odporności
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen – DR isotype</i>	receptor powierzchniowy komórek MHC klasy II
HLA-G	<i>human leukocyte antigen-G</i>	ludzki antygen leukocytarny G
HNF1B	<i>hepatocyte nuclear factor 1 beta</i>	czynnik jądrowy hepatocytów 1 beta
HNF4A	<i>hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>	czynnik jądrowy hepatocytów 4 alfa
HO	<i>heme-oxygenase</i>	oksygenaza hemowa
HT-1080		linia komórkowa włókniakomięsaka
IDO	<i>indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase</i>	2,3-dioksygenaza indoloaminy
IFN		interferon
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>	insulinopodobny czynnik wzrostu
IgG		immunoglobuliny G
IL		interleukina

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>	Międzynarodowe Towarzystwo ds. Terapii Komórkowej
κB	<i>nuclear factor kappa B</i>	jądrowy czynnik kappa B
Lin-	<i>lineage negative</i>	linia ujemna
LMN	<i>lower motor neuron</i>	dolny neuron ruchowy
M1		mikroglej M1
M2		mikroglej M2
MCF-7		linia komórkowa raka piersi
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>	białko chemotaktyczne monocytów
MFDS	<i>Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea</i>	Ministerstwo Bezpieczeństwa Żywności i Leków Republiki Korei
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	antygen zgodności tkankowej
MIP	<i>macrophage inflammatory proteins</i>	białka zapalne makrofagów
MNC	<i>mononuclear cell</i>	komórki jednojądrzaste
MSC	<i>mesenchymal stromal cells</i>	mezenchymalne komórki stromalne
MYO3B	<i>myosin IIIB</i>	miozyna IIIB
NCI-H727		linia komórkowa wykazująca morfologię nabłonka, wyizolowana z płuc z rakowiakiem
NGF	<i>nerve growth factor</i>	czynnik wzrostu nerwów
NK	<i>natural killers</i>	

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
NKX2-5	<i>NK2 homeobox 5</i>	
NO		tlenek azotu
NTC	<i>no template control</i>	
Oct-4/ POU5F1		czynniki transkrypcyjne należące do rodziny POU (Pit, Oct, Unc)
OPTN	<i>optineurin</i>	
OUN		ośrodkowy układ nerwowy
p75^{ECD}	<i>neurotrophin receptor p75 extracellular domain</i>	domena zewnątrzkomórkowa receptora neurotrofiny p75
PBKM		Polski Bank Komórek Macierzystych
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	buforowany roztwór soli fizjologicznej
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>	płatkopochodny czynnik wzrostu
PDGFR-α	<i>platelet-derived growth factor receptor A</i>	receptor płatkopochodnego czynnika wzrostu A
PET		pozytonowa tomografia emisyjna
PFN1	<i>profilin 1</i>	profilina 1
PGE2	<i>prostaglandin E2</i>	prostaglandyna E ₂
pNfH	<i>phosphorylated neurofilament heavy chain</i>	fosforylowany łańcuch ciężki neurofilamentów
POU4F1	<i>POU Class 4 Homeobox 1</i>	
PROM1	<i>prominin 1</i>	prominina 1
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>	chemokina syntetyzowana i wydzielana przez limfocyty T

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
RBC	<i>red blood cells</i>	krwinki czerwone / erytrocyty
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktywne formy tlenu
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
sALS	<i>sporadic amyotrophic lateral sclerosis</i>	sporadyczne stwardnienie zanikowe boczne
SD	<i>standard deviation</i>	odchylenie standardowe
SDF-1α	<i>stromal cell-derived factor 1</i>	czynnik pochodzący z komórek zrębowych 1 α
SOD1	<i>superoxide dismutase type 1</i>	dysmutaza ponadtlenkowa 1
SOX2	<i>SRY-box transcription factor 2</i>	
Tc		limfocyty T cytotoksyczne
TDGF1	<i>teratocarcinoma-derived growth factor 1</i>	
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>	transformujący czynnik wzrostu β
Th		limfocyty T pomocnicze
TMS	<i>transcranial magnetic stimulation</i>	przezczaszkowa stymulacja magnetyczna
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	czynnik martwicy nowotworów
Treg	<i>immunoregulatory T cell</i>	komórki T regulatorowe
TWIST1	<i>twist-related protein 1</i>	
UBQLN2	<i>ubiquilin 2</i>	ubikwilina-2
URPL		Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
VCP	<i>valosin-containing protein</i>	
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
WJ-MSC	<i>Wharton's jelly mesenchymal stromal cells</i>	mezenchymalne komórki stromalne pochodzące z galarety Whartona
XF	<i>xeno-free</i>	
ZBTB16	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>	
ZR-75-3		linia komórek nabłonkowych wyizolowana z gruczołu sutkowego objętego nowotworem piersi w stadium 0

STRESZCZENIE

Stwardnienie zanikowe boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS) to choroba neurodegeneracyjna ośrodkowego, jak i obwodowego układu nerwowego, której etiologia i patofizjologia do tej pory nie zostały w pełni ustalone. Często początek choroby jest trudny do zdiagnozowania, gdyż objawy mogą być mylone z chwilowym osłabieniem organizmu. Objawy stopniowo stają się bardziej charakterystyczne i obejmują: postępujące uszkodzenie ośrodkowego neuronu ruchowego (m.in. osłabienie siły mięśni oraz ich wzmożone napięcie), bełkotliwą wymowę oraz trudności z przelknięciem, a w końcowej fazie – zaburzenia oddychania i śmierć, zwykle 5 lat od postawienia diagnozy. Stwardnienie zanikowe boczne występuje we wszystkich częściach świata z roczną zapadalnością 3–5 przypadków na 100 tys. mieszkańców. Wytyczne Europejskiej Sieci Referencyjnej ds. chorób nerwowo-mięśniowych dotyczące planu leczenia w rozpoznaniu ALS są bardzo ograniczone. Główne zalecenia obejmują wprowadzenie podstawowego leku riluzol, przyjmowanego od chwili rozpoznania do końca życia. Tymczasowym zaleceniem jest stosowanie produktów leczniczych takich jak edarawon i AMX0035 oraz do końca 2023 roku zapowiedziano wprowadzenie wytycznych dotyczących leku tofersen, opartego na antysensownych oligonukleotydach, jako leczenie pierwszego rzutu dla pacjentów z genetyczną postacią ALS pacjentów z mutacją w genie dysmutazy ponadtlenkowej 1 (*SOD1*). Ostatnie badania epidemiologiczne wykazały, że korzystny wpływ w przypadku riluzolu utrzymuje się tylko podczas pierwszych 6 miesięcy leczenia farmakologicznego i życie zostaje przedłużone jedynie o 10–20%. Wymienione fakty świadczą o zapotrzebowaniu na opracowanie nowych terapii, które zapewnią chorym dłuższe życie i lepszą jego jakość.

Obecnie trwają badania nad zastosowaniem terapii komórkowej, która pozwoli na opóźnienie progresji ALS. Prace badawcze ostatnich lat skupiają się na poznaniu przyczyn wystąpienia oraz postępów choroby i wskazują jako jeden z potencjalnych czynników – dysfunkcję układu immunologicznego. Z drugiej strony istnieje wiele doniesień, że mezenchymalne komórki stromalne (ang. *mesenchymal stromal cells*, MSC) mogą modulować odpowiedź immunologiczną oraz zmieniać ekspresję białek pro- i przeciwzapalnych oraz czynników troficznych dla neuronów. Sekrecja czynników neurotroficznych przez MSC może pozytywnie wpływać na utrzymanie funkcji neuronów ruchowych i komórek glejowych niezbędnych do odpowiedniej aktywności neuronalnej. Stwierdzono pozytywny wpływ MSC na ochronę przed apoptozą: neuronów ruchowych, astrocytów oraz mikrogleju. Terapeutyczne

zastosowanie autologicznych MSC w przypadku pacjentów ma znaczne ograniczenia, ponieważ ALS jest chorobą występującą w wieku średnim i starszym. MSC pozyskiwane od osób chorych wykazują wiele dysfunkcji, a to może negatywnie wpływać na skuteczność terapii. Ponadto stwierdzono, że MSC pochodzące od pacjentów z ALS cechuje zmniejszona zdolność proliferacyjna. Biorąc pod uwagę pojawiające się negatywne aspekty związane z terapią autologiczną, optymalnym rozwiązaniem wydaje się terapia MSC oparta na allogenicznym preparacie komórkowym. Jedną z atrakcyjnych opcji są mezenchymalne komórki stromalne, wyizolowane z galarety Whartona (ang. *Wharton's jelly mesenchymal stromal cells*, WJ-MSC). Zaletą podejścia allogenicznego jest możliwość zastosowania produktu komórkowego *of-the-shelf*, bez inwazyjnej ingerencji, jaka występuje przy wytworzeniu autologicznego preparatu komórek wyizolowanych ze szpiku lub tkanki tłuszczowej pacjentów. Galareta Whartona sznura pępowiny jest bogatym i bezpiecznym źródłem komórek MSC ze względu na łatwość procedury ich pozyskania. Komórki pochodzące z płodu różnią się od komórek MSC uzyskanych z tkanek dorosłych osób (szpik kostny, tkanka tłuszczowa) i posiadają zdolność do wydzielania czynników immunomodulujących i neurotroficzných. Uzyskane WJ-MSC są bardziej homogenne i mają większe zdolności proliferacyjne.

Celem doktoratu wdrożeniowego było opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej (ang. *advanced therapy medicinal product*, ATMP) opartego na komórkach mezenchymalnych z galarety Whartona (WJ-MSC) w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego. Produkty WJ-MSC wytworzono w warunkach GMP zgodnie z obowiązującymi procedurami oraz przy użyciu kwalifikowanych oraz certyfikowanych materiałów i urządzeń. Produkcja ma miejsce w klasie A (przepływ laminarny) w otoczeniu klasy B. Etapy wytwarzania ATMP obejmowały kwalifikację materiału sznura pępowinowego na podstawie: wywiadu medycznego, wyników krwi matki na obecność czynników zakaźnych oraz wstępnych oględzin tkanki. Z kwalifikowanych tkanek założono hodowle pierwotne komórek WJ-MSC metodą eksplantów z galarety Whartona w systemie hodowli wolnej od materiałów podchodzenia zwierzęcego. Uzyskane komórki poddano weryfikacji jakościowej i ilościowej w celu zwolnienia produktu końcowego, potwierdzając ich zgodność z kryteriami zalecanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ang. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT), m.in. polegającej na sprawdzeniu charakterystycznych markerów powierzchniowych (negatywne Lin-: CD34, CD45, CD19, CD14, receptor powierzchniowy komórek MHC klasy II HLA-DR; pozytywnie: CD73, CD90, CD105), a także na ocenie ich kariotypu, obecności endotoksyn i mykoplazmy oraz jałowości mikrobiologicznej.

Innowacyjne podejście zrealizowane w trakcie wykonywania niniejszej pracy polegało na precyzyjnej, rozszerzonej charakterystyce komórek WJ-MSC m.in. pod kątem ich markerów powierzchniowych, profilu wydzielniczego (sekretomu) oraz właściwości immunomodulujących. Właściwości immunomodulujące zostały ocenione na podstawie modelu kohodowli *in vitro* składającej się z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *mononuclear cell*, MNC) zdrowych dawców z allogenicznymi komórkami WJ-MSC. Kohodowla została oceniona pod względem proliferacji i subpopulacji komórek MNC, takich jak: limfocyty T, limfocyty B, monocyty, komórki NK (ang. *natural killer*), limfocyty T pomocnicze (Th), limfocyty T cytotoksyczne (Tc), subklasy limfocytów Th - Th1, Th2, Th17 oraz komórki T regulatorowe (Treg), a także ich profilu aktywacji na podstawie charakterystycznych markerów powierzchniowych CD69, CD25 i HLA-DR. Stworzenie banku komórek WJ-MSC i jego klasteryzacja umożliwiły pogrupowanie produktów charakteryzujących się zbliżoną aktywnością biologiczną. Na podstawie uzyskanych wyników opracowano zgłoszenie patentowe pt. *Sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne*. Przedmiotem wynalazku jest sposób klasteryzacji produktów komórkowych opartych na komórkach MSC ze względu na ich właściwości terapeutyczne oraz dobór produktu komórkowego przez dopasowanie dawcy do biorcy. W przyszłości klasteryzacja może pomóc przy wdrożeniu zasad medycyny spersonalizowanej (ang. *personalized medicine*), niosąc za sobą wzmocniony i dopasowany efekt terapeutyczny produktów komórkowych.

Kolejnym etapem było podanie badanego produktu leczniczego (BPL) opartego na komórkach mezenchymalnych z galarety Whartona (WJ-MSC) w badaniu klinicznym o akronimie ALSTEM. Badanie kliniczne polegało na ocenie wpływu komórek galarety Whartona (WJ-MSC) na układ immunologiczny pacjentów z rozpoznaniem choroby ALS. Dzięki dostępności do unikatowego materiału biologicznego, jakim były próbki krwi obwodowej, moczu oraz płynu mózgowo-rdzeniowego osób z rozpoznaniem ALS, sprawdzono m.in. status immunologiczny pacjentów, którzy otrzymali produkty komórkowe WJ-MSC. Odpowiedź terapeutyczna pacjentów została określona na podstawie współczynnika trendu skali ALSFRS-R (ang. *ALS Functional Rating Scale-Revised*). Skala ALSFRS-R uważana jest za złoty standard stosowany do pomiaru postępu choroby ALS, a także odpowiedzi na nowe leki i terapie.

Współczynnik trendu skali ALSFRS-R wyodrębnił trzy grupy pacjentów, które opisano jako:

- RESPONDER – wartość współczynnika ALSFRS-R > 0 wskazuje pozytywny wpływ leczenia;
- NULL – wartość współczynnika ALSFRS-R = 0 wskazuje neutralny wpływ leczenia;
- NON-RESPONDER – wartość współczynnika ALSFRS-R < 0 wskazuje brak pozytywnej odpowiedzi na leczenie.

Ocenę wykonano na podstawie immunofenotypu subpopulacji komórek krwi obwodowej oraz profilu wybranych cytokin, chemokin i czynników wzrostu w osoczu oraz płynie mózgowo-rdzeniowym. Stężenie wybranych immunoreaktywnych analitów oznaczono na urządzeniu MAGPIX (platforma Luminex). W wyniku przeprowadzenia analizy otrzymanych danych z analiz biochemicznych i cytometrycznych krwi, moczu oraz płynu mózgowo-rdzeniowego, a także oceny funkcji życiowych powstał wstępny zestaw danych do predykcji odpowiedzi pacjentów na terapię komórkową WJ-MSC.

Podsumowując, celem projektu i rozprawy doktorskiej było opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartej na komórkach mezenchymalnych galarety Whartona (WJ-MSC) mającego zastosowanie w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Kluczowym elementem działalności wdrożeniowej było pełne zbadanie potencjału komórek WJ-MSC, ich precyzyjna charakterystyka, zbadana na poziomie immunologicznym i genetycznym w celu ich klasteryzacji, co jest wyraźną nowością w tej dziedzinie. Kolejny etap polegał na charakterystyce oraz pogrupowaniu pacjentów z ALS biorących udział w badaniu klinicznym według ich odpowiedzi terapeutycznej na produkt komórkowy WJ-MSC na podstawie skali ALSFRS-R. Analizy materiału biologicznego pacjentów, m.in. na poziomie immunologicznym, pozwoliły uzyskać parametry predykcyjne przewidujące pozytywną odpowiedź pacjenta na leczenie preparatem WJ-MSC.

SUMMARY

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting both the central and peripheral nervous systems. Its etiology and pathophysiology have not yet been fully established. Often the onset of the disease is difficult to diagnose, as the symptoms may be mistaken for temporary weakness of the body. Gradually, the symptoms become more characteristic and include progressive central motor neuron damage (resulting in muscle weakness and increased muscle tone), slurred speech, difficulty swallowing, and in the final stage, respiratory distress, typically leading to death around 5 years after diagnosis. Amyotrophic lateral sclerosis occurs in all parts of the world with an annual incidence of 3-5 cases per 100,000 population. The guidelines from the European Reference Network for Rare Neuromuscular Diseases regarding treatment schedules for the diagnosis of ALS are very limited. The main recommendations include the introduction of the basal drug Riluzole, which is taken from the time of diagnosis until the end of life. The provisional recommendation includes the use of medicinal products such as Edaravone and AMX0035. By the end of 2023, guidelines for the drug Tofersen based on antisense oligonucleotides are expected to be announced as a first-line treatment for patients with the genetic form of ALS, specifically those with a mutation in the superoxide dismutase 1 gene (SOD1). Recent epidemiological studies have shown that the beneficial effect with Riluzole persists only during the first 6 months of treatment and extends life by only 10-20%. The above-mentioned facts highlight the need to develop new therapies aimed at enhancing both the quality and duration of life for patients.

Currently, research is underway into the use of cell therapy to delay the progression of ALS. In recent years, research has focused on understanding the causes and progression of the disease, identifying immune system dysfunction as a potential factor. On the other hand, there are many reports that mesenchymal stromal cells (MSCs) can modulate the immune response and modify the expression of pro- and anti-inflammatory proteins and trophic factors for neurons. The secretion of neurotrophic factors by MSCs can positively support the maintenance of motor neuron and glial cell function necessary for proper neuronal activity. It has been observed that MSCs have a positive effect on protecting motor neurons, astrocytes, and microglia against apoptosis. The therapeutic use of autologous MSCs in patients has significant limitations, as ALS is a disease that occurs in middle and older age. MSCs sourced from ALS patients present many dysfunctions, and this can adversely affect the effectiveness of therapy.

In addition, MSCs from ALS patients were found to have reduced proliferative potential. In view of the negative aspects that occur, MSC therapy based on an allogeneic cell preparation seems to be the optimal solution. One of the compelling options is the use of mesenchymal stromal cells, isolated from Wharton's jelly (WJ-MSc). The advantage of the allogeneic approach is the possibility of using an allogeneic "of-the-shelf" cell product, without the invasive interference that occurs when producing an autologous preparation of cells isolated from patients' marrow or adipose tissue. Wharton's jelly of the umbilical cord is a rich and safe source of MSC cells due to the ease of the procedure for obtaining them. Cells derived from the fetal tissues are different from MSCs obtained from adult tissues (bone marrow, adipose tissue) and have the ability to secrete immunomodulatory and neurotrophic factors. The obtained WJ-MSCs are more homogeneous and have higher proliferative potential.

The aim of the implementation doctorate was to develop an advanced therapy medicinal product (ATMP) based on Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSc) for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. WJ-MSc products were manufactured under current GMP conditions in accordance with applicable procedures and using qualified and certified materials and equipment. Production takes place in Class a (laminar flow) in a Class B environment. The manufacturing steps of the ATMP included qualifying the umbilical cord material based on medical history, maternal blood results for the presence of infectious agents, and preliminary visual inspection of the tissue. From the qualified tissues, primary cultures of WJ-MSc cells were established using the Wharton's jelly explants method in a culture system free of animal-derived components. The obtained cells were subjected to qualitative and quantitative verification for the release of the final product, confirming their compliance with the criteria recommended by the International Society for Cellular Therapy (ISCT), including checking characteristic surface markers (negative Lin-: CD34, CD45, CD19, CD14, HLA-DR; positive: CD73, CD90, CD105), as well as assessing their karyotype, the presence of endotoxins and mycoplasma, and microbiological sterility.

The innovative realized in the course of this work approach consisted of precise, extended characterization of WJ-MSc cells in terms of their surface markers, secretory profile (secretome) and immunomodulatory properties. Immunomodulatory properties were evaluated using an *in vitro* co-culture model consisting of peripheral blood mononuclear cells (MNCs) from healthy donors with allogeneic WJ-MSc cells. The co-culture was evaluated for proliferation and assessment of MNC cell subpopulations, such as T cells, B cells, monocytes, NK cells, Th cells, Tc cells, Th1 cells, Th2 cells, Th17 cells, regulatory T cells, as well as their activation profile based on the characteristic surface markers CD69, CD25 and HLA-DR. The

development of a WJ-MSC cell bank and its clustering, made it possible to assign products with similar biological activity. Based on the results, a patent application was developed: "Method of classifying MSC cells for therapeutic properties". The object of the invention is a method of clustering cell products based on MSC cells for their therapeutic properties and selection of the cell product by matching donor to recipient. In the future, clustering, may help with the implementation of personalized medicine bringing with it an enhanced and matched therapeutic effect of cellular products.

The next stage was to administer an investigational mesenchymal cell-based medicinal product from Wharton's Jelly (WJ-MSC) in a clinical trial with the acronym ALSTEM. The clinical trial assessed the effects of Wharton's jelly cells (WJ-MSCs) on the immune system of patients diagnosed with ALS. Due to the availability of unique biological material such as samples of peripheral blood, urine and cerebrospinal fluid of people diagnosed with ALS, among other things, the immunological status of patients who received WJ-MSC cell products. Patients' therapeutic response was determined by the ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRS-R) scale trend factor. The ALSFRS-R scale is considered the gold standard used to measure ALS disease progression, as well as response to new drugs and therapies.

The trend factor of the ALSFRS-R scale distinguished three groups of patients, which were described as:

- RESPONDER value of ALSFRS-R coefficient > 0 , indicates positive effect of treatment
- NULL value of ALSFRS-R coefficient $= 0$, indicates neutral effect of treatment
- NON-RESPONDER value of ALSFRS-R coefficient < 0 , indicates no positive response to treatment

The evaluation was based on the immunophenotype of peripheral blood cell subpopulations and the profile of selected cytokines, chemokines and growth factors in plasma and cerebrospinal fluid. The concentration of selected immunoreactive analytes was determined on a MAGPIX instrument (Luminex platform). Analyzing the data obtained from biochemical and cytometric analyses of blood, urine and cerebrospinal fluid, as well as assessments of vital functions, a preliminary dataset for predicting patients' response to WJ-MSC cell therapy was created.

In summary, the goal of the project and dissertation was to develop a therapeutic product of advanced therapy based on Wharton's jelly mesenchymal cells (WJ-MSCs) for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The key element of the implementation activity was the thorough exploration of the potential of WJ-MSC cells, their precise characterization, studied at the immunological and genetic levels for their clustering, which is a clear novelty in the field. The next stage was characterization and group ALS patients participating in the clinical trial

based on their therapeutic response to the WJ-MSK cell product based on the ALSFRS-R scale. The analyses of patients' biological material, among other things, at the immunological level, have yielded predictive parameters that anticipate a positive patient response to treatment with WJ-MSKs.

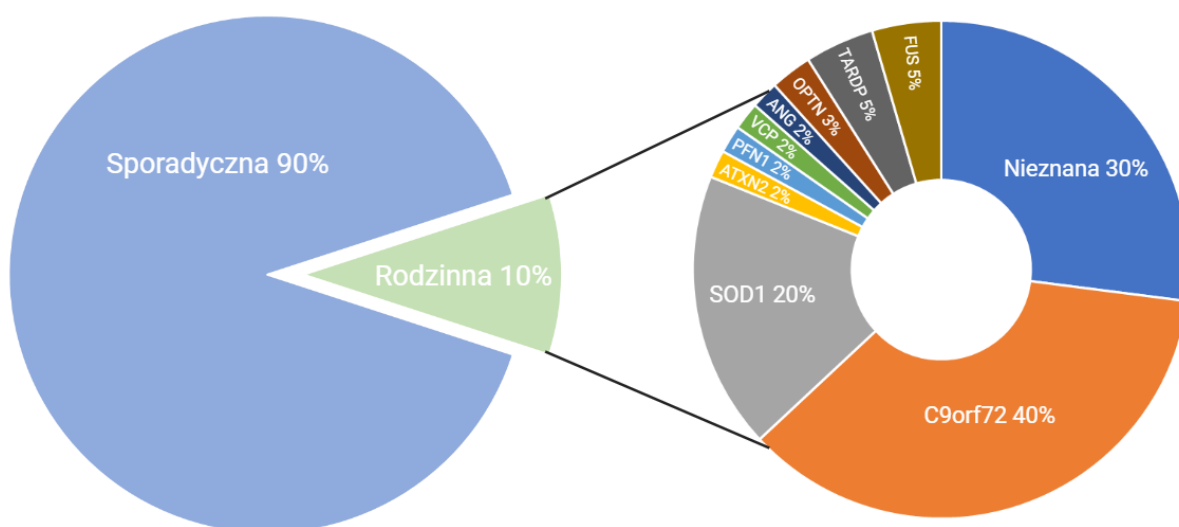
1. WSTĘP

1.1. Stwardnienie zanikowe boczne

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) to wyniszczająca choroba neurodegeneracyjna, która przejawia się postępującą niewydolnością układu nerwowo-mięśniowego w wyniku osłabienia mięśni kończyn górnych i dolnych, a także mięśni opuszkowych i oddechowych. W 1869 roku francuski neurolog i anatom Jean-Martin Charcot po raz pierwszy zdiagnozował i opisał kliniczną patologię tej choroby, a w 1874 roku zaczął używać terminu stwardnienie zanikowe boczne [1]. Przyczyna ALS jest niejednorodna i tylko częściowo poznana. Coraz więcej badań na poziomie klinicznym i genetycznym wskazuje ALS jako zespół chorób ogólnoustrojowych, a nie wyłącznie w obszarze ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Podstawa schorzenia to selektywny i postępujący zanik rdzeniowych, opuszkowych i korowych neuronów ruchowych, prowadzący do nieodwracalnego paraliżu, zaburzenia mowy i połykania, a ostatecznie do śmierci z powodu niewydolności mięśni oddechowych [2]. Faza początkowa choroby zaczyna się miejscowo, przez osłabienie mięśni, często jednej ręki. Następnie rozprzestrzenia się, wpływając na większość mięśni szkieletowych i doprowadzając do całkowitego paraliżu. Objawy pojawiają się początkowo w kończynach (70% przypadków), w mięśniach opuszkowych (25% przypadków) oraz tułowia (5% przypadków) [1]. Z powodu umiejscowienia i rozprzestrzeniania się symptomów w 25% przypadków rozróżniamy postać opuszkową (objawiającą się dyzartrią, dysfagią czy dysfonią), a w 75% – postać kończynową (objawiającą się jednostronnym dystalnym osłabieniem i zanikiem mięśni kończyn górnych lub dolnych). Śmierć następuje ok. 3–5 lat po pojawieniu się pierwszych objawów, głównie na skutek niewydolności oddechowej [3].

Częstotliwość występowania choroby ALS jest szacowana na 1,75–3 przypadków na 100 000 osób rocznie, a w przypadku Europy – 10–12 na 100 000 osób. Obserwuje się, że częstość występowania ALS wzrasta, a co roku diagnozuje się o 1–2 nowe przypadki więcej na 100 000 osób [5]. Przedział wiekowy o najwyższym ryzyku zachorowania na ALS to 45–75 lat. Średni wiek wystąpienia objawów jest zmienny: 58–63 lata dla sporadycznego ALS (sALS) i 40–60 lat dla rodzinnego ALS (fALS). Oszacowano, że ryzyko zachorowania w ciągu całego życia wynosi 1 : 350 u mężczyzn oraz 1 : 400 u kobiet. Wyniki pokazują, że w przypadku mężczyzn ryzyko rozwoju sALS jest wyższe [3]. Ponad 90% przypadków ALS ma charakter sporadyczny (idiopatyczny) o nieznannej etiologii (sALS), podczas gdy rodzinne występowanie o podłożu genetycznym zidentyfikowano u 10% przypadków. Członkowie rodzin osób z sALS

mogą być narażeni na zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia choroby. Jednak ryzyko to jest stosunkowo niskie, a u większości z nich nie wystąpią objawy czy dalszy rozwój choroby [4]. W przypadku dziedzicznej fALS pojawienie się objawów związane jest z wystąpieniem określonych wariantów genów (zidentyfikowano ok. 30), m.in. *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *OPTN*, *VCP*, *UBQLN2*, *C9ORF72* i *PFN1*. W przypadku aż 2/3 postaci fALS zmiany dotyczyły genów *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* i *FUS* [5]. Według metaanalizy mutacje w *C9ORF72* stanowią 40% wśród przypadków ALS, następnie *SOD1* na poziomie 20%, *TARDBP* i *FUS* na poziomie 5% (ryc. 1) [6].

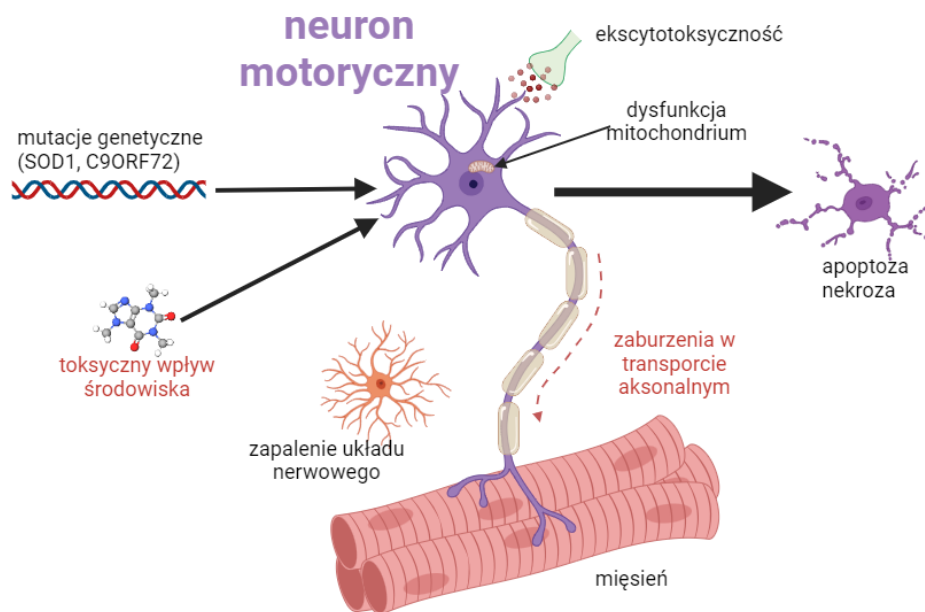


Ryc. 1. Rozkład procentowy przypadków sALS lub fALS oraz występowanie najbardziej znanych genetycznych przyczyn fALS. Zmodyfikowano na podstawie [6]

Oznacza to, że w przypadku fALS istnieje znaczna heterogenność oraz zaangażowanie kilku mechanizmów patologicznych [7]. Dodatkowo mutacje w *C9ORF72*, *TARDBP*, *SOD1* i *FUS* występują również w sALS i odpowiadają za mniej niż 8% przypadków sALS w Europie [8].

Badania epidemiologiczne wykazały wpływ środowiska i stylu życia na rozwój ALS. Wydaje się, że czynniki takie jak: czynniki dietetyczne, pestycydy, narażenie na obecność metali ciężkich, palenie, alkohol, infekcje wirusowe i grzybicze czy promieniowanie elektromagnetyczne mogą być zaangażowane w patogenezę ALS [5]. W rozwoju ALS bierze udział wiele szlaków molekularnych, takich jak ekscytotoksyczność, dysfunkcja mitochondriów, stres oksydacyjny, dysfunkcja oligodendrocytów, zaburzenia funkcji cytoszkieletu i nieprawidłowości w transporcie aksonalnym, zaburzony metabolizm RNA,

nukleocytoplazmatyczne deficyty transportowe i nieprawidłowa naprawa DNA, które prowadzą do uszkodzeń neuronów ruchowych na drodze apoptozy lub nekrozy (ryc. 2) [9].



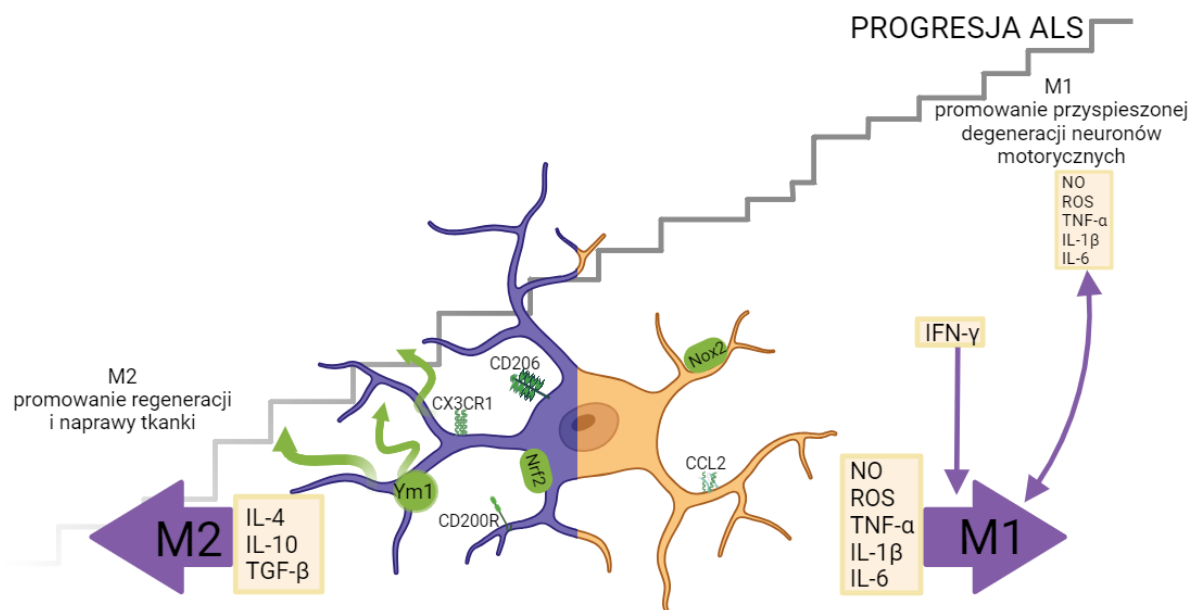
Ryc. 2. Mechanizm ALS. W rozwoju schorzenia ALS istotne znaczenie mają mutacje genetyczne (np. *SOD1* i *C9ORF72*) oraz czynniki środowiskowe. Do degeneracji neuronów ruchowych na drodze apoptozy lub nekrozy może przyczynić się kilka mechanizmów, takich jak ekscytotoksyczność, zapalenie nerwów, zaburzenia w transporcie aksonalnym, czy dysfunkcja mitochondriów. Zmodyfikowano na podstawie [9]

Stres oksydacyjny pojawia się, gdy produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) przekracza zdolności buforowe komórki, uszkadzając w ten sposób DNA, białka i lipidy. Agregaty białek w mitochondriach prowadzą także do zaburzeń łańcucha transportu elektronów, w wyniku czego następuje zwiększona produkcja ROS i dysfunkcja mitochondriów, która zaburza podstawowe funkcje komórki, ostatecznie prowadząc do jej nekrozy. Jedną z funkcji siateczki śródplazmatycznej (ER) jest synteza i składanie białek oraz kontrola nad prawidłowością procesu. Stres komórkowy może zaindukować reakcję stresową w ER, charakteryzującą się chromatolizą i nagromadzeniem nieprawidłowych i nieprawidłowo sfałdowanych białek w inkluzjach cytoplazmatycznych. Ostatecznie dezagregacja ER skutkuje utratą zdolności tej struktury do syntezy białek, często prowadząc do aktywacji apoptozy danej komórki [10]. Cytoplazmatyczna agregacja białek została powiązana z mutacjami w genach *TARDBP* i *FUS* występujących w fALS i sALS. Ekscytotoksyczność glutaminianu to kolejna główna przyczyna stresu oksydacyjnego. W tym przypadku zmniejszona ekspresja transportera na astrocytach powoduje jego niepełny wychwyt, przyczyniając się do wysokiego poziomu glutaminianu, co skutkuje nadmiernym napływem jonów Ca^{2+} w okolice neuronów. Nieprawidłowy poziom Ca^{2+}

dotkowi zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu, powodując uszkodzenie neuronów. Upośledzona naprawa DNA jest również obserwowana w przebiegu ALS. W tym przypadku uszkodzenia w DNA oraz nieprawidłowości w ścieżkach jego naprawy, a także aktywacja białka p53 pośredniczą w apoptozie motoneuronów [8]. Nie ma wątpliwości, że wyszczególnione mechanizmy są zaangażowane w patogenezę choroby. Powszechnie przyjmuje się, że ALS jest konsekwencją splotu procesów patologicznych, które nie ograniczają się do zapalenia czy śmierci neuronów ruchowych, ale obejmują również aktywację mikrogleju, astrogliozę czy nacieki z monocytów, neutrofilów i limfocytów T [11].

1.1.1. Aktywacja mikrogleju w odpowiedzi na stres lub uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w ALS

Mikroglej to rezydujące komórki układu odpornościowego pochodzenia mezodermalnego wewnątrz ośrodkowego układu nerwowego. Populacja mikrogleju jest utrzymywana przez lokalną proliferację, bez uzupełniania przez obwodowe monocyty pochodzące ze szpiku kostnego. Uważa się, że system ten służy jako wrodzona obrona immunologiczna mózgu i rdzenia kręgowego, zapewniając stały nadzór nad infekcjami wywołanymi przez wirusy, bakterie czy grzyby. Mikroglej jest jedną z pierwszych linii obrony OUN przed urazem i infekcją i aktywnie uczestniczy w przebudowie OUN poprzez interakcję z astrocytami i wspomaganie funkcjonalności synaps neuronalnych czy usuwanie zdegenerowanych neuronów przez fagocytozę [12]. Podczas zapalenia nerwów mikroglej jest odpowiedzialny za uwalnianie cytokin pro- i przeciwzapalnych i usuwanie uszkodzonych komórek, a także za działania neuroprotektoryjne [1]. W zależności od funkcji mikroglej wykazuje fenotyp M1, który był odpowiedzialny za uwalnianie cytokin zapalnych oraz usuwanie uszkodzonych komórek, oraz fenotyp M2, zdolny do uwolnienia neuroprotektoryjnych cytokin przeciwzapalnych. W przypadku aktywacji mikrogleju, jak to się dzieje podczas neurodegeneracji, komórki migrują do miejsca uszkodzenia, a następnie w niektórych przypadkach dochodzi do zmiany neuroprotektoryjnego fenotypu M2, do ekspansji klonalnej i rozwinięcia fenotypu M1. W tym procesie wydzielane są immunomodulujące czynniki, takie jak NO i IL-1 β , które negatywnie wpływają na strukturę neuronów i ich funkcje. Aktywowane komórki mikrogleju, przechodząc od fenotypu M2, promującego naprawę i odbudowę macierzy pozakomórkowej oraz zwiększenie przeżywalności neuronów poprzez uwalnianie BDNF, IGF-1 i cytokin przeciwzapalnych do fenotypu M1 wydzielającego czynniki i cytokiny prozapalne, przyczyniają się w ostateczności do apoptozy neuronów (ryc. 3) [13].



Ryc. 3. Fenotyp mikrogleju w patogenezie ALS. Progresja choroby poprzez brak polaryzacji i zmianę fenotypu z M2 na M1. Zmodyfikowano na podstawie [13]

W ostatnich latach badacze ALS dużo uwagi poświęcili zaangażowaniu komórek układu odpornościowego w patogenezę choroby, koncentrując się właśnie na mikrogleju. Badacze obserwują zjawisko polaryzacji M1/M2 podczas progresji ALS.

W zaburzeniach ALS rola mikrogleju jest kluczowa w:

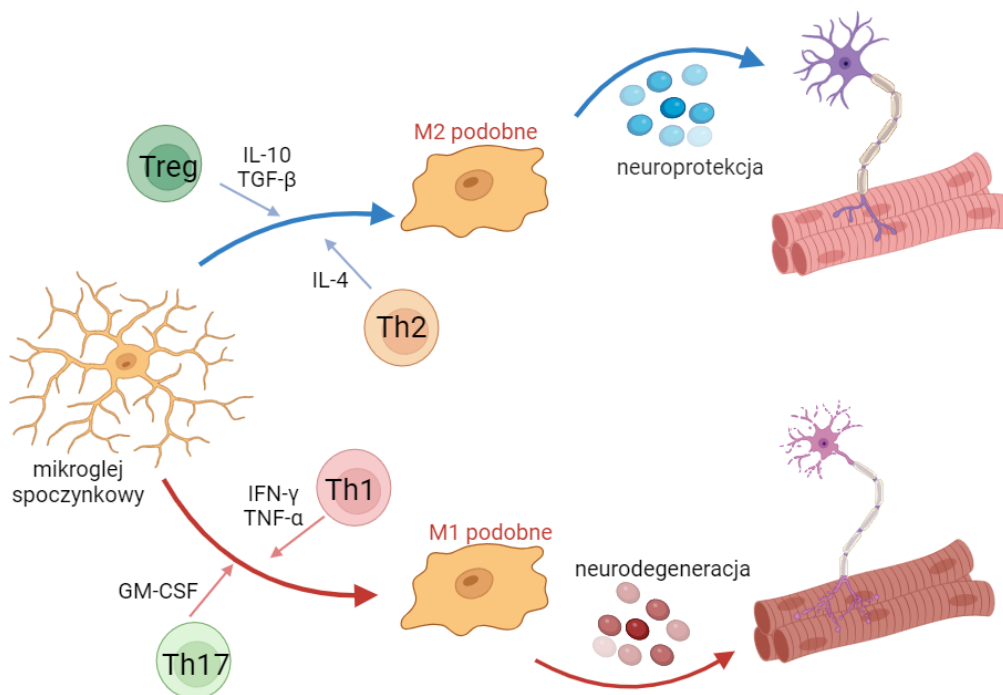
- efekcie neuroprotekcijnym na wczesnym etapie choroby – poprzez ograniczenie uszkodzeń i fagocytozę martwych neuronów oraz agregatów białkowych czy wydzielanie czynników neurotroficznych i cytokin przeciwzapalnych, takich jak BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*), czy interleukiny (IL-4, IL-10);
- działaniu neurotoksycznym w późniejszych fazach – poprzez aktywację astrocytów, proces ten jest zdominowany przez wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*), IL-1 β , IL-6, powodujących dodatkowe uszkodzenia nerwów.

W patologii ALS widoczny jest zmieniony czasoprzestrzennie wzorec aktywacji mikrogleju w pobliżu uszkodzonych neuronów ruchowych, w szczególności w rdzeniu kręgowym, gdzie aktywacja mikrogleju jest widoczna już przed początkiem wystąpienia objawów klinicznych i nasila się wraz z postępem choroby, jeszcze przed osłabieniem mięśni i utratą neuronów ruchowych [8]. Wykazano także aktywację *in vivo* mikrogleju u pacjentów z ALS przy użyciu obrazowania pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Silną aktywność zapalną potwierdzono, obserwując lokalny naciek makrofagów i limfocytów T oraz wzrost

cytokin i chemokin, w tym TNF- α , IL-6, IL-1 β i VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) na obwodzie [14]. Dodatkowo mikroglej uwalnia również białko chemotaktyczne monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), odpowiedzialne za infiltrację monocytów przez barierę krew–mózg, które to również przyczynia się do zamierania neuronów ruchowych [7].

1.1.2. Zaburzenia układu odpornościowego w ALS

Coraz więcej doniesień naukowych sugeruje, że zapalenie nerwów w przebiegu ALS powiązane jest z ogólnoustrojowym stanem zapalnym. Limfocyty T pomocnicze (Th, charakterystyczny marker powierzchniowy CD4) wpływają na aktywność innych typów komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, takich jak mikroglej/makrofagi czy limfocyty B. Cytotoksyczne limfocyty T (Tc, charakterystyczny marker powierzchniowy CD8) są zdolne do bezpośredniego zabijania innych komórek poprzez aktywację ścieżki związanej z ligandem Fas (FasL) i uwalnianie perforyn i granzymów. Poprzez interakcję z Fas (CD95) – Tc aktywują dalsze kaspazy i inicjują apoptozę komórek docelowych, podczas gdy uwolnione perforyny ułatwiają tworzenie porów i aktywują szlak apoptotyczny za pomocą granzymów. Zbyt intensywna aktywacja układu immunologicznego objawia się wydzielaniem przez komórki Th cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α i IL-17, czy indukcją apoptozy neuronów ruchowych przez limfocyty Tc. Szczegółowa analiza limfocytów Th zdefiniowała subpopulacje związane z określonym profilem wydzielniczym. Wyróżniono komórki Th1 i Th17, które uwalniają mediatory i cytokiny zapalne, promując aktywację makrofagów i ekspansję limfocytów T. Komórki Th2 uwalniają cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-4 [15]. Th1 i Th17 są zaangażowane w reakcje prozapalne, podczas gdy Th2 biorą udział w reakcjach przeciwzapalnych. Wykazano, że komórki naciekające OUN pacjentów z ALS posiadają głównie fenotyp Th1 i Th17. Natomiast w początkowej fazie ALS, ze względu na dominującą ekspresję białka wiążącego czynnik transkrypcyjny GATA3, uważa się, że limfocyty Th wykazują głównie fenotyp Th2, o działaniu przeciwzapalnym [13]. Odrębną subpopulacją limfocytów Th są limfocyty T regulatorowe (Treg), wykazujące ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (ang. *forkhead box P3*), o działaniu immunosupresyjnym (ryc. 4).



Ryc. 4. Zaburzenia układu immunologicznego w ALS. Limfocyty Th wytwarzające Th1, Th17 i GM-CSF promują fenotyp neurotoksyczny M1-podobny; Th2, Treg i niektóre typy limfocytów Tc mogą przyczyniać się do promowania neuroprotekcynnego fenotypu M2-podobnego. Zmodyfikowano na podstawie [16]

Komórki Treg indukują zarówno bezpośrednią lizę aktywowanych i autoagresywnych limfocytów T, w której pośredniczy wydzielanie granzymu A i perforyny, jak i supresję aktywacji komórek T, powodując ich inhibicję poprzez hamowanie wychwytu IL-2, cytokiny niezbędnej do przeżycia limfocytów T. U pacjentów z ALS chroniczne zapalenie związane jest ze zmniejszoną liczbą komórek Treg oraz zmniejszoną ekspresją mRNA dla Foxp3, TGF- β , IL-4 i GATA3, co skutkuje przyspieszeniem progresji choroby. Niższy odsetek komórek Treg oznaczany u pacjentów z ALS wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością, podczas gdy wyższe poziomy są związane z dłuższym przeżyciem [17].

Cytokiny są głównymi modulatorami proliferacji i różnicowania komórek. Aktywnie uczestniczą w regulacji odpowiedzi zapalnej, w tym takich procesów jak prezentacja antygeny, rekrutowanie komórek czy ekspresja cząsteczek adhezyjnych. Znanych jest ponad 300 cytokin, w tym chemokiny, interleukiny, interferon (IFN) i czynnik martwicy nowotworów (TNF). W chorobach neurodegeneracyjnych niektóre cytokiny uwalniane przez komórki rezydujące w OUN we wczesnym przebiegu choroby mogą przeciwdziałać uszkodzeniom lub stanom zapalnym tkanek. Jednak w miarę progresji choroby uwalniane cytokiny odgrywają rolę neurotoksyczną. Liczne badania wykazały, że poziomy niektórych interleukin, takich jak IL-1 β , IL-2 i IL-4, są podwyższone zarówno w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal*

fluid, CSF), jak i we krwi obwodowej pacjentów z ALS w porównaniu z osobami zdrowymi. Wśród głównych cytokin prozapalnych czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α) jest wydzielany przez aktywowane makrofagi i bierze udział w aktywacji fagocytów i ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Jego rola w patogenezie ALS jest nadal niejasna ze względu na działanie plejotropowe. W rzeczywistości w niektórych przypadkach poziom TNF- α we krwi i CSF pacjentów z ALS wzrasta lub pozostaje niezmienny. Według ostatnich doniesień wysoki poziom interferonu gamma (IFN- γ) we krwi i CSF pacjentów z ALS wiąże się z szybszą progresją i krótszym przeżyciem. Procesy zapalne, a tym bardziej neurozapalne, są niezwykle złożone. Zwłaszcza pod względem aktywowanych szlaków molekularnych, które wykazują swoisty dualizm, przekładając się na antagonistyczne mechanizmy neuroprotekcyjne i neurotoksyczne. Tak jak w przypadku mikrogleju – wczesne stadia ALS charakteryzują się obecnością neuroprotekcyjnych mediatorów przeciwzapalnych, podczas gdy w późniejszych stadiach przeważają cytotoksyczne mediatory prozapalne [15].

Wraz z rosnącą liczbą badań w ostatnich latach wykazano charakterystyczny profil cytokin/chemokin we krwi obwodowej i płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z ALS. Obserwacje te pogłębiają zrozumienie roli cytokin i immunoprzebiegów w patogenezie, wczesnej diagnostyce i potencjalnym dopasowaniu terapii. Dlatego niektórzy badacze sugerują, aby profil cytokin zastosować jako narzędzie diagnostyczne przydatne w monitorowaniu oraz predykcji progresji ALS [18].

1.1.3. Diagnostyka i leczenie ALS

Etiologia ALS pozostaje wciąż nieznaną, co znacznie utrudnia zaprojektowanie i opracowanie efektywnej terapii i precyzyjnego schematu diagnostycznego [1]. Rozpoznanie ALS opiera się na analizie historii przebiegu choroby, wywiadzie rodzinnym, wykluczeniu innych chorób neurodegeneracyjnych, badaniu fizykalnym, podstawowym zestawie badań krwi, badaniu elektromiograficznym (EMG), obrazowaniu mózgu oraz kręgosłupa oraz na biopsji mięśni szkieletowych. Badanie EMG jest bardzo przydatnym narzędziem diagnostycznym potwierdzającym dysfunkcję dolnego neuronu ruchowego (ang. *lower motor neuron*, LMN) czy czynności mięśni [2]. Biopsja mięśni szkieletowych pozwala na wykluczenie nietypowych miopatii, takich jak choroba ciałek poliglukozowych, lub na potwierdzenie diagnozy ALS poprzez rozpoznanie typowej atrofii mięśni. Rutynowe badanie neurofizjologiczne obejmuje badanie przewodnictwa nerwowego. Badania przewodnictwa nerwowego są niezbędne do wykluczenia zaburzeń naśladujących ALS, takich jak

demielinizacyjna neuropatia ruchowa. Należy wspomnieć, że bardzo trudno jest określić konkretną datę pierwszych objawów choroby. W rzeczywistości proces patologiczny w ALS zaczyna się na długo przed wystąpieniem pierwszych symptomów klinicznych. Początkowo wczesna dysfunkcja neuronalna kompensowana jest przez pobliskie neurony ruchowe, które tymczasowo rekompensują powstające deficyty [12]. Średni czas do rozpoznania ALS wynosi od 8 do 15 miesięcy. Biorąc pod uwagę, że oczekiwana mediana przeżycia w tej chorobie wynosi tylko 3 lata, kluczowe jest skrócenie czasu diagnostyki, monitorowanie progresji i jak najszybsze wprowadzenie terapii [19].

ALS należy do chorób nieuleczalnych. Chociaż na przestrzeni lat zaproponowano kilka substancji kandydujących na lek do leczenia ALS, to opracowanie skutecznej terapii nadal jest przedmiotem badań klinicznych. Wytyczne Europejskiej Sieci Referencyjnej ds. chorób nerwowo-mięśniowych dotyczące planu leczenia w rozpoznaniu ALS są bardzo ogólne. Główne zalecenia obejmują wprowadzenie leku z substancją czynną riluzol, który jest przyjmowany przez pacjentów od momentu rozpoznania. Pierwszy wprowadzony lek Riluzol wykazuje aktywność neuroprotekcijną. Jest antagonistą glutaminianu, którego mechanizm działania nie jest całkowicie zdefiniowany. Wiadomo, że hamuje uwalnianie glutaminianu i inaktywuje zależne od potencjału kanały sodowe. Wydłuża medianę przeżycia tylko o około 2 do 3 miesięcy [5]. Tymczasowym zaleceniem jest podawanie edarawonu, czy AMX0035. Edarawon (znany również jako MCI-186) początkowo został odkryty jako wymiatacz wolnych rodników i silny przeciwutleniacz w leczeniu ostrego udaru niedokrwiennego mózgu. Eliminuje nadtlenoazotyn i produkty peroksydacji lipidów, a także chroni neurony przed uszkodzeniami spowodowanymi przez wolne rodniki i stres oksydacyjny [8]. Dodatkowo do końca 2023 roku zapowiedziano wprowadzenie wytycznych dotyczących leku tofersen, opartego na technologii antysensownych oligonukleotydów (ASO), jako leczenia pierwszego rzutu przeznaczonego dla pacjentów z mutacją w genie dysmutazy ponadtlenkowej 1 (*SOD1*). Pomimo iż naukowcy i klinicyści na całym świecie poszukują skutecznego leczenia tej wyniszczającej choroby, złożony i wieloczynnikowy charakter patologii ALS utrudnia zidentyfikowanie celowanej terapii. Obiecujące opcje, w kontekście opracowania nowych strategii terapeutycznych, wprowadzają terapie komórkowe. Produkty oparte na preparatach/produktach komórkowych mogłyby stanowić ważne i alternatywne podejście w stosunku do klasycznej terapii farmakologicznej. Ich główne działanie mogłoby polegać na uwolnieniu czynników, które zapewnią działanie neuroprotekcyjne oraz wyciszenie stanu zapalnego [20]. Pierwsze badania kliniczne leczenia ALS oparte na produktach komórkowych zarejestrowano w bazie clinicaltrials.gov w roku 1998. Wiele z nich zawieszono lub zakończono

bez publikacji, a ich wyniki są w dużej mierze nieznane [21]. Jednym z kandydatów na produkt komórkowy są mezenchymalne komórki stromalne (ang. *mesenchymal stromal cell*, MSC). MSC posiadają zdolność regulacji odporności wrodzonej i nabytej poprzez uwalnianie czynników takich jak prostaglandyna E2 (PGE2), 2,3-dioksygenaza indoloaminy (IDO) i TGF- β , tym samym modyfikując środowisko z prozapalnego na przeciwzapalne i neuroprotektoryjne. Immunomodulujące i wydzielnicze zdolności MSC potencjalnie korzystne w terapii ALS, takie jak podwyższenie liczby limfocytów Treg oraz populacji komórek Th2 czy wydzielanie czynników neurotroficznych, odegrałyby ważną rolę w neuroprotektoryjnym wpływie w stosunku do neuronów ruchowych. Ponadto MSC mogą modulować właściwości funkcjonalne mikrogleju poprzez wydzielanie TGF- β , przełączając je z fenotypu klasycznie aktywowanego do fenotypu przeciwzapalnego [22].

1.1.4. Biomarkery – możliwość szybkiej i łatwej diagnozy oraz predykcji terapii ALS

Biomarkery definiuje się jako cechę mierzalną będącą wskaźnikiem prawidłowych procesów biologicznych, procesów chorobotwórczych lub reakcji i odpowiedzi na nowe interwencje terapeutyczne. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) wyodrębniła różne podtypy biomarkerów, takie jak: diagnostyczny, monitorujący, prognostyczny, predykcyjny, oceniający bezpieczeństwo lub ryzyko. Znalezienie odpowiednich biomarkerów diagnostycznych, które pomogą w odróżnieniu ALS od innych chorób, postawieniu szybszego rozpoznania czy monitorowaniu efektywności nowych leków, jest niezwykle pożądane. Zastosowanie zwalidowanych i kwalifikowanych biomarkerów w badaniach klinicznych ALS mogłoby znacznie zwiększyć wartość informacyjną na temat farmakodynamiki czy potencjału terapeutycznego leku. Wśród proponowanych biomarkerów ALS znajduje się oznaczanie domeny zewnątrzkomórkowej receptora neurotrofiny p75 (p75^{ECD}) w moczu, fosforylowanego ciężkiego neurofilamentu (pNfH) w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) i lekkiego neurofilamentu (NfL) w surowicy [23].

W przypadku ALS dobór biomarkerów powinien skupić się na powiązaniu procesu chorobowego w ośrodkowym układzie nerwowym z możliwością oznaczenia ich w tkance obwodowej, np. w CSF, osoczu, surowicy, moczu, czy ślinie i charakteryzować się stabilnością. W przeciwieństwie do płynu mózgowo-rdzeniowego inne płyny ustrojowe są łatwo dostępne i nie wymagają inwazyjnych metod ich pozyskiwania. Krew stanowi jedno z podstawowych źródeł materiału biologicznego używanego w diagnostyce, a jej uzyskanie od

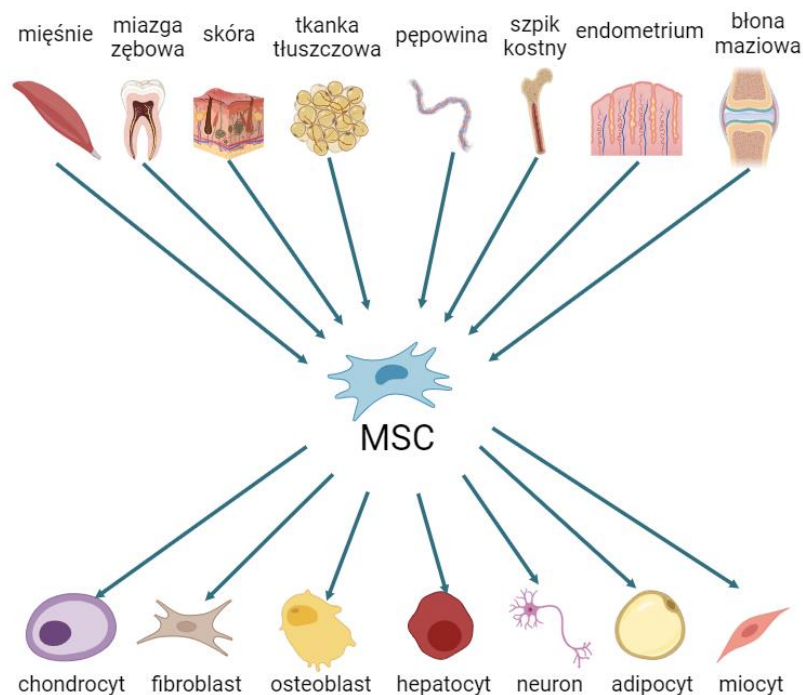
pacjentów jest proste i niedrogi. Próbkę krwi można łatwo frakcjonować na składniki, tj. osocze (lub surowicę) i elementy morfotyczne. Prowadzone badania wykazały, że rozkład subpopulacji limfocytów T i B, komórek NK i monocytów może odzwierciedlać status otaczającej tkanki [24]. Obserwowano zmiany w populacji limfocytów T u pacjentów z ALS, takie jak spadek krążących komórek Th w porównaniu z osobami zdrowymi. Wyniki te mogą sugerować, że spadek liczby krążących limfocytów T we wczesnej fazie choroby odzwierciedla wzrost liczby tych komórek w miejscu rozwoju patologii, jednak eksperymentalna walidacja tej hipotezy jej nie potwierdziła. Również liczba Treg i charakterystyczna ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxp3 były znacznie zmniejszone u pacjentów z szybszą progresją i odwrotnie skorelowane z dynamiką postępu choroby [15]. W przypadku porównania poziomu cytokin w surowicy – stwierdzono znaczące różnice w poziomach IL-1 β , IL-4 i IFN- γ między pacjentami z ALS a zdrowymi osobami. Wysoki poziom IL-1 β we krwi powoduje osłabienie neurogenezy i nasilenie glikogenezy, prowadząc do intensyfikacji procesów zapalnych. Dotyczy to zarówno ALS, jak i innych chorób neurodegeneracyjnych [11]. U pacjentów z ALS rozpoznanych poniżej 12 miesięcy poziom IL-6 był ujemnie skorelowany z progresją choroby, podczas gdy u pacjentów z rozpoznaniem powyżej 12 miesięcy poziomy IL-6 był dodatnio skorelowany z rozwojem choroby [18]. Białko MCP-1 odgrywa również ważną rolę w procesie zapalnym nerwów. W wielu badaniach zaobserwowano jego podwyższenie w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z ALS, a jego wysoki poziom korelował z ciężkim przebiegiem choroby. Poziom białka zapalnego makrofagów – 1 α i 1 β (MIP-1 α i MIP-1 β) również wpływa na środowisko zapalne, kumulując się w mikrogleju. Doniesienia wskazują, że poziom MIP-1 α i MIP-1 β jest podwyższony w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z ALS [25]. Należy jednak mieć na uwadze, że oznaczany profil cytokin we krwi czy CSF może być trudny do interpretacji ze względu na stan chorobowy, czynniki środowiskowe i podłoże genetyczne. Ponadto stosowanie niestandardowych oznaczeń może być związane z zastosowaniem odmiennych procedur normalizacji czy procedury zabezpieczenia i przechowywania próbek [4]. Podczas pobierania próbek w różnych ośrodkach klinicznych istotne jest, aby próbki były pobierane i zabezpieczane według ustalonych i zwalidowanych protokołów. Każde odstępstwo od protokołu może wpłynąć np. na poziom komórek zaktywowanych lub zapalnych, wprowadzając zaburzenia w wyniku i jego interpretacji. Pomocną innowacją w identyfikacji nowych markerów w ALS może okazać się podejście oparte na uczeniu maszynowym.

1.2. Komórki MSC jako produkt terapii komórkowej

Najprostsza definicja komórek macierzystych wskazuje na ich dwie kluczowe cechy: zdolności do podziału oraz różnicowanie w inne typy komórek. Kluczową kwestią jest posiadanie potencjału do samoodnawiania w związku z przechodzeniem asymetrycznych podziałów. Komórki macierzyste gwarantują fizjologiczny proces regeneracji tkanek i utrzymania homeostazy organizmu. Można je klasyfikować zgodnie z ich potencjałem (totipotentny, pluripotentny lub multipotentny), czy pochodzeniem (embrionalne komórki macierzyste, komórki uzyskane z płodu i tkanek popłodowych oraz komórki uzyskane od urodzonych i starzejących się organizmów). Totipotencja odnosi się do zdolności generowania całego spektrum typu komórek, w tym tworzących organizm, jak i tkanki pozapłodowe, np. łożysko. Pluripotencja dotyczy zdolności różnicowania w trzy listki zarodkowe (endoderme, mezoderme i ektoderme). Wreszcie multipotencja to możliwość różnicowania w specyficzny typ komórki, najczęściej związany z określoną tkanką [20]. Istnieje wiele różnych typów komórek macierzystych o różnych zdolnościach i źródłach występowania. Mezenchymalne komórki stromalne (MSC) są komórkami multipotencjalnymi, co oznacza, że mają zdolność rozwijania się w kilka typów wyspecjalizowanych komórek. Komórki MSC są najszerszej stosowanym w badaniach klinicznych produktem komórkowym. Najczęściej wykorzystywanym źródłem komórek MSC jest autologiczny szpik (ang. *bone marrow mesenchymal/stromal cells*, BM-MSC), mimo niesionych za sobą obaw związanych z wiekiem dawcy czy obecnymi wadami genetycznymi powiązаныmi z chorobą. Dotychczasowe badania, które porównały cechy MSC wyizolowane od osób zdrowych względem pacjentów z ALS wykazały znaczące różnice w ich morfologii, potencjale różnicowania i ekspansji, a także zmian na poziomie fenotypu [21]. BM-MSC są izolowane ze szpiku uzyskanego z talerza kości biodrowej. Jest to metoda inwazyjna, wymagająca znieczulenia i leczenia szpitalnego, przez co dodatkowo może wiązać się z wystąpieniem powikłań. Wadą stosowania komórek autologicznych jest to, że mogą one zachować kluczowe znaczniki epigenetycznej choroby i mieć negatywny wpływ na końcowy efekt terapeutyczny [26]. Przykładowo MSC uzyskane od pacjentów z ALS wykazały zmniejszoną ekspresję *Oct-4* i *NANOG* oraz poziom czynników troficznych ANG, FGF-2, HGF, IGF-1, PIGF, SDF-1 α , TGF- β i VEGF, czy ich obniżoną zdolność do migracji [5].

Badania nad MSC rozpoczęto ponad 5 dekad temu, w 1966 roku, gdy z mysiego szpiku kostnego zespół A.J. Friedensteina wyizolował komórki. W hodowli komórki adherentne utworzyły wrzecionowate kolonie zbliżone morfologią do fibroblastów [27]. Po wielu latach,

w roku 1991, A.I. Caplan wprowadził termin MSC. Od tego czasu MSC stały się znanym źródłem komórek do zastosowań klinicznych [28]. MSC izolowane są z takich źródeł jak szpik kostny, tkanki płodu (sznur pępowinowy, owodnia, kosmki łożyska), tkanka zębowa, tkanka tłuszczowa i inne (ryc. 5) [27].



Ryc. 5. Źródło komórek MSC i ich zdolności do różnicowania. Źródłem komórek MSC jest m.in. sznur pępowiny, szpik kostny, tkanka tłuszczowa, błona maziowa, miazga zębowa, endometrium i in. MSC posiadają zdolności różnicowania m.in. w kierunku chondrocytów, fibroblastów, osteoblastów, adipocytów czy miocytów. Zmodyfikowano na podstawie [27]

Międzynarodowe Towarzystwo ds. Terapii Komórkowej ISCT zaproponowało minimalne kryteria definiowania MSC:

- morfologia podobna do fibroblastów i posiadanie zdolności adhezji do naczyń hodowlanych;
- obecność markerów na powierzchni komórki CD105, CD73 i CD90 oraz brak antygenów charakterystycznych dla linii hematopoetycznej, czyli CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79 α lub CD19 i antygenów HLA-DR;
- zdolność do różnicowania *in vitro* w osteoblasty, adipocyty i chondroblasty.

Pierwotnie minimalnie ustalone kryteria miały na celu ujednoczenie MSC wśród laboratoriów badawczych. Dziś te kryteria wymagają modyfikacji o nowo dostępną wiedzę na temat MSC [26].

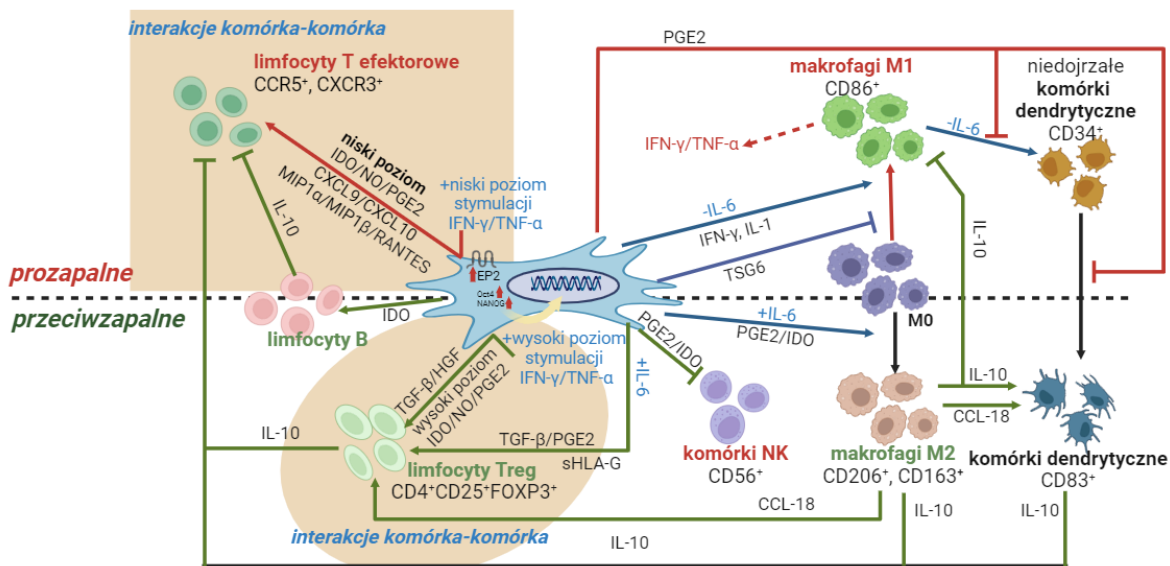
Pożądaną cechą MSC jako kandydata na terapię komórkową związaną z immunomodulacją i działaniem przeciwzapalnym jest wydzielanie przez te komórki wielu cytokin i czynników wzrostu. Wśród kluczowych czynników wymienia się:

- cytokiny, w tym IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 i IL-15;
- płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF);
- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF);
- czynnik wzrostu hepatocytów (HGF);
- neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF);
- czynnik wzrostu nerwów (NGF);
- insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF);
- czynnik pochodzenia zrębowego-1 (SDF-1);
- czynnik wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF);
- czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów i granulocytów (GM-CSF).

Chociaż MSC mają zdolność różnicowania się w różne typy komórek, to większość ich pozytywnych efektów przypisuje się działaniu parakrynnemu. Wydzielane przez MSC czynniki parakryne biorą m.in. udział w ochronie przed włóknieniem, apoptozą czy stresem oksydacyjnym, w promowaniu angiogenezy oraz działaniu immunomodulującym i neuroprotekcijnym. W zależności od mikrośrodowiska MSC mogą wydzielać neuroprotekcyjne czynniki wzrostu w tkance nerwowej, które chronią neurony i komórki glejowe. Wydzielanie czynników troficznych powoduje wzrost m.in. neurotroficznego czynnika pochodzącego z linii komórek glejowych (GDNF), BDNF, VEGF, IGF-1, NGF, promując różne mechanizmy układu nerwowego do jego regeneracji [29].

Proponowane ścieżki oddziaływania produktu komórkowego opartego na mezenchymalnych komórkach stromalnych to m.in. immunomodulacja. Immunomodulacja ma miejsce poprzez interakcję bezpośrednią komórka–komórka oraz pośrednio przez wydzielanie cytokin i substancji rozpuszczalnych. Należy zauważyć, że w zależności od mikrośrodowiska, w jakim się znajdują, MSC mogą działać pro- lub przeciwzapalnie. Przy niskich poziomach stymulacji IFN- γ i TNF- α – MSC wykazują fenotyp prozapalny (ryc. 6, strzałki czerwone). MSC wytwarzają chemokiny, takie jak MIP-1, RANTES (ang. *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), chemokina motyw CXC ligand 9 (CXCL9), chemokina motyw CXC ligand 10 (CXCL10), w swoim mikrośrodowisku, aktywując limfocyty T. MSC poprzez silne wydzielanie PGE2 hamują prekursorów komórek dendrytycznych (ang. *dendritic cell*, DC) w procesie ich różnicowania i dojrzewania. W przypadku braku interleukiny-6 (IL-6) MSC sprzyjają proliferacji i aktywacji makrofagów M1. Przejście z M0 (makrofagi

nieaktywowane) do prozapalnego makrofaga M1 jest indukowane przez wydzielanie interferonu gamma (IFN- γ) i IL-1 wraz z ekspresją białka powierzchniowego ligandu CD40 (CD40L). Ponadto makrofagi M1 ekspresyjnie produkują IFN- γ i czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) w mikrośrodkowisku w odpowiedzi na aktywację limfocytów T. Natomiast w mikrośrodkowisku przeciwpalnym zjawisko to może być hamowane. Mechanizm sprzężenia zwrotnego badany w odniesieniu do cytokin prozapalnych *in vitro* sprawia, że MSC wzmacniają odpowiedź immunologiczną poprzez produkcję chemokin CXCL-9, CXCL-10 i CXCL-11. Prowadzi to do przemieszczania się większej liczby neutrofilów w kierunku miejsca zapalenia, w którym działają głównie przez fagocytozę. Efekt przeciwpalny MSC hamuje działanie cytokin prozapalnych w mikrośrodkowisku. MSC skutecznie hamowały aktywację i proliferację limfocytów T (ryc. 6, strzałki zielone) [28].



Ryc. 6. Rola prozapalna (strzałki czerwone) i przeciwpalna (strzałki zielone) komórek MSC w odpowiedzi immunologicznej. Poprzez interakcje z MSC komórka–komórka może wystąpić immunosupresja proliferacji komórek B i T, indukcja i regulacja regulatorowych limfocytów T (Treg) za pośrednictwem transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) / czynnika wzrostu hepatocytów (HGF). Działanie immunomodulacyjne MSC następuje poprzez hamowanie komórek NK, DC, a także w zależności od ich polaryzacji – makrofagów i mikrośrodkowiska. Zmodyfikowano na podstawie [28]

To szczególne zachowanie MSC w obecności i nieobecności cząsteczek zapalnych nazywa się polaryzacją MSC. Przy wysokim poziomie IFN- γ i TNF- α MSC wytwarzają cytokiny, takie jak transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), oraz wydzielają czynniki rozpuszczalne, takie jak 2,3-dioksygenaza indoloaminy (IDO), PGE2 i tlenek azotu (NO). Czynniki te bezpośrednio aktywują limfocyty T regulatorowe CD4+

CD25+Foxp3+ (Treg). Odpowiadając na stymulację IL-6, MSC ponownie wydzielają TGF- β i PGE2, aby wywołać aktywację komórek Treg. MSC mogą również pośrednio promować aktywację komórek Treg. MSC poprzez sekrecjęIDO wyzwalają proliferację, aktywację i wydzielanie immunoglobulin G (IgG) przez komórki B [28].

MSC regulują komórki odpornościowe zarówno związane z wrodzoną, jak i nabytą odpowiedzią układu odpornościowego poprzez uwalnianie czynników takich jak prostaglandyna E2, 2,3-dioksygenaza indoloaminy i TGF- β , zmieniając w ten sposób środowisko pacjenta z prozapalnego i toksycznego na przeciwzapalne, wprowadzając go w stan neuroprotekcyny. Zdolności immunoregulacyjne MSC, takie jak wpływ na wzrost liczby limfocytów T regulatorowych (Treg) i limfocytów pomocniczych Th2, odgrywają ważną rolę w działaniu neuroprotekcynym, co również występuje przy wydzielaniu czynników neurotroficznych. Ponadto MSC mają zdolność modulowania funkcji mikrogleju poprzez wydzielanie TGF- β oraz przełączanie ich z fenotypu aktywowanego (M1) klasycznie do fenotypu przeciwzapalnego (M2). Te właściwości MSC mogą zostać potencjalnie wykorzystane jako strategia terapeutyczna do hamowania toksyczności w procesach neurozapalnych w fazie objawowej ALS [30].

Obecnie zarejestrowanych jest ponad 900 badań klinicznych (clinicaltrials.gov) wykorzystujących komórki MSC w wielu wskazaniach. Badania kliniczne podzielono na terapie komórkami autologicznymi – wykorzystujące własny materiał pacjenta (np. izolacja MSC ze szpiku czy tkanki tłuszczowej) i allogenicznymi – w celu izolacji komórek MSC materiał pobierany jest od dawcy (np. izolacja MSC z tkanek płodu, takich jak sznur pępowinowy, łożysko, owodnia) [31][32][33]. Terapia autologicznymi komórkami macierzystymi wymaga pobrania komórek od biorcy, a następnie ich izolacji i ekspansji przez kilka tygodni, aby uzyskać niezbędną dawkę. Z pierwszymi terapiami komórkowymi opartymi na źródle autologicznym wiązało się kilka wad: i) wysoki koszt wytwarzania (przygotowywanie pojedynczych serii), ii) trudności w utrzymaniu wysokiej kontroli jakości, ponieważ na jakość pozyskanych komórek może mieć wpływ stan zdrowia pacjenta oraz choroby współistniejące. W celu umożliwienia szerszego dostępu do terapii komórkowej zaproponowano źródła allogeniczne. Wraz z postępem technologii genotypowania (w celu genetycznego dopasowania dawców pod kątem immunogenności), jak również dzięki coraz szerszej wiedzy dotyczącej właściwości MSC pozyskiwanie allogeniczne umożliwia produkcję serii produktów na większą skalę dla większej liczby pacjentów, proponując terapię typu *off the shelf* [34].

Początkowo produkty oparte na MSC wykorzystywano głównie w medycynie regeneracyjnej do naprawy i regeneracji tkanek, jednak takie podejście nie zapewniło oczekiwanych efektów terapeutycznych. Obecnie coraz częściej stosuje się je w przypadku chorób powiązanych z dysfunkcją i nadmierną aktywacją komórek układu odpornościowego, takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft-versus-host disease*, GVHD), choroby autoimmunologiczne, jak toczeń i choroba Leśniowskiego-Crohna, oraz choroby neurodegeneracyjne. Kliniczny potencjał preparatów MSC był weryfikowany w odniesieniu do terapii zawału mięśnia sercowego, udaru, stwardnienia rozsianego, marskości wątroby, cukrzycy czy schorzeń płuc [35]. Należy podkreślić, że większość prób klinicznych produktów MSC ukierunkowana jest w stronę weryfikacji bezpieczeństwa ich podania [21].

Przebieg hodowli oraz kriokonserwacji produktów MSC do zastosowania klinicznego wymaga ustalonych standardów. Na różnice, zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych, może mieć wpływ odmienna charakterystyka i funkcje komórek MSC ze względu na ich naturalną heterogenność, ale także ze względu na ich sposób hodowli *in vitro* – stosowane podłoża, gęstość wysiewu czy warunki tlenowe [26]. Podstawowe kryteria ISCT są pomocne jedynie w odróżnieniu wyizolowanej populacji komórek od komórek krwiotwórczych, jednak nie są unikalne dla MSC, a tym bardziej nie sprawdzają ich funkcjonalności. Komitet w 2019 roku opublikował zaktualizowane stanowisko, zalecając wykonanie dodatkowo testu funkcjonalności wykazującego właściwości komórek MSC, takie jak immunomodulacja, angiogeneza czy wydzielanie czynników troficznych [36]. Największe ograniczenia w projektowaniu terapii opartej na produkcie komórkowym MSC to zmienność między dawcami i potrzeba wydajnej ekspansji, umożliwiającej uzyskanie dawki klinicznej. Dzięki licznym badaniom wiadomo, że ekspansja, kinetyka, zdolność do różnicowania są zależne od wieku dawcy. Komórki uzyskane od dawców starszych wykazują zwiększoną obecność proapoptotycznych białek p53 i p21. Inne czynniki zależne od dawcy, a mające wpływ na jakość i fenotyp uzyskiwanych komórek to: wskaźnik masy ciała (BMI), styl życia czy obecność warunków patofizjologicznych w organizmie. Ta heterogenność w populacji komórek, zależna m.in. od dawcy czy źródła komórek, prowadzi również do obserwowanej znacznej zmienności profilu wydzielniczego MSC. Ze względu na te czynniki, które znacząco przyczyniają się do wewnątrzpopulacyjnego, ale i międzypopulacyjnego zróżnicowania MSC, niezbędne jest opracowanie strategii ekspansji jednorodnych MSC w produkcie komórkowym [36].

MSC z galarety Whartona (WJ-MSC) pochodzące ze sznura pępowiny zakwalifikowanego jako odpad medyczny stanowią bardzo atrakcyjne źródło pozyskiwania

allogenicznego produktu komórkowego [35]. Pod względem właściwości biologicznych WJ-MSC wykazują *in vitro* wyższy potencjał proliferacyjny niż BM-MSC. „Badania wykazały, że WJ-MSC mogą utrzymać stały czas podwojenia do pasażu 10, podczas gdy BM-MSC do pasażu 6”. Dlatego klinicznie efektywną dawkę opartą na komórkach WJ-MSC można osiągnąć wcześniej niż dawkę uzyskaną z BM-MSC [25]. Ze względu na niski poziom ekspresji głównego układu zgodności tkankowej (MHC) oraz brak ligandu kostymulatorów, takich jak CD40, CD80 i CD86, komórki WJ-MSC cechuje obniżona immunogenność [37]. WJ-MSC wykazują ekspresję cząsteczki HLA-G, nieklasycznego antygeny zgodności tkankowej, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w postaci rozpuszczalnej. Płodowa ekspresja i obecność wysokiego poziomu HLA-G może hamować alloreaktywność ze strony matki, inicjując proces tolerogeny występujący na poziomie płód–matka [38].

Ekspansja MSC *in vitro* do celów terapeutycznych przebiega na podstawie procedur Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP) w pomieszczeniach czystych typu *clean room*, w klasie czystości A w otoczeniu klasy czystości B, gdzie jakość powietrza i ilość cząstek są kontrolowane [27]. W Europie kliniczne produkty komórkowe oparte na komórkach MSC uznawane są za produkt leczniczy terapii zaawansowanej (ATMP), zgodnie z unijnym rozporządzeniem nr 1394/2007. Dodatkowo produkty komórkowe MSC można przyporządkować, jako grupę produktów leczniczych, somatycznej terapii komórkowej (ang. *somatic cell therapy medicinal product*). Grupa ta to preparaty składające się z komórek niemodyfikowanych genetycznie, bez przeznaczenia do zastosowań w tych samych tkankach, z których pochodzą [39]. Produkty ATMP to szybko rozwijająca się dziedzina medycyny o szerokim potencjale zastosowania [40]. Obecnie wiele terapii ATMP jest przeznaczonych dla pacjentów, których potrzeby nie są zaspokajane przez leki w aktualnym standardzie opieki [41]. Według obowiązujących przepisów prawa polskiego, podanych na stronie <https://www.gov.pl/>, „podjęcie wytwarzania produktów leczniczych terapii zaawansowanej ATMP wymaga uzyskania zgody Głównego Inspektora Farmaceutycznego. Zgoda wydawana jest w drodze decyzji. Zgoda na wytwarzanie potwierdza, na podstawie przeprowadzonej inspekcji w miejscu wytwarzania, spełnienie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania i nie może być interpretowana jako zgoda na leczenie tymi produktami”.

Zrozumienie mechanizmów, dzięki którym MSC tworzą środowisko *in vivo* sprzyjające regeneracji komórek i tkanek, jest kluczem do opracowania skutecznej metody terapeutycznej wykorzystującej mezenchymalne komórki stromalne w leczeniu ALS.

2. CELE PRACY

Celem przedstawionej pracy było opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartej na komórkach mezenchymalnych galarety Whartona (WJ-MSC) mającego zastosowanie w terapii stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Cel ten był oparty na dwóch filarach.

Pierwszym filarem było przygotowanie i charakterystyka produktu komórkowego, obejmujące przygotowanie banku, jego rozszerzoną charakterystykę i podział na klastry terapeutyczne. Kluczowym elementem było zbadanie potencjału komórek WJ-MSC na poziomie immunologicznym i genetycznym w celu ich klasteryzacji.

Filar drugi był realizowany poprzez przeprowadzenie badania klinicznego ALSTEM oraz dokonanie analiz materiału biologicznego pozyskanego od pacjentów włączonych do badania. Efektem była selekcja czynników predykcyjnych przy ocenie pacjentów w badaniu klinicznym, dla których badanym produktem leczniczym były allogeniczne komórki MSC.

Cel był realizowany poprzez wymienione poniżej prace badawcze:

- 1) Przygotowanie banku produktów komórkowych WJ-MSC (zgodnie z obowiązującymi normami cGMP) zwolnionych do badania klinicznego ALSTEM.
- 2) Rozszerzona charakterystyka banku produktów komórkowych WJ-MSC oparta o: test jednostek tworzących kolonie (CFU), rozszerzony fenotyp z nieklasycznymi markerami takimi jak CD119, CD200, CD120b, CD72, CD273, CD274, CD39, HO, panel bezpieczeństwa określający poziom ekspresji wybranych genów, analizę sekretomu, test sprawdzający właściwości immunomodulujące produktu oparty na kohodowli WJ-MSC z aktywowanymi jednojądrzastymi komórkami dawcy zdrowego.
- 3) Ustalenie klasteryzacji i podziału na klastry terapeutyczne banku produktów komórkowych WJ-MSC na podstawie ich rozszerzonej charakterystyki oraz przy użyciu algorytmów bioinformatycznych.
- 4) Ocena pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM według ich odpowiedzi terapeutycznej na badany produkt leczniczy – BPL (allogeniczne komórki WJ-MSC) na podstawie: parametrów i standardowych ocen klinicznych, immunofenotypu krwi obwodowej, profilu wybranych cytokin, chemokin i czynników wzrostu w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym oraz biologicznego markera progresji choroby ALS – p75^{ECM} w moczu.
- 5) Identyfikacja czynników predykcyjnych umożliwiających ocenę potencjalnej skuteczności terapii komórkowej WJ-MSC przy użyciu algorytmów bioinformatycznych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. **Utworzenie banku produktów ATMP (ang. *advanced therapy medicinal products*, produkt leczniczy terapii zaawansowanej) opartych na allogenicznych komórkach mezenchymalnych z galarety Whartona zgodnie z obowiązującymi normami Dobrej Praktyki Produkcyjnej cGMP (ang. *current Good Manufacturing Practice*, aktualna Dobra Praktyka Produkcyjna)**

W celu stworzenia banku komórek WJ-MSC pobrane sznury pępowinowe kwalifikowano do przetworzenia na podstawie restrykcyjnych kryteriów włączenia i wyłączenia opartych na wywiadzie medycznym oraz wynikach wirusologicznych badań krwi matki. Przyjęcie tkanki do przetworzenia następowało tylko i wyłącznie wtedy, kiedy rodzice wyrazili świadomą zgodę oraz złożyli podpisy, oświadczając, że:

- zostali poinformowani przez personel medyczny w sposób prosty i zrozumiały o celu i procesie pobierania fragmentu sznura pępowinowego po porodzie ich dziecka;
- wyrażają zgodę na pozyskanie fragmentu sznura pępowinowego w celu wytworzenia produktu leczniczego „komórki mezenchymalne galarety Whartona” przeznaczonego do zastosowań klinicznych w oparciu o zgodę nr GIF-IW-400/WTC0436/01/41/UA2/14 Głównego Inspektora Farmaceutycznego i przeznaczonego do wytworzenia produktu leczniczego dla potrzeb przeprowadzenia badań klinicznych;
- wyrażają zgodę na przekazanie wytworzonego produktu leczniczego ośrodkowi klinicznemu;
- wyrażają zgodę na wykonanie badania cytogenetycznego – kariotyp wyizolowanych komórek;
- wyrażają zgodę na wykonanie badań diagnostycznych matki w kierunku: HBV, HCV, HIV, CMV, toksoplazmozy, kiły oraz badań genetycznych – kariotyp.

Kwestionariusz medyczny mający zastosowanie przy pozyskaniu fragmentu sznura pępowinowego służy kwalifikacji dawcy materiału biologicznego i jest analizowany przez lekarza PBKM, który na jego podstawie stwierdza, czy stan zdrowia matki i ojca może mieć wpływ na jakość i przydatność leczniczą produktu komórkowego. Kwestionariusz zawiera m.in. pytania dotyczące ciąży (która ciąża, który poród, czy wystąpiły poronienia i z jakiego powodu, czy w trakcie ciąży była stosowana antybiotykoterapia, czy w trakcie ciąży lub ewentualnie poprzednich ciążach występowały komplikacje/odchylenia w badaniach

prenatalnych, czy w czasie ciąży były wykonywane zabiegi mające kontakt z krwią), czy przebytych chorób i przyjmowanych leków.

Proces wytworzenia oraz zwolnienia preparatów komórkowych i produktów leczniczych terapii zaawansowanej oparty był na szczegółowych procedurach produkcyjnych, kontrolnych, jak i jakościowych zwiększając gwarancję wytworzenia zgodnie ze specyfikacją zwolnienia. System oparty na procedurach czy zwalidowanych metodach ma na celu zapewnienie powtarzalności wytwarzanych produktów. Nadzór miał miejsce już od kwalifikacji dostawców materiałów, poprzez ich magazynowanie, kolejne etapy wytwórcze łącznie z formulacją i mrożeniem produktu komórkowego po jego kontrolę jakości, zwolnienie do obrotu czy dystrybucję. Zasady postępowania dotyczące preparatyki fragmentu sznura pępowinowego w celu uzyskania materiału wyjściowego oraz dalszej ekspansji komórek WJ-MSC w celu uzyskania badanego produktu leczniczego terapii zaawansowanej na potrzeby projektu ALSTEM zawarto w procedurze wytwórni farmaceutycznej pt. „Wytwarzanie MSC z galarety Whartona w ramach projektu ALSTEM”. Procedura opisuje proces od momentu rozpakowania zestawu zawierającego tkankę, jego kwalifikację do preparatyki, poprzez preparatykę i izolację komórek, do momentu zamrożenia gotowego produktu komórek mezenchymalnych. Wyznacza również zasady postępowania w celu wykonania wszystkich badań kontroli jakości czy zwalniania, certyfikacji i dystrybucji produktów komórkowych do badania klinicznego. Ze względu na możliwość naruszenia tajemnicy oraz know-how przedsiębiorstwa w rozprawie doktorskiej zawarto jedynie ogólne opisy wykonanych metod oraz użytych materiałów.

Po kwalifikacji materiału biologicznego komórki WJ-MSC izolowano z galarety Whartona sznura pępowiny pobranego od zdrowych noworodków w warunkach cGMP (ang. *current Good Manufacturing Practice*, aktualna Dobra Praktyka Produkcyjna) oraz za zgodą Głównego Inspektora Farmaceutycznego (GIF) przy użyciu tylko i wyłącznie odczynników XF (ang. *xeno-free*) bez komponentów odzwierzęcych. Hodowle pierwotne komórek MSC założono z eksplantów galarety Whartona. Po około dwóch tygodniach pod mikroskopem zaobserwowano wrzecionowate komórki adherentne, wyglądem zbliżone do fibroblastów. Komórki poddano weryfikacji jakościowej według specyfikacji – polegającej na sprawdzeniu ich charakterystycznych antygenów (negatywne Lin-: CD34, CD45, CD19, CD14, HLA-DR; pozytywne: CD73, CD90, CD105), liczby, żywotności, sprawdzeniu prawidłowości kariotypu, obecności endotoksyn i mykoplazmy oraz jałowości mikrobiologicznej.

3.1.1. Izolacja WJ-MSC z ludzkiej pępowiny (materiał wyjściowy)

Fragment pępowiny (materiał wyjściowy) został pobrany przez przeszkolone położne podczas porodu naturalnego lub cięcia cesarskiego za świadomą zgodą rodziców. Pobraną tkankę (będącą odpadem medycznym) umieszczono w sterylnym pojemniku transportowym wypełnionym płynem transportowym (0,9-proc. roztwór chlorku sodu – Fresenius Kabi, uzupełniony 1-procentowym roztworem antybiotyku / środka przeciwgrzybiczego – Antibiotic/Antimycotic Gibco). Po transporcie do laboratorium w temperaturze 4–8°C pobrany fragment pępowiny przemyto sterylnym 0,9-proc. roztworem chlorku sodu uzupełnionym roztworem antybiotykowo-przeciwgrzybiczym. Następnie pobraną pępowinę podzielono na mniejsze ok. 1-cm fragmenty, z których usunięto naczynia krwionośne. Oczyszczoną galaretę Whartona rozdrobniono na mniejsze skrawki ok. 1–2 mm³ i umieszczono w pożywce wolnej od komponentów zwierzęcych i surowicy w butelce hodowlanej 3-piętrowej o pojemności 525 cm². Pożywka hodowlana to komercyjnie dostępne medium 3-składnikowe MSC NutriStem XF (medium bazowe + suplement + roztwór fibronektyny, Biological Industries) przeznaczone do izolacji i ekspansji komórek MSC. Skrawki umieszczono na naczyniach uprzednio pokrytych roztworem fibronektyny, według protokołu producenta. Naczynia ze skrawkami (hodowla pierwotna/pasaż 0) inkubowano w inkubatorze hodowlanym w 37°C w 5% CO₂ w powietrzu. Po maksymalnie 4 tygodniach hodowle sprawdzono przy użyciu mikroskopu odwróconego na obecność przylegających komórek, morfologią przypominających fibroblasty. Wszystkie nieprzylegające komórki obecne w hodowlach wypłukano przy użyciu 0,9-proc. roztworu chlorku sodu (Fresenius Kabi). Komórki adherentne odrywano od powierzchni naczyń hodowlanych za pomocą enzymu TrypLE™ Express Enzyme 1X (Gibco) w celu ich dalszej ekspansji.

3.1.2. Ekspansja *ex vivo* komórek WJ-MSC

Komórki adherentne pasażowano średnio co 3–4 dni po wizualnej kontroli poziomu konfluencji komórek dochodzącej do 80%. Pasaże wykonano przy użyciu metody mechaniczno-enzymatycznej, a następnie komórki wysiewano na nowe naczynia/systemy hodowlane. Komórki składające się na ostateczny produkt komórkowy namnażano do pasażu trzeciego (p3).

3.1.3. Formułacja produktu komórkowego i jego kriokonserwacja

Po zakończeniu hodowli komórkowej (p3) pożywkę hodowlaną usunięto pobierając jej próbki do testów kontroli jakości. Komórki z poszczególnych naczyń/systemów hodowlanych za pomocą metody mechaniczno-enzymatycznej zbierano z naczyń hodowlanych i zawieszano w 5-proc. roztworze ludzkiej albuminy. Następnie komórki wirowano przy $300 \times g$ przez 7 minut w temperaturze 20–22°C. Osad komórek ponownie zawieszono w 5-proc. roztworze ludzkiej albuminy (CSL Behring), a następnie filtrowano przez filtr 100 μm . Wyznaczono liczbę i żywotność komórek i ponownie odwirowywano. Osad komórek zawieszono w mieszaninie kriochronnej, dodając schłodzony wcześniej roztwór kriochronny DMSO (WAK Chemie) uprzednio rozcieńczony częścią albuminy ludzkiej. Zawiesina produktu została rozdzielona do worków mrozeniowych (odpowiednio zgodnie z zamówioną dawką), jak również na próby przeznaczone do testów kontroli jakości, w tym testów oznaczających jałowość produktu, czy dodatkowe próby referencyjne i archiwalne. Materiał zamrożono przy użyciu zamrażarki z kontrolowanym mrożeniem. Zamrożone serie produktu końcowego umieszczono w oparach ciekłego azotu w celu długoterminowego przechowywania według ustalonej daty ważności na podstawie przeprowadzonych badań stabilności produktu komórkowego.

3.1.4. Charakterystyka i zwolnienie produktów WJ-MSc zgodnie z ustaloną specyfikacją produktu końcowego

Reprezentatywne próby produktu przeznaczone na testy kontroli jakości rozmrożono w temperaturze 37°C. Zawiesinę komórek przeniesiono do probówki wirówkowej 15 ml typu Falcon do 5 ml kompletnego medium MSC NutriStem XF (baza + suplement) i zwirowano w celu usunięcia DMSO (10 min, $300 \times g$, 20–22°C). Oznaczono liczbę i żywotność komórek, a następnie wysiano 1 mln komórek żywych na butelkę hodowlaną T-75 uprzednio opłuszczoną roztworem fibronektyny. Ocena obejmowała:

- ocenę morfologiczną

Wizualizacja zdolności przylegania komórek do plastiku przy użyciu mikroskopu odwróconego.

- ocenę fenotypu zgodnie z wytycznymi ISCT

Po uzyskaniu 80% konfluencji komórki odklejono od powierzchni naczynia hodowlanego przy użyciu TrypLE™ Express Enzyme 1X (Gibco), a następnie zawieszono w minimalnej gęstości 1×10^6 komórek/ml w buforze przeznaczonym do

cytometrii przepływowej (BD Pharminogen). Komórki znakowano przez 30 minut, wykorzystując przeciwciała skoniungowane z fluorochromami, skierowanymi przeciwko markerom CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD19, CD14, HLA-DR. W celu wykluczenia niespecyficznego odczytu i zakłóceń wykonano kontrole izotypowe dla każdego fluorochromu. Pomiar przeprowadzono za pomocą FACSLyric firmy Becton Dickinson, używając oprogramowania BD FACSuite.

- karyotyp

Zamrożone próbki z produktem wysłano do laboratorium zewnętrznego, któremu zlecono oznaczenie karyotypu komórek, składających się na produkt komórkowy WJ-MSK.

- jałowość preparatów komórkowych, obecność endotoksyn i mykoplazm

- ocena jałowości za pomocą systemu BACTEC:

Z pobranych próbek nadsączu znad hodowli oraz produktu po formułacji sprawdzono jałowość produktów komórkowych. Próbkę za pomocą sterylnej igły i strzykawki wstrzyknięto do podłoża BD BACTEC Plus Aerobic/F Medium i BD BACTEC Plus Anaerobic/F Medium – przeznaczonego odpowiednio do wzrostu zanieczyszczeń tlenowych i beztlenowych. Butelki umieszczono w analizatorze mikrobiologicznym BACTEC FX na 14 dni. System Bactec wykorzystuje jakościową procedurę wykrywania mikroorganizmów. System BACTEC FX posiada protokoły umożliwiające sygnalizację wyniku na podstawie zmiany fluorescencji w czasie. Gdy mikroorganizmy są obecne w zaszczipionej próbce w butelce BACTEC, organizmy metabolizują substraty obecne w podłożu i wytwarzają dwutlenek węgla (CO₂), a aparat wykrywa wzrost fluorescencji, spowodowany większą ilością CO₂, i alarmuje o wyniku pozytywnym.

- ocena obecności endotoksyn:

Obecność endotoksyn sprawdzono przy użyciu systemu Endosafe®-PTS™ Charles River. Metoda opiera się na chromogenicznej reakcji kinetycznej z Limus Amebocyte Lysate (LAL) i jest w pełni zgodna z wymaganiami Farmakopei Europejskiej (Ph.Eur. 2.6.14). Metoda polega na pomiarze intensywności barwy powstałej w wyniku enzymatycznego rozkładu syntetycznego kompleksu peptyd–chromogen, która jest wprost proporcjonalna do stężenia endotoksyn w badanej próbce.

- ocena obecności mykoplazmy:

W przypadku oznaczania zanieczyszczeń z grupy mykoplazm wykonywany jest test z użyciem zestawu Venor®GeM Classic KIT, który opiera się na amplifikacji PCR

z wizualizacją elektroforezy w żelu agarozowym. Zestaw przeznaczony jest do wykrywania *Mollicutes*, takich jak *Mycoplasma*, *Acholeplasma* i *Spiroplasma*, w hodowlach komórkowych i innych matrycach biologicznych. Celem testu jest wykrycie wszystkich gatunków mykoplazm wymienionych w Farmakopei (Ph.Eur. 2.6.7).

3.2. Rozszerzona charakterystyka banku z produktami WJ-MSC i jego klasteryzacja

Charakterystykę rozszerzoną przeprowadzono tylko i wyłącznie na produktach komórkowych zwolnionych do obrotu zgodnie z ATMP (ang. *advanced therapy medicinal products*). Z serii pochodzących od 14 różnych WJ-MSC uzyskanych z pępowiny dawców (ALS393, ALS439, ALS613, ALS558, ALS628, ALS634, ALS397, ALS432, ALS366, ALS410, ALS502, ALS633, ALS414, ALS487), określanych dalej również jako „linie komórkowe”, rozmrożono po jednym reprezentatywnym produkcie wytworzonym przez Wytwórnię Farmaceutyczną PBKM. Materiał komórkowy wykorzystano do przeprowadzenia rozszerzonej charakterystyki, umożliwiającej uniwersalne grupowanie (klasteryzację) danego produktu terapii komórkowej. Po odwirowaniu roztworu krioprotektanta komórki zawieszono w tym samym kompletnym podłożu, które zostało użyte do wytworzenia produktów komórkowych (baza MSC NutriStem XF + suplement), a następnie określono liczbę i żywotność komórek.

Rozszerzona charakterystyka banku obejmowała:

- test komórkowy jednostek tworzących kolonie (ang. *colony-forming unit*, CFU) z rozmrożonych produktów komórkowych;
- pomiar ekspresji wybranych genów;
- oznaczenie rozszerzonego fenotypu nieklasycznego;
- pomiar profilu wydzielniczego (sekretomu);
- test immunomodulacji oparty na kohodowli WJ-MSC z komórkami jednojądrzastymi wyizolowanymi z kożuszka leukocyarno-płytkowego zdrowego dawcy.

Natychmiast po rozmrożeniu komórek założono test jednostek tworzących kolonie (CFU). Resztę żywych komórek wysiano na naczynia hodowlane (27 000 komórek/cm²) opłaszczone fibronektyną w takim samym kompletnym podłożu i warunkach hodowli, jakie zastosowano do wytworzenia produktów komórkowych. Po 3 dniach przy użyciu mikroskopu inwersyjnego określono konfluencję. Tam, gdzie konfluencja była mniejsza niż 75%, wymieniono podłoże na świeże. W przypadku gdy konfluencja była większa niż 75%, komórki

oddzielano za pomocą TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco). 1×10^7 (13 000 komórek/cm²) komórek wysiano na opłaszczoną fibronektyną naczynia hodowlane do kolejnego pasażu. Po następnych 2 dniach hodowli komórki odczepiono za pomocą TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco) i określono ich liczbę i żywotność. 5×10^6 komórek zabezpieczono jako osad i zamrożono w -80°C do dalszej izolacji RNA w celu przeprowadzenia oceny bezpieczeństwa molekularnego przy użyciu metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Kolejne $3,5 \times 10^6$ komórek przeznaczono do określenia fenotypu za pomocą rozszerzonego panelu. $0,5 \times 10^6$ komórek wysiano do 3 dołków na 6-dołkowej płytce (167 000 komórek na dołek) w celu oceny profilu wydzielniczego (sekretomu) 14 linii komórkowych WJ-MSC. Kolejne $0,5 \times 10^6$ komórek wysiano do 3 dołków na 6-dołkowej płytce (167 000 komórek na dołek) i umieszczono w inkubatorze w standardowych warunkach, tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂, na 48 godzin w celu przygotowania testu sprawdzającego immunomodulującą zdolności komórek WJ-MSC opartego na kohodowli z aktywowanymi komórkami jednojądrzastymi (MNC).

3.2.1. Test komórkowy jednostek tworzących kolonie (CFU) z rozmrożonych produktów komórkowych

Do testu CFU z rozmrożonych komórek produktu - od 14 linii WJ-MSC wysiano na 6-dołkowe płytki 100 komórek/dołek w 4 ml kompletnego podłoża hodowlanego, które zostało użyte do wytworzenia produktów komórkowych (baza MSC NutriStem XF + suplement) w 3 powtórzeniach. Komórki hodowano przez 14 dni w takim samym kompletnym podłożu i warunkach hodowli, jakie stosowano do wytwarzania produktów komórkowych, jak opisano powyżej. Po 14 dniach w celu uwidocznienia kolonii komórek podłoże usunięto, a adherentne komórki przemyto 1 ml PBS (ang. *phosphate buffered saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna) (Gibco) na dołek. Komórki utrwalono 4-proc. roztworem formaldehydu (Sigma Aldrich), 1 ml/dołek, i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. Utrwalacz usunięto, a komórki przemyto DPBS (1 ml/dołek). W celu wizualizacji komórki barwiono 0,5-proc. roztworem błękitu toluidynowego (Sigma), 1 ml na dołek, i inkubowano 30 minut na wytrząsarce kołyskowej w temperaturze pokojowej. Barwnik wymyto przez dwukrotne przemycie DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco) (Gibco), 1 ml na dołek, oraz zliczono widoczne kolonie dla poszczególnych dołków. Potencjał do tworzenia kolonii (CFU) zdefiniowano jako procent liczby kolonii do liczby wysianych komórek.

3.2.2. Ekspresja wybranych genów dla 14 linii komórkowych WJ-MSC opartego na tzw. teście panelu bezpieczeństwa molekularnego (zgłoszenie patentowe nr P.433374 pt. *Zastosowanie zestawu genów do określania potencjału teratogenicznego komórek mezenchymalnych*, które uzyskało patent 2 sierpnia 2022 r.)

RNA wyizolowano i oczyszczono za pomocą zestawów PureLink RNase Mini Kit (Invitrogen) i PureLink DNase Kit (Invitrogen) zgodnie z protokołami producenta. Otrzymany w ten sposób kwas nukleinowy (RNA) był materiałem wyjściowym do kolejnego etapu, czyli odwrotnej transkrypcji RNA przy użyciu Maxima H Minus Kit w celu uzyskania wysokojakościowego cDNA pozbawionego genomowego DNA. Finalnie na otrzymanym cDNA przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) do identyfikacji obecności, jak i relatywnej ekspresji (poprzez porównanie siły sygnału fluorescencji) wyselekcjonowanych markerów genetycznych (płytką niestandardowa PrimePCR 96W, Bio-Rad).

3.2.3. Izolacja całkowitego RNA z produktów komórkowych WJ-MSC – oczyszczanie, pomiar stężenia oraz kontrola jakości RNA

Izolację wykonano za pomocą zestawu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). W celu izolacji całkowitego RNA do rozmrożonych osadów zawierających 5×10^6 komórek z 14 linii komórkowych dodano po 350 μ l buforu lizującego i zworteksowano przez 1 min. Uzyskany homogenat komórkowy pięciokrotnie przepipetowano przy użyciu igły 20G i strzykawki wolnej od RNaz i ponownie zworteksowano przez 1 min. Do otrzymanego lizatu komórkowego dodano 350 μ l 70-proc. etanolu i dobrze zawieszono poprzez pipetowanie. Przeniesiono po 700 μ l każdej z 14 prób (razem z osadem, jeżeli powstał) do indywidualnej kolumny, którą umieszczono w probówce odbierającej o objętości 2 ml. Kolumny zwirowano z prędkością $\geq 10\ 000$ rpm przez 30–60 sekund. Probówkę odbierającą usunięto, minikolumnę umieszczono w kolejnej probówce odbierającej. Na kolumny naniesiono po 350 μ l buforu RW1, a po zamknięciu zwirowano z prędkością $\geq 10\ 000$ rpm przez 30 sekund. Probówkę odbierającą usunięto, minikolumnę umieszczono w kolejnej probówce odbierającej. Na kolumny naniesiono po 80 μ l mieszaniny z DNazą i i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po skończonej inkubacji do każdej kolumny dodano 350 μ l buforu RW1. Kolumny zamknięto i zwirowano z prędkością $\geq 10\ 000$ rpm przez 30 sekund. Probówkę odbierającą usunięto, minikolumnę umieszczono w kolejnej probówce odbierającej. Na kolumny

naniesiono po 500 μ l buforu RPE do kolumny. Kolumny zamknięto i zwirowano z prędkością $\geq 10\,000$ rpm przez 30 sekund. Probówkę odbierającą usunięto, minikolumnę umieszczono w kolejnej probówce odbierającej. Na kolumny naniesiono ponownie po 500 μ l buforu RPE do kolumny. Kolumny zamknięto i zwirowano z prędkością $\geq 10\,000$ rpm przez 2 min. Kolumny przeniesiono do nowych probówek odbierających i zwirowano z maksymalną prędkością przez 1 min. Każdą z kolumn przeniesiono do probówek typu RNase free o objętości 1,5 ml. Na złożę kolumn naniesiono po 30–50 μ l wody wolnej od RNaz, kolumny zamykano i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Po czasie inkubacji kolumny umieszczono w wirówce i zwirowano z prędkością $\geq 10\,000$ rpm przez 1 min. Pomiar stężenia RNA przeprowadzono dwukrotnie na urządzeniu BioDrop. Odpowiedni stopień czystości RNA jest przy wartości współczynnika absorpcji A260/A280 nm w obrębie 1,9–2,1 oraz dla A230/A260 nm wynosi powyżej 1,8. Kolejnym etapem była analiza jakości i integralności RNA na żelu agarozowym. W tym celu próbki RNA (100 ng) połączono z barwnikiem obciążającym w proporcji objętościowej 1 : 1, następnie je zworteksowano i zwirowano z maksymalną prędkością przez 1 min w 4°C. Próbkę przeniesiono do termobloku i ogrzewano w 70°C przez 10 min. Kolejną próbkę przeniesiono do lodu i schładzano przez 3 minuty. Tak przygotowany materiał oraz wzorcową drabinkę RiboRuler High Range RNA (Thermo Scientific™) naniesiono na 1-proc. żel agarozowy i wykonano elektroforezę przez ok. 45 minut. Żel zwizualizowano przy użyciu transiluminatora UV ChemiDoc XRS+.

3.2.4. Odwrotna transkrypcja RNA przy użyciu Maxima H Minus Kit

Odczynniki z zestawu do syntezy pierwszej nici cDNA: Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase (Thermo Fisher Scientific) oraz próbki RNA zworteksowano oraz zwirowano przez 2 sekundy na programie short spin. Do próbek RNA dodano mieszaninę DNazującą (woda wolna od nukleaz, bufor dsDNase, dsDNase, matryca RNA), następnie delikatnie zworteksowano i zwirowano na programie short spin przez 2 sekundy. Próbkę umieszczono w termobloku o temperaturze 37°C na 2 min, a następnie w celu ich schłodzenia umieszczono je w statywie ustawionym na lodzie. Do wszystkich próbek dodano mieszaninę reakcyjną (woda wolna od nukleaz, startery Oligo(dT)18 Primer, mieszanina dNTP 10 mM). Próbkę zamknięto, delikatnie zworteksowano i zwirowano na programie short spin przez 2 sekundy, po czym umieszczono w termobloku o temperaturze 65°C na 5 min. Probówki po inkubacji ponownie umieszczono w statywie ustawionym na lodzie. Kolejną do wszystkich próbek dodano mieszaninę enzymatycznej (mieszanina

enzymów zestawu Maxima H Minus Enzyme Mix – inhibitor RNaz, transkryptaza oraz bufor 5X RT) i umieszczono w termocyklerze (Thermal Cycler C1000), ustawiając parametry reakcji zgodnie z protokołem producenta:

- inkubacja przez 10 minut w 25°C;
- inkubacja przez 30 minut w 50°C;
- zatrzymanie reakcji na 5 minut w 85°C;
- schładzanie próbek do 4°C.

Uzyskany produkt reakcji odwrotnej transkrypcji (cDNA) jest używany w procedurze wykorzystującej łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) do identyfikacji obecności, jak i relatywnej ekspresji (poprzez porównanie siły sygnału fluorescencji) wyselekcjonowanych charakterystycznych markerów genetycznych dla linii: WJ-MSC, pluripotencjalnych, ludzkich indukowanych komórek macierzystych (hIPS) oraz nowotworowych pochodzących z trzech różnych listków zarodkowych (endodermy, mezodermy i ektodermy).

3.2.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) na bazie zaprojektowanych płytek PrimePCR Custom Plate 96W wraz z oceną testu panelu bezpieczeństwa molekularnego produktu komórkowego WJ-MSC

Do reakcji qPCR zastosowano termocykler Thermal Cycler C1000 z nakładką CFX-96. Startery rozcieńczono w stosunku 1 : 10 i 1 : 25 w wodzie wolnej od nukleaz. Wszystkie startery do analiz PCR zaprojektowano z wykorzystaniem oprogramowania NCBI Primer-BLAST, NetPrimer oraz NCBI GeneBase. Zaprojektowana płytka (niestandardowa PrimePCR 96W, Bio-Rad) obejmowała zbiór wyselekcjonowanych charakterystycznych markerów genetycznych dla:

- panelu charakterystycznego dla MSC (*CDKN2A, HAND2, PDGFRA, TWIST1, ZBTB16*);
- panelu pluripotencjalnego (*TDGF1, DNMT3B, IDO1, NANOG, POU5F1, SOX2*);
- panelu mezodermalnego (*ALOX15, HEY1, NKX2-5, ESM1*);
- panelu ektodermalnego (*FUT3, MYO3B, PROM1, FOXA1, DMBX1*);
- panelu endodermalnego (*CLDN1, CPLX2, POU4F1, FOXA2, HNF1B, HNF4A*).

Na zaprojektowanej płytce umieszczano również kontrole czystości odczynników (ang. *no template control*, NTC), kontrole RNA, a także użyto referencyjnej próby WJ-MSC do kalibracji międzypłytkowej.

Reakcję prowadzono według standardowego programu, zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli 1.

Tabela 1. Warunki protokołu reakcji RT-PCR

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	5 sek.	40
Annealing/wydłużanie	60°C	30 sek.	
Krzywa topnienia*	65–95°C (przyrost 0,5°C)	5 sek./etap	1

* Etap krzywej topnienia jest tylko dla analizy SYBR® Green

Zebrane dane poddano analizie przy zastosowaniu komercyjnego oprogramowania Maestro 1.1. W poszczególnych panelach każdorazowo dla danej linii komórkowej produktu WJ-MSC normalizowano uzyskane wyniki relatywnej ekspresji poszczególnych genów według patentu nr P.433374 pt. *Zastosowanie zestawu genów do określania potencjału teratogennej komórek mezenchymalnych* [42]. Według patentu relatywna ekspresja wyznaczona jest metodą $2(-\Delta\Delta C(T))$, zaaprobowaną przez środowisko naukowe i zaproponowaną w 2001 roku przez grupę badawczą profesora Livaka w artykule pt. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method* [43], względem próby kontrolnej dla komórek nowotworowych, pluripotencjalnych czy komórek WJ-MSC. W zależności od panelu biologiczne próby kontrolne to odpowiednio: linia WJ-MSC pochodząca z banku komórek PBKM oraz komercyjne linie: IPS (ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste), ZR-75-30 (linia komórek nabłonkowych wyizolowana z gruczołu sutkowego pacjentki z nowotworem piersi), A-375 (linia komórkowa wykazująca morfologię nabłonka, wyizolowana ze skóry kobiety chorej na czerniaka złośliwego), HT-1080 (komórki nabłonkowe pochodzące z tkanki łącznej pacjenta z włókniakiem mięśniakiem), MCF-7 (linia komórkowa raka piersi), A-549 (komórki wyizolowane z tkanki płuc mężczyzny chorego na raka płuc) i NCI-H727 (linia komórkowa wykazująca morfologię nabłonka, wyizolowana z płuc kobiety z rakowiakiem). Na podstawie biologicznych prób kontrolnych wyznaczono przedział relatywnej ekspresji wybranych genów dla komórek WJ-MSC. Charakterystyczne limity dla komórek MSC oraz krytyczne parametry dla produktów komórkowych WJ-MSC oparte na zlogarytmowanych wartościach (logarytm o podstawie 2) – ekspresja względna (tabela 2).

Tabela 2. Parametry ekspresji względnej dla wybranych genów

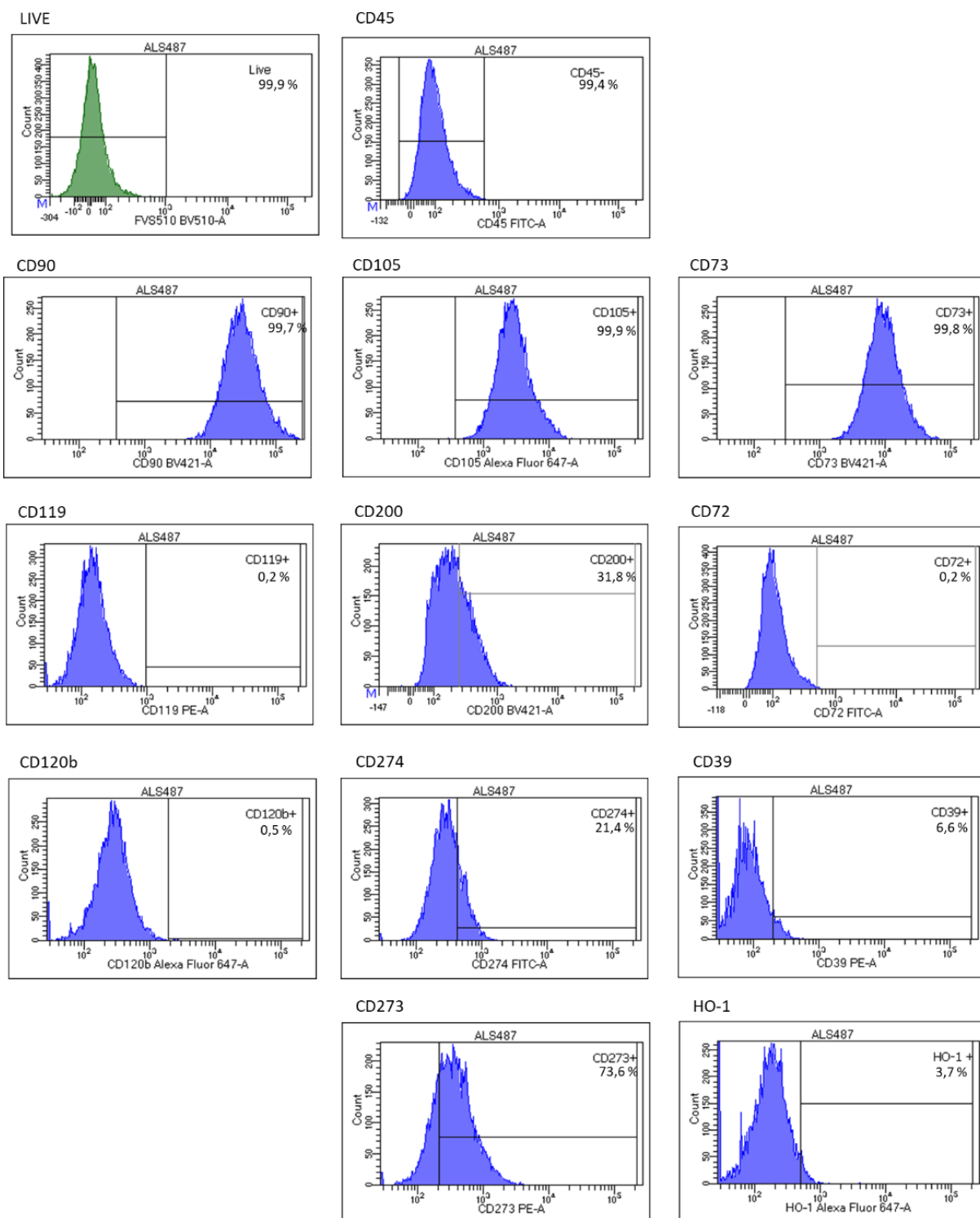
Panel charakterystyczny dla komórek MSC		
	Limit górny	Limit dolny
<i>CDKN2A</i>	1,70802025	-1,70802025
<i>HAND2</i>	1,54963036	-1,54963036
<i>PDGFR-α</i>	3,33592988	-3,33592988
<i>TWIST1</i>	3,65851901	-3,65851901
<i>ZBTB16</i>	3,70368846	-3,70368846
Krytyczne parametry panelu pluripotencjalnego		
	Limit górny	Limit dolny
<i>TDGF1</i>	0,69021592	-0,69021592
<i>DNMT3B</i>	0,12036168	-0,12036168
<i>IDO1</i>	0,13921258	-0,13921258
<i>NANOG</i>	0,34607909	-0,34607909
<i>POU5F1</i>	0,20831123	-0,20831123
<i>SOX2</i>	0,11637313	-0,11637313
Krytyczne parametry panelu mezodermalnego		
	Limit górny	Limit dolny
<i>ALOX15</i>	0,685118	-0,685118
<i>HEY1</i>	1,4164	-1,4164
<i>NKX2-5</i>	0,45152	-0,45152
<i>ESM1</i>	1,75801	-1,75801
Krytyczne parametry panelu ektodermalnego		
	Limit górny	Limit dolny
<i>FUT3</i>	0,545514	-0,545514
<i>MYO3B</i>	0,203845	-0,203845
<i>PROM1</i>	1,672433	-1,672433
<i>FOXA1</i>	0,154776	-0,154776
<i>DMBX1</i>	0,213765	-0,213765
Krytyczne parametry panelu endodermalnego		
	Limit górny	Limit dolny
<i>CLDN1</i>	0,34684	-0,34684
<i>CPLX2</i>	1,250913	-1,250913
<i>POU4F1</i>	0,149568	-0,149568
<i>FOXA2</i>	1,370631	-1,370631
<i>HNF1B</i>	0,328734	-0,328734
<i>HNF4A</i>	0,118367	-0,118367

3.2.6. Oznaczenie rozszerzonego fenotypu WJ-MSC z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Do próbki cytometrycznej zawierającej po $3,5 \times 10^6$ komórek WJ-MSC każdej z linii (komórek przygotowanych zgodnie z punktem 3.2) dodano po 1 ml DPBS (Gibco). Komórki zwirowano przy parametrach: $300 \times g$, 7 min. Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 100 μ l DPBS (Gibco). W celu oznaczenia żywotności do zawiesiny komórek dodano 10 μ l 100-krotnie rozcieńczonego barwnika FVS510 (BD) przygotowanego zgodnie z instrukcją producenta – barwnik wiąże się z komórkami martwymi. Zawiesiny zworteksowano i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 7 min. Po czasie inkubacji do próbek dodano po 1 ml DPBS (Gibco), a następnie zwirowano przy parametrach: $300 \times g$, 7 min. Supernatant usunięto, a do osadu dodano 700 μ l DPBS (Gibco) w celu zawieszenia komórek. Panel fenotypu rozszerzonego rozłożony jest na 7 próbek cytometrycznych, do których to rozpipetowano po 100 μ l przygotowanej zawiesiny komórek dla każdej z linii. Kolejno do każdej cytometryczki dodano 10 μ l Brilliant Stain Buffer i zworteksowano. Następnie w objętości rekomendowanej przez producenta dodano przeciwciała (BD) według schematu przedstawionego na rycinie 7.

Probówka 1	nieznakowane				
Probówka 2	Fluorochrom	BV421	FITC		
	Przeciwciało	CD90	CD45		
Probówka 3	Fluorochrom	BV421	PE		
	Przeciwciało	CD90	CD119 (INF γ)		
Probówka 4	Fluorochrom	BV421	AF647		
	Przeciwciało	CD90	CD120b (TNF α)		
Probówka 5	Fluorochrom	PE	AF647		
	Przeciwciało	IgG2b κ	IgG2b κ		
Probówka 6	Fluorochrom	FITC	PE	BV421	AF647
	Przeciwciało	CD274	CD273	CD200	CD105
Probówka 7	Fluorochrom	FITC	PE	BV421	AF647
	Przeciwciało	CD72	CD39	CD73	HO-1

Ryc. 7. Znakowania komórek WJ-MSC. Schemat przeciwciał skoniugowanych z fluorochromem



Ryc. 8. Schemat bramkowania dla znakowania komórek WJ-MSC

Próbki z zawiesiną komórek zworteksowano i inkubowano przez 30 min w lodówce w 4–8°C. Po inkubacji do cytometrówek dodano po 1 ml DPBS (Gibco), próbki zwirowano (300 × g, 7 min). Supernatant usunięto, a osad komórkowy zawieszono w 200 µl sporządzonego według instrukcji producenta odczynnika utrwalającego CellFix (BD). Przygotowane komórki w próbkach cytometrycznych 1–7 dla każdej linii WJ-MSC były gotowe do analizy. Pomiar

wykonano w cytometrze przepływowym Celesta (BD), a analizę za pomocą oprogramowania FACSDiva, na podstawie szablonu (ryc. 8).

3.2.7. Analiza profilu wydzielniczego (sekretomu) linii WJ-MSC

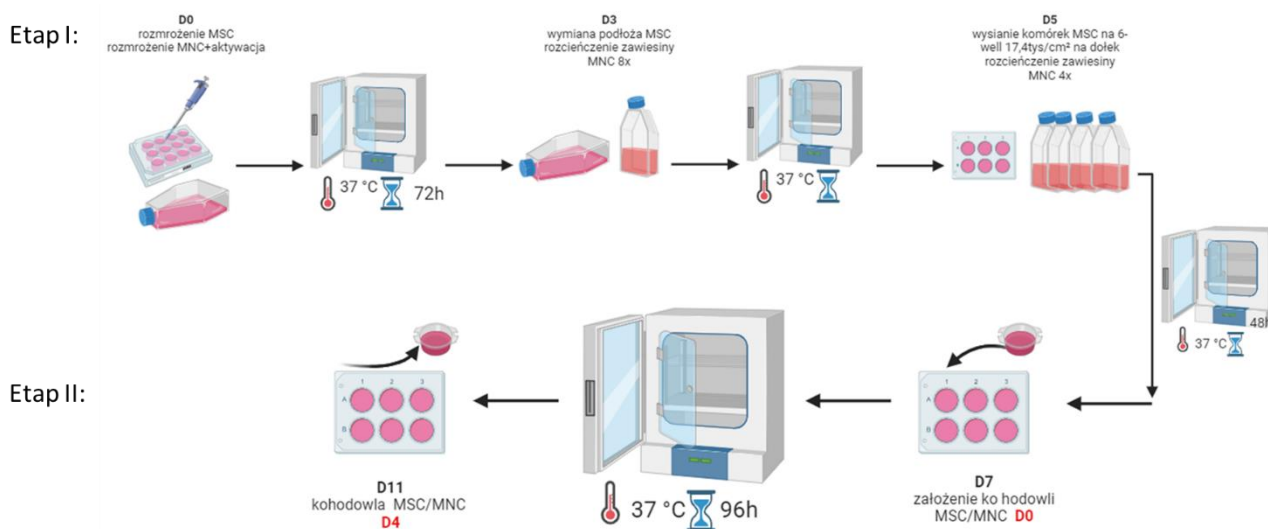
Po wysianiu $0,5 \times 10^6$ komórek w 3 dołkach na 6-dołkowej płytce (167 000 komórek na dołek) hodowlę dla każdej linii WJ-MSC umieszczono w inkubatorze na 48 godzin w standardowych warunkach, tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO_2 . Hodowla była przeprowadzana w takim samym kompletnym podłożu, jakie zostało użyte do wytworzonych produktów komórkowych. Po 48 godzinach podłoże z nad komórek usunięto i dwukrotnie przepłukano DPBS. Do każdego dołka dodano 4 ml kompletnego podłoża i hodowlę umieszczono w inkubatorze na kolejne 4 dni w standardowych warunkach, tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO_2 . Po 4 dniach hodowli zebrano supernatant i odwirowano ($600 \times \text{g}$, 10 min). Otrzymane supernatanty poddano krioprezerwacji w -80°C do czasu analizy. Sekretom oznaczono dla wszystkich 14 linii komórkowych WJ-MSC w kierunku następujących analitów: BDNF, HGF, IL-6, IL-8, MCP1, RANTES, TGF β 1, TGF β 2. Oznaczenie sekretomu przeprowadzono przy użyciu gotowych zestawów Luminex Multiplex (Merck) według protokołu producenta. Z zestawu Luminex Multiplex (Merck) przygotowano mieszaninę kulek (ang. *beads*) dla wyselekcjonowanych analitów przez ich 30-sekundową sonikację i worteksowanie przez 1 min. Do buteleczki oznaczonej „Mixing Bottle” przeniesiono po 150 μl zawiesiny kulek każdego analitu, a następnie dopełniono buforem oznaczonym jako „Assay Buffer” do 3 ml. Zestaw zawierał odczynniki do przygotowania krzywej standardowej metodą kolejnych rozcieńczeń oraz kontrolę niską i wysoką. Mając przygotowaną mieszaninę kulek, standardy oraz kontrole, przygotowano płytkę 96-dołkową dołączoną do zestawu, dodając 200 μl buforu, a następnie umieszczenie jej na wytrząsarce przy parametrach wytrząsania 600 rpm przez 10 min w temperaturze pokojowej. Usunięto płynną zawartość płytki i osuszono ją na ręczniku papierowym. Na tak przygotowaną płytkę dodano w tryplikatach po 25 μl przygotowanych standardów, kontroli oraz próby ślepej (bufor). Następnie do wszystkich dołków dodano po 25 μl „Assay Buffer”. Do dołków przeznaczonych na próby badane dodano po 25 μl rozmrożonego supernatantu z nad hodowli. Supernatant z każdej linii WJ-MSC oznaczano w tryplikatach. Kolejno do wszystkich dołków dodano po 25 μl przygotowanej zawiesiny kulek. Aby uniknąć osadzania się kulek na dnie butelki, kulki worteksowano. Płytkę umieszczono na wytrząsarce (600 rpm) w temperaturze 4°C i inkubowano w ciemności przez 16–18 godzin. Po inkubacji płytkę umieszczono na magnesie

ręcznym i usunięto roztwór z nad kulek. Kulki 3-krotnie przepłukano przygotowanym buforem płuczającym dołączonym do zestawu. Po etapie płukania do wszystkich dołków dodano po 50 µl odczynnika „Detection Antibody”, który jest biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym, i umieszczono na wytrząsarce (600 rpm) na godzinę w temperaturze pokojowej. Po godzinnej inkubacji dodano do wszystkich dołków po 50 µl odczynnika streptawidyny–fikoerytryny, która to wiąże się z biotyną, i poddano kolejnej 30-minutowej inkubacji na wytrząsarce (600 rpm) w temperaturze pokojowej. Po 30 min płytkę umieszczono na magnesie, usuwając mieszaninę z nad kulek oraz przepłukując je 3-krotnie. Do przepłukanych kulek na dołkach dodano po 100 µl płynu osłonowego przeznaczonego do urządzenia MAGPIX i umieszczono na co najmniej 5 min na wytrząsarce do czasu odczytu na urządzeniu. Wszystkie płytki odczytano na aparacie Luminex MAGPIX zgodnie z wytycznymi producenta dla poszczególnych analizów. Otrzymane poziomy cytokin analizowano w programie Belysa® Software.

3.2.8. Test immunomodulacji oparty na kohodowli WJ-MSK z komórkami jednojądrzastymi wyizolowanymi z kożuszka leukocyarno-płytkowego zdrowego dawcy

Jednym z głównych elementów kohodowli było wcześniejsze zbankowanie i zamrożenie komórek jednojądrzastych MNC (ang. *mononuclear cells*) poprzez ich wyizolowanie z kożuszka leukocyarno-płytkowego zdrowego dawcy przez wirowanie w gradiencie stężeń.

Test immunomodulacji oparty na kohodowli WJ-MSK z MSC zdrowego dawcy składał się z dwóch etapów. Etap pierwszy to przygotowanie komórek WJ-MSK i MNC. W przypadku WJ-MSK komórki wykorzystane w teście były poddane przynajmniej jednemu pasażowi po ich rozmrożeniu. W przypadku MNC komórki należy zaktywować i poddać ekspansji. Aktywacja komórek MNC ma na celu zasymulowanie środowiska zapalnego. Etap drugi to kohodowla adherentnych komórek WJ-MSK ze zaktywowanymi komórkami MNC umieszczonymi na insercie. Kohodowlę przeprowadzono według ustalonego schematu (ryc. 9).



Ryc. 9. Graficzny schemat testu opartego na kohodowli komórek WJ-MSC z komórkami MNC

Etap I (przygotowanie komórek WJ-MSC oraz MNC)

Komórki jednojądrzaste rozmrożono (tego samego dnia co komórki WJ-MSC) w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, a następnie usunięto podłoże kriochronne przez odwirowanie. Osad komórek zawieszono w podłożu do namnażania limfocytów ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium (StemCell Technologies) + 1% (obj./obj.) A/A (Gibco) + 56 UI/ml ludzkiej IL-2 IS klasy premium (Miltenyi Biotec). Po określeniu liczby i żywotności komórek za pomocą automatycznego licznika komórek pobrano 8×10^6 komórek w 4 ml (zachowując gęstość komórek 2×10^6 /ml) i wysiano na 12-dołkową płytke. Komórki aktywowano przez dodanie 25 μ l/ml aktywatora ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator (StemCell Technologies), po czym płytke umieszczono w inkubatorze na 72 godziny w standardowych warunkach, tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Po 72 godzinach aktywacji zawiesinę komórek zgodnie z wytycznymi producenta rozcieńczono ośmiokrotnie i hodowlę umieszczono w inkubatorze na 48 godzin w celu namnażania. Po 48 godzinach zawiesinę komórek rozcieńczono dwukrotnie w celu dalszego namnażania i umieszczono w inkubatorze na kolejne 48 godzin. Po 48 godzinach i 7-dniowym namnażaniu aktywowane komórki jednojądrzaste były gotowe do kohodowli z komórkami WJ-MSC.

Komórki wysiewano w 7. dniu w gęstości 17 361,1 komórki/cm². Po 48-godzinnej hodowli WJ-MSC na 6-dołkowej płytce komórki były liczone. Dane te posłużyły do wysiewu prawidłowej liczby komórek jednojądrzastych, która ma być 10 razy większa w dołku niż liczba WJ-MSC. W tym celu komórki odrywano od powierzchni jednego z dołków za pomocą TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco). Komórki zliczono za pomocą automatycznego

licznika komórek. Podłoże hodowlane WJ-MSC usunięto z pozostałych dwóch dołków z komórkami i przemyto dwukrotnie DPBS.

Etap II (kohodowla adherentnych komórek WJ-MSC z komórkami zawieszinowymi MNC)

Kohodowlę prowadzono w podłożu dla limfocytów ImmunoCult (StemCell Technologies), aby zapewnić jak najlepsze warunki ich namnażania. W celu przetestowania właściwości immunomodulacyjnych WJ-MSC komórki jednojądrzaste umieszczono na insercie 0,4 μm (Greiner Bio-One) w dołku z WJ-MSC. Na insercie umieszczono dziesięć razy więcej komórek jednojądrzastych niż WJ-MSC. Insert umożliwia kohodowanym komórkom pośrednią interakcję poprzez wydzielanie czynników wzrostu i cytokin w 4 ml podłoża dla limfocytów. Jeden z dołków z WJ-MSC działał jako kontrola namnażania komórek MSC w medium dla limfocytów – 4 ml podłoża ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium (StemCell Technologies) + 1% (obj./obj.) roztworu penicyliny/streptomycyny i amfoterycyny B (Gibco) + 56 UI/ml ludzkiej IL-2 IS klasy premium (Miltenyi Biotec). Kolejną kontrolą był dołek z identyczną liczbą samych komórek jednojądrzastych (w 4 ml podłoża dla limfocytów), którą umieszczono w kohodowli. Wszystkie kontrole i kohodowlę na 6-dołkowej płytce umieszczono w inkubatorze na 4 dni w standardowych warunkach, tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Po 4 dniach test immunomodulacyjny sprawdzono poprzez określenie liczby komórek jednojądrzastych i ich fenotypu. Liczbę i żywotność komórek jednojądrzastych z kontroli i kohodowli określono za pomocą automatycznego licznika komórek. Komórki jednojądrzaste przemywano jednokrotnie DPBS (Gibco) i znakowano, oznaczając wybrane subpopulacje limfocytów i markery charakterystyczne dla poziomu aktywacji. Osad zawieszono w Brilliant Stain Buffer Plus (Becton Dickinson) przy minimalnej gęstości 1×10^6 komórek/ml. Zawiesinę komórek inkubowano z przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem (BD) przez 30 min na lodzie w ciemności według schematu zaprezentowanego na rycinie 10.

Analizę komórek przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego Celesta i oprogramowania FACSDiva (Becton Dickinson). Wyniki przedstawiono jako procent komórek dodatnich dla odpowiednich markerów w stosunku do izotypu komórki kontrolnej i niewybarwionej.

Probówka 1	nieznakowane
------------	--------------

Probówka 2	Fluorochrom	BV421	BV605	BV650	BV786	BB515	PE- CF594	PE- CF594	BB700	APC	APC- R700	APC- H7
	Przeciwciało	CD25	HLA- DR	CD3	CD69	CD45RO	CD16	CD56	CD4	CD45RA	CD19	CD8

Probówka 3	Fluorochrom	BV421	PE	PerCP	AF647
	Przeciwciało	CD40	CD16	CD45	CD14

Probówka 4	Fluorochrom	BV421	BV650	BV786	BB515	PE	BB700	APC- H7
	Przeciwciało	CD25	CD183	CD4	CD196	CD127	CD194	CD3

Ryc. 10. Znakowania komórek MNC. Schemat przeciwciał skoniungowanych z fluorochromem

3.3. Klasteryzacja

W celu przyporządkowania komórkowego produktu leczniczego do danego klastra z próbki referencyjnej zwalnianego produktu leczniczego – po rozmrożeniu próbki wykonano dodatkowe badania pozwalające na ocenę rozszerzonej charakterystyki produktów WJ-MSC. Dodatkowe badania składały się na rozszerzony panel cytometryczny z dodatkowymi markerami takimi jak: CD119, CD200, CD120b, CD72, CD273, CD274, CD39, HO, test jednostek tworzących kolonie (CFU), dane z ekspresji genów związanych z oceną bezpieczeństwa badanych, analiza sekretomu i opracowana technologia kohodowli MSC z produktu komórkowego z MNC (komórki jednojądrzaste) od zdrowego dawcy. Poszerzona charakterystyka i uzyskane wyniki pozwoliły stworzyć algorytm i przypisać serię produktów komórkowych (WJ-MSC) do odpowiedniego klastra terapeutycznego. Serie produktów komórkowych przypisane do klastrów terapeutycznych na podstawie stworzonego algorytmu mają podobną aktywność biologiczną. Klastrowanie dla zmienności produktu komórkowego oparto na uczeniu maszynowym. Analizowany problem wymagał przygotowania procedury statystycznej obejmującej dwa etapy. W pierwszym etapie przeprowadzono klasteryzację nienadzorowaną. Następnie, w drugim etapie, wyznaczono pulę parametrów, które najlepiej charakteryzowały wskazany podział.

3.4. Badanie kliniczne

Rozpoczęcie badania klinicznego wiązało się z uzyskaniem niezbędnych zgód oraz pozwoleń dotyczących badanego produktu leczniczego (BPL) opisanego i zatwierdzonego w dossier produktu (ang. *Investigational Medicinal Product Dossier*, IMPD), czy m.in. zgody komisji bioetycznej i organu regulacyjnego na protokół badania oraz formularz świadomej zgody pacjenta. IMPD zawiera informacje dotyczące wytwarzania, kontroli jakości, oceny stabilności, danych z badań nieklinicznych, a także przeprowadzonych badań rozwojowych nad produktem.

W przypadku badania klinicznego o akronimie ALSTEM kryteria włączające pacjentów do badania to m.in.:

- osoby dorosłe, powyżej 18 roku życia;
- waga pacjenta ≥ 40 kg;
- rozpoznanie choroby ≥ 6 miesięcy, przy historii wystąpienia pierwszych objawów choroby nie dłuższej niż 2 lata;
- co najmniej 30 punktów w skali ALSFRS-R podczas wizyty kwalifikacyjnej;
- progresja choroby w ostatnich 6 miesiącach, co najmniej 3 punkty w skali ALSFRS-R;
- natężona pojemność życiowa $> 70\%$ wartości przewidywanej dla wieku, płci i wzrostu;
- leczenie ustabilizowaną dawką (2×50 mg na dobę) riluzolu przed wizytą kwalifikacyjną (przez co najmniej 1 miesiąc);
- zdolność do wyrażenia pisemnej świadomej zgody;
- zdolność do przestrzegania wymogów dotyczących badania oraz wszystkich procedur badawczych i wizyt kontrolnych;
- kobiety w wieku rozrodczym oraz mężczyźni mający partnerki w wieku rozrodczym muszą wyrazić zgodę na stosowanie dwóch form antykoncepcji przez cały czas trwania badania;
- pacjenci posługujący się biegle językiem polskim.

Kryteria wyłączenia z badania klinicznego obejmowały takie kryteria jak:

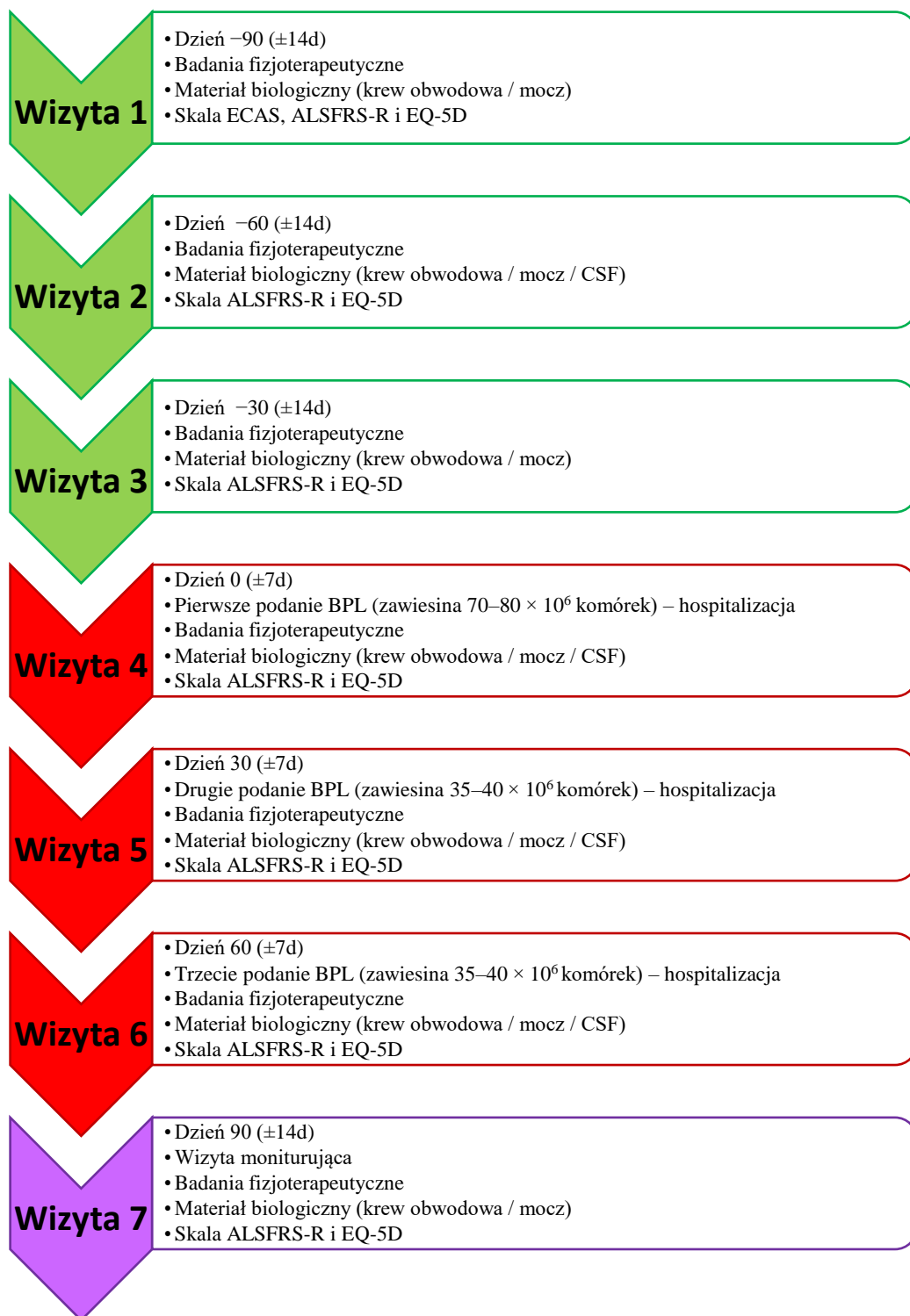
- ciąża i/lub karmienie piersią;
- tracheostomia oraz zależność od respiratora;
- choroby nerek przy kreatyninie >2 mg/dL;
- choroby wątroby z aktywnością ALT, AST lub GGTP 2-krotnie wyższą niż górna granica normy;

- pozytywny wynik testu w kierunku HBV, HCV, HIV oznaczenie metodą NAT;
- pozytywny wynik testu na kiłę;
- inne istotne klinicznie nieprawidłowości w ocenie laboratoryjnej;
- jakikolwiek stan uniemożliwiający wykonanie nakłucia łędźwiowego;
- sztywność karku i inne objawy związane z zapaleniem opon mózgowych;
- aktywna choroba ogólnoustrojowa;
- choroba autoimmunologiczna (dozwolona leczona choroba Hashimoto);
- nieleczona cukrzyca ($HbA1c > 8\%$);
- choroby płuc mogące wpływać na prawidłową interpretację spirometrii;
- współistniejące choroby neurologiczne;
- pacjenci przewlekłe leczeni przeciwzakrzepowo (heparyna/warfaryna/acenokumarol/(N)OAC);
- niestabilizowane współistniejące choroby o podłożu psychicznym, wysokie ryzyko samobójstwa;
- nadużywanie substancji odurzających w ciągu ostatniego roku;
- pozytywny wywiad nowotworowy w ciągu ostatnich 5 lat;
- każdy inny istotny klinicznie stan chorobowy, który w opinii badacza może zagrozić bezpieczeństwu pacjenta;
- leczenie lekami immunomodulującymi (np. immunoglobulinami, kortykosteroidami lub innymi lekami immunosupresyjnymi) w ciągu ostatnich 6 miesięcy;
- udział w innym badaniu klinicznym w ciągu ostatnich 6 miesięcy;
- otrzymanie jakiegokolwiek innej terapii komórkowej;
- nadwrażliwość na jakikolwiek składnik użyty przy wytwarzaniu produktu komórkowego.

Każdy pacjent uczestniczył w trzech wizytach kwalifikacyjnych i obserwacyjnych (wizyta 1 – 3 miesiące przed pierwszym podaniem, wizyta 2 – 2 miesiące przed pierwszym podaniem, wizyta 3 – miesiąc przed pierwszym podaniem), w kolejnych trzech wizytach, podczas których podano BPL, składający się z zawiesiny komórek WJ-MSC, oraz kolejno w wizytach monitorujących. Wizyty odbywały się w odstępie 30 dni (± 7 dni w przypadku wizyt, podczas których następuje podanie BPL, oraz ± 14 dni w przypadku pozostałych wizyt). Podczas wizyt, w czasie których podano BPL, obowiązywała czterodniowa hospitalizacja. Produkt był

podawany dokanałowo (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) poprzez wykonanie punkcji lędźwiowej. W czasie wizyty 4 (podanie pierwsze) według ustalonego i zaakceptowanego protokołu badania klinicznego zaaplikowana dawka to zawiesina $70\text{--}80 \times 10^6$ komórek w postaci dwóch preparatów po 5 ml. Wizyta 5 (podanie drugie) i wizyta 6 (podanie trzecie) to dawka $35\text{--}40 \times 10^6$ komórek w postaci jednego preparatu o objętości 5 ml. Produkt BPL był transportowany do apteki ośrodka klinicznego w postaci zamrożonej w specjalnym (zwalidowanym oraz zaplombowanym) transportowym zbiorniku kriogenicznym (CryoShipper) w oparach ciekłego azotu (temperatura -196°C), według ustalonych procedur przez przeszkolony personel zajmujący się transportem produktów komórkowych oraz materiału biologicznego. Preparat z zawiesiną komórek WJ-MSK był rozmrożony i rekonstruowany przez wykwalifikowany personel ośrodka klinicznego w gabinecie zabiegowym przy łóżku pacjenta bezpośrednio przed podaniem.

Zgodnie z protokołem badania w czasie każdej wizyty ambulatoryjnej lekarza wykonywano badanie fizykalne oceniające ogólny stan pacjenta, m.in. pomiar BMI, ciśnienia krwi, tętna, saturacji, częstości oddechów, spirometrii czy siły mięśniowej oraz pobierano krew obwodową. Podczas wizyt obejmujących podanie BPL pobranie krwi następowało w sumie dwukrotnie – podczas przyjęcia do szpitala i przy wypisie. Na każdej z wizyt przeprowadzona została ocena skali ALSFRS-R (Skorygowana Funkcjonalna Skala Stwardnienia Zanikowego Bocznego, ang. *Revise Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale*) oraz ocena jakości życia na podstawie skali EQ-5D (ryc. 11).



Ryc. 11. Schemat wizyt pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM

3.4.1. Pobranie, zabezpieczenie i badania materiału biologicznego pacjentów ALSTEM

3.4.1.1. Krew obwodowa

Krew obwodową pobierano na każdej wizycie (1–7), w przypadku wizyty hospitalizacyjnej przy podaniu BPL (wizyty 4–6), trzykrotnie: 1) podczas przyjęcia, 2) po podaniu BPL oraz 3) przy wypisie. Krew pobrano na wyniki podstawowe, jak i biochemiczne, pozwalające ocenić funkcje życiowe organizmu, m.in. wydolność wątroby, nerek, wydolność układu krzepnięcia czy gospodarki elektrolitowej. Do laboratorium zewnętrznego wysyłano materiał krwi na następujące badania: morfologię, sód, potas, chlorki, fosfor, magnez, kreatyninę, mocznik, aminotransferazę asparaginianową (AST), aminotransferazę alaninową (ALT), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP), kinazę keratynową (CK), białko całkowite (TP), albuminę, czas protrombinowy (PT), kwas moczowy (UA), białko C-reaktywne (CRP). Dodatkowo próbkę z 10 ml krwi obwodowej z antykoagulantem CPD tego samego dnia przetransportowano w temperaturze 4–8°C w specjalnie do tego przeznaczonym i zwalidowanym pojemniku transportowym do Laboratorium PBKM w celu oznaczenia immunofenotypu oraz zabezpieczenia osocza na oznaczenia panelu wyselekcjonowanych cytokin.

Krew obwodowa – postępowanie w Centralnym Laboratorium PBKM

Wszystkie etapy wykonano zgodnie z aktualnymi i sporządzonymi procedurami. Z przetransportowanej w kontrolowanych warunkach pełnej krwi obwodowej pobrano próbkę 1,5 ml na ocenę immunofenotypową. Pozostałą krew poddano wirowaniu 1500 × g przez 15 min w 21°C. Oddzieloną frakcję osocza zebrano i rozdzielono do specjalnych próbek kriogenicznych (NUNC CryoTubes) po 100 µl, a następnie umieszczono w zamrażalce (–80°C) w celu późniejszej analizy cytokin, chemokin i czynników wzrostu, a także jako unikatowy materiał archiwalny.

a) Ocena fenotypowa krwi pełnej pacjentów z ALS

Do próbki cytometrycznej zawierającej ok. 0,7 ml krwi pełnej dodano 4,5 ml buforu lizującego ACK (Gibco). Zawartość próbki wymieszano poprzez obrócenie próbki góra–dół i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15–30 min. Po inkubacji próbkę zwirowano (300 × g, 5 min, 21°C). Supernatant usunięto, a osad komórek zawieszono w 1 ml DPBS (Gibco) i ponownie zwirowano (300 × g, 5 min, 21°C). Supernatant usunięto, osad komórek

zawieszono w 100 µl DPBS (Gibco) i dodano 10 µl 100-krotnie rozcieńczonego barwnika FVS510 (BD) do oznaczenia populacji komórek żywych. Zawiesinę zworteksowano i inkubowano przez 7 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po wyznaczonym czasie inkubacji do zawiesiny komórek dodano 1 ml DPBS (Gibco) i zwirowano ($500 \times g$, 5 min, $21^{\circ}C$). Supernatant usunięto, a osad komórek zawieszono w 200 µl DPBS (Gibco). Zawiesinę komórek rozdzielono po 50 µl na 4 probówki cytometryczne 1–4. Do probówek cytometrycznych nr 1, 2, 3 i 4 dodano 10 µl Brilliant Stain Buffer Plus (BD) i przeciwciała sprzężone z fluorochromem (BD) według schematu przedstawionego na rycinie 12.

Probówka 1	nieznakowane
-----------------------	--------------

Probówka 2	Fluorochrom	BV421	BV605	BV650	BV786	BB515	PE- CF594	PE- CF594	BB700	APC	APC- R700	APC- H7
	Przeciwciało	CD25	HLA- DR	CD3	CD69	CD45RO	CD16	CD56	CD4	CD45RA	CD19	CD8

Probówka 3	Fluorochrom	BV421	PE	PerCP	AF647
	Przeciwciało	CD40	CD16	CD45	CD14

Probówka 4	Fluorochrom	BV421	BV650	BV786	BB515	PE	BB700	APC- H7
	Przeciwciało	CD25	CD183	CD4	CD196	CD127	CD194	CD3

Ryc. 12. Znakowanie komórek MNC. Schemat przeciwciał skoniungowanych z fluorochromem

Probówki zworteksowano i inkubowano na lodzie, w ciemności przez 20 min. Po upływie czasu inkubacji do probówek cytometrycznych dodano po 1 ml DPBS (Gibco) i zwirowano ($500 \times g$, 5 min, $21^{\circ}C$). Supernatant odebrano, a osad komórkowy z probówek nr 1, 2 i 3 zawieszono w 250 µl CellFix (BD). Próbkę dokładnie zworteksowano i do czasu analizy umieszczono w lodówce w $4-8^{\circ}C$. Do osadu komórek pozostałej probówki nr 4 dodano 1 ml buforu A (BD) z zestawu do znakowania Foxp3, osad dokładnie rozpipetowano i inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności, przez 10 min. Po upływie inkubacji próbkę zwirowano ($500 \times g$, 5 min, $21^{\circ}C$), supernatant usunięto, a osad komórkowy zawieszono w 0,5 ml sporządzonego buforu C (BD) zestawu do znakowania Foxp3. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności, przez 20–30 min. Po inkubacji do probówki dodano 1 ml DPBS (Gibco) i zwirowano ($500 \times g$, 5 min, $21^{\circ}C$). Supernatant usunięto, osad zawieszono w 100 µl DPBS (Gibco), dodano 10 µl przeciwciała anty-FoxP3 AF647 (BD) i inkubowano na

lodzie, w ciemności, przez 20 min. Do próbki dodano 1 ml DPBS (Gibco) i zwirowano (500 × g, 5 min, 21°C). Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 200 µl odczynnika utrwalającego CellFix (BD). Przygotowane komórki w probówkach cytometrycznych 1–4 były gotowe do analizy. Pomiar wykonano w cytometrze przepływowym Celesta (BD) z wykorzystaniem oprogramowaniu FACSDiva.

b) Analiza wybranych cytokin, chemokin i czynników wzrostu w osoczu pacjentów z ALS

Analizę wykonano za pomocą urządzenia MAGPIX, opartego na technologii Luminex, oraz zestawu Milliplex Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore). Wyselekcjonowane anality do oznaczenia w osoczu to: TGF-β 1/2/3, IL-10, IL-4, GM-CSF, VEGF-A, IFN-γ, IL-17A, IL-1b, IL-6, IL-8, MIP-1b, RANTES, FGF-2, IL-12p40, MCP-1, G-CSF, TNF-α, IL-13. Zabezpieczone próbki osocza rozmrożono i procedowano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu Milliplex Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore). Przygotowano płytkę 96 dołków dołączoną do zestawu poprzez dodanie 200 µl buforu (Assay Buffer, zestaw Merck Millipore) i umieszczenie na wytrząsarce (600 rpm) w temperaturze pokojowej na 10 minut. Bufor usunięto, do odpowiednich dołków dodano po 25 µl przygotowanego standardu, kontroli wysokiej oraz niskiej. Następnie do tych samych dołków dodano 25 µl Assay Buffer (zestaw Merck Millipore). Dodano po 25 µl Assay Buffer do dołków, na które miały zostać przeniesione próbki badane. Kolejno dodano 25 µl próbek osocza. Kulki opłaszczane i wychytujące wybrane anality zworteksowano (butelka Mixing Bottle, zestaw Merck Millipore) i dodano po 25 µl ich zawiesiny do wszystkich dołków. Płytkę poddano całonocnej inkubacji na wytrząsarce (600 rpm), w ciemności, w temperaturze 4°C. Po inkubacji płytkę trzykrotnie przepłukano buforem płuczącym (Wash Buffer, zestaw Merck Millipore) przy użyciu magnesu ręcznego, a następnie dodano przeciwciała detekcyjne skoniugowane z biotyną (Detection Antibodies, zestaw Merck Millipore) i inkubowano na wytrząsarce (600 rpm) w temperaturze pokojowej przez 60 min. Po godzinnej inkubacji dodano do wszystkich dołków po 25 µl odczynnika streptawidyny skoniugowanej z fikoerytryną (Streptavidin-Phycoerythrin, zestaw Merck Millipore) i inkubowano na wytrząsarce (600 rpm) w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po inkubacji płytkę przepłukano trzykrotnie 100 µl buforu płuczającego (Wash Buffer, zestaw Merck Millipore) z użyciem magnesu ręcznego. Do wszystkich dołków dodano po 150 µl buforu Drive Fluid (Merck Millipore), płytkę umieszczono na wytrząsarce (600 rpm) na 5 min. Następnie dokonano pomiaru na urządzeniu MAGPIX. Wszystkie standardy, kontrole oraz próbki na płytce umieszczono w triplikatach. Analizę danych wykonano przy użyciu oprogramowania Belysa (Merck Millipore).

3.4.1.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy

Procedura nakłucia lędźwiowego była przeprowadzana podczas wizyty 2 oraz na wizytach, na których podawano BPL. Podczas punkcji pobierano płyn mózgowo-rdzeniowy (CFS). Jego 2 ml przekazywano do laboratorium zewnętrznego w celu oznaczenia poziomu glukozy, białka całkowitego i chlorków. Pozostałą część tego samego dnia transportowano w temperaturze 4–8°C w specjalnie do tego przeznaczonym i zwalidowanym pojemniku transportowym do Laboratorium PBKM. Tam próbówka z CFS była odwirowywana (400 × g, 10 min, 21°C) w celu usunięcia komórek, np. erytrocytów pozostałych po nakłuciu. Supernatant rozdzielano do próbek kriogenicznych (NUNC CryoTubes) po 1 ml i umieszczano w zamrażalce (–80°C) do późniejszej analizy cytokin, chemokin i czynników wzrostu, a także jako unikatowy materiał archiwalny. Procedurę oznaczenia wybranych analitów: TGF-β 1/2/3, IL-10, IL-4, GM-CSF, VEGF-A, IFN-γ, IL-17A, IL-1b, IL-6, IL-8, MIP-1b, RANTES, FGF-2, IL-12p40, MCP-1, G-CSF, TNF-α, IL-13 w płynie mózgowo-rdzeniowym wykonywano tożsamo jak przy oznaczeniu ich w osoczu.

3.4.1.3. Mocz

Próbkę moczu pobrano w czasie wizyt 1, 2, 4, 5, 6, 7, w przypadku wizyty hospitalizacyjnej przy podaniu BPL próbka została pobrana przy przyjęciu i oznaczona jako wizyta 4(1), 5(1), 6(1). Pobrany materiał pozwolił ocenić poziom zewnątrzkomórkowej domeny receptora neurotrofiny p75 (p75^{ECD}), będący biomarkerem progresji oraz prognozyki w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS). Bardzo ważne było zabezpieczenie próbki moczu już na etapie ośrodka klinicznego, gdyż w ciągu 30 minut od pobrania materiału próbkę moczu należy zwirować (1000 × g, 10 min, 4°C), następnie pobrać 2 ml supernatantu i umieścić po 1 ml w próbkach kriogenicznych (NUNC CryoTubes), a następnie niezwłocznie umieścić je w zamrażarce w –20°C. Tego samego dnia specjalny kurier odbierał zamrożony materiał, przekładał go do pojemnika transportującego wypełnionego suchym lodem, a następnie dostarczał do Laboratorium Centralnego PBKM. Próbki z pojemnika transportowego do czasu wykonania oznaczeń umieszczono w zamrażarce w –80°C. Oznaczenie p75^{ECD} wykonano za pomocą testu ELISA i komercyjnie dostępnego zestawu NGFR/p75^{ECD} Rapid™ ELISA Kit: Human (Biosensis®) zgodnie z instrukcją producenta. Próbki umieszczono w łaźni wodnej w 37°C do czasu rozmrożenia. Przygotowano odczynniki, standardy i kontrole dołączone do zestawu oraz rozcieńczono próbki moczu według wytycznych z instrukcji producenta. Na płycie 96-dołkowej umieszczono po 100 μl przygotowanego standardu, kontroli oraz próbek

moczu w tryplikatach. Płytkę zabezpieczono parafilmem i umieszczono na wytrząsarce (140 rpm) na 90 minut. Nadsącz z płytki usunięto, po czym każdy z dołków 5-krotnie przepłukano z użyciem 200 μ l na dołek Wash Buffer. Następnie dodano, w ilości 100 μ l na dołek, przeciwciało pierwszorzędowe. Płytkę zabezpieczono parafilmem i wytrząsano (140 rpm) na wytrząsarce przez 60 minut. Nadsącz z płytki usunięto, każdy z dołków przepłukano 5-krotnie Wash Buffer (200 μ l/dołek), a następnie dodano 100 μ l/dołek streptawidyny-HR. Płytkę zabezpieczono parafilmem i wytrząsano (140 rpm) przez 30 minut na wytrząsarce. Nadsącz usunięto, a każdy z dołków przepłukano 5-krotnie z użyciem Wash Buffer (200 μ l/dołek). Kolejno dodano substrat TMB (100 μ l/dołek) i przeprowadzono inkubację płytki w ciemności w temperaturze pokojowej przez 10–15 minut bez wytrząsania. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie odczynnika Stop solution (100 μ l/dołek). Bezpośrednio wykonano odczyt absorbancji na czytniku spektrofotometrycznym, O.D. 450 nm. Wszystkie użyte odczynniki wraz z płytką 96-dołkową stanowiły zestaw NGFR/p75^{ECD} Rapid™ ELISA Kit: Human (Biosensis®). Dla moczu, w celu znormalizowania, wartość wyrażona jest jako ng p75^{ECD}/mg kreatyniny. Drugą zabezpieczoną próbkę moczu wysłano do diagnostycznego laboratorium zewnętrznego w celu zlecenia analizy kreatyniny w próbce moczu z wizyt 1, 2, 4(1), 5(1), 6(1), 7.

3.4.2. Statystyczna analiza danych

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism. Wyniki przeanalizowano pod kątem istotności statystycznej z wykorzystaniem jednostronnej i/lub dwustronnej analizy wariancji ANOVA z testem Tukeya. Wyniki przedstawiono jako wartości średniej \pm odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Różnice istotne statystycznie przyjęto, gdy wartość parametru p była mniejsza od 0,05 ($p < 0,05$). Istotność statystyczną określono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4. WYNIKI

4.1. Bank produktów komórkowych WJ-MSC

Bank produktów komórkowych WJ-MSC przeznaczonych do badania klinicznego pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym wytworzono w warunkach GMP (ang. *Good Manufacturing Practice*) przez Polski Bank Komórek Macierzystych, zgodnie z obowiązującymi procedurami oraz przy użyciu kwalifikowanych oraz certyfikowanych materiałów i urządzeń. Zgodnie z GMP oraz rozporządzeniem dla produktów ATMP pomieszczenia wytwórcze były skwalifikowane i odpowiednio kontrolowane w celu zapewnienia środowiska aseptycznego. Klasyfikacja pomieszczeń czystych była wykonana zgodnie z normą ISO 14644-1. Wykorzystany sprzęt był poddany procedurom kwalifikacyjnym zgodnie z wymaganiami GMP. Produkcja ATMP odbywała się w klasie A (przepływ laminarny) w otoczeniu klasy B. Obszary wytwórcze były monitorowane pod kątem mikroorganizmów żywych (poprzez kontrolę i pobieranie próbek powietrza oraz powierzchni przy użyciu płytek sedymentacyjnych oraz odciskowych) oraz liczby cząstek czy utrzymywania kaskady ciśnień. Obowiązkowej kontroli zanieczyszczeń podlegali również pracownicy po wykonaniu pracy związanej z wytworzeniem produktów komórkowych.

Wytwarzanie rozpoczyna się od kwalifikacji materiału sznura pępowinowego na podstawie wywiadu medycznego, analizy wyników na obecność czynników zakaźnych we krwi matki oraz wstępnych oględzin tkanki. W przypadku kwalifikacji następuje ekspansja *ex vivo* w systemie hodowli wolnej od materiałów pochodzenia zwierzęcego. Hodowla pierwotna komórek MSC jest zakładana z eksplantów galarety Whartona w medium przeznaczonym dla mezenchymalnych komórek stromalnych w warunkach GMP oraz za zgodą Głównego Inspektora Farmaceutycznego (GIF) przy użyciu odczynników bez komponentów odzwierzęcych (ang. *xeno-free*, XF). Po około dwóch tygodniach pod mikroskopem można zaobserwować wrzecionowate komórki adherentne, wyglądem zbliżone do fibroblastów.

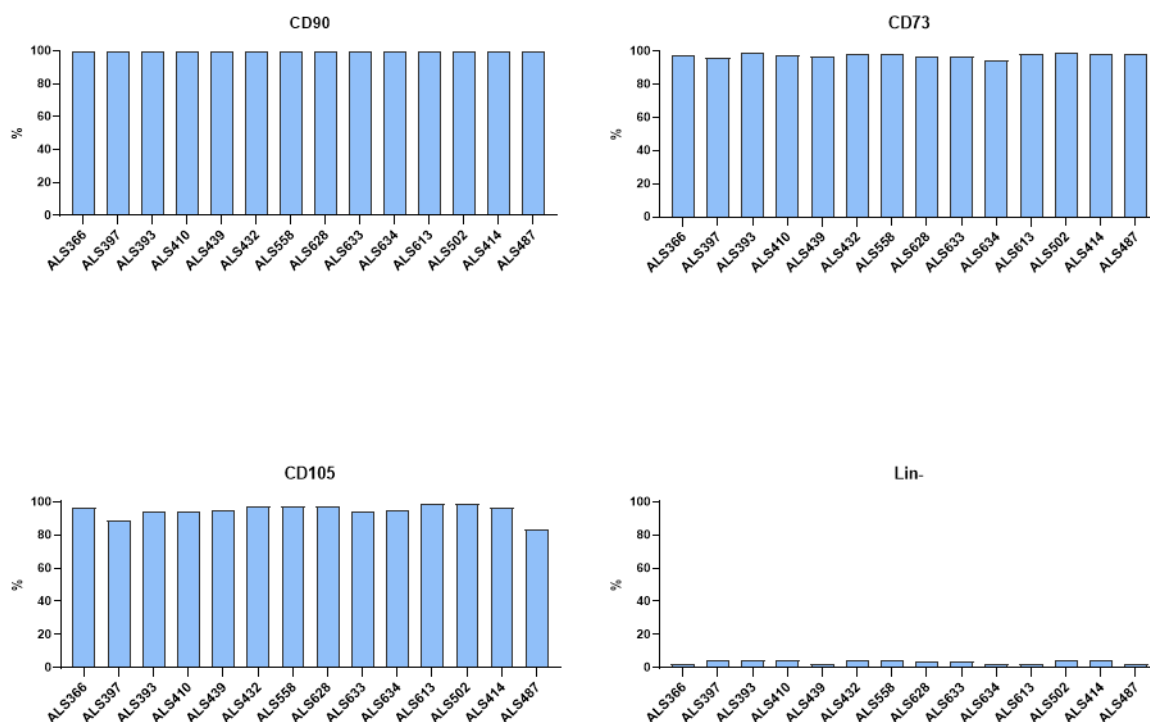
W celu wytworzenia produktów komórkowych zostało pobranych ok. 300 sznurów pępowinowych, spośród których na podstawie kryteriów do dalszej preparatyki zakwalifikowano ok. 60 sznurów. Z puli 60 sznurów założono hodowle eksplantów, finalnie do badania klinicznego zakwalifikowano produkty ATMP wytworzone z 14 linii WJ-MSC (oznaczonych jako ALS numer) spełniających wytyczne specyfikacji produktu końcowego (tabela 3). Dodatkowo wybrana linia musiała spełnić dodatkowy warunek liczby wyprodukowanych dawek, tj. minimum 6 kaset.

Tabela 3. Specyfikacja produktu końcowego opartego na komórkach WJ-MSC

Oznaczenie	Limity
Sterylność	brak obecności bakterii/grzybów
Mykoplasma	nie wykryto
Endotoksyny	nie wykryto
Liczba komórek	$30-40 \times 10^6$
Żywotność komórek	$\geq 80\%$
Zdolność adherencji	$\geq 90\%$
Kariotyp	46XX lub 46XY
Ekspresja antygenu CD45	$< 5\%$
Ekspresja antygenu CD34	$< 5\%$
Ekspresja antygenu CD14	$< 5\%$
Ekspresja antygenu CD19	$< 5\%$
Ekspresja antygenu HLA-DR	$< 5\%$
Ekspresja antygenu CD73	$\geq 70\%$
Ekspresja antygenu CD90	$\geq 70\%$
Ekspresja antygenu CD105	$\geq 70\%$

Przeprowadzona ocena fenotypowa dla 14 linii WJ-MSC potwierdziła na poziomie podstawowym, zgodnie z wymogami ISCT, charakterystyczny profil markerów dla komórek MSC (markery CD73, CD90, CD105 pozytywne; markery Lin-: CD34, CD45, CD14, CD14, HLA-DR negatywne) (ryc. 13). Nie wykazano różnic w poziomie markerów pozytywnych i negatywnych dla poszczególnych linii.

Wszystkie linie komórkowe WJ-MSC spełniły założenia klasycznego fenotypu dla komórek MSC (markery CD73, CD90, CD105 pozytywne $\geq 70\%$; markery Lin-: CD34, CD45, CD14, CD14, HLA-DR negatywne $< 5\%$). Żaden produkt nie wykazał obecności mykoplazmy. Wszystkie produkty wykazały jałowość oraz poziom endotoksyn $< 0,1$ EU/ml. W sumie przygotowano 215 dawek (kaset) produktu ATMP, zawierających komórki WJ-MSC. Każda dawka zawierała 40×10^6 komórek o żywotności powyżej 90%, wykazujących prawidłowy kariotyp (46XX lub 46XY). Zoptymalizowany sposób izolacji i wytwarzania produktu komórkowego był na tyle wydajny, że pozwolił zredukować liczbę linii potrzebnych do wytworzenia produktu dla 20 pacjentów ALS w badaniu klinicznym. Ostatecznie do pacjentów trafiły produkty uzyskane z linii ALS397, ALS439, ALS432, ALS558, ALS414, ALS487, ALS633, ALS634 (tabela 4).



Ryc. 13. Fenotyp podstawowy WJ-MSC według wytycznych ISCT. Pozytywne markery powierzchniowe CD73, CD90, CD105 oraz negatywne dla Lin-: CD34, CD45, CD14, CD14, HLA-DR

Tabela 4. Zestawienie produktów komórkowych WJ-MSC przeznaczonych do badania klinicznego ALSTEM. Produkty spełniły wytyczne specyfikacji produktu końcowego, a liczba wyprodukowanych dawek (40×10^6 komórek) dla poszczególnych linii była ≥ 6

Linia WJ-MSC	Liczba produktów komórkowych (dawka 40×10^6 komórek WJ-MSC)	Całkowita liczba komórek [1×10^9]
ALS439	14	0,56
ALS432	12	0,48
ALS558	11	0,44
ALS634	20	0,8
ALS397	33	1,32
ALS414	7	0,28
ALS487	6	0,24
ALS633	10	0,4

4.2. Rozszerzona charakterystyka banku produktów WJ-MSC

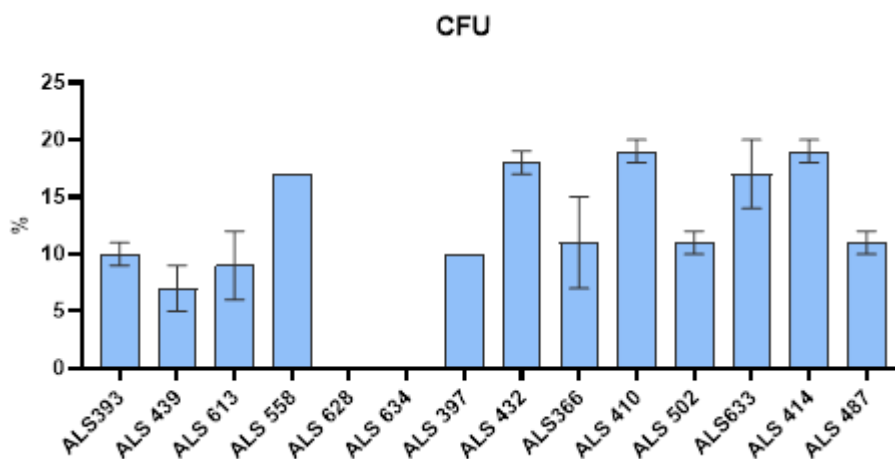
Rozszerzoną charakterystykę przeprowadzono dla reprezentatywnych produktów komórkowych WJ-MSC wyizolowanych od 14 dawców, zwolnionych zgodnie ze specyfikacją

końcową (tabela 3). Wszystkie produkty komórkowe spełniły kryteria zwolnienia, nie wykazując zróżnicowania między dawcami komórek. Rozszerzoną charakterystykę przeprowadzono, wykonując następujące testy:

- test jednostek tworzących kolonie (CFU);
- rozszerzony fenotyp WJ-MSC (analiza cytometryczna markerów nieklasycznych: CD119, CD120b, CD200, CD72, CD213, CD39, CD274, HO-1);
- profil ekspresji genów: *CDKN2A*, *CLDN1*, *DNT3B*, *ESM1*, *HAND2*, *HEY1*, *MYO3B*, *NANOG*, *PDGFRA*, *POU5F1*, *TDGF1*, *TWIST1*, *ZBTB16*;
- profil wydzielniczy komórek WJ-MSC w hodowli *in vitro*;
- ocenę zdolności immunomodulujących komórek WJ-MSC w kohodowli pośredniej z komórkami MNC – efekt parakryny.

4.2.1. Test jednostek tworzących kolonie – CFU (ang. *colony forming unit*)

W przypadku serii produktu ALS628 i ALS634 nie zaobserwowano kolonii. Pozostałe WJ-MSC wykazały stopień tworzenia kolonii w zakresie 7–19%. Serie produktu opartego na WJ-MSC w zależności od dawcy różniły się procentem komórek tworzących kolonie (ryc. 14).



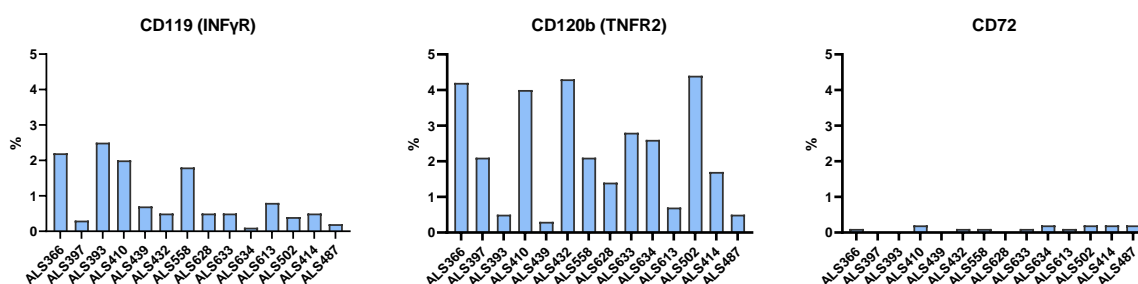
Ryc. 14. Test jednostek tworzących kolonie – CFU dla linii WJ-MSC. Stopień tworzenia kolonii zdefiniowano jako procent liczby kolonii do liczby wysianych komórek

4.2.2. Analiza obecności antygenów nieklasycznych dla komórek WJ-MSC – fenotyp rozszerzony

Na podstawie literatury wybrano fenotyp rozszerzony markerów komórek WJ-MSC mających potencjalny wpływ na ich zdolności immunomodulujące. Fenotyp rozszerzony obejmował ocenę cytometryczną markerów:

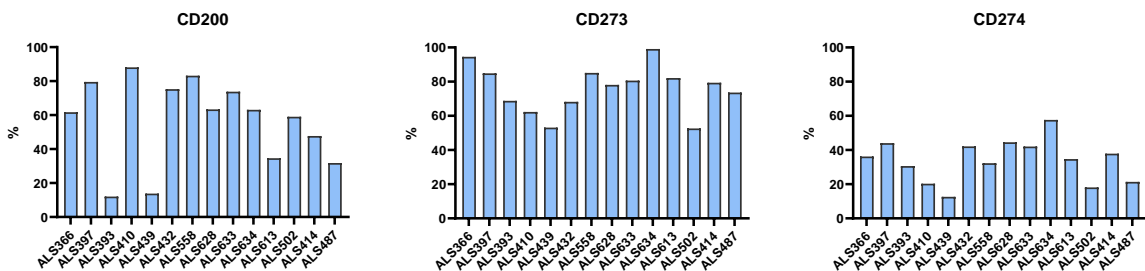
- CD119 (*IFNGR1* – koduje łańcuch wiążący ligand (alfa) receptora interferonu gamma, odgrywa kluczową rolę w odpowiedziach przeciwdrobnoustrojowych, przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych poprzez aktywację efektorowych komórek odpornościowych i wzmocnienie prezentacji antygeny);
- CD120b (*TNFRSF1B* – białko kodowane przez ten gen należy do nadrodziny receptorów TNF);
- CD72 (*CD72* – koduje białko CD72, rola w proliferacji i różnicowaniu komórek B);
- CD200 (*CD200* – koduje białko CD200, rola w immunosupresji);
- CD273 (*PDCDILG2* – hamuje proliferację komórek T);
- CD274 (*CD274* – koduje białko CD74, blokuje aktywację komórek T);
- CD39 (*ENTPDI* – hydrolizuje zewnątrzkomórkowy adenozy-5'-trifosforan i difosforan adenozy do monofosforanu adenozy);
- HO-1 (*HMOX1* –oxygenaza hemowa 1, katalizuje degradację hemu).

Komórki WJ-MSC w zależności od dawcy wykazują zróżnicowany profil ekspresji wybranych markerów w panelu rozszerzonym. Wyniki przedstawiono poniżej (ryc. 15, 16, 17).



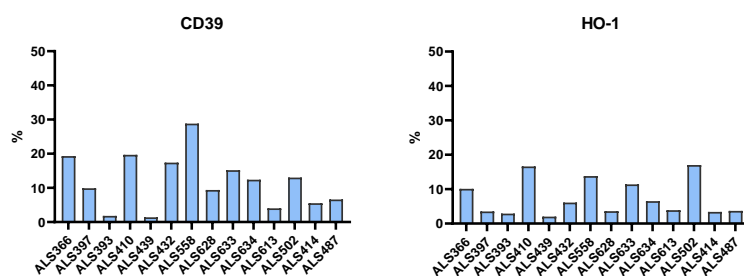
Ryc. 15. Rozszerzony fenotyp dla linii WJ-MSC. Procent markerów CD119, CD120b, CD72

Na znikomym poziomie występuje u wszystkich dawców marker CD72 (<0,2%). Również na niskim poziomie występują markery CD119 (<3%) oraz CD120b (<5%).



Ryc. 16. Rozszerzony fenotyp dla linii WJ-MSC. Procent markerów CD200, CD273, CD274

W przypadku CD200 możemy wyróżnić 3 grupy CD200: przedział 12–14% (ALS393 i ALS439), przedział 30–50% (ALS613, ALS414, ALS487) i największą grupę – przedział 59–88% (ALS366, ALS397, ALS410, ALS432, ALS558, ALS628, ALS633, ALS634, ALS502). Średni procent dla markera CD273 wśród wszystkich dawców to 76% (± 14). Marker CD274 – jego średni procent wśród wszystkich dawców to 34% (± 12).



Ryc. 17. Rozszerzony fenotyp dla linii WJ-MSC. Procent markerów CD39, HO-1

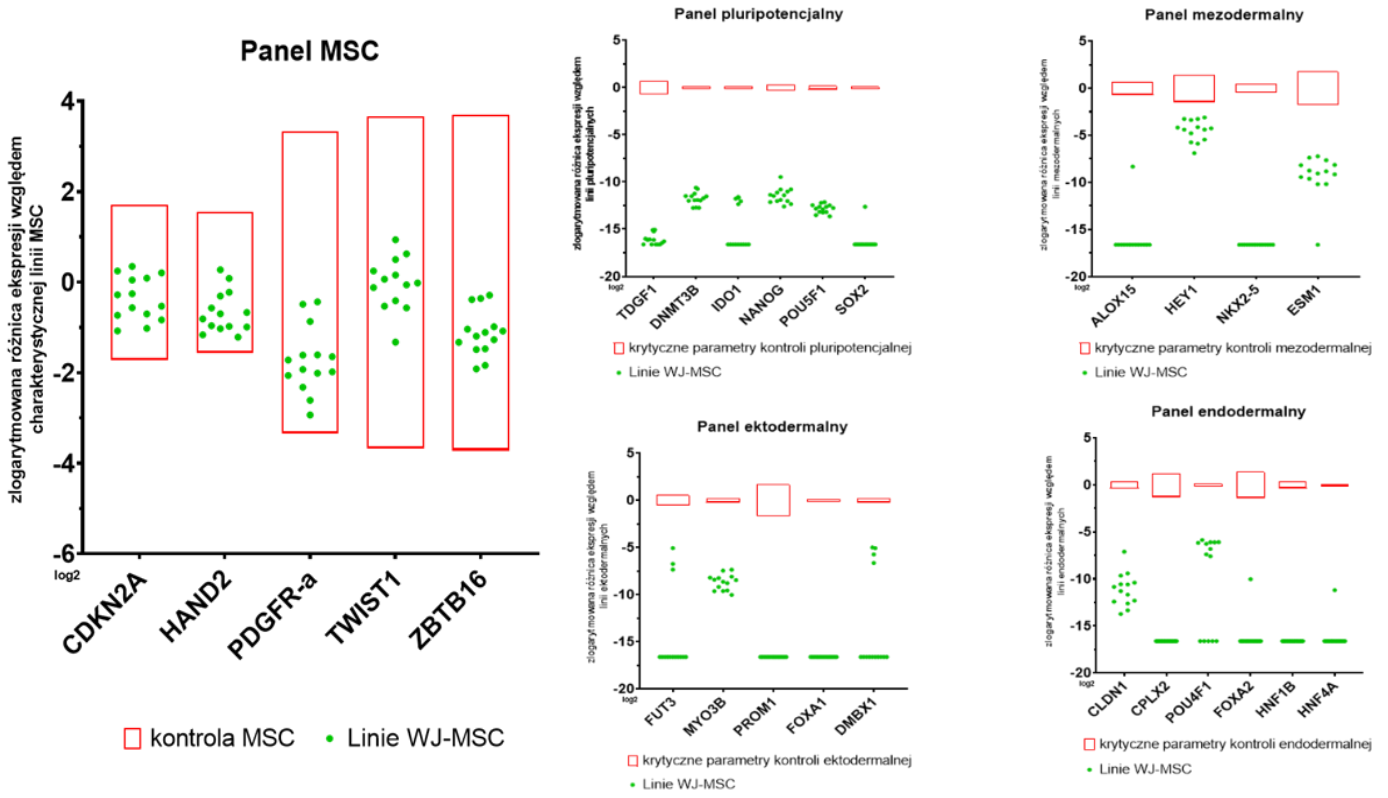
Procentowa zawartość CD39, również w zależności od dawcy, równo podzieliła ich na dwie grupy: $<10\%$ (ALS397, ALS393, ALS9, ALS628, ALS613, ALS414, ALS487) i przedział 12–30% (ALS66, ALS410, ALS432, ALS558, ALS633, ALS634, ALS502). Oksygenaza hemowa-1 (HO-1) podzieliła wszystkich dawców na trzy grupy: $<5\%$ (ALS397, ALS393, ALS439, ALS628, ALS613, ALS414, ALS487), przedział 6–10% (ALS366, ALS432, ALS634) oraz przedział 11–17% (ALS410, ALS558, ALS633, ALS502).

4.2.3. Ocena ekspresji panelu genów oceniających bezpieczeństwo produktów komórkowych WJ-MSC

Ważne jest, aby sprawdzić potencjał do nowotworzenia, ponieważ badany produkt komórkowy oparty jest na komórkach multipotencjalnych. Ocena ekspresji komórek WJ-MSC pozwala na odróżnienie ich od linii mających zdolność do pluripotencji, nowotworzenia czy pochodzących z odmiennych listków zarodkowych. Ekspresję genów obliczano na podstawie logarytmu o podstawie 2 z ekspresji względnej dla komórek mezenchymalnych w stosunku do średniej ekspresji dla populacji kontrolnej komórek: mezenchymalnych, nowotworowych pochodzenia mezodermalnego, nowotworowych pochodzenia ektodermalnego, nowotworowych pochodzenia endodermalnego oraz pluripotencjalnych, znormalizowaną dla genów referencyjnych: *GAPDH*, *HPRT* i *ACTB* [42].

Oceniane linie komórkowe osiągnęły poziom zlogarytmowanej różnicy ekspresji względnej charakterystycznej dla MSC, tym samym potwierdzając ich prawidłowy profil ekspresji. Poziom zlogarytmowanej różnicy ekspresji względnej był poza wyznaczonym limitem krytycznym dla panelu genów związanych z pluripotencją oraz genami ulegającymi ekspresji w nowotworach pochodzenia mezodermalnego, ektodermalnego oraz endodermalnego (ryc. 18 [A]). Komórki WJ-MSC w zależności od dawcy wykazały ekspresję na różnym poziomie dla wyselekcjonowanych markerów genetycznych w panelu pluripotencjalnym (*TDGF1*, *NANOG*, *POU5F1*, *DNMT3B*), panelu charakterystycznym dla MSC (*CDKN2A*, *HAND2*, *PDGFRA*, *TWIST1*, *ZBTB16*), panelu mezodermalnym (*ESMI*, *HEY1*), panelu ektodermalnym (*MYO3B*), panelu endodermalnym (*CLDNI*) (ryc. 18 [B]). Ogólny rozkład ekspresji wybranych genów dla charakteryzowanych linii WJ-MSC przedstawia się następująco: *CDKN2A* ($1,78 \pm 0,60$), *HAND2* ($1,54 \pm 0,57$), *PDGFRA* ($1,80 \pm 1,06$), *ZBTB16* ($1,44 \pm 0,53$), *TWIST1* ($1,28 \pm 0,63$), *TDGF1* ($1,24 \pm 0,70$), *POU5F1* ($0,91 \pm 0,28$), *NANOG* ($0,97 \pm 0,74$), *ESMI* ($1,41 \pm 0,92$), *CLDNI* ($0,53 \pm 1,04$), *DNMT3B* ($1,05 \pm 0,51$), *HEY1* ($2,05 \pm 1,40$), *MYO3B* ($2,05 \pm 1,21$).

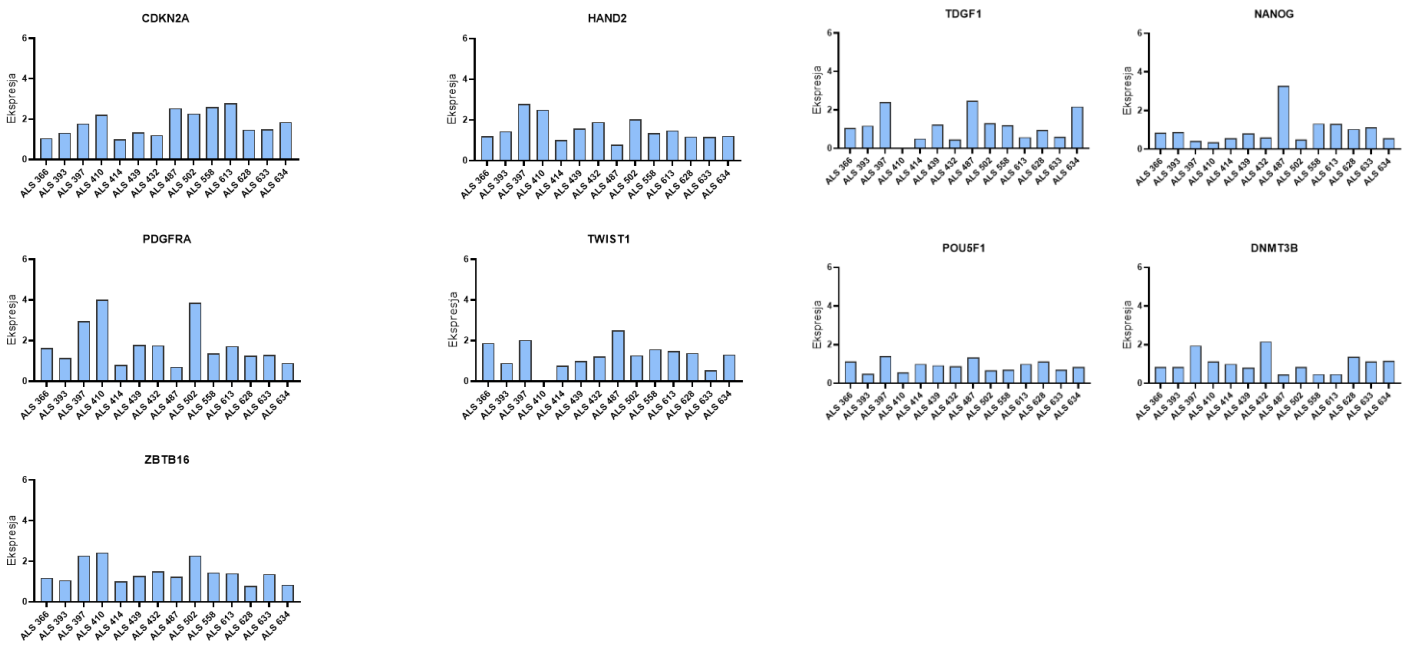
A



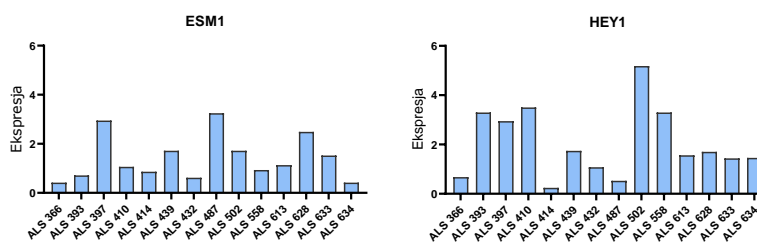
B

Panel charakterystyczny dla MSC

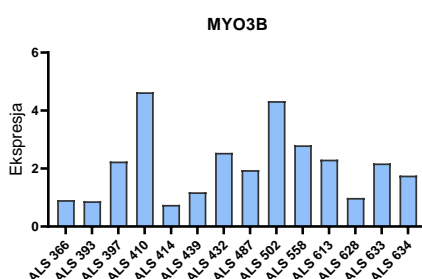
Panel pluripotencjalny



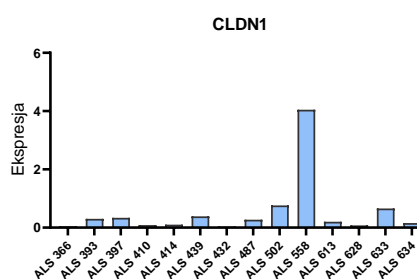
Panel mezodermalny



Panel ektodermalny



Panel endodermalny



Ryc. 18. Ocena ekspresji panelu genów. [A] Czerwone kwadraty oznaczają poziom zlogarytmowanej różnicy ekspresji względnej charakteryzującej panel MSC oraz krytyczny poziom zlogarytmowanej różnicy ekspresji względnej dla panelu pluripotencjalnego, mezodermalnego, ektodermalnego oraz endodermalnego. [B] Ekspresja wybranych genów z panelu charakterystycznego dla MSC (*CDKN2A*, *HAND2*, *PDGFRA*, *TWIST1*, *ZBTB16*), panelu pluripotencjalnego (*TDGF1*, *NANOG*, *POU5F1*, *DNMT3B*), panelu mezodermalnego (*ESM1*, *HEY1*), panelu ektodermalnego (*MYO3B*) oraz panelu endodermalnego (*CLDN1*)

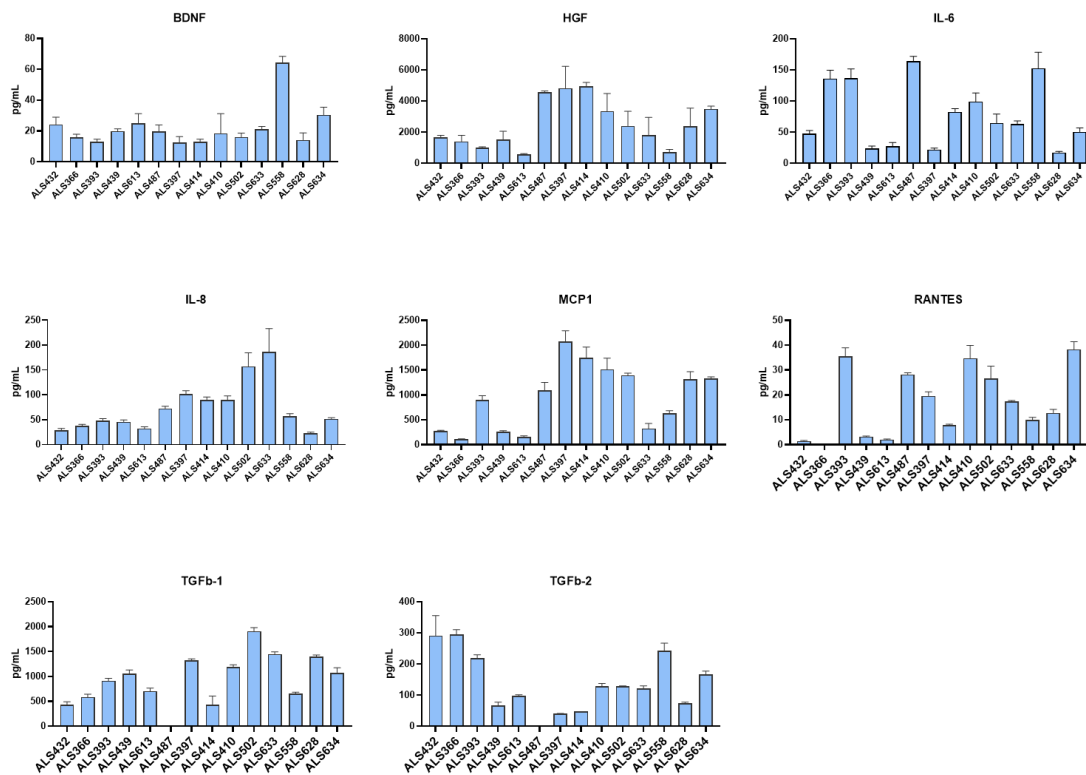
4.2.4. Ocena aktywności wydzielniczej WJ-MSC (sekretom)

Komórki WJ-MSC w zależności od dawcy (linii) wykazują zróżnicowany poziom wydzielania BDNF, HGF, IL-6, IL-8, MCP1, RANTES, TGF- β 1, TGF- β 2, co potwierdza doniesienia o zmienności biologicznej MSC izolowanych z tego samego źródła (ryc. 19).

Dla charakteryzowanych $n = 14$ linii WJ-MSC oznaczane poziomy cytokin mieściły się w zakresach: BDNF ($22,01 \pm 13,22$ pg/ml), HGF ($2474,29 \pm 1516,93$ pg/ml), IL-6 ($77,69 \pm 51,62$ pg/ml), IL-8 ($73,03 \pm 48,74$ pg/ml), MCP-1 ($938,56 \pm 648,90$ pg/ml), RANTES ($16,97 \pm 13,69$ pg/ml), TGF- β 1 ($937,35 \pm 505,06$ pg/ml), TGF- β 2 ($137,16 \pm 93,79$ pg/ml).

Dodatkowo zaobserwowano istotną pozytywną korelację poziomów dla HGF i MCP1. Kolejna istotna korelacja opierała się na zależności RANTES i MCP1. Im większe wydzielanie

RANTES, tym większe wydzielanie MCP1. Negatywną korelację wykazywały cytokiny TGF- β 2 w odniesieniu do HGF.



Ryc. 19. Sekretom komórek WJ-MSC. Oznaczono anality metodą multiplex: BDNF, HGF, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, TGF- β 1, TGF- β 2 w nadsączu z nad komórek

4.2.5. Test oparty na kohodowli sprawdzający zdolności immunomodulacyjne komórek WJ-MSC

W celu sprawdzenia właściwości immunomodulacyjnych WJ-MSC przeprowadzono kohodowle populacji komórek MSC z MNC wyizolowanych z kożuszka leukocytno-płytkowego. Komórki MNC uprzednio aktywowano w celu określenia, czy komórki WJ-MSC są w stanie stłumić odpowiedź immunologiczną.

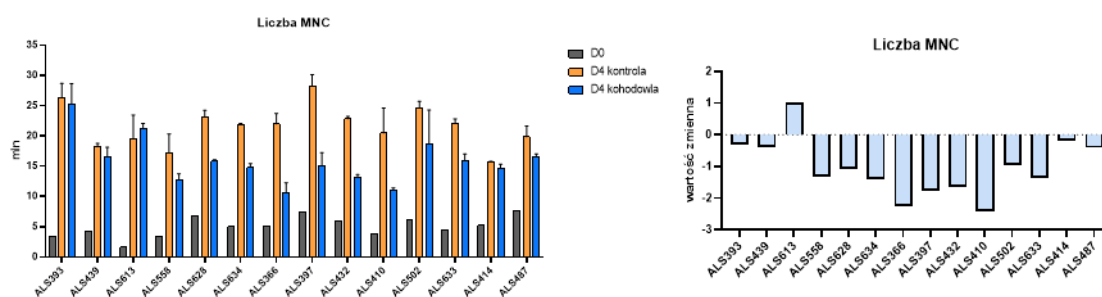
Wszystkie parametry oceny testu kohodowli przedstawiające wpływ linii WJ-MSC na komórki MNC wyrażono wzorem:

$$\frac{D4 \text{ KOHODOWLA} - D4 \text{ KONTROLA}}{D_0}$$

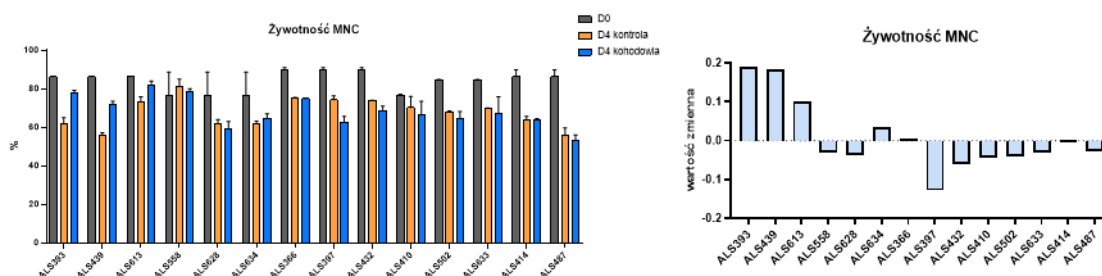
○ Liczba/żywołność MNC

Zahamowanie ekspansji komórek MNC w kohodowli dzięki immunomodulacyjnym właściwościom komórek WJ-MSC przedstawiono na rycinie 20 [A]. Jedynie linia ALS613 nie wykazała zdolności obniżenia ekspansji komórek MNC. Żywołność komórek MNC przedstawiono na rycinie 20 [B]. Średnia żywołność komórek MNC w dniu założenia kohodowli (D0) wynosiła 84% (± 5). W dniu zakończenia kohodowli (D4) średnia żywołność komórek MNC w kontroli oraz kohodowli wynosiła 68% (± 8). Linie WJ-MSC, które obniżyły żywołność komórek MNC, to ALS558, ALS628, ALS397, ALS432, ALS410, ALS502, ALS633, ALS414, ALS487.

A



B

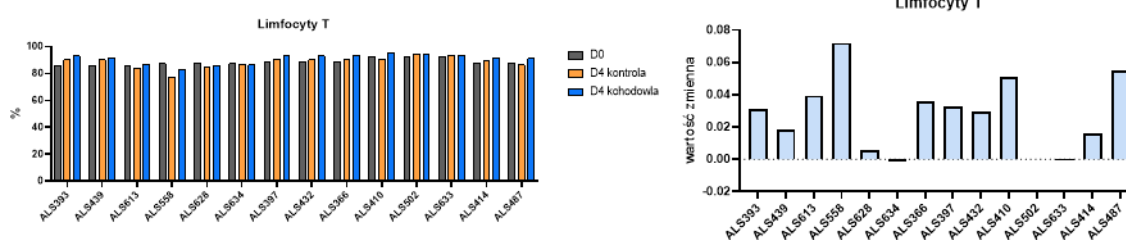


Ryc. 20. Ocena kohodowli WJ-MSC z MNC pod względem [A] liczby i [B] żywołności komórek MNC

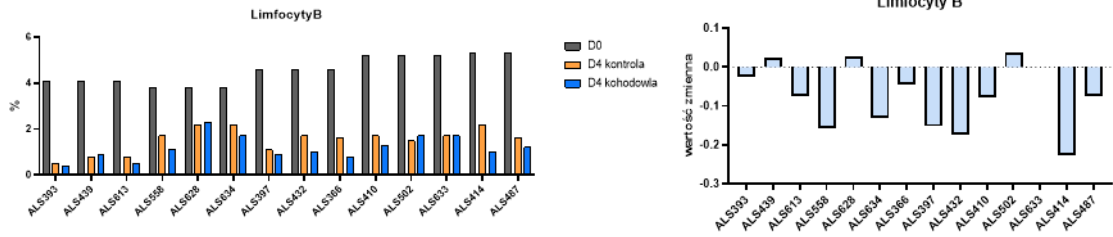
○ Subpopulacje limfocytów

Na podstawie cytometrii przepływowej przeanalizowano fenotyp MNC przy użyciu przeciwciał przeciwko markerom powierzchniowym wybranym dla populacji MNC, m.in. komórki Th1, Th2, Th17, Tc, Treg, T-naiwne i T-pamięci, czy markery aktywacji, takie jak CD25, CD69 i HLA-DR. W wyniku kohodowli z WJ-MSC zwiększył się udział procentowy limfocytów T CD3+ (ryc. 21) w odniesieniu do warunków kontrolnych. Odsetek limfocytów B

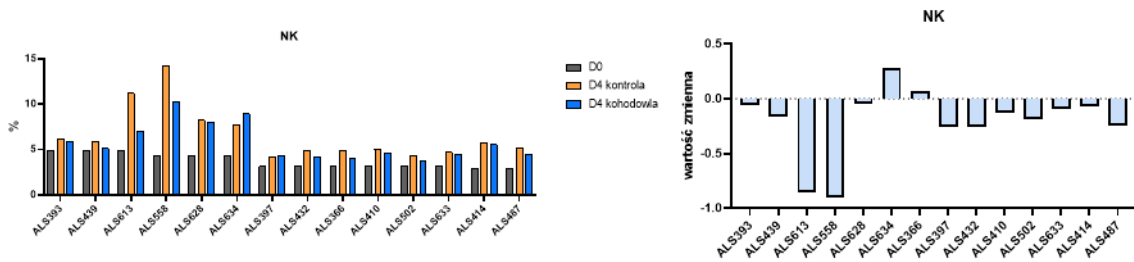
(ryc. 22) w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców uległ zmniejszeniu. NK (ryc. 23) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się procent CD4-CD16+CD56+ na MNC, jedynie dla linii ALS634 i ALS366 wartość wykazała wzrost. NKT (ryc. 24) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się procent CD4+CD16+CD56+ na MNC, jedynie dla linii ALS366 i ALS633 wartość wykazała wzrost. Limfocyty Th (ryc. 25) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców wzrósł procent CD4+ na MNC, czego nie zaobserwowano w kohodowli z linią ALS628, gdzie wartość ta obniżyła się. Limfocyty Tc (ryc. 26) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców spadł procent CD8+ na MNC, a w przypadku linii ALS628 i ALS487 zaobserwowano wzrost. Limfocyty Th naiwne (ryc. 27) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zwiększył się procent CD4+CD45RA+ na MNC, oprócz kohodowli z liniami ALS393, ALS439, ALS613 i ALS558. Limfocyty Th pamięci (ryc. 29) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od 7 dawców zwiększył się procent CD4+CD45RO+ na MNC, z jednym dawcą WJ-MSC procent nie uległ zmianie, z WJ-MSC od 6 dawców procent zmniejszył się. Limfocyty Tc naiwne (ryc. 28) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od połowy dawców zwiększył się procent CD8+CD45RA+ na MNC. Limfocyty Tc pamięci (ryc. 30) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od połowy dawców zmniejszył się procent CD4+CD45RO+ na MNC lub pozostał bez zmian. Limfocyty T regulatorowe (ryc. 31) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się procent komórek CD4+CD25+CD127lowFoxp3+. Limfocyty Th1 (ryc. 32) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC u połowy dawców zwiększył się procent komórek Th1, zależności nie zaobserwowano w kohodowli z liniami ALS393, ALS439, ALS613, ALS414, ALS487. Limfocyty Th2 (ryc. 33) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC u wszystkich dawców zwiększył się dość znacznie procent komórek Th2. Limfocyty Th17 (ryc. 34) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC u większości dawców zwiększył się procent komórek Th17 z wyjątkiem kohodowli z ALS393, ALS439, ALS613, ALS558, gdzie procent Th17 zmniejszył się.



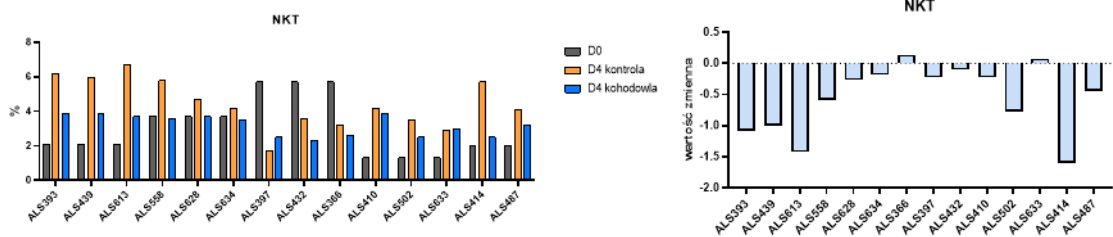
Ryc. 21. Ocena odsetka limfocytów T (CD3+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



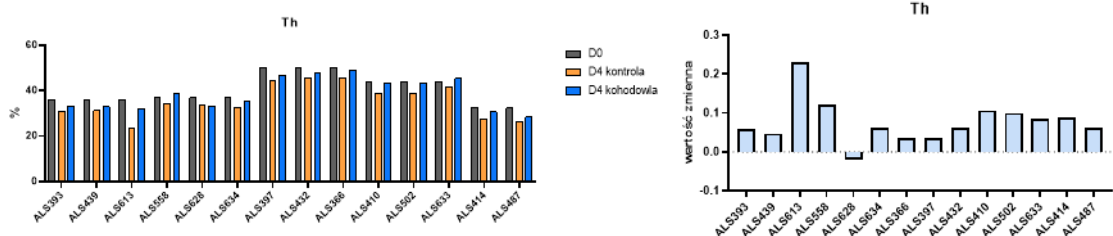
Ryc. 22. Ocena odsetka limfocytów B (CD19+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



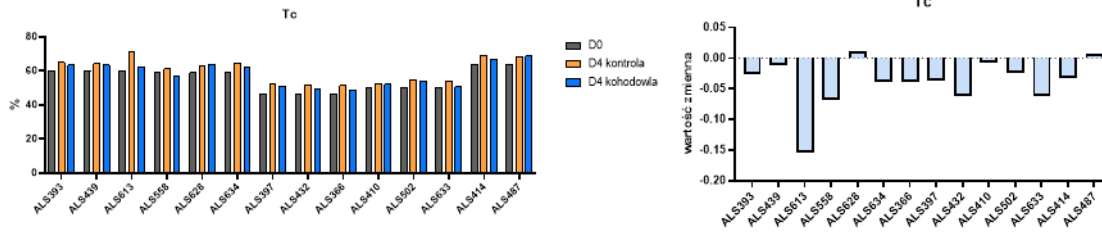
Ryc. 23. Ocena odsetka komórek NK (CD4-CD16+CD56+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



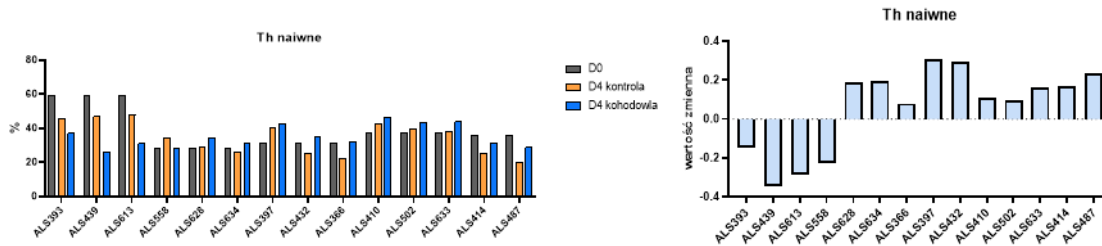
Ryc. 24. Ocena odsetka komórek NKT (CD4+CD16+CD56+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



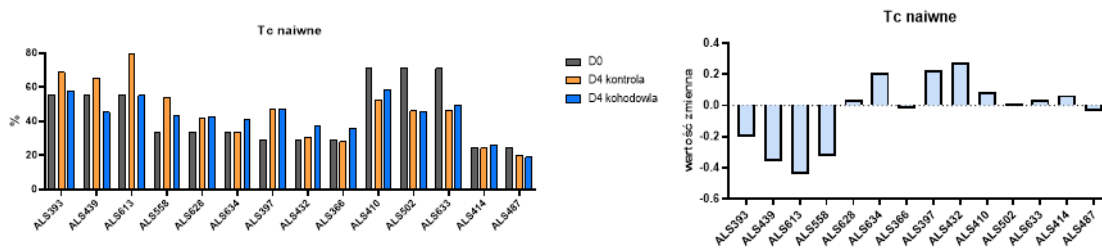
Ryc. 25. Ocena odsetka komórek Th (CD3+CD4+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



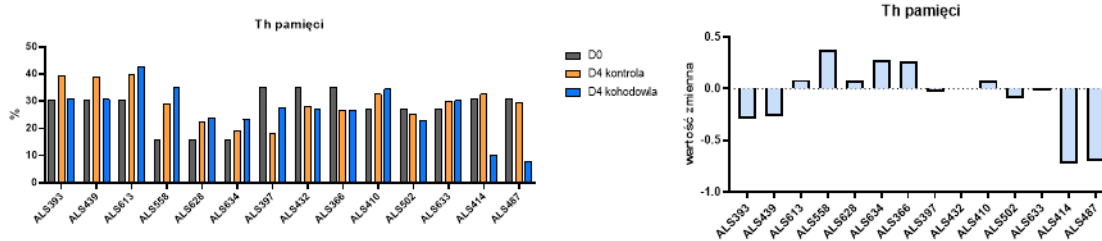
Ryc. 26. Ocena odsetka komórek Tc (CD3+CD8+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



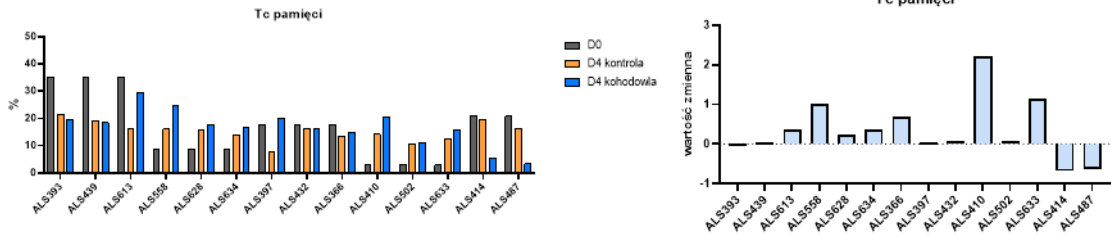
Ryc. 27. Ocena odsetka komórek Th naiwnych (CD4+CD45RA+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



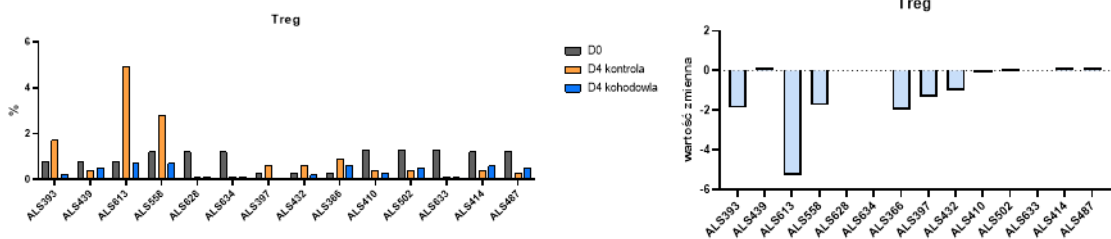
Ryc. 28. Ocena odsetka komórek Tc naiwnych (CD8+CD45RA+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



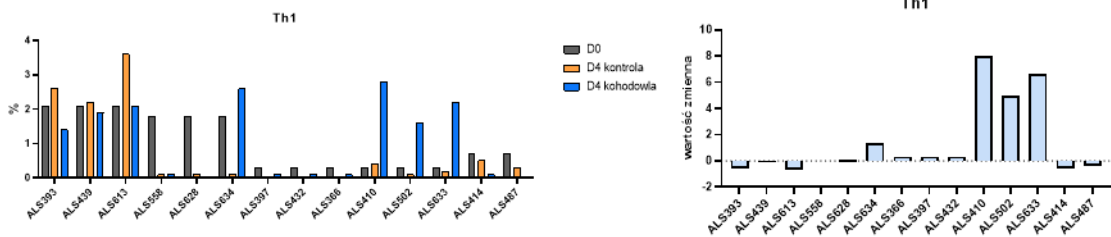
Ryc. 29. Ocena odsetka komórek Th pamięci (CD4+CD45RO+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



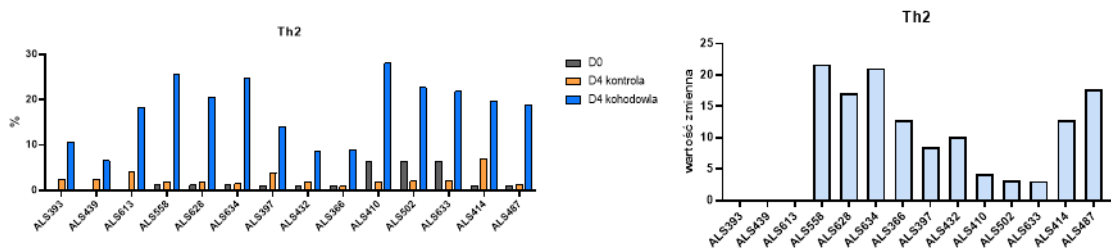
Ryc. 30. Ocena odsetka komórek Tc pamięci (CD8+CD45RO+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



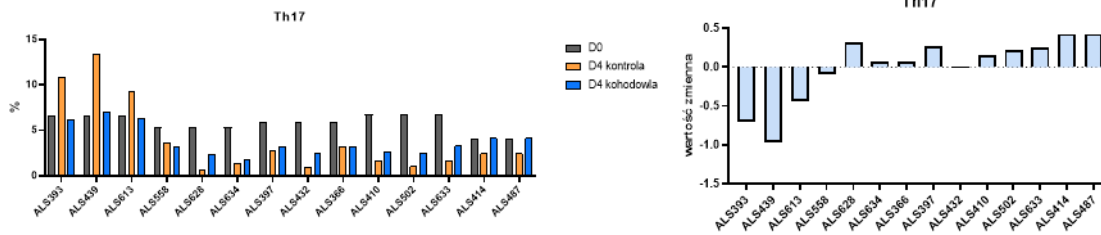
Ryc. 31. Ocena odsetka komórek T regulatorowych (CD4+CD25+CD127lowFoxp3) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



Ryc. 32. Ocena odsetka komórek Th1 (CD4+CD183+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



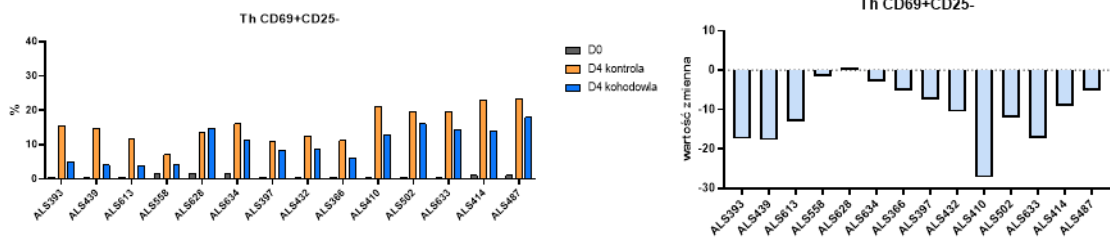
Ryc. 33. Ocena odsetka komórek Th2 (CD4+CD194+CD196-) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



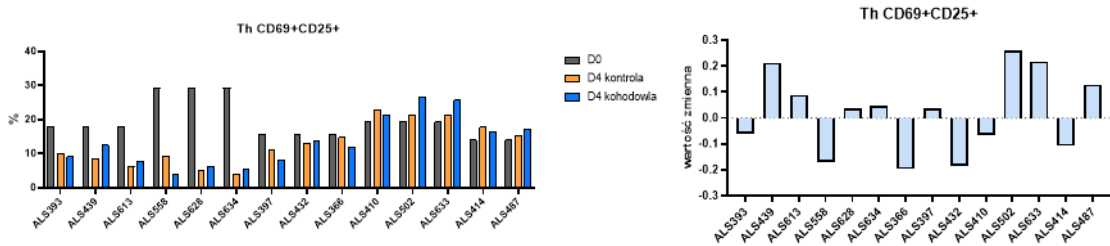
Ryc. 34. Ocena odsetka komórek Th17 (CD4+CD194+CD196+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ- MSC

o Dynamika zmian markerów aktywacji limfocytów (CD25/CD69)

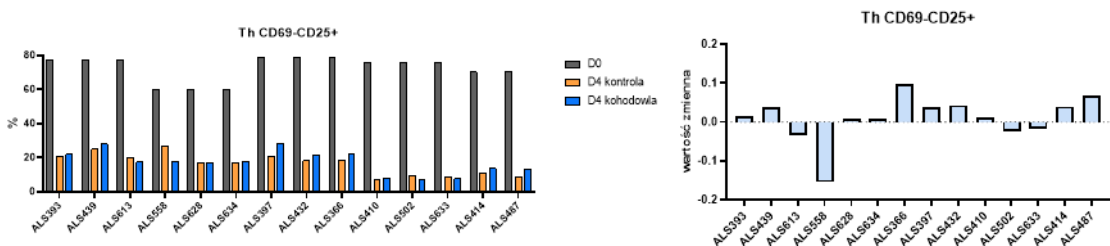
Parakrynnie zdolności immunomodulujące komórek WJ-MSC sprawdzono na podstawie dynamiki zmian markerów CD25 oraz CD69 na zaktywowanych limfocytach umieszczonych na insercie. Wczesna aktywacja na limfocytach Th (ryc. 35) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent Th CD69+CD25- zmniejszył się, tylko z WJ-MSC dawcy ALS628 nieznacznie się zwiększył. Właściwa aktywacja na limfocytach Th (ryc. 36) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent Th CD25+CD69+ zwiększył się, oprócz kohodowli z WJ-MSC linii ALS393, ALS558, ALS366, ALS432, ALS410, ALS414. Późna aktywacja na limfocytach Th (ryc. 37) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent Th CD69-CD25+ zwiększył się, z wyjątkiem kohodowli z liniami ALS613, ALS558, ALS502, ALS633. Limfocyty Th nieaktywowane (ryc. 38) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC większości dawców zwiększył się procent komórek Th nieaktywowanych, wyciszenie aktywacji przez WJ-MSC. Wczesna aktywacja na limfocytach Tc (ryc. 39) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent Tc CD69+CD25- zmniejszył się, z wyjątkiem linii ALS366. Właściwa aktywacja na limfocytach Tc (ryc. 40) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent Tc CD69+CD25+ zwiększył się, z wyjątkiem linii ALS558, ALS366, ALS397, ALS432. Późna aktywacja na limfocytach Tc (ryc. 41) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent Tc CD69-CD25+ zwiększył się, a w przypadku linii ALS558, ALS366, ALS397 i ALS432 zaobserwowano spadek. Limfocyty Tc nieaktywowane (ryc. 42) – w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zwiększył się procent komórek Tc nieaktywowanych, wyciszenie aktywacji przez WJ-MSC, z wyjątkiem ALS393, ALS439, ALS613, ALS628.



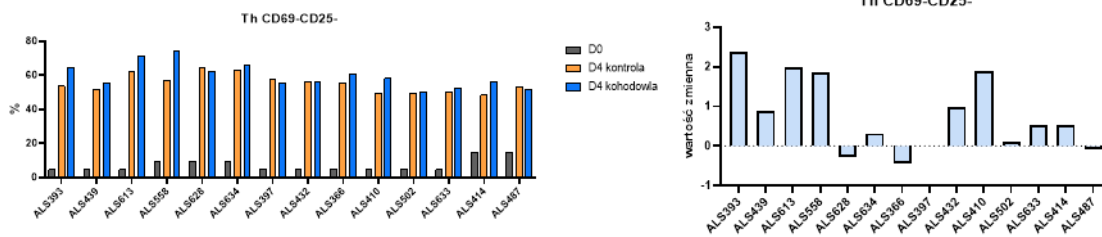
Ryc. 35. Ocena odsetka komórek dla aktywacji wczesnej na limfocytach Th (CD4+CD69+CD25-) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



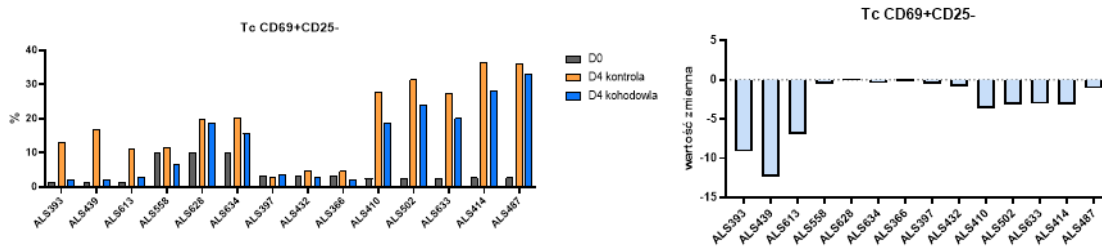
Ryc. 36. Ocena odsetka komórek dla aktywacji właściwej na limfocytach Th (CD4+CD69+CD25+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



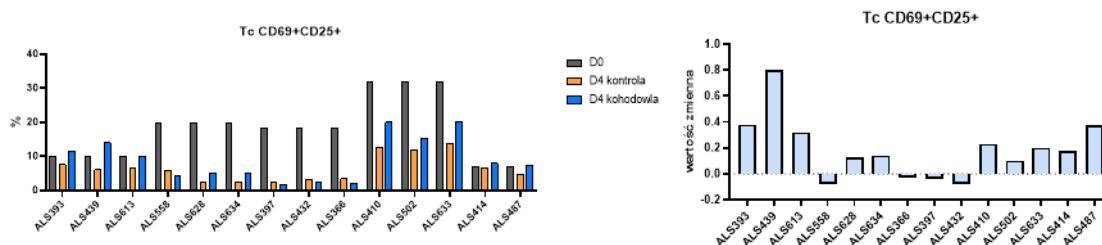
Ryc. 37. Ocena odsetka komórek dla aktywacji późnej na limfocytach Th (CD4+CD69-CD25+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



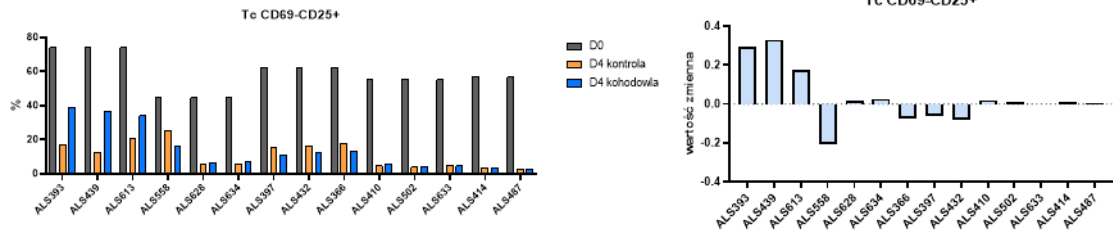
Ryc. 38. Ocena odsetka komórek nieaktywowanych na limfocytach Th (CD4+CD69-CD25-) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



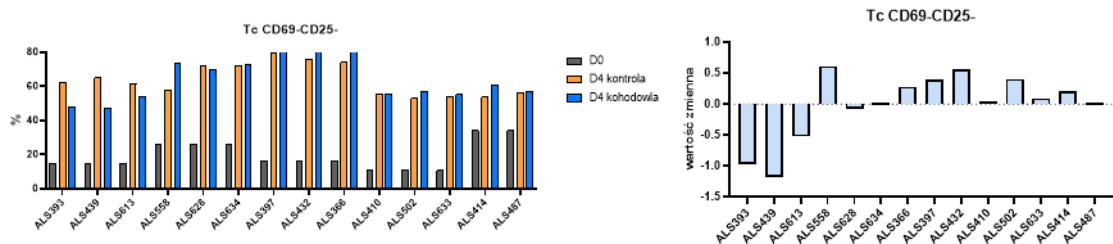
Ryc. 39. Ocena odsetka komórek dla aktywacji wczesnej na limfocytach Tc (CD8+CD69+CD25-) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



Ryc. 40. Ocena odsetka komórek dla aktywacji właściwej na limfocytach Tc (CD8+CD69+CD25+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



Ryc. 41. Ocena odsetka komórek dla aktywacji późnej na limfocytach Tc (CD8+CD69-CD25+) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC



Ryc. 42. Ocena odsetka komórek nieaktywowanych na limfocytach Tc (CD8+CD69-CD25-) pod wpływem kohodowli z komórkami WJ-MSC

Zmiany w ekspansji i fenotypie komórek MNC w kohodowli z WJ-MSC świadczą o immunomodulacji komórek MSC. Większe/mniejsze zdolności immunomodulacyjne są powiązane ze zmiennością biologiczną dawców MSC.

4.3. Klasteryzacja banku produktów WJ-MSC

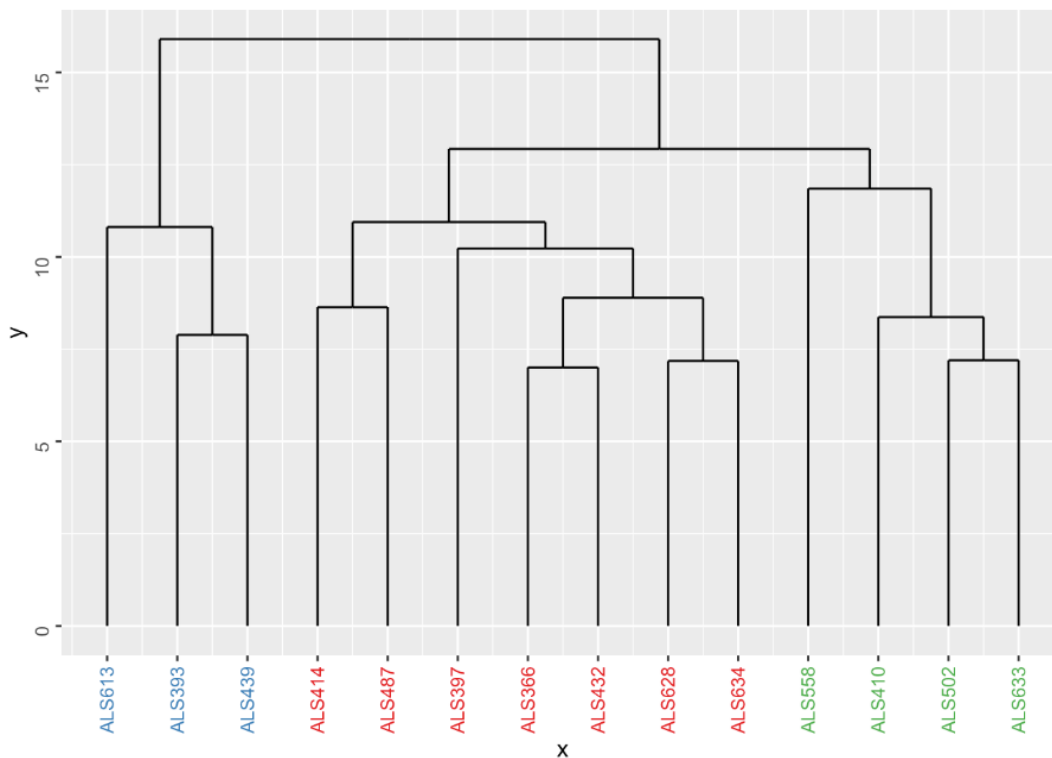
Klasteryzacja miała na celu wykorzystanie danych wygenerowanych na etapie szczegółowej charakterystyki banku WJ-MSC do nienadzorowanego podziału produktów komórkowych na podstawie ich biologicznych właściwości i aktywności. Przygotowana i zastosowana procedura statystyczna obejmowała dwa etapy. W pierwszym etapie przeprowadzono nienadzorowany podział na klastry. Kolejnym etapem było wyznaczenie krytycznych parametrów, na podstawie których następowała predykcja i przydzielenie analizowanych linii do poszczególnych klastrów. W pierwszym kroku część danych została przetworzona. Dla danych dotyczących fenotypu MNC (w doświadczeniach opartych na kohodowli) oraz ich liczby i żywotności wartości zmienne (parametrów) wyznaczono zgodnie ze wzorem:

$$\frac{D4\text{ KOHODOWLA} - D4\text{ KONTROLA}}{D_0}$$

natomiast w przypadku, gdy nie było dostępnej wartości D0, wyznaczana była różnica pomiędzy warunkami kohodowli a hodowlą kontrolną (MNC).

4.3.1. Etap I klasteryzacji produktów komórkowych WJ-MSC

W celu określenia klastrów terapeutycznych dla podziału komórek banku WJ-MSC zastosowano hierarchiczną analizę skupień (metoda 'complete'), której wynik zilustrowano na rycinie 43.



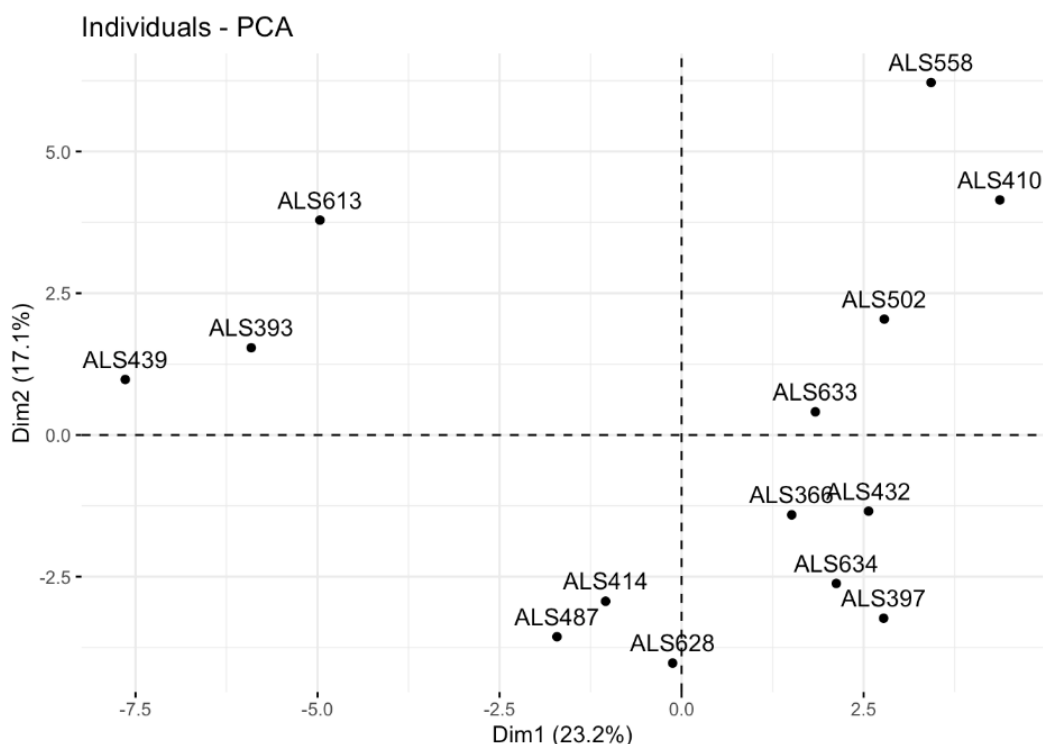
Ryc. 43. Hierarchiczna analiza skupień dla linii WJ-MSC

Wykazała ona, że na podstawie uzyskanych danych przeprowadzona nienadzorowana klasteryzacja umożliwia podział linii komórkowych/produktów na trzy klastry. Pod uwagę wzięto parametry otrzymane przy rozszerzonej charakterystyce komórek WJ-MSC, które pogrupowano następująco:

- nieklasyczny fenotyp WJ-MSC sprawdzający poziom markerów CD119(INF- γ), CD120b (TNF- α), CD274, CD273, CD200, CD72, CD39, HO-1;
- kohodowla – immunofenotyp MNC;
- kohodowla – liczba/żywołność MNC;
- procent komórek WJ-MSC tworzących kolonie – CFU;
- ocena ekspresji 12 genów z panelu oceniającego bezpieczeństwo;

f) profil wydzielniczy (sekretom) komórek WJ-MSC, m.in. HGF, IGF, BDNF, VEGF-A, RANTES, MCP-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, FGF-2, TGF- β -1/2/3.

W celu sprawdzenia otrzymanego podziału zastosowano analizę składowych głównych (ryc. 44).



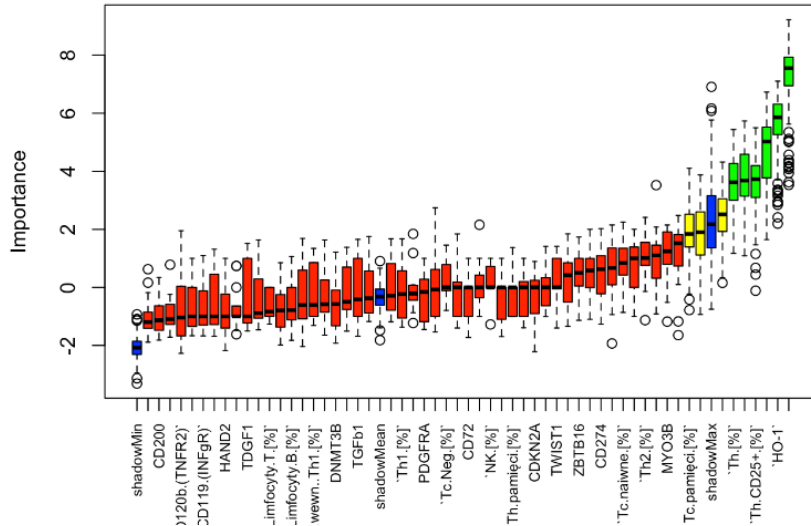
Ryc. 44. Analiza składowa linii WJ-MSC

Dane wejściowe do tego etapu przetworzono na macierz, której kolumny były kolejnymi zmiennymi (parametrami), natomiast w wierszach były próby (linie komórkowe WJ- MSC). Z macierzy tej wyznaczono macierz dystansów. Wynikiem tego etapu było przyporządkowanie każdej z prób do jednego z 3 klastrów (podziału prób na 3 subpopulacje), które zostały użyte w kolejnym etapie.

4.3.2. Etap II klasteryzacji produktów komórkowych WJ- MSC

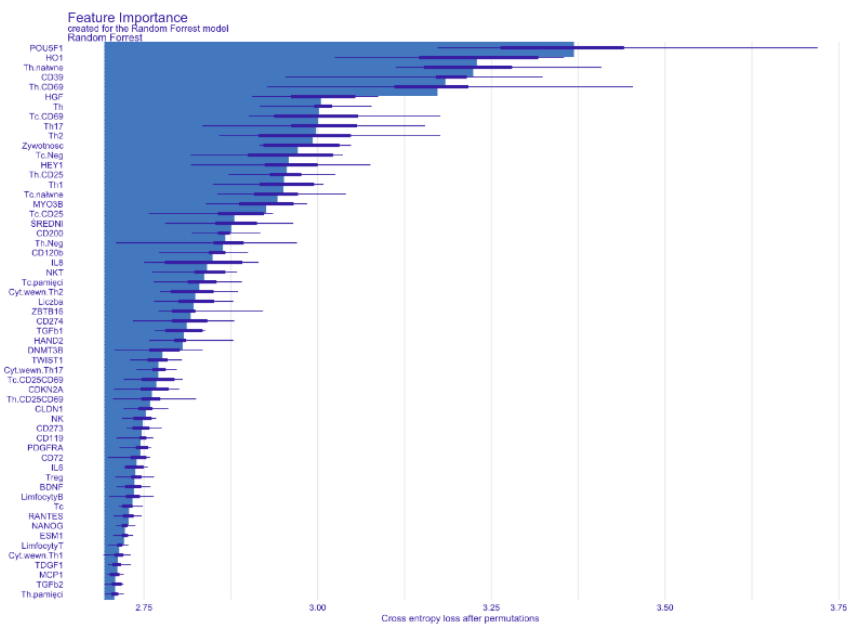
Tak jak w etapie pierwszym parametry zostały połączone w macierz o takich samych wymiarach. Każda próba została przyporządkowana do jednego z trzech klastrów. Efektem końcowym tego etapu był zestaw parametrów, które najlepiej przydzielały próby do określonego klastra. Przy zastosowaniu algorytmu Boruta w celu znalezienia istotnych parametrów [44], algorytm ten został użyty z klasyfikatorem lasów losowych dla znalezienia

ważności każdego parametru. W tym celu algorytm wyliczył miarę istotności parametrów na podstawie współczynników błędu klasyfikacji każdego parametru (ryc. 45).



Ryc. 45. Istotność parametrów linii WJ-MSC według algorytmu Boruta

Po wytypowaniu istotnych parametrów, aby zweryfikować otrzymane wyniki, zastosowano drugi algorytm do szukania istotnych parametrów – DALEX (ryc. 46) [45]. Został on użyty podobnie jak w przypadku algorytmu Boruta – wraz z klasyfikatorem lasów losowych. Wytypowanie parametrów wykonano za pomocą miary istotności parametrów opartej na funkcji straty tzw. entropii krzyżowej.

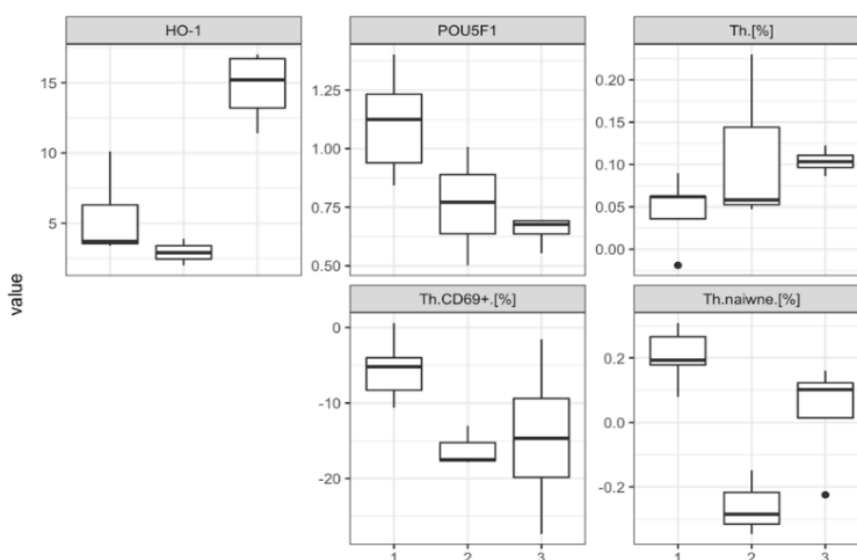


Ryc. 46. Istotność parametrów linii WJ-MSC według algorytmu DALEX

Tylko parametry, które okazały się istotne w obu algorytmach, wzięto do dalszych analiz, w których sprawdzono istotność korelacji pomiędzy wytypowanymi parametrami. Kolejny krok to wyłączenie ze zbioru tych parametrów istotnych, które były ze sobą mocno skorelowane. W ten sposób podniesiono efektywność procedury klasyfikacji i zmniejszono złożoność modelu. Bazując tylko na wytypowanych parametrach, sprawdzono, czy zastosowanie hierarchicznej analizy skupień potwierdzi ten sam podział na klastry, który otrzymano na początku eksperymentu przy użyciu wszystkich parametrów. Efektywność parametrów sprawdzono w procesie klasyfikacji, do którego użyto klasyfikatora ensemble [46], będącego złożeniem 3 klasyfikatorów: metody wektorów nośnych, lasów losowych oraz partycjonowania rekurencyjnego. Dla każdej linii komórkowej wzięto pod uwagę tylko wyselekcjonowane parametry:

- odsetek HO-1 na komórkach WJ-MSC;
- poziom ekspresji *POU5F1* (*OCT3/4*) dla komórek WJ-MSC;
- zmianę odsetka komórek Th pod wpływem kohodowli z WJ-MSC;
- zmianę odsetka komórek dla aktywacji wczesnej (*CD69+CD25-*) na komórkach Th pod wpływem kohodowli z WJ-MSC;
- zmianę odsetka komórek Th (naiwnych);

jako zbiór wejściowy dla klasyfikatora w celu predykcji, czy dana linia WJ-MSC należy do jednego z trzech wytypowanych wcześniej klastrów (ryc. 47).



Ryc. 47. Klasyfikacja linii WJ-MSC na podstawie istotnych 5 parametrów. Parametry: odsetek HO-1 na komórkach WJ-MSC; poziom ekspresji *POU5F1* (*OCT3/4*) dla komórek WJ-MSC; zmiana odsetka komórek Th pod wpływem kohodowli z WJ-MSC; zmiana odsetka komórek dla aktywacji wczesnej (*CD69+CD25-*) na komórkach Th pod wpływem kohodowli z WJ-MSC; zmiana odsetka komórek Th (naiwnych)

Podsumowując, wszystkie zebrane wyniki dla rozszerzonej charakterystyki banku produktów MSC od 14 różnych dawców/linii wniosły 58 różnych czynników, na których podstawie za pomocą metod statystycznych wykonano klasteryzację nienadzorowaną, której wynikiem był podział wszystkich linii na 3 klastry. Wynikiem końcowym tego etapu było podanie prawdopodobieństwa przynależenia linii komórkowej do danego klastra na podstawie 5 predyktorów. Ostatecznie wytypowano i scharakteryzowano 3 klastry:

KLASTER 1 (proregeneracyjny)

Charakteryzuje się równocześnie wysokim parametrem dla POU5F1 eksprymowanym przez komórki WJ-MSC, niskim odsetkiem Th na komórkach MNC w teście kohodowli, parametrem wysokim dodatnim obecności komórek o fenotypie Th naiwne dla komórek MNC w teście kohodowli oraz najniższym spadkiem odsetka markera CD69+CD25- na komórkach Th dla MNC w teście kohodowli.

KLASTER 2 (nadaktywny)

Charakteryzuje się niskim parametrem dla markera HO-1 na komórkach WJ-MSC, ujemnym parametrem dla parametru opartego na fenotypie Th naiwnym dla komórek MNC w teście kohodowli.

KLASTER 3 (antystresowy)

Charakteryzuje się wysokim parametrem dla markera HO-1 na komórkach WJ-MSC, niskim parametrem dla POU5F1 eksprymowanym przez komórki WJ-MSC oraz wysokim parametrem Th na komórkach MNC w teście kohodowli.

Przynależność danego produktu linii WJ-MSC przedstawia tabela 5. Linie WJ-MSC przyporządkowano według wyznaczonych pięciu parametrów.

Tabela 5. Klasteryzacja charakteryzowanych linii WJ-MSC

Linia WJ- MSC	HO-1	Th	POU5F1	Th naiwne	Th CD69+CD25-	KLASTER	Prawdopodobieństwo przynależności do klastra
ALS366	10,1	0,06	1,12	0,30	-10,6	1	0,98
ALS393	2,9	0,06	0,50	-0,15	-17,5	2	0,54
ALS397	3,5	0,04	1,40	0,08	-5,2	1	1
ALS410	16,6	0,11	0,55	0,11	-27,3	3	0,76
ALS414	3,4	0,09	1	0,17	-9,2	1	1
ALS432	6,1	0,04	0,88	0,31	-7,4	1	1
ALS439	2	0,05	0,77	-0,35	-17,8	2	0,6
ALS487	3,7	0,06	1,33	0,24	-5,2	1	1
ALS502	17	0,1	0,66	0,09	-12	3	0,75
ALS558	13,8	0,12	0,69	-0,22	-1,59	3	0,9
ALS613	3,9	0,23	1	-0,28	-13	1	0,84
ALS628	3,6	-0,2	1,14	0,19	0,59	1	0,99
ALS633	11,4	0,09	0,7	0,16	-17,3	3	0,63
ALS634	6,5	0,06	0,84	0,19	-2,8	1	1

4.4. Badanie kliniczne

Badanie kliniczne pod akronimem ALSTEM to badanie fazy I/II, jednoramienne, niezaślepienie, oceniające bezpieczeństwo podania BPL opartego na mezenchymalnych komórkach stromalnych wyizolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC) do płynu mózgowo-rdzeniowego dla 20 pacjentów z rozpoznaniem stwardnienia zanikowego bocznego. Badany produkt leczniczy nie jest dopuszczony do stosowania w Unii Europejskiej ani w innych krajach. PBKM uzyskał wymagane przez regulatorów zgody oraz opinie niezbędne do formalnego rozpoczęcia badania klinicznego, tj. zgodę Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPL). URPL wydał decyzję dotyczącą pozwolenia na prowadzenie badania klinicznego pt. Ocena wpływu komórek macierzystych galarety Whartona (WJMSCs) na układ immunologiczny pacjentów z rozpoznaniem stwardnienia bocznego zanikowego (ALS) – decyzja nr UR/DBL/D.158/20. Badanie prowadzono w ośrodku wyłonionym poprzez przetarg – w JST sp. z o.o. z siedzibą w Częstochowie. Projekt był realizowany na podstawie pozwolenia na prowadzenie badań klinicznych o unikatowym numerze EudraCT: 2018-004171-12.

4.4.1. Pacjenci ze stwardnieniem zanikowym bocznym w badaniu klinicznym ALSTEM

Wizytę 1, kwalifikacyjną, odbyło 26 pacjentów, do etapu wizyty 4 (pierwsze podanie BPL) zakwalifikowano 20 pacjentów. Po pierwszym podaniu BPL z uczestnictwa w dalszych procedurach zrezygnował jeden pacjent. Ostateczna grupa pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM to 19 osób i dla tej grupy przedstawiono wyniki oraz ich statystykę. Podstawowe informacje dotyczące grupy pacjentów, którzy przeszli wszystkie wymagane procedury i odbyli siedem wizyt oraz mieli zdiagnozowaną postać ALS opuszkową lub kończynową, a także wyrazili świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu klinicznym ALSTEM, zawarto w tabeli poniżej (tabela 6).

Tabela 6. Zestawienie pacjentów badania klinicznego ALSTEM, którzy otrzymali BPL

Unikatowy numer pacjenta	Rozpoznanie ALS	Wiek (podczas wizyty 1)	Płeć
ALSTEM_01_002	kończynowa	48	kobieta
ALSTEM_01_004	opuszkowa	48	kobieta
ALSTEM_01_005	kończynowa	71	mężczyzna
ALSTEM_01_006	kończynowa	60	mężczyzna
ALSTEM_01_007	kończynowa	58	mężczyzna
ALSTEM_01_008	kończynowa	58	mężczyzna
ALSTEM_01_009	opuszkowa	69	kobieta
ALSTEM_01_010	opuszkowa	52	kobieta
ALSTEM_01_011	kończynowa	77	mężczyzna
ALSTEM_01_012	opuszkowa	60	kobieta
ALSTEM_01_013	kończynowa	58	mężczyzna
ALSTEM_01_014	opuszkowa	66	kobieta
ALSTEM_01_016	kończynowa	62	mężczyzna
ALSTEM_01_018	kończynowa	45	kobieta
ALSTEM_01_019	kończynowa	75	kobieta
ALSTEM_01_022	kończynowa	61	mężczyzna
ALSTEM_01_023	opuszkowa	64	mężczyzna
ALSTEM_01_025	opuszkowa	41	kobieta
ALSTEM_01_026	opuszkowa	66	kobieta

Skala ALSFRS-R uważana jest za złoty standard stosowany do pomiaru postępu choroby ALS, a także odpowiedzi na nowe leki i terapie. W przypadku badania klinicznego ALSTEM pomiar skali ALSFRS-R odbywał się na każdej wizycie 1–7, a w trakcie wizyt 4–6 nawet dwukrotnie, przed podaniem i po podaniu BPL. Aby móc wykorzystać całą informację

zawartą w punktacji w okresie przed podaniem BPL i po podaniach oraz określić efektywność leczenia, posłużono się teorią związaną z regresją liniową dla szeregów czasowych. Dla każdej zmiennej (wizyty 1–7) został wyliczony współczynnik trendu w przedziale czasowym. Współczynnik trendu mówi o zmiennej wartości w jednostce czasu (miesiąc). Współczynnik trendu skali ALSFRS-R wyodrębnił trzy grupy, które opisano następująco:

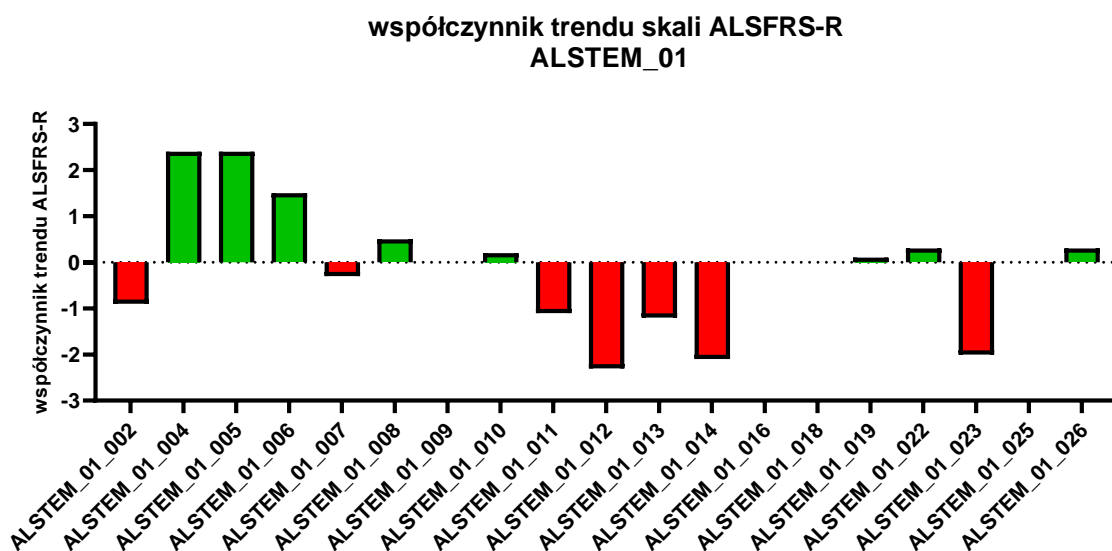
- **RESPONDER** – wartość współczynnika ALSFRS-R > 0 , wskazuje pozytywny wpływ leczenia;
- **NULL** – wartość współczynnika ALSFRS-R $= 0$, wskazuje neutralny wpływ leczenia;
- **NON-RESPONDER** – wartość współczynnika ALSFRS-R < 0 , wskazuje brak odpowiedzi na leczenie.

Podział pacjentów na podstawie współczynnika trendu skali ALSFRS-R zawarto w tabeli 7.

Tabela 7. Podział pacjentów na grupy ze względu na odpowiedź terapeutyczną na podstawie współczynnika trendu skali ALSFRS-R. Grupa responder – współczynnik > 0 ; grupa non-responder – współczynnik < 0 ; grupa null – współczynnik $= 0$

Unikatowy numer pacjenta	Współczynnik trendu ALSFRS-R	Grupa
ALSTEM_01_002	-0,9	non-responder
ALSTEM_01_004	2,4	responder
ALSTEM_01_005	2,4	responder
ALSTEM_01_006	1,5	responder
ALSTEM_01_007	-0,3	non-responder
ALSTEM_01_008	0,5	responder
ALSTEM_01_009	0,0	null
ALSTEM_01_010	0,2	responder
ALSTEM_01_011	-1,1	non-responder
ALSTEM_01_012	-2,3	non-responder
ALSTEM_01_013	-1,2	non-responder
ALSTEM_01_014	-2,1	non-responder
ALSTEM_01_016	0,0	null
ALSTEM_01_018	0,0	null
ALSTEM_01_019	0,1	responder
ALSTEM_01_022	0,3	responder
ALSTEM_01_023	-2,0	non-responder
ALSTEM_01_025	0,0	null
ALSTEM_01_026	0,3	responder

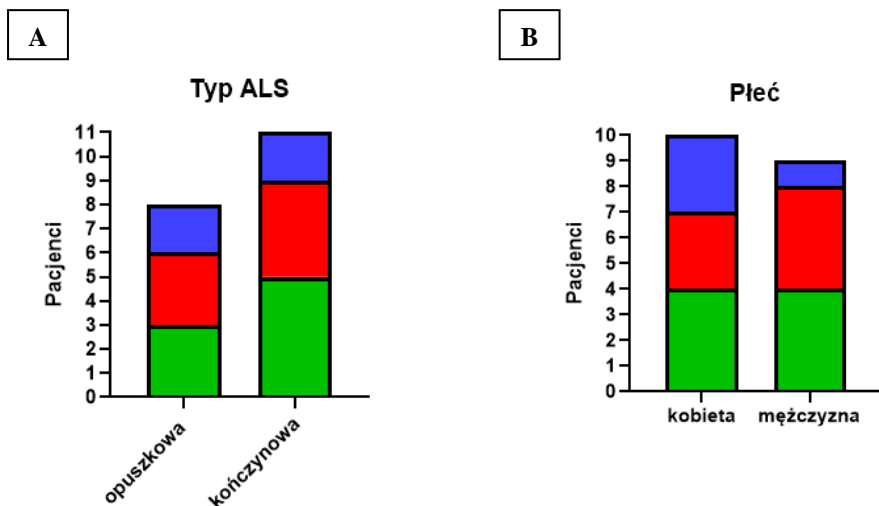
Według współczynnika trendu skali ALSFRS-R, który bierze pod uwagę wartości punktacji skali ze wszystkich przedziałów czasowych podczas wizyt 1–7, wyróżniono 8 pacjentów, którzy zareagowali na terapię komórkami WJ-MSC w sposób pozytywny (grupa responder, kolor zielony), 7 pacjentów, którzy nie wykazali reakcji (non-responder, kolor czerwony) oraz 4 pacjentów z reakcją neutralną (null) (ryc. 48).



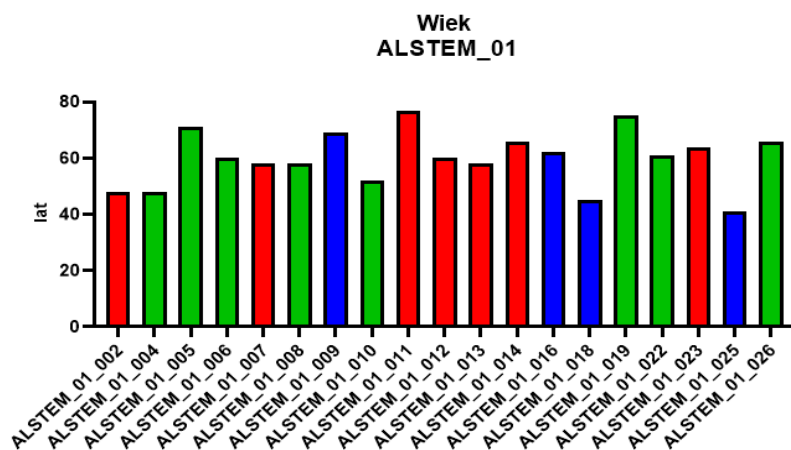
Ryc. 48. Współczynnik trendu skali ALSFRS-R dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. Grupa responder – współczynnik skali ALSFRS-R > 0 (kolor zielony); grupa non-responder – współczynnik skali ALSFRS-R < 0 (kolor czerwony); grupa null – współczynnik skali ALSFRS-R = 0

Dalsze wyniki wraz ze statystyką zostały przedstawione z uwzględnieniem podziału na grupy **responder**, **non-responder**, **null**, biorące pod uwagę odpowiedź na terapię komórkową.

Wśród grupy 19 pacjentów można wyróżnić 8 z postacią opuszkową oraz 11 pacjentów mających postać ALS kończynową. W grupie responder 3 pacjentów miało postać opuszkową, a 5 kończynową. Bez odpowiedzi na terapię było 3 pacjentów z postacią opuszkową oraz 4 z kończynową (ryc. 49 [A]). W badaniu uczestniczyło 10 kobiet i 9 mężczyzn. W grupie responder na terapię odpowiedziały 4 kobiety i 4 mężczyźni. Grupa non-responder obejmowała 3 kobiety oraz 4 mężczyzn. W grupie null były 3 kobiety i 1 mężczyzna (ryc. 49 [B]).

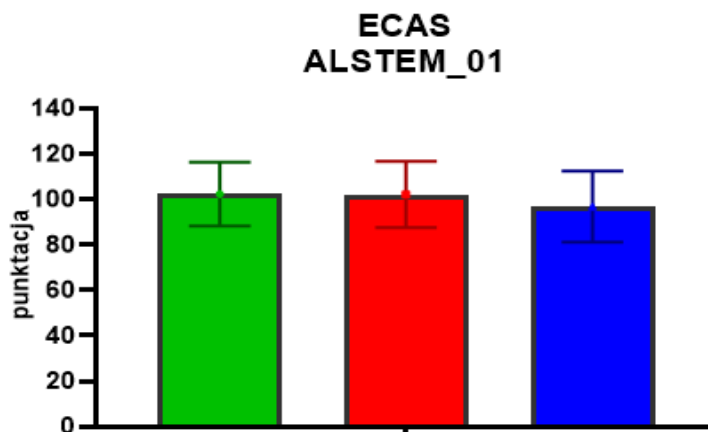


Ryc. 49. Podział pacjentów ze względu na [A] typ ALS (postać opuszkowa lub kończynowa) oraz [B] wiek pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. Podział uwzględnia rozdział na grupę responder (kolor zielony), grupę non-responder (kolor czerwony) i grupę null (kolor niebieski)



Ryc. 50. Wiek pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM, którzy otrzymali BPL. Podział uwzględnia rozdział na grupę responder (kolor zielony), grupę non-responder (kolor czerwony) i grupę null (kolor niebieski)

Średnia wieku pacjentów we wszystkich grupach była zbliżona i wynosiła ok. 60 lat. Najmłodszy pacjent miał 41 lat, a najstarszy 77. Wywiad dotyczący wieku zebrano podczas wizyty 1 (ryc. 50). Nie zaobserwowano istotnej zależności związanej z wiekiem wśród odpowiedzi na terapię komórkową BPL.

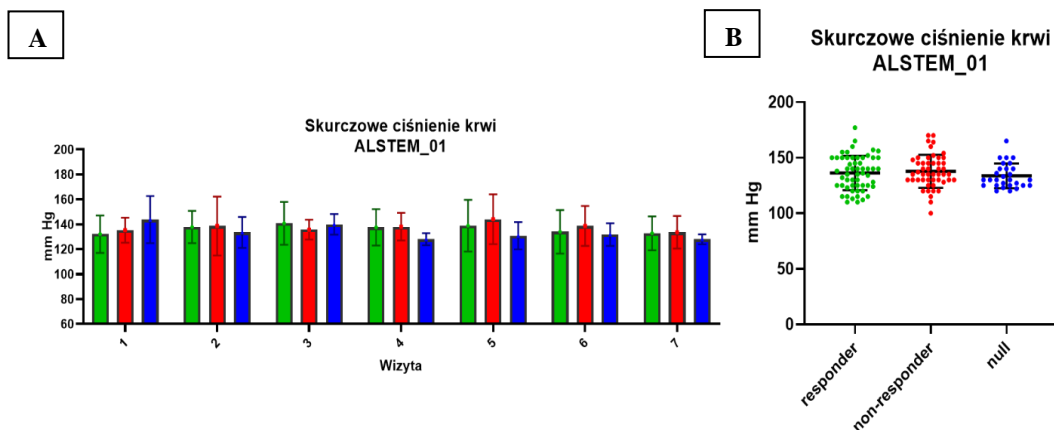


Ryc. 51. Punkcja skali ECAS w badaniu klinicznym ALSTEM. Podział uwzględnia rozdział na grupy terapeutyczne: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnej grupy terapeutycznej z wizyty 1. Brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

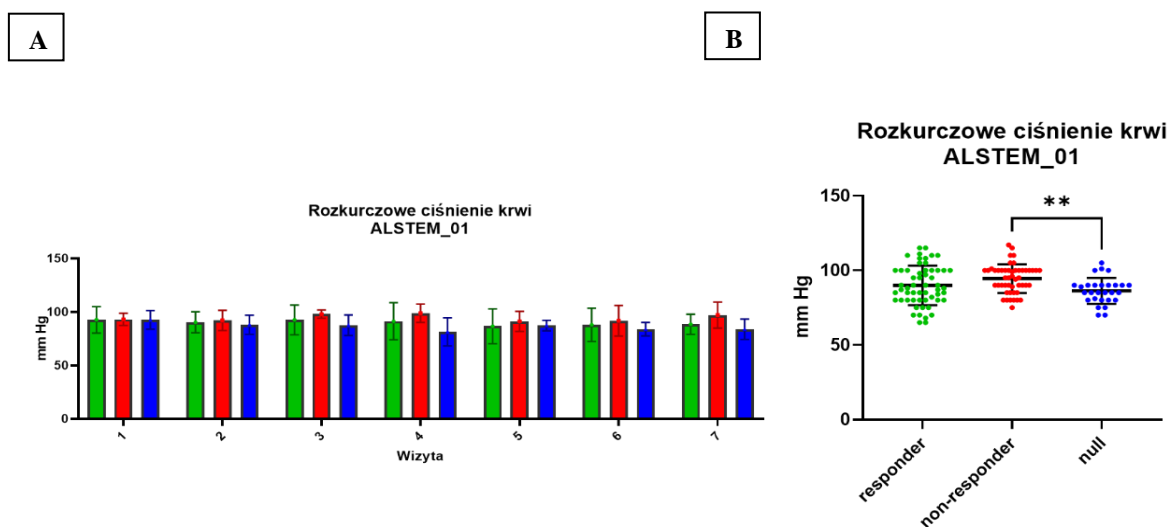
Skala ECAS ocenia przesiewowo różne obszary funkcjonowania poznawczego, takie jak pamięć, mowa czy funkcje wzrokowo-przestrzenne. Skala ta również nie wykazała istotnych zmian wśród wyodrębnionych grup pacjentów, jak i czasem obserwacji (ryc. 51).

4.4.2. Rozkład podstawowych parametrów życiowych podczas obserwacji pacjentów

W okresie obserwacji nie odnotowano statystycznie istotnych zmian w parametrach życiowych, takich jak ciśnienie tętnicze (skurczowe i rozkurczowe) czy tętno między grupami pacjentów, jak również między wizytami. Dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM pomiar ciśnienia krwi nie wykazał istotnych statystycznie zmian w przypadku ciśnienia skurczowego (ryc. 52 [A]) i rozkurczowego (ryc. 53 [A]) między grupami pacjentów a ich poszczególnymi wizytami. Na przestrzeni wszystkich 7 wizyt średnio skurczowe ciśnienie krwi wynosiło dla grupy responder $136 \pm 15,5$ mmHg, non-responder: $138 \pm 14,8$ mmHg, null: $134 \pm 11,1$ mmHg (ryc. 52 [B]), a rozkurczowe odpowiednio $90 \pm 13,3$ mmHg, $95 \pm 9,5$ mmHg i $86 \pm 8,7$ mmHg. Ciśnienie rozkurczowe dla grupy non-responder było istotnie wyższe niż w grupie null ($p < 0,01$) (ryc. 53 [B]).

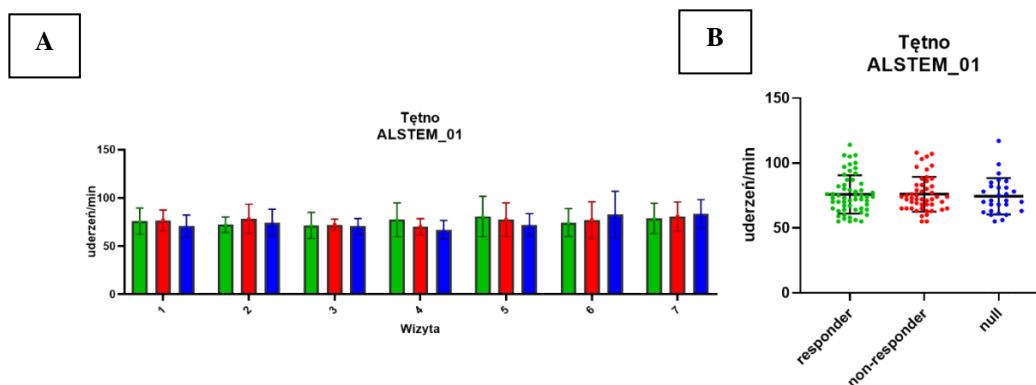


Ryc. 52. Wartości skurczowe ciśnienia krwi dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. [A] Średnie wartości skurczowego ciśnienia krwi [mmHg] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości skurczowego ciśnienia krwi [mmHg] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



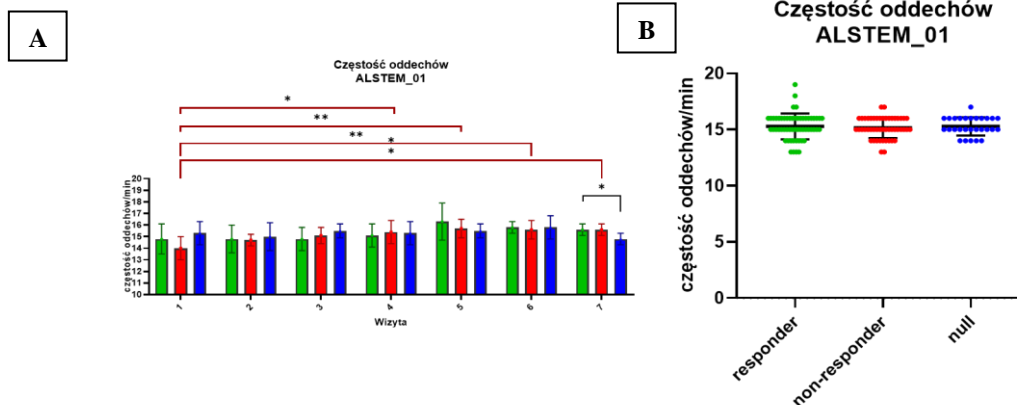
Ryc. 53. Wartości rozkurczowe ciśnienia krwi dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. [A] Średnie wartości rozkurczowego ciśnienia krwi [mmHg] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości rozkurczowego ciśnienia krwi [mmHg] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony), grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$

Tętno pacjentów ALSTEM nie wykazało istotnych różnic pod względem odpowiedzi na terapię (ryc. 54 [A]), a ich średni pomiar to: grupa responder: 76 ± 15 uderzeń/min, grupa non-responder: 76 ± 13 uderzeń/min, grupa null: 74 ± 14 uderzeń/min (ryc. 54 [B]).



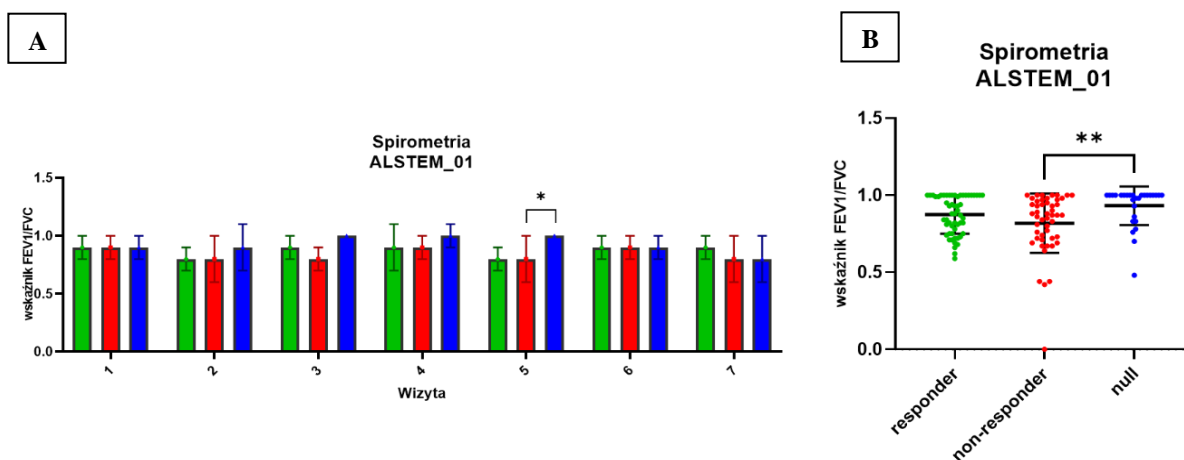
Ryc. 54. Wartości tętna dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. [A] Średnie wartości tętna [uderzeń/min] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości tętna [uderzeń/min] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

W przypadku grupy osób niereagujących na produkt leczniczy (non-responder) odnotowano istotną statystycznie różnicę w częstości oddechów, gdzie liczba oddechów na minutę wzrastała między wizytą 1 (14 ± 1) a wizytą 4 (15 ± 1) ($p < 0,05$) oraz wizytą 5 (16 ± 1) ($p < 0,01$), wizytą 6 (16 ± 1) ($p < 0,01$) i wizytą 7 (16 ± 1) ($p < 0,01$). Podczas wizyty 7 dodatkowo częstość oddechów była również wyższa w grupie responder (16 ± 1) w porównaniu z grupą null (15 ± 1) ($p < 0,05$) (ryc. 55 [A]). Średnia częstość oddechów dla wszystkich grup wynosiła 15 ± 1 (ryc. 55 [B]). W zakresie wyników ze spirometrii stwierdzono wzrost wskaźnika FEV1/FVC w grupie null (97 ± 2) w porównaniu z grupą non-responder (96 ± 1) ($p < 0,05$) podczas pomiaru w czasie wizyty 7, przy jednoczesnym braku zmian wskaźnika między grupami pacjentów czy pozostałymi wizytami (ryc. 56 [A]). Wyższą średnią FEV1/FVC odnotowano w grupie null ($0,93 \pm 0,12$) w porównaniu z grupą non-responder ($0,8 \pm 0,18$) ($p < 0,01$). W grupie responder średni wskaźnik FEV1/FVC wyniósł $0,87 \pm 0,12$ (ryc. 56 [B]).



Ryc. 55. Częstość oddechów mierzona na minutę dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM.

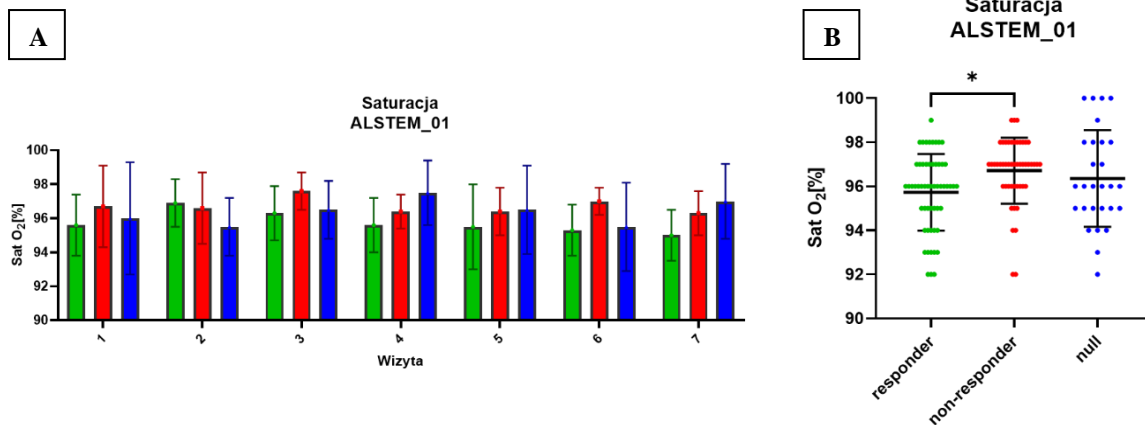
[A] Średnie wartości częstości oddechów na minutę w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; *p < 0,05, **p < 0,01. [B] Średnie wartości częstości oddechów na minutę w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)



Ryc. 56. Wynik spirometrii dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM.

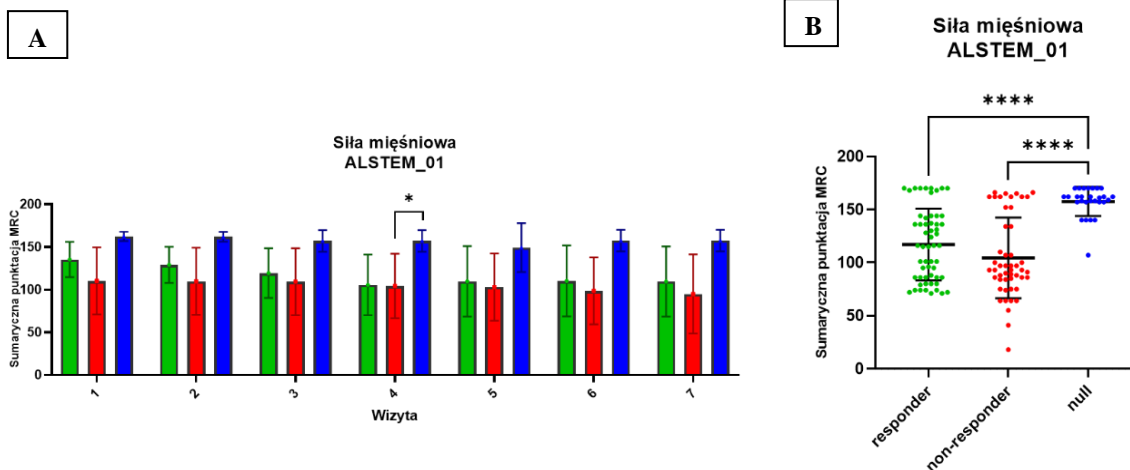
[A] Średnie wartości spirometrii (wskaźnik FEV1/FVC) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; *p < 0,05. [B] Średnie wartości spirometrii (wskaźnik FEV1/FVC) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** p < 0,01

Pomiary saturacji nie wykazały istotnych zmian między grupami pacjentów oraz czasem obserwacji (ryc. 57 [A]). W tym przypadku średnia saturacja utrzymywała się na poziomie $95,7 \pm 1,7\%$ w grupie responder, $96,7 \pm 1,5\%$ w grupie non-responder i $96,4 \pm 2,2\%$ w grupie null, gdzie wynik okazał się istotny statystycznie między grupą responder a non-responder ($p < 0,05$) (ryc. 57 [B]).



Ryc. 57. Wartości saturacji dla pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. [A] Średnie wartości saturacji [%] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości saturacji [%] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

Siła mięśni była mierzona na podstawie skali MRC, dla której im większa punktacja, tym większa siła mięśni. W badaniu ALSTEM podczas wizyty 4 zaobserwowano wyższy parametr oceniający siłę mięśniową w grupie null (157 ± 13) w porównaniu z grupą non-responder (104 ± 38) ($p < 0,05$) (ryc. 58 [A]). Najniższa sumaryczna punktacja ze wszystkich pomiarów wystąpiła w grupie non-responder (104 ± 38), a najwyższa w grupie null (158 ± 14), w przypadku grupy responder wyniosła 117 ± 34 . Dla grupy null odnotowano istotnie większą sumarycznie punktację dla skali MRC w porównaniu z grupami responder ($p < 0,0001$) i non-responder ($p < 0,0001$) (ryc. 58 [B]).

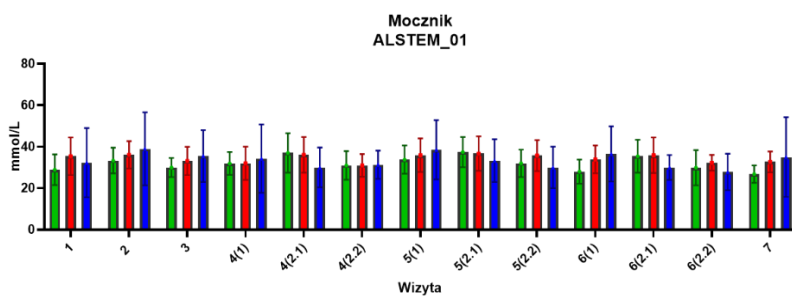
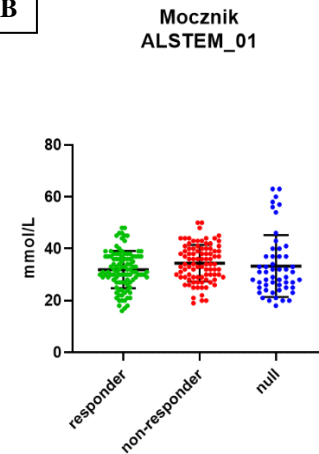


Ryc. 58. Sumaryczna punktacja skali MRC dla pomiaru siły mięśniowej pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM. [A] Średnie wartości punktacji MRC w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości punktacji MRC w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; **** p < 0,0001

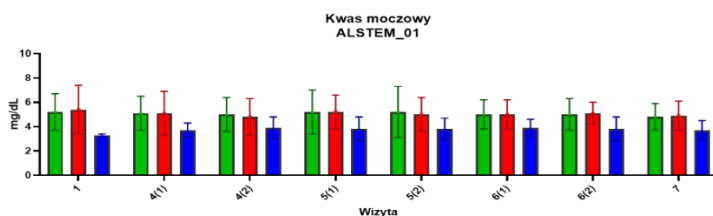
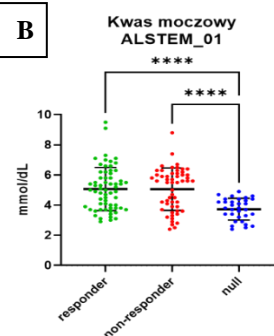
4.4.3. Rozkład parametrów biochemicznych krwi podczas obserwacji pacjentów ALSTEM

W czasie obserwacji parametrów biochemicznych we krwi obwodowej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dotyczących zmian w stężeniu mocznika (ryc. 59 [A]) i kwasu moczowego (ryc. 60 [A]) w trakcie poszczególnych wizyt. Nie zaobserwowano istotnych różnic dla średnich wartości wśród grup w czasie całego okresu obserwacji stężenia mocznika we krwi, które dla grupy responder wyniosło $33,1 \pm 8,4$ mmol/l, dla grupy non-responder: $34 \pm 9,1$ mmol/l, dla grupy null: $33,3 \pm 11,9$ mmol/l (ryc. 59 [B]).

W przypadku pacjentów ALSTEM średnie stężenie kwasu moczowego w ciągu wszystkich wizyt było najniższe w grupie null: $3,7 \pm 0,7$ mg/dl, kolejno w grupie responder: $4,8 \pm 1,4$ mg/dl i grupie non-responder: $4,6 \pm 1,4$ mg/dl. Niższe stężenie kwasu moczowego w grupie null było istotne statystycznie w porównaniu z grupami responder (p < 0,0001) i non-responder (p < 0,0001) (ryc. 60 [B]).

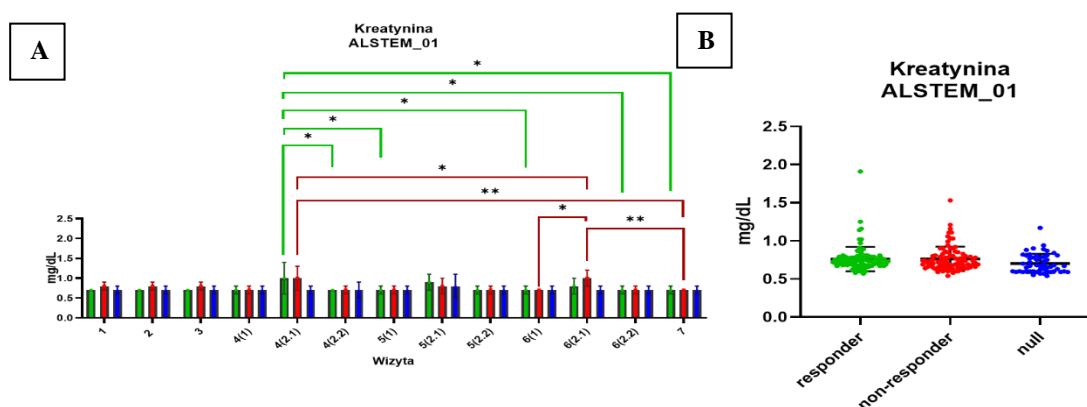
A**B**

Ryc. 59. Wartość mocznika we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości mocznika [mmol/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości mocznika [mmol/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; * $p < 0,05$

A**B**

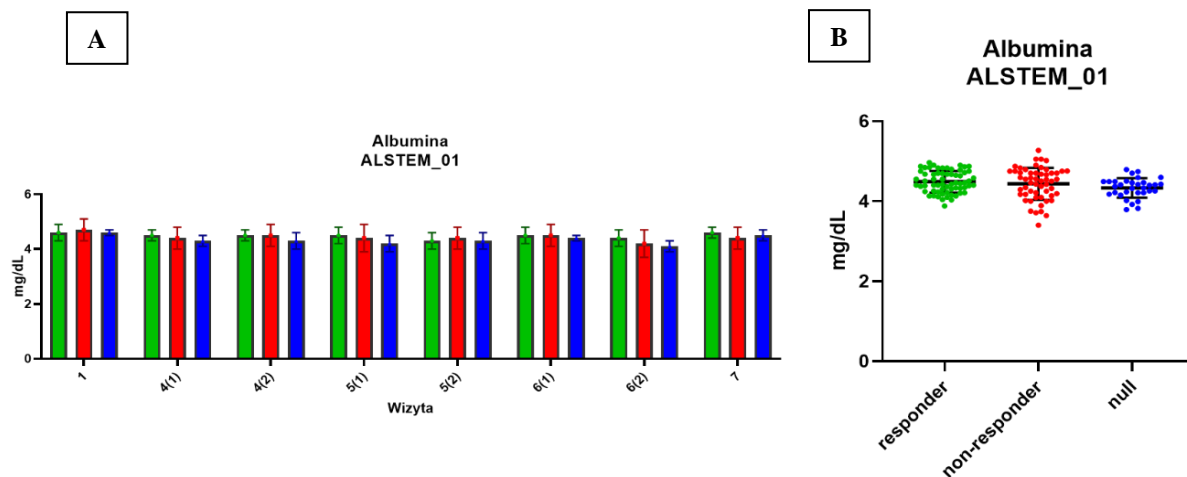
Ryc. 60. Wartość kwasu moczowego w krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości kwasu moczowego [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości kwasu moczowego [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; **** $p < 0,0001$

Wśród wyników pomiaru kreatyniny zaobserwowano zmiany po podaniu BPL. Zmiana widoczna jest dla grupy responder i non-responder od wizyty 4(2.1) po podaniu pierwszej dawki produktu do wizyty 7. W grupie responder stężenie kreatyniny ($0,7 \pm 0,05$ mg/dl) we krwi obniżyło się następnego dnia po podaniu pierwszej dawki produktu komórkowego WJ-MSC w porównaniu z wynikiem we krwi pobranej po podaniu BPL ($0,97 \pm 0,4$ mg/dl) ($p < 0,05$). W grupie responder również podczas wszystkich trzech pobrań w czasie wizyty 6 (podanie 3 – ostatniej dawki BPL) oraz wizyty 7 (kontrolna – bez podania BPL) poziom kreatyniny był niższy niż wynik uzyskany na wizycie 4(2.1), czyli $0,97 \pm 0,4$ mg/dl. W grupie pacjentów non-responder zaobserwowano najwyższy poziom kreatyniny po pierwszym podaniu BPL – wizyta 4(2.1) ($0,95 \pm 0,3$ mg/dl), który następnie obniżył się na wizycie 7 ($0,65 \pm 0,05$) ($p < 0,01$) (ryc. 61 [A]). Jeśli jednak spojrzymy na ogólny średni poziom kreatyniny wśród grup, to brak jest istotnych różnic i pomiary wyglądają następująco: w grupie responder: $0,75 \pm 0,15$ mg/dl, grupie non-responder: $0,74 \pm 0,15$ mg/dl i grupie null: $0,7 \pm 0,13$ mg/dl (ryc. 61 [B]).

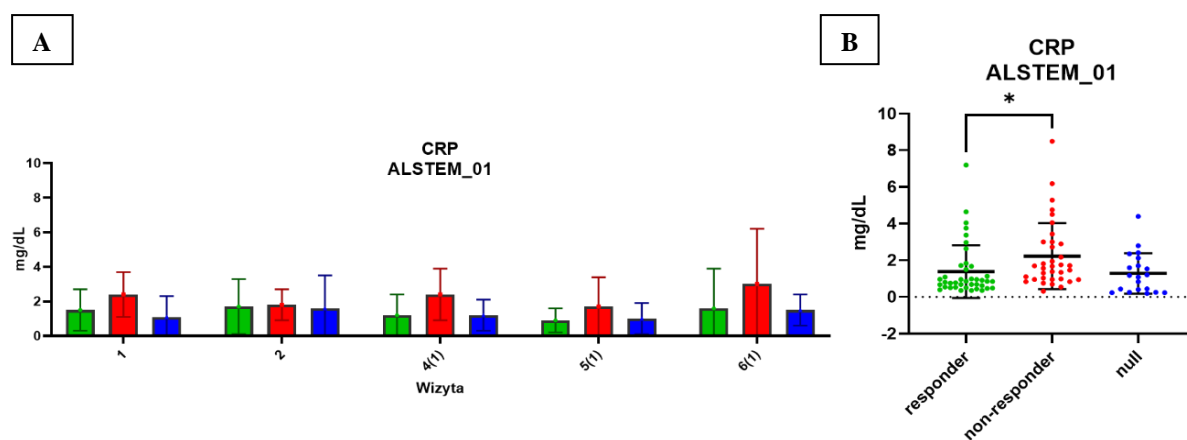


Ryc. 61. Wartość kreatyniny we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości kreatyniny [mg/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości kreatyniny [mg/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

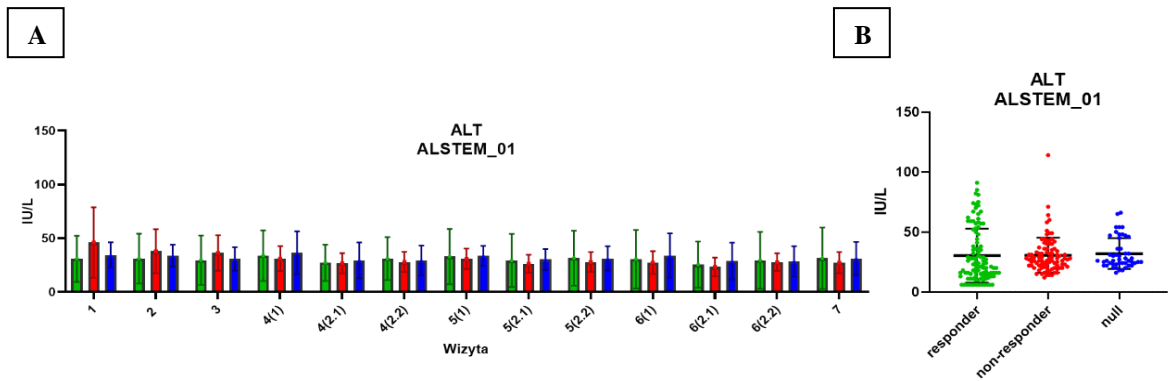
Nie zaobserwowano zmian w zawartości albuminy (ryc. 62 [A]), CRP (ryc. 63 [A]) czy aktywności ALT (ryc. 64 [A]), AST (ryc. 65 [A]), GGTP (ryc. 66 [A]) czy kinazy kreatynowej (ryc. 67 [A]) w osoczu krwi przez cały okres obserwacji, zarówno między trzema grupami pacjentów, jak i między pojedynczymi wizytami. Statystyka dla zebranych wyników z całego okresu obserwacji w obrębie grup charakteryzujących odpowiedź na terapię nie wykazała istotnych różnic dla poziomu albuminy (responder: $4,44 \pm 0,32$ mg/dl, non-responder: $4,44 \pm 0,35$ mg/dl, null: $4,33 \pm 0,25$ mg/dl) (ryc. 62 [B]) ani ALT (responder: $30,32 \pm 22,51$ IU/l, non-responder: $30,58 \pm 14,67$ IU/l, null: $31,98 \pm 12,84$ IU/l) (ryc. 64 [B]). Parametr CRP był wyższy w grupie non-responder ($2,23 \pm 1,8$ mg/dl) w porównaniu z grupą responder ($1,38 \pm 1,44$ mg/dl) ($p < 0,05$), a w grupie null był na poziomie $1,28 \pm 1,11$ mg/dl (ryc. 63 [B]). Enzym wątrobowy AST był podwyższony w grupie null ($32,48 \pm 8,84$ IU/l) w porównaniu z grupami responder ($27,17 \pm 11,14$ IU/l) ($p < 0,05$) i non-responder ($27,53 \pm 13,11$ IU/l) ($p < 0,05$) (ryc. 65 [B]). Wyższą aktywność gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP) zaobserwowano w grupie non-responder ($36,5 \pm 39,16$ mg/dl) w porównaniu z grupą responder ($24,21 \pm 9,87$ mg/dl) ($p < 0,01$). W grupie null wartość wyniosła $30,37 \pm 26,13$ mg/dl (ryc. 66 [B]). Wykazano również podwyższony poziom kinazy kreatynowej w grupie null (323 ± 232 IU/l) w porównaniu z pozostałymi obiema grupami, czyli grupą responder (231 ± 187 IU/l) ($p < 0,01$) i grupą non-responder (189 ± 127 IU/l) ($p < 0,0001$) (ryc. 67 [B]).



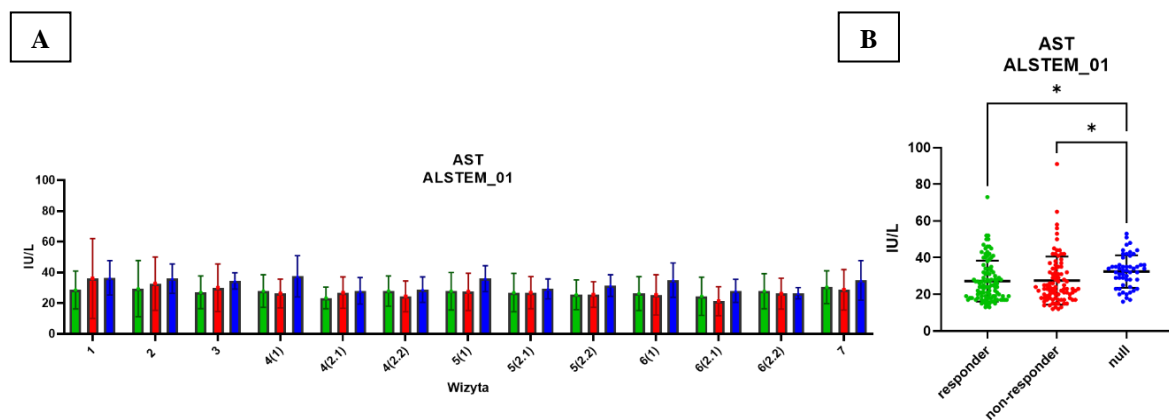
Ryc. 62. Wartość albuminy we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości albuminy [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości kreatyniny [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



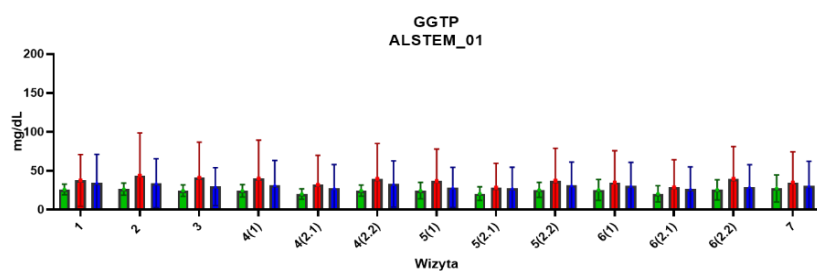
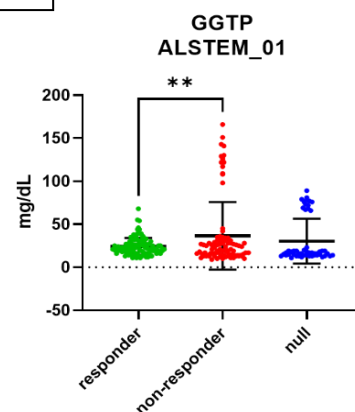
Ryc. 63. Wartość CRP we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości CRP [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości CRP [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$



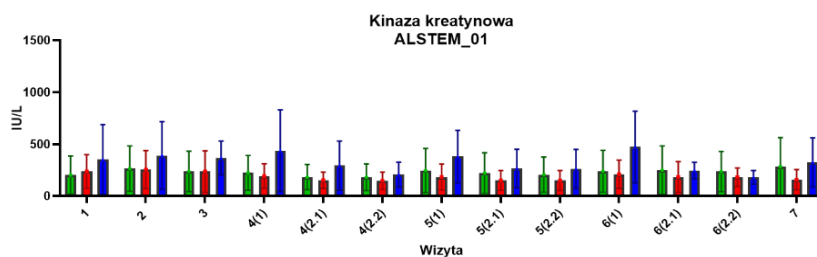
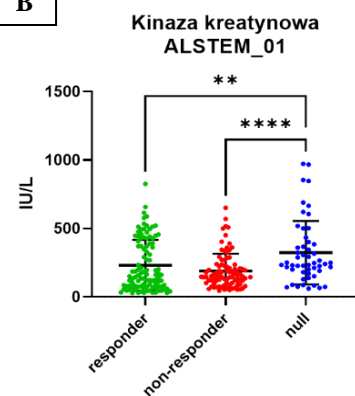
Ryc. 64. Wartość ALT we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości ALT [IU/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości ALT [IU/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



Ryc. 65. Wartość AST we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości AST [IU/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości AST [IU/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

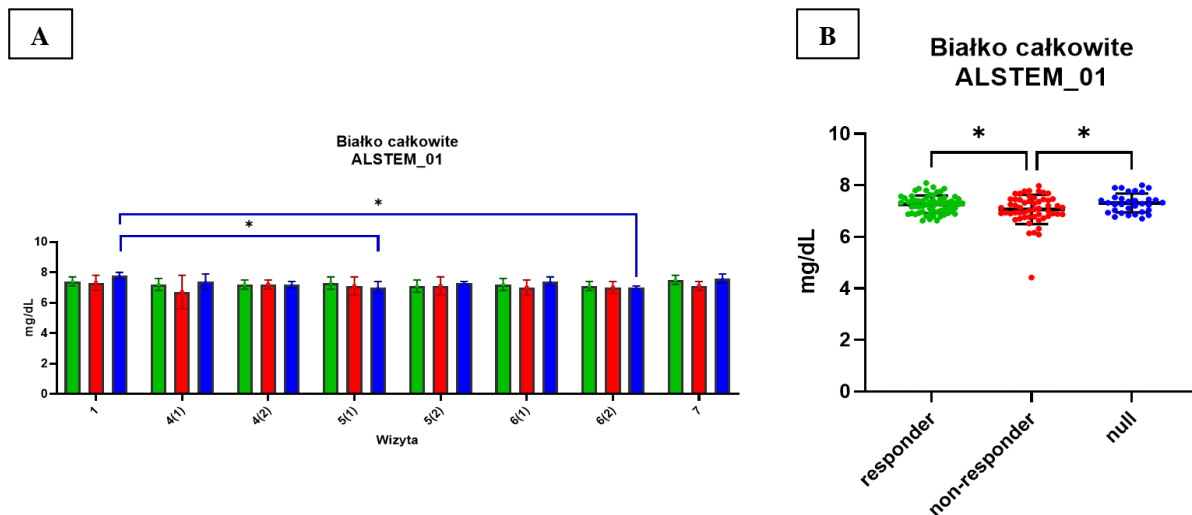
A**B**

Ryc. 66. Wartość GGTP we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości GGTP [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości GGTP [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$

A**B**

Ryc. 67. Wartość kinazy kreatynowej we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości kinazy kreatynowej [IU/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości kinazy kreatynowej [IU/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

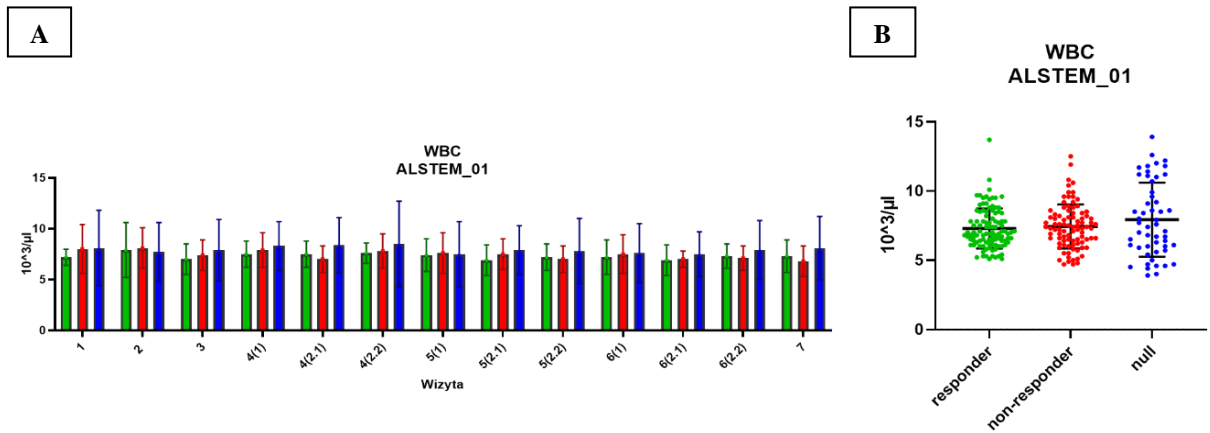
Poziom białka całkowitego w osoczu obniżył się w grupie null zarówno miesiąc po pierwszym podaniu ($6,98 \pm 0,38$ mg/dl), jak i po trzecim podaniu WJ-MSC ($6,98 \pm 0,06$ mg/dl) w porównaniu z wynikiem z wizyty 1 – kwalifikacyjnej ($7,75 \pm 0,23$ mg/dl) ($p < 0,05$) (ryc. 68 [A]). Średnie wyniki ze wszystkich wizyt wykazały najniższą wartość w grupie non-responder ($7,1 \pm 0,6$ mg/dl) w porównaniu z grupami responder ($7,3 \pm 0,3$ mg/dl) i non-responder ($7,1 \pm 0,6$ mg/dl) ($p < 0,05$) (ryc. 68 [B]).



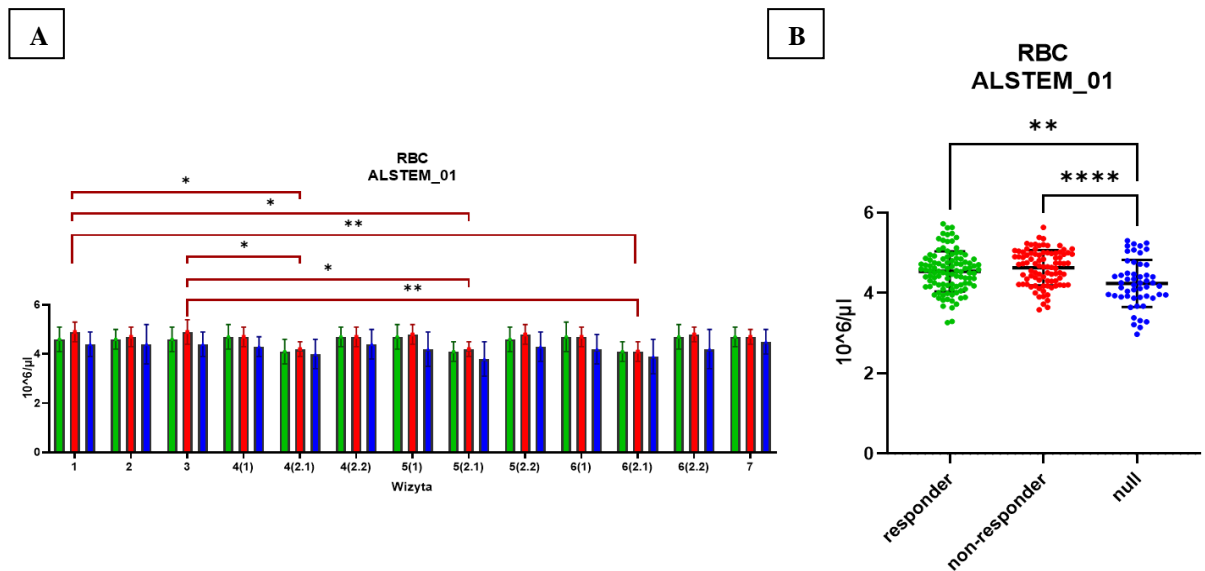
Ryc. 68. Wartość białka całkowitego we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości białka całkowitego [mg/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości białka całkowitego [mg/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

Wpływ terapii WJ-MSC na morfologiczny parametr białych krwinek (WBC) nie wiązał się z istotnymi zmianami między grupami czy czasem obserwacji (ryc. 69 [A][B]). W przypadku zmiany liczby czerwonych krwinek (RBC) we krwi istotność odnotowano jedynie w grupie pacjentów non-responder, gdzie parametr ten zmniejszył się pomiędzy wizytą 1 ($4,89 \pm 0,37$ mln/ μ l) a wizytą 4(2.1) ($4,17 \pm 0,29$ mln/ μ l) ($p < 0,05$), wizytą 1 ($4,89 \pm 0,37$ mln/ μ l) a wizytą 5(2.1) ($4,21 \pm 0,33$ mln/ μ l) ($p < 0,05$) oraz wizytą 1 ($4,89 \pm 0,37$ mln/ μ l) a wizytą 6(2.1) ($4,09 \pm 0,37$ mln/ μ l) ($p < 0,01$). Parametr ten zmniejszył się również w grupie non-responder podczas trwania terapii pomiędzy wizytą 3 ($4,92 \pm 0,48$ mln/ μ l) a wizytą 4(2.1) ($4,17 \pm 0,29$ mln/ μ l) ($p < 0,05$), wizytą 3 ($4,92 \pm 0,48$ mln/ μ l) a wizytą 5(2.1) ($4,21 \pm 0,33$ mln/ μ l) ($p < 0,05$) oraz wizytą 3 ($4,92 \pm 0,48$ mln/ μ l) a wizytą 6(2.1) ($4,09 \pm 0,37$ mln/ μ l) ($p < 0,01$) (ryc. 70 [A]). Najniższy poziom RBC ze wszystkich pomiarów w obrębie danej grupy

odnotowano w grupie null ($4,2 \pm 0,6$ mln/ μ l) w porównaniu z grupami responder ($4,5 \pm 0,5$ mln/ μ l) ($p < 0,01$) oraz non-responder ($4,2 \pm 0,6$ mln/ μ l) ($p < 0,0001$) (ryc. 70 [B]).

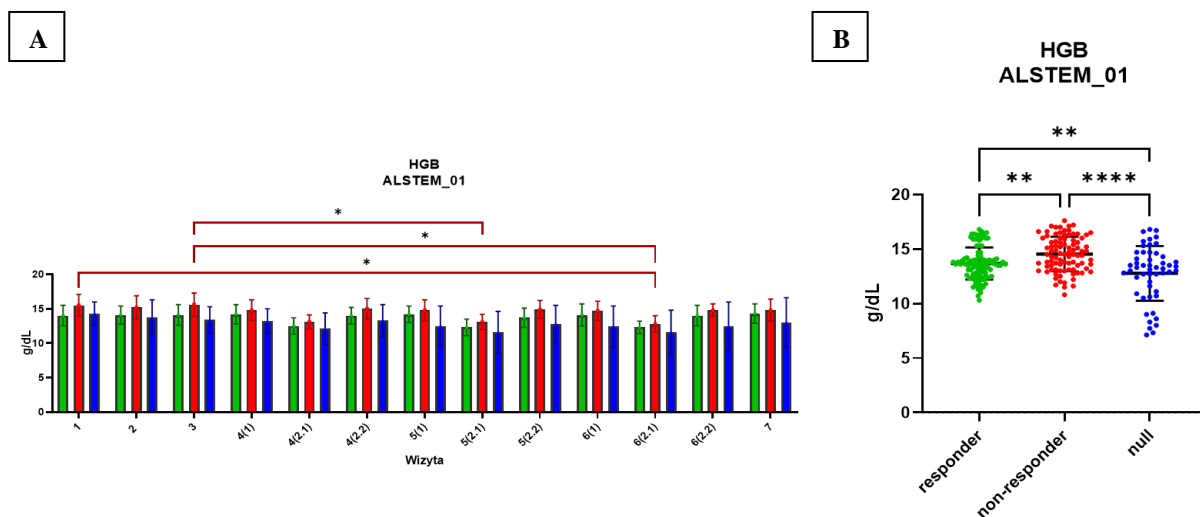


Ryc. 69. Wartość WBC we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości WBC [$10^3/\mu$ l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości WBC [$10^3/\mu$ l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



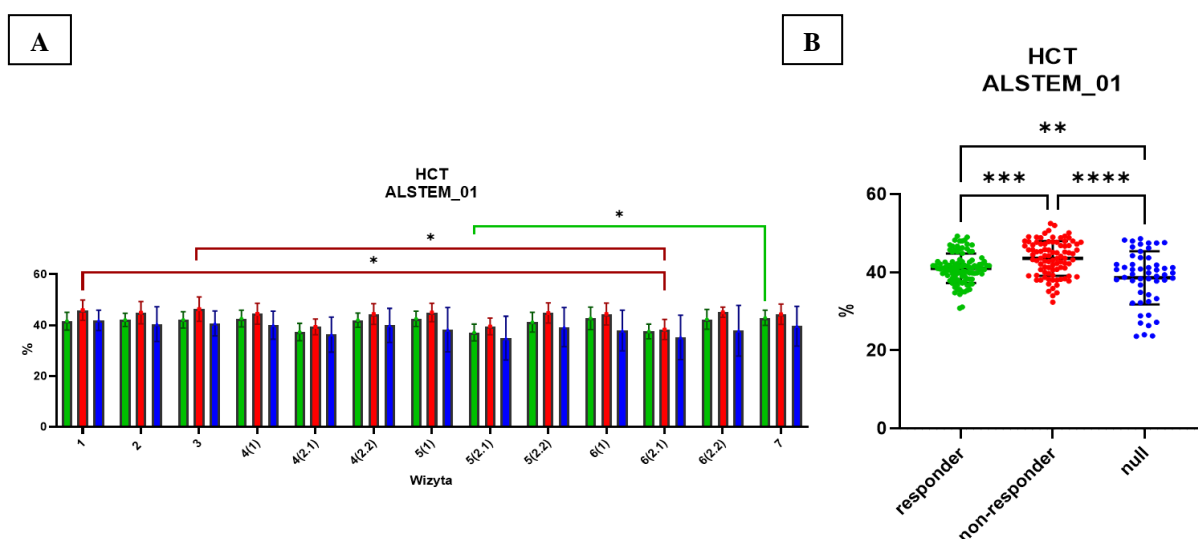
Ryc. 70. Wartość RBC we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości RBC [$10^6/\mu$ l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości RBC [$10^6/\mu$ l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

Istotne zmiany poziomu hemoglobiny (HGB) we krwi widoczne są w grupie non-responder, gdzie parametr ten zmniejszał się pomiędzy wizytą 1 ($15,49 \pm 1,58$ g/dl) a wizytą 6(2.1) ($12,79 \pm 1,22$ g/dl) ($p < 0,05$), wizytą 3 ($15,63 \pm 1,70$ g/dl) a wizytą 5(2.1) ($13,07 \pm 1,08$ g/dl) ($p < 0,05$) oraz wizytą 3 ($15,63 \pm 1,70$ g/dl) a wizytą 6(2.1) ($12,79 \pm 1,22$ g/dl) ($p < 0,05$) (ryc. 71 [A]). Średni najniższy parametr HGB z pomiarów podczas całej obserwacji odnotowano w grupie null ($12,8 \pm 2,5$ g/dL) w porównaniu z grupami responder ($13,7 \pm 1,5$ g/dl) ($p < 0,01$) i non-responder ($14,5 \pm 1,6$ g/dl) ($p < 0,0001$). Istotność wyniku wykazano również dla grupy non-responder i responder ($p < 0,01$) (ryc. 71 [B]).



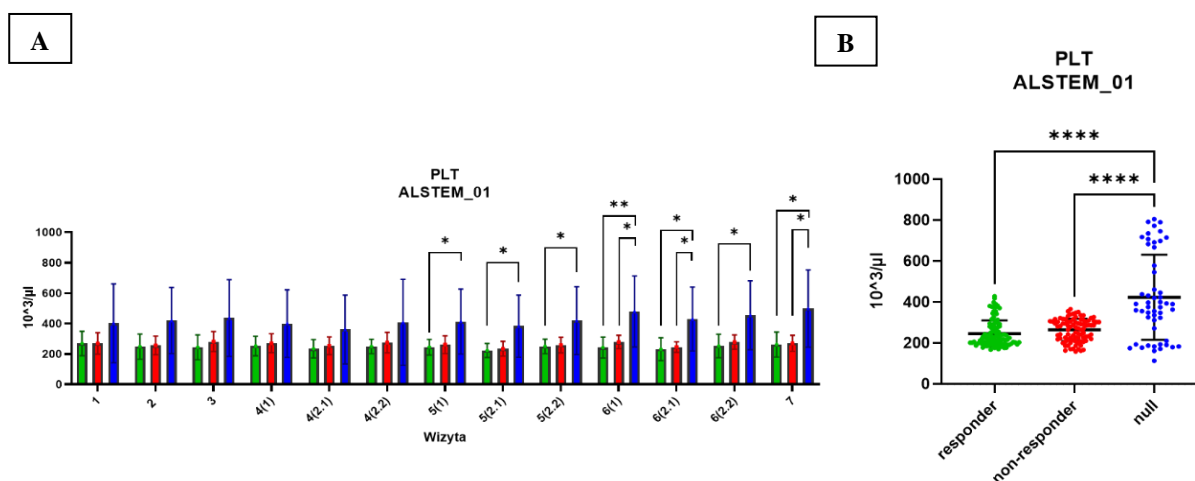
Ryc. 71. Wartość HGB we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości HGB [g/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości HGB [g/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

Poziom hematokrytu (HCT) po trzecim podaniu BPL podczas wizyty 6 ($38,3 \pm 4\%$) był niższy w porównaniu z wizytą 1 ($45,9 \pm 4\%$) oraz wizytą 3 ($46,35 \pm 4,79\%$) w grupie non-responder ($p < 0,05$), ale wzrósł w przypadku grupy responder na wizycie 7 ($42,86 \pm 3\%$) w porównaniu z wynikiem na wizycie 5(2.1) ($37,06 \pm 3,26\%$) po podaniu BPL ($p < 0,05$) (ryc. 72 [A]). Poziom hemoglobiny odzwierciedlił się również w średnich pomiarach ze wszystkich wizyt wśród grup. Najniższy procent wykazano w grupie null ($38,6 \pm 6,8\%$) w porównaniu z grupami responder ($41 \pm 3,8\%$) ($p < 0,01$) i non-responder ($43,6 \pm 4,5\%$) ($p < 0,0001$). Istotnie wyższy parametr zaobserwowano również w grupie non-responder w porównaniu z grupą responder ($p < 0,001$) (ryc. 72 [A]).



Ryc. 72. Wartość HCT we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości HCT [%] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości HCT [%] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

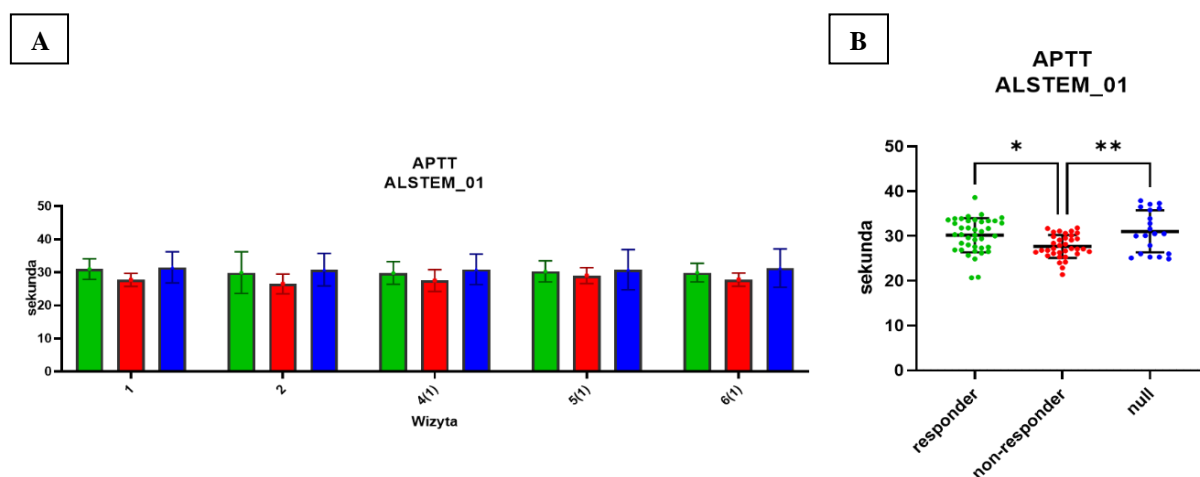
Zmiany w liczbie płytek (PLT) krwi zaobserwowano między grupami na wizycie 5, miesiąc po pierwszym podaniu BPL. Grupa responder charakteryzowała się mniejszą liczbą PLT ($244,88 \pm 50,97$ tys./ μl) w porównaniu z grupą null ($413,55 \pm 212,96$ tys./ μl) ($p < 0,05$), gdzie tendencja ta utrzymywała się do końca obserwacji. Dodatkowo w próbkach pobranych podczas wizyt 6(1), 6(2.1) oraz 7 podobny trend obserwowano między grupą non-responder a null ($p < 0,05$) (ryc. 73 [A]). Średnie wyniki ze wszystkich wizyt wykazały największą wartość w grupie null (424 ± 207 tys./ μl) w porównaniu z grupami responder (247 ± 65 tys./ μl) i non-responder (264 ± 54 tys./ μl) ($p < 0,0001$) (ryc. 73 [B]).



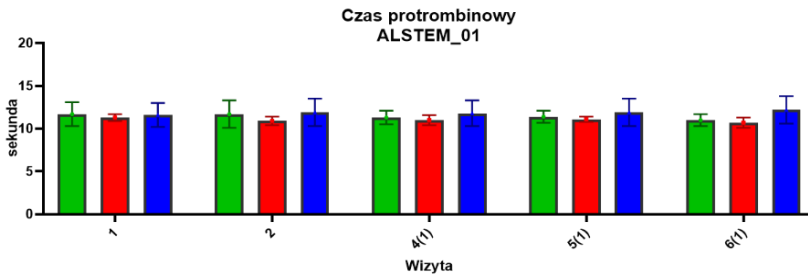
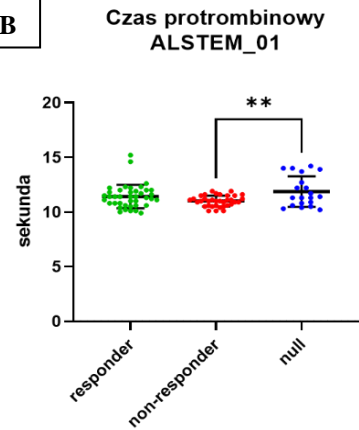
Ryc. 73. Wartość PLT we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości PLT [$10^3/\mu\text{l}$] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości PLT [$10^3/\mu\text{l}$] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; **** $p < 0,0001$

Pomimo opisanych powyżej widocznych zmian w liczbie płytek pomiędzy grupami pacjentów – inne parametry krwi wskazujące na krzepliwość, takie jak APTT (ryc. 74 [A]), czas protrombinowy (ryc. 75 [A]) czy INR (ryc. 76 [A]) nie zmieniły się istotnie w okresie pojedynczych wizyt. Istotności odnotowano wśród wyników średnich zebranych ze wszystkich wizyt. Czas kaolinowo-kefalinowy (APTT) był najniższy w grupie non-responder ($27,7 \pm 2,6$ sekundy) w odniesieniu do grup responder ($30,2 \pm 3,8$ sekundy) ($p < 0,05$) i null ($31 \pm 4,7$ sekundy) ($p < 0,01$) (ryc. 74 [B]). W przypadku czasu protrombinowego wyższą wartość odnotowano w grupie null ($11,88 \pm 1,4$ sekundy) w porównaniu z grupą non-responder ($11 \pm 0,49$ sekundy) ($p < 0,01$). W grupie responder wyniósł $11,42 \pm 1,08$ sekundy (ryc. 75 [B]).

Międzynarodowy współczynnik znormalizowany (INR) oparty na pomiarze czasu protrombinowego był również wyższy w grupie null ($1,06 \pm 0,14$) w odniesieniu do grupy non-responder ($0,98 \pm 0,05$) ($p < 0,01$). W grupie responder wyniósł $1 \pm 0,1$ (ryc. 76 [B]).

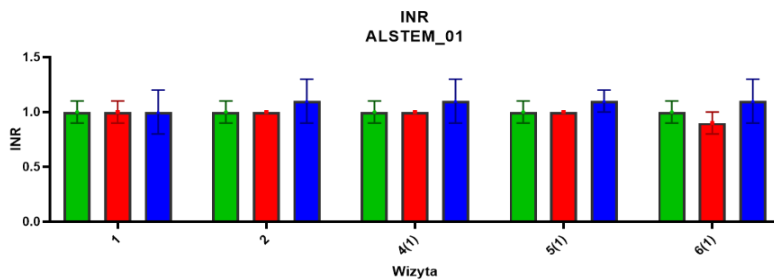
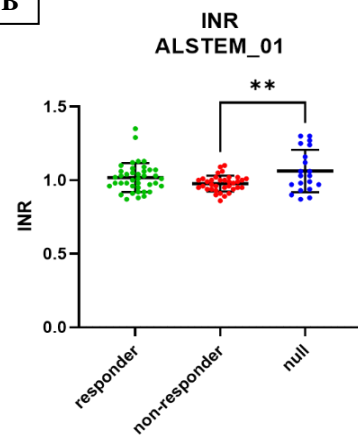


Ryc. 74. Wartość APTT dla krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości APTT [sekunda] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości APTT [sekunda] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

A**B**

Ryc. 75. Wartość czasu protrombinowego dla krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM.

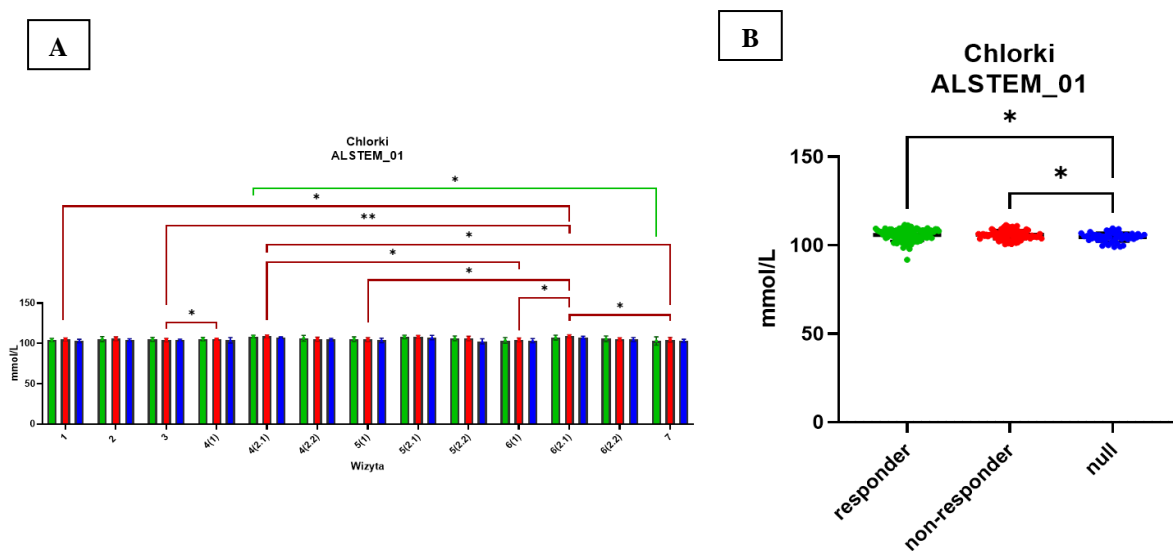
[A] Średnie wartości czasu protrombinowego [sekunda] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości czasu protrombinowego [sekunda] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; ** $p < 0,01$

A**B**

Ryc. 76. Wartość INR dla krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM.

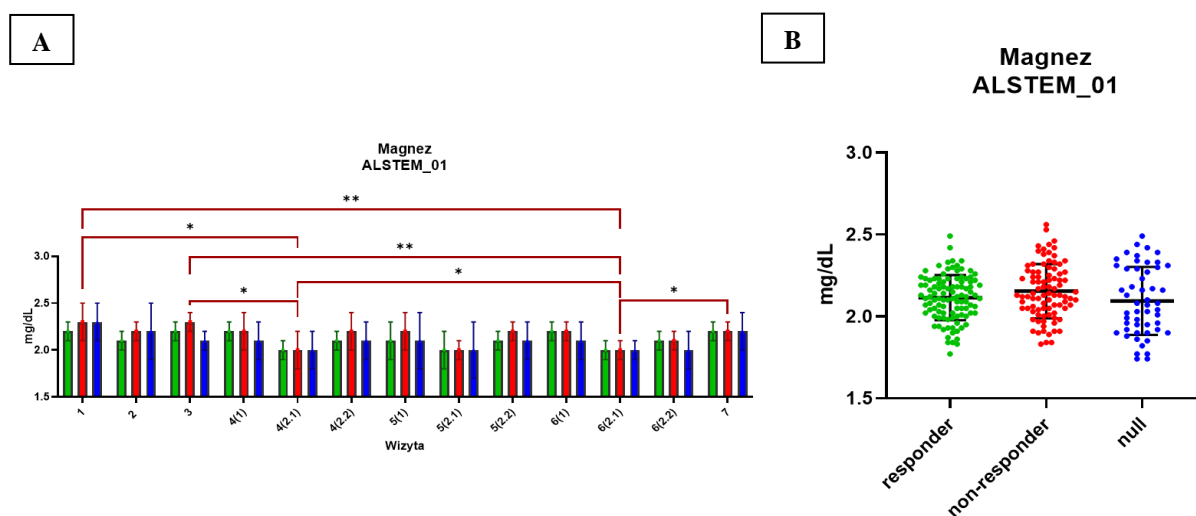
[A] Średnie wartości INR w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości INR w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; ** $p < 0,01$

Oceniając zawartość elektrolitów we krwi pacjentów z ALS, można zauważyć, że najbardziej znaczące zmiany widoczne są w stężeniu chlorków oraz magnezu. Istotne zmiany w zawartości chlorków we krwi zaobserwowano w grupie pacjentów non-responder, gdzie parametr ten wzrósł po trzecim podaniu podczas wizyty 6(2.1) ($108,11 \pm 1,82$ mmol/l) w porównaniu z wynikiem w próbce pobranej podczas wizyty 1 ($104,97 \pm 1,69$ mmol/l) ($p < 0,05$) i wizyty 3 ($104,3 \pm 1$ mmol/l) ($p < 0,01$). Natomiast stężenie chlorków w próbce z wizyty 6 ($104,51 \pm 2,19$ mmol/l) pobranej w momencie przyjęcia była niższa w porównaniu z okresem po podaniu pierwszej dawki ($108,83 \pm 1,8$ mmol/l) ($p < 0,05$). Zawartość chlorków w próbce krwi pobranej podczas wizyty 4 ($105,4 \pm 1$ mmol) była wyższa w porównaniu z wynikiem z wizyty 3 ($104,3 \pm 1$ mmol/l) ($p < 0,05$), a na wizycie 7 ($104,57 \pm 2,89$ mmol/l) wynik był niższy w porównaniu z wynikiem z próbki krwi pobranej po trzecim podaniu BPL ($109 \pm 1,81$ mmol/l) ($p < 0,05$). W grupie responder poziom chlorków po zakończeniu terapii WJ-MSc w próbce krwi z wizyty 7 ($103,09 \pm 5,14$ mmol/l) był niższy w porównaniu z próbką przed podaniami BPL, pobraną na wizycie 4 ($105,59 \pm 2,14$ mmol/l) ($p < 0,05$) (ryc. 77 [A]). Statystyka pomiarów z całego czasu obserwacji wykazała najniższą wartość dla grupy null ($104,6 \pm 2,5$ mmol/l) w porównaniu z wynikami dla grupy responder ($105,8 \pm 3,3$ mmol/l) ($p < 0,05$) i non-responder ($106 \pm 2,5$ mmol/l) ($p < 0,05$) (ryc. 77 [B]).



Ryc. 77. Wartość chlorków we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości chlorków [mmol/l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości chlorków [mmol/l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

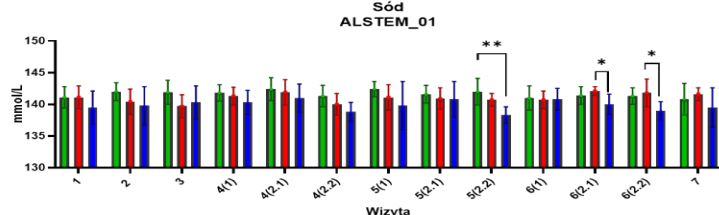
Zmiany poziomu magnezu we krwi pacjentów stwierdzono jedynie w grupie pacjentów non-responder, gdzie zaobserwowano obniżenie poziomu już po pierwszym podaniu PBL ($2 \pm 0,15$ mg/dl) w porównaniu z oznaczeniem podczas wizyty 1 ($2,67 \pm 0,16$ mg/dl) ($p < 0,05$). Tendencja spadkowa poziomu magnezu jeszcze bardziej uwidoczniła się po trzecim podaniu BPL ($2,2 \pm 0,13$ mg/dl) w porównaniu z wizytą 1 ($2,67 \pm 0,16$ mg/dl) ($p < 0,01$). Stężenie magnezu we krwi po trzecim podaniu BPL ($1,96 \pm 0,08$ mg/dl) było również niższe w porównaniu z wizytą 3 ($2,28 \pm 0,14$ mg/dl) ($p < 0,01$). Po pierwszym podaniu BPL stężenie magnezu ($2 \pm 0,15$ mg/dl) we krwi było też niższe w porównaniu z wizytą 3 ($2,28 \pm 0,14$ mg/dl) ($p < 0,05$). Poziom magnezu u pacjentów non-responder po ostatnim podaniu produktu komórkowego ($1,96 \pm 0,08$ mg/dl) był niższy w porównaniu z wynikiem po pierwszym podaniu ($2 \pm 0,15$ mg/dl) ($p < 0,05$), podczas gdy poziom elektrolitu oznaczony na wizycie 7 ($2,24 \pm 0,15$ mg/dl) wykazał wzrost w porównaniu z wizytą, na której podano ostatnią dawkę BPL ($1,96 \pm 0,08$ mg/dl) ($p < 0,05$) (ryc. 78 [A]). Nie zaobserwowano istotnych różnic dla średnich pomiarów ze wszystkich wizyt dla grup responder ($2,11 \pm 0,14$ mg/dl), non-responder ($2,15 \pm 0,17$ mg/dl) oraz null ($2,09 \pm 0,21$ mg/dl) (ryc. 78 [B]).



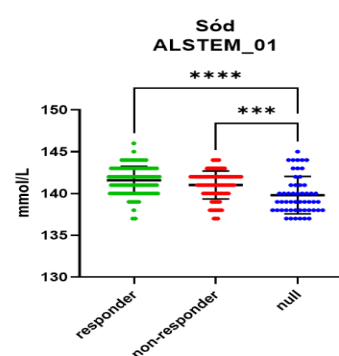
Ryc. 78. Wartość magnezu we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości magnezu [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości magnezu [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Wyniki stężenia pozostałych elektrolitów: sodu, potasu oraz fosforu są następujące. We krwi pacjentów uczestniczących w badaniu klinicznym ALSTEM w przypadku poziomu sodu zmiany zaobserwowano między grupą responder a grupą null podczas wizyty 5 po podaniu BPL oraz w przypadku poziomu potasu podczas wizyty 6 w momencie przyjęcia. Stężenie sodu podczas wizyty 5 po podaniu BPL było wyższe w grupie responder (142 ± 2 mmol/l) w porównaniu z grupą null ($138 \pm 1,3$ mmol/l) ($p < 0,01$) (ryc. 79 [A]). Średnie pomiary ze wszystkich wizyt wykazały najniższy poziom sodu we krwi w grupie null ($139,8 \pm 2,2$ mmol/l) w porównaniu z grupami responder ($141,6 \pm 1,7$ mmol/l) ($p < 0,0001$) i non-responder ($141 \pm 1,7$ mmol/l) ($p < 0,001$) (ryc. 79 [B]). Stężenie potasu we krwi w momencie przyjęcia podczas wizyty 6 było najwyższe w grupie pacjentów null ($4,49 \pm 0,32$ mmol/l) i istotnie statystycznie w porównaniu z grupą responder ($4,12 \pm 0,2$ mmol/l) ($p < 0,05$) (ryc. 80 [A]). Średni wynik przeprowadzonych pomiarów potasu we krwi w czasie całej obserwacji był wyższy w grupie non-responder ($4,4 \pm 0,3$ mmol/l) w porównaniu ze średnim wynikiem w grupie responder ($4,2 \pm 0,3$ mmol/l) ($p < 0,001$). W grupie null średnia wartość wynosiła ($4,3 \pm 0,5$ mmol/l) (ryc. 80 [B]). Stężenie fosforu we krwi pacjentów non-responder ($3,33 \pm 0,45$ mg/dl) było niższe niż w grupie responder ($3,9 \pm 0,39$ mg/dl) podczas wizyty 6 w przypadku próbki pobranej po podaniu produktu komórkowego ($p < 0,05$) (ryc. 81 [A]). Nie odnotowano istotnych różnic wśród średnich oznaczeń ze wszystkich wizyt. Stężenie fosforu we krwi dla grup było zbliżone i wyniosło dla grupy responder $3,7 \pm 0,4$ mg/dl, non-responder: $3,6 \pm 0,4$ mg/dl i null: $3,6 \pm 0,3$ mg/dl (ryc. 81 [B]).

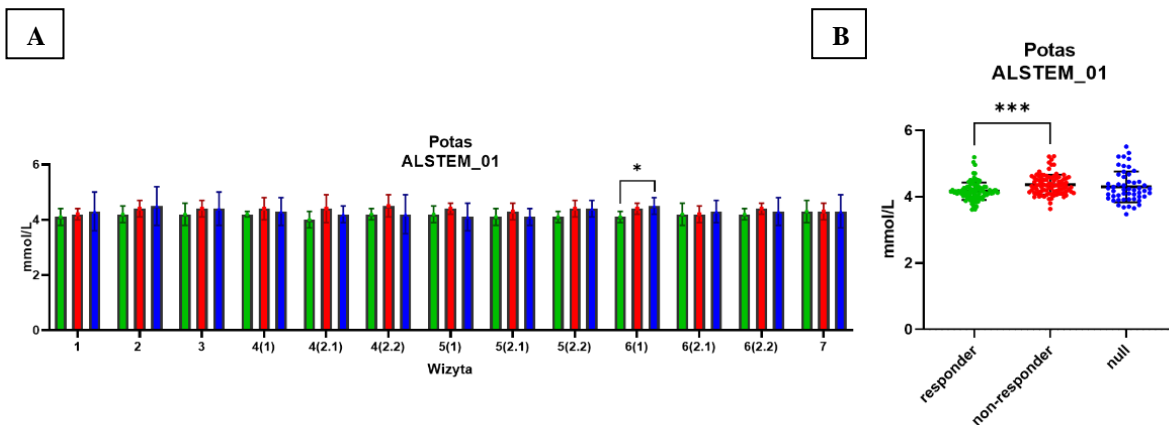
A



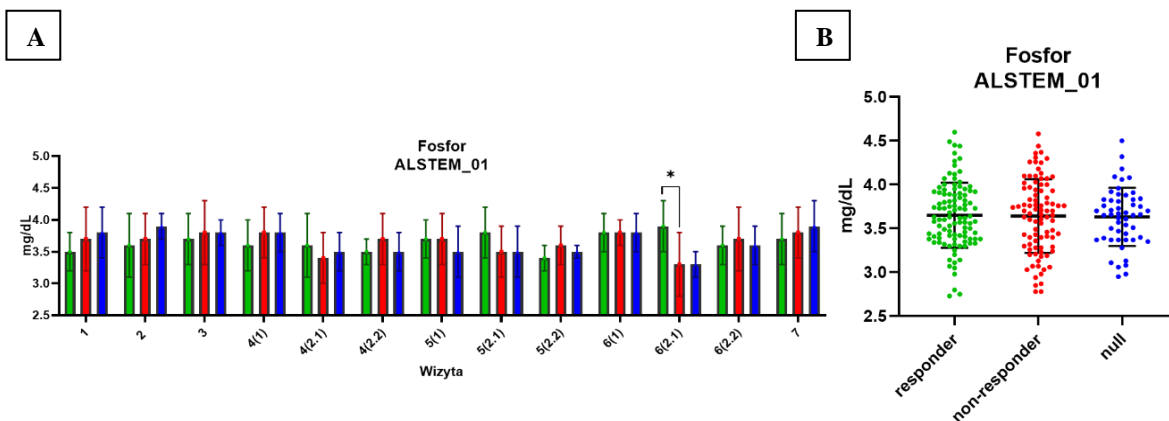
B



Ryc. 79. Wartość sodu we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości sodu [mmol/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości sodu [mmol/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$



Ryc. 80. Wartość potasu we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości potasu [mmol/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości potasu [mmol/l] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; *** p < 0,001



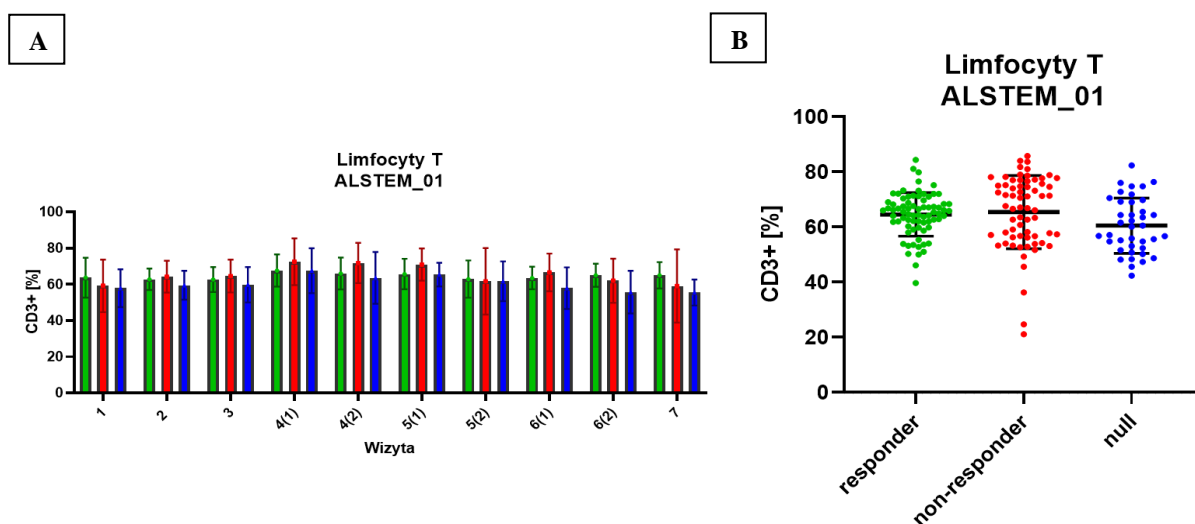
Ryc. 81. Wartość fosforu we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości fosforu [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości fosforu [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)

4.4.4. Rozkład subpopulacji leukocytów we krwi obwodowej podczas obserwacji grup pacjentów ALSTEM

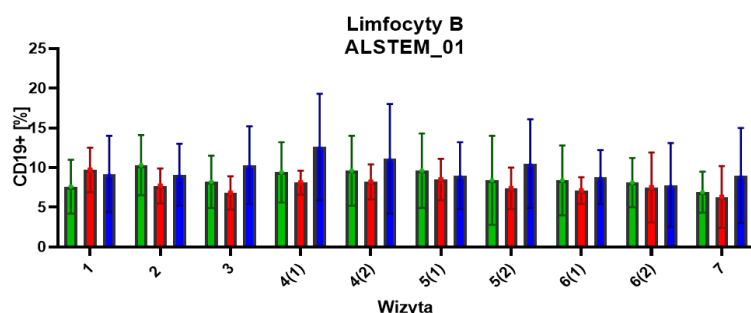
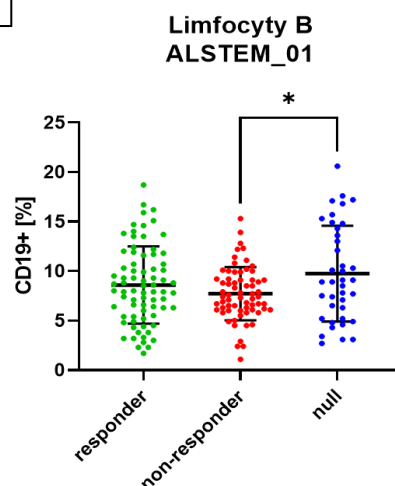
Analiza cytometryczna komórek krwi obwodowej pacjentów z ALS poddanych terapii produktem komórkowym opartym na komórkach WJ-MSC w grupach (responder, non-responder, null) dla poszczególnych wizyt nie wykazała statystycznie istotnej różnicy dotyczącej zawartości populacji limfocytów T (ryc. 82 [A]), limfocytów B (ryc. 83 [A]), komórek Th (ryc. 84 [A]), komórek Tc (ryc. 85 [A]), komórek Th2 (ryc. 86 [A]), monocytów (ryc. 87 [A]), limfocytów Th pamięci (ryc. 88 [A]), limfocytów Tc naiwnych (ryc. 89 [A]) oraz limfocytów Tc pamięci (ryc. 90 [A]). Również brak istotnej statystycznie różnicy dla profilu aktywacji na komórkach Th (ryc. 91 [A]) oraz Tc (ryc. 92 [A]) dla aktywacji późnej (CD69-CD25+). W przypadku przedstawienia średnich wyników z całego badania klinicznego dla poszczególnych grup – procent:

- limfocytów T (ryc. 82 [B]) nie wykazał istotnych statystycznie różnic wśród grup – w grupie responder wynik to $64,6 \pm 7,9\%$, w non-responder: $65,4 \pm 13,3\%$, a w null: $60,5 \pm 10\%$;
- limfocytów B (ryc. 83 [B]) był istotnie niższy ($p < 0,05$) w grupie non-responder ($7,7 \pm 2,7\%$) w porównaniu z grupą null ($9,7 \pm 4,8\%$), a w grupie responder wyniósł $8,6 \pm 3,9\%$;
- limfocytów Th (ryc. 84 [B]) był niższy w grupie responder ($58,5 \pm 15,3\%$) w porównaniu z grupą null ($66,8 \pm 7,1\%$) ($p < 0,01$), a w grupie non-responder wyniósł $62,5 \pm 9,6\%$;
- limfocytów Tc (ryc. 85 [B]) był najniższy w grupie null ($23,7 \pm 6,1\%$) w zestawieniu z grupami responder ($33,4 \pm 13\%$) ($p < 0,0001$) oraz non-responder ($31 \pm 10,5\%$) ($p < 0,01$);
- komórek Th2 (ryc. 86 [B]) był bez istotnych statystycznie różnic w grupach responder ($19,8 \pm 8,4\%$), non-responder ($18,8 \pm 7,8\%$) i null ($19,4 \pm 5,3\%$);
- monocytów (ryc. 87 [B]) zaobserwowano niższy w grupie non-responder ($18,4 \pm 9,7\%$) w zestawieniu z grupą null ($23,2 \pm 8,4\%$) ($p < 0,05$), a w grupie responder wartość była równa $20,6 \pm 8,2\%$;
- limfocytów Th pamięci (ryc. 88 [B]) wyniósł w grupie responder $52,3 \pm 19\%$, w non-responder: $56,7 \pm 14,1\%$, a w null: $51,4 \pm 6,2\%$;
- limfocytów Tc naiwnych (ryc. 89 [B]) był wyższy w grupie non-responder ($49,9 \pm 19,2\%$) w porównaniu z grupą null ($40,3 \pm 14,8\%$) ($p < 0,05$), a w grupie responder wynik wyniósł $43,2 \pm 18,4\%$;

- limfocytów Tc pamięci (ryc. 90 [B]) odnotowano niższy w grupie non-responder ($29,5 \pm 16,8\%$) w porównaniu z grupą null ($41,1 \pm 13,9\%$) ($p < 0,001$), a w grupie responder średni wynik wyniósł $34,2 \pm 14,9\%$;
- aktywacji późnej na limfocytach Th (ryc. 91 [B]) nie wykazał istotnych statystycznie zmian wśród grup – wynik dla grupy responder wyniósł $9,9 \pm 3,8\%$, dla non-responder: $10,4 \pm 5\%$ a dla null: $10,5 \pm 3,3\%$;
- aktywacji późnej na limfocytach Tc (ryc. 92 [B]) nie wykazał istotnych statystycznie zmian w grupach – w responder był równy $12,4 \pm 13,8\%$, w non-responder: $10 \pm 9,3\%$ a w null: $12 \pm 8,8\%$.

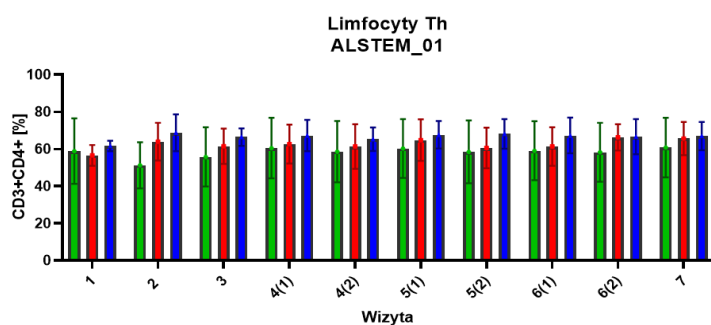
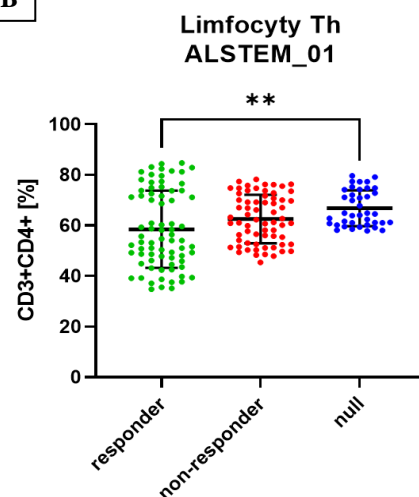


Ryc. 82. Wartość procentowa limfocytów T we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów T (CD3+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów T (CD3+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

A**B**

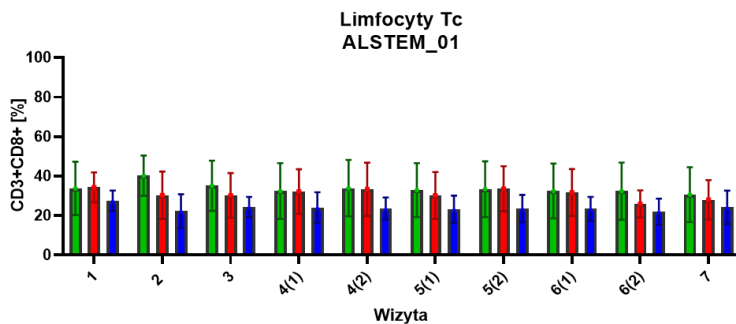
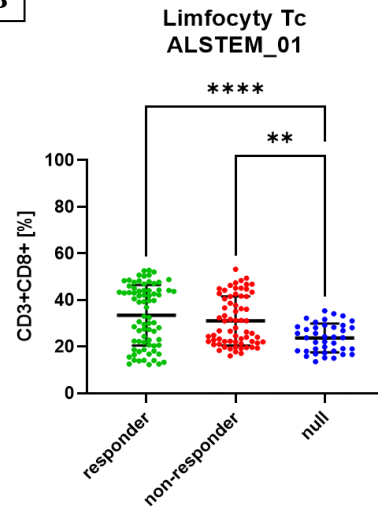
Ryc. 83. Wartość procentowa limfocytów B we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM.

[A] Średnie wartości procentowe limfocytów B (CD19+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów B (CD19+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

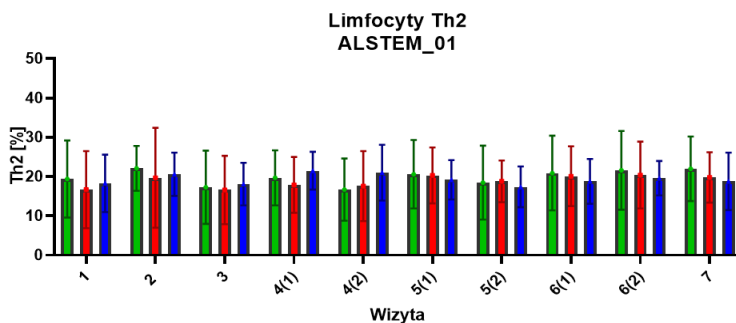
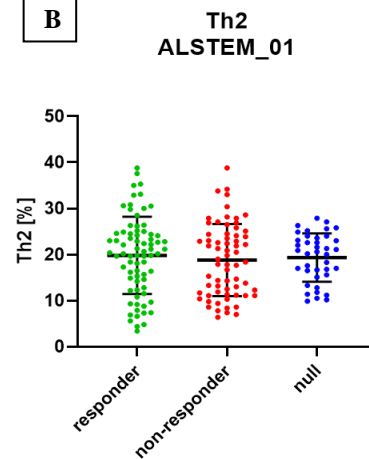
A**B**

Ryc. 84. Wartość procentowa limfocytów T pomocniczych (Th) we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM.

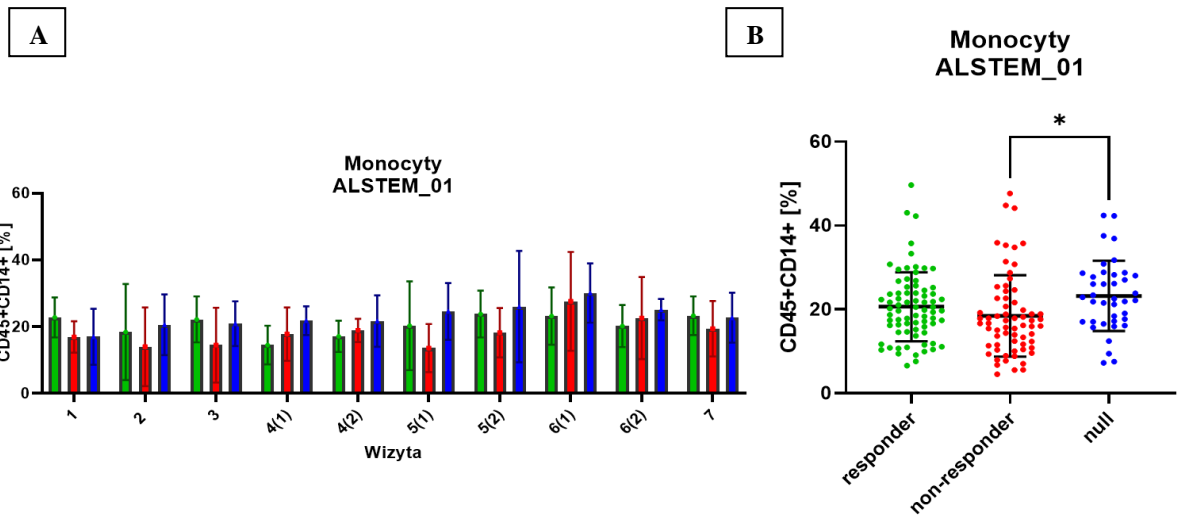
[A] Średnie wartości procentowe limfocytów Th (CD3+CD4+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Th (CD3+CD4+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$

A**B**

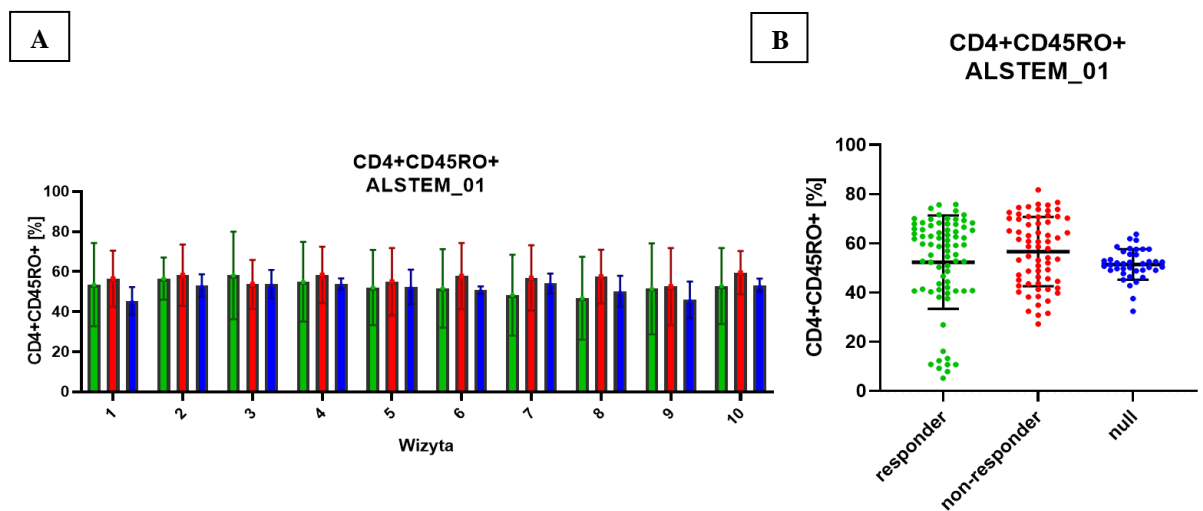
Ryc. 85. Wartość procentowa limfocytów T cytotoksycznych (Tc) we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc (CD3+CD8+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc (CD3+CD8+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

A**B**

Ryc. 86. Wartość procentowa limfocytów Th2 w krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Th2 (CD3+CD4+CD194+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Th2 (CD3+CD4+CD194+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

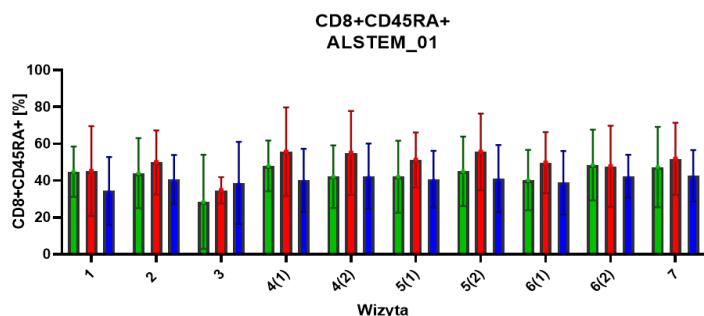


Ryc. 87. Wartość procentowa monocytów we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe monocytów (CD45+CD14+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe (CD45+CD14+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

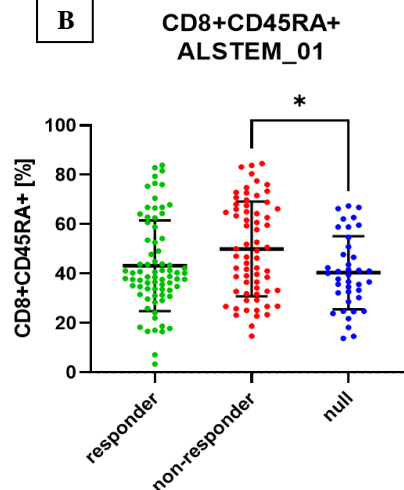


Ryc. 88. Wartość procentowa limfocytów Th pamięci we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Th pamięci (CD3+CD4+CD45RO+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Th pamięci (CD3+CD4+CD45RO+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

A

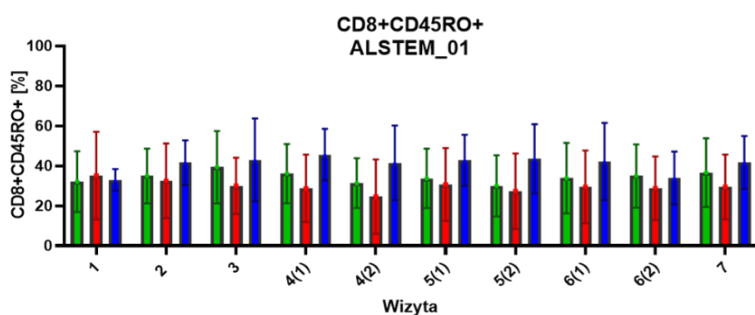


B

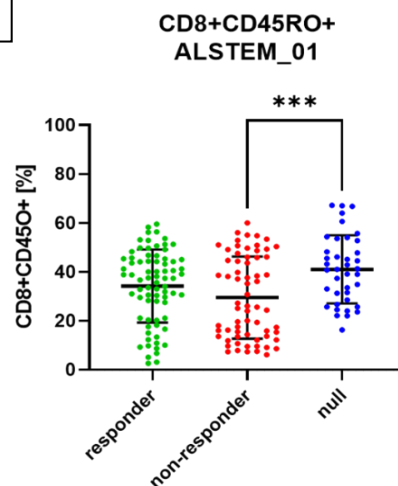


Ryc. 89. Wartość procentowa limfocytów Tc naiwnych we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc naiwnych (CD3+CD8+CD45RA+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc naiwnych (CD3+CD8+CD45RA+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

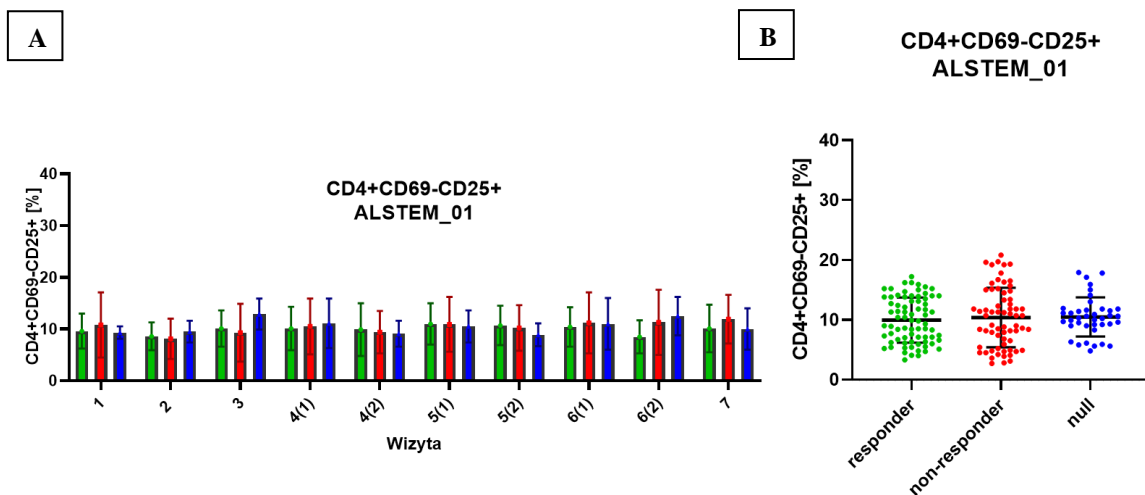
A



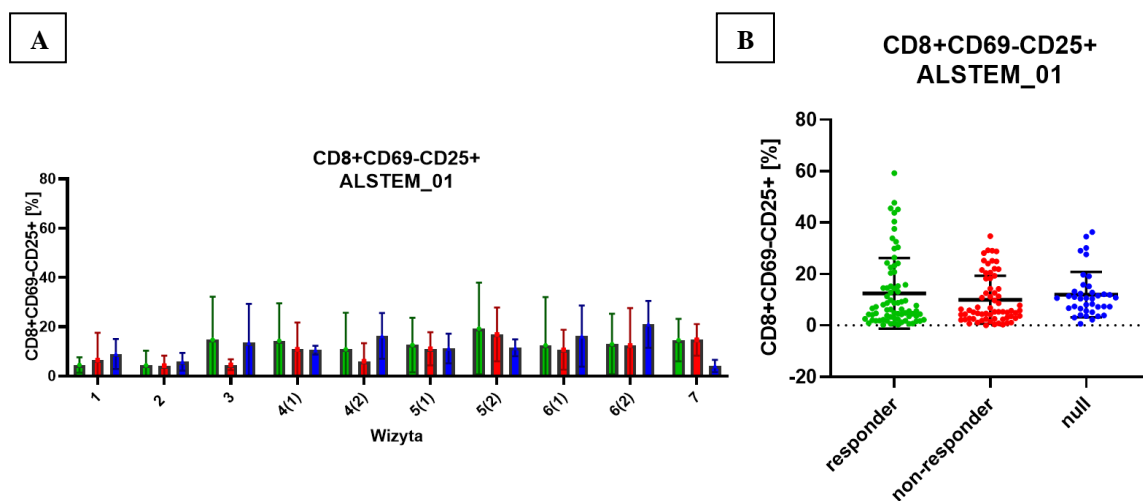
B



Ryc. 90. Wartość procentowa limfocytów Tc pamięci we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc pamięci (CD3+CD8+CD45RO+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc pamięci (CD3+CD8+CD45RO+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; *** $p < 0,001$

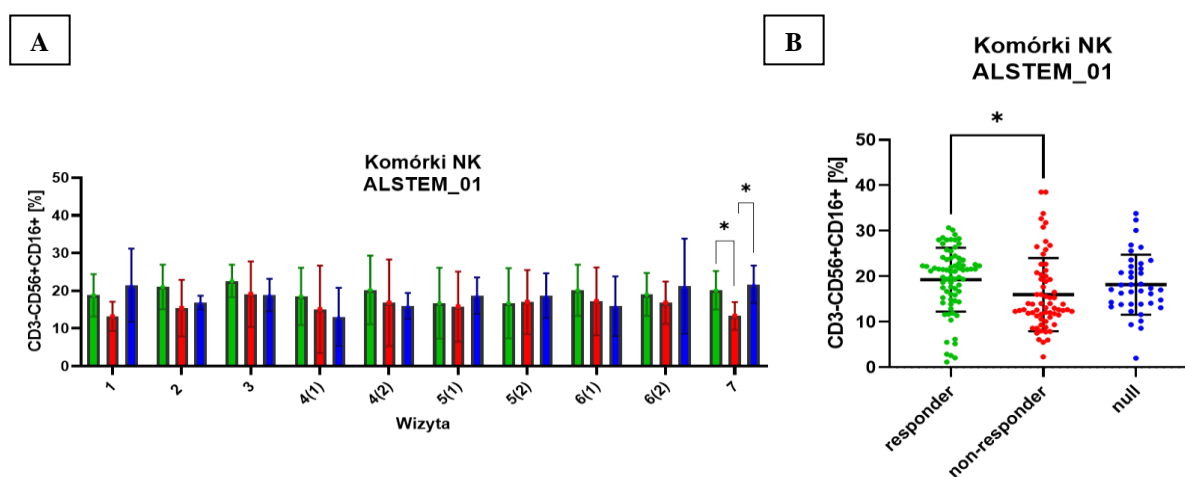


Ryc. 91. Wartość procentowa aktywacji późnej na limfocytach Th we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe aktywacji późnej na limfocytach Th (CD4+CD69-CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe aktywacji późnej na limfocytach Th (CD4+CD69-CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



Ryc. 92. Wartość procentowa aktywacji późnej na limfocytach Tc we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe aktywacji późnej na limfocytach Tc (CD8+CD69-CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości procentowe aktywacji późnej na limfocytach Tc (CD8+CD69-CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

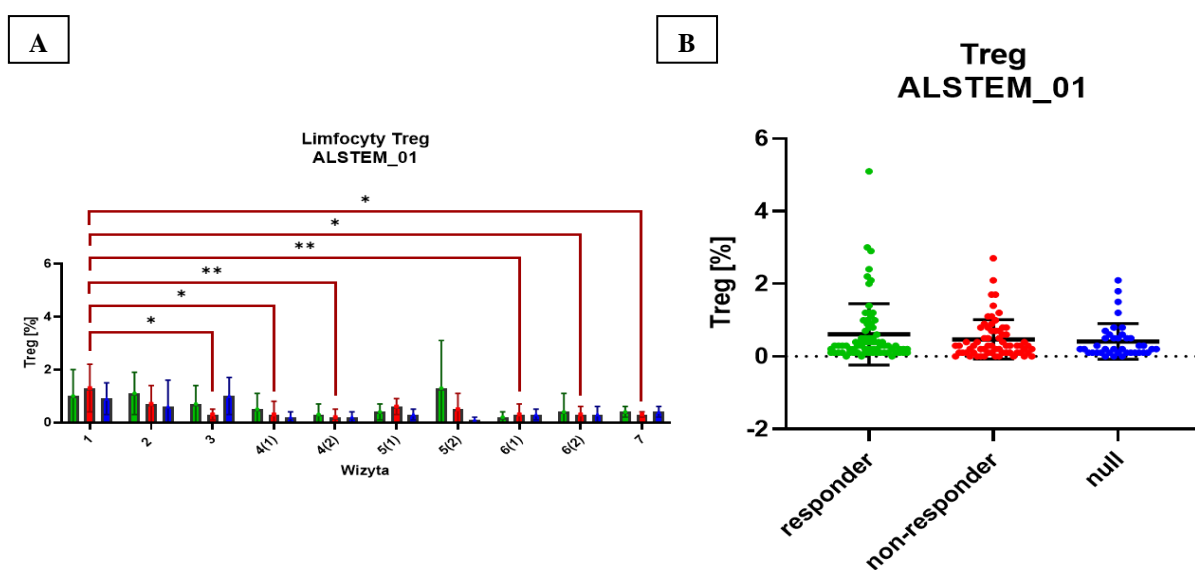
Procent komórek NK (ryc. 93 [A]) we krwi obwodowej zmienił się pomiędzy grupami responder, non-responder oraz null dopiero w materiale pobranym podczas wizyty 7, czyli miesiąc po ostatnim, trzecim podaniu BPL. Procent komórek NK był niższy w grupie non-responder ($13,33 \pm 3,71\%$) w porównaniu z grupą responder ($20,14 \pm 5,1\%$) ($p < 0,5$). W grupie pacjentów null ($21,68 \pm 5,04\%$) parametr ten również był wyższy w porównaniu z grupą non-responder ($13,33 \pm 3,71\%$) ($p < 0,05$). Brak istotnych zmian w procencie komórek w trakcie trwania obserwacji. Średnia wartość procentowa komórek NK (ryc. 93 [B]) ze wszystkich wizyt objętych badaniem klinicznym była wyższa w grupie responder ($19,3 \pm 7\%$) w porównaniu z grupą non-responder ($16 \pm 8\%$) ($p < 0,05$), a w grupie null wynosiła $18,2 \pm 6,6\%$.



Ryc. 93. Wartość procentowa komórek NK we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe komórek NK (CD3-CD56+CD16+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości procentowe komórek NK (CD3-CD56+CD16+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

Zmiany w zawartości procentowej limfocytów T regulatorowych (ryc. 94 [A]) zaobserwowano we krwi grupy pacjentów non-responder. W trakcie terapii komórkowej zawartość limfocytów Treg statystycznie stale spadała w porównaniu z początkową wizytą 1 – z wyjątkiem wizyty 2 oraz wizyty 5. Procent Treg w grupie non-responder podczas wizyty 3 był niższy ($0,32 \pm 0,18\%$) w porównaniu z wizytą 1 ($1,3 \pm 0,89\%$) ($p < 0,05$). Tendencja do zmniejszania procentu Treg utrzymywała się podczas wizyty 4 – przed podaniem BPL

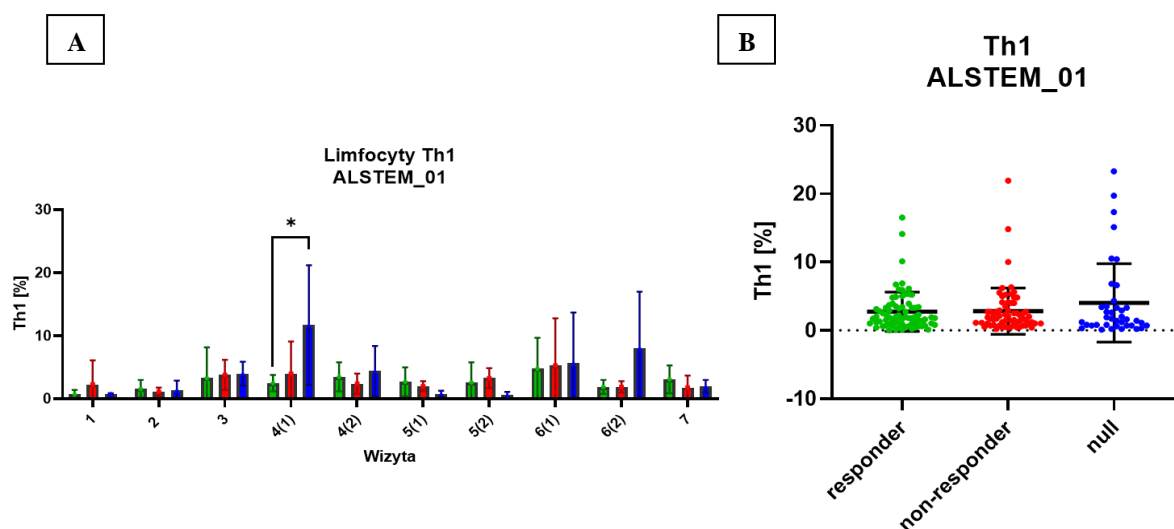
($0,33 \pm 0,48 \%$) ($p < 0,05$), po podaniu BPL ($0,19 \pm 0,28\%$) ($p < 0,01$), a także podczas wizyty 6 – przed podaniem BPL ($0,27 \pm 0,37\%$) ($p < 0,01$), po podaniu BPL ($0,25 \pm 0,26\%$) ($p < 0,05$) oraz podczas wizyty 7 ($0,29 \pm 0,15\%$) ($p < 0,05$) w porównaniu z wizytą 1, kwalifikacyjną ($1,3 \pm 0,89\%$). Nie wystąpiły istotne zmiany wśród uśrednionych wyników komórek Treg ze wszystkich wizyt składających się na badanie kliniczne ALSTEM (ryc. 94 [B]) – procent komórek Treg w grupie responder wyniósł $0,6 \pm 0,8$, w non-responder: $0,5 \pm 0,5$, a w null: $0,4 \pm 0,5$.



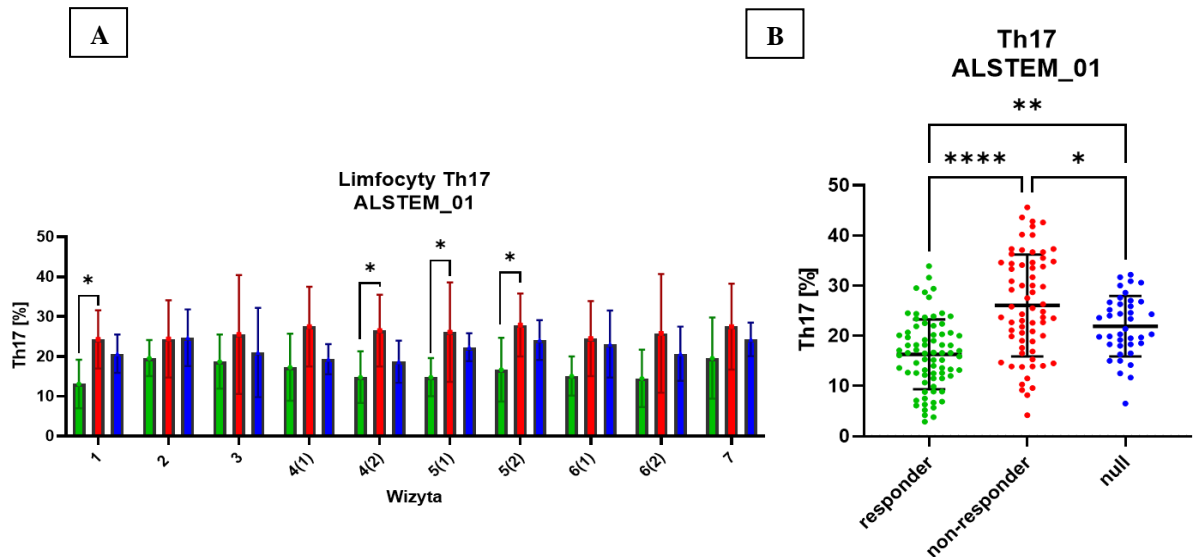
Ryc. 94. Wartość procentowa limfocytów T regulatorowych (Treg) we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe komórek Treg ($CD3+CD4+CD25+CD127^{low}Foxp3+$) w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości procentowe komórek Treg ($CD3+CD4+CD25+CD127^{low}Foxp3+$) w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Procent komórek Th1 (ryc. 95 [A]) był istotnie wyższy ($11,68 \pm 9,52\%$) we krwi pacjentów z grupy null podczas wizyty 4(1) przed podaniem BPL w porównaniu z grupą pacjentów responder ($2,46 \pm 1,31\%$) ($p < 0,05$). Uśredniony procent komórek Th1 wśród grup (ryc. 95 [B]) wyniósł w grupie responder $2,7 \pm 2,9$, non-responder: $2,8 \pm 3,4$, a null: $4 \pm 5,7$. Zmiany w ilości procentowej limfocytów Th17 (ryc. 96 [A]) stwierdzono pomiędzy grupą

responder a grupą non-responder we krwi pobranej podczas wizyty 1, wizyty 4(2), wizyty 5(1) i wizyty 5(2), przy istotności $p < 0,05$. Podczas wizyty 1 analiza cytometryczna wykazała wyższy procent wśród grupy non-responder ($24,33 \pm 7,3\%$) w porównaniu z grupą responder ($13,07 \pm 6,12\%$) ($p < 0,05$). Tendencja ta powtórzyła się podczas wizyty 4, we krwi pobranej po podaniu BPL ($p < 0,05$), oraz wizyty 5, we krwi pobranej zarówno przed, jak i po podaniu BPL ($p < 0,05$). Zestawienie wyników ze wszystkich wizyt dla parametru Th17 (ryc. 96 [B]) wskazało najwyższą wartość w grupie non-responder ($26,1 \pm 10,2\%$) w porównaniu z grupami responder ($16,3 \pm 6,9\%$) ($p < 0,0001$) oraz null ($21,9 \pm 6\%$) ($p < 0,05$). Istotność ($p < 0,01$) wykazano również przy niższym wyniku w grupie responder ($16,3 \pm 6,9\%$) w porównaniu z grupą null ($21,9 \pm 6\%$).

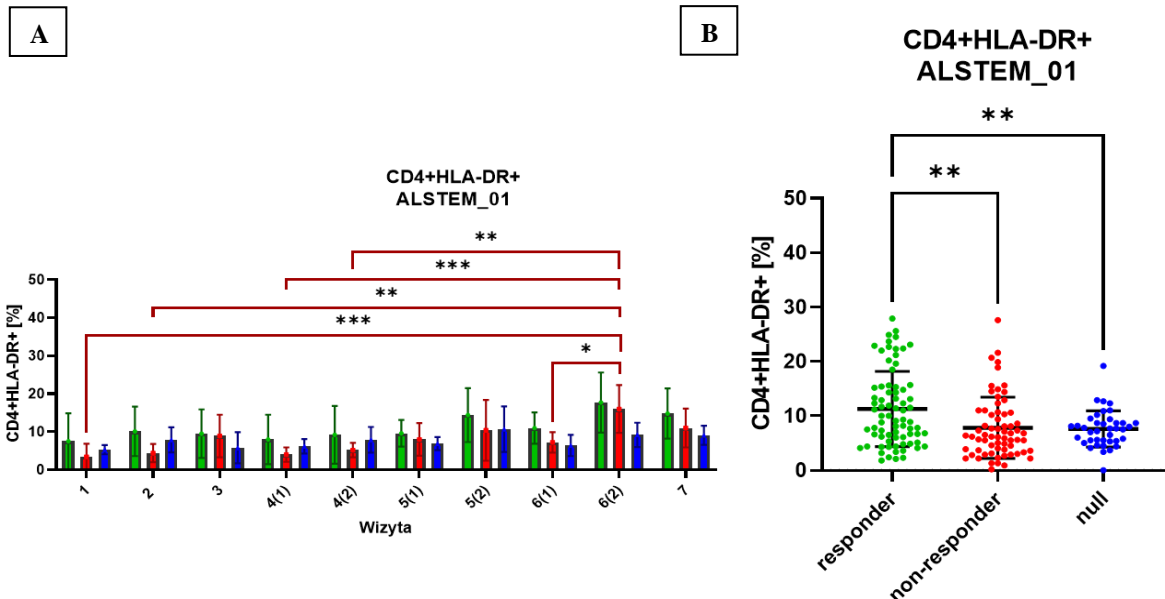


Ryc. 95. Wartość procentowa limfocytów Th1 we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM.
 [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Th1 ($CD3+CD4+CD183+CD194^-$) w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Th1 ($CD3+CD4+CD183+CD194^-$) w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

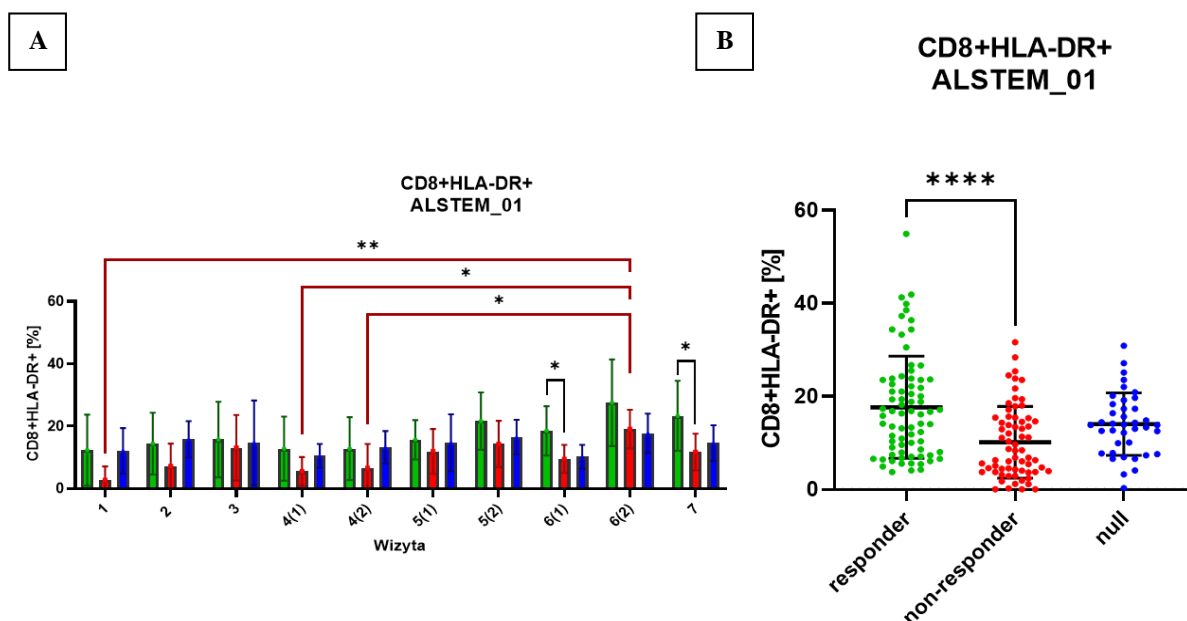


Ryc. 96. Wartość procentowa limfocytów Th17 we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Th17 (CD3+CD4+CD196+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Th17 (CD3+CD4+CD196+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001

Zmiany w procencie CD4+HLA-DR+ (ryc. 97 [A]) obserwowano głównie w grupie non-responder po trzecim podaniu PBL (wizyta 6(2)) ($15,95 \pm 6,32\%$) w porównaniu z wizytą 1 ($3,37 \pm 3,45\%$) ($p < 0,001$) i wizytą 4 przed podaniem ($3,97 \pm 1,88\%$) ($p < 0,001$) i po podaniu PBL ($5,19 \pm 1,89\%$) ($p < 0,01$). Uśredniony wynik między grupami cząsteczki HLA-DR na limfocytach Th (ryc. 97 [B]) z całego okresu badania klinicznego wykazał jej najwyższy procent w grupie responder ($11,3 \pm 6,9\%$) w porównaniu z grupami non-responder ($7,8 \pm 5,6\%$) ($p < 0,01$) oraz null ($7,6 \pm 3,3\%$) ($p < 0,01$). Pod koniec obserwacji (wizyta 7) procent CD8+HLA-DR (ryc. 98 [A]) we krwi w grupie non-responder ($11,69 \pm 5,86\%$) był istotnie niższy w porównaniu z grupą responder ($23,26 \pm 11,23\%$) ($p < 0,05$). Odnotowano wyższy procent cząsteczki HLA-DR na limfocytach Tc (ryc. 98 [B]) wśród zestawienia ze wszystkich wyników dla grupy responder ($17,6 \pm 11\%$) w porównaniu z grupą non-responder ($10,1 \pm 7,7\%$) ($p < 0,0001$), a dla grupy null wynik wyniósł $14 \pm 6,7\%$.

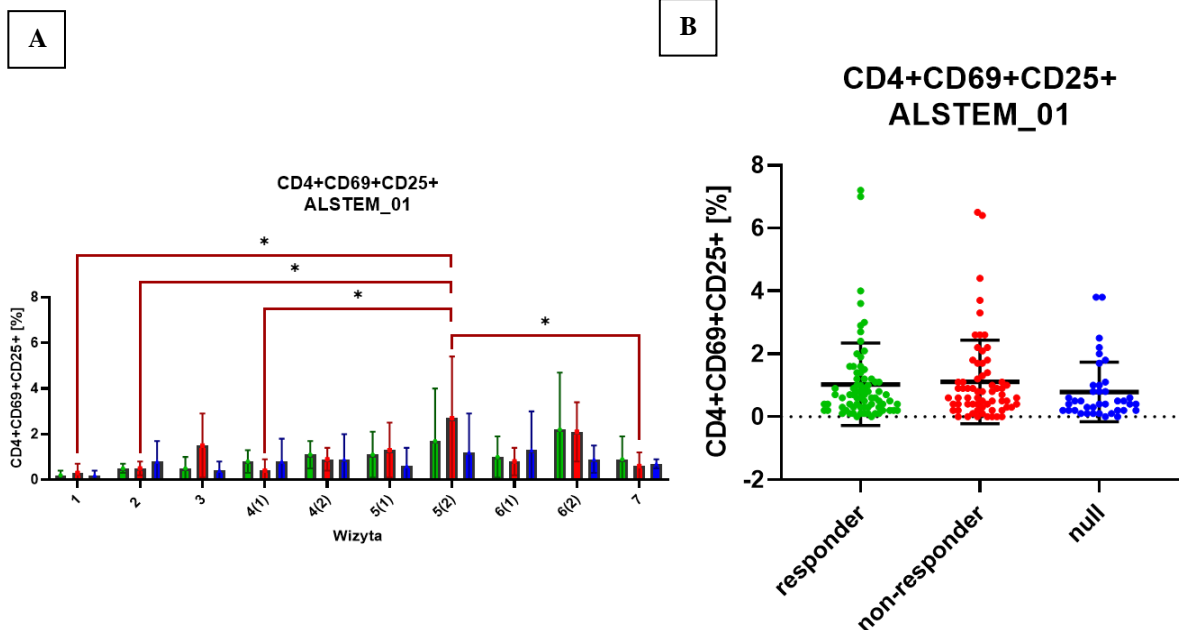


Ryc. 97. Wartość procentowa markera HLA-DR+ na limfocytach Th we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe markera HLA-DR+ na limfocytach Th (CD4+HLA-DR+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. [B] Średnie wartości procentowe markera HLA-DR+ na limfocytach Th (CD4+HLA-DR+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; ** p < 0,01

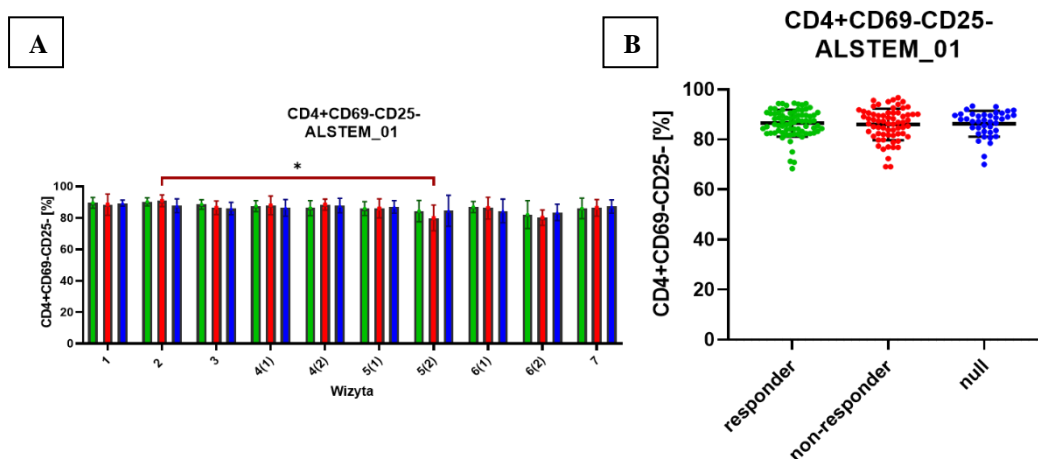


Ryc. 98. Wartość procentowa markera HLA-DR+ na limfocytach Tc we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe markera HLA-DR+ na limfocytach Tc (CD8+HLA-DR+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05, ** p < 0,01. [B] Średnie wartości procentowe markera HLA-DR+ na limfocytach Tc (CD8+HLA-DR+) w grupach: grupa responder n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; **** p < 0,0001

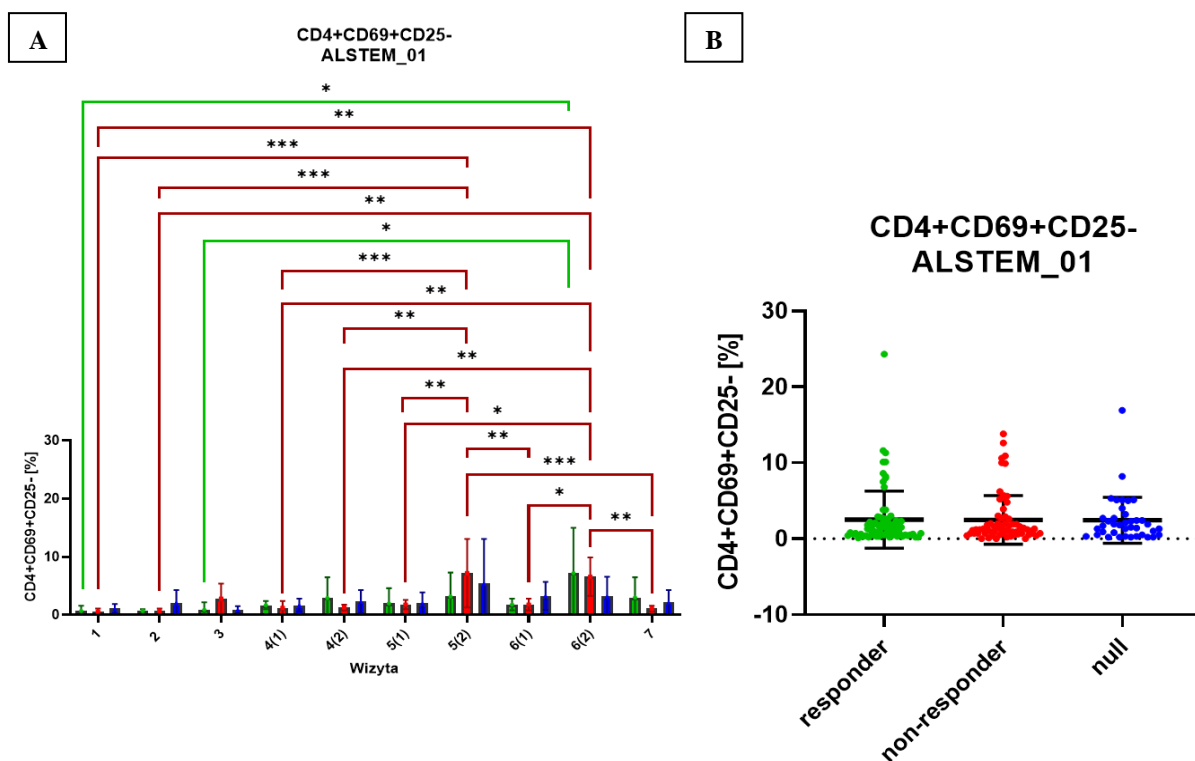
Procent komórek o profilu CD4+CD69-CD25- (limfocyty Th nieaktywowane) (ryc. 100 [A]) we krwi po drugim podaniu PBL – wizyta 5(2) ($79,93 \pm 8,18\%$) zmniejszył się w grupie non-responder w porównaniu z wcześniejszą wizytą, wizytą 2 ($90,77 \pm 3,67\%$) ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano istotnych zmian między grupami w czasie wizyt 1–7 (ryc. 100 [B]), gdzie procent dla grupy responder wyniósł $86,5 \pm 5,4\%$, non-responder: $86 \pm 6,3\%$ i null: $86,3 \pm 5,2\%$. Procent CD4+CD69+CD25- (aktywacja wczesna na limfocytach Th) (ryc. 101 [A]) w grupie non-responder po drugim podaniu BPL we krwi był istotnie wyższy ($7,16 \pm 5,9\%$) w porównaniu z pomiarem z wizyty 1 ($0,55 \pm 0,52\%$) ($p < 0,001$), wizyty 2 ($0,67 \pm 0,38\%$) ($p < 0,001$), wizyty 4(1) ($1,2 \pm 1,2\%$) ($p < 0,001$), wizyty 4(2) ($1,29 \pm 0,54\%$) ($p < 0,05$), a także wizyty 5(1) ($1,83 \pm 0,77\%$) ($p < 0,001$). Po trzecim podaniu PBL ($6,58 \pm 3,27\%$) procent wzrósł istotnie w porównaniu z wynikami z wizyty 1 ($0,55 \pm 0,52\%$) ($p < 0,001$), wizyty 2 ($0,67 \pm 0,38\%$) ($p < 0,01$), a także wizyty 4 – w momencie przyjęcia ($1,2 \pm 1,2\%$) ($p < 0,01$), jak i po podaniu ($1,29 \pm 0,54\%$) ($p < 0,01$) oraz wizyty 5 – przed podaniem BPL ($1,83 \pm 0,77\%$) ($p < 0,05$). Poziom CD4+CD69+CD25- w momencie hospitalizacji podczas wizyty 6 ($1,77 \pm 1\%$) był niższy w porównaniu z pomiarem w czasie wizyty 5(2) ($7,16 \pm 5,9\%$) po drugim podaniu BPL ($p < 0,01$) i niższy w porównaniu z wizytą 6(2) ($6,58 \pm 3,27\%$) ($p < 0,05$) dla grupy non-responder. Procent CD4+CD69+CD25- w grupie non-responder w czasie wizyty 7 ($1,06 \pm 0,51\%$), kończącej obserwację, był niższy w porównaniu z wizytą 6(2) ($6,58 \pm 3,27\%$) ($p < 0,01$). Średnia aktywacja wczesna na limfocytach Th wśród grup w czasie całego badania klinicznego (ryc. 101 [B]) była na poziomie $2,5 \pm 3,8\%$ dla grupy responder, $2,5 \pm 3,2\%$ dla grupy non-responder i $2,4 \pm 3\%$ dla grupy null. Procent CD4+CD69+CD25+ (aktywacja właściwa na limfocytach Th) (ryc. 99 [A]) zmieniał się trakcie trwania badania klinicznego w grupie non-responder. Zwiększył się na wizycie 5 – po drugim podaniu BPL ($2,7 \pm 2,67\%$) w porównaniu zarówno z wizytą 2 ($0,45 \pm 0,29\%$) ($p < 0,05$), jak i wizytą 1 ($0,27 \pm 0,36\%$) ($p < 0,05$). Procent zmniejszył się także podczas wizyty 7 ($0,63 \pm 0,58\%$) względem wizyty 5(2) ($2,7 \pm 2,67\%$) ($p < 0,05$). Średnia aktywacja właściwa na limfocytach Th wśród grup w czasie wizyt 1–7 (ryc. 99 [B]) była na poziomie $1 \pm 1,3\%$ w grupie responder, $1,1 \pm 1,3\%$ w grupie non-responder i $0,8 \pm 0,9\%$ w grupie null.



Ryc. 99. Wartość procentowa aktywacji właściwej na limfocytach Th we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe aktywacji właściwej na limfocytach Th (CD4+CD69+CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości procentowe aktywacji właściwej na limfocytach Th (CD4+CD69+CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony), grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)



Ryc. 100. Wartość procentowa limfocytów Th nieaktywowanych we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Th nieaktywowanych (CD4+CD69-CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; *p < 0,05. [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Th nieaktywowanych (CD4+CD69-CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)

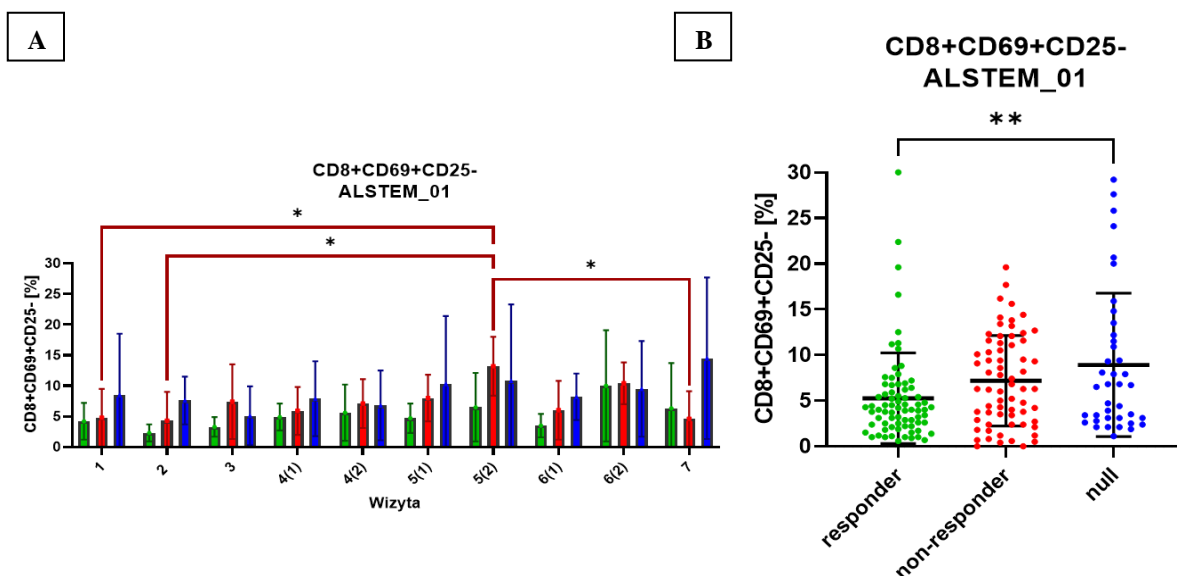


Ryc. 101. Wartość procentowa aktywacji wczesnej na limfocytach Th we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe aktywacji wczesnej na limfocytach Th (CD4+CD69+CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. [B] Średnie wartości procentowe aktywacji wczesnej na limfocytach Th (CD4+CD69+CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom CD8+CD69-CD25- (limfocyty Tc nieaktywowane) (ryc. 104 [A]) obniżył się w grupie non-responder po drugim podaniu BPL ($72,57 \pm 20\%$) w porównaniu z pierwszym podaniem ($85,04 \pm 10,25\%$) ($p < 0,05$), wizytą 2 ($91,1 \pm 4,86\%$) ($p < 0,01$) i wizytą 1 ($88,07 \pm 12,61\%$) ($p < 0,05$). Nie było istotnych różnic między grupami w uśrednionych wynikach ze wszystkich wizyt dla limfocytów Tc nieaktywowanych (ryc. 104 [B]). Ich procent wynosił dla grupy responder $80,2 \pm 15,6\%$, non-responder: $80 \pm 13,6\%$ oraz null: $75,2 \pm 13,6\%$. Najwyższy procent CD8+CD69+CD25- (aktywacja wczesna na limfocytach Tc) (ryc. 102 [A]) i CD8+CD69+CD25+ (aktywacja właściwa na limfocytach Tc) (ryc. 103 [A]) obserwowano po drugim podaniu BPL w grupie pacjentów non-responder. Poziom CD8+CD69+CD25- (ryc. 102 [A]) podczas wizyty 5(2) ($13,17 \pm 4,77\%$) był wyższy w porównaniu z wizytą 1 ($4,82 \pm 4,7\%$) ($p < 0,05$), wizytą 2 ($4,32 \pm 4,69\%$) ($p < 0,05$) oraz z próbkami krwi pobranymi po zakończeniu terapii komórkowej WJ-MSC na wizycie 7 ($4,56 \pm 4,45\%$) ($p < 0,05$). Średni procent podczas

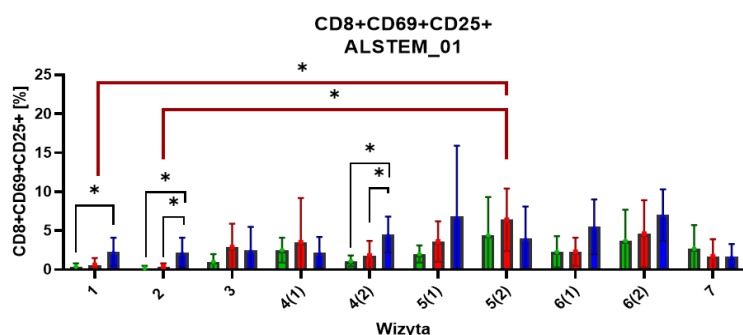
całego badania klinicznego aktywacji wczesnej na limfocytach Tc (ryc. 102 [B]) wyniósł w grupie responder $2,1 \pm 2,7\%$, non-responder: $2,8 \pm 3,4\%$, a null: $3,9 \pm 3,9\%$.

Ilość procentowa CD8+CD69+CD25+ (ryc. 103 [A]) po drugim podaniu BPL ($6,36 \pm 4\%$) wzrosła w porównaniu z wizytą 2 ($0,35 \pm 0,4\%$) ($p < 0,05$) i wizytą 1 ($0,62 \pm 0,95\%$) ($p < 0,05$) w grupie non-responder. Procent CD8+CD69+CD25+ w grupie null ($4,45 \pm 2,26\%$) był wyższy w porównaniu z grupą responder ($0,99 \pm 0,63\%$) na wizycie 4 – po podaniu leku w porównaniu z wizytą 2 ($p < 0,05$) i wizytą 1 ($p < 0,05$). Na wizycie 4 – po podaniu BPL i wizycie 2 procent CD8+CD69+CD25+ był również wyższy w grupie null w porównaniu z grupą pacjentów non-responder ($p < 0,05$). Średni procent ze wszystkich wizyt wśród grup dla aktywacji właściwej na limfocytach Tc (ryc. 103 [B]) wyniósł $5,3 \pm 5$ w grupie responder, $7,2 \pm 5$ w grupie non-responder oraz $8,9 \pm 7,9$ w grupie null.

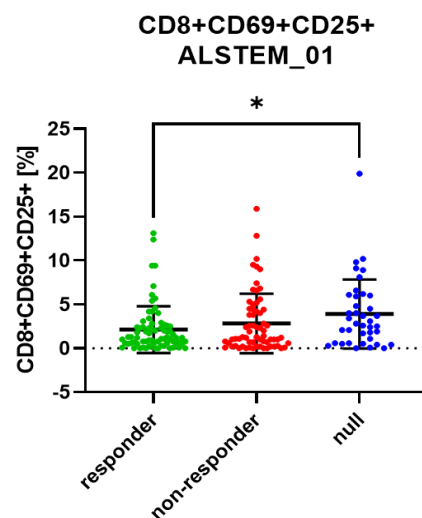


Ryc. 102. Wartość procentowa aktywacji wczesnej na limfocytach Tc we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe aktywacji wczesnej na limfocytach Tc (CD8+CD69+CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości procentowe aktywacji wczesnej na limfocytach Tc (CD8+CD69+CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; ** $p < 0,01$

A

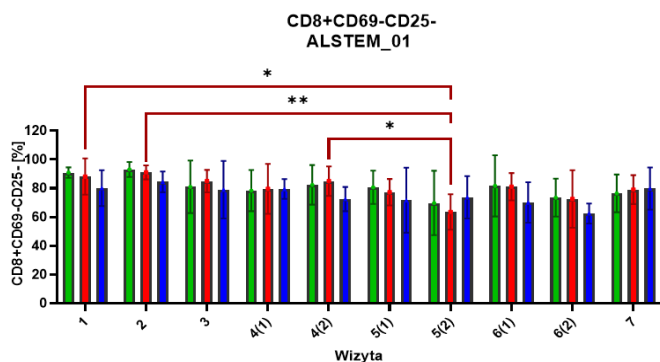


B

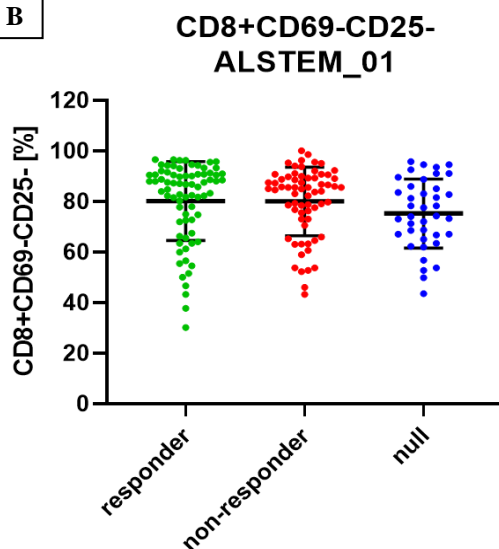


Ryc. 103. Wartość procentowa aktywacji właściwej na limfocytach Tc we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe aktywacji właściwej na limfocytach Tc (CD8+CD69+CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości procentowe aktywacji właściwej na limfocytach Tc (CD8+CD69+CD25+) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * p < 0,05

A



B

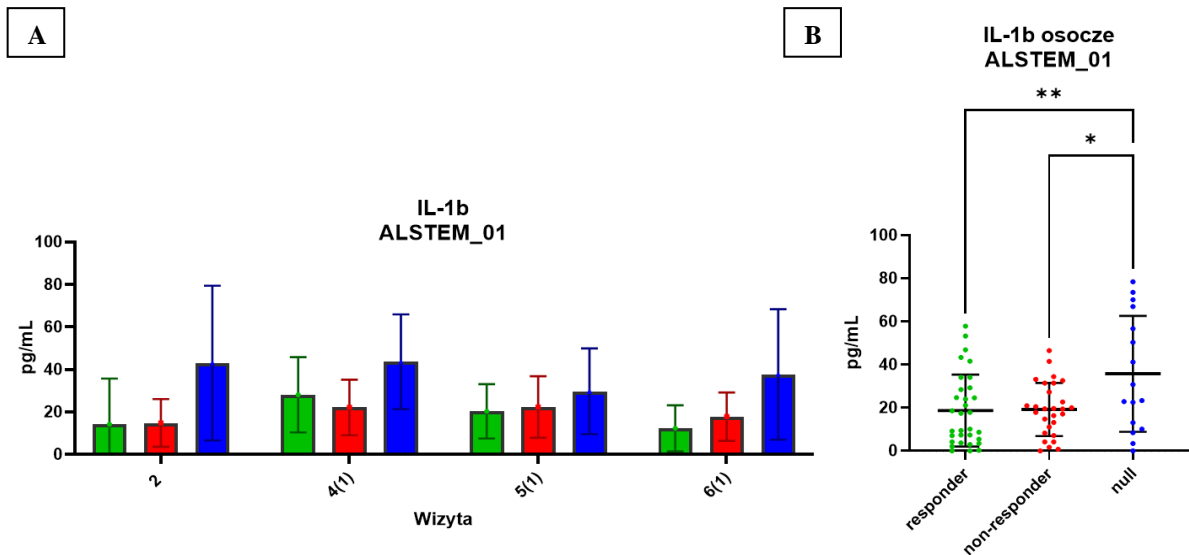


Ryc. 104. Wartość procentowa limfocytów Tc nieaktywowanych we krwi obwodowej pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc nieaktywowanych (CD8+CD69-CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05, ** p < 0,01. [B] Średnie wartości procentowe limfocytów Tc nieaktywowanych (CD8+CD69-CD25-) w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)

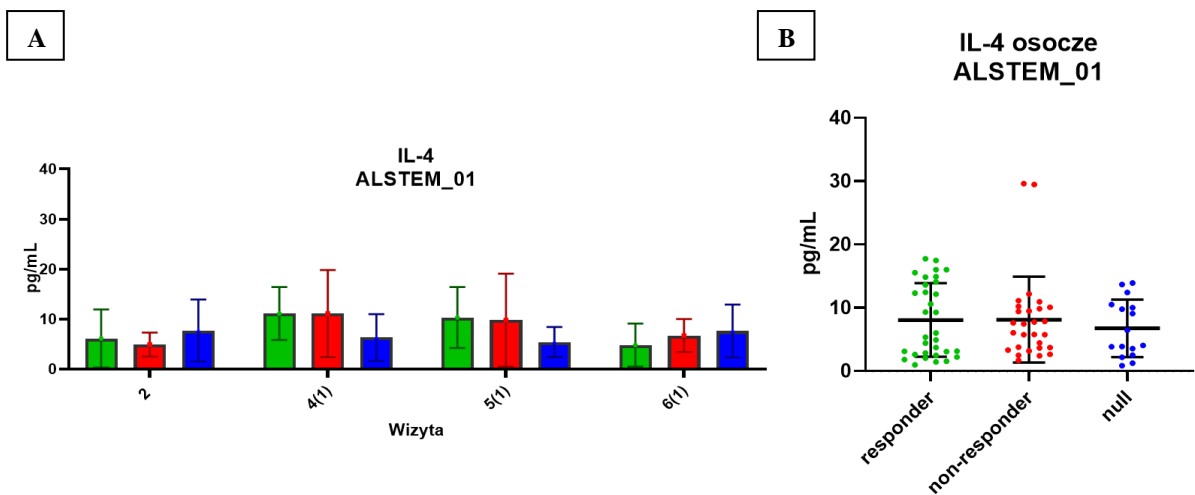
4.4.5. Wpływ terapii WJ-MSC na wybrane parametry w osoczu krwi obwodowej

W ocenie sekrecji krwi obwodowej nie zaobserwowano istotnych różnic dla wartości stężenia IL-1 β (ryc. 105 [A]), IL-4 (ryc. 106 [A]), IL-6 (ryc. 107 [A]), IL-12(p40) (ryc. 108 [A]), IL-13 (ryc. 109 [A]), TGF- β 2 (ryc. 110 [A]), TNF- α (ryc. 111 [A]), VEGF-A (ryc. 112 [A]) zarówno wśród grup pacjentów, jak i poszczególnych wizyt. W przypadku przedstawienia średnich wyników z całego badania klinicznego dla poszczególnych grup stężenie [pg/ml] w osoczu:

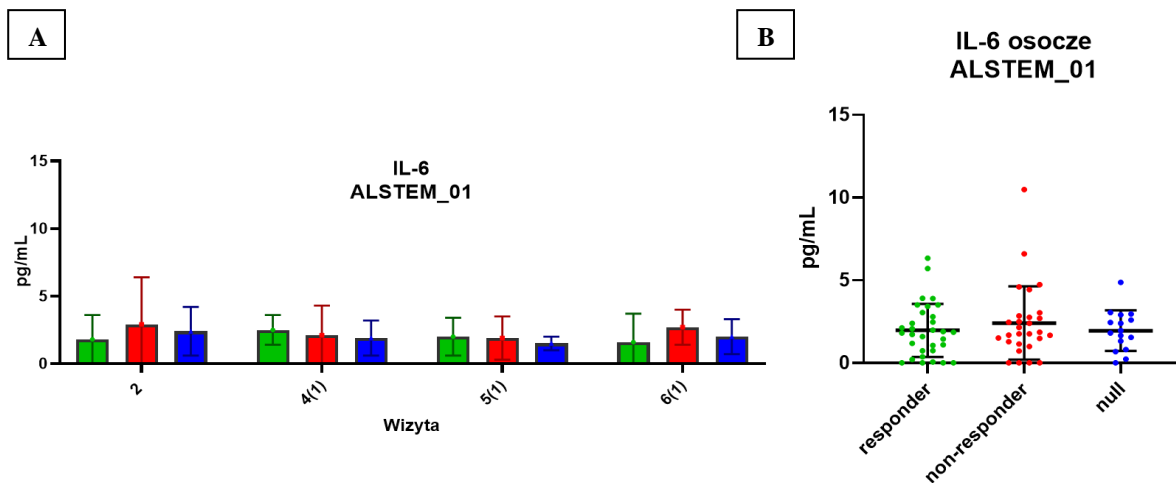
- IL-1 β (ryc. 105 [B]) było wyższe wśród grupy null ($35,8 \pm 26,9$ pg/ml) w porównaniu z grupą responder ($18,7 \pm 16,6$ pg/ml) ($p < 0,01$) i grupą non-responder ($19,2 \pm 12,3$ pg/ml) ($p < 0,05$);
- IL-4 (ryc. 106 [B]) nie wykazało istotnych statystycznie różnic wśród grup: responder: $8,1 \pm 5,8$ pg/ml, non-responder: $8,1 \pm 6,8$ pg/ml oraz null: $6,7 \pm 4,5$ pg/ml;
- IL-6 (ryc. 107 [B]) było bez istotnych statystycznie różnic wśród grup responder ($2 \pm 1,6$ pg/ml), non-responder ($2,4 \pm 2,2$ pg/ml) i null ($1,9 \pm 1,2$ pg/ml);
- IL-12(p40) (ryc. 108 [B]) wyniosło w grupie responder $97,4 \pm 49,6$ pg/ml, w non-responder: $94,1 \pm 43,6$ pg/ml, a w null: $109 \pm 58,8$ pg/ml;
- IL-13 (ryc. 109[B]) było bez istotnych statystycznie zmian wśród grup – wynik dla grupy responder wyniósł $135,5 \pm 109,5$ pg/ml, dla grupy non-responder: $135,7 \pm 95$ pg/ml, a dla null: $137,7 \pm 85,9$ pg/ml;
- TGF- β (ryc. 110 [B]) nie wykazało istotnych statystycznie różnic wśród grup – responder: $106,5 \pm 49,3$ pg/ml, non-responder: $105,8 \pm 61,6$ pg/ml oraz null: $66,9 \pm 51,7$ pg/ml;
- TNF- α (ryc. 111 [B]) było bez istotnych statystycznie zmian wśród grup – wynik dla grupy responder wyniósł $33,4 \pm 19,4$ pg/ml, dla grupy non-responder: $32,7 \pm 16,3$ pg/ml, a dla null: $28,4 \pm 13,3$ pg/ml;
- VEGF-A (ryc. 112 [B]) nie wykazało istotnych statystycznie różnic wśród grup – responder: $119,6 \pm 151,1$ pg/ml, non-responder: $117,7 \pm 12,3$ pg/ml, null: $74,1 \pm 64,1$ pg/ml.



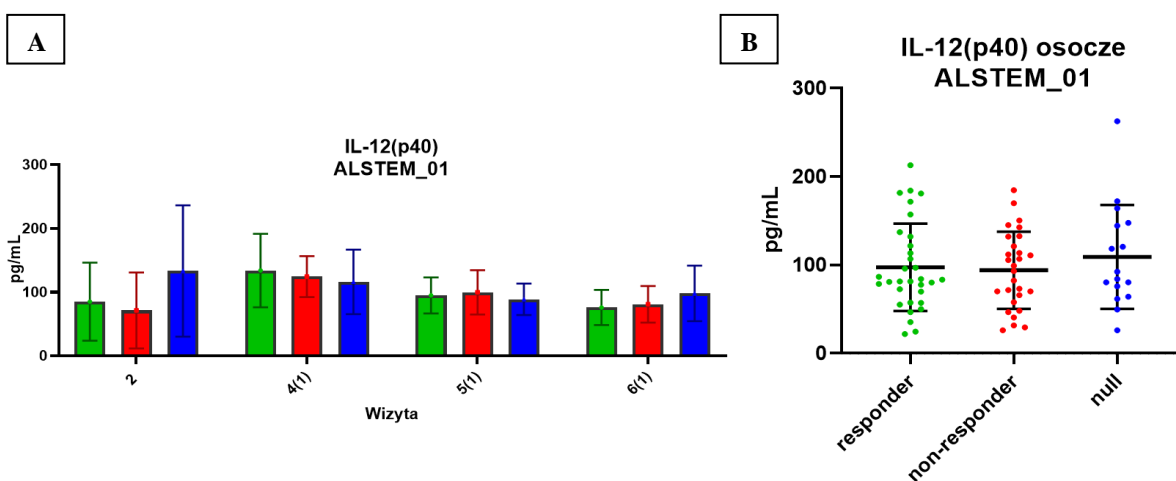
Ryc. 105. Stężenie IL-1b w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-1b [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-1b [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



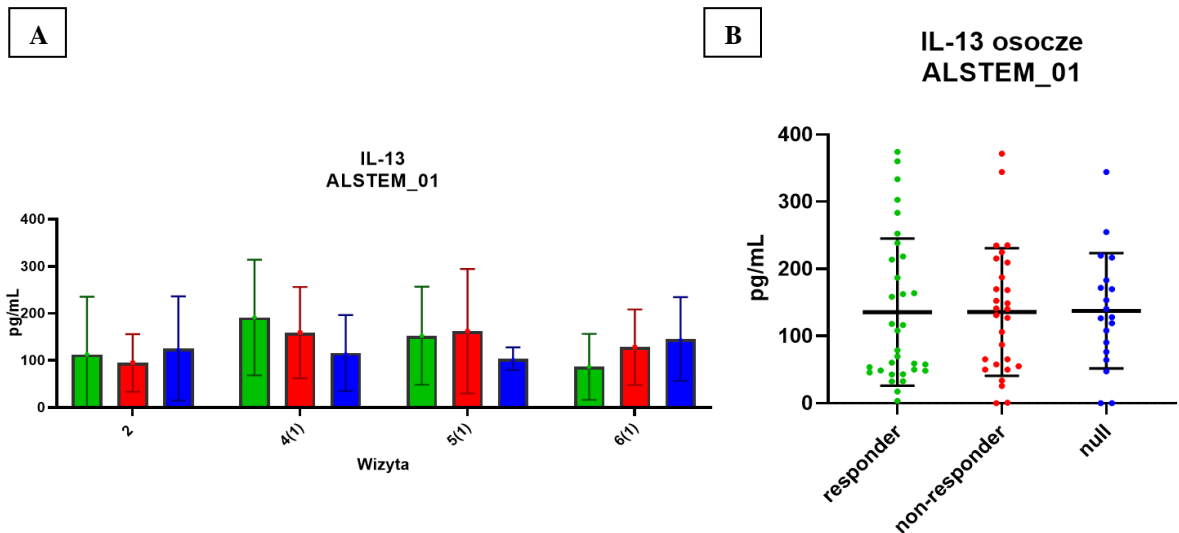
Ryc. 106. Stężenie IL-4 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-4 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-4 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



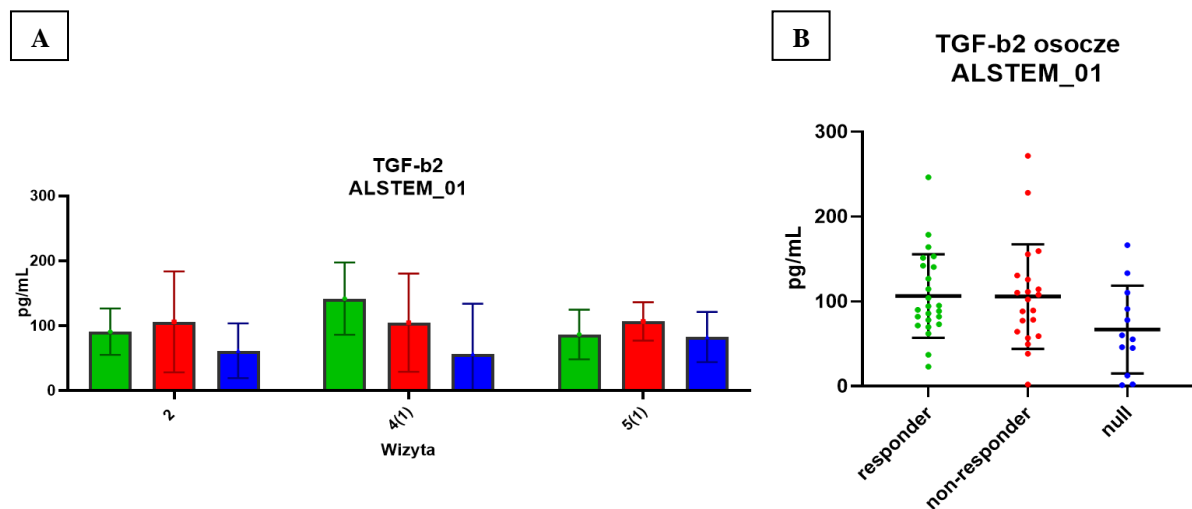
Ryc. 107. Stężenie IL-6 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-6 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-6 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



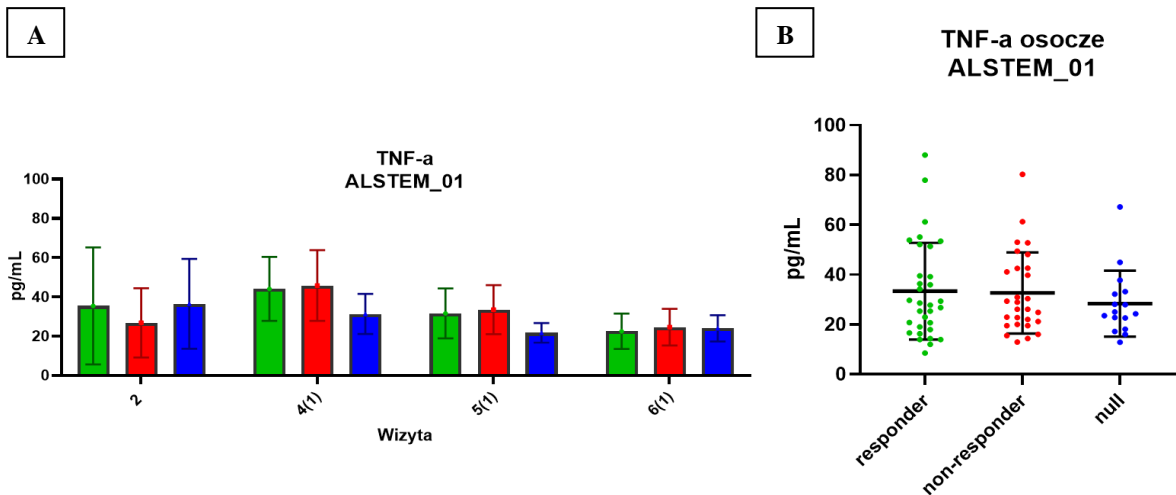
Ryc. 108. Stężenie IL-12(p40) w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-12(p40) [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-12(p40) [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



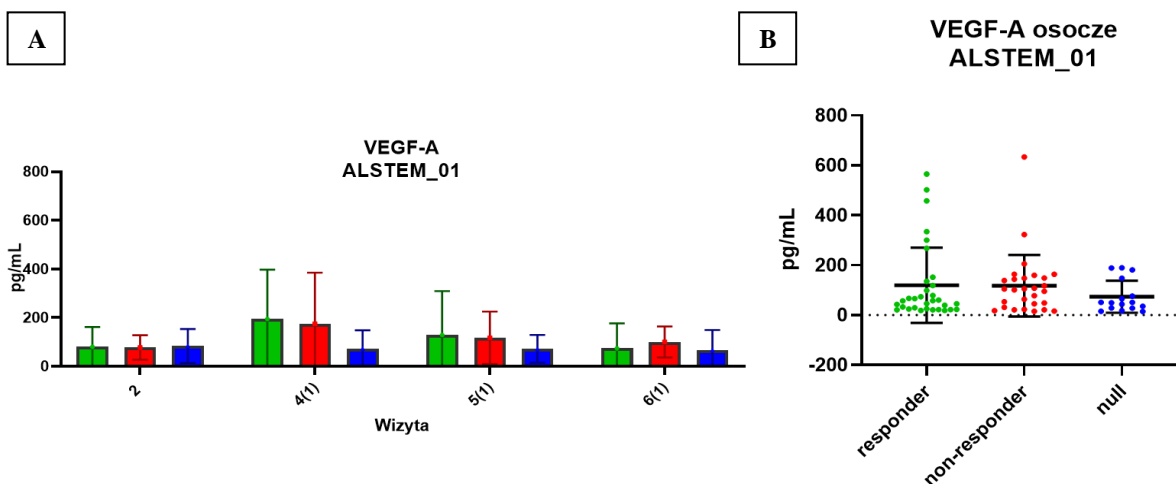
Ryc. 109. Stężenie IL-13 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-13 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-13 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



Ryc. 110. Stężenie TGF-β2 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia TGF-β2 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia TGF-β2 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony), grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony), grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

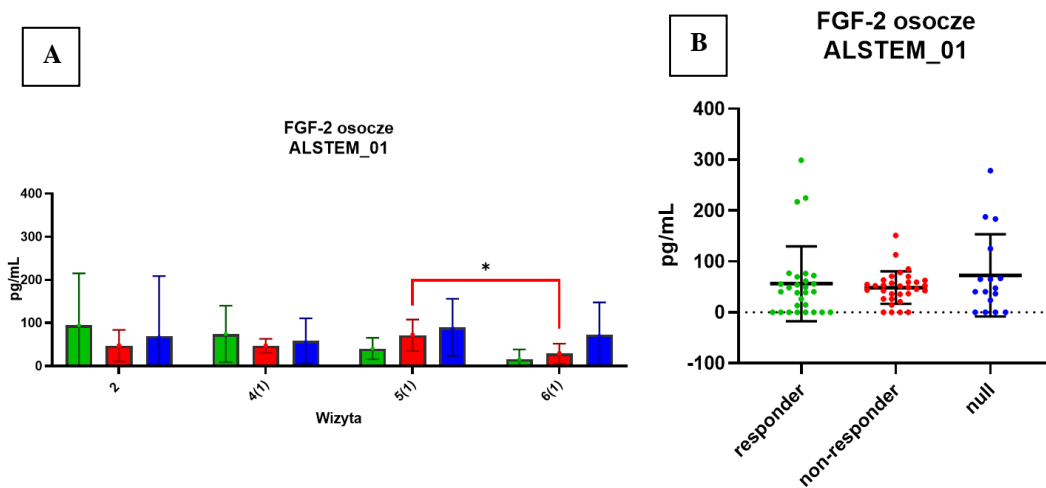


Ryc. 111. Stężenie TNF- α w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia TNF- α [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia TNF- α [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



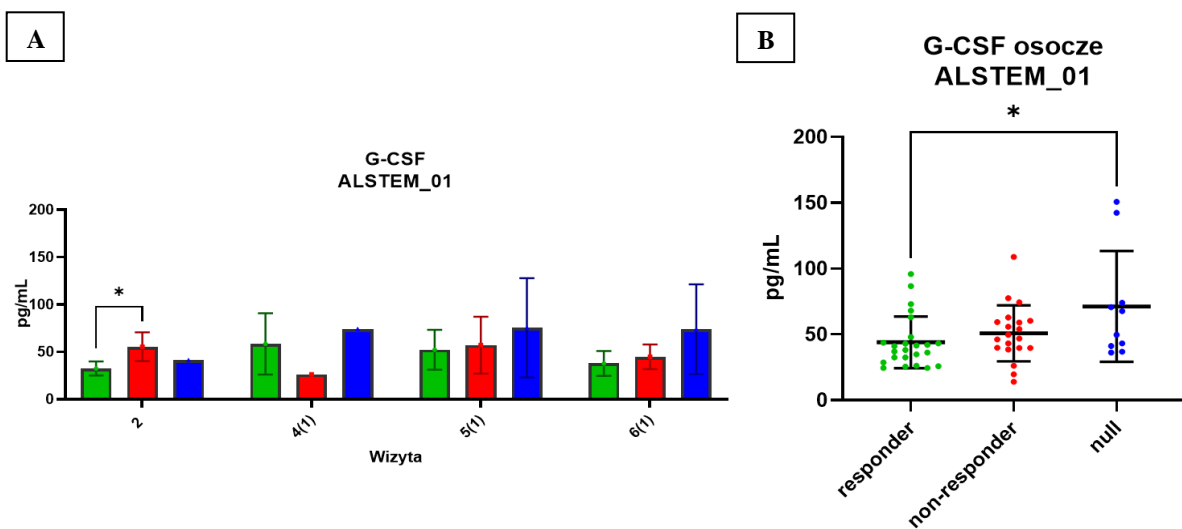
Ryc. 112. Stężenie VEGF-A w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia VEGF-A [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia VEGF-A [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom FGF-2 w osoczu z krwi obwodowej (ryc. 113 [A]) obniżył się w grupie non-responder ($28,94 \pm 23,22$ pg/ml) podczas wizyty 6 w porównaniu z wcześniejszą wizytą 5 ($71,6 \pm 36,4$ pg/ml) ($p < 0,05$). Nie było istotnych statystycznie różnic wśród grupowych wyników ze wszystkich pomiarów; stężenie w grupie responder wyniosło $56,3 \pm 73,4$ pg/ml, w grupie non-responder: $48,7 \pm 31,9$ pg/ml, a w grupie null: $72,6 \pm 80,9$ pg/ml.



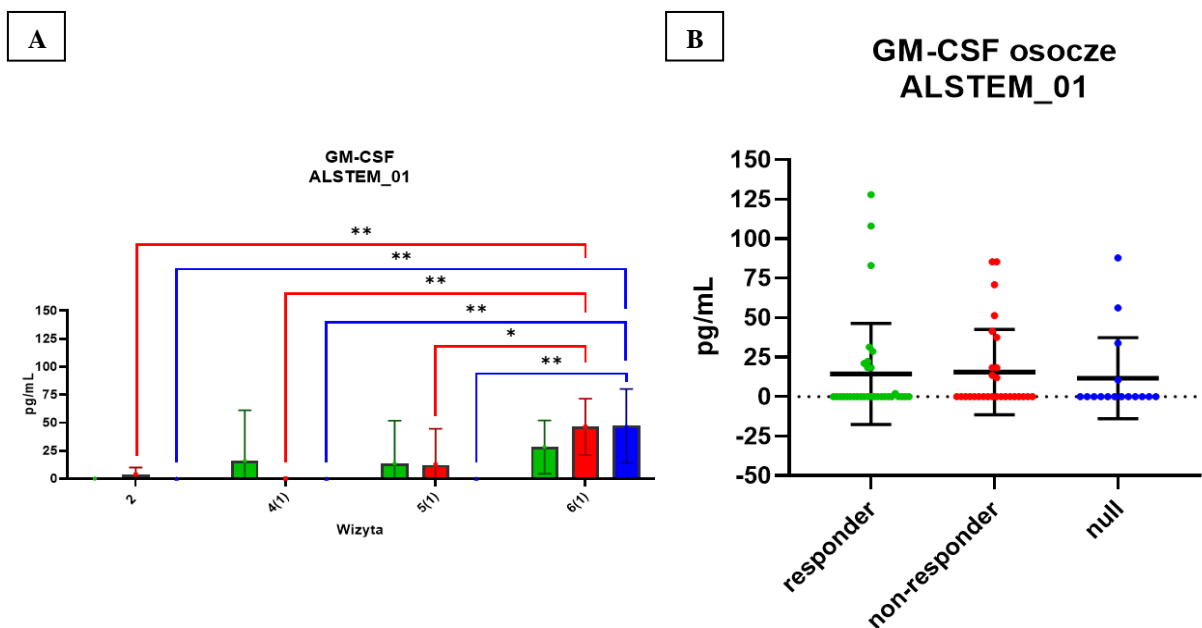
Ryc. 113. Stężenie FGF-2 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia FGF-2 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia FGF-2 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom G-CSF w osoczu (ryc. 114 [A]) był wyższy w grupie osób non-responder (55,49 ± 15,19 pg/ml) w porównaniu z grupą responder (32,36 ± 7,46 pg/ml) ($p < 0,05$) podczas wizyty 2. Zaobserwowano wyższe stężenie G-CSF ze wszystkich wykonanych pomiarów (ryc. 114 [B]) w grupie null (71,3 ± 42,1 pg/ml) w porównaniu z grupą responder (44 ± 19,5 pg/ml) ($p < 0,05$); w grupie non-responder wynik pomiaru wyniósł 50,9 ± 21,3 pg/ml.



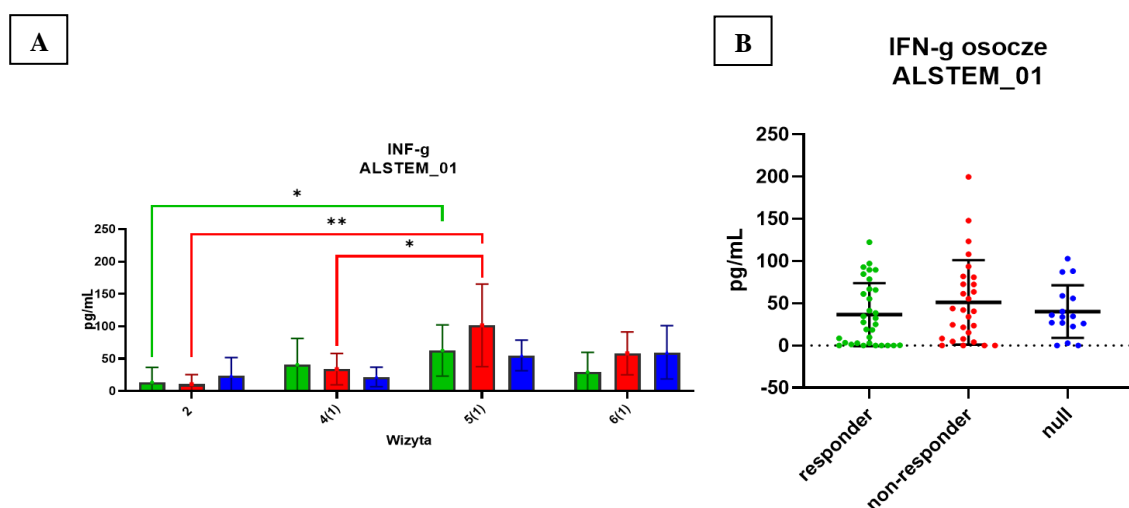
Ryc. 114. Stężenie G-CSF w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia G-CSF [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia G-CSF [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom GM-CSF (ryc. 115 [A]) zmienił się zarówno w grupie null, jak i non-responder. W grupie pacjentów null stężenie GM-CSF było najwyższe w czasie wizyty 6 ($47,13 \pm 32,95$ pg/ml), istotnie przekraczając ten parametr w porównaniu z wizytą 5 (0 pg/ml) ($p < 0,01$), wizytą 4 (0 pg/ml) ($p < 0,01$) oraz wizytą 2 (0 pg/ml) ($p < 0,01$). W grupie osób non-responder poziom GM-CSF także był najwyższy podczas wizyty 6 ($46,25 \pm 25,21$ pg/ml), istotnie przekraczając ten parametr względem wizyty 5 ($12,21 \pm 32,3$ pg/ml), ($p < 0,05$), wizyty 4 (0 pg/ml) ($p < 0,01$) oraz wizyty 2 ($3,67 \pm 6,29$ pg/ml) ($p < 0,01$). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic dla stężenia GM-CSF wśród wszystkich pomiarów (ryc. 115 [B]) dla grupy responder ($14,4 \pm 32$ pg/ml), non-responder ($15,5 \pm 27$ pg/ml) oraz null ($11,8 \pm 25,7$ pg/ml).

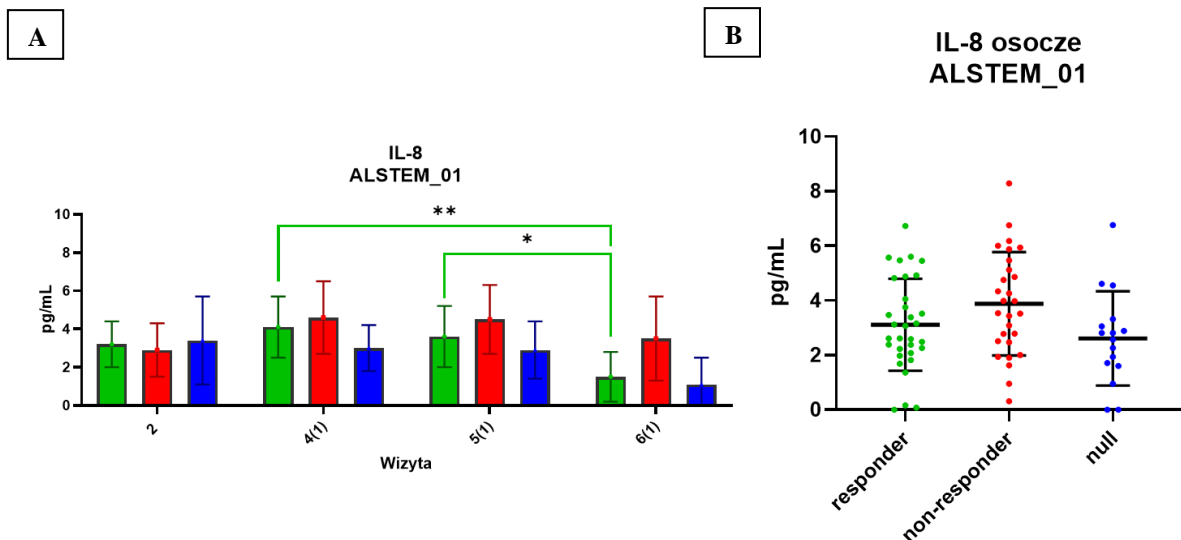


Ryc. 115. Stężenie GM-CSF w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia GM-CSF [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości stężenia GM-CSF [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom INF- γ (ryc. 116 [A]) na wizycie 5 ($95,76 \pm 61,24$ pg/ml) wśród osób non-responder był wyższy w porównaniu z wizytą 4 ($33,16 \pm 22,41$ pg/ml) ($p < 0,5$) i wizytą 2 ($13,56 \pm 16$ pg/ml) ($p < 0,01$). W grupie responder poziom INF- γ w osoczu krwi podczas wizyty 5 ($59,52 \pm 41,67$ pg/ml) był wyższy w porównaniu z wizytą 2 ($15,53 \pm 24,39$ pg/ml) ($p < 0,05$). W przypadku przedstawienia średnich wyników z całego badania klinicznego dla poszczególnych grup – stężenie INF- γ w osoczu grupy responder wyniosło $36,6 \pm 37,2$ pg/ml, grupy non-responder: $51,1 \pm 50$ pg/ml, a grupy null: $40,2 \pm 31,2$ pg/ml. Pod wpływem BPL poziom IL-8 (ryc. 117 [A]) wśród grupy responder obniżył się podczas wizyty 6 ($1,53 \pm 1,3$ pg/ml) w porównaniu z wizytą 5 ($3,57 \pm 1,57$ pg/ml) ($p < 0,05$) i wizytą 4 ($4,14 \pm 1,62$ pg/ml) ($p < 0,01$). Uśrednione wyniki IL-8 (ryc. 117 [A]) z całego badania klinicznego (wizyty 1–7) dla poszczególnych grup przedstawiały się następująco: grupa responder: $3,1 \pm 1,7$ pg/ml, non-responder: $3,9 \pm 1,9$ pg/ml, null: $2,6 \pm 1,7$ pg/ml.



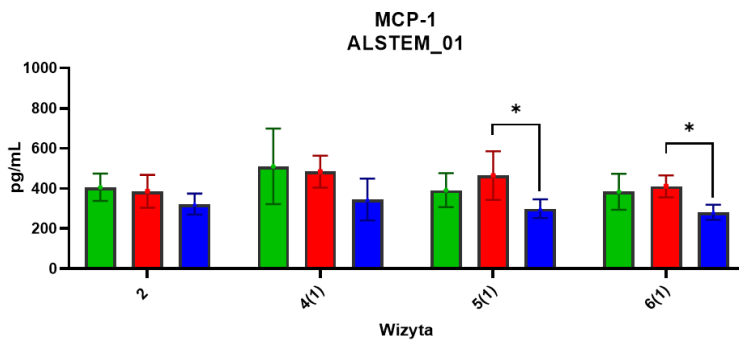
Ryc. 116. Stężenie IFN- γ w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IFN- γ [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości stężenia IFN- γ [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



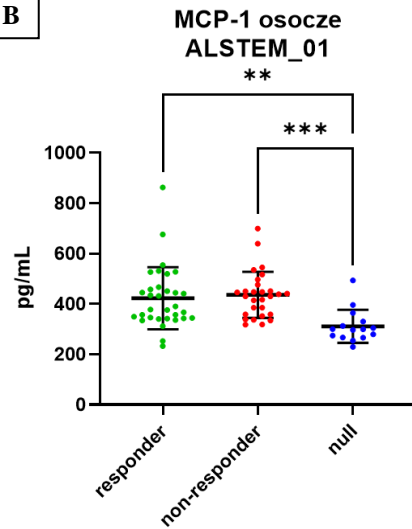
Ryc. 117. Stężenie IL-8 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-8 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości stężenia IFN- γ [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Zaobserwowano istotną zmianę poziomu MCP-1 (ryc. 118 [A]) wśród grup non-responder i null na wizycie 5 i wizycie 6. Podczas wizyty 5 ($299,33 \pm 46,25$ pg/ml) grupa null miała niższe stężenie MCP-1 w porównaniu z grupą non-responder ($464,41 \pm 120,92$ pg/ml) ($p < 0,05$). Zależność tę zaobserwowano również na wizycie 6 – grupa null ($281,65 \pm 37,56$ pg/ml) a grupa non-responder ($410,84 \pm 54,58$ pg/ml) ($p < 0,05$). Średnie pomiary z całego badania klinicznego dla poszczególnych grup wykazały, że stężenie MCP-1 w osoczu było niższe w grupie null (311 ± 66 pg/ml) w porównaniu z grupą responder (423 ± 123 pg/ml) ($p < 0,01$) i grupą non-responder (436 ± 92 pg/ml) ($p < 0,001$). W przypadku MIP-1 β (ryc. 119 [A]) poziom zmniejszył się w grupie pacjentów non-responder na wizycie 6 ($31,23 \pm 10$ pg/ml) w porównaniu z wizytą 5 ($49,54 \pm 10,6$ pg/ml) ($p < 0,05$). Brak było istotnych różnic wśród grup dla pomiaru stężenia MIP-1 β (ryc. 119 [B]): grupa responder: $42,6 \pm 12,9$ pg/ml, grupa non-responder: $40 \pm 11,9$ pg/ml, grupa null: $38,8 \pm 8,2$ pg/ml).

A

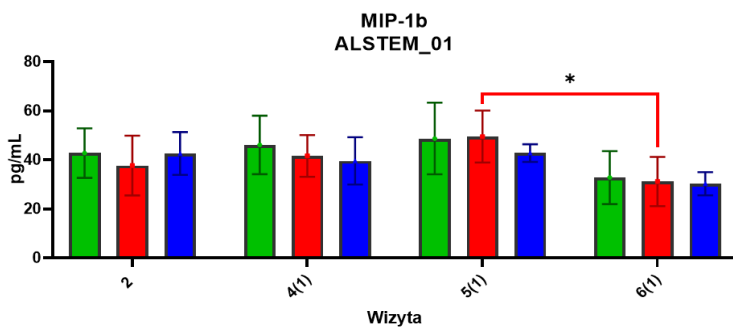


B

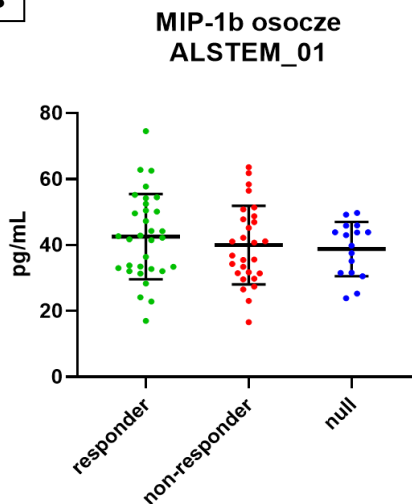


Ryc. 118. Stężenie MCP-1 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia MCP-1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości stężenia MCP-1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; ** p < 0,01, *** p < 0,001

A

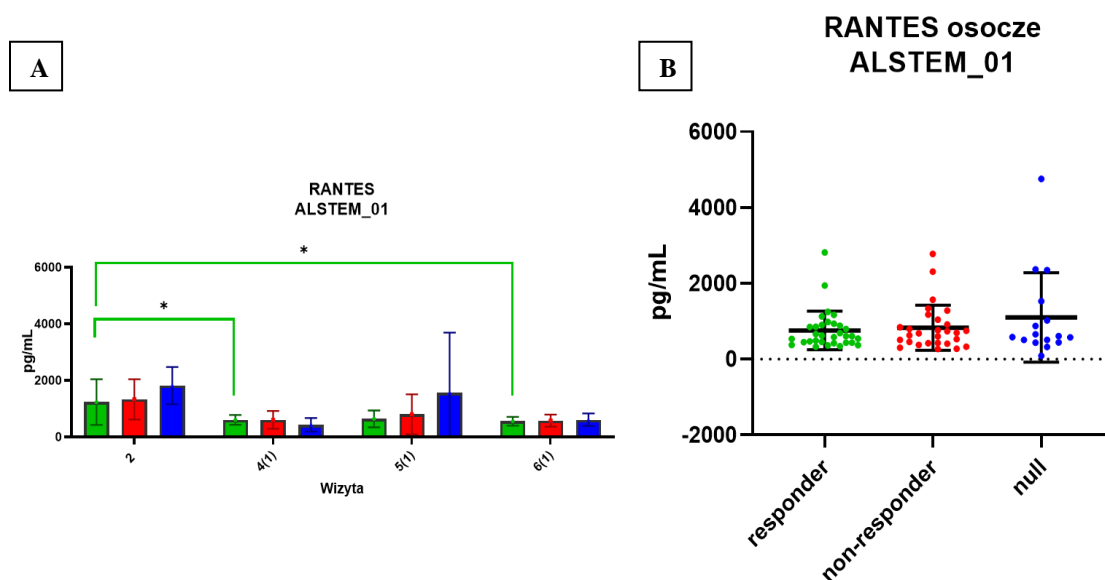


B

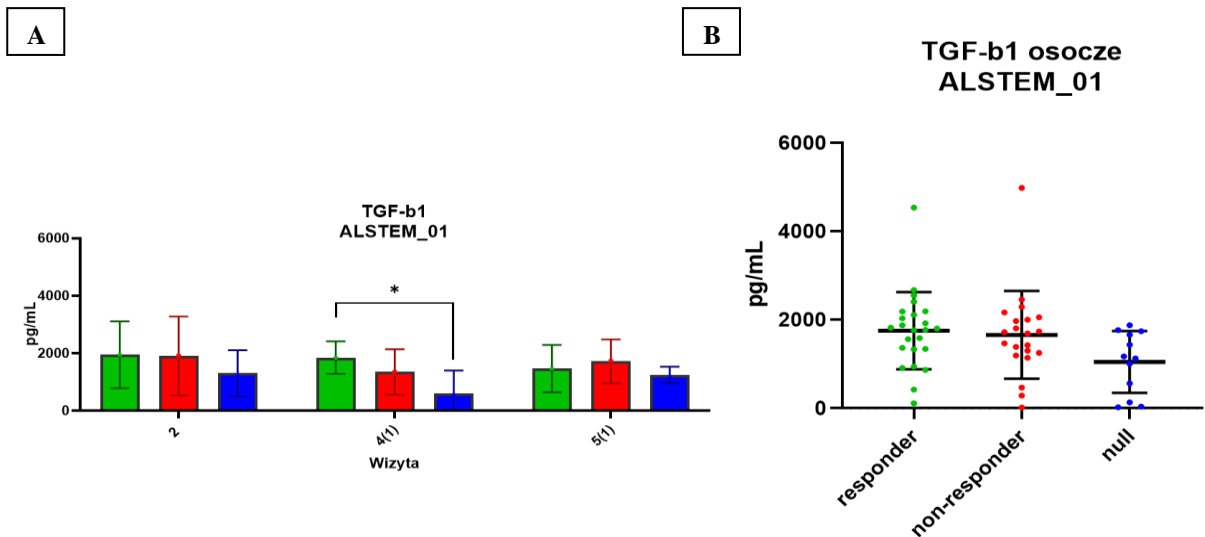


Ryc. 119. Stężenie MIP-1β w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia MIP-1β [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości stężenia MIP-1β [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)

Poziom RANTES (ryc. 120 [A]) zmienił się w grupie responder i był najniższy na wizycie 6 ($556,31 \pm 157,54$ pg/ml) i statystycznie istotnie niższy w porównaniu z wizytą 2 (1234 ± 806 pg/ml) ($p < 0,05$). Również istotnie niższy RANTES wystąpił na wizycie 4 (608 ± 174 pg/ml) w porównaniu z wizytą 2 (1234 ± 806 pg/ml) ($p < 0,05$). Nie wykazano istotnych różnic wśród grup dla uśrednionych wszystkich pomiarów stężenia RANTES (ryc. 120 [B]) dla grupy responder (759 ± 508 pg/ml), grupy non-responder (830 ± 593 pg/ml) ani grupy null (1103 ± 1182 pg/ml). Poziom TGF- β 1 (ryc. 121 [A]) w grupie null podczas wizyty 4 (591 ± 809 pg/ml) był niższy w porównaniu z grupą responder (1849 ± 568 pg/ml) ($p < 0,05$). Brak było istotnych różnic dla uśrednionych pomiarów z wizyt 1–7 stężenia TGF- β 1 wśród grup (ryc. 121 [B]) – grupa responder: 1755 ± 872 pg/ml, grupa non-responder: 1659 ± 992 pg/ml, grupa null: 1046 ± 701 pg/ml.



Ryc. 120. Stężenie RANTES w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia RANTES [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia RANTES [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



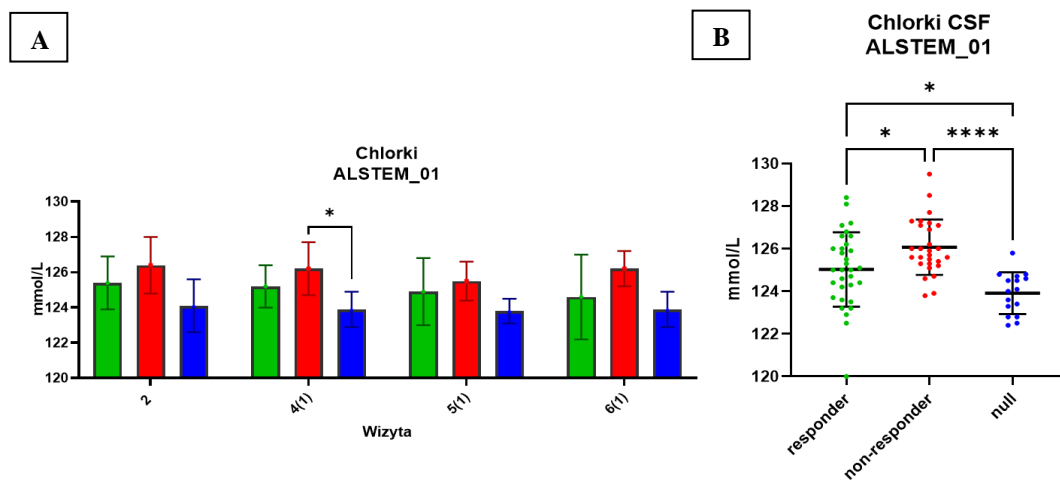
Ryc. 121. Stężenie TGF-β1 w osoczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia TGF-β1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05. [B] Średnie wartości stężenia TGF-β1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05)

4.4.6. Wpływ terapii WJ-MSC na wybrane parametry w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF)

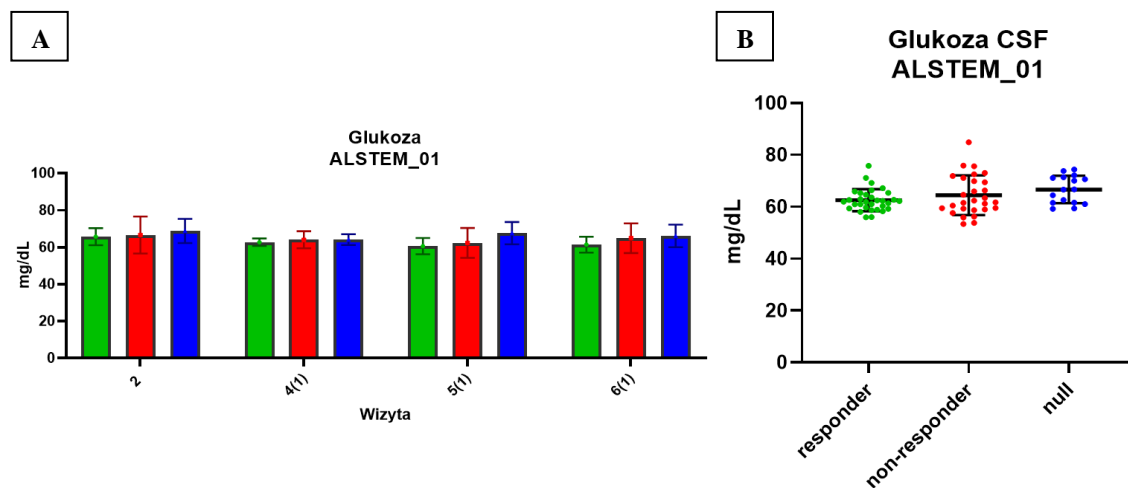
W świeżym materiale płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF) pacjentów wykonano oznaczenia poziomu chlorków (ryc. 122 [A]), glukozy (ryc. 123 [A]) oraz białka całkowitego (ryc. 124 [A]). W przypadku chlorków na wizycie 4(1) bezpośrednio przed podaniem BPL wystąpiła różnica związana z ich mniejszym stężeniem w grupie null ($123,9 \pm 0,96$ mmol/l) w porównaniu z grupą non-responder ($126,2 \pm 1,5$ mmol/l) (p < 0,05). W przypadku stężenia białka całkowitego oraz glukozy nie stwierdzono istotnych różnic między grupami czy poszczególnymi wizytami. Analizując wyniki w postaci uśrednionych pomiarów wybranych analitów w CSF dla wizyt 1–7 wśród grup, można zaobserwować:

- dla chlorków – najwyższe stężenie w przypadku grupy non-responder (126 ± 1 mmol/l) w porównaniu z grupami responder (125 ± 2 mmol/l) (p < 0,05) oraz null (124 ± 1 mmol/l) (p < 0,0001), również istotnie wyższe stężenie oznaczono w grupie responder (125 ± 2 mmol/l) w porównaniu z grupą null (124 ± 1 mmol/l) (p < 0,05);
- dla glukozy – brak istotnych różnic wśród grup responder (63 ± 4 mg/dl), non-responder (65 ± 8 mg/dl) oraz null (67 ± 5 mg/dl);

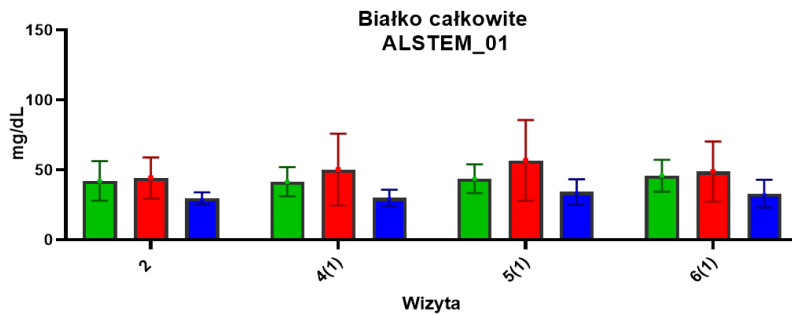
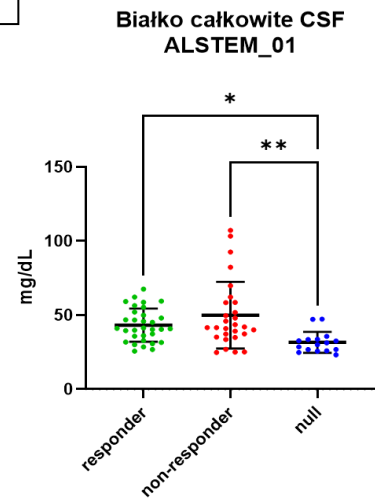
- dla białka całkowitego – niższe stężenie dla grupy null (32 ± 7 mg/dl) w zestawieniu z grupami responder (43 ± 11 mg/dl) ($p < 0,05$) oraz non-responder (50 ± 22 mg/dl) ($p < 0,01$).



Ryc. 122. Stężenie chlorków w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia chlorków [mmol/l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia chlorków [mmol/l] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$

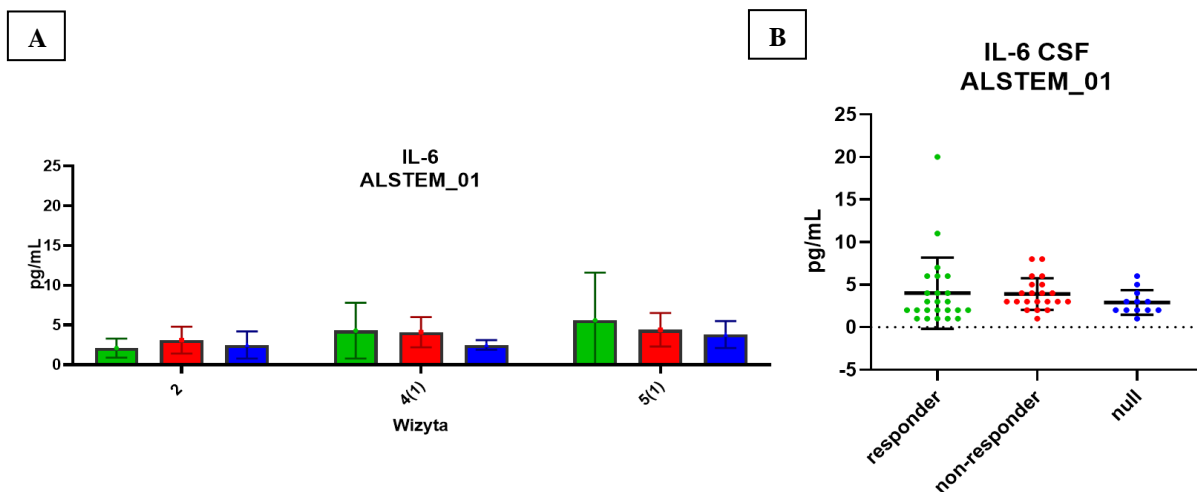


Ryc. 123. Stężenie glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia glukozy [mg/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia chlorków [mg/dl] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

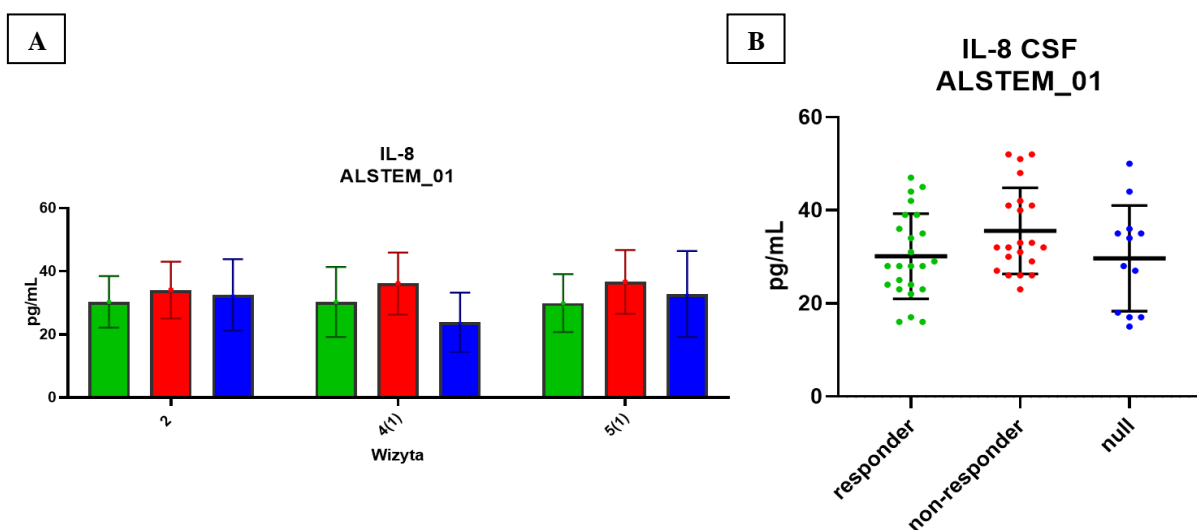
A**B**

Ryc. 124. Stężenie białka całkowitego w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia białka całkowitego [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia chlorków [mg/dl] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony), grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Poziom wybranych czynników wzrostu, chemokin czy cytokin wyznaczono w pobranym materiale metodą multiplex. Nie wykazano istotnych różnic dla pojedynczych pomiarów i grup dla IL-6 (ryc. 125 [A]) ani IL-8 (ryc. 126 [A]). Nie wykazano również zmian wśród średnich wyników zebranych ze wszystkich wizyt obejmujących badanie kliniczne dla poszczególnych grup dla IL-6 (ryc. 125 [B]) (responder: 4 ± 4 pg/ml, non-responder: 4 ± 2 pg/ml, null: 3 ± 1 pg/ml) ani IL-8 (ryc. 126 [B]) (responder: 30 ± 9 pg/ml, non-responder: 36 ± 9 pg/ml, null: 30 ± 11 pg/ml).

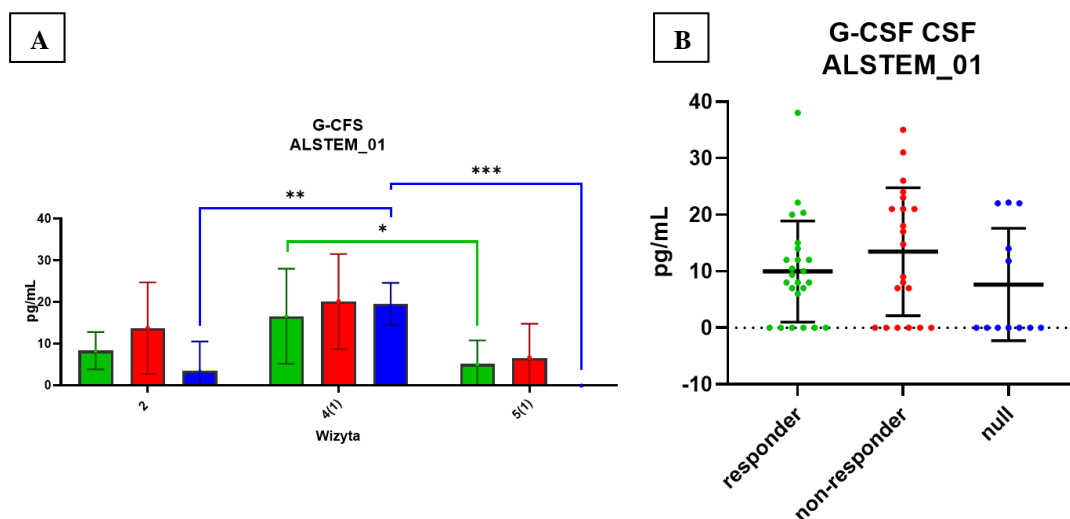


Ryc. 125. Stężenie IL-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-6 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-6 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony), grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)



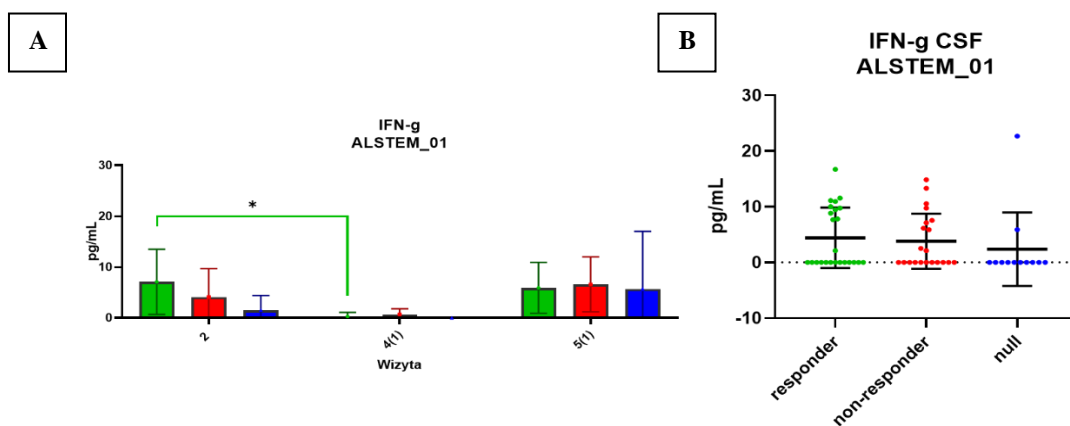
Ryc. 126. Stężenie IL-8 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-8 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia IL-8 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom G-CSF w CSF (ryc. 127 [A]) wśród grupy null podczas wizyty 4(1) – bezpośrednio przed pierwszym podaniem BPL był wyższy ($19,5 \pm 5,1$ pg/ml) w porównaniu z poziomem podczas wizyty 2 ($3,5 \pm 7$ pg/ml) ($p < 0,01$), ale jego stężenie spadło do 0 po pierwszym podaniu BPL – wizyta 5(1) ($p < 0,001$). W grupie pacjentów responder stężenie obniżyło się ($5,1 \pm 5,7$ pg/ml) na wizycie 5(1) względem poziomu analitu na wizycie 4(1) ($16,6 \pm 11,4$ pg/ml) – przed pierwszym podaniem BPL ($p < 0,05$). Nie wykazano różnic stężenia G-CSF wśród średnich wyników zebranych ze wszystkich wizyt 1–7 dla poszczególnych grup (ryc. 127 [B]) – grupa responder: 10 ± 9 pg/ml, non-responder: 13 ± 11 pg/ml, null: 8 ± 10 pg/ml.



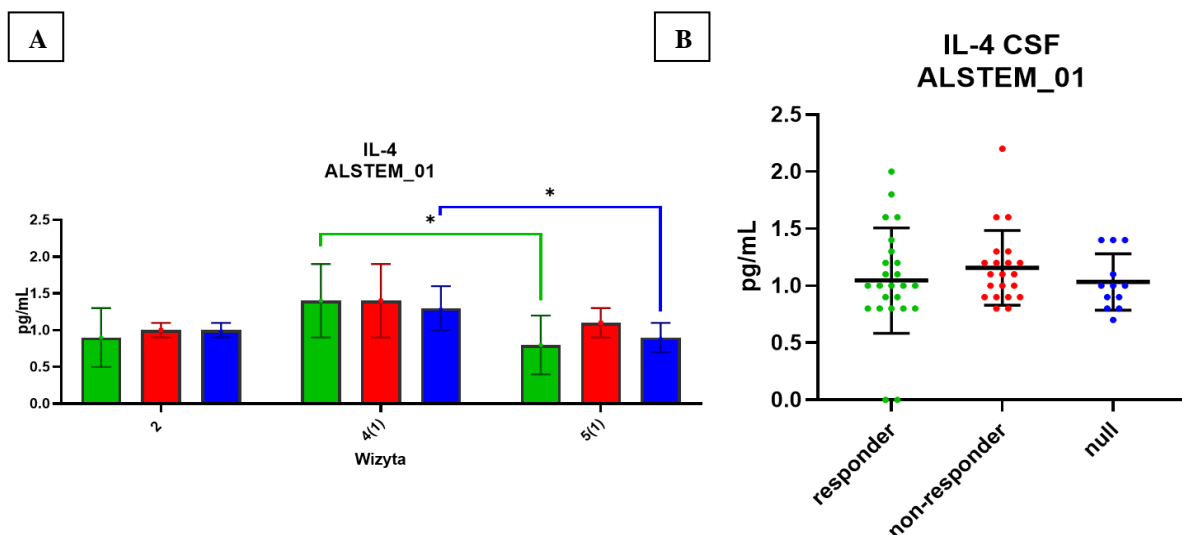
Ryc. 127. Stężenie G-CSF w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia G-CSF [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. [B] Średnie wartości stężenia G-CSF [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Poziom $\text{INF-}\gamma$ (ryc. 128 [A]) zmniejszył się w grupie osób responder na wizycie 4(1) ($0,27 \pm 0,75$ pg/ml) w porównaniu z wizytą 2 ($7,1 \pm 6,4$ pg/ml) ($p < 0,05$), ale na tę zmianę nie miała wpływu terapia komórkowa i BPL. Brak różnic w stężeniu $\text{INF-}\gamma$ wśród średnich wyników zebranych ze wszystkich w poszczególnych grupach (ryc. 128 [B]) – grupa responder: $4,4 \pm 5,4$ pg/ml, non-responder: $3,8 \pm 5$ pg/ml, null: $2,4 \pm 6,6$ pg/ml.



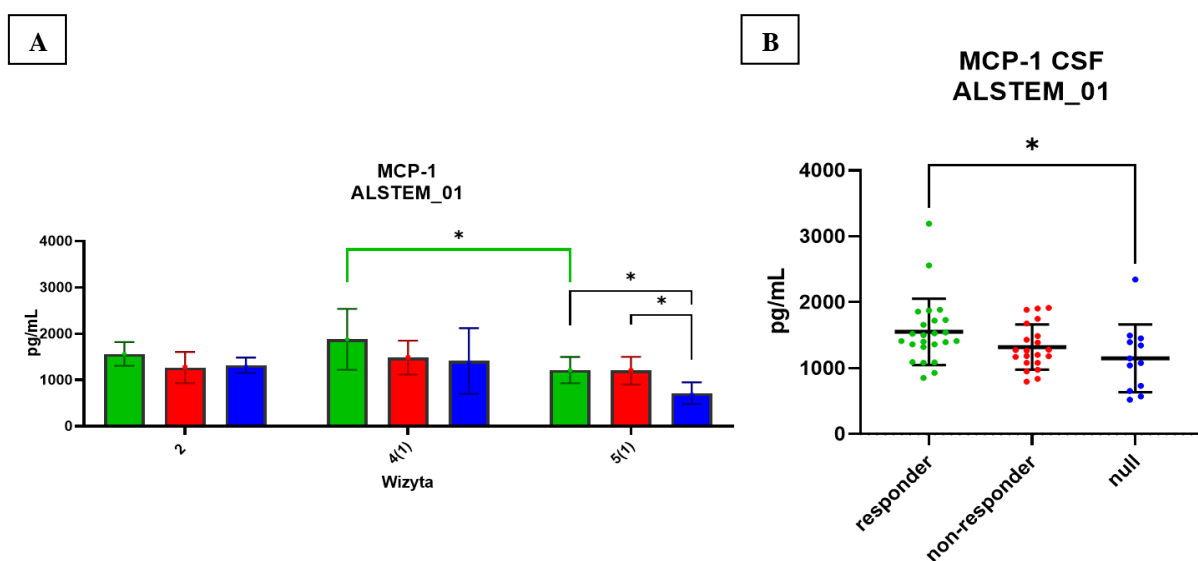
Ryc. 128. Stężenie $\text{INF-}\gamma$ w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia $\text{INF-}\gamma$ [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia $\text{INF-}\gamma$ [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Natomiast w przypadku poziomu IL-4 (ryc. 129 [A]) w grupach responder oraz null pierwsze podanie PBL już mogło przyczynić się do jego obniżenia. Parametr ten mierzony w obu grupach podczas wizyty 5(1) był istotnie niższy w porównaniu z pomiarem dokonany na wizycie 4(1) ($p < 0,05$). Brak różnic w stężeniu IL-4 wśród średnich wyników zebranych ze wszystkich w poszczególnych grupach (ryc. 129 [B]) – grupa responder: $1,05 \pm 0,46$ pg/ml, non-responder: $1,16 \pm 0,33$ pg/ml, null: $1,03 \pm 0,25$ pg/ml.



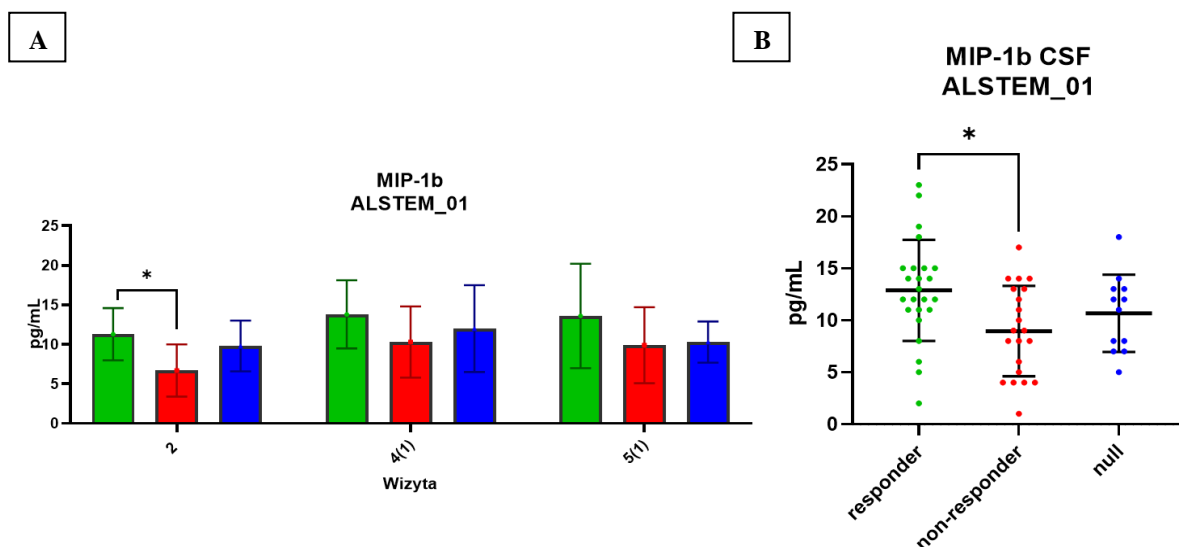
Ryc. 129. Stężenie IL-4 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia IL-4 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia IL-4 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Podanie PBL mogło mieć wpływ na spadek poziomu MCP-1 (ryc. 130 [A]) u osób z grupy responder między wizytą 4(1) (1880 ± 658 pg/ml) a wizytą 5(1) (1216 ± 284 pg/ml) miesiąc po pierwszym podaniu BPL ($p < 0,05$). Po podaniu pierwszej dawki zauważono również, że stężenie MCP-1 w grupie null (1411 ± 712 pg/ml) było niższe w porównaniu zarówno z grupą responder (1880 ± 658 pg/ml), jak i non-responder (1486 ± 366 pg/ml) ($p < 0,05$). Analizując stężenie MCP-1 dla uśrednionych pomiarów z wizyt 1–7 wśród grup (ryc. 130 [B]), można zaobserwować jego niższą wartość dla grupy null (1148 ± 514 pg/ml) w zestawieniu z grupą responder (1553 ± 503 pg/ml) ($p < 0,05$), podczas gdy stężenie w grupie non-responder było na poziomie 1320 ± 341 pg/ml.



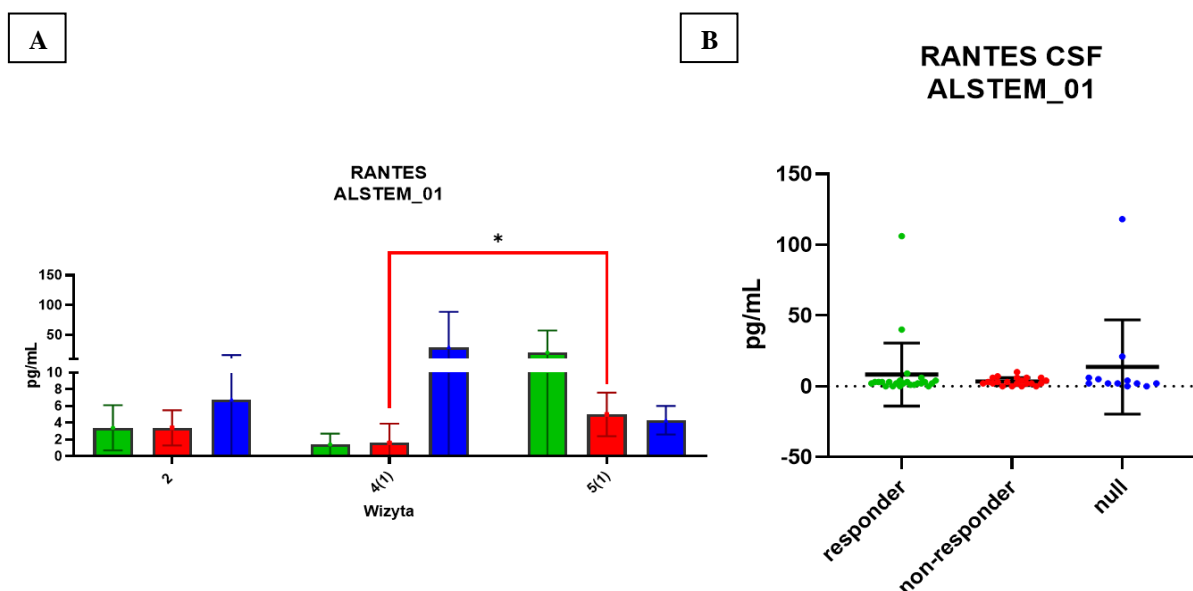
Ryc. 130. Stężenie MCP-1 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia MCP-1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia MCP-1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

Poziom MIP-1 β (ryc. 131 [B]) pacjentów z grupy responder był istotnie wyższy ($11,25 \pm 3,28$ pg/ml) w porównaniu z poziomem u pacjentów w grupie non-responder ($6,7 \pm 3,25$ pg/ml) ($p < 0,05$) podczas wizyty 2, a kolejno podania BPL nie wpłynęły na poziom tego analitu. Również dla stężenia MIP-1 β uśrednionych pomiarów ze wszystkich wizyt wśród grup (ryc. 131 [B]) można zaobserwować wyższe stężenie w grupie responder ($12,9 \pm 4,9$ pg/ml) w porównaniu z grupą non-responder ($9 \pm 4,3$ pg/ml) ($p < 0,05$). W grupie null stężenie wyniosło $10,67 \pm 3,7$ pg/ml.



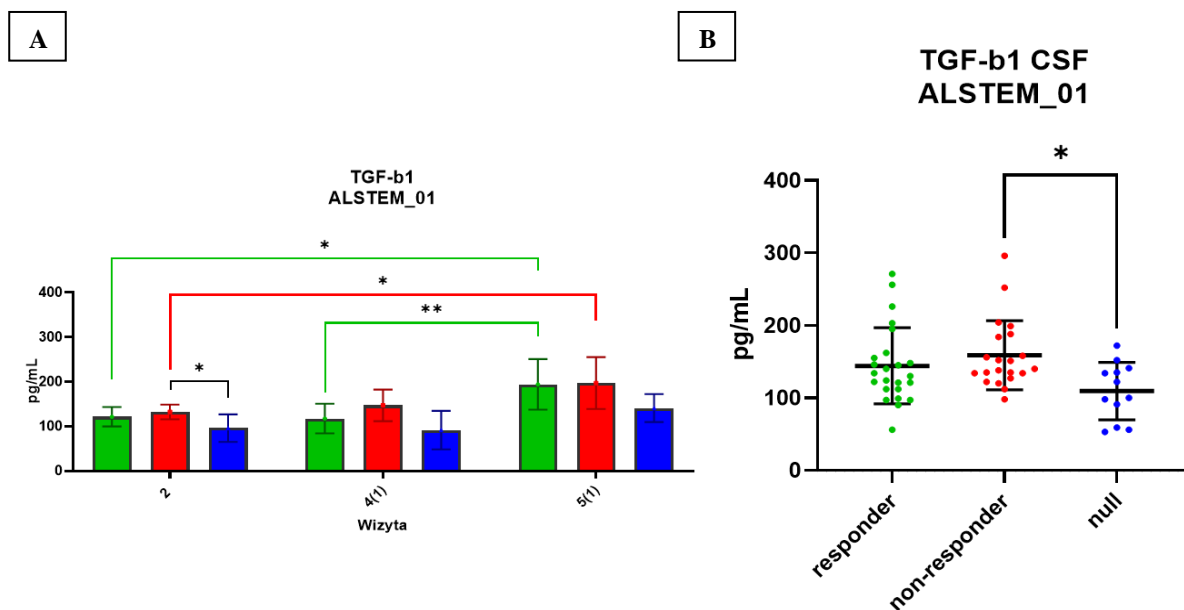
Ryc. 131. Stężenie MIP-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM.
 [A] Średnie wartości stężenia MIP-1 β [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia MIP-1 β [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

Podanie PBL mogło spowodować wzrost poziomu RANTES (ryc. 132 [A]) w grupie non-responder. Zależność ta jest widoczna między wizytą 4(1) ($1,57 \pm 2,3$ pg/ml) – przed podaniem pierwszej dawki BPL a wizytą 5(1) ($5 \pm 2,6$ pg/ml) – miesiąc po pierwszym podaniu ($p < 0,05$). Brak istotnych zmian między grupami dla uśrednionych wyników z wizyt 1–7 poziomu RANTES (ryc. 132 [B]) w grupach responder ($8,4 \pm 22,2$ pg/ml), non-responder ($3,3 \pm 2,7$ pg/ml) i null ($13,7 \pm 33,3$ pg/ml).



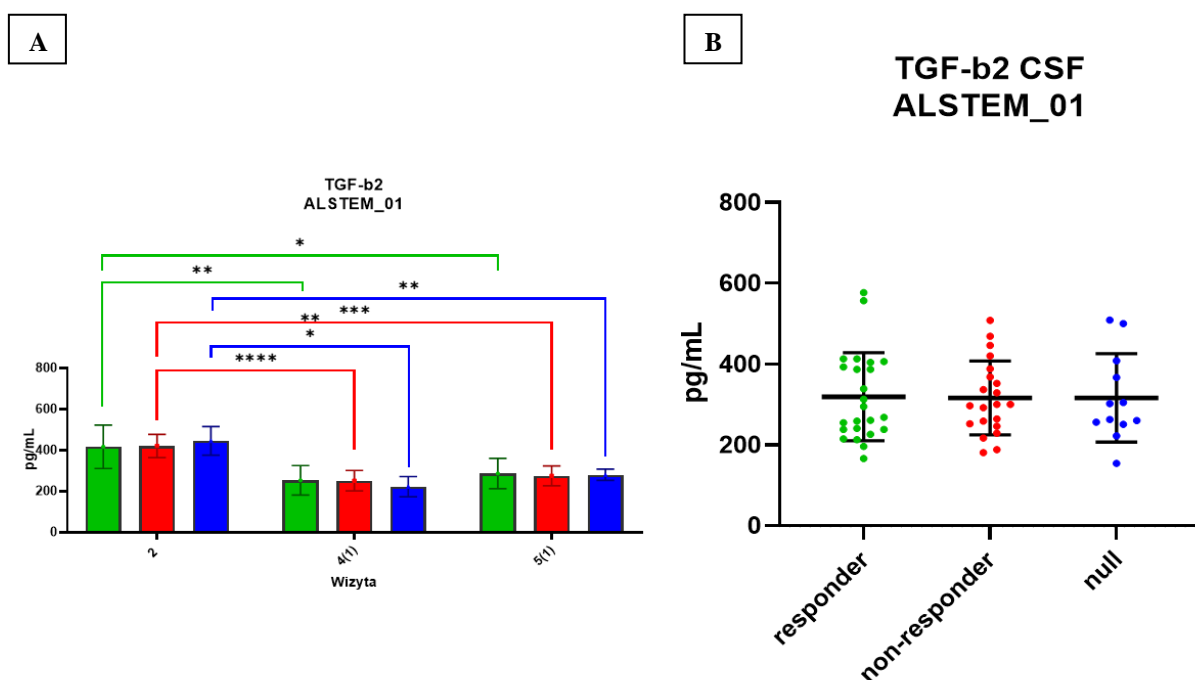
Ryc. 132. Stężenie RANTES w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia RANTES [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$. [B] Średnie wartości stężenia RANTES [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Stężenie TGF- β 1 (ryc. 133 [A]) w płynie mózgowo-rdzeniowym zmieniało się zarówno w grupie responder, jak i non-responder. W grupie pacjentów responder poziom TGF- β 1 w materiale z wizyty 5(1) zwiększył się ($194 \pm 56,7$ pg/ml) w porównaniu z wynikiem z wizyty 4(1) ($117,25 \pm 33,28$ pg/ml) ($p < 0,01$), jak i z wizyty 2 ($121,5 \pm 21,8$ pg/ml) ($p < 0,05$). W grupie non-responder stężenie TGF- β 1 z wizyty 2 ($132,3 \pm 16,5$ pg/ml) wzrosło w materiale pobranym podczas wizyty 5(1) (197 ± 58 pg/ml) ($p < 0,05$). Dodatkowo na wizycie 2 wystąpiła zależność w przypadku poziomu analitu między grupami non-responder ($132,3 \pm 16,5$ pg/ml) a null (96 ± 31 pg/ml), gdzie grupa null charakteryzowała się niższą wartością tego parametru ($p < 0,05$). Wykazano istotną zmianę między grupami dla uśrednionych wyników z wizyt 1–7 poziomu TGF- β 1 (ryc. 133 [B]), gdzie grupa non-responder cechowała się wyższym stężeniem analitu (159 ± 48 pg/ml) w porównaniu z grupą null (109 ± 40 pg/ml) ($p < 0,05$). W grupie responder stężenie wyniosło 144 ± 52 pg/ml.



Ryc. 133. Stężenie TGF- β 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM.
 [A] Średnie wartości stężenia TGF- β 1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. [B] Średnie wartości stężenia TGF- β 1 [pg/ml] w grupach: grupa responder, $n = 8$ (kolor zielony); grupa non-responder, $n = 7$ (kolor czerwony); grupa null, $n = 4$ (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; * $p < 0,05$

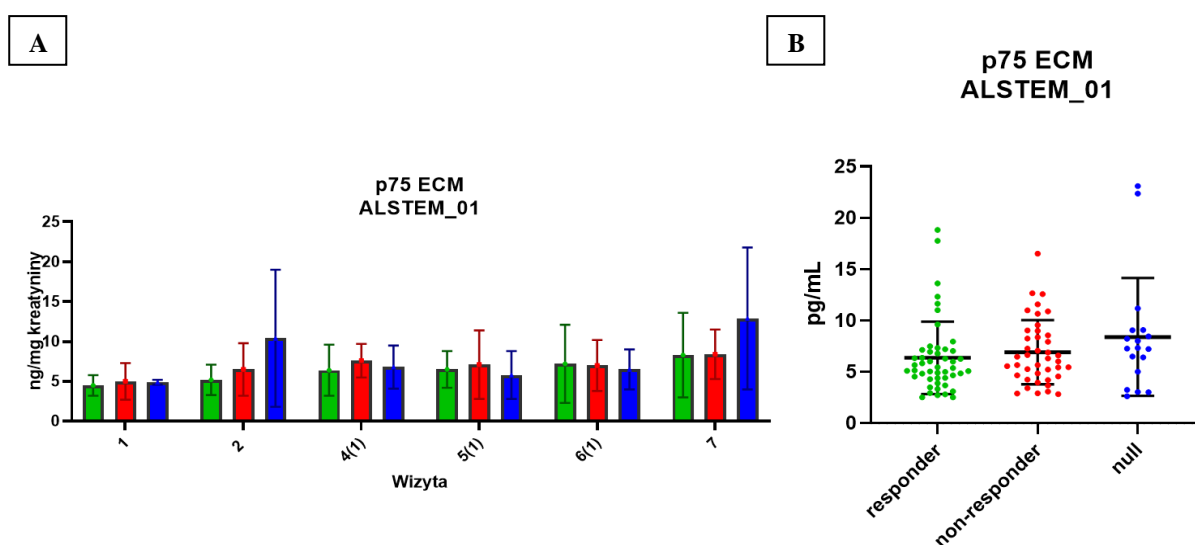
Najbardziej znaczące zmiany w stężeniu analitu dla wszystkich grup dotyczyły TGF-β2 (ryc. 134 [A]). Miesiąc po pierwszym podaniu (wizyta 5(1)) jego poziom obniżył się w grupach responder (287 ± 74 pg/ml) ($p < 0,05$), non-responder (275 ± 48 pg/ml) ($p < 0,001$) oraz grupie null (280 ± 27 pg/ml) ($p < 0,01$) w porównaniu z pomiarem podczas wizyty 2. Natomiast podczas wizyty 2 stężenie TGF-β2 było statystycznie wyższe względem pomiaru z wizyty 4(1) w grupach responder (254 ± 72 pg/ml) ($p < 0,01$), non-responder (252 ± 750 pg/ml) ($p < 0,0001$) oraz null (223 ± 49 pg/ml) ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano różnic wśród grup dla uśrednionych wyników z wizyt objętych badaniem klinicznym poziomu TGF-β2 (ryc. 134 [B]), gdzie jego stężenie wyniosło dla grupy responder: 319 ± 109 pg/ml, dla non-responder: 316 ± 91 pg/ml i dla null: 316 ± 109 pg/ml. W płynie mózgowo-rdzeniowym u żadnego z pacjentów nie wykryto analitu TGF-β3.



Ryc. 134. Stężenie TGF-β2 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia TGF-β2 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. [B] Średnie wartości stężenia TGF-β2 [pg/ml] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

4.4.7. Biologiczny marker progresji choroby ALS – p75^{ECM}

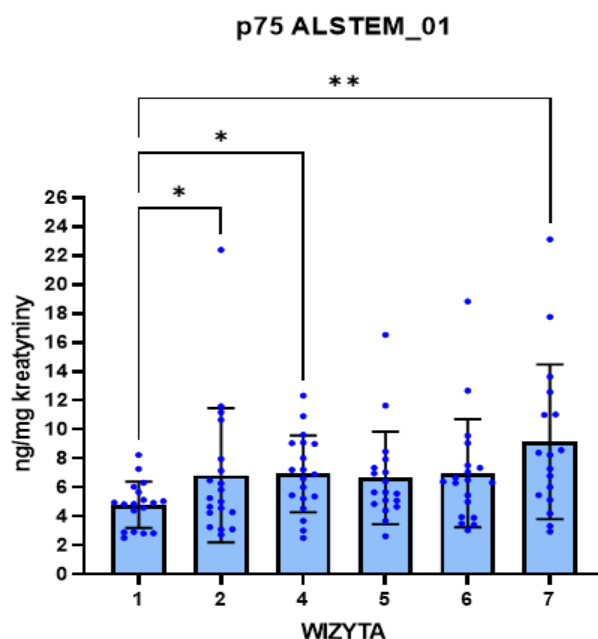
Ocena poziomu p75^{ECM} (ryc. 135 [A]) w badaniu moczu pacjentów z ALS włączonych do badania klinicznego nie wykazała istotnej statystycznie różnicy między grupami responder, non-responder i null. Podanie BPL również nie wpłynęło na zawartość p75^{ECM} w okresie obserwacji. Również brak było istotnych zmian dla średnich pomiarów ze wszystkich wizyt wśród grup (ryc. 135 [B]), odnotowano zbliżone wartości ng p75^{ECM} / mg kreatyniny w moczu. Dla grupy responder: 6 ± 4 ng p75^{ECM}/mg kreatyniny, dla grupy non-responder: 7 ± 3 ng p75^{ECM}/mg kreatyniny oraz dla grupy null: 8 ± 6 ng p75^{ECM}/mg kreatyniny.



Ryc. 135. Stężenie p75^{ECM} ng/mg kreatyniny w moczu pacjentów badania klinicznego ALSTEM. [A] Średnie wartości stężenia p75^{ECM} [ng/mg] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD dla poszczególnych wizyt; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). [B] Średnie wartości stężenia p75^{ECM} [ng/mg] w grupach: grupa responder, n = 8 (kolor zielony); grupa non-responder, n = 7 (kolor czerwony); grupa null, n = 4 (kolor niebieski) podczas badania klinicznego (wizyty 1–7). Prezentowane wartości przedstawiają: średnia \pm SD; brak istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$)

Jako przykład biologicznego markera progresji choroby ALS w ogólnej grupie pacjentów badania klinicznego ALSTEM (ryc. 136) istotnie widoczny jego wzrost parametru między wizytą 1 a wizytą 7 ($p < 0,01$). Również istotny wzrost można zaobserwować podczas wizyt przed podaniem BPL, czyli między wizytą 1 ($4,78 \pm 1,6$ ng/mg kreatyniny) a wizytą 2 ($6,8 \pm 4,6$ ng/mg kreatyniny) ($p < 0,05$), a także między wizytą 1 ($4,78 \pm 1,6$ ng/mg kreatyniny) a wizytą 4 przed podaniem BPL ($6,9 \pm 2,7$ ng/mg kreatyniny) ($p < 0,05$). Brak istotnych różnic

poziomu p75^{ECM} w moczu pobranym w czasie wizyt, podczas których pacjenci otrzymali BPL (wizyta 5, wizyta 6).

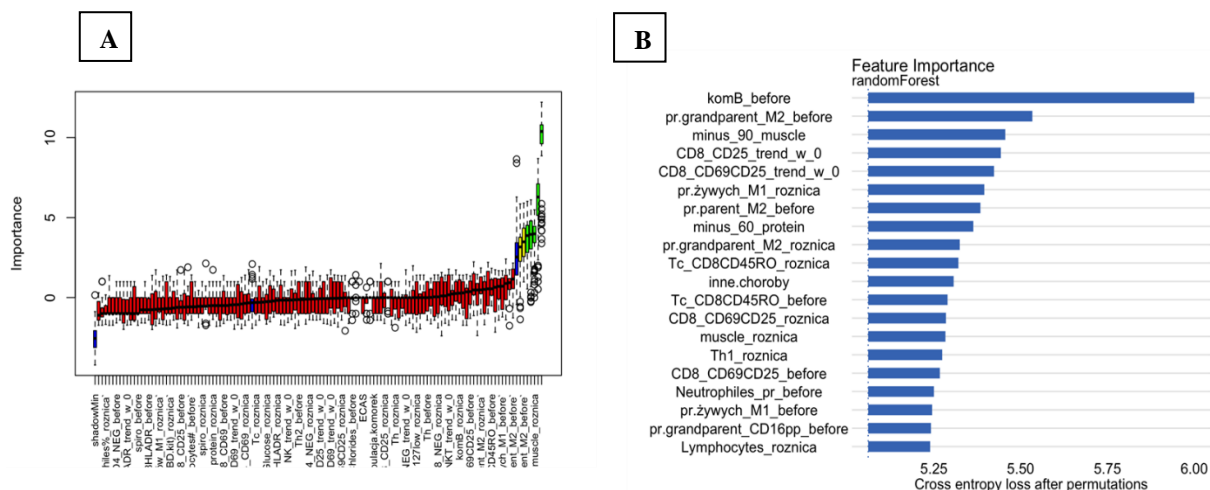


Ryc. 136. Średnie stężenie p75^{ECM} ng/mg kreatyniny w moczu wszystkich pacjentów badania klinicznego ALSTEM. Prezentowane wartości przedstawiają: średnia ± SD dla poszczególnych wizyt; * p < 0,05, ** p < 0,01

4.4.8. Identyfikacja czynników predykcyjnych umożliwiających ocenę potencjalnej skuteczności terapii komórkowej WJ-MSC u danego pacjenta

W celu selekcji istotnych predyktorów odpowiedzi na terapię MSC pozwalających przewidzieć efektywność leczenia pacjenci zostali pogrupowani według dynamiki zmiany współczynnika ALSFRS. Analiza zdefiniowała grupę pacjentów odpowiadających na terapię spowolnieniem progresji choroby (responder, n = 8), u grupy non-responder (n = 7) zauważono przyspieszenie progresji, a w grupie neutralnej (null, n = 4) zastosowana terapia komórkowa nie zmieniła przebiegu choroby. Przeprowadzając analizę danych w celu definicji predyktorów dla powstałych 3 grup klinicznych, włączono wyniki obejmujące: analizy biochemiczne i cytometryczne krwi, moczu oraz płynu mózgowo-rdzeniowego, a także spirometrię, siłę mięśni czy wiek, płeć, BMI, postać choroby, długość choroby, delta FS, jakość życia, a także indyktor występowania innych chorób, profil cytokinowy. Analizowano zarówno dane statyczne

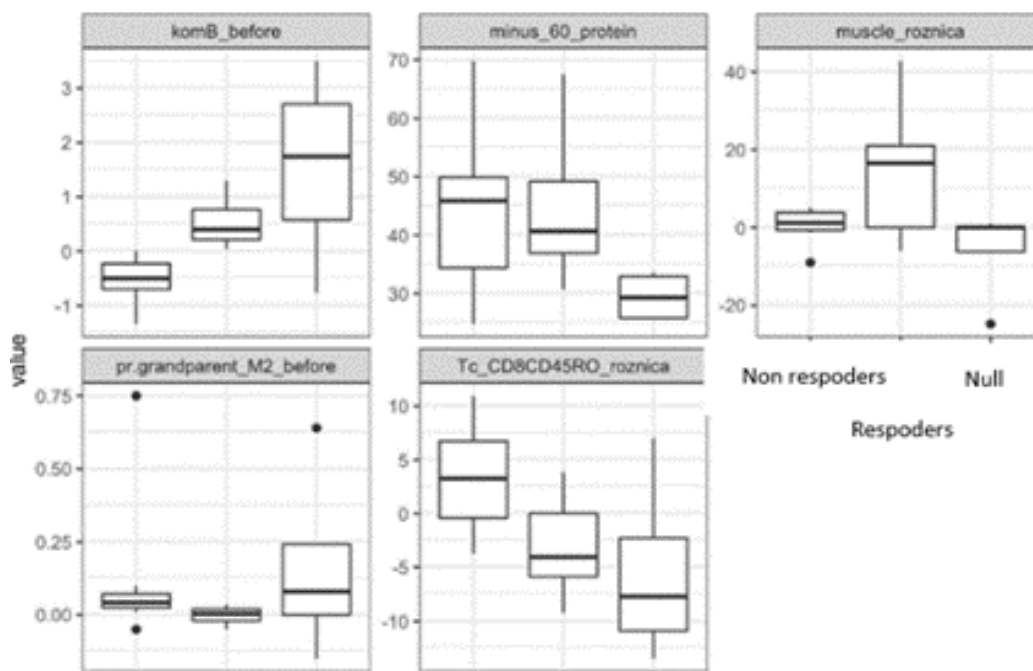
(mierzone w danym punkcie czasowym), jak i dynamiczne – czyli zmiany danej wartości w określonym czasie pomiędzy wizytami. W sumie powstał zestaw danych do predykcji, który zawiera 123 zmienne. Istotność zmiennych wyznaczono na podstawie algorytmu Boruta (ryc. 137 [A]), a otrzymane wyniki zastawiono z pakietem DALEX (ryc. 137 [B]).



Ryc. 137. Istotność zmiennych parametrów klinicznych według algorytmu [A] Boruta oraz [B] DALEX

Do redukcji zmiennych wykorzystano korelację pomiędzy poszczególnymi zmiennymi. Efektywność modeli jest większa, jeśli zmienne nie są skorelowane. Dlatego została wykonana procedura, która usuwa z zestawu danych zmienne o istotnej statystycznie (na poziomie 0,05) zależności, dla których jednocześnie poziom korelacji co do wartości bezwzględnej jest większy niż 0,5.

Całościowa analiza kliniczna pacjentów objętych badaniem klinicznym pozwoliła na utworzenie modelu algorytmu predykcyjnego odpowiedzi pacjentów na terapię komórkową WJ-MSC. Wśród predyktorów znalazły się parametry takie jak: siła mięśniowa czy poziomy subpopulacji limfocytów oraz zmiana ich odsetka w czasie obserwacji przed podaniem preparatu. Zmienne, które mają wpływ na predykcje odpowiedzi chorych na terapię komórkową WJ-MSC, to rozkład subpopulacji we krwi obwodowej (limfocyty B, komórki M2, oraz komórki Tc pamięci o profilu CD8CD45RO), białka w CFS oraz pomiar siły mięśni (ryc. 138).



Ryc. 138. Istotne predyktory kliniczne odpowiedzi na terapię komórkową WJ-MSC. Zmienne mające wpływ na predykcje terapii komórkowej WJ-MSC to rozkład subpopulacji we krwi obwodowej (limfocyty B, monocyty oraz komórki Tc pamięci o profilu CD8CD45RO), białka w CFS oraz pomiar siły mięśni

Podsumowując, w badaniu klinicznym ponownie wykorzystano metody maszynowego uczenia, ale tym razem statystycy zastosowali klasteryzację nadzorowaną, gdzie pacjentów podzielono na grupy responder, non-responder oraz null zgodnie z wartością współczynnika skali ALSFRS-R, a algorytm wytypował czynniki predykcyjne z ocenionych w sumie 123 zmiennych. Algorytm wytypował 5 takich istotnych zmiennych.

5. DYSKUSJA

Stwardnienie zanikowe boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS) to choroba neurodegeneracyjna ośrodkowego układu nerwowego, bardzo trudno rozpoznawalna szczególnie na wczesnym etapie. Diagnoza zazwyczaj następuje nawet do 16 miesięcy po wystąpieniu pierwszych objawów. Przyczyną trudności w rozpoznaniu choroby jest jej heterogenny przebieg i nieswoiste objawy, pokrywające się z innymi chorobami neurodegeneracyjnymi. ALS jest chorobą ogólnoustrojową o zróżnicowanym obrazie klinicznym, m.in. obejmuje objawy niemotoryczne, zmiany w zachowaniu czy pogorszenie funkcji poznawczych [16]. Neurodegeneracyjna choroba ALS charakteryzuje się postępującym, bezbolesnym osłabieniem mięśni spowodowanym śmiercią neuronów ruchowych w mózgu, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym. Ze względu na początkową lokalizację objawów wyróżnia się dwie postacie choroby: postać z początkowymi objawami zlokalizowanymi w kończynach – kończynową (ang. *limb onset*), stanowiącą około 3/4 przypadków ALS, oraz postać z początkowymi zaburzeniami mowy i połykania – opuszkową (ang. *bulbar onset*), stanowiącą około 1/4 przypadków ALS [47]. W opuszkowym ALS osłabienie zaczyna się od mięśni twarzy, języka i gardła, powodując dyzartrię, a następnie dysfagię. Objawy większości pacjentów z postacią kończynową ALS to osłabienie wokół jednego obszaru ciała, które z czasem rozprzestrzenia się wokół tego samego obszaru, ale po przeciwnej stronie. Śmierć z powodu ALS następuje zazwyczaj w ciągu 2–4 lat od diagnozy z powodu niewydolności oddechowej [48]. Obecnie nie jest dostępna skuteczna terapia, podstawą leczenia pozostaje multidyscyplinarność opieki z naciskiem na wspomaganie funkcji oddechowych oraz podawanie farmakoterapii opartej na kilku substancjach, które w badaniach klinicznych wykazały potencjał do nieznacznego spowalniania dynamiki progresji ALS. Istnieje duże zapotrzebowanie na rozszerzenie diagnostyki klinicznej oraz określenie kryteriów diagnozujących ALS [3]. Koniecznością jest selekcja biomarkerów (diagnostycznych, prognostycznych, predykcyjnych), które przyczynią się do zrozumienia genezy patologicznych zmian, dynamiki progresji, identyfikacji celów terapeutycznych i poprzez to opracowania skutecznych terapii [24]. Wytyczne Europejskiej Sieci Referencyjnej ds. chorób nerwowo-mięśniowych dotyczące planu leczenia w rozpoznaniu ALS są bardzo minimalistyczne. Główne zalecenia obejmują wprowadzenie podstawowego leku riluzol, który jest przyjmowany od chwili rozpoznania do końca życia. Riluzol to lek szeroko dostępny w leczeniu ALS już od lat 90., będący antagonistą uwalniania glutaminianu. Tymczasowym zaleceniem są produkty

lecnicze takie jak edarawon i AMX0035 (nazwa handlowa Relyvrio). Edarawon to przeciwutleniacz o funkcji ochronnej neuronów przed stresem oksydacyjnym poprzez wymiatanie wolnych rodników powodujących uszkodzenia komórek. AMX0035 to doustna mieszanka dwóch substancji czynnych: fenylomaślanu sodu i taurursodiolu, dla których dokładny mechanizm działania tej kombinacji preparatów nie jest znany, ale doniesienia na podstawie badań przedklinicznych sugerują, że oba leki zapobiegają tworzeniu nieprawidłowości w fałdowaniu białek, a także obniżają stres retikulum endoplazmatycznego [49][50]. Terapie komórkowe mogą stanowić ważne i alternatywne podejście w porównaniu z klasyczną terapią farmakologiczną – poprzez uwolnienie czynników zapewniających działanie neuroprotektoryjne oraz modulowanie szlaków przekazywania sygnałów czy stanu zapalnego [20]. Mezenchymalne komórki stromalne (MSC), odkryte ponad 50 lat temu, są jednym z najczęściej badanych potencjalnych produktów komórkowych zarówno przez środowisko akademickie, jak i firmy biotechnologiczne ze względu na ich potencjał właściwości immunomodulujących i w przypadku niektórych tkanek potencjał regeneracyjny. Chociaż dane przedkliniczne wykazały wstępną skuteczność MSC jako potencjalnego leku w ALS, to wyniki przeprowadzonych badań klinicznych nie były jednoznaczne. Wykorzystanie MSC jako metody terapeutycznej poprawiającej jakość życia osób cierpiących na choroby, w której standard opieki jest niższy od optymalnego lub przestaje być skuteczny, pozostaje jedną z opcji [40]. Według opracowania zespołu Fernández-Garzy do kwietnia 2023 roku w badaniach klinicznych z wykorzystaniem MSC zarejestrowanych było 1120 pacjentów cierpiących na ALS, a agencje regulatorowe zajmujące się komercjalizacją terapii opartych na komórkach MSC wydały zgodę na 12 rodzajów terapii. Warto podkreślić jest fakt, że 9 z 12 terapeutów opartych na MSC to produkty pochodzące z Azji, z wyraźnym trendem przeważającym z Republiki Korei [51], dlatego należy podchodzić ze zwiększoną ostrożnością do takich doniesień. Jednym z przykładów terapii komórkowej w ALS koreańskiej firmy biotechnologicznej CORESTEM jest produkt NeuroNata-R (lenzumestrocel). Preparat został zatwierdzony jako lek sierocy do leczenia ALS przez Ministerstwo Bezpieczeństwa Żywności i Leków (ang. *Ministry of Food and Drug Safety of the Republic of Korea*, MFDS) w Korei Południowej w 2014 roku oceniany w badaniu klinicznym III fazy (NCT04745299) w celu potwierdzenia bezpieczeństwa i skuteczności. NeuroNata-R opiera się na autologicznych mezenchymalnych komórkach stromalnych (MSC) pochodzących ze szpiku kostnego. Terapia zakłada pobranie szpiku kostnego od pacjenta, następnie izolację i ekspansję komórek MSC. Ostatecznie autologicznym produktem są ekspandowane komórki MSC ze szpiku kostnego zawieszane w płynie mózgowo-rdzeniowym i wstrzyknięte dooponowo. Lek NeuroNata-R

opisywany jest jako lek o działaniu neuroprotekcyjnym, łagodzącym progresję stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) poprzez przedłużenie prawidłowej funkcji nerwu ruchowego dzięki swemu działaniu przeciwzapalnemu i immunomodulującemu [52]. W przypadku Europy przełomem w dziedzinie terapii komórkami MSC był rok 2018, kiedy to nastąpiło pierwsze dopuszczenie do obrotu przez Europejską Agencję Leków (EMA) terapii allogenicznymi komórkami macierzystymi. Zezwolenie dotyczy zastosowania allogenicznych mezenchymalnych komórek stromalnych pochodzących z tkanki tłuszczowej do leczenia przetoki okołodbytniczej w chorobie Leśniowskiego-Crohna [53] [54]. Niestety w październiku 2023 roku firma Tekada wydała oświadczenie na temat preparatu Alofisel (ludzkie allogeniczne mezenchymalne komórki pobrane z tkanki tłuszczowej osób dorosłych), wskazanego w leczeniu złożonych przetok okołodbytniczych u dorosłych pacjentów z postacią nieaktywną/łagodną choroby Leśniowskiego-Crohna, „o zakończeniu badania III fazy, oceniającej skuteczność i bezpieczeństwo, w którym to nie osiągnął głównego punktu końcowego, jakim była remisja po 24 tygodniach”.

Mimo wielu zalet zastosowania autologicznych terapii komórkowych, takich jak: niskie ryzyko odrzucenia czy wywołanie odpowiedzi immunologicznej oraz mniejsze ryzyko infekcji wirusowych, w ostatecznym rozrachunku terapie autologiczne są kosztowne, czasochłonne i w niektórych przypadkach mogą być nieskuteczne, zwłaszcza u pacjentów przewlekle chorych z potencjalnie obniżoną jakością komórek lub przeciwwskazaniem do przeprowadzenia zabiegu pozyskującego komórki, np. pobranie szpiku kostnego czy tłuszczu. Allogeniczna terapia komórkowa również wiąże się z pewnymi ograniczeniami, w tym możliwością ekspozycji biorcy na obce antygeny, które mogą wywołać niepożądaną odpowiedź immunologiczną, prowadząc do odrzutu. Ograniczenia te można zminimalizować poprzez dokładne badanie dawców. Wówczas allogeniczna terapia komórkowa wykazuje wiele zalet i przewag nad terapią opartą na komórkach autologicznych. Należą do nich łatwa dostępność (ang. *off-the-shelf*) czy możliwość unifikacji i dopasowania oraz większy potencjał proliferacyjny komórek pobranych od zdrowych dawców [55]. Terapie komórkowe są dziś jedną z eksperymentalnych opcji terapeutycznych, a w przyszłości mają potencjał stanowić podstawę opracowania nowoczesnych strategii modyfikacji przebiegu choroby u pacjentów z ALS. Mechanizmy stojące za ALS nie są do końca poznane, a najnowsze badania skupiają się na dysfunkcji układu immunologicznego i wzmożonej i nieprawidłowej aktywacji mikrogleju. Dodatkowo przebieg choroby ALS może być powiązany ze zmienionym stężeniem cytokin i czynników wzrostu w osoczu lub płynie mózgowo-rdzeniowym. Komórki MSC precyzyjnie zostały zdefiniowane po raz pierwszy w 2006 roku przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ISCT);

charakteryzują się niską immunogennością, umożliwiając ich zastosowanie w układzie allogenicznym. Galareta Whartona sznura pępowiny stanowi jedno ze źródeł pozyskiwania MSC i w porównaniu np. z inwazyjną procedurą pobrania szpiku kostnego wykazuje łatwość uzyskania.

Rozprawa doktorska skupia się na opracowaniu produktu leczniczego terapii zaawansowanej (allogenicznego produktu leczniczego, zaklasyfikowanego do somatycznej terapii komórkowej) skierowanej do pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym zrealizowanej w ramach Projektu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Doktorat wdrożeniowy”. Substancją aktywną (ang. *active pharmaceutical ingredient*, API) dla produktu leczniczego terapii zaawansowanej (ang. *advanced therapy medicinal products*, ATMP) są mezenchymalne komórki stromalne wyizolowane z galarety Whartona (WJ-MSC). Cel niniejszej rozprawy opierał się na dwóch głównych filarach. Pierwszym było przygotowanie banku produktów komórkowych WJ-MSC zgodnie z obowiązującymi normami cGMP, przeprowadzenie rozszerzonej charakterystyki banku produktów komórkowych WJ-MSC oraz ich podział na klastry terapeutyczne przy użyciu algorytmów bioinformatycznych. Jest to odpowiedź na liczne doniesienia dotyczące braku standaryzacji produktów ATMP i braku jednoznacznych wyników wielu badań klinicznych tych produktów. O zmienności i heterogeniczności wykorzystywanych produktów komórkowych i niespójności w odpowiedzi terapeutycznej już od dawna komunikuje FDA [56]. Odpowiadając na zapotrzebowanie, badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu analizę serii produktów komórkowych WJ-MSC od różnych dawców na podstawie rozszerzonej charakterystyki, wzmocnienie procesu, ograniczając heterogenność dawców. Jest to również ważny element w kontekście terapii allogenicznych i wyboru jak najlepszych produktów komórkowych, charakteryzujących się właściwościami immunomodulującymi. Wytyczne ISCT opisujące komórki MSC nie pełnią funkcji predyktorów skuteczności odpowiedzi terapeutycznej, a jedynie pozwalają w ograniczony sposób określić tożsamość komórek [57]. Zastosowanie w niniejszej pracy dodatkowych oznaczeń i testów potwierdzających zmienność wśród dawców komórek jest krokiem do standaryzacji produktów komórkowych ATMP eliminującym różnice między dawcami czy seriami produktów. Użycie algorytmów bioinformatycznych pozwoliło na identyfikację krytycznych zmiennych umożliwiających klasteryzację produktów opartych na komórkach MSC, pozwalając na selekcję BPL o zbliżonej aktywności biologicznej. Cel filaru drugiego był realizowany poprzez zaplanowanie czynników predykcyjnych przy ocenie pacjentów w badaniu klinicznym o akronimie ALSTEM, dla których badanym produktem leczniczym były allogeniczne komórki WJ-MSC. Identyfikacja czynników predykcyjnych

umożliwiła ocenę potencjalnej skuteczności terapii komórkowej WJ-MSC, również przy użyciu algorytmów bioinformatycznych.

Widocznie rosnący potencjał terapii zaawansowanych znalazł odzwierciedlenie w prawodawstwie europejskim – Rozporządzeniu (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniającym dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004 [39] – które zapewnia wspólne ramy wprowadzania do obrotu produktów leczniczych terapii zaawansowanej (ATMP). Ponadto Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) powołała Komitet ds. Terapii Zaawansowanych (ang. *Committee for Advanced Therapies*, CAT), który jest odpowiedzialny za bezpośrednie monitorowanie rynku oraz wydawanie opinii naukowych w sprawie jakości, bezpieczeństwa i skuteczności nowych produktów leczniczych terapii zaawansowanej. W Polsce rejestr wytwórców produktów leczniczych prowadzi Główny Inspektorat Farmaceutyczny (GIF). Polski Bank Komórek Macierzystych posiada pozwolenie GIF o nr GIF-IW-400/WTC0436/01/41/UA2/14 na wytworzenie allogenicznego produktu ATMP z komórek mezenchymalnych (MSC) z galarety Whartona sznura pępowinowego przeznaczonego do zastosowań klinicznych.

Podczas realizacji niniejszej pracy fragmenty sznura pępowinowego pobierano po uzyskaniu świadomej zgody rodziców, a następnie transportowano w odpowiednich warunkach do laboratorium Wytwórni Farmaceutycznej PBKM. Kwalifikacja tkanki jako materiału wyjściowego wymagała udzielenia pełnych odpowiedzi na kwestionariusz medyczny oraz pobrania próbki krwi obwodowej w kierunku oceny czynników zakaźnych. Na podstawie dokumentacji dawcy oraz wyników badań laboratoryjnych kwalifikacja materiału była określona przez Dyrektora Medycznego PBKM. Próbki osocza krwi matki zostały zarchiwizowane do celów przyszłych badań. Pobieranie próbek od dawców i badania przesiewowe (kwestionariusz stanu zdrowia) są przeprowadzane zgodnie z załącznikiem II do dyrektywy 2006/17/WE [58]. Należy podkreślić, że statystycznie zaledwie 10–25% pobranych próbek kwalifikuje się do etapu przetworzenia i izolacji komórek WJ-MSC zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP). Produkcja kończy się formulacją i kriokonserwacją produktu komórkowego w obecności krioprotektantu w postaci roztworu sulfotlenku dimetylu (DMSO). W procesie produkcyjnym od pobrania fragmentu tkanki pępowinowej do momentu wydania produktu końcowego nie są wykorzystywane żadne surowce pochodzenia zwierzęcego. W czasie hodowli pierwotnej, metodą eksplantatów, a następnie podczas produkcji pobrane zostają próbki w celu określenia obecności zanieczyszczeń bakteryjnych i grzybiczych, a także obecności mykoplazmy i endotoksyn. Zwolnienie produktu końcowego

następuje na podstawie próby referencyjnej produktu końcowego, z której po rozmrożeniu zakładana jest hodowla. Hodowla referencyjna jest źródłem materiału do ostatecznego potwierdzenia jałowości produktu, funkcjonalności (liczba i żywotność komórek, zdolność adherencji) oraz potwierdzenia immunofenotypu charakterystycznego dla komórek WJ-MSC zgodnie z wytycznymi ISCT. Sztandarowymi i klasyfikującymi cechami komórek MSC według ISCT, niezależnie od pochodzenia i sposobu izolowania, jest zdolność przyczepiania się do plastiku. Ich morfologia zbliżona jest do fibroblastów oraz posiadają wspólne z nimi właściwości, takie jak ekspresja CD105, CD73 i CD90 przy braku CD11b lub CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 i antygeny układu zgodności tkankowej klasy II (HLA-DR) [59][60][61][62][63][64]. W przypadku jakichkolwiek nieprawidłowości w testach zgodnych z wytycznymi ISCT dla końcowego produktu komórkowego produkt został zdyskwalifikowany. Na tej podstawie z wytworzonych produktów komórkowych WJ-MSC zwolniono produkty wytworzone od 14 dawców. Głównym problemem terapii komórkowej jest nieadekwatna do właściwości terapeutycznych charakterystyka produktu oraz rozbieżność skuteczności *in vivo* [59]. Wytyczne ISCT opierają się na zdolności adherencji komórek do plastiku, obecności specyficznych antygenów, takich jak CD90, CD73 i CD105, wraz z brakiem markerów układu krwiotwórczego i odpornościowego (CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79a, CD19) i antygenów powierzchniowych HLA-DR, jak również na nadaniu tożsamości dla komórek macierzystych posiadających zdolność różnicowania się w osteoblasty, chondrocyty i adipocyty. Powszechnie akceptowane wytyczne Towarzystwa ISCT ostatecznie nie gwarantują powtarzalności właściwości produktów MSC ani ich skuteczności. Należy podkreślić, że produkty komórkowe MSC wykazują znaczną heterogeniczność pod względem dynamiki proliferacji, klonogenności, wydzielanych czynników (sekretomu) czy potencjału do różnicowania. Ta heterogeniczność nie jest brana pod uwagę w rutynowej charakterystyce komórek, a tym bardziej przy zwolnieniu produktu komórkowego [65]. Produkty wytworzone od 14 różnych dawców zostały zwolnione, więc spełniły specyfikację produktu końcowego (tabela 3), co znaczy, że były jałowe, wolne od mykoplazm oraz endotoksyn, a także spełniły limity poziomu poniżej 5% dla charakterystycznych markerów komórek hematopoetycznych oraz powyżej 70% dla charakterystycznych markerów MSC. Warto podkreślić, że kryteria na podstawie zwolnienia nie wykazały żadnych różnicowań wśród dawców. Różnice, które mają udowodniony wpływ na produkt komórkowy, to stosowane podłoża hodowlane o zróżnicowanym składzie, w szczególności ich suplementacja, gęstość wysiewu komórek, liczba pasaży lub czas trwania hodowli, a nawet sposób zamrażania [66]. To, że różnice wynikające z ekspansji komórek WJ-MSC w różnych mediach hodowlanych mają wpływ na

zdolności wydzielnicze, zauważono przy projektowaniu testu sprawdzającego zdolności immunomodulujące komórek WJ-MSC opartego na kohodowli (wyniki własne niezamieszczone w rozprawie doktorskiej). W celu sprawdzenia wpływu medium do ekspansji limfocytów na żywotność i liczbę komórek WJ-MSC założono kontrolę WJ-MSC w medium ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium (StemCell Technologies) + 1% (obj./obj.) Antybiotyk/Antymykotyk (Gibco) + 56 UI/ml ludzkiej IL-2 IS klasy premium (Miltenyi Biotec) + roztwór fibronektyny (Biological Industries) oraz przeznaczonym do MSC NutriStem XF (basal medium + suplement + roztwór fibronektyny, Biological Industries). Istotne różnice wykazano poprzez zwiększone wydzielanie przez WJ-MSC: HGF, MCP-1, IL-8, IL-6, TGF- β 2 w medium przeznaczonym do ekspansji limfocytów oraz zmniejszenie wydzielania dla BDNF i TGF- β 1 w porównaniu ze zdolnością wydzielniczą w medium przeznaczonym do komórek MSC. W przypadku FGF-2 komórki WJ-MSC hodowane w medium przeznaczonym dla MSC nie wydzielają tego czynnika wcale, a wydzielają w hodowli w medium do limfocytów. Istnieją różnice w protokołach zamrażania komórek w różnych obszarach produkcyjnych i pomimo utrzymywania podstawowych parametrów ISCT po rozmrożeniu komórek – potencjał immunomodulacyjny komórek może zmniejszyć się nawet o 50%. Ze względu na różne zdolności immunomodulacyjne MSC mają one różny wpływ na hamowanie odpowiedzi komórek limfocytów T, dojrzewanie komórek prezentujących antygen, cytotoksyczność spoczynkowych komórek NK, różnicowanie monocytów w niedojrzałe komórki dendrytyczne czy sekretom MSC (zwiększenie produkcji PGE2, TGF- β i IL-10), który pomaga w indukowaniu i różnicowaniu komórek w regulatorowe komórki T (T-reg) [40]. Dlatego głównym problemem w dziedzinie terapii komórkowych jest brak standaryzacji protokołu wytwarzania produktu komórkowego. Wytwórcy prawdopodobnie nie zoptymalizują protokołu izolacji i wytwarzania produktu komórkowego opartego na MSC. Odpowiedzią na potrzebę opracowania bardziej rygorystycznego sposobu charakteryzowania MSC pod kątem jakości, bezpieczeństwa i skuteczności produktów MSC jest sposób klasyfikacji komórek MSC o zbliżonych właściwościach biologicznych. W niniejszej pracy przedstawiono sposób ich podziału na klastry terapeutyczne w celu wyeliminowania zmienności partii. Założeniem było, iż klastry terapeutyczne pomogą zmniejszyć obserwowaną zmienność pomiędzy wytworzonymi produktami komórkowym, a także w przyszłości potencjalnie umożliwią predykcję skuteczności terapii *in vivo*. W celu przyporządkowania komórkowego produktu leczniczego do danego klastra z próbki referencyjnej zwalnianego produktu leczniczego – po rozmrożeniu próbki wykonano dodatkowe badania: nieklasyczny panel cytometryczny z dodatkowymi markerami takimi jak CD119, CD200, CD120b, CD72, CD273, CD274, CD39,

HO-1, test jednostek tworzących kolonie (CFU), ekspresję wybranych genów na podstawie przeprowadzonego testu bezpieczeństwa molekularnego (zgłoszenie patentowe nr P.433374 pt. *Zastosowanie zestawu genów do określania potencjału teratogennego komórek mezenchymalnych*, które uzyskało patent 2 sierpnia 2022 roku), analizę sekretomu oraz test kohodowli produktu komórkowego WJ-MSC z MNC (komórki jednojądrzaste) od zdrowego dawcy, charakteryzujący zdolności immunomodulujące produktu. Rozszerzona charakterystyka reprezentatywnych serii produktów od 14 różnych dawców rozpoczęła się od testu klonogenności (CFU). Mimo zwolnienia wszystkich serii produktów komórkowych do obrotu test CFU (ryc. 14) wykazał, że nie wszystkie linie posiadają zdolność tworzenia kolonii, a średni procent CFU dla pozostałych linii wynosił $13 \pm 0,04\%$. Wynik ten jest zbliżony do dostępnych w literaturze danych przedstawiających „zdolność klonogenną WJ-MSC na poziomie 11%”. Wynik CFU może być zależny od źródła, skąd izolowane są komórki MSC (galareta Whartona, szpik kostny), a nawet pasażu, na którym komórki zostały zamrożone [67]. W kolejnym kroku przeprowadzono analizę fenotypu nieklasycznego, składającą się na panel pozwalający oznaczyć markery dla CD119, CD120b, CD72, CD200, CD273, CD274, CD39 oraz HO-1. Markery mające związek z określeniem własności immunomodulujących komórek MSC zostały wybrane na podstawie dostępnej literatury. Produkty komórkowe w zależności od dawcy mają różny rozkład procentowy wybranych markerów w fenotypie nieklasycznym. Według pracy Dondersa i wsp. dodatni CD200 na komórkach MSC wyizolowanych z aspiratu szpiku kostnego korelował pozytywnie z większą zdolnością CFU oraz z większym potencjałem immunomodulującym komórek MSC. Wyniki przedstawione w pracy porównały procent markera CD200 na komórkach WJ-MSC (88,4–4,6%) i BM-MSC (50,9–13,4%) [68]. Niską ekspresją CD200 (12–14%) charakteryzowały się linie ALS393 oraz ALS439 (ryc. 16). Zależności tej nie potwierdzono w przypadku CFU i linii mającej wynik negatywny tego testu (ryc. 14). Jednak linie cechujące się niską ekspresją CD200 również uplasowały się w dolnej granicy CFU. Przy średnim CFU $13 \pm 0,04\%$ wynik dla linii ALS393 wyniósł $10 \pm 1\%$, ALS439: $7 \pm 2\%$, przy czym najwyższy wynik CFU, ok. 19%, miały linie ALS410 oraz ALS414, a ich procent CD200 wynosił odpowiednio: 88 i 48. Średni wynik CD200 dla wszystkich linii to $56 \pm 25\%$. W przypadku zdolności immunomodulujących ocenianych przez test kohodowli linie o niskiej ekspresji CD200 (ryc. 16) były w grupie, która nie wykazała obniżenia żywotności komórek MNC w kohodowli (ryc. 20), co może świadczyć o ich niskiej zdolności immunomodulującej. WJ-MSC również w zależności od dawcy wyrażają na powierzchni komórki marker CD39 i CD73. Funkcją CD39 jest katabolizm ATP (adenozyno-5'-trifosforan) do AMP (adenozyno-5'-monofosforan), a w przypadku CD73 – katabolizm AMP

do adenozy. Pozakomórkowe ATP ma działanie silnie prozapalne, podczas gdy adenozy działa przeciwzapalnie. Zatem im większy procent CD39 i CD73 na komórkach WJ-MS, tym większa ich zdolność do rozszczepiania zewnątrzkomórkowego ATP do adenozy poprzez przełączenie profilu prozapalnego na przeciwzapalny. Dodatkowo CD39 na powierzchni komórek MS indukuje komórki Treg [69][70]. O ile marker CD73 należy do klasycznego fenotypu MS i jego obecność jest powszechna na powierzchni charakteryzowanych linii WJ-MS (średnio $98 \pm 1\%$) (ryc. 13), co spełnia kryterium ISCT: $CD73 \geq 95\%$ [71], to średnia ekspresja CD39 (11,74%) (ryc. 17) wśród charakteryzowanych linii WJ-MS wykazuje większe SD ($\pm 7,8\%$). Literatura potwierdza różny rozkład procentowy markera CD39 na komórkach MS – od jego braku, po zwiększający się procent, korelujący ze zdolnością immunosupresyjną komórek MS [72][70]. Pożądany i pozytywny efekt w hamowaniu odpowiedzi zapalnej obserwowano także przy obecności czynnika HO-1. HO-1 indukowany jest przez stres oksydacyjny i cytokiny zapalne, jednak dzięki swoim właściwościom przeciwutleniającym może hamować apoptozę komórek. Chen X. i wsp. w modelu *in vitro* wykazali, że szczurze komórki MS transdukowane lentiwirusem zapewniającym ekspresję HO-1 cechowały się zwiększoną zdolnością do wyciszenia zaindukowanych uszkodzeń zapalnych [73]. Analiza cytometryczna w badaniach objętych niniejszą rozprawą doktorską dla średniego procenta markera HO-1 na komórkach WJ-MS od 14 różnych dawców wykazała $7,5 \pm 5,3\%$ (ryc. 17). W literaturze naukowej brak jest dokładnych danych procentowych dla markera HO-1 na komórkach WJ-MS, jednak naukowcy tak samo jak w przypadku komórek szczurzych starają się zwiększyć potencjał terapeutyczny MS, wzmacniając obecność HO-1 w komórkach. Nadekspresję uzyskują, stosując modyfikacje genetyczne lub kondycjonowanie komórek MS dodając do medium hodowlanego IFN- γ , czyli poprzez ich ekspansję w warunkach prozapalnych [74]. Co ciekawe, Yang Y. i wsp. wykazali terapeutyczne działanie komórek MS z nadekspresją HO-1, skutecznie regulując polaryzację mikrogleju w mikrośrodowisku tkankowym podczas stanu zapalnego, co jest pożądane w leczeniu choroby ALS [75]. Również opis patentowy o numerze CA2876499A1 ujawnia zastosowanie rozszerzonego panelu składającego się z ponad 20 markerów (m.in. CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, CD44, CD13, CD29, CD54, CD49E, CD45, CD34, CD31, SSEA4, OCT4, NANOG, TRA-1-60) do oceny hES-MS (ang. *human embryonic stem cell-derived mesenchymal stroma cells*) wytworzonych zgodnie z wymogami standardów produktów leczniczych terapii zaawansowanej przeznaczonych do terapii chorób autoimmunologicznych, w szczególności stwardnienia rozsianego. Autorzy przyznają, że ograniczone źródła i zmienność biologiczna ludzkich tkanek od różnych dawców ograniczają badania i

zastosowanie MSC, uniemożliwiają standaryzację MSC jako produktu terapeutycznego do zastosowania klinicznego na większą skalę. Dodatkowo MSC pochodzące z tkanek dorosłych są wysoce heterogennymi populacjami komórek i być może tylko część komórek wywiera działanie immunomodulujące [76]. Powyższe doniesienia publikacyjne, jak również wyniki uzyskane w pracy potwierdzają zmienność biologiczną komórek MSC izolowanych od różnych dawców, jak też potrzebę wprowadzenia dodatkowych narzędzi klasteryzujących produkty komórkowe o zbliżonych właściwościach terapeutycznych. Jako że produkt jest oparty na komórkach multipotencjalnych, ważne jest, by możliwie wiarygodnie potwierdzić jego bezpieczeństwo i ocenić potencjał do niekontrolowanego rozrostu. Dlatego kolejnym etapem rozszerzonej charakterystyki była analiza molekularna i ocena bezpieczeństwa linii WJ-*MSC* pod kątem ekspresji kluczowych genów według patentu PL 241520 B1 *Zastosowanie panelu genów do określania potencjału teratogennego komórek mezenchymalnych i pochodzenia perinatalnego*, opracowanego w laboratorium badawczo-rozwojowym PBKM [42]. Głównym celem tego testu było zbadanie zbieżności w ekspresji genów w produktach komórkowych WJ-*MSC* przeznaczonych do badania klinicznego ALSTEM względem oznaczonych w PBKM linii kontrolnych WJ-*MSC* oraz linii pluripotencjalnych i nowotworowych. Badane różnice w ekspresji genów oparto na stworzonym „panelu genetycznym”, mającym służyć molekularnej ocenie bezpieczeństwa linii mezenchymalnych komórek stromalnych pochodzących z galarety Whartona (WJ-*MSC*). Zastosowana metoda analizy wykorzystuje łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) do oceny ekspresji wyselekcjonowanych charakterystycznych markerów genetycznych dla linii: WJ-*MSC*, pluripotencjalnych, ludzkich indukowanych komórek macierzystych (hIPS) oraz nowotworowych pochodzenia endodermalnego, mezodermalnego i ektodermalnego. Dzięki zaprojektowanemu w tym celu panelowi możliwa jest pośrednia ocena bezpieczeństwa badanych linii WJ-*MSC* w kontekście ich potencjalnie onkogenego profilu ekspresji. Linie WJ-*MSC* na podstawie przeprowadzonej analizy molekularnej charakteryzowały się profilem ekspresji zbieżnym z grupą referencyjną WJ-*MSC* (ryc. 18A). Linie te wykazują bardzo niską ekspresję genów pluripotencji (ryc. 18B). Dodatkowo linie te nie wykazują profilu ekspresji zgodnego z referencyjną grupą nowotworową w panelu ektodermalnym, mezodermalnym i endodermalnym, potwierdzając, że badane populacje nie posiadają cech (na poziomie molekularnym) typowych dla linii nowotworowych (ryc. 18A). Kolejny krok rozszerzonej charakterystyki obejmował analizy sekretomu linii WJ-*MSC*, które wykazały różny poziom wydzielania BDNF, HGF, IL-6, IL-8, MCP1, RANTES, TGFb1, TGFb2 w zależności od dawcy (ryc. 19), co potwierdza również obserwacje innych autorów [40][53][77] dotyczące zmienności biologicznej. Jak wskazują

obserwacje dokonane przy okazji opracowywania testu kohodowli, profil wydzielniczy MSC jest powiązany i zależny od mikrośrodowiska, w którym znajdują się komórki MSC, a w przypadku grupy badawczej Sykova E. mogą np. wydzielać neuroprotektoryczne czynniki wzrostu (np. GDNF, BDNF, VEGF, IGF-1 czy NGF) w tkance nerwowej, chroniąc neurony, komórki glejowe czy połączenia nerwowo-mięśniowe [29]. W profilu wydzielniczym zaobserwowano istotną negatywną korelację dla TGF- β 2 i HGF, a pozytywną dla HGF i MCP1 oraz RANTES i MCP-1. Powszechnie uznane jest, że działanie terapeutyczne MSC zależy od ich zdolności do wydzielania czynników przeciwzapalnych i immunomodulujących. Jednym z rozwiązań na zmienność w sekretomie pod względem dawców i źródeł pochodzenia jest tzw. *priming* cytokinowy. Wykazano, że *priming* komórek MSC koktajlem prozapalnych cytokin IFN- γ oraz TNF- α skutkowało wyrównaniem zdolności immunomodulujących w kierunku immunosupresji wśród dawców [68].

Pozytywny efekt komórkowej terapii MSC wiąże się raczej z ich właściwościami adjuwantowymi i działaniem parakrynnym niż z bezpośrednim kontaktem „komórka–komórka”. W tym celu zaprojektowano i dobrano parametry kohodowli pośredniej komórek WJ-MSC oraz komórek jednojądrzastych krwi obwodowej zdrowego dawcy (ang. *mononuclear cell*, MNC) (ryc. 9). Uzyskane wyniki pozwoliły określić zmianę liczby/żywołności komórek MNC, subpopulacji limfocytów oraz charakterystycznych markerów aktywacji. Ponownie podczas przeprowadzania rozszerzonej charakterystyki 14 linii wartość zmienna danego parametru była różna w zależności od dawcy. Większość linii WJ-MSC wykazała wzrost odsetka komórek Th (ryc. 25) i spadek Tc (ryc. 26) w kohodowli. W przypadku subpopulacji komórek Th1 (ryc. 32) i Th17 (ryc. 34) tylko część linii wykazała pożądaną spadek ich liczb. Wpływ kohodowli na subpopulację Th2 (ryc. 33) potwierdził jej wzrost dla wszystkich linii WJ-MSC. Nie zaobserwowano wzrostu subpopulacji komórek T-reg (ryc. 31) w kohodowli z żadną z linii WJ-MSC. Przyczyną braku wzrostu odsetka limfocytów Treg może być kohodowla pośrednia z użyciem insertu, a nie bezpośrednia, umożliwiająca kontakt „komórka–komórka” [78]. Tym bardziej że w kohodowli obserwujemy wzrost subpopulacji komórek Th (naiwnych) (ryc. 27) dla większości linii, a cytokiną niezbędną do różnicowania naiwnych limfocytów Th do komórek T-reg (CD4+CD25+Foxp3+) jest TGF- β [79], której wydzielanie potwierdzono dla większości charakteryzowanych linii WJ-MSC (ryc. 19). Komórki MSC hamują proliferację oraz aktywację komórek NK (ryc. 23) oraz NKT (ryc. 24) [69]. W teście kohodowli dla linii WJ-MSC w przypadku subpopulacji NK obserwowano podobny efekt na podstawie uzyskanej wartości zmiennej. Bardzo ważnym elementem do obserwacji w przypadku testu kohodowli jest profil aktywacji komórek MNC na

podstawie markerów CD69 oraz CD25 na komórkach Th i Tc. Zaobserwowano pozytywny efekt wyciszenia aktywacji wczesnej (CD69+CD25-) na komórkach Th w większości kohodowli z liniami WJ-MSC (ryc. 35). W przypadku aktywacji właściwej (CD69+CD25+) (ryc. 36) oraz późnej (CD69-CD26+) (ryc. 37) immunomodulacja miała różny skutek w zależności od dawcy.

Rozszerzona charakterystyka i uzyskane wyniki w niniejszej pracy doktorskiej potwierdziły różnice w liniach WJ-MSC w zależności od dawcy, pozwoliły stworzyć algorytm przyporządkowujący daną serię produktów komórkowych (WJ-MSC) do trzech samodefiniujących się na podstawie analizy PCA klastrów (ryc. 44). Ideą zaproponowanego podejścia było założenie, że serie produktów komórkowych przypisane do wyznaczonych klastrów na podstawie stworzonego algorytmu będą charakteryzować się podobną aktywnością biologiczną. Wszystkie zebrane dane, obejmujące wyniki z fenotypu klasycznego i nieklasycznego komórek WJ-MSC, test CFU, poziom ekspresji na podstawie testu bezpieczeństwa molekularnego, sekretom komórek WJ-MSC oraz 24 wartości zmienne dla testu kohodowli, a w ogólnym podsumowaniu rozszerzonej charakterystyki 58 zmienne, określili za pomocą metod statystycznych i przeprowadzenia klasteryzacji nienadzorowanej podział linii WJ-MSC na trzy grupy. Opracowany algorytm pozwolił na scharakteryzowanie trzech klastrów dla produktów linii WJ-MSC do badania klinicznego ALSTEM na podstawie pięciu istotnych parametrów (poziom markera HO-1 na komórkach WJ-MSC, poziom zmiany ekspresji POU5F1 (OCT3/4) oraz wybrane wartości zmienne komórek MNC (limfocyty Th, limfocyty Th naiwne, aktywacja wczesna na limfocytach Th) jako zbioru wejściowego dla klasyfikatora (ryc. 47).

Linie WJ-MSC zaklasyfikowano do jednego z trzech klastrów, których nazwy zostały zaproponowane na podstawie charakterystycznego profilu wartości parametrów kluczowych dla przeprowadzenia grupowania.

KLASTER 1 („klaster proregeneracyjny”) – charakteryzuje się wysoką wartością *POU5F1(OCT3/4)* oraz wynikiem testu kohodowli o niskiej wartości Th i wysokiej dodatniej wartości zmiennej subpopulacji komórek Th naiwnych oraz najniższym spadkiem aktywacji wczesnej na limfocytach Th (ThCD69+CD25-) – klasyfikuje produkty komórkowe WJ-MSC od 8 różnych dawców. Mimo wyższej ekspresji *OCT3/4* nie sięga ona poziomów oznaczanych w liniach pluripotentnych, a tym samym nie niesie za sobą ryzyka związanego z nowotworzeniem *in vivo*. Dodatkowo w teście kohodowli linie WJ-MSC klastra 1 w kontakcie z MNC powodowały zwiększenie odsetka limfocytów T pomocniczych o fenotypie naiwnym (CD3+CD4+CD45RA+). Jak opisano w literaturze, taki zwiększony

odsetek naiwnych Th jest skorelowany z lepszym rokowaniem dla pacjentów z ALS [80][81][82][83]. W badaniu klinicznym ALSTEM 14 pacjentów otrzymało produkty komórkowe WJ-MSC z klastra 1. Pozytywny wpływ na leczenie odnotowano u 7 pacjentów (50%), brak odpowiedzi u 4 pacjentów (29%), neutralny wpływ u 3 pacjentów (21%).

KLASTER 2 („klaster nadaktywny”) – charakteryzuje się niskim odsetkiem markera HO-1 na powierzchni komórek WJ-MSC, niską ekspresją *POU5F1 (OCT3/4)*, a w kohodowli w kontakcie z MNC powoduje najwyższe obniżenie odsetka naiwnych limfocytów Th, co może negatywnie wpłynąć na wydajność różnicowania do komórek T-reg (CD4+CD25+Foxp3+) przy udziale TGF- β [69][81] – klasyfikuje produkty komórkowe WJ-MSC od 2 różnych dawców. W badaniu klinicznym ALSTEM – 2 pacjentów otrzymało produkty komórkowe WJ-MSC z klastra 2. Nie odnotowano u nich pozytywnego wpływu na efekt terapeutyczny.

KLASTER 3 („klaster antystresowy”) – charakteryzuje się wysokim procentem markera HO-1 na powierzchni komórek WJ-MSC, niską wartością *POU5F1(OCT3/4)*, wynikiem testu kohodowli o wysokiej wartości Th – klasyfikuje linie WJ-MSC od 4 różnych dawców. W klastrze tym komórki wykazują najwyższy odsetek markera HO-1, który to jest zaangażowany w komunikację międzykomórkową, immunomodulację czy odpowiedź na stres oksydacyjny poprzez hamowanie apoptozy ze względu na właściwości przeciwutleniające. W literaturze pojawiają się doniesienia o wprowadzeniu wymuszonej ekspresji tego genu do komórek MSC jako podejścia wzmacniającego efekt terapeutyczny komórek mezenchymalnych i indukcję komórek Treg [74]. W badaniu klinicznym ALSTEM 3 pacjentów otrzymało produkty komórkowe WJ-MSC z klastra 3. Odpowiedź na terapię była niejednakowa, gdyż wystąpił pozytywny oraz neutralny wpływ, jak również brak odpowiedzi.

Uzyskane wyniki są pilotażowe i ze względu na ich ograniczony charakter należy traktować ich interpretację jako założenie do szerszych badań.

Klasyfikowanie linii komórkowych/produktów MSC do jednego z wymienionych wyżej klastrów terapeutycznych może pomóc w doborze odpowiedniego produktu komórkowego do zastosowania w danej jednostce chorobowej. Po walidacji klastrów na większej liczbie linii MSC i MNC pacjentów – rozwiązaniem może okazać się możliwość predykcji odpowiedzi pacjenta na produkt komórkowy z danego klastra terapeutycznego. Takie podejście do produktu komórkowego i jego oceny jakościowej wychodzi naprzeciw potrzebie standaryzacji protokołu wytwarzania produktu komórkowego. Dodatkowym atutem jest redukcja liczby mierzonych parametrów umożliwiających przyporządkowanie serii produktów komórkowych MSC, co znacznie skraca czas analiz oraz redukuje koszty. W dniu 8 grudnia 2022 roku dokonano zgłoszenia patentowego: *Sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na*

właściwości terapeutyczne. Przedmiotem wynalazku jest sposób klasteryzacji serii produktów komórkowych opartych na komórkach MSC ze względu na ich właściwości terapeutyczne oraz dobór produktu komórkowego przez dopasowanie dawcy do biorcy.

Wytworzone i zwolnione produkty komórkowe WJ-MSC, na których to w niniejszej rozprawie wykonano rozszerzoną charakterystykę, przeznaczone były do badania klinicznego ALSTEM, polegającego na „ocenie wpływu komórek macierzystych galarety Whartona (WJMSCs) na układ immunologiczny pacjentów z rozpoznaniem stwardnienia bocznego zanikowego (ALS)”, posiadającej pozytywną decyzję nr UR/DBL/D.158/20, wydaną przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPL). W badaniu klinicznym ALSTEM przebadano 26 osób, a do podania trzech dawek badanego produktu leczniczego (BPL – preparat komórek WJ-MSC) ostatecznie zakwalifikowano 19 pacjentów z rozpoznaniem ALS (tabela 6). Harmonogram badania obejmował trzy wizyty skriningowe, trzy wizyty hospitalizacyjne, podczas których nastąpiło podanie badanego produktu leczniczego oraz kolejno obserwację (ryc. 11). Na podstawie współczynnika wartości zmiennych skali ALSFR-S pacjentów podzielono na grupy „responder” (8 pacjentów), „non-responder” (7 pacjentów) oraz „null” (4 pacjentów) (tabela 7). Dalszą dyskusję oparto na pogrupowaniu pacjentów na grupę responder (pozytywna odpowiedź na BPL) oraz non-responder (brak odpowiedzi na BPL). Nie zaobserwowano zależności między wiekiem (średnia wieku 60 ± 10 lat) (ryc. 50), postacią choroby (opuszkowa/kończynowa) (ryc. 49A) oraz płcią (ryc. 49B) a odpowiedzią terapeutyczną w badaniu klinicznym ALSTEM. Odnotowano brak istotnej zależności w przypadku ciśnienia krwi mierzonego między poszczególnymi wizytami (ryc. 52, 53). Kolejno parametry oddechowe wydają się dość ważnym elementem charakteryzującym pacjenta ALS. W tym przypadku średnia saturacja pacjentów utrzymywała się $>95\%$ (ryc. 57), a mimo istotnych różnic w pomiarze oddechów na minutę dla grupy non-responder pomiar mieścił się w normie dla osoby zdrowej, dla której liczba oddechów w spoczynku wynosi 12–15 na minutę [84]. Wyniki oznaczeń kwasu moczowego w osoczu pacjentów ALS dokonywanych na poszczególnych wizytach nie były istotne w obrębie grup ani czasu obserwacji (ryc. 60). Liczne badania pacjentów z ALS wykazały niższy poziom kwasu moczowego w porównaniu z populacją osób zdrowych. Kwas moczowy odgrywa rolę neuroprotekcyjną jako silny przeciwutleniacz u pacjentów z ALS, a także bierze udział w wielu interakcjach neurochemicznych w OUN. Jednak ostateczne potwierdzenie jego roli w neuroprotekcji czy wyznaczenie kwasu moczowego jako biologicznego markera progresji są nadal w fazie badań [85]. Kolejnym literaturowym predyktorem obok kwasu moczowego we krwi jest kreatynina.

Wyższy wyjściowy poziom kreatyniny był związany z wolniejszym spadkiem ALSFRS-R i dłuższym przeżyciem. Niższy poziom kreatyniny w chwili rozpoznania korelował z niższą punktacją w skali ALSFRS-R [30]. Istotnie zauważalną różnicą w grupach responder i non-responder był wzrost poziomu kreatyniny bezpośrednio po podaniu BPL, który spadał kolejnego dnia do wartości wyjściowej w dniu przyjęcia (ryc. 61). Podobnie w przypadku kinazy kreatyninowej, której niższy poziom może być powiązany z szybszą progresją oraz niższą punktacją ALSFRS-R. Obniżenie aktywności kinazy kreatynowej pozwala odzwierciedlić ilość masy mięśniowej, gdyż jej niski poziom związany jest z ciężkim uszkodzeniem mięśni u pacjentów ALS [86]. Wśród pacjentów ALSTEM nie obserwowano istotnych różnic stężenia kinazy kreatynowej w grupie responder oraz non-responder (ryc. 67). Podobnie nie było istotnych różnic między grupami w przypadku albuminy w surowicy (ryc. 62). W literaturze niższy poziom albuminy jest powiązany z jej wyższą aktywnością zapalną, a zapalenie układu nerwowego zostało zidentyfikowane jako patomechanizm ALS. Ponadto ma ona również właściwości antyoksydacyjne, więc wyższy poziom może zapewnić ochronę przed stresem oksydacyjnym występującym w ALS. Poziom albuminy to kolejny kandydat na marker progresji ALS, wskazujący, że jego niskie stężenie może być powiązane ze złym stanem funkcjonalnym oraz rokowaniem wśród pacjentów ALS [86]. Kolejny parametr to białko C-reaktywne (CRP), marker stanu zapalnego, dla którego odnotowano niższy poziom w grupie responder (pacjenci pozytywnie reagujący na terapię komórkową WJ-MSC) w porównaniu z grupą non-responder (ryc. 63). Prace donoszą, że już nawet nieznacznie podwyższone CRP zwiększa przepuszczalność bariery krew–mózg, wywołując w ten sposób aktywację mikrogleju, co może prowadzić do wzmożonego uwalniania cytokin prozapalnych, zapalenia układu nerwowego i śmierci komórek mózgowych. Potwierdzenie tej zależności wymaga bardziej dogłębnych badań definiujących mechanizmy łączące ogólnoustrojowy stan zapalny z patofizjologią rozwoju ALS [87][88][89][90].

Stwardnienie zanikowe boczne jest chorobą o podłożu immunologicznym [91]. Dysfunkcja układu odpornościowego skutkuje rozregulowaniem ośrodkowej i obwodowej reakcji zapalnej. Stan zapalny nerwów wiąże się z aktywacją mikrogleju, astrogliozą, naciekiem limfocytów T i monocytów oraz nadprodukcją cytokin prozapalnych. Badanie profilu immunologicznego pacjentów poprzez ocenę płynu mózgowo-rdzeniowego oraz składowych komórkowych subpopulacji krwi sprzyja wykazaniu potencjalnego celu terapeutycznego lub wyznaczeniu biomarkerów charakteryzujące patogenezę choroby ALS. Zarówno wrodzona, jak i nabyta odpowiedź immunologiczna jest zaangażowana w progresję ALS. W zależności od stadium choroby może promować albo neuroprotekcję, albo

neurotoksyczność. Początkowa bezobjawowa faza choroby oraz faza pierwszych objawów związana jest z aktywacją odpowiedzi przeciwzapalnej (przeciwzapalny mikroglej, komórki Treg i limfocyty Th oraz Th2). Przyjmuje się, że w początkowym stadium choroby tworzone jest środowisko neuroprotekcyjne, gdzie czynniki neurotroficzne i cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-4 i IL-10, są wydzielane przez otaczające astrocyty i mikroglej (odpowiedź M2). W miarę postępu choroby, a następnie jej terminalny etap są zdominowane przez odpowiedź prozapalną (prozapalny mikroglej i astrocyty, monocyty zapalne, cytotoksyczne limfocyty Tc, Th1, Th17, komórki NK i neutrofile). Konsekwencją jest uwolnienie czynników toksycznych, w tym reaktywnych form tlenu (ROS) oraz cytokin prozapalnych, m.in. IL-1 czy TNF, powodujące postępujące uszkodzenie neuronów ruchowych (odpowiedź M1) [92]. Fenotypowa ocena cytometryczna limfocytów T (CD3+) (ryc. 82) oraz B (CD19+) (ryc. 83) wśród pacjentów badania klinicznego ALSTEM nie wykazała istotnych zmian wśród grup oraz wizyt. Krew obwodowa pacjentów z rozpoznaniem ALS zawiera wyższy odsetek limfocytów NK i B w porównaniu z krwią zdrowej osoby. Komórki NK pośredniczą w polaryzacji w kierunku prozapalnym mikrogleju i astrocytów poprzez wydzielanie IFN- γ lub mają zdolność bezpośredniej indukcji apoptozy neuronów ruchu [93]. Komórki NK i ich cytotoksyczność odgrywają kluczową rolę zarówno w odporności wrodzonej, jak i nabytej. Ich obecność potwierdzono w tkankach obwodowych oraz krwi pacjentów z ALS [91]. Większy procent komórek NK wśród pacjentów ALSTEM ze wszystkich wizyt był w grupie responder w porównaniu z grupą non-responder (ryc. 93). Monocyty są jednym z głównych składników układu odpornościowego, odpowiedzi wrodzonej, biorąc udział w fagocytozie i wydzielaniu cytokin. Po kilku dniach krążenia na obwodzie monocyty migrują do tkanek, gdzie różnicują się w makrofagi lub komórki dendrytyczne. Podczas urazu lub zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) makrofagi pochodzące z monocytów mają zdolność infiltracji do OUN, pokonując barierę krew-mózg, wykazując działanie prozapalne bądź przeciwzapalne w zależności od fenotypu środowiska, w jakim się znajdują. W materiale pośmiertnym monocyty wykryto w pobliżu neuronów, gdzie ich obecność mogła korelować z progresją choroby. Jednocześnie obserwowano również zmniejszenie liczby krążących monocytów u pacjentów z ALS, przypuszczając, że spadek ten spowodowany jest migracją tych komórek do OUN [94]. We krwi obwodowej pacjentów ALSTEM nie zaobserwowano istotnych różnic między grupą responder a non-responder (ryc. 87). Limfocyty T na swojej powierzchni mogą mieć glikoproteinę CD8 (komórka T cytotoksyczna, Tc) lub glikoproteinę CD4 (komórka T pomocnicza, Th). Komórki Tc infiltrują do OUN, gdzie uczestniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez wytwarzanie cytokin, takich jak IFN- γ i TNF- α . W przeciwieństwie

do komórek Th, które są zaangażowane w różnym stadium choroby, komórki Tc obserwuje się dopiero w późniejszym stadium. We krwi obwodowej pacjentów z ALS wykryto zwiększony poziom komórek Th, a obniżony poziom komórek Tc w porównaniu z osobami zdrowymi [94]. Różnice w oznaczonym odsetku limfocytów Th u pacjentów ALSTEM we krwi obwodowej w poszczególnych grupach („responder”, „non-responder”) nie były istotne (ryc. 84). W badaniach Grassano i wsp. przedstawiono, że zwiększona liczba limfocytów Tc we krwi obwodowej korelowała z szybką progresją choroby [95]. Limfocyty Tc rozpoznają antygen prezentowany na głównym układzie zgodności tkankowej I (MHC klasy I). Po związaniu receptora komórek T (TCR) z MHC klasy I komórki te mogą m.in. uwalniać perforyny i granzymy, prowadząc do apoptozy komórki docelowej, np. neuronu ruchowego [93]. Procent limfocytów Tc u pacjentów oznaczony w badaniu ALSTEM znajdował się na podobnym poziomie w obu grupach terapeutycznych (ryc. 85), ale był mniejszy niż procent limfocytów Th (ryc. 84). Sprawdzone charakterystyczne markery aktywacji komórek, takie jak: CD69, CD25 i HLA-DR. W przypadku późnej aktywacji dla komórek Tc (CD8+HLA-DR+) najwyższy wynik osiągnęła grupa responder (ryc. 92). Aktywowane komórki Th często różnicują w jeden z dwóch fenotypów: Th1 lub Th2. Komórki Th1 wytwarzają interleukinę (IL-2), interferon gamma (IFN- γ) i czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α). Biorą głównie udział w reakcjach zapalnych lub autoimmunologicznych. Komórki Th2 charakteryzują się wytwarzaniem cytokiny IL-4, pośrednicząc w obronie humoralnej przed bakteriami i wirusami lub obronie przeciwalergicznej. W 2005 roku zidentyfikowano kolejny podtyp komórek Th – komórki Th17. Różnicowanie w Th17 następuje w obecności m.in. TGF- β i IL-6. Według coraz większej liczby doniesień literaturowych komórki Th17 mogą mieć bardziej znaczący wpływ na patogenezę ALS niż komórki Th1 [96]. We krwi obwodowej pacjentów ALSTEM zostały oznaczone subpopulacje komórek Th1, Th2 oraz Th17. W przypadku subpopulacji Th1 dzień przed pierwszym podaniem BPL można zaobserwować najmniejszy procent w grupie responder (ryc. 95). Wśród populacji komórek Th2 nie stwierdzono istotnych różnic na poszczególnych wizytach (ryc. 86). Wyniki uzyskane dla oceny odsetka Th2 (komórki przeciwzapalne) były zbliżone dla grup, a ich procent był większy niż procent subpopulacji Th1 (komórki prozapalne). Wyniki mogą sugerować, że dominują neuroprotektoryjne komórki Th2, jak w przypadku wczesnej fazy progresji ALS, która ostatecznie w późniejszej fazie przesuwa się w kierunku szkodliwej odpowiedzi Th1 [97]. Komórki Th17 są uważane za silnie związane z procesem chorobotwórczym przez ich prozapalny charakter i profil wydzielanych cytokin (np. IL-17A, IL-21, IL-23, IL-6, IFN- γ i GM-CSF) [96]. Wśród uzyskanych wyników dla subpopulacji Th17 widoczna jest różnica między grupą responder a non-responder (ryc. 96).

Największy procent Th17 utrzymywał się na wszystkich wizytach w grupie non-responder, ale przy $p < 0,05$ w porównaniu z grupą responder wynik istotny był po pierwszym podaniu BPL, miesiąc po podaniu i po drugim podaniu BPL. W ogólnym wyniku w grupach procent dla grupy responder wyniósł $16,3 \pm 6,9\%$, za to w grupie non-responder wynik był wyższy przy $p < 0,0001$ i wyniósł $26,1 \pm 10,2\%$. Powtarzającą się zasadą większości prac o neuroprotektoryjnych zaletach komórek Treg w chorobie ALS, to im większa ich liczba we krwi, tym wolniejszy postęp choroby. Komórki Treg są kluczowym typem komórek odpowiedzialnych za wyciszenie i modulację odpowiedzi immunologicznej, i utrzymywanie w ten sposób homeostazy organizmu [4][98][15][13]. W przypadku pacjentów włączonych do badania ALSTEM procent komórek T-reg we krwi obwodowej z wizyty na wizytę ulegał zmniejszeniu (ryc. 94). W sumarycznych pomiarach w obrębie grup nie obserwowano istotnych różnic.

W celu zbadania profilu cytokin pacjentów z ALS objętych badaniem klinicznym ALSTEM oceniono cytokiny prozapalne (m.in. IL-1b, IL-6, TNF- α), a także cytokiny przeciwzapalne (m.in. IL-4) w osoczu oraz płynie mózgowo-rdzeniowym. Zmiany cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym mogą odzwierciedlać dysfunkcję na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, podczas gdy zmiany obserwowane w surowicy mogą reprezentować wtórną reakcję zapalną związaną z ogólnym stanem zdrowia pacjentów. TNF- α jest główną cytokiną prozapalną, wydzielaną np. przez Tc czy aktywowane makrofagi. W odniesieniu do ALS zwiększone stężenie TNF stwierdzono w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi pacjentów z ALS [4]. Według analizy Brodovitcha i wsp. stężenie TNF- α u zdrowych osób kontrolnych jest mniejsze w porównaniu z chorymi z ALS [99]. W przypadku pacjentów ALSTEM cytokina TNF- α nie wykazała istotnych zmian wśród grup responder i non-responder (ryc. 111). Przeciwzapalna IL-4 jest wydzielana przez komórki Th2 oraz Treg, hamując reakcję zapalną w mikrogleju [91]. W osoczu pacjentów ALSTEM stężenie IL-4 (ryc. 106) było na podobnym poziomie w obu grupach, tak jak wspomniane wcześniej oznaczenie subpopulacji Th2 we krwi (ryc. ryc. 86). IFN- γ jest silną cytokiną prozapalną, która może indukować zapalenie nerwów i doprowadzić do śmierci neuronów ruchowych. Wydzielany jest przede wszystkim przez limfocyty Tc, Th1 i komórki NK [91]. W osoczu pacjentów ALSTEM nie zaobserwowano istotnych różnic IFN- γ dla obu grup (ryc. 116). Pomimo dużej liczby zdefiniowanych interleukin, które wydają się uczestniczyć we wzajemnym oddziaływaniu prozapalnym w patogenezie ALS, nadal nie zidentyfikowano mediatora, który byłby używany jako czynnik diagnostyczno-prognostyczny w ALS. Kolejny czynnik powiązany z ALS to G-CSF, który pośredniczy w stymulacji komórek progenitorowych czy indukowaniu mobilizacji neutrofilii [100]. W płynie mózgowo-rdzeniowym i we krwi u pacjentów z ALS stwierdzono jego wzrost

[4]. Analiza multipleksowa G-CSF w osoczu (ryc. 114) i CSF (ryc. 127) pacjentów ALSTEM nie wykazała istotnych zmian wśród grup charakteryzujących odpowiedź na terapię komórkową WJ-MSC. Kolejną cytokiną zaangażowaną w przebieg ALS jest transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β). Ogólnie TGF- β zaangażowany jest w wiele naprawczych procesów biologicznych, w tym angiogenezę czy gojenie ran, ale w przypadku, gdy to komórki glejowe wykazują nadmierną ekspresję TGF- β 1, efekt neuroprotekcyny zmienia się w neurotoksyczność i przyspieszanie apoptozy neuronów [91][101]. Wykazano, że aktywowany mikroglej u myszy hSOD1, które są wykorzystywane do modelowania ALS, wywala różnicowanie reaktywnych astrocytów wytwarzających TGF- β , tłumiąc funkcje neuroprotekcyny mikrogleju, przyspieszając progresję choroby. Z kolei farmakologiczna blokada sygnalizacji szlaku TGF- β wydłuża przeżycie zwierząt doświadczalnych. Dlatego chociaż TGF- β w początkowej fazie jest cytokiną przeciwzapalną, to w dłuższej perspektywie jego działanie wpływa negatywnie na funkcjonowanie komórek układu nerwowego [92]. W osoczu pacjentów biorących udział w badaniu ALSTEM również nie wykazano istotnych różnic stężenia TGF- β między grupami pacjentów (ryc. 110, 121). Białko chemotaktyczne monocytów 1 (MCP-1) odgrywa ważną rolę związaną z zapaleniem nerwów. W licznych badaniach zaobserwowano podwyższenie poziomu MCP-1 w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi obwodowej u pacjentów z ALS. Zmniejszony wynik MCP-1 korelował z lepszą progresją [102][103][101]. W przypadku pacjentów ALSTEM wykazano odwrotną zależność – to właśnie grupa responder, charakteryzująca się największym współczynnikiem ALSFRS-R, miała jego największe stężenie w CFS (ryc. 130). Dodatkowo w przypadku MCP-1 literatura wskazuje, że u pacjentów z ALS koreluje ono z poziomem neurofilamentów i z innymi markerami prozapalnymi, takimi jak IL-8 czy INF- γ , podkreślając swoje zaangażowanie w procesach neurodegeneracyjnych i neurozapalnych w progresji choroby ALS [4]. Wśród grup pacjentów badania klinicznego ALSTEM wykazano brak istotności w stężeniu IL-8 w CFS (ryc. 126). Mimo dostępnych informacji na temat poziomu różnych grup cytokin oznaczonych w materiale biologicznym problemem w wyznaczeniu znaczących biomarkerów prognostycznych ALS może okazać się współdziałanie czynników środowiskowych otaczających pacjenta [4]. Obecnie jedynym biomarkerem oceniającym postęp choroby ALS jest zewnątrzkomórkowa domena receptora neurotrofiny p75 oznaczana w moczu (p75^{NTR}ECD) [103]. Poziom p75^{ECD} jest wyższy u pacjentów z ALS ($5,6 \pm 2,2$ ng/mg kreatyniny) w porównaniu z grupą kontrolną ($3,6 \pm 1,4$ ng/mg kreatyniny) [101]. Pomiary wśród pacjentów ALSTEM potwierdziły wysoki poziom p75^{ECD} (grupa responder: 6 ± 4 ng/mg kreatyniny, grupa non-responder: 7 ± 3 ng/mg kreatyniny), jednak różnica nie była istotna (ryc.

135). Dodatkowo wśród wszystkich pacjentów, dla których pomiar wykonano na wizycie 1 ($4,78 \pm 1,6$ ng/mg kreatyniny), nastąpił widoczny wzrost ($p < 0,01$) dla pomiaru po upływie 7 miesięcy ($9,1 \pm 5,3$ ng/mg kreatyniny) (ryc. 136).

W badaniu klinicznym ALSTEM potwierdzono bezpieczeństwo podania produktów WJ-MSC pacjentom z ALS. Na podstawie skali ALSFRS-R, służącej do oceny progresji choroby, zdefiniowano grupy pacjentów: z pozytywną odpowiedzią responder (42%), pacjentów z brakiem odpowiedzi na leczenie non-responder (37%) oraz neutralnym wpływem na leczenie null (21%). Na podstawie uzyskanych danych klinicznych (takich jak odpowiedź ze strony układu immunologicznego pacjenta i jego stan kliniczny) zostały zaproponowane predyktory kliniczne do oceny odpowiedzi terapeutycznej na produkt komórkowy WJ-MSC. W ocenie badania klinicznego, tak jak w przypadku klasteryzacji produktów komórkowych WJ-MSC, ponownie wykorzystano metody maszynowego uczenia. Tym razem zastosowano klasteryzację nadzorowaną i do pacjentów przydzielonych do grup responder i non-responder algorytm wytypował czynniki predykcyjne z oznaczonych 123 zmiennych. Propozycja predyktorów opierała się na ocenie 5 istotnych zmiennych (ryc. 138). Wśród predyktorów znalazły się parametry takie jak: siła mięśniowa czy odsetek subpopulacji limfocytów oraz zmiana ich odsetka w czasie obserwacji przed podaniem preparatu. Zmienne, które mają wpływ na predykcję odpowiedzi chorych na terapię komórkową WJ-MSC, to rozkład subpopulacji we krwi obwodowej (limfocyty B, monocyty, oraz komórki Tc pamięci o profilu CD8CD45RO), stężenie białka w CFS oraz pomiar siły mięśni.

Podsumowując, wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są elementem wdrożeniowym w rozwoju terapii komórkowej WJ-MSC w schorzeniu ALS. Klasteryzacja terapeutyczna preparatów WJ-MSC pozwoli na marginalizację ich zmienności biologicznej, spowodowaną heterogenicznością dawców, i na pogrupowanie preparatów charakteryzujących się zbliżoną aktywnością biologiczną. Wprowadzona standaryzacja wyeliminuje różnice między produktami i seriami, które mogą być odpowiedzialne za rozbieżność w wynikach skuteczności pomiędzy badaniami klinicznymi a modelami przedklinicznymi produktu. Kolejny element to medycyna spersonalizowana allogenicznego produktu komórkowego opartego na komórkach WJ-MSC, a wyznaczone predyktory umożliwią rokowanie odpowiedzi na terapię w warunkach laboratoryjnych jeszcze przed rozpoczęciem właściwego leczenia, wprowadzając możliwość zmaksymalizowania oraz dopasowania efektu terapeutycznego. Dodatkowym atutem jest redukcja liczby wykonanych testów i mierzonych parametrów umożliwiających przyporządkowanie serii produktów komórkowych MSC, co znacznie skraca czas analiz oraz redukuje koszty. Jednakże uzyskane wyniki, szczególnie predyktory,

wymagają dalszych badań i przeprowadzenia kolejnego badania klinicznego fazy II/IIIa. W badaniu kolejnej fazy pacjenci będą mieć dobrany i podany preparat WJ-MSK z klastra terapeutycznego charakteryzującego się najbardziej korzystnymi parametrami odpowiedzi immunomodulującej. Takie innowacyjne podejście do modelowania *in vitro* terapii komórkowej przed ostatecznym podaniem preparatu może być przydatne w leczeniu innych zaburzeń neurologicznych. Panel prognostyczny byłby otwarty do modyfikacji zgodnie z mechanizmem choroby i aktualną wiedzą na temat scharakteryzowanych właściwości preparatu komórkowego.

6. PODSUMOWANIE

Pomimo wielu badań MSC jako produktów terapii komórkowej ze względu na niejednoznaczne wyniki istnieje potrzeba dalszej ich charakterystyki w kontekście zastosowania klinicznego. W celu właściwej oceny i potencjalnej klasyfikacji linii WJ-MSC ze względu na właściwości – szczególnej analizie poddano ich zmienność biologiczną. Pomimo wyznaczonych przez ISCT kryteriów heterogeny charakter MSC może wpływać na ich skuteczność terapeutyczną. W badaniach przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykazano brak zmienności produktów WJ-MSC według kryteriów ISCT oraz pod względem specyfikacji zwolnienia serii produktów, jednak w szczegółowych analizach stwierdzono znaczne zróżnicowanie MSC uzyskanych od dawców i w związku z tym potrzebę dalszych badań nad ich charakterystyką w kontekście funkcjonalności i skuteczności klinicznej. Badanie kliniczne ALSTEM, skupiające się na terapii ALS z wykorzystaniem WJ-MSC, przyniosło cenne dane dotyczące odpowiedzi pacjentów na leczenie, stanowiąc istotną wskazówkę do dalszych badań nad terapeutycznym potencjałem tych komórek.

W ramach realizacji badań w pracy doktorskiej:

- 1) ustanowiono bank produktów komórkowych WJ-MSC (zgodnie z obowiązującymi normami cGMP) do badania klinicznego ALSTEM;
- 2) dokonano rozszerzonej charakterystyki banku produktów komórkowych WJ-MSC opartej na: teście jednostki tworzącej kolonie (CFU), rozszerzonym fenotypie z nieklasycznymi markerami takimi jak CD119, CD200, CD120b, CD72, CD273, CD274, CD39, HO-1, panelu bezpieczeństwa określającym poziom ekspresji wybranych genów, analizie poziomu wydzielniczego (sekretomu), teście sprawdzającym właściwości immunomodulujące produktu opartym na kohodowli WJ-MSC z aktywowanymi jednojądrzastymi komórkami (MNC) dawcy zdrowego;
- 3) zaproponowano protokół klasteryzacji i podziału na klastry terapeutyczne produktów komórkowych WJ-MSC na podstawie ich rozszerzonej charakterystyki oraz przy użyciu algorytmów uczenia maszynowego;
- 4) oceniono odpowiedź terapeutyczną pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM na badany produkt leczniczy – BPL (allogeniczne komórki WJ-MSC) na podstawie parametrów i standardowych ocen klinicznych, a także immunofenotypu krwi obwodowej, profilu

wybranych cytokin, chemokin, czynników wzrostu w osoczu oraz płynie mózgowo-rdzeniowym i biologicznego markera progresji choroby ALS – p75^{ECM} w moczu;

- 5) zidentyfikowano czynniki predycyjne umożliwiające ocenę potencjalnej skuteczności terapii komórkowej WJ-MSC przy użyciu algorytmów uczenia maszynowego.

7. WNIOSKI KOŃCOWE

Na podstawie przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej doświadczeń zgromadzono i przeprowadzono produkcję BPL opartego na WJ-MSC. Przeprowadzono rozszerzoną charakterystykę linii WJ-MSC, która pozwoliła na klasteryzację. Procedura oceny i klasteryzacji stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego UPP-329394 *Sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne*.

Przygotowane produkty WJ-MSC zostały zastosowane w badaniu klinicznym ALSTEM. Po przeprowadzeniu analiz dotyczących zarówno danych klinicznych, jak i dodatkowych niestandardowych oznaczeń z wykorzystaniem metod uczenia maszynowego wytypowano potencjalne kryteria pozwalające na predykcję odpowiedzi pacjentów na terapię.

Uzyskane wyniki pozwoliły na postawienie następujących wniosków:

1) Bank produktów komórkowych WJ-MSC

Zastosowana metodologia pobrania i przetwarzania tkanki pępowiny pozwoliła na przygotowanie preparatów komórkowych zgodnie z obowiązującymi normami cGMP. Komórki WJ-MSC wyizolowano od 14 dawców, tworząc 113 dawek w kasetach mrożeniowych zawierających 40×10^6 komórek, które zostały zwolnione do badania klinicznego ALSTEM.

2) Rozszerzona charakterystyka banku produktów komórkowych WJ-MSC

Wytyczne ISCT, choć powszechnie akceptowane, nie gwarantują powtarzalności właściwości produktów komórkowych MSC, a ich ocena nie pozwala na uchwycenie różnic pomiędzy liniami. Wykazano, że produkty komórkowe MSC są heterogenne pod względem dynamiki proliferacji, klonogenności, wydzielanych czynników (sekretomu) czy potencjału do różnicowania. Ze względu na zróżnicowane zdolności immunomodulacyjne – MSC wywierają zróżnicowany wpływ na funkcje komórek układu odpornościowego. Dla zastosowań klinicznych WJ-MSC istnieje potrzeba rozszerzonej charakterystyki produktów ATMP, która ocenia funkcjonalność komórek. Jako że produkty WJ-MSC poddane szczegółowej analizie wykazały duże zróżnicowanie pomiędzy dawcami pod kątem profilu wydzielniczego, profilu ekspresji genów, rozszerzonego fenotypu – nieklasycznego czy oceny potencjału linii WJ-MSC do immunomodulacji aktywowanych MNC, ta heterogenność powinna być oceniana w rutynowej charakterystyce komórek.

3) Nienadzorowana klasteryzacja serii produktów WJ-MSC

Klasteryzacja wyodrębniła trzy klastry produktów ATMP. Przyporządkowanie do danego klastra było możliwe poprzez ocenę:

- zdolności immunomodulujących opartych na zoptymalizowanym w trakcie realizacji pracy doktorskiej teście kohodowli MNC-WJ-MSC (zmiana odsetka komórek Th; zmiana odsetka obecności markera aktywacji wczesnej CD69+CD25- na komórkach Th; zmiana odsetka komórek Th naiwnych);
- poziomu ekspresji genu *POU5F1/Oct-4* w komórkach WJ-MSC;
- odsetka MSC wykazującego obecność markera powierzchniowego HO-1.

Klasyfikowanie linii komórkowych MSC może wspomóc dobór odpowiedniego produktu komórkowego – może służyć jako narzędzie dopasowania dawcy do biorcy. Dodatkowo redukcja liczby mierzonych parametrów linii komórkowych MSC skraca znacznie czas analiz oraz ich koszt.

4) Ocena odpowiedzi terapeutycznej pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM na badany produkt leczniczy (allogeniczne komórki WJ-MSC)

Badanie kliniczne ALSTEM miało na celu ocenę wpływu komórek wyizolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC) na układ immunologiczny pacjentów z rozpoznaniem choroby ALS. Ostatecznie do podania BPL zakwalifikowano 19 pacjentów, a ich odpowiedź terapeutyczna została określona na podstawie współczynnika trendu skali ALSFRS-R. Potwierdzono bezpieczeństwo podania produktów WJ-MSC pacjentom z ALS. Na podstawie skali ALSFR-S zdefiniowano grupy pacjentów: z pozytywną odpowiedzią („responder”, 42%), bez pozytywnej odpowiedzi („non-responder”, 37%) i wykazujących neutralną odpowiedź na leczenie („null”, 21%).

5) Identyfikacja czynników predykcyjnych – algorytm nadzorowany

Wykorzystując dane dla grup klinicznych responder, non-responder oraz null i stosując nadzorowany algorytm oparty na uczeniu maszynowym, ustalono założenia predykcji odpowiedzi terapeutycznej na podstawie:

- oceny immunofenotypu MNC krwi obwodowej (limfocyty B, monocyty, Tc naiwne) w kohodowli;
- pomiaru siły mięśni;
- poziomu białka w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach realizacji doktoratu wdrożeniowego mogą w dalszej perspektywie stanowić punkt odniesienia do przyszłej charakterystyki aktywności biologicznej produktów leczniczych terapii zaawansowanych opartych na ludzkich WJ-MSC, uwzględniając zmienność biologiczną zależną od dawcy czy protokołu wytwarzania. Dodatkowo analizy materiału biologicznego pacjentów, m.in. na poziomie immunologicznym, umożliwiły wskazanie parametrów predykcyjnych pozwalających potwierdzić pozytywną odpowiedź pacjenta na leczenie preparatem WJ-MSC.

8. LISTA PROCEDUR powstała w ramach doktoratu wdrożeniowego

- ID-0051_ALSTEM-001_Schemat postępowania z próbkami z badania klinicznego
- ID-0052_ALSTEM-002_Izolacja komórek MNC z krwi pełnej
- ID-0053_ALSTEM-003_Mrożenie komórek MNC
- ID-0054_ALSTEM-004_Aktywacja i ekspansja komórek MNC
- ID-0055_ALSTEM-005_Kohodowla komórek MNC z komórkami WJ-MSC
- ID-0056_ALSTEM-006_Znakowanie krwi pełnej
- ID-0057_ALSTEM-007_Znakowanie komórek MNC
- ID-0058_ALSTEM-008_Znakowanie komórek WJ-MSC
- ID-0059_ALSTEM-009_Schemat postępowania przy charakterystyce banku komórek WJ-
MSC
- ID-0060_ALSTEM-010_Test CFU
- ID-0061_ALSTEM-011_Pasaż komórek WJ-MSC
- ID-0062_ALSTEM-012_Mrożenie komórek WJ-MSC
- ID-0063_ALSTEM-013_Izolacja DNA z krwi (QIAamp – Qiagen)
- ID-0064_ALSTEM-014_Izolacja RNA (RNeasy Mini Kit – Qiagen)
- ID-0065_ALSTEM-015_Pomiar czystości i stężenia wyizolowanego RNA
- ID-0066_ALSTEM-016_Sprawdzanie jakości i integralności próbek RNA na żelu
agarozowym
- ID-0067_ALSTEM-017_Odwrotna transkrypcja – Maxima H Minus Kit
- ID-0068_ALSTEM-018_Panel bezpieczeństwa MSC – RT-PCR i analiza wyników
- ID-0069_ALSTEM-019_Oznaczenie cytokin wewnątrzkomórkowych
- ID-0070_ALSTEM-020_Oznaczenie p75 przy użyciu testu ELISA
- ID-0071_ALSTEM-021_Analiza sekretomu z zastosowaniem technologii Multiplex
- ID-0072_ALSTEM-022_Schemat badań kohodowli komórek MNC od pacjentów
z komórkami WJ-MSC
- ID-0073_ALSTEM-023_Kohodowla komórek MNC z komórkami WJ-MSC (pacjenci)

9. SPIS PIŚMIENICTWA

- [1] A. L. Kjældgaard *et al.*, “Amyotrophic lateral sclerosis: The complement and inflammatory hypothesis,” *Mol. Immunol.*, vol. 102, no. June, pp. 14–25, 2018, doi: 10.1016/j.molimm.2018.06.007.
- [2] K. Valko and L. Ciesla, *Amyotrophic lateral sclerosis*, 1st ed., vol. 58. Elsevier B.V., 2019.
- [3] P. Masrori and P. Van Damme, “Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 27, no. 10, pp. 1918–1929, 2020, doi: 10.1111/ene.14393.
- [4] L. Moreno-martinez, A. C. Calvo, and R. Osta, “Are Circulating Cytokines Reliable Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis ?,” 2019.
- [5] A. Gugliandolo, P. Bramanti, and E. Mazzon, “Mesenchymal stem cells: A potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis?,” *Stem Cells Int.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/3675627.
- [6] A. Amin, N. D. Perera, P. M. Beart, B. J. Turner, and F. Shabanpoor, “Amyotrophic Lateral Sclerosis and Autophagy: Dysfunction and Therapeutic Targeting,” *Cells*, vol. 9, no. 11, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/cells9112413.
- [7] R. D. A. Rufino, L. D. S. Pereira-Rufino, T. C. S. Vissoto, I. Kerkis, A. D. C. Neves, and M. C. P. Da Silva, “The Immunomodulatory Potential Role of Mesenchymal Stem Cells in Diseases of the Central Nervous System,” *Neurodegener. Dis.*, vol. 22, no. 2, pp. 68–82, 2023, doi: 10.1159/000528036.
- [8] T. J. Lin *et al.*, “Potential of Cellular Therapy for ALS: Current Strategies and Future Prospects,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, no. March, 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.851613.
- [9] Q. Zhu and P. Lu, “Stem Cell Transplantation for Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1266, pp. 71–97, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-4370-8_6.
- [10] J. Riancho, I. Gonzalo, and J. Berciano, “Why do motor neurons degenerate? Actualisation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis,” vol. 34, no. 1, 2019.
- [11] A. Polverino *et al.*, “In Amyotrophic Lateral Sclerosis Blood Cytokines Are Altered, but Do Not Correlate with Changes in Brain Topology,” *Brain Connect.*, vol. 10, no. 8, pp. 411–421, 2020, doi: 10.1089/brain.2020.0741.
- [12] G. Cipollina, A. D. Serej, G. Di Nolfi, A. Gazzano, and A. Marsala, “Heterogeneity of Neuroinflammatory Responses in Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Challenge or an

Opportunity ?,” 2020.

- [13] A. Motataianu, L. Barcutean, and R. Balasa, “Neuroimmunity in amyotrophic lateral sclerosis: focus on microglia,” *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.*, vol. 21, no. 3–4, pp. 159–166, 2020, doi: 10.1080/21678421.2019.1708949.
- [14] L. Mazzini *et al.*, “Advances in stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 18, no. 8, pp. 865–881, 2018, doi: 10.1080/14712598.2018.1503248.
- [15] M. Wosiski-Kuhn, M. S. Lyon, J. Caress, and C. Milligan, “Inflammation, immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: II. immune-modulating therapies,” *Muscle and Nerve*, vol. 59, no. 1, pp. 23–33, 2019, doi: 10.1002/mus.26288.
- [16] N. J. Maragakis and R. M. Kimball, “Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *Curr. Ther. Neurol. Dis. Text with CD-ROM*, vol. 400, no. 10360, pp. 322–328, 2005, doi: 10.1016/B978-0-323-03432-6.50074-X.
- [17] D. R. Beers and S. H. Appel, “Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies,” *Lancet Neurol.*, vol. 18, no. 2, pp. 211–220, 2019, doi: 10.1016/S1474-4422(18)30394-6.
- [18] Z. Jiang, Z. Wang, X. Wei, and X. Yu, “Inflammatory checkpoints in amyotrophic lateral sclerosis : From biomarkers to therapeutic targets,” no. December, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1059994.
- [19] M. Ralli, A. Lambiase, M. Artico, M. de Vincentiis, and A. Greco, “Amyotrophic lateral sclerosis: Autoimmune pathogenic mechanisms, clinical features, and therapeutic perspectives,” *Isr. Med. Assoc. J.*, vol. 21, no. 7, pp. 438–443, 2019.
- [20] G. Bonaventura *et al.*, “Stem cells: Innovative therapeutic options for neurodegenerative diseases?,” *Cells*, vol. 10, no. 8, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3390/cells10081992.
- [21] F. Sironi, F. De Marchi, L. Mazzini, and C. Bendotti, “Cell therapy in ALS: An update on preclinical and clinical studies,” *Brain Res. Bull.*, vol. 194, no. January, pp. 64–81, 2023, doi: 10.1016/j.brainresbull.2023.01.008.
- [22] S. H. Kim, K. Oh, H. K. Jin, and J. Bae, “Immune inflammatory modulation as a potential therapeutic strategy of stem cell therapy for ALS and neurodegenerative diseases,” vol. 51, no. 11, pp. 545–546, 2018, doi: 10.1002/ana.25302.
- [23] K. A. Staats, D. R. Borchelt, M. G. Tansey, and J. Wymer, “Blood-based biomarkers of inflammation in amyotrophic lateral sclerosis,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–19, 2022, doi: 10.1186/s13024-022-00515-1.
- [24] O. Pansarasa *et al.*, “Biomarkers in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells : The

- State of the Art in Amyotrophic Lateral Sclerosis,” 2022.
- [25] M. Dreger, R. Steinbach, M. Otto, M. R. Turner, and J. Grosskreutz, “Cerebrospinal fluid biomarkers of disease activity and progression in amyotrophic lateral sclerosis,” vol. 2, pp. 422–435, 2022, doi: 10.1136/jnnp-2021-327503.
- [26] A. Naji, M. Eitoku, B. Favier, F. Deschaseaux, N. Rouas-Freiss, and N. Suganuma, “Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 17, pp. 3323–3348, 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03125-1.
- [27] A. Shariati *et al.*, “Mesenchymal stromal cells (MSCs) for neurodegenerative disease: A promising frontier,” *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 99, no. 6, p. 151097, 2020, doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151097.
- [28] V. K. Mishra *et al.*, “Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells,” *Cells*, vol. 9, no. 5, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/cells9051145.
- [29] E. Sykova, D. Cizkova, and S. Kubinova, “Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Spinal Cord Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. July, pp. 1–17, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.695900.
- [30] K. W. Oh *et al.*, “Repeated Intrathecal Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *Ann. Neurol.*, vol. 84, no. 3, pp. 361–373, 2018, doi: 10.1002/ana.25302.
- [31] J. J. El-Jawhari, P. Ganguly, E. Jones, and P. V. Giannoudis, “Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells as autologous therapy for osteonecrosis: Effects of age and underlying causes,” *Bioengineering*, vol. 8, no. 5, 2021, doi: 10.3390/BIOENGINEERING8050069.
- [32] M. Murphy, C. Curtin, G. Duffy, C. Kavanagh, T. O’Brien, and F. Barry, “Mesenchymal stem cells in regenerative medicine,” *Biomed. Heal. Res.*, pp. 51–61, 2012, doi: 10.3233/978-1-61499-076-5-51.
- [33] C. Götherström and L. Walther-Jallow, “Stem Cell Therapy as a Treatment for Osteogenesis Imperfecta,” *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 18, no. 4, pp. 337–343, 2020, doi: 10.1007/s11914-020-00594-3.
- [34] K. Kim, S. Bou-Ghannam, S. Kameishi, M. Oka, D. W. Grainger, and T. Okano, “Allogeneic mesenchymal stem cell sheet therapy: A new frontier in drug delivery systems,” *J. Control. Release*, vol. 330, pp. 696–704, 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.028.
- [35] M. Frank, Matthew G. annis, Watkins, “HHS Public Access,” *Physiol. Behav.*, vol. 41, no. 80, pp. 678–687, 2019, doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009.Mesenchymal.
- [36] A. Srinivasan *et al.*, “Strategies to enhance immunomodulatory properties and reduce

- heterogeneity in mesenchymal stromal cells during ex vivo expansion,” *Cytotherapy*, vol. 24, no. 5, pp. 456–472, 2022, doi: 10.1016/j.jcyt.2021.11.009.
- [37] T. Li, M. Xia, Y. Gao, Y. Chen, and Y. Xu, “Human umbilical cord mesenchymal stem cells: An overview of their potential in cell-based therapy,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 15, no. 9, pp. 1293–1306, 2015, doi: 10.1517/14712598.2015.1051528.
- [38] D. C. Ding, Y. H. Chang, W. C. Shyu, and S. Z. Lin, “Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy,” *Cell Transplant.*, vol. 24, no. 3, pp. 339–347, 2015, doi: 10.3727/096368915X686841.
- [39] Parlament Europejski, “Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004,” *Dz. Urzędowy Unii Eur.*, no. 1394, pp. 121–137, 2007, [Online]. Available: <https://eurlex.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj%0Ahttp://data.europa.eu/eli/reg/2007/1394/2019-07-26>.
- [40] A. Wright, M. L. Arthaud-Day, and M. L. Weiss, “Therapeutic Use of Mesenchymal Stromal Cells: The Need for Inclusive Characterization Guidelines to Accommodate All Tissue Sources and Species,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. February, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.632717.
- [41] L. Aguilera-Cobos, M. P. Rosario-Lozano, A. Ponce-Polo, J. A. Blasco-Amaro, and D. Epstein, “Barriers for the evaluation of advanced therapy medicines and their translation to clinical practice: Umbrella review,” *Health Policy (New. York).*, vol. 126, no. 12, pp. 1248–1255, 2022, doi: 10.1016/j.healthpol.2022.10.007.
- [42] T. Kolanowski and I. Stepaniec, Patent PL 241520 B1 vol. 22, no. 12, 2022 " Zastosowanie zestawu genów do określania potencjału teratogennego komórek mezenchymalnych."
- [43] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [44] M. B. Kursa and W. R. Rudnicki, “Feature selection with the boruta package,” *J. Stat. Softw.*, vol. 36, no. 11, pp. 1–13, 2010, doi: 10.18637/jss.v036.i11.
- [45] P. Biecek, “Dalex: Explainers for complex predictive models in R,” *J. Mach. Learn. Res.*, vol. 19, pp. 1–5, 2018.
- [46] S. Datta, V. Pihur, and S. Datta, “An adaptive optimal ensemble classifier via bagging and rank aggregation with applications to high dimensional data,” *BMC Bioinformatics*,

- vol. 11, no. August 2010, 2010, doi: 10.1186/1471-2105-11-427.
- [47] R. Vasta *et al.*, “Degeneration What is amyotrophic lateral sclerosis prevalence?,” *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–6, 2021, doi: 10.1080/21678421.2021.1936557.
- [48] S. A. Goutman *et al.*, “Recent advances in the diagnosis and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis,” *Lancet Neurol.*, vol. 21, no. 5, pp. 480–493, 2022, doi: 10.1016/S1474-4422(21)00465-8.
- [49] S. P. Norris, M. F. N. Likanje, and J. A. Andrews, “Amyotrophic lateral sclerosis: update on clinical management,” *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 33, no. 5, pp. 641–648, 2020, doi: 10.1097/WCO.0000000000000864.
- [50] M. F. Elmansy, C. T. Reidl, M. Rahaman, P. H. Özdinler, and R. B. Silverman, “Small molecules targeting different cellular pathologies for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis,” *Med. Res. Rev.*, vol. 43, no. 6, pp. 2260–2302, 2023, doi: 10.1002/med.21974.
- [51] L. E. Fernández-Garza, S. A. Barrera-Barrera, and H. A. Barrera-Saldaña, “Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World,” *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 9, pp. 1–11, 2023, doi: 10.3390/ph16091334.
- [52] R. J. Mead, N. Shan, H. J. Reiser, F. Marshall, and P. J. Shaw, “Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 22, no. March 2023, 2022, doi: 10.1038/s41573-022-00612-2.
- [53] M. J. Hoogduijn and E. Lombardo, “Mesenchymal Stromal Cells Anno 2019: Dawn of the Therapeutic Era? Concise Review,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 8, no. 11, pp. 1126–1134, 2019, doi: 10.1002/sctm.19-0073.
- [54] E. Rendra, E. Scaccia, and K. Biebac, “Recent advances in understanding mesenchymal stromal cells,” *F1000Research*, vol. 9, pp. 1–9, 2020, doi: 10.12688/f1000research.21862.1.
- [55] K. Shah *et al.*, “Alloreactivity of Allogeneic Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Other Cellular Therapies: A Concise Review,” *Stem Cells Int.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/9589600.
- [56] M. Mendicino, A. M. Bailey, K. Wonnacott, R. K. Puri, and S. R. Bauer, “MSC-based product characterization for clinical trials: An FDA perspective,” *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 2, pp. 141–145, 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.013.
- [57] E. T. Camilleri *et al.*, “Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for

- good manufacturing practice-compliant production,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–16, 2016, doi: 10.1186/s13287-016-0370-8.
- [58] K. Wsp, L. Europejskich, and P. Niniejsz, “L 38/40,” no. 4, pp. 40–52, 2006.
- [59] S. A. DeVeaux *et al.*, “Characterizing human mesenchymal stromal cells’ immunomodulatory potency using targeted lipidomic profiling of sphingolipids,” *Cytotherapy*, vol. 24, no. 6, pp. 608–618, 2022, doi: 10.1016/j.jcyt.2021.12.009.
- [60] E. Munoz-Perez, A. Gonzalez-Pujana, M. Igartua, E. Santos-Vizcaino, and R. M. Hernandez, “Mesenchymal stromal cell secretome for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: Latest trends in isolation, content optimization and delivery avenues,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 11, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13111802.
- [61] S. Viswanathan *et al.*, “Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature,” *Cytotherapy*, vol. 21, no. 10, pp. 1019–1024, 2019, doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.
- [62] Y. Xie *et al.*, “The quality evaluation system establishment of mesenchymal stromal cells for cell-based therapy products,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01696-6.
- [63] D. Cacabelos *et al.*, “Early and gender-specific differences in spinal cord mitochondrial function and oxidative stress markers in a mouse model of ALS,” *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 4, p. 3, 2016, doi: 10.1186/s40478-015-0271-6.
- [64] E. O. Ajayi *et al.*, “We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %,” *Intech*, vol. 11, no. tourism, p. 13, 2016, [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.
- [65] A. Wilson, A. Webster, and P. Genever, “Nomenclature and heterogeneity: Consequences for the use of mesenchymal stem cells in regenerative medicine,” *Regen. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 595–611, 2019, doi: 10.2217/rme-2018-0145.
- [66] D. F. Stroncek *et al.*, “Human Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Characteristics Vary Among Laboratories When Manufactured From the Same Source Material: A Report by the Cellular Therapy Team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. June, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00458.
- [67] C. Laroye, M. Gauthier, H. Antonot, V. Decot, L. Reppel, and D. Bensoussan, “Mesenchymal stem/stromal cell production compliant with good manufacturing

- practice: comparison between bone marrow, the gold standard adult source, and wharton’s jelly, an extraembryonic source,” *J. Clin. Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 1–13, 2019, doi: 10.3390/jcm8122207.
- [68] R. Donders *et al.*, “Human Wharton’s Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells,” *Stem Cells Dev.*, vol. 27, no. 2, pp. 65–84, 2018, doi: 10.1089/scd.2017.0029.
- [69] W. Jiang and J. Xu, “Immune modulation by mesenchymal stem cells,” *Cell Prolif.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1111/cpr.12712.
- [70] K. N. Sivanathan *et al.*, “Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function,” *Stem Cells*, vol. 33, no. 9, pp. 2850–2863, 2015, doi: 10.1002/stem.2075.
- [71] M. Dominici *et al.*, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,” *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.
- [72] M. Sundin *et al.*, “Multipotent mesenchymal stromal cells express FoxP3: A marker for the immunosuppressive capacity?,” *J. Immunother.*, vol. 34, no. 4, pp. 336–342, 2011, doi: 10.1097/CJI.0b013e318217007c.
- [73] X. Chen, Y. Zhang, W. Wang, Z. Liu, J. Meng, and Z. Han, “Mesenchymal Stem Cells Modified with Heme Oxygenase-1 Have Enhanced Paracrine Function and Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory and Oxidative Damage in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 49, no. 1, pp. 101–122, 2018, doi: 10.1159/000492847.
- [74] D. Mougiakakos, R. Jitschin, C. C. Johansson, R. Okita, R. Kiessling, and K. Le Blanc, “The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells,” *Blood*, vol. 117, no. 18, pp. 4826–4835, 2011, doi: 10.1182/blood-2010-12-324038.
- [75] Y. Yang *et al.*, “Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells overexpressing HO-1 attenuate neural injury and enhance functional recovery by inhibiting inflammation in stroke mice,” *CNS Neurosci. Ther.*, no. August, pp. 1–19, 2023, doi: 10.1111/cns.14412.
- [76] Patent CA2876499A1 "Mesenchymal - like stem cells derived from human embryonic stem cells, methods and uses thereof" .
- [77] K. P. Robb, J. Galipeau, Y. Shi, M. Schuster, I. Martin, and S. Viswanathan, “Failure to

launch commercially-approved mesenchymal stromal cell therapies: what's the path forward? Proceedings of the International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) Annual Meeting Roundtable held in May 2023, Palais des Congrès de Paris, Organized," *Cytotherapy*, vol. 000, pp. 1–5, 2023, doi: 10.1016/j.jcyt.2023.09.001.

- [78] N. Song, M. Scholtemeijer, and K. Shah, "Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 41, no. 9, pp. 653–664, 2020, doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009.
- [79] W. Hu, W. Wang, X. Jiang, Z. Wang, and R. Lin, "Mesenchymal stem cells can prevent or promote the progression of colon cancer based on their timing of administration," *J. Transl. Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–16, 2023, doi: 10.1186/s12967-023-04028-3.
- [80] S. M. Han *et al.*, "Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- And Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells," *Exp. Mol. Med.*, vol. 46, no. 6, pp. e101-9, 2014, doi: 10.1038/emm.2014.28.
- [81] M. P. Gustafson *et al.*, "Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis," *PLoS One*, vol. 12, no. 7, pp. 1–21, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0182002.
- [82] A. Musiał-Wysocka, M. Kot, M. Sułkowski, B. Badyra, and M. Majka, "Molecular and functional verification of wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) pluripotency," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 8, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/ijms20081807.
- [83] I. Matic *et al.*, "Expression of OCT-4 and SOX-2 in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation," *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 9–16, 2016, doi: 10.3889/oamjms.2016.008.
- [84] Polska Rada Resuscytacji, "Wytyczne resuscytacji 2010," 2010. Available: <http://www.prc.krakow.pl/2010/>.
- [85] S. Hussein *et al.*, "The Impact of Serum Uric Acid on the Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Adults Aged 18 and Older: A Systematic Review," *Cureus*, vol. 15, no. 7, 2023, doi: 10.7759/cureus.42312.
- [86] N. Hertel *et al.*, "Analysis of routine blood parameters in patients with amyotrophic lateral sclerosis and evaluation of a possible correlation with disease progression — a multicenter study."
- [87] G. D. Batty, M. Kivimäki, P. Frank, C. R. Gale, and L. Wright, "Systemic inflammation and subsequent risk of amyotrophic lateral sclerosis: Prospective cohort study," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 114, no. April, pp. 46–51, 2023, doi: 10.1016/j.bbi.2023.07.026.

- [88] C. Milligan *et al.*, “Tocilizumab is safe and tolerable and reduces C-reactive protein concentrations in the plasma and cerebrospinal fluid of ALS patients,” *Muscle and Nerve*, vol. 64, no. 3, pp. 309–320, 2021, doi: 10.1002/mus.27339.
- [89] J. Liu, X. Zhang, J. F. Zhong, and C. Zhang, “Use of chimeric antigen receptor T cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,” *Immunotherapy*, vol. 11, no. 1, pp. 37–44, 2019, doi: 10.2217/imt-2018-0089.
- [90] M. S. McGrath, R. Zhang, P. M. Bracci, A. Azhir, and B. D. Forrest, “Regulation of the Innate Immune System as a Therapeutic Approach to Supporting Respiratory Function in ALS,” *Cells*, vol. 12, no. 7, pp. 1–15, 2023, doi: 10.3390/cells12071031.
- [91] A. P. Passaro, A. L. Lebos, Y. Yao, and S. L. Stice, “Immune Response in Neurological Pathology : Emerging Role of Central and Peripheral Immune Crosstalk,” vol. 12, no. June, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.676621.
- [92] A. Markovinovic *et al.*, “BRAIN COMMUNICATIONS Immunity in amyotrophic lateral sclerosis : blurred lines between excessive inflammation and inefficient immune responses,” 2020, doi: 10.1093/braincomms/fcaa124.
- [93] S. Als *et al.*, “The Potential Role of Cytotoxic Immune Effectors in Induction , Progression and Pathogenesis of Amyotrophic Lateral,” 2022.
- [94] P. Masrori, J. Beckers, H. Gossye, and P. Van Damme, “The role of inflammation in neurodegeneration : novel insights into the role of the immune system in C9orf72 HRE - mediated ALS / FTD,” *Mol. Neurodegener.*, pp. 1–23, 2022, doi: 10.1186/s13024-022-00525-z.
- [95] M. Grassano *et al.*, “The role of peripheral immunity in ALS : a population- based study,” pp. 1623–1632, 2023, doi: 10.1002/acn3.51853.
- [96] Y. Shi, B. Wei, L. Li, B. Wang, and M. Sun, “Th17 cells and inflammation in neurological disorders : Possible mechanisms of action,” no. July, pp. 1–12, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.932152.
- [97] S. Yazdani *et al.*, “T cell responses at diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis predict disease progression,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34526-9.
- [98] J. Stephenson, E. Nutma, and P. Van Der Valk, “Inflammation in CNS neurodegenerative diseases,” pp. 204–219, 2018, doi: 10.1111/imm.12922.
- [99] A. Brodovitch *et al.*, “Combination of serum and CSF neurofilament-light and neuroinflammatory biomarkers to evaluate ALS,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80370-6.

- [100] A. Theyab *et al.*, “New insight into the mechanism of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) that induces the mobilization of neutrophils,” *Hematol. (United Kingdom)*, vol. 26, no. 1, pp. 628–636, 2021, doi: 10.1080/16078454.2021.1965725.
- [101] S. R. Shepherd *et al.*, “A prognostic , disease progression , and pharmacodynamic,” vol. 0, pp. 1–8, 2017.
- [102] A. A. Krull *et al.*, “Alterations of mesenchymal stromal cells in cerebrospinal fluid: insights from transcriptomics and an ALS clinical trial,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1186/s13287-021-02241-9.
- [103] S. Amor, “Imaging immunological processes from blood to brain in amyotrophic lateral sclerosis,” no. June, pp. 301–313, 2021, doi: 10.1111/cei.13660.