



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Hemato-onkologická
klinika

Univerzita Karlova	6479
Vytvořeno: 26.07.2022 v 11:29:31 Čj.: UKLFP/321561/2022-3	Odbor VV
Č.dop.: RR170697025CZ Listů: 4 Příloh: 1 Druh: písemné	Zprac.



V Olomouci 21. 7. 2022

Oponentský posudek disertační práce **MUDr. Lenky Hejretové** s názvem „**Imunitní monitorace a imunoterapie po alogenní transplantaci krvetvorných buněk**“ - doktorský studijní program Anatomie, histologie, embryologie na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Plzni.

Jedná se o disertační práci věnovanou vybraným možným formám buněčné imunoterapie, které lze využít po alogenních transplantacích krvetvorných kmenových buněk (alloHSCT), a to jak v léčbě jejich závažných komplikací, tak relapsů onemocnění, pro které byli pacienti transplantováni.

Disertační práce má 115 stran. Bez Seznamu používaných symbolů a zkratk, Seznamu použité literatury, závěrečného Poděkování a Příloh je členěna do šesti základních kapitol. Téměř polovinu textu představuje Úvod seznamující s hlavními principy alloHSCT, významné léčebné metody a formy adoptivní imunoterapie řady, zejména hematoonkologických, onemocnění. Kromě přehledně a srozumitelně popsaných hlavních postupů (přípravné režimy, profylaktická imunosuprese), zdrojů krvetvorných kmenových buněk (výběr dárce, kostní dřeň periferní nebo pupečnicková krev, jako možné transplantované štěpy) a imuno(pato)fyzilogických mechanismů, které se u alloHSCT uplatňují, jsou uvedena i hlavní úskalí této léčby, rozvoj nemoci štěpu proti hostiteli (GvHD) a relaps základní choroby. Na uvedenou standardní léčbu těchto komplikací navazují body představující další terapeutické možnosti. Po monoklonálních a polyklonálních protilátkách, extrakorporální fotoforéze, JAK 1/2 inhibitory v léčbě GvHD a aplikaci neselektovaných dárcovských lymfocytů, event. druhé transplantaci v případech relapsu primárního onemocnění, jsou na závěr Úvodu představeny možnosti specifické buněčné imunoterapie hlavních potransplantačních komplikací, aplikace mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a invariantních NKT lymfocytů (iNKT). U obou typů imunoterapie jsou popsány studované buněčné subtypy a uvedeny mechanismy imunomodulace ovlivňující GvHD a u iNKT také riziko relapsu/progrese nádoru.



Hlavní cíle disertační práce byly: 1) porovnat imunomodulační potenciál léčivých přípravků (LP) z poolovaných MSC a MSC od jednotlivých dárců, 2) porovnat kompozici různých šarží MSC jako LP, 3) zhodnotit kinetiku iNKT po alloH SCT a event. nalézt optimální timing pro jejich odběr a 4) porovnat imunomodulační vlastnosti MSC a iNKT. Výsledky měly ověřit tyto hypotézy: 1) poolování MSC zvyšuje jejich imunomodulační potenciál, 2) různé šarže MSC se liší ve svých vlastnostech, 3) během rekonstituce imunitního systému po alloH SCT narůstají i počty iNKT a 4) imunomodulační potenciál MSC a iNKT se neliší.

Imunomodulační potenciál LP z MSC od jednotlivých dárců a poolovaných se nelišil (tento výstup byl publikován jako původní práce v časopise s impakt faktorem), taktéž nebyly shledány významné rozdíly v metabolické a proliferační aktivitě. Proliferace MSC nebyla asociována s jejich imunomodulačním potenciálem. Šarže získané do roku 2016 obsahovaly vyšší počty MSC než šarže z pozdějšího období, u všech však bylo dosaženo minimální terapeutické dávky. Šarže se však nijak nelišily ve viabilitě buněk a jejich čistotě. Měření potransplantační kinetiky iNKT nepotvrdilo lineární nárůst této buněčné populace v čase se stoupajícím počtem leukocytů, navíc byly zaznamenány interindividuální rozdíly mezi pacienty, a to i z hlediska jednotlivých subtypů a exprese CD62L. Imunomodulační potenciály MSC a iNKT se nelišily. Výsledky práce nepotvrdily hypotézy, že: 1) poolování MSC od různých dárců zvýšilo jejich imunomodulační potenciál, 2) s potransplantační rekonstitucí imunitního systému v čase narůstají počty iNKT. Naopak byly potvrzeny hypotézy, že: 1) se různé šarže MSC (zejména v období do 2016 a od 2017) významně lišily v celkových počtech získaných buněk (ne však ve viabilitě a čistotě buněčných linií) a 2) imunomodulační potenciál MSC a iNKT je srovnatelný.

Hodnocení předložené disertační práce:

- a) Zvolené téma práce je aktuální a v rámci České republiky (center provádějících alogenní transplantace krvinek) je řešení této problematiky specifické adoptivní imunoterapie výjimečné.
- b) Podrobně je rozvedena metodika zpracování vzorků a další manipulace s cílovými buněčnými produkty (MSC a iNKT). Adekvátní je i statistická analýza měřením získaných dat.



- c) Výsledky práce jsou přínosné. Významné je potvrzení imunomodulačního potenciálu MSC i iNKT, který je srovnatelný. Velká interindividuální variabilita v potransplantačním vývoji počtů iNKT, jejich jednotlivých subpopulací a povrchové exprese CD62L, ale i absence jejich korelace s expresí CD1d na monocytech u relativně malého souboru pacientů zatím neumožnila formulovat další validní závěry.
- d) Práce doplňuje a svým způsobem validuje některá data publikovaná v minulých letech. Závěry týkající se imunomodulačního potenciálu MSC jako LP od jednotlivých a poolovaných od několika dárců publikovala v impaktovaném periodiku také autorka disertace. Přínosem je i samotné zavedení metodiky zpracování, kultivace, kokultivace, kryokonzervace a analýzy uvedených buněčných populací. Zdokonalování a standardizace těchto metod jsou nezbytné pro přípravu LP (MSC k dispozici v léčbě SR-GvHD již několik let), ale i další studium potransplantačního vývoje různých populací imunokompetentních buněk a možností jejich využití v prevenci nebo léčbě závažných komplikací alloHSCT, včetně relapsu primárního nádorového onemocnění.

Připomínky a dotazy:

Mám několik formálních připomínek. Za hlavním textem je uveden „Seznam používaných symbolů a zkratk“ a stejný název této části by měl být použit i v Obsahu. Většina zkratk je však vysvětlena již v textu, takže jejich seznam je zbytečný (a některé z nich ani neobsahuje). Pokud by zkratky v textu vysvětleny nebyly, bylo by vhodnější uvést seznam na začátku práce, před textem. Přílohy na konci disertační práce obsahují sice značné množství grafů a tabulek, ale domnívám se, že by zařazení těchto výsledků přímo k odpovídajícím kapitolám (např. grafy potransplantačního vývoje počtů iNKT do kapitoly 4.3.1 Kinetika rekonstituce iNKT) bylo možná přehlednější a čtivější. Na str. 50 je odkaz uveden mylně na obrázce 13, ale měl by to být zřejmě obrázek 15 (na str. 52).



Na autorku mám dva dotazy:

- 1) Imunomodulační účinky LP MSC poolovaných a od jednotlivých dárců se *in vitro* v předložené práci nelišily. Pokud byly tyto LP („poolované“ a „jednotlivé“) podány nemocným se SR-GvHD, byly mezi nimi pozorovány nějaké rozdíly v klinickém vývoji (i když při uvedeném počtu toto zřejmě nelze validně statisticky hodnotit)?
- 2) Soubor 22 nemocných je velmi heterogenní, a proto nepřekvapuje interindividuální variabilita potransplantačního vývoje počtů iNKT. Avšak některé „patientské“ grafy a standardizované hodnoty iNKT v Příloze 1 mají podobný profil kinetiky. Na Obrázku 14 jsou uvedeny čtyři reprezentativní příklady těchto profilů (pacienti 3, 13, 15 a 22). Lišily se tyto „iNKT profilované typy“ nemocných v parametrech, které bezesporu ovlivňují potransplantační rekonstituci imunity (např. HLA inkompatibilitě, aplikaci *in vivo* T-deplece, rozvoji GVHD, léčbě steroidy apod.)?

Závěr:

Doporučuji předloženou disertační práci MUDr. Lenky Hejretové k obhajobě a udělení akademického titulu doktor (Ph.D.) podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

doc. MUDr. Luděk Raida, Ph.D.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc
I . P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: raida@fnol.cz