

## **Posudek na disertační práci Mgr. Miroslavy Jandové s názvem „Kryokonzervační metody ve výrobě léčivých přípravků moderní terapie“**

Disertační práce Mgr. Miroslavy Jandové je napsána v požadovaném standardním členěním na 130 stranách, včetně 34 tabulek a 36 obrázků.

Téma práce je zaměřeno zejména na uplatnění kryokonzervačních metod při získávání, zpracování a skladování buněk pro výrobu léčivých přípravků moderní terapie (LPMT) založených na somatobuněčné a genové terapii. S rozvojem uplatnění zmíněných terapií v klinické praxi, který probíhá v současné době, **je zvolené téma je velmi aktuální.**

Formálně je disertační práce napsaná až na výjimky (viz níže) na velmi dobré úrovni, psaná kvalitní češtinou a doprovázena odpovídajícími ilustracemi a tabulkami.

Podstatnou část disertační práce tvoří na 31 stranách **Úvod do problematiky**, který představuje dobře zpracovanou dosavadní klinickou praxi v použití LPMT v ČR, celý proces k získání certifikace pro klinické hodnocení a odpovídající legislativu v ČR a EU. Uvedené dělení a charakteristika LPMT vychází z materiálu SÚKL, jejichž autorem je MUDr. Tomáš Boráň.

Následné dvě kapitoly **Metodika a Materiál** a **Výsledky** jsou strukturovány do 5 částí, které autorka avizuje v **Cílech disertační práce**. Kapitola **Metodika a Materiál** popisuje podrobně vše, co vyžadují certifikované standardy SÚKL pro práci s buněčnými kulturami s cílem jejich klinické aplikace. V textu první části **M+M a Výsledků** však strukturální uspořádání neodpovídá zmiňovaným cílům, protože došlo k záměně subkapitol o hMSC a mononukleárních buněk.

V první části **Výsledků** se autorka věnuje validaci odběru a kryokonzervace mononukleárních buněk periferní krve pro přípravu registrovaných LPMT Kymriah metodou chimérických antigenních receptorů T-lymfocytů (CAR-T). Na základě autorčiny práce bylo získáno povolení pro opatřování, zpracování a distribuci mononukleárních buněk pro výrobu LPMT a také získání vývozní licence do země místa výroby geneticky manipulovaného LPMT. V disertační práci je uvedena aplikace **takto modifikovaných mononukleárních buněk u 2 pacientů.**

**Druhá část** disertace popisuje výsledky odběru kostní dřeně získané pro LPMT na bázi lidských mezenchymálních stromálních buněk (hMSCs). Dále autorka uvádí vývoj kryokonzervačního protokolu pro hodnocený LPMT, který je součástí experimentální klinické studie EUDRA CT č. 2016-000926-21. Protokol byl s úspěchem použit u 6 pacientů

zapojených do studie. Všechny odběry hMSCs vyhověly v testech na sterilitu a neobsahovaly mykoplasmata. Výsledky této části uvádějí vitalitu a fenotypovou čistotu hMSCs před a po kryokonzervaci s použitím media s DMSO a komerčního média Biofreeze. Na závěr je v tabulce 23 uvedena analýza rizik pro výrobu LPMT z kryokonzervovaných hMSCs metodou FMEA.

**Třetí část** této kapitoly disertační práce popisuje výsledky retrospektivní studie provedené na souboru 13 pacientů, u kterých byla sledována toxicita dimethylsulfoxidu (DMSO) jako kryoprotektiva. Ukázalo se, že odstranění DMSO má za následek významně sníženou životaschopnost buněk, což naznačuje, že tento proces by měl být prováděn pouze u vysoce rizikových pacientů.

**V čtvrté a páté části** disertační práce doktorandka popisuje skladování komerčně dodávaných buněk pro přípravu jejich genetických modifikací, jejich dočasné skladování v kryokonzervovaném stavu v podmínkách zdravotnického zařízení a transport na klinické pracoviště. Navržený proces byl úspěšný v certifikačním auditu a byl rovněž ověřen v praxi.

**Disertační práce splnila zadané cíle a její výsledky vytvořily kvalitní podmínky pro další výzkum a klinické aplikace LPMT.**

K disertační práci mám následující drobné **formální připomínky**:

- V seznamu zkratk chybí NC jaderné buňky
- V grafech třetí části by medián mohl být graficky více zvýrazněn; proč je v grafu křížkem vyznačena průměrná hodnota, která nemá význam a není proto uvedena v odpovídajících tabulkách ani v textu komentována. Navíc je velmi matoucí ilustrovat výsledky jednotlivých testů **v tabulce a odpovídajícím grafu bez uvedení signifikance rozdílů**. Ty jsou pak shrnuty v tabulce 28 a 29, jejichž text by mohl být uveden jako Shrnutí vlivu procesu zmrazení/rozmrazení... respektive, vlivu odmytí DMSO na parametry rozmrazeného koncentrátu autologních mobilizovaných HPCs.
- K signifikanci rozdílů bych rád věděl, proč u parametru TNC je vliv procesu zmrazení/rozmrazení signifikantní, zatímco po odmytí DMSO ne (Leukaferéza 2,46 vs. Po zmrazení 1,79; přitom min/max hodnoty jsou po rozmrazení podstatně větší než po domytí DMSO, kde mediány jsou stejné).
- V textu na str. 90 pro uvedení tabulky č.30 by asi mělo být uvedeno: V Tab. č. 30 jsou uvedeny hodnoty mediánů klíčových parametrů při porovnání hodnot při leukaferéze **a po**

*rozmrazení* a odmytí DMSO.

**Na základě výše uvedeného lze konstatovat, že předložená disertační práce jednoznačně prokazuje schopnosti Mgr. Miroslavy Jandové k samostatné vědecké práci, a proto na základě odpovídajících předpisů a výsledku obhajoby doporučuji, aby ji byl udělen titul Ph.D.**

**Na doktorandku mám následující dotazy:**

1. Co lze podle doktorandky v dohledné době ještě vylepšit v technice a organizaci při získávání a kryokonzervaci buněk pro LPMT.
2. Existují kromě DMSO i jiná kryoprotektiva? Můžete je uvést a jaké jsou jejich výhody a nevýhody ve srovnání s DMSO.

V Brně 7.8. 2022

Prof. RNDr. Petr Dubový, CSc.  
Anatomický ústav LF MU