



UNIVERZITA KARLOVA 3. lékařská fakulta

Posudek oponenta disertační práce

Název práce: **The role of the immune system in the immunopathogenesis of autoimmune diseases and the therapeutic modulation of autoimmune reaction by tolerogenic dendritic cells**

Studijní program: Imunologie

Řešitelka: **Mgr. Klára Dáňová**

Školitelka: **RNDr. Lenka Palová Jelínková, Ph.D.**

Oponent: **RNDr. Petr Heneberg, Ph.D.**

Disertační práce Mgr. Dáňové se na 132 stranách, včetně dvou příloh, zabývá třemi cíli: 1) zavedením protokolu pro tvorbu tolerogenních dendritických buněk, vyhodnocováním jejich fenotypu a funkce a testů jejich fenotypické a funkční stability v prozánětlivém prostředí, 2) přípravou tolerogenních dendritických buněk z krve na základě dříve zavedeného protokolu využívajícího jako zdrojového materiálu krev pacientů s diabetes mellitus 1. typu, dále pak výzkumem fenotypu a supresivních funkcí těchto buněk se záměrem jejich využití při buněčné terapii diabetes mellitus 1. typu a 3) testováním a optimalizací protokolu pro přípravu tolerogenních buněk na klinické škále pro aplikaci pacientům. Po formální stránce je práce psána poměrně neobvyklou hybridní formou, kdy je zdánlivě koncipována jako plnotextová, ale dvě ze tří podkapitol výsledků jsou nahrazeny vložením separátů prací publikovaných v průběhu PhD studia. V obou případech jde o práce prvoautorské, jedna je publikována v kvalitním oborovém časopise (*J. Immunol.*), druhá je publikována v časopise problematičtější, v dnešní době již kvůli neetickým praktikám neindexovaném v JCR (viz komentář níže). Nicméně, provedení obou již publikovaných prací je solidní; kromě nich Mgr. Dáňová publikovala ještě řadu dalších s tematikou disertační práce více či méně souvisejících prací, tedy požadavek na dostatečnou publikační aktivitu mám za splněný. Rozsah jednotlivých kapitol je standardní, jen z metodické části jsou vypuštěny metodiky zmiňované výhradně ve vložených publikovaných článcích. Práce na první pohled působí dobrým dojmem, je psána čtivě, angličtinou bez závažnějších chyb. Dojem kazí jen práce s referencemi, kdy reference v dlouhých pasážích textu často nejsou citovány vůbec, nejaktuálnější zásadní oborové reference chybí a navíc reference jsou ve svém seznamu uvedeny tak, jak byly zřejmě staženy z nějaké databáze (PubMed), se všemi nepřesnostmi a nedůslednostmi, které jsou u referencí na PubMedu obvyklé. Manuální korekce těchto drobností by práci slušela, stejně jako bývá žádoucí při tvorbě seznamů referencí pro jednotlivé rukopisy. Níže vypisuji detailněji jednotlivé připomínky a dva dotazy k předložené práci.

Připomínky:

- Formát předložené práce – v informacích pro postgraduální studenty je uvedeno, že Disertační práce se předkládá ... buď v klasické formě, nebo ve formě monotematicky zaměřeného souboru nejméně 4 vědeckých publikací, vztahujících se k tématu (z toho minimálně 2 s „impakt faktorem“) je-li tak stanoveno v individuálním studijním plánu nebo vnitřním předpise fakulty. Předložená práce je jakousi hybridní formou obsahující jen dvě práce (z toho navíc jednu problematičtější – viz níže), které nahrazují dvě ze tří podkapitol kapitoly Results; zbytek textu je psán klasickou formou, přičemž jedna třetina kapitoly Metodika je psána klasickou formou a dvě třetiny kapitoly Metodika si má čtenář dohledat v příložených článcích („Material and methods used in presented publications are described in given publications“). Je ke zvážení komise, nakoľik jde o progresivní trend ve způsobu podávání disertačních prací anebo o rozvolňování nastavených pravidel.
- V práci mne na první pohled upoutala publikace v časopise *Oncotarget*. Jde o časopis dlouhodobě ostrakizovaný, s problematičtější (variabilní) úrovní recenzního řízení, který si navzdory této skutečnosti a nevalné pověsti udržoval dlouho neobvykle vysokou citovanost. Došlo dokonce k tomu, že tato práce byla oceněna Českou imunologickou společností jako nejlepší publikace v oboru přirozené a protinádorové imunity za rok 2015, tedy Cenou Milana Prošpíšila a Mario Campy. Nicméně, časopisu *Oncotarget* byl již na podzim 2017 odebrán společností Clarivate Analytics faktor impaktu pro neetické praktiky, časopis byl stažen i z PubMedu, kam se ovšem po čase a velkém tlaku vydavatele opět vrátil. Na jednu stranu jde tedy o časopis, který v době publikace článku splňoval (přes svou pověst) kritéria časopisu s faktorem impaktu, ale v současné době je nesplňuje a je otázkou, zda je na místě trvat na zahrnutí výsledku mezi výstupy započítávací se pro splnění podmínek pro získání doktorského titulu. S ohledem na výše uvedené a na to, že Mgr. Dáňová je autorkou celé řady jiných prací v solidních časopisech, bych navrhol k publikaci v *Oncotarget* nepřihlížet, na splnění podmínek pro získání doktorského

Ruská 87, 100 00 Praha 10

tel.: +420 267 102 111

fax: +420 267 311 812

sekretariatdekana@lf3.cuni.cz, <http://www.lf3.cuni.cz>

IČ: 00216208, DIČ: CZ00216208

Bankovní spojení: 22734101/0100

titulu by to nemělo mít vliv. Pro příště je nutné být při výběru časopisů k publikaci ostražitější, nástup open access modelu publikování je bohužel asociován s mnoha podobnými případy.

- Introduction, 2. odstavec – „Nevertheless, the most promising results from preclinical testing on animal models of T1D and from initial small clinical trials have not yet been confirmed in subsequent phase III efficacy studies,“ – pro takto zásadní konstatování zde chybí jakékoliv reference na výsledky klinických zkoušek. V prvních fázích klinických testů není primárním cílem testování léčebných účinků, nicméně tyto samozřejmě mohou být zjišťovány. Takováto konstatování by tedy měla být ozdrojována. Když už komentuji tuto větu – věta sama má šest řádek – používat ve vědeckých pracích takto dlouhé věty je navíc nevhodné, čtenář se v nich ztrácí.
- Kapitola 2.1 – „China, India or Venezuela, with only 0.1 cases per 100 000 people each year, are notably on the opposite side of the spectrum. Such significant differences suggest that genetic predispositions as well as environmental factors and their mutual interactions play a role in T1D development [6-8].“ – zmiňovaná incidence T1D v Číně neodpovídá aktuálním datům, v Číně je zhruba řádově vyšší – viz Weng et al., *BMJ* 2018; 360: j5295. Pro Indii jsou tato čísla také řádově vyšší, viz např. Das, *Indian J Endocrinol Metab.* 2015 Apr; 19(Suppl 1): S31–S33.
- Kapitola 2.1.1.1 – „PTPN22, CD25 and CTLA-4 are all involved in the regulation of T cell activation“ – PTPN22 neoznačuje protein, ale gen; lidské geny bývá zvykem psát kurzívou.
- Kapitola 2.1.2 – kritéria pro diagnózu T1D jsou převyprávěna věcně správně, ale neúplně, zejména ve vztahu užití glykémie a HbA1c pro iniciální diagnózu diabetu – v současné době se považuje detekce positivity na HbA1c nad 48 mmol/mol za průkaz diabetu nezávisle na zjištěných hladinách glukózy. Viz aktuální Guidelines ADA.
- Obrázky 1 a 2 pochází z předchozích studií, zvláště u obrázku 2 je to velmi nápadné. Tyto studie jsou sice v legendě obrázku citovány, je ale nutno ověřit, že pro takovéto využití obrázku nebylo nutné povolení vydavatele, popř., že bylo získáno. Zároveň by bylo vhodné vždy explicitně zmínit, že obrázek je překopírován z dané publikace – to, že k legendě vložíme referenci, ještě nepředjímá, že obrázek sám je kopií obrázku z jiné publikace.
- Kapitola 2.1.5.4 – „In the study reported by Bluestone et al., patients with established T1D (disease duration ranging from 14–104 weeks) received a single infusion of 0.05–26×10⁸ polyclonal Tregs.“ – ačkoliv se věta výslovně odkazuje na jinou práci, reference není uvedena. Zacházení s referencemi obecně nepatří ke kladům této studie. Například hned následující 17-řádkový odstavec obsahuje referenci jen na samém svém konci.
- Kapitola 2.2.1 – „serine of *Schistosoma mansoni*, lysophosphatidic acid of *Lactobacillus acidophilus* and many others [148]“ – vědecké, tedy latinské, názvy organismů bývá zvykem uvádět kurzívou.
- Kapitola 2.2.1 – „miR-155, miR-34, miR-21 or miR-23-b“ – seznam zkratk je téměř úplný, zkratka „miR“ v něm ale uvedena není.
- Kapitola 2.2.1 – zkratka „miR-23-b“ není psána dle běžného úzu, správně má být uvedeno „miR-23b“
- Kapitola 4.9 – „Paired or unpaired tests were applied for data analysis“ – není uvedeno jaký test byl užit, jen, že byl párový či nepárový.
- Kapitola 5.1, obr. 4A – párové obrázky Western blotů často nemají korespondující tvar, což napovídá tomu, že kontroly nemusí pocházet ze shodných membrán jako proměnné (např. pJNK/SAPK vs JNK/SAPK z tDCs, IDO vs actin z tDCs). Pro obhajobu by bylo vhodné doložit originální neoříznuté snímky, aby bylo možné výše uvedenou námitku bez jakýchkoliv pochybností vyloučit.
- Kapitola 5.1, obr. 2A – není příliš zřejmé, z jakého testu pramení indikované hodnoty signifikance. Legenda udává „Pearson analysis“, což se ale zjevně vztahuje jen k podobrázku 2C.
- Kapitola 5.3 – „described in Dáňová et al., 2015 and 2017 [208,209]. Compared with our previous in vitro experiments, we implemented the necessary, abovementioned changes associated with modification of a tolerogenic DC manufacturing procedure to clinical purpose. We used leukapheresis products as a source of PBMCs and we incorporated cryopreservation of the final product. Regarding the monocyte isolation method, we initially used adherence to plastic for monocyte enrichment, which we used in our manufacturing protocol reported in Dáňová et al., 2015 and 2017.“ – v kapitole se objevují jinak formátované reference, někdy ve spojení se standardně formátovanými odkazy (jako na začátku citátu), jindy bez standardně formátovaných odkazů (jako na konci citátu).
- Reference – Zaujalo mne, že citované nejnovější reference z r. 2018 nepokrývají nejnovější poznatky z oboru z nejlepších časopisů, ale jsou pojaty spíše doplňkovým způsobem, s častými citacemi z *Front. Immunol.* Články ze špičkových časopisů (např. *Nat. Genet.*) jsou naopak citovány výhradně z let předchozích, např. pro výše zmíněný časopis jde o citace z let 1997 (2x), 2005 a 2009 (2x).

- Formátování referencí – při procházení referencí mne zaujalo několik referencí neúplných (např. ref. 207 chybí ročník i paginace; v případě citace článku, který by byl v době psaní disertace ještě v tisku, by bylo vhodné uvést alespoň doi; ref. 152 je též neúplná). Kurzívy a jiných způsobů formátování textu je v referencích užíváno sporadicky, chybí např. kurzíva ve výrazu „*ex vivo*“ v ref. 3, chybí horní index ve výrazu „+“ ve spojení „Foxp3+“ (obdobně výraz „high“ v ref. 76, výrazy „+“ a „hi“ v ref. 77, atp.), dále se objevují v originále článku neexistující závorky ve spojení s chybějícími horními indexy, tak jako ve výrazu „CD4(+)CD25(+)“ v ref. 74 (obdobně v ref. 76, pro kterou je to dokonce na PubMedu již ve správném formátu, v disertaci ale stále v tom starším přepisu), řecká písmena jsou přepisována foneticky (např. „alpha“ a „beta“ v ref. 115); toto vše bývají typické nešvary u citací stahovaných pomocí referenčních programů např. z PubMed bez následných manuálních oprav. Dokonce se objevuje i dvojitá pomlčka, tedy „--“, kterou při své editorské práci vídám poměrně zřídka, ale opět jde o klasický artefakt z PubMedu (ref. 45). U reference 45 bych se na chvíli zastavil, protože se na ní projevovalo více vad, a to konkrétně chyba v paginaci – Mgr. Dáňová používá celá čísla stránek, tedy paginace by neměla být „S6-12“, ale „S6-S12“, jak je ostatně použito hned v následující ref. 46; hned další ref. 47 je ale z tohoto pohledu citována opět nekonzistentně s ref. 46; problém se opakuje i jinde v seznamu referencí, např. na pozici 115. U ref. 45 zároveň chybí autor, což bývá zvykem řešit spíše dopsáním slova „Anonymus“, ale ne kompletním vynecháním autora; tento problém je však společný více autorům a v časopise Diabetes Care byl v pozdějších vydáních vyřešen přidáním návrhu citace, který jako autora udává ADA; identický problém je u ref. 49. Zároveň mne ale použití ref. 45 a 46 přivádí k dotazu, proč nebyla využita novější vydání Guidelines? Časopis Diabetes Care, který tyto Guidelines publikuje a v jehož redakční radě jsem, vydává aktualizovanou Guidelines na začátku každého roku právě z toho důvodu, aby došlo k zachycení aktuálních pokroků a posunů v jednotlivých oblastech klinické diabetologie. Kouzlo nechtěného se projevuje též u ref. 48, kde jsou jako první dva autoři uvedeni „Diabetes C, Complications Trial Research G“, což ale mělo být „Diabetes Control and Complications Trial Research Group“, – tato chyba není chybou z PubMedu, ale objevuje se u celé řady přehledných a jiných prací citujících zmiňovanou referenci. Předpokládám tedy, že jde o citování reference uvedené jinou publikací bez nahlédnutí do skutečného článku. Docela by mne zajímalo, kdo tu chybu zavedl jako první, při prohledání webu pomocí Google Scholar je evidentní, že uvedený způsob citování reference 48 (je z roku 1993) pochází zřejmě až z r. 2017. Středoevropana zaujme též absence interpunkce a písmen z jiné než anglické abecedy, což se týká např. polských autorů ref. 66 – opět, PubMed tyto znaky zjednodušuje, ale reference by se měly řídit zněním v jednotlivých člancích, ne v databázi.
- Práce je psána plynou angličtinou s minimem překlepů a gramatických chyb. Několik se jich vyskytlo, např. „important findings about the immune deregulation associated with T1D is obtained“ v kapitole 2.1.4 nebo „to evaluated their phenotype“ v kapitole 3. Nadto jsou užívány různé nešvary typu „T1D patients“ namísto „patients with T1D“ anebo není dodržována konzistentně kurzíva napříč dokumentem (v textu je „et al.“ kurzívou, zatímco v seznamu literatury nikoliv), zkratka CD je užívána jak pro Crohnovu nemoc, tak pro cluster of differentiation. Při daném rozsahu práce jde ale naprosté minimum obdobných drobností. Co se týče jazykové stránky, práce je provedena velmi pečlivě.

Dotazy:

- 1) **Dosavadní výsledky naznačují, že terapie by byla nejefektivnější spíše jako prevence u prediabetických pacientů. Na toto téma jsem však v přeložené práci našel málo zmínek. Proč prediabetici nebyli na rozdíl od osob s již chybějícími výrazně potlačenými beta buňkami do dosavadních studií zahrnuti?**
- 2) **Ve své práci ukazujete rozdíl mezi tolerogenními dendritickými buňkami z pacientů s diabetes mellitus 1. typu s vysokým a nízkým glykovaným hemoglobinem. Reflektoval rozdíl mezi pacienty spíše stupeň jejich adherence k léčbě anebo správnost nastavení jejich léčby? Aneb vztahuje se závěr této práce k pacientům, kteří jsou dekompenzováni léčbě navzdory anebo k pacientům, kteří jsou dekompenzováni jen proto, že si nepodávají inzulín, když má být podán?**

Práce dle mého názoru splňuje nároky na práci disertační, prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci, a tedy ji **doporučuji k obhájení** za účelem udělení titulu Ph.D.

v Praze, dne 29. 4. 2019
Petr Heneberg