



Oponentský posudek disertační práce

Oponent:	RNDr. Karel Drbal, Ph.D	Datum: 8. 2. 2017
Autor:	Mgr. Simona Partlová	
Název práce:	Nádorové mikroprostředí a význam protinádorové imunity pro klinický průběh lidských nádorových onemocnění	
Instituce:	Univerzita Karlova	Program: Imunologie
Školitel:	Prof. MUDr. Radek Špíšek, PhD	

Souhrn:

Magistra Simona Partlová předkládá k obhajobě disertační práci, vypracovanou na dvou pracovištích – 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy a v biotechnologické firmě Sotio a.s. Zaměření práce vyplývá z dlouhodobého směřování výzkumu a vývoje ve firmě Sotio a. s., a tím je vývoj nádorově-cílených buněčných vakcín pro pacienty s karcinomy. Proto je i cílem této práce získání evidence pro to, že nádorové buněčné linie, které se používají k výrobě vakcín, obsahují antigeny shodné s primárními nádory a zároveň, že tyto antigeny jsou vhodnými cíli pro adaptivní imunitní odpověď, respektive že je imunitní infiltrát v primárních nádorových vzorcích důležitým predikčním faktorem vývoje onemocnění.

Práce je koncipovaná jako soubor čtyř publikací, které vyšly tiskem v letech 2013-2016 a byly publikované v klinicky zaměřených časopisech s celkovým počtem citací 56 (údaj z WoS k 29. 1. 2017). To je známkou atraktivního tématu a plně by vyhovovalo podmínkám pro získání titulu Ph.D. Z nich se dvě práce věnují infiltraci T buněk u pevných nádorů a u jedné z nich je Simona Partlová první autorkou (publikace č. 2), další dvě potom popisují exprese vybraných antigenů u buněčných linií, které se využívají k přípravě vakcín, respektive popisují netradiční indukce buněčné smrti vysokým tlakem. U všech publikací se jedná o týmové práce deseti a více autorů. V samotných publikacích ani v disertační práci není popsána konkrétní spoluúčast kandidátky na týmové práci a proto není možné posoudit její autorský podíl. Tento musí být přehledně a srozumitelně v disertaci uveden.

Formální a obsahové hledisko:

Recenzovaná disertační práce je psaná kumulativní formou se souborem čtyř publikací a není proto členěná klasickým způsobem.

Úvodní část si klade za úkol pojednat na 37 stranách v kapitolách 1 až 6 o vývoji lidských nádorů obecně a detailně o roli nádorového mikroprostředí a vztahu nádorů a imunitního systému. To je velmi široké téma, které přesahuje oblast výzkumu ve zmíněných čtyřech publikacích. Mnoho textu v úvodních kapitolách je obecného až popularizačního charakteru a z toho následně vyplývají nepřesná tvrzení, které nejsou podloženy kvalitními citacemi. Plynulost textu je slabá, autorka přeskakuje mezi tématy, některé jsou ve více kapitolách, ale především neuzavírá jednotlivé části jasnou syntézou a ponechává tak posouzení důležitosti sdělení na samotném čtenáři.

Určité části textu v úvodu disertační práce nesouvisí přímo s předmětem studia a jsou proto nadbytečné. Tak například, proč autorka koncentruje svojí pozornost na invazivitu nádorů v

kapitole 2 (Klíčové kroky v evoluci nádorů), když metastázy nebyly následně předmětem publikací? Naopak, autorka se ve svých publikacích soustředila na vstup a přežívání T buněk v pevných nádorech, ale tomu se v následujících kapitolách 3 (Nádorové mikroprostředí) a 4 (Role imunitního systému v obraně proti nádorům) detailně nevěnuje. Pouze na konci 4. kapitoly vyjmenovala jen čtyři chemokiny s citacemi z přelomu tisíciletí bez udání jejich relevantních producentů v nádorovém prostředí. V téže kapitole dále popisuje expresi chemokinových receptorů, ale překvapivě na nádorových buňkách. Je to pouze příklad nekonzistentního textu. Tato centrální kapitola pojednává obecně o některých mechanismech imunitní odpovědi v širokém rozsahu, přitom zde chybí jejich celkový souhrn. Autorka se zde věnuje dogmatickému popisu osy $CD8^+$ T buňka-dendritická buňka, ale úplně ignoruje NK buňky a fagocyty, které jsou velice důležité právě u spontánních lidských nádorů. Následně například rychlejší fagocytózu deteguje v jedné z příložených prací, ale v úvodu ani v diskuzi se tomu vůbec nevěnuje. Je to překvapivé, protože právě regulace fagocytózy je jednou z moderních terapeutických možností napříč spektrem všech nádorů (CD47 blokáda). Roli $CD4^+$ T buněk bylo možné pojednat na základě reversibilní regulace Th_{17}/T_{reg} polarizace a nabízí se zde mnoho současných studií, které popisují bilanci Th_{17}/T_{reg} osy. Ani jedna z nich není zmíněná a autorka je pojednala jako úplně nezávislé entity.

Klíčová kapitola 5 (Dynamický vztah nádoru a imunitního systému, imunogenicita nádorů) je zkrácená na pouhé tři stránky a zůstává fragmentární.

Poslední kapitola 6 (Možnosti imunoterapie nádorů) se věnuje tematice, kterou autorka ve svých publikacích nezpracovávala.

Úvodní text disertační práce se z výše zmíněných důvodů stává kombinací obecných faktů a nesouvisejících představ a názorů autorky.

Následuje kapitola Cíle práce, které se kryjí s jednotlivými publikacemi. Ani cíle disertační práce nemá autorka dobře vystavěné. Je tu sice zmíněná hypotéza pro každou ze čtyř příložených prací, ale konkrétní cíle a otázky pro diskuzi už zde nebyly popsány. Autorka neodkázala ani na jednotlivé související publikace a následně ponechala jednotlivé hypotézy úplně bez diskuze.

Seznam použitých metod je pouze heslovitý a neúplný. Nelze se v nich orientovat, ani podle nich práci reprodukovat. Chybí zde i tak základní údaje jako jsou zdroje a odkazy na publikace, ve kterých byly použité. Namátkově například heslo mikroskopie není vůbec specifikované, a to ani v disertační práci, ani v konkrétní příložené publikaci (č. 3). Přitom je to klíčová technika pro průkaz externalizace používaných DAMP molekul! V takovém případě je lepší kapitolu úplně vynechat, ovšem zadání 2. lékařské fakulty pro disertační práce požaduje tuto kapitolu začlenit. Můj osobní názor je, že disertační práce mají naopak obsahovat kompletní a detailní výčet všech metod, které autoři během svého PhD studia dovedli k dokonalosti a následně mají tyto zůstat v laboratoři jako jeden z výsledků konkrétního PhD studia.

Kapitola Výsledky a diskuze podává úvodní informace k jednotlivým příloženým publikacím. Pozitivně hodnotím zařazení komentářů ke čtyřem publikacím, ale diskuzi autorka zcela vynechala - není zde jediná citace, a to považuji za zásadní nedostatek práce. Chybí sdělení jakým směrem se tato problematika v posledních letech vyvíjí. Z vědeckého pohledu jsou tři roky dlouhá doba a právě toto má být hlavní součástí disertační práce - současný souhrn problematiky, které se autorka během svého studia věnovala.

Kapitola Souhrn pouze opakuje již sdělené informace v předchozí kapitole, a to v češtině i v angličtině. Následuje krátký Závěr, který sděluje na osmi řádkách obecná tvrzení v popularizačním stylu bez vztahu k publikovaným datům. Toto dělení je nadbytečné. Závěr obsahující syntézu dosažených výsledků jsem v práci postrádal.

Vědecké hledisko:

Vědecká kvalita přiložených publikací je nesporně vysoká. Jsou publikované v kvalitních žurnálech klinického směřování. Výhradu bych měl pouze k volbě časopisu Oncotarget, který se v poslední době profiluje jako takzvaný predátorský časopis. Nehodnotím zde vlastní publikace, ale disertační práci jako celek. Autorka je členkou velice širokého vědeckého týmu, ale její role není v disertační práci zdůrazněná. To je významný nedostatek.

Hlavní dovedností Ph.D studenta, kterou se během studia má naučit je práce s daty, jejich kritická interpretace a diskuze se současnými souhlasnými i rozpornými vědeckými prameny. Toho v recenzované disertační práci evidentně nebylo dosaženo. Autorka necituje ani zásadní práce z úzkého oboru, který by měla znát. Z celkového počtu 203 citací je pouhých 24 z posledních pěti let! To je naprosto nedostatečné, a souvisí to právě s tím, že se autorka nevěnuje příliš současným poznatkům v oblasti svých publikací a od doby publikování (2013-16) je neaktualizovala.

Příkladem může být klasický přehledný článek „The Hallmarks of Cancer“ autorů Hanahan, Weinberg, který autorka cituje v původním vydání z roku 2000, ale přitom vzhledem k tématu práce měla citovat novou verzi z roku 2011, která pojednává právě o předmětu této disertace, tedy o mikroprostředí a roli imunitního systému v něm. Takových nevhodných citací je v disertační práci většina. Často používá citace vlastního pracoviště nebo spolupracujících pracovišť a nepokrývá celý prostor daného tématu. Jindy necituje vůbec, a to i u zásadních tvrzení pro logiku celé disertace: „*Pohled na nádorovou imunologii zásadně změnily práce Schreiber a kol., které vyústily v teorii, že T buňky infiltrující nádory mají zásadní vliv na klinický průběh nádorového onemocnění.*“. Důsledkem takového přístupu při tvorbě textu jsou detailní nepřesnosti, kterých je v práci velké množství. Autorku takový přístup vede k zjednodušujícím tvrzením obecného charakteru, které jsou více podobné nevědeckému popularizačnímu stylu. Podstatou tvorby vědeckého textu je pravý opak – doložení tvrzení primárními daty a jejich kritický diskurz.

Zásadním nedostatkem celé disertační práce je úplná absence skutečné diskuze, kterou by autorka jasně prokázala schopnost tvořit vědecký text.

Doporučení:

Z výše zmíněných důvodů nesplňuje předložená disertační práce kritéria vědecké kvality a proto jí nedoporučuji k obhajobě a udělení titulu Ph.D Mgr. Simoně Partlové. Naopak autorce doporučuji přepsat práci pro obhajobu v náhradním termínu.

Těž zde nepřikládám kompletní seznam otázek, který je v nynější verzi tak obsáhlý, že jej není možné zvládnout zodpovědět v časovém rozsahu obhajoby. Níže uvádím pouze moje zásadní otázky.

Otázky k diskusi:

1. Může autorka porovnat význam hlavních protinádorových efektorových mechanismů proti spontánním pevným nádorům: CD8⁺ T buněk, CD4⁺ buněk (rozlište Th1 a Th17), NK buněk, makrofágů a dendritických buněk? O NK buňkách a makrofázích se disertace vůbec nezmiňuje. Prosím o jejich doplnění.
2. Doložte práce a data, které dokazují, že: „*prognostická hodnota imunofenotypizace mohla být u některých typů nádorů dokonce účinnější, než tradiční rozdělení nádorů do anatomických stadií (tzv. „staging“)*“, a to pro jednotlivé typy pevných nádorů, kterým se experimentálně věnujete. Jaké závěry zmíněné multicentrické studie (Galon et al. 2012, 2014) byly publikované a co z nich vyplývá?

3. Můžete doložit jakým způsobem byla v práci hodnocená dynamika a adaptabilita imunitního systému na změny prostředí, kterou zmiňujete v Závěru jako zásadní pro účinnost imunitní odpovědi proti nádorům?
4. Jakým způsobem „*Mutované geny významně přispívají k imunogenicitě nádorů*“?
5. K publikaci č. 2: tato Vaše stěžejní práce popisuje produkci IFNG a IL-17 jako významného rozdílu mezi HPV- a HPV+ HNSCC pacienty.
 - a. V této práci ukazujete na třech obrázcích (Fig.1, 2 a 4b,c) statistickou významnost IFNG a IL-17, ale to pouze u CD8⁺ T buněk a u sekretovaného IL-17. Rozptyl hodnot měřených na buňkách byl přitom vysoký mezi jednotlivými pacienty. Můžete tato data korelovat s klinickým vývojem onemocnění během poledních dvou let?
 - b. Nicméně po PMA/ionomycin stimulaci se ještě významně zvyšuje produkce IL-2 a TNF (Fig. 4b,c). U průkazu imunitní odpovědi se u více druhů patologií používá jako významného korelátu právě trojitého značení buněk kombinací IL-2, TNF a IFNG. Lze toto využít i u nádorů?
 - c. Vyjmenujte konkrétní krátkodobé i dlouhodobé funkce IFNG, dle Vašeho sdělení: „*IFN γ , který má nespočet funkcí majících vliv na schopnost imunitního systému kontrolovat a eliminovat nádory.*“.
 - d. Jak vysokou buněčnost (počet buněk na mm³ tkáně) jste u 54 HNSCC vzorků vámi navrženou metodikou naměřili a jakou výtěžnost tato metodika vykazovala? Tento parametr je klíčový pro následné porovnávání detailních výsledků. Ve vlastní práci nejsou vynesena data ze všech těchto vzorků, pouze z přibližně 50% dle konkrétní analýzy. Probíhala další analýza vzorků po publikování případně jejich korelace s klinickým stavem pacientů?
6. K publikaci č. 3: v této práci je po indukcí buněčné smrti nádorových buněk vysokým tlakem (HPP) a jejich přidání k dendritickým buňkám analyzována externalizace DAMP na nádorových buňkách a dále produkce cytokinů a fagocytóza dendritickými buňkami.
 - a. Při detekci fagocytózy (Fig. 3b,c) mi není jasné proč nejsou nádorové buňky přítomné na kontrolních mikroskopických snímcích při 4°C (červená fluorescence)? Jak se chovala kontrola neovlivněných (HPP, UV) buněk? Můžete ukázat snímky z vyšším rozlišením?
 - b. Na obrázku (Fig. 2e) nejsou detailně vidět lokalizace signálu HMGB1. Může autorka ukázat detailnější mikroskopické obrázky s vyšším rozlišením na více buňkách ne/ovlivněných UV, HPP? Jakou mikroskopickou techniku zde autorka použila? Není to popsáno v metodice.
 - c. Jaké další publikace prokázaly externalizaci DAMP molekul na povrchu nádorových buněk po imunogenní buněčné smrti? Pokud možno uveďte zdroje z nezávislých laboratoří.



V Praze dne 8. 2. 2017

RNDr. Karel Drbal, Ph.D