prof. dr hab. n. med. Ewa Kontny
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji (NIGRiR)
w Warszawie
Zakład Patofizjologii i Immunologii

Warszawa, 3 czerwca 2020

**OCENA**
**rozprawy doktorskiej mgr Marcina Przemysława Krzykawskiego**

**pt.:"Evaluation of new experimental models developed to monitor growth, immunogenicity and metastasis of cancer cells".**
**"Ocena nowych modeli doświadczalnych opracowanych w celu monitoringu wzrostu, immunogenności i przerzutowania komórek nowotworowych."**

**Ocena formalna rozprawy**

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Katedrze Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Janusza Marcinkiewicza.

Oceniana rozprawa doktorska liczy 71 stron i ma formę spójnego tematycznie cyklu czterech artykułów naukowych napisanych w jęz. angielskim, na który składają się:

(i) 3 prace oryginalne, których pierwszym autorem jest mgr M.P. Krzykawski:

Krzykawski MP., Krzykawska-Serda M, Jasińska K, Marcinkiewicz J. Pan_02 murine pancreatic cancer model. *Folia Med. Cracov 2015, 55 (3): 15-24.* Impact factor (IF) = 0; punkty MNiSW = 10;

Krzykawski MP, Krzykawska R, Paw M, Czyż J, Marcinkiewicz J. A novel in vitro model of metastasis supporting passive shedding hypothesis from murine pancreatic cancer Panc-02. *Cytotechnology 2019, 71 (5): 989-1002.* IF = 1,672; punkty MNiSW = 40;

Krzykawski MP, Burda J, Kwietniak D, Chorobik P, Gimenez-Alejandre M, Alemany R, Marcinkiewicz J. Mathematical model of biological anticancer agents distribution in vivo based on entire tumor imaging. Praca złożona do druku 30 grudnia 2019 r w czasopiśmie *Computers in Biology and Medicine*; IF=2,286; punkty MNiSW=100

(ii) oraz 1 autorska praca przeglądowa Doktoranta:

Krzykawski MP. Combined bacterial and viral treatment: a novel anticancer strategy. *Centr Eur J Immunol 2015, 40 (3): 366-372.* IF = 0,309; punkty MNiSW = 15.

Dwie spośród wymienionych prac opublikowano w czasopismach listy ISI Thomson Reuters, ich łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 1,981, także ostatnią pracę oryginalną złożono do czasopisma z tej listy.

Część merytoryczną rozprawy doktorskiej rozpoczynają jej zwięzłe streszczenia w języku angielskim i polskim. Po nich zamieszczony jest krótki opis prac składających się na tę rozprawę oraz ich opublikowane lub złożone do druku wersje. W części końcowej znajdują się deklaracje mgr M.P. Krzykawskiego oraz oświadczenia wszystkich współautorów tych publikacji, określające ich wkład w realizację poszczególnych prac. Z tych oświadczeń jednoznacznie wynika, że Doktorant pełnił rolę pierwszoplanową, biorąc aktywny udział we wszystkich etapach badań – od opracowania koncepcji, poprzez projektowanie i wykonanie części doświadczalnej, analizę, opracowanie i interpretację uzyskanych wyników, aż do napisania i przygotowania manuskryptów do publikacji. Na podkreślenie zasługuje także udział Doktoranta w pozyskaniu finansowania badań. Były one współfinansowane z kilku źródeł, m.in. przez Fundację Na Rzecz Nauki Polskiej (Program VENTURES), Narodowe Centrum Badań i Rozwoju wraz z Unią Europejską - Europejskim Funduszem Rozwoju Regionalnego (grant w ramach Programu Innowacyjnej Gospodarki) oraz Europejskim Funduszem Społecznym (the INTER Programme).

**Ocena merytoryczna rozprawy**

Według raportu WHO z 2018 roku nowotwory złośliwe są, w skali globalnej, przyczyną co szóstego zgonu. Ograniczona skuteczność i poważne wady konwencjonalnych sposobów leczenia chorób nowotworowych inspirują badaczy do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Wśród nich podejmowane są próby wykorzystania w tym celu niektórych bakterii i wirusów onkolitycznych, a dotychczasowe obserwacje budzą nadzieję na postęp w leczeniu nowotworów. Niektóre z wirusów onkolitycznych, np. T-VEC, ludzki reowirus typu 3 (Reolysin), zostały już zaaprobowane przez amerykańską Agencję Żywności i Leków do leczenie chorych, a wiele innych jest ocenianych w badaniach klinicznych II/III fazy. Badania nad terapeutycznym wykorzystaniem bakterii onkolitycznych są mniej zaawansowane, większość jest na etapie badań *in vitro* i tylko nieliczne wchodzą w fazę badań klinicznych. Jedną z przyczyn utrudniających podjęcie badań klinicznych jest brak dobrych modeli przedklinicznych, oceniających skuteczność terapeutyczną onkolitycznych wirusów i bakterii. Oceniana rozprawa doktorska podejmuje ten problem, przyczyniając się do częściowego wypełnienia tej luki.

W autorskiej pracy przeglądowej *(Krzykawski M.P. Combined bacterial and viral treatment: a novel anticancer strategy. Centr Eur J Immunol 2015, 40 (3): 366-372)* Doktorant szczegółowo omawia korzyści i ograniczenia terapii nowotworów za pomocą onkolitycznych wirusów i bakterii, zwracając uwagę na mechanizmy przeciwnowotworowego

działania tych mikroorganizmów, możliwości ich udoskonalania za pomocą inżynierii genetycznej, porusza również kwestię bezpieczeństwa i potencjalnych zagrożeń ich stosowania dla pacjentów. W oparciu o analizę danych z piśmiennictwa Doktorant proponuje rozważenie terapii łączonej, w której, dzięki sumowaniu zalet każdej z tych terapii, możliwe byłoby osiągnięcie lepszych efektów terapeutycznych. Ta propozycja została zauważona i zacytowana w późniejszej pracy przeglądowej innych autorów *(Son S, et al. The role of bacteria in cancer therapy – enemies in the past, but allies at present. Infectious Agents and Cancer 2018; doi:10.1186/s13027-018-0180y).*

Praca oryginalna *(Krzykawski MP, et al. Mathematical model of biological anticancer agents distribution in vivo based on entire tumor imaging),* złożona w grudniu 2019 roku do publikacji w czasopiśmie *„Computers in Biology and Medicine"*, jest w pewnym sensie kontynuacją rozważań Doktoranta opisanych w omówionej powyżej pracy przeglądowej. Badania były prowadzone w ośrodku macierzystym Doktoranta oraz w Catalan Institute of Oncology (IBIDELL) w Barcelonie. Ich istotą było stworzenie i przetestowanie narzędzia matematyczno-informatycznego, opisującego dystrybucję biologicznych czynników terapeutycznych w obrębie guzów nowotworowych. W guzach nowotworowych, indukowanych u myszy poprzez podanie komórek linii NP-18 ludzkiego raka trzustki (układ ksenogeniczny) lub komórek linii MC38CEA mysiego gruczolakoraka (układ syngeniczny), analizowano rozmieszczenie: (i) 2 wirusów onkolitycznych (VCN-01 i ICOVIR-15K), cechujących się wysoką selektywnością do guzów nowotworowych, a wywodzących się ze zmodyfikowanych genetycznie ludzkich adenowirusów oraz (ii) 2 zmodyfikowanych genetycznie bakterii *S. typhimurium* o obniżonej zjadliwości (VNP20009 pREP4 i VNP20009 pREP4-Plac-sipB). Algorytmy opisujące rozkład przestrzenny badanych czynników biologicznych wewnątrz guza nowotworowego weryfikowano w oparciu o dane pochodzące z analizy histochemicznej skrawków guza. Wyniki tej pracy udowodniły, że z odpowiedzią guza na stosowana terapię korelują algorytmy mierzące: (i) średnią odległość między komórkami nowotworowymi a czynnikami biologicznymi oraz (ii) homogeniczność dystrybucji czynnika biologicznego. Autorzy proponują, że stworzony na podstawie tych badań program komputerowy (Microorganism Intratumoral Distribution Investigation Tool – MIDIT), może znaleźć szerokie zastosowanie, m.in. do oceny porównawczej różnych biologicznych czynników terapeutycznych, jak i czynników poddanych różnym modyfikacjom. Powyższa praca wpisuje się bardzo dobrze w dynamicznie rozwijający się nurt badań, w których za pomocą modeli matematycznych zmierza się do prognozowania skuteczności nowych, wyboru optymalnych, a nawet swoistych dla pacjenta, postępowań

terapeutycznych. W roku 2018 w czasopismach naukowych opublikowanych zostało aż 218 takich artykułów, a niektóre modele matematyczny znajdują już zastosowanie w prowadzeniu badań klinicznych, co wskazuje, że jest to nowa, dynamicznie rozwijająca się dziedzina onkologii.

Kolejne dwie prace oryginalne Doktoranta opisują nowotwór trzustki, indukowany u myszy przez podskórne podanie komórek gruczolakoraka linii Pan_02. Wybór modelu badawczego jest jak najbardziej uzasadniony. Jak szacuje organizacja Pancreatic Cancer Action Network, rak trzustki będzie w tym roku drugą przyczyną zgonów wśród osób cierpiących na choroby nowotworowe, a w czasie rozpoznania, u większości pacjentów, guz jest już w zaawansowanym stadium, z przerzutami do otaczających tkanek i narządów. Jak dotąd opracowanych jest zaledwie kilka modeli pozwalających na badanie przerzutowania komórek raka trzustki, a powyższe prace Doktoranta poszerzają możliwości analizy tego zjawiska, co podkreślają inni autorzy *(Owusu-Ansah KG, et al. COL6A1 promotes metastasis and predicts poor prognosis in patients with pancreatic cancer. Int J Oncol 2019, 55:391-404)*, cytując pierwszą z tych prac, opublikowaną w 2015 roku w *Folia Medica Cracoviensia (55, 3: 15-24)*. W tej pracy zoptymalizowano warunki indukowania guza nowotworowego, oceniano stopień jego unaczynienia i funkcjonalność naczyń krwionośnych, konkludując iż powyższy model może być przydatny w badaniach oceniających skuteczność terapeutyczną chemioterapii, gdyż powstające guzy są dobrze unaczynione, naczynia krwionośne funkcjonalne a obszary nekrotyczne stanowią około 20% masy guza. W toku tych badań stwierdzano często przerzuty nowotworowe, głównie do płuc i węzłów chłonnych. Ta obserwacja stała się inspiracją do dalszych badań i opracowania nowego modelu przerzutowania komórek raka trzustki, co opisuje druga praca, opublikowana w czasopiśmie *Cytotechnology (2019, 71:989-1002)*. W tych najnowszych badaniach Doktoranta, poprzez zastosowanie procedury selekcji migracyjnej komórek linii Pan_02 *in vitro*, otrzymano subpopulację komórek wykazujących wybitną zdolność tworzenia przerzutów. W oparciu o analizę markerów biochemicznych autorzy konkludują, że jest to nowy mechanizm pasywnego rozsiewania komórek nowotworowych, związany z częściowym przejściem epitelialno-mezenchymalnym i potwierdzający wcześniejszą hipotezę zaproponowaną przez innych autorów *(Bockhorn M, et al. Lancet Oncol 2007, 8:444-448)*. W mojej ocenie ta praca zasługuje na szczególną uwagę, gdyż opracowany model może być użyteczny w badaniu tego kluczowego zjawiska także w innych typach nowotworów.

**Uwagi krytyczne**

Autorska praca przeglądowa *(Krzykawski MP. Combined bacterial and viral treatment: a novel anticancer strategy. Centr Eur J Immunol 2015, 40 (3): 366-372)* jest wprowadzeniem do problematyki badawczej, wokół której ogniskują się prace Doktoranta. Jednak, moim zdaniem, uzupełnienie w formie kilkunastostronicowego autoreferatu, obejmującego omówienie problemu badawczego na tle literatury przedmiotu, celu i modeli badawczych, oraz dyskusję wyników w świetle najnowszych doniesień z piśmiennictwa, wzbogaciłoby ocenianą rozprawę doktorską.

**Ocena końcowa**

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską oraz oświadczeniami mgr M.P. Krzykawskiego i współautorów publikacji składających się na tę rozprawę stwierdzam, że Doktorant wykazał się niezbędną wiedzą w dziedzinie badanego problemu, jak również umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej, a oceniana rozprawa wnosi wkład w opracowanie i ocenę modeli doświadczalnych przydatnych w badaniach dotyczących nowotworów.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska, przygotowana w postaci spójnego tematycznie cyklu prac naukowych, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim (*art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami)* i przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie Pana mgr M.P. Krzykawskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z-CA KIEROWNIKA
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii
i Rehabilitacji w Warszawie
Ewa Kontny
prof. dr hab. n. med. Ewa Kontny

Warszawa, 3.06.2020