

Warszawa, 14 kwietnia 2017

dr hab. n .med. Magdalena Chechlińska, prof. nadzw.
Zakład Immunologii
Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Komorowskiego
pt.: „*Oncolytic Vaccinia Virus in Treatment of Cancer. Targeting Metastatic
and Chemoresistant Ovarian Cancer by a CXCR4 antagonist-armed Viral Oncotherapy*”.**

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr. Marcina Komorowskiego pt.: „*Oncolytic Vaccinia Virus in Treatment of Cancer. Targeting metastatic and chemoresistant ovarian Cancer by a CXCR4 antagonist-armed viral oncotherapy*”, przygotowana pod kierunkiem prof. Bogumiły Litwińskiej oraz prof. Danuty Kozbor, wpisuje się w niezwykle aktualny i istotny nurt badań poświęconych opracowywaniu nowych, ukierunkowanych terapii przeciwnowotworowych, które dają nadzieję na polepszenie wyników leczenia chorych na nowotwory. Szacuje się, że obecnie średnio co trzecia osoba w ciągu całego swojego życia rozwija nowotwór. Liczba zachorowań na nowotwory złośliwe na całym świecie jednak stale rośnie. Wg danych Krajowego Rejestru Nowotworów w Polsce notuje się ok. 150 tys. zachorowań rocznie, do 2050 roku ta liczba ma się podwoić. Wskaźnik 5-letnich przeżyć chorych na nowotwory wynosi w Polsce ok. 45%.

Postęp w badaniach molekularnych i coraz lepsze poznanie biologii nowotworów stanowią dobrą podstawę opracowywania nowych podejść terapeutycznych, ukierunkowanych na mechanizmy związane z rozwojem i wzrostem nowotworów.

Doktorant postawił sobie szeroko zakrojony cel, polegający na opracowaniu ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem zmodyfikowanego wirusa onkolitycznego, skierowanej przeciwko komórkom chemoopornym o wysokiej agresywności i zbadaniu mechanizmów jego efektywności. Podjęty problem uważam za ważny i bardzo aktualny, a cele postawione przez doktoranta za ambitne i całościowo obejmujące problem.

Za cel molekularny terapii Doktorant wybrał szlak CXCL12/CXCR4. Dokonał trafnego wyboru, uwzględniając istotną rolę i plejotropowe działanie tego szlaku w rozwoju nowotworów, a także dotychczasowe wyniki badań, wykazujące przeciwnowotworowe działanie antagonistów receptora CXCR4, który jest niemal jedynym receptorem dla chemokiny CXCL12 (inaczej SDF-1). CXCL12 ma silne działanie chemotaktyczne. W warunkach fizjologicznych chemokina ta jest konstytutywnie ujawniana m.in. w szpiku kostnym, skórze, wątrobie i płucach. Oddziaływanie CXCL12/CXCR4 ma istotne znaczenie w procesach dojrzewania i regeneracji tkanek. Powoduje m.in. chemotaksję niedojrzałych i dojrzewających leukocytów, które to komórki charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji CXCR4. Receptor CXCR4 ulega także ekspresji w wielu typach komórek nowotworowych, w tym raka jajnika. Komórki raka jajnika ponadto produkują chemokinę CXCL12. W efekcie, szlak CXCL12/CXCR4, na drodze autokrynej i parakrynej pełni wiele ról w biologii raka jajnika, pobudza wzrost, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, bierze udział w angiogenezie, może również działać immunosupresyjnie. Ma istotne znaczenie w progresji nowotworu i tworzeniu ognisk przerzutowych. Wysoka ekspresja CXCR4 jest niekorzystnym wskaźnikiem przeżycia chorych na raka jajnika. I to właśnie ten nowotwór został wybrany jako model do badania proponowanych podejść terapeutycznych.

Jako nośnika antagonisty CXCR4 Doktorant użył wirusów krowianki, które charakteryzują się silnym działaniem onkolitycznym. Użył szczepów pozbawionych dwóch genów: czynnika wzrostu wirusa krowianki (VGF) oraz kinazy tymidynowej (TK), dzięki czemu szczepy te mają obniżoną zdolność namnażania się w komórkach prawidłowych. Do wirusów wklonował gen antagonisty receptora CXCR4. Należy zaznaczyć, że zastosowanie wirusów krowianki w terapii przeciwnowotworowej nie było jak dotąd badane w raku jajnika.

Oceniał następnie skuteczność działania zmodyfikowanego wirusa krowianki wobec chemioopornych nowotworów o wysokiej agresywności *in vivo*, w ortotopowych zwierzęcych modelach mysich i ludzkich raków jajnika o wysokiej agresywności, z zastosowaniem – odpowiednio: myszy syngenicznych i myszy SCID (pozbawionych limfocytów T i B).

Postanowił również zbadać zmiany w mikrośrodoisku guza indukowane przez zmodyfikowane wirusy.

Wreszcie podjął się opracowania nowego podejścia terapeutycznego, z zastosowaniem zmodyfikowanego wirusa krowianki skojarzonego z doksorubicyną i zbadania mechanizmu działania tej terapii w syngenicznym modelu raka jajnika opornego na paklitaksel i karboplatynę. Do badań samodzielnie uzyskał agresywny, chemiooporny wariant mysiej linii komórek raka jajnika.

Praca została napisana w języku angielskim. Ma formę oprawionego wydruku komputerowego. Liczy 130 stron. Składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Cele, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie wyników, Wnioski, Kierunki dalszych badań. Praca opatrzona jest również spisem treści i spisem skrótów umieszczonych na początku monografii, a na końcu streszczeniem w języku angielskim i polskim oraz spisem cytowanych publikacji.

Wstęp przedstawia zagadnienia związane z: biologią raka jajnika, rolą ścieżki CXCR4/CCL12 w tym nowotworze, standardami leczenia chorych na raka jajnika, biologią wirusów onkolitycznych i mechanizmami ich działania przeciwnowotworowego, w tym w szczególności wirusa krowianki (kolejność jak w pracy). W obrębie poszczególnych podrozdziałów wstępu poruszane zagadnienia zostały ujęte poprawnie, adekwatnie do tytułów tych podrozdziałów. W mojej opinii jednak we wstępie, który przecież ma za zadanie wprowadzić czytelnika w problematykę doktoratu i pokazać czytelnikowi tok rozumowania, jaki przeprowadził Doktorant przystępując do badań, zbyt duży akcent położono na zagadnienia związane z rakiem jajnika i na dodatek umieszczono je na samym początku. Sugeruje to, że głównym przedmiotem zainteresowania badacza jest rak jajnika. Takie wrażenie mogą dodatkowo potęgować opisy różnorodności typów histologicznych i molekularnych raka jajnika, nie mające jednak bezpośredniego odniesienia do przedmiotu pracy. Podobnie wywody na temat diagnostyki laboratoryjnej raka jajnika z uwypukleniem roli oznaczeń CA 125 i cytokin. (*Nota bene*, wbrew twierdzeniu na str. 19 obecnie już nie ma wielkich nadziei na diagnostyczne wykorzystanie oznaczeń cytokin w nowotworach). Elementy te nie powinny być w tej pracy tak eksponowane. Bowiem nadrzędnym badanym problemem było przeciwnowotworowe działanie zmodyfikowanego wirusa, które równie dobrze można by testować na modelu innego nowotworu. Zabrakło natomiast wyczerpującego uzasadnienia dlaczego Doktorant przyjął określony model, na którym sprawdzał swoją hipotezę, dlaczego był to akurat rak jajnika. Wiadomo przecież, że szlak CXCR4/CCL12 ma istotne znaczenie w wielu nowotworach, nie tylko w raku jajnika. Mniej uważny czytelnik mógłby jednak mieć wrażenie, że ścieżka CXCR4/CCL12 ma w raku jajnika znaczenie szczególne. Czy wybór modelu podyktowany był np. dostępnością materiału lub wynikał z wcześniejszych doświadczeń w badaniu tych nowotworów przez zespoły promotorów pracy, a może to właśnie w raku jajnika można było wykazać, że przeciwnowotworowe działanie modyfikowanego wirusa odbywa się na wielu poziomach, tj. na drodze bezpośredniego działania na komórki

nowotworowe oraz poprzez hamowanie oddziaływań immunosupresyjnych i pobudzenie odpowiedzi przeciwnowotworowej ustroju? A może chodziło o sposób rozsiewu tego nowotworu? W podrozdziale 1.3.1 Doktorant opisuje specyfikę rozsiewu raka jajnika, polegającą na zajęciu jamy otrzewnej i wskazuje, że chemioterapia dootrzewnowa jest bardziej efektywna niż dożylna. To zagadnienie zasługiwało na szersze opracowanie i należało wyraźnie podkreślić, że z punktu widzenia zastosowania klinicznego terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych, rak jajnika jest szczególnie dogodnym typem nowotworu, ze względu na jego umiejscowienie nawet w wysokich stopniach zaawansowania ograniczone do jamy otrzewnej, co czyni ten nowotwór dogodnym celem dla wirusów podawanych dootrzewnowo.

Ścieżka sygnałowa CXCL12/CXCR4 w raku jajnika jest bardzo istotną przesłanką pracy. Tymczasem autor poświęcił jej pół strony 35-stronicowego wstępu w podrozdziale zatytułowanym „CXCR4/CXCL12 signaling axis in ovarian cancer”. Szkoda, że nie napisał wyraźnie czy i jaka jest specyfika raka jajnika w kontekście sygnałowania przez CXCL12/CXCR4. W tym miejscu opisał bardzo krótko i ogólnikowo kwestię zastosowania antagonistów receptora CXCR4 w terapii przeciwnowotworowej i ewentualnych skutków niepożądanych takiego leczenia, nie zaznaczając, że przytacza dane dotyczące innych nowotworów – nie raka jajnika. Zabrakło tu też koncepcji „ziarna i gleby”, którą we współczesnej formie rozwinął Mueller i wsp. w pracy cytowanej przez mgr. Komorowskiego (poz. 118), pokazując, że chemokiny (będące przedmiotem tej pracy) są cząsteczkami ukierunkowującymi przerzuty.

Rozdziały 1.4 i 1.5 są przykładem niezbyt dobrej praktyki odwzorowywania w tekście własnym treści innej publikacji. Tytuły tych rozdziałów oraz ich podrozdziałów zostały zaczerpnięte z pracy przeglądowej Charbonneau i in. z 2013 roku (ref. 51), zawartość – choć opisana własnymi zdaniami – dokładnie odzwierciedla treści ujęte w pracy Charbonneau.

Za dobrą część wstępu uważam podrozdział 1.8 dotyczący istotnej dla pracy kwestii terapii z użyciem wirusów onkolitycznych. Doktorant przedstawił tutaj cechy wirusów onkolitycznych i sposoby ich modyfikowania dla polepszenia efektów terapeutycznych oraz omówił różnorodne mechanizmy działania wirusów onkolitycznych. W tym podrozdziale znalazła się jedna nieścisłość, mianowicie Doktorant stwierdza, że dowodem na obecność genów wirulencji w wirusach jest związek pomiędzy przewlekłymi stanami zapalnymi a rozwojem nowotworów (str. 37), podczas gdy ten związek jest o wiele bardziej złożony i w dużej mierze jest uwarunkowany pronowotworowym oddziaływaniem środowiska stanu zapalnego o charakterze przewlekłym. W ostatnim akapicie tego rozdziału Doktorant stwierdza, że wirusy onkolityczne, aby być efektywne MUSZĄ zabić komórki nowotworowe (str. 39). Można się domyślać, że chodzi o efektywność terapeutyczną. Tak kategoryczne stwierdzenie jest niespójne z wcześniej postawioną tezą (str. 37), że pośrednie mechanizmy przeciwnowotworowe mogą mieć krytyczne znaczenie dla efektywności działania wirusa. Tezę tę *nota bene* potwierdzają wyniki pracy doktorskiej.

We wstępie zabrakło przeglądu stanu badań – *in vitro*, na zwierzętach i ew. prób klinicznych – nad terapeutycznym zastosowaniem wirusów onkolitycznych, w tym wirusa krowianki, oraz innych podejść terapeutycznych związanych z blokowaniem ścieżki CXCR4/CXCL12, np. z zastosowaniem siRNA (np. Liu i wsp. 2014), czyli informacji bezpośrednio związanych z przedmiotem badania. Autor powinien był również poświęcić należytą uwagę problematyce cech komórek nowotworowych, odpowiednio do badanych w pracy mechanizmów działania opracowywanej terapii. Doktorant jedynie wymienia te cechy (rozdz. 1.9.2, str. 45). Zabrakło tu również zaakcentowania trwającej od lat dyskusji nt. występowania tzw. komórek macierzystych raka jako odrębnej populacji bądź stanu komórki. Doktorant, decydując się na wybór komórek o cechach komórek macierzystych jako celu opracowywanej przez siebie strategii terapeutycznej, powinien wykazać się znajomością

istotnych aspektów będących przedmiotem kontrowersji. Ten wątek można było powiązać (we wstępie lub w dyskusji) z problemem heterogenności raka jajnika, który doktorant ograniczył do typów histopatologicznych i molekularnych, nie wspominając o heterogenności w obrębie guza i problemie plastyczności komórek nowotworowych.

W efekcie wstęp nie stanowi kompletnego obrazu najważniejszych kwestii związanych z przedmiotem pracy, przesłanki podjęcia badań nie są przedstawione klarownie, brakuje jasnego uzasadnienia dlaczego autor postanowił weryfikować działanie opracowywanej terapii na modelu raka jajnika. Jest bardzo dużo informacji zazwyczaj dość ogólnikowych, a czasem nadmiernie szczegółowych, a czytelnik w dużej mierze musi sam dociekać dlaczego poszczególne kwestie są istotne i jak wiążą się ze sobą.

Rozdział **Cele pracy** – to bardzo ważna część pracy, która ma jasno pokazać problemy jakie chciano rozwiązać w prowadzonych badaniach.

Ten rozdział rozpoczyna się akapitem, który prawdopodobnie miał skrótowo ujmować istotę pracy, zawiera jednak tylko trzy bardzo ogólnikowe zdania, w których Doktorant niezbyt szczęśliwie pomieszał przesłanki oraz hipotezę i nadrzędny cel pracy. Wybór raka jajnika jako modelu badawczego. Autor tłumaczy takim zdaniem: „Rak jajnika jest nowotworem o najwyższej śmiertelności, wynikającej z późnego wykrywania, pierwotnej i wtórnej chemiooporności i wybitnej heterogenności.” Z kolei sformułowanie nadrzędnego celu pracy, istotne w tym rozdziale, zostało przyćmione wyeksponowanym stwierdzeniem nazwanym „hipotezą”, które jednak nie jest hipotezą, a bardzo ogólnym sformulowaniem obecnie obowiązującego paradygmatu. Stwierdzenia tego akapitu w aktualnej formie i nie służą wprowadzeniu do szczegółowych celów pracy, które po nim następują.

Cele szczegółowe pracy zostały z niewyjaśnionych przez Doktoranta względów nazwane „Study I”, „Study II” itd. Można się oczywiście domyślać, że odnosi się to do etapów badania.

Szczegółowy cel I sformułowany został jakby był nadrzędnym celem badań, podczas gdy Doktorant przypuszczalnie chciał w tym punkcie opisać zadanie polegające na konstrukcji zmodyfikowanego wirusa krowianki. Jeśli taki miał zamiar, nie powinien tu być odnosić się do „opracowywania terapii”, a raczej do „konstrukcji zmodyfikowanego wirusa”. Jeśli takiego zamiaru nie miał, to dlaczego nazwał ten cel „szczegółowym”?

Szczegółowe cele pracy II do IV zostały poprawnie sformułowane i odnoszą się do poszczególnych etapów badań.

Metodyka badań jest prawidłowo dobrana do założonych celów. Doktorant przedstawił ją w sposób zwięzły i klarowny w rozdziale **Materiały i metody**.

We wszystkich układach badawczych zastosowano właściwe kontrole. Wyniki analizowano statystycznie z użyciem adekwatnych metod. Badania uzyskały akceptację właściwej komisji bioetycznej. Na wyróżnienie zasługuje różnorodność zastosowanych przez Doktoranta technik, które samodzielnie wykonywał. Były to techniki molekularne, komórkowe oraz badania *in vivo*, takie jak: uzyskiwanie rekombinowanych wirusów i ich namnażanie, hodowle komórkowe *in vitro*, badania klonogenności i zdolności do indukcji guzów przez komórki nowotworowe, testy immunologiczne (ELISA, Western blott), cytometria przepływową, złożone badania *in vivo* na modelach syngenicznych i ksenogenicznych. Zastosowanie badań *in vitro* i równoległe modeli *in vivo*, wykorzystujących obok układu ksenogenicznego, ortotopowego układu syngenicznego, pozwalającego na badania oddziaływań na układ odpornościowy, jest niewątpliwą zaletą pracy.

Zastanawia jedynie dlaczego niektóre metody zostały przedstawione w rozdziale „Wyniki”, np. szczegóły dotyczące białka fuzyjnego i uzyskiwania modyfikowanych wirusów krowianki zostały przedstawione na ryc. 13 i 14 i opisane w tekście podrozdziału 4.1.

Wyniki opisane zostały w 4 podrozdziałach, podzielonych łącznie na 11 części, i przedstawione w postaci 40 złożonych rycin i 2 tabel. Uzyskane wyniki zostały bardzo dobrze zobrazowane i wyczerpująco opisane.

Za bardzo istotne uznaję wykazanie złożonych mechanizmów terapeutycznego oddziaływania zmodyfikowanego wirusa krowianki, hamującego wzrost komórek o fenotypie komórek inicjujących nowotwór, indukującego apoptozę tych komórek, hamującego rozsiew nowotworu i działającego immunomodulacyjnie poprzez hamowanie oddziaływań immunosupresyjnych oraz pobudzanie odpowiedzi przeciwnowotworowej i generowanie pamięci immunologicznej, a także pokazanie mechanizmu synergistycznego działania *in vivo* wirusowej szczepionki terapeutycznej i doxorubicyny na chemioopornego raka jajnika.

Wątpliwość moją budzi odważna interpretacja (str. 89 oraz w streszczeniu polskim) wyniku przedstawionego na ryc. 48, że u 20% myszy z syngenicznym rakiem jajnika uzyskano efekt całkowitego wyleczenia w odpowiedzi na liposomalną formę doksorubicyny, której podanie poprzedzono podaniem zmodyfikowanego wirusa krowianki. Czy – pomimo poprawności matematycznej – na podstawie jednego eksperymentu, przeprowadzonego na 10 myszach, z których 2 zostały wyleczone, uprawniona jest generalizacja, że po terapii uzyskuje się 20% wyleczeń?

Tytuł części 4.1 jest nieadekwatny do treści. Jest ona poświęcona konstrukcji modyfikowanego wirusa, a nie opracowaniu terapii. To ten sam błąd, który pojawił się w rozdziale Cele pracy. Ponadto, w tym rozdziale, na str. 56, Doktorant pisze o „*new antagonist*” nie precyzując co to za nowy antagonist, w stosunku do czego „nowy”.

W rozdziale Wyniki Doktorant, poza opisem uzyskanych rezultatów, w wielu miejscach umieścił również metody (o tym wspomniałam już wyżej, odnosząc się do rozdziału metody) oraz przesłanki (np.: pierwsze akapity rozdziału 4.1 to głównie przesłanki, podobnie 4.4, pierwszy akapit rozdziału 4.2) i wnioski (np. ostatnie zdanie rozdziału 4.2.2), a nawet czasem stwierdzenia, które powinny stać się częścią dyskusji (np. ostatnie zdanie na str. 87). O ile czasem – dla jasności wyводу – przypomina się wybrane przesłanki w opisie wyników, są to jednak zazwyczaj krótkie zdania łączące. Szkoda, że te cenne fragmenty nie znalazły się w odpowiednich miejscach, tam ich bardzo zabrakło.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorant przedstawił wagę problemu poszukiwania terapii dla chorych na chemioopornego, zaawansowanego raka jajnika. Omówił następnie dostępne modele badawcze i zalety zastosowanego ortotopowego mysiego modelu agresywnego raka jajnika. Zrekapitulował następnie uzyskane wyniki i przedstawił je w kontekście danych literaturowych. Przeanalizował możliwe skutki uboczne terapii z zastosowaniem wirusów. Przedyskutował również możliwe mechanizmy wchodzenia wirusów krowianki do komórek nowotworowych i mechanizmy synergistycznego działania modyfikowanego wirusa krowianki i doxorubicyny. Dyskusję poprowadził ciekawie i sprawnie, wykazując się dobrą znajomością literatury przedmiotu.

Doktorant poświęca relatywnie długi – jak na tę krótką, 6 stronicową dyskusję – akapit niewątpliwie ciekawemu wywodowi nt. indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej przez antygeny uwalniane przez komórki nowotworowe zainfekowane wirusami. Jednak z niewiadomych przyczyn wyniki tu przytaczane nie zostały pokazane w pracy. Szkoda też, że zabrakło rozważań nt. wartości zastosowania linii komórkowych do przeprowadzonych badań i kłopotów z eksperymentalnymi modelami raka jajnika, oraz że m.in. w tym kontekście Doktorant nie przedyskutował ograniczeń wykonanych badań. Nie próbował też wyjaśnić dlaczego podanie DOX po uprzednim podaniu wirusa jest najbardziej efektywne, co tak pięknie wykazał w swoich badaniach.

Warto podkreślenia jest bardzo dobre i przejrzyste, graficzne (Ryc. 55) (dyskusja) oraz tekstowe **podsumowanie najważniejszych wyników** (podrozdział str. 104)

nt. przeciwnowotworowego działania modyfikowanego wirusa onkolitycznego, ujawniającego antagonistę CXCR4, doxocykliny oraz skojarzonego zastosowania tych dwóch podejść, wraz z prezentacją mechanizmów warunkujących uzyskane efekty.

Wnioski generalnie odpowiadają postawionym celom pracy. Ich sformułowanie budzi jednak pewne zastrzeżenia. Wniosek a) jest poprawnie sformułowany, z zastrzeżeniem, dotyczącym sformułowania: „*overcoming immunosuppression in favor of inflammation*”, które uważam za nieprecyzyjne, a może nawet błędne, w świetle danych pokazujących, że immunosupresja jest elementem stanu zapalnego, w szczególności przewlekłego. Nie można przeciwstawiać tych procesów. Należało tu pominąć zwrot „*in favor of inflammation*”. Dodatkowo w trzecim tire w wyrażeniu: „*generating antitumor immune responses that are capable of controlling tumor growth*” „*immune response*” powinno być w liczbie pojedynczej, gdyż, co prawda, odpowiedź immunologiczna warunkowana jest wieloma różnymi mechanizmami, ale to sformułowanie określa zjawisko. Wniosek b) jest lakoniczny i ogólnikowy, nie zawiera istoty odkrytego mechanizmu. Brak jest tu odniesienia do indukcji pamięci immunologicznej. Punkt c) nie jest zdaniem recenzenta wnioskiem i powinien znaleźć się w rozdziale poświęconym dalszym badaniom. Brakuje wniosku dotyczącego wpływu kolejności podania modyfikowanego wirusa i chemioterapeutyku na efekt terapeutycznego. Wnioski powinny być raczej formułowane w pierwszej osobie lub bezosobowo, a nie w liczbie mnogiej, Doktorant w rozprawie przedstawia bowiem swoje własne wyniki.

Rozdział „**Kierunki dalszych badań**” zawiera zwięzły, dobrze zaprezentowany opis planowanych badań, będących kontynuacją prac opisanych w rozprawie doktorskiej, zmierzających do lepszego zrozumienia mechanizmów oddziaływania wirusa na komórki nowotworowe i do znalezienia wskaźników chemiooporności oraz wskaźników wrażliwości na terapię z użyciem wirusa krowianki, w oparciu o badanie klinicznego materiału raków jajnika.

Piśmiennictwo

Rozprawa doktorska zawiera 309 numerowanych pozycji piśmiennictwa, uporządkowanych w kolejności cytowania. Doktorant jest niekonsekwentny w sposobie podawania danych bibliograficznych. W niektórych odnośnikach podaje wszystkich autorów prac, w innych tylko pierwszego lub kilku z dopiskiem et al. Raz stosuje skróty nazw czasopism, w innych miejscach podaje pełne nazwy, dotyczy to również tych samych tytułów czasopism.

Cytowania są zazwyczaj poprawne, choć niestety niekiedy nie można ich określić „starannie dobranymi”. Na przykład we wstępie Doktorant w wielu miejscach cytuje pozycje piśmiennictwa cytowane w pracach, na których się wzorował, choć można by z łatwością znaleźć nowsze, aktualne pozycje. Dla przykładu na str. 22, w opisie standardów leczenia chorych na raka jajnika powołuje się na pracę z 2001 roku (pozycja 148). Od tego czasu pojawiło się setki opracowań, metaanaliz, opisów badań klinicznych i prac przeglądowych przedstawiających współczesne standardy. Być może dlatego w opisie standardów terapeutycznych Doktorant zupełnie pominął nowe podejścia, o których należało choćby wspomnieć, np. włączone do standardów leczenie skojarzone z użyciem bevacizumabu np. w rakach jajnika opornych na platynę – czyli ściśle związane z przedmiotem pracy, czy będące na etapie prób strategię w oparciu o inne leki celowane, np. przeciwko punktom kontrolnym odpowiedzi immunologicznej, czy inhibitory PARP (np. artykuł przegl. Sundar i wsp., 2016).

Niejednokrotnie autor pisze o ostatnich/niedawnych badaniach, a powołuje się na prace sprzed lat, np. str. 18, ref. 41 z 2009 roku, str. 23, ref. 64 z 2012 r.

Miejscami Doktorant odnosi się do prac oryginalnych, w których co prawda padają przytaczane tezy, ale na podstawie przywołanych, innych pozycji literatury. W takich sytuacjach należałoby odwoływać się do prac, w których oryginalnie udowodniono daną tezę.

W szeregu miejsc brak jest odnośników do prezentowanych stwierdzeń, np. na str. 18 na końcu drugiego akapitu oraz po stwierdzeniu, że angiogeneza zjawiskiem wczesnym w progresji raka jajnika. Często Doktorant podaje odnośniki do całych akapitów zamiast do konkretnych tez.

Są też pozycje nieprawidłowo cytowane, tj. takie, które nie są poparciem głoszonych tez, np. na str. 13: poz. 11, str. 19: poz. 50 (praca mówi tylko o tylko o IL-6), str. 21: poz. 51, str. 22: poz. 61 (autorzy nie mówią o małej liczbie komórek CD8+ a o braku takich komórek), str. 45: poz. 175 i 221 (chodzi o tezę o podobieństwach „między wirusami a komórkami nowotworowymi”).

W przypadku użycia w zdaniu nazwiska autora, na pracę którego Doktorant się powołuje, w całej pracy (pierwsza taka sytuacja to poz. 20 na str. 14) numer odnośnika Doktorant umieszcza na końcu zdania, a nie zgodnie ze standardami – za nazwiskiem. Pozytywnym wyjątkiem jest cytowanie poz. 56 na str. 22.

Streszczenie angielskie dobrze przedstawia treści rozprawy i uzyskane wyniki. Byłoby wskazane zakończyć streszczenie jasno wyartykułowanymi wnioskami, poprzedzającymi istniejące, dobre zdanie kończące streszczenie, pokazujące sens ogólny uzyskanych wyników.

Streszczenie polskie jest słabo napisane. Doktorant nie zachował proporcji pomiędzy wprowadzeniem, wynikami i konkluzjami. Podobnie jak w całej pracy, za dużo miejsca poświęcił samemu rakowi jajnika, wchodząc często w szczegóły nieistotne z punktu widzenia meritum tej pracy. Konkluzje są słabo zaakcentowane. Do strony językowej i terminologicznej streszczenia polskiego odnoszę się w dalszej części.

Oceniając **poprawność redakcyjną** rozprawy należy podkreślić, że jest ona przejrzysta pod względem formy, ryciny przedstawiające wyniki są bardzo dobrze opracowane. Jedyne zastrzeżenia co do formy ogólnej to brak konsekwencji w stosowaniu wcięcia na początku akapitów oraz bardzo niewyraźna i przez to bardzo mało czytelna Rycina 14, przedstawiająca homologiczną rekombinację prowadzącą do uzyskania rekombinowanego wirusa krowianki. W kilku miejscach zastrzeżenia budzą nieprecyzyjne sformułowania i użyta terminologia. Np. na str. 96, na początku dyskusji, opisując komórki inicjujące raka jajnika Doktorant pisze, że “[...] *ovarian CICs are characterized by self-renewal, aggressive neovascularization, [...]*”. Tworzenie nowych naczyń dotyczy guza, a nie komórek; zastosowany tu skrót myślowy jest nieuprawniony. Na str. 111, w streszczeniu polskim Doktorant użył sformułowania „komórki odpornościowe aktywowane działaniem chemioterapeutyków”. Chemioterapeutyki działają raczej immunosupresyjnie poprzez nieswoistą eliminację komórek odpornościowych. Doktorant miał chyba na myśli działanie pośrednie, polegające na oddziaływaniu antygenów uwalnianych przez rozpadające się komórki nowotworowe, co opisuje w tym akapicie. Podobnie sformułowanie „parakryne przemieszczanie się komórek” (str. 112) jest błędne. Parakryne mogą być oddziaływania, przemieszczanie może być indukowane oddziaływaniami parakrynnymi. Należy unikać takich nieprecyzyjnych sformułowań w tekście naukowym. Polskim odpowiednikiem angielskiego terminu „*combined therapy*” jest „terapia skojarzona”; to określenie byłoby lepiej stosować niż używane przez Doktoranta na str. 115-116 wyrażenie „terapia łączona”.

Niestety praca zawiera wiele błędów językowych, dotyczących stosowania rodzajników, interpunkcji, szyku zdania, nieprecyzyjności wypowiedzi, które głównie wynikają z pisania przez Doktoranta w języku obcym. Szkoda, że treści nie zweryfikowała osoba zajmująca się podobną problematyką, dla której angielski jest językiem ojczystym. Jednak niektóre błędy dotyczą spraw zupełnie podstawowych, które Doktorant powinien był sam skorygować, jak np. na str. 23 powinno być *grade*, a nie *grades*, na str. zamiast „*In spite numerous ...*” powinno być „*In spite of numerous...*” Błędy literowe choć nieliczne, są dość

niefortunne, np. słowo *ascitic* zostało na str. 68 zamienione na *ascetic*, a *though* na *thought* (str. 97).

Doktorant nie ustrzegł się błędów językowych również w tekście polskim. Streszczenie w języku polskim napisane jest nienajlepszą polszczyzną, zawiera szereg błędów interpunkcyjnych i terminologicznych. Brzmi miejscami jak słabe tłumaczenie z angielskiego. Doktorant pisze o leczeniu nowotworów. Jest to skrót myślowy często stosowany w mowie, jednak należy pamiętać, że leczymy chorych, a nie chorobę i nie powinno się stosować takiego sformułowania w pracy naukowej. Angielskie, poprawne wyrażenie „*cancer treatment*”, choć znaczy to samo, oparte jest o nieco inne zabarwienie znaczeniowe słowa „*treatment*”. Innym przykładem kolokwializmu jest zdanie „Dostępne terapie jednak bardzo rzadko pozwalają na całkowite wyzdrowienie chorych z zaawansowanym rakiem jajnika”, które powinno poprawnie brzmieć: Dostępne terapie jednak bardzo rzadko pozwalają na całkowite wyleczenie chorych na zaawansowanego raka jajnika”. Słowo „oddziaływały” (str. 113), choć często spotykane, jest błędne, poprawna forma to „oddziałujący”.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr. Marcina Komorowskiego prezentuje wyniki istotnych i zawierających nowatorskie elementy badań, które zostały zaplanowane i przeprowadzone, a także zinterpretowane prawidłowo. Uwagi krytyczne dotyczą przede wszystkim niepełnego ujęcia przesłanek i sformułowania celów oraz wniosków, niepełnej krytycznej analizy uzyskanych wyników na tle aktualnej problematyki i danych literaturowych oraz poprawności odniesień do literatury, a także strony redakcyjnej. Należy jednak podkreślić, że uzyskane wyniki są wartościowym wkładem mgr. Komorowskiego w badania nad terapeutycznym wykorzystaniem wirusów onkolitycznych w chorobach nowotworowych.

Za oryginalne wyniki pracy doktorskiej mgr. Komorowskiego uznaję te, które przedstawione są w rozdziale 4.4., obejmującym ryciny 35-54, czyli wyniki badań poświęconych opracowaniu nowej skojarzonej terapii przeciwnowotworowej, z zastosowaniem doksorubicyny oraz wirusa krowianki z ekspresją antagonisty CXCR4. Pozostałe wyniki, poprzedzające opracowanie tej nowej terapii, były opublikowane przez mgr Komorowskiego jako autora równorzędnego z pierwszym autorem w 2014 roku w *Journal of Immunology* (IF=4,9). Jako opublikowane wcześniej, przed otwarciem przewodu doktorskiego, ze względów formalnych nie stanowią oryginalnej części pracy doktorskiej. Szkoda, że fakt ten nie został jednoznacznie odnotowany w tekście rozprawy. Natomiast należało się pochwalić, że pozostałe wyniki zostały złożone do druku w 2016 roku i praca, której mgr Komorowski jest pierwszym autorem, jest już opublikowana w *Molecular Therapy – Oncolytics*.

Zakres pracy doktorskiej jest niezwykle szeroki, zdaniem recenzenta wykracza poza ramy rozprawy doktorskiej. Dlatego też wyniki oryginalne, obejmujące opracowanie terapii skojarzonej uznaję za w pełni wystarczającą podstawę rozprawy doktorskiej.

Reasumując, uwzględniając całościowe i wielowątkowe ujęcie problemu, nowe, interesujące i poprawnie zinterpretowane wyniki w dziedzinie niezwykle istotnej i intensywnie badanej, oraz niewątpliwe oryginalne osiągnięcie Doktoranta, polegające na wykazaniu potencjału zastosowania onkolitycznego wirusa krowianki ukierunkowanego przeciwko szlakowi CXCR4/CXCL12 w terapii przeciwnowotworowej stwierdzam, że pomimo licznych przedstawionych wyżej uwag krytycznych rozprawa mgr. Marcina Komorowskiego spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – PZH z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Marcina Komorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.