



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

ZAKŁAD BIOLOGII I GENETYKI NOWOTWORÓW  
KATEDRA PATOMORFOLOGII

Warszawa 15.03.2024

Prof. dr. n. med. Tomasz Stokłosa  
Zakład Biologii i Genetyki Nowotworów  
Katedra Patomorfologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
[tomasz.stoklosa@wum.edu.pl](mailto:tomasz.stoklosa@wum.edu.pl)

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Radosława Borowskiego pod tytułem:  
" Perspektywy zastosowania w terapii przeciwnowotworowej immunotoksyn  
ukierunkowanych na komórki nowotworowe z ekspresją receptora IL-13R $\alpha$ 2"**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr Radosława Borowskiego na stopień doktora nauk biologicznych dotyczy aktualnego i niezwykle ważnego problemu - nowoczesnej terapii celowanej nowotworów przy zastosowaniu immunotoksyn, czyli przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z toksyną, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN), w tym w szczególności glejaka wielopostaciowego ale także przerzutów nowotworów piersi, prostaty, płuc i czerniaka do OUN.

Glejak wielopostaciowy (GBM) jest najczęstszym i najbardziej śmiertelnym pierwotnym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego (OUN) u dorosłych. Glejaki stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Szybko rosnące glejaki mogą mieszać się ze zdrowymi komórkami mózgowymi, tworząc rozsiane guzy, które są trudne do usunięcia chirurgicznego, przez co operacja całkowicie radykalna zazwyczaj nie jest możliwa. Standardowa terapia polegająca na zastosowaniu frakcjonowanej radioterapii wspartej chemioterapią przy zastosowaniu temozolomidu jako leku radiouczulającego, a następnie w monoterapii daje ograniczone rezultaty, gdyż prawie zawsze dochodzi do nawrotu choroby. Obecnie nie ma dobrego standardowego leczenia choroby nawrotowej, a mediana całkowitego czasu przeżycia (OS) w przypadku nawrotowego GBM (rGBM) trwa krócej niż rok. Dlatego skuteczna terapia dla glejaka

wielopostaciowego, a zwłaszcza jego postaci nawrotowej (rGBM), pozostaje jedną z największych niezaspokojonych potrzeb w onkologii i w całej medycynie.

O tym jak bardzo nowoczesny i ważny jest temat rozprawy doktorskiej, może też świadczyć opublikowany w ostatnich tygodniach artykuł w prestiżowym czasopiśmie *Nature Medicine* pokazujący wyniki badania klinicznego I fazy u sześciu chorych z rGBM z zastosowaniem terapii modyfikowanymi genetycznie biwalentnymi limfocytami T (z ang. chimeric antigen receptor T cells - CART) pt. „*Intrathecal bivalent CAR T cells targeting EGFR and IL13Ra2 in recurrent glioblastoma: phase I trial interim results*” (<https://doi.org/10.1038/s41591-024-02893-z>). W tej oryginalnej publikacji jednym z celów dla komórek modyfikowanych genetycznie (CART) był receptor IL13Ra2 (drugim był EGFR, który ulega często nadekspresji w GBM). Opublikowane wyniki wprawdzie wskazują na ograniczoną w czasie skuteczność podjętej terapii, ale potwierdzają celowość kontynuowania badań z wykorzystaniem celów molekularnych takich jak, EGFR i IL13Ra2. Oryginalna publikacja w takim czasopiśmie potwierdzająca właściwy kierunek badań niezwykle wzmacnia rangę i wagę podjętych badań przez Doktoranta.

**Z uwagi na powyższe uważam, że wybór tematu rozprawy jest nie tylko aktualny ale trafia w najnowsze trendy w poszukiwaniu nowoczesnych terapii celowanych w onkologii przy zastosowaniu immunotoksyn, tym bardziej iż dotyczy jednego z najbardziej agresywnych i złośliwych nowotworów, jakim jest glejak wielopostaciowy.**

Rozprawa liczy 114 stron (bez bibliografii, która obejmuje 196 pozycji na 19 stronach) i ma klasyczny układ. Składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim, interesującego wstępu, wprowadzającego dobrze w temat, celu pracy określonego w 3 punktach, szczegółowego opisu materiałów i metod, obszernej sekcji wyników oraz wyczerpującej dyskusji i wnioskach, które są zawarte w 4 punktach oraz obszernej bibliografii. Rozprawa jest prawidłowo przygotowana jeśli chodzi o szatę graficzną, zawiera liczne ryciny oraz tabele. Krytyczna uwaga odnosząca się do strony językowej rozprawy, którą chciałbym podnieść, dotyczy sporej liczby błędów literowych, które w niektórych sytuacjach są nieznaczące (np. na str. 23: „*Bevacizumab. Bavacizumab...*”, str. 109: „*Odpowiednio modyfikowane egzotoksyny: egozotoksyna A*”) jednak w innych mają niezamierzony efekt (str.70. „*4.2. Bania na modelach in vitro*”, czy str. 101 „*linii przyrzutów do mózgu*”). Należy przypomnieć, że automatyczna korekta językowa nie

poprawi takich błędów, a wyłącznie staranne przeczytanie tekstu. Nieprawidłowo są stosowane niektóre skróty, np. TCLA-4, (powinno być CTLA-4, z ang. *Cytotoxic T-cell Antigen 4*). Razi także stosowany w niektórych sformułowaniach żargon, czy tzw. kalki językowe, jak np. „*metastazy nowotworów...*”, co jednak można usprawiedliwić niewielkim doświadczeniem Doktoranta w zakresie onkologii klinicznej i stosowanej w niej nomenklatury.

W wyczerpującym tematykę **wstępie** Doktorant w ciekawy sposób przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący biologii, genetyki oraz współczesnej terapii nowotworów mózgu, zarówno pierwotnych, takich jak glejaki jak i wtórnych czyli przerzutowych. O ile w zdecydowanej większości przedstawiony stan wiedzy jest aktualny to nie udało się uniknąć pewnych błędów merytorycznych, przykładowo na str. 22 jest stwierdzenie „*Metylacja promotora genu MGMT i jego wyciszenie, jest ważnym czynnikiem prognostycznym w kontekście terapii TMZ. Metylacja promotora genu MGMT występuje częściej we wznowach (75%) w stosunku do guzów pierwotnych (36%), warunkując wyższą oporność komórek GBM na działanie TMZ*” co nie odpowiada rzeczywistości, gdyż metylacja promotora MGMT jest pozytywnym czynnikiem predykcijnym jeśli chodzi o odpowiedź na temozolomid (nie warunkuje oporności ale wrażliwość na TMZ przynajmniej w ograniczonym zakresie).

Krytyczna uwaga dotyczy Tabeli 1 w której przedstawiono bardzo niewielką liczbę aktualnie stosowanych terapii celowanych w nowotworach człowieka. Brakuje w niej nie tylko wielu stosowanych już w klinice drobnocząsteczkowych inhibitorów np. ukierunkowanych na EGFR, BRAF, PIK3CA, IDH1/2, BTK, BCL-2, NTRK ale także licznych zaaprobowanych do terapii nowotworów człowieka przeciwciał monoklonalnych (np. anty-CD20, anty-CD38). Jest to poniekąd zrozumiałe, próba wymienienia większości takich terapii znacząco przekraczałaby ramy rozprawy doktorskiej; jednak Doktorant powinien zatytułować tabelę np. „*przykładowe*” lub „*wybrane*” leki celowane aby uniknąć wrażenia, iż tabela przedstawia stan wiedzy sprzed dwóch dekad.

**Celami** pracy było otrzymanie rekombinowanych białek fuzyjnych

‘następnie analiza ich

cytotoksycznego oddziaływania na komórki nowotworowe glejaka wielopostaciowego oraz przerzuty do mózgu nowotworów sutka, prostaty, płuc i czerniaka skóry w modelach komórkowych *in vitro*. Cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i

klarowny oraz zostały określone w taki sposób, aby były możliwe do osiągnięcia w zakresie dostępnej metodyki.

**Materiały i metody** są przedstawione w sposób rzetelny i wyczerpujący, procedura otrzymywania immunotoksyn jest opisana bardzo dokładnie. Dodatkowa uwaga dotyczy opisu analizy statystycznej, szeroki wachlarz zastosowanych testów daje przekonanie, że zostały wybrane właściwie, jednak powinno być w metodyce wyraźnie określone do jakich eksperymentów, jakie testy.

**Wyniki** obejmują ponad 20 złożonych rycin i tabel i stanowią dowód na bardzo duży nakład pracy włożony przez Doktoranta w przygotowanie rozprawy. Nie mam wątpliwości, że zastosowany panel testów cytotoksycznych oparty o zupełnie różne parametry życiowe komórek, pozwoliły uzyskać wiarygodne wyniki. Drobne zastrzeżenia budzą ryciny pokazujące barwienia komórek metodami fluorescencyjnymi, które mają charakter jakościowy (ryc. 33), a których jakość jest niewystarczająca.

**Dyskusja** oparta jest o uzyskane wyniki, Doktorant konfrontuje wyniki własne z danymi literaturowymi i wykazuje się właściwą znajomością dotychczas opublikowanych danych w zestawieniu z własnymi odkryciami. Co bardzo ważne w badaniach aplikacyjnych, Doktorant wykazał się dużą wiedzą odnośnie prób i badań również komercyjnych z zastosowaniem strategii celowania w IL-13R $\alpha$ 2 co uwiarygadnia podjętą strategię. Moja drobna krytyczna uwaga dotyczy tytułu pierwszego podrozdziału w dyskusji (5.1. *IL-13 jako marker w terapii antynowotworowej*), który to uważam za mylący. O ile trwają intensywne badania nad terapiami celowanymi w IL-13R $\alpha$ 2, włączając w to nie tylko immunotoksyny ale i próby kliniczne z CART, o czym wspominałem wcześniej to trudno uznać, że sama IL-13 jest stosowanym biomarkerem w chorobach nowotworowych człowieka. Na podstawie uzyskanych wyników zostały wyciągnięte cztery **wnioski**. O ile pierwsze trzy wnioski w mojej opinii nie budzą zastrzeżeń i zostały wyciągnięte prawidłowo (dotyczą możliwości wyprodukowania immunotoksyny oraz jej właściwości cytotoksycznych w stosunku do komórek glejaka) to jednak ostatni, czwarty postawiony wniosek budzi moje zastrzeżenia. Jest on sformułowany nieprecyzyjnie i sugeruje działanie cytotoksyczne immunotoksyn, które nie zostało wykazane w przedstawionej pracy. Zasadniczo, badania na modelu *in vitro* dotyczyły linii komórkowych wyprowadzonych z nowotworu pierwotnego lub przerzutowego. Nie mogę się zgodzić, iż wykazano takie działanie wobec nowotworu prostaty czy piersi. Mam jednak

nadzieję, iż w trakcie publicznej obrony Doktorant będzie miał możliwość szerszego przedyskutowania i uzasadnienia dla tego wniosku.

**Biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy, w podsumowaniu, praca mgr Radosława Borowskiego jest niezwykle interesująca i cenna w kontekście badania nowych celowanych immunoterapii na modelach in vitro nowotworów człowieka. Przeprowadzone badania mają dużą wartość poznawczą ale także konkretne przełożenie aplikacyjne i potencjał translacyjny a uzyskane wyniki stanowią oryginalny dorobek naukowy Doktoranta. Przedstawione przez mnie uwagi krytyczne nie wpływają znacząco na moją pozytywną ocenę rozprawy. Przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) w związku z czym chciałbym przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego wnioski o dopuszczenie Pana mgr inż. Radosława Borowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz pragnę wnioskować o wyróżnienie.**

KIEROWNIK  
Zakład Biologii i Genetyki Nowotworów  
prof. dr med. Tomasz Stokłosa

Tomasz Stokłosa