



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY



KATEDRA I KLINIKA NEUROLOGII

Warszawa, 18.11.2022

dr hab. n. med. Monika Nojszewska
Katedra i Klinika Neurologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej **mgr inż. Mateusza Cieśluka** zatytułowanej:
**„Charakterystyka właściwości mechanicznych nowotworów
ośrodkowego układu nerwowego”**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Robert Bucki
Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Pogoda

Rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnego zagadnienia w codziennej praktyce klinicznej, złośliwe nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) stanowią bowiem około 2% zachorowań na złośliwe nowotwory w Polsce, co daje ok. 3000 zachorowań rocznie. Dane statystyczne wskazują, iż są one główną przyczyną zgonów z powodu guzów litych u dzieci i trzecią co do częstości przyczyną zgonów z powodu nowotworów u młodzieży i dorosłych w wieku od 15 do 34 lat. Glejaki stanowią około 80% wszystkich nowotworów powstających w OUN, a częstość ich występowania na świecie oceniana jest na ok. 7 na 100 000 osób. Najczęstszy spośród nich glejak zarodkowy odznacza się największą agresywnością i inwazyjnością wzrostu, a co za tym idzie wysoką śmiertelnością (stopień IV wg WHO). Ze względu na naciekowy wzrost, skłonność do nawrotów i ograniczoną wrażliwość na standardowe leczenie stanowi on wciąż duże wyzwanie w neuroonkologii. Pomimo postępów w diagnostyce i terapii, rokowanie w przypadku tych nowotworów jest nadal złe, a mediana czasu przeżycia wynosi od 7 do 18 miesięcy. Dotychczas w ich leczeniu proponowano stosowanie wielu chemioterapeutyków, jednak ich wpływ na przeżycie był ograniczony i niejednoznaczny. Obecnie pewne nadzieje

wiąże się z zastosowaniem temozolomidu (TMZ) lub humanizowanego przeciwciała monoklonalnego bevacizumabu. Podejmowane są także próby leczenia skojarzonego, ale wiążą się również z wyższą toksycznością. Z tego też względu, poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych dla leczenia nowotworów OUN jest niezwykle istotne. Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że właściwości mechaniczne środowiska zewnątrzkomórkowego w OUN mogą być istotne nie tylko w rozwoju nowotworów w jego obrębie, ale także mogą wpływać na efektywność stosowanych leków przeciwnowotworowych. Tymi właśnie zagadnieniami w swojej pracy doktorskiej zajął się mgr inż. Mateusz Cieśluk. Uważam, że temat podjęty przez Doktoranta jest niezmiernie ważny, a wyniki badań mogą przyczynić się do poszerzenia naszej wiedzy na temat rozwoju i możliwości leczenia złośliwych guzów OUN.

Przedstawiona mi do recenzji praca mgr inż. Mateusza Cieśluka dotyczy – jak wprost wynika z tytułu – charakterystyki właściwości mechanicznych nowotworów OUN. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie cyklu trzech artykułów (jednego przeglądowego i dwóch prac oryginalnych) opublikowanych w języku angielskim w recenzowanych czasopismach naukowych o wysokim IF oraz punktacji MEiN. Łączna punktacja rozprawy wynosi 380 punktów MEiN, wartość IF 16.366.

Poniżej przedstawiono wykaz w/w prac:

1. Mateusz Cieśluk, Katarzyna Pogoda, Ewelina Piktel, Urszula Wnorowska, Piotr Deptuła, Robert Bucki: *Mechanical Properties of the Extracellular Environment of Human Brain Cells Drive the Effectiveness of Drugs in Fighting Central Nervous System Cancers*. Brain Sciences, 2022, 12, 927. doi: 10.3390/brainsci12070927 **IF = 3.394**, **MEiN = 100** (praca przeglądowa)
2. Mateusz Cieśluk, Katarzyna Pogoda, Piotr Deptuła, Paulina Werel, Alina Kułakowska, Jan Kochanowicz, Zenon Mariak, Tomasz Łysoń, Joanna Reszeć, Robert Bucki. *Nanomechanics and Histopathology as Diagnostic Tools to Characterize Freshly Removed Human Brain Tumors*. International Journal of Nanomedicine, 2020. 15, s. 7509-7521. doi: 10.2147/IJN.S270147 **IF = 6.400**, **MEiN = 140** (praca oryginalna)
3. Mateusz Cieśluk, Ewelina Piktel, Urszula Wnorowska, Karol Skłodowski, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, Robert Bucki, Katarzyna Pogoda. *Substrate viscosity impairs temozolomide-mediated inhibition of glioblastoma cells' growth*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease,

Rozprawa liczy 114 stron i ma typowy układ dla prac doktorskich w formie cyklu publikacji. Zaczyna się od strony tytułowej, następnie znajdują się źródła finansowania pracy (projekty Narodowego Centrum Nauki oraz program stypendialny Naukowej Fundacji Polpharmy), podziękowania i dedykacje, spis treści, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, omówienie prac składających się na rozprawę doktorską (cel, materiały i metody, wyniki, dyskusja oraz wnioski), kopie opublikowanych prac, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia oraz oświadczenia wszystkich współautorów publikacji określające ich udział w powstawaniu prac i zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. W pracy cytowanych jest 80 pozycji piśmiennictwa, ale należy podkreślić, że piśmiennictwo znajduje się także na końcu każdej z prac składających się na cykl, co dodatkowo istotnie wydłuża jego listę. Udział Doktoranta w pracach wyniósł odpowiednio: 70% (praca przeglądowa) oraz 60% i 63% (prace oryginalne). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że powstanie tych prac było możliwe dzięki - tak ważnej w neuroonkologii - współpracy przedstawicieli wielu dyscyplin zaangażowanych w opiekę nad pacjentami z guzami OUN od neurologów i neurochirurgów po patomorfologów i specjalistów reprezentujących nauki podstawowe (specjalistów inżynierii biomedycznej czy fizyki doświadczalnej). Połączenie sił i ścisła współpraca tych specjalistów pozwoliły na powstanie przedłożonej mi do recenzji pracy, która wpisuje się w istotne z punktu widzenia klinicznego kierunki badań.

We wstępie do rozprawy doktorskiej Autor w bardzo przystępny dla czytelnika sposób przedstawia skład i znaczenie biologiczne macierzy zewnątrzkomórkowej mózgu, znaczenie ilościowej charakterystyki właściwości mechanicznych tkanek w patogenezie chorób, a także analizy ich potencjalnych zmian w korelacji z postępem choroby. Zwraca szczególną uwagę na fakt, że we wczesnych stadiach rozwoju choroby, w tym rozwoju nowotworu, zmiany sztywności komórek/tkanek mogą poprzedzać wykrywalne zmiany histologiczne. Dzięki tym obserwacjom zmiany mechaniki tkanek potencjalnie mogą służyć jako nowe mechanomarkery do celów diagnostycznych. Podkreśla także, iż w szeregu prac dowiedziono, że właściwości nanomechaniczne tkanki i środowiska zewnątrzkomórkowego istotnie wpływają na potencjał przerzutowy nowotworów np. piersi, trzustki, wątroby, jelita grubego czy szyjki macicy, gdyż zwiększone naprężenia ściskające mogą zmniejszać przepływ krwi w tkankach poprzez ucisk na naczynia krwionośne i dzięki temu modyfikować progresję guza i zmniejszać skuteczność

chemio- i nanoterapii. We wstępie poruszony został także problem wykorzystywanych do prowadzenia badań nad mechaniką komórek i tkanek metod, ze zwróceniem uwagi na ich wady i zalety. Zagadnienia te zostały szczegółowo zaprezentowane w pracy przeglądowej, której Doktorant jest pierwszym autorem (publikacja numer 1). Można w niej znaleźć także szerokie omówienie dostępnej wiedzy na temat wpływu właściwości mechanicznych tkanki nerwowej na skuteczność stosowanego leczenia przeciwnowotworowego, co potwierdza także obszerna bibliografia (230 pozycji). Wstęp i publikacja numer 1 (praca przeglądowa) stanowią więc spójną pierwszą część rozprawy doktorskiej, właściwie uzasadniając podjęcie problemu badawczego w przedstawionej mi do recenzji pracy.

Według Doktoranta całokształt opisanych we wstępie doniesień wskazuje na istotne znaczenie optymalnych właściwości mechanicznych tkanki dla jej prawidłowego funkcjonowania oraz potwierdza tezę, iż analiza parametrów mechanicznych tkanek powinna stanowić stały element badań nad patofizjologią nowotworów oraz rozwojem nowych leków wykorzystywanych w terapii. Doprowadziło to do sformułowania dwóch celów badawczych rozwiniętych w pracy Doktoranta, którymi były:

1. ocena własności mechanicznych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego o różnym pochodzeniu oraz różnym stopniu złośliwości
2. ocena możliwości wykorzystania mikroskopii sił atomowych w procesie diagnostyki nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

Dodatkowo z wykorzystaniem modelu komórkowego z wykorzystaniem linii komórkowych glejaka: LN-18 oraz LN-229 oceniono wpływ parametrów sztywności i lepkości środowiska zewnątrzkomórkowego na efektywność przeciwnowotworową temozolomidu.

Warto tutaj zaznaczyć, że cele pracy zostały określone bardzo ogólnie, a ich uszczegółowienie pomogłoby w zrozumieniu istoty podjętego projektu badawczego i doprowadziło do sformułowania – na podstawie uzyskanych wyników - bardziej przejrzystych wniosków. Ponadto ocena wpływu właściwości środowiska zewnątrzkomórkowego na efektywność przeciwnowotworową leków nie stanowi wprost sformułowanego celu pracy.

W pierwszej pracy oryginalnej (publikacja numer 2) badania właściwości mechanicznych nowotworów OUN przeprowadzono na czternastu próbkach guzów mózgu, pobranych od jedenastu pacjentów podczas zabiegów neurochirurgicznych. Analiza mechaniczna tkanek została przeprowadzona z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM), natomiast ocenę histopatologiczną wykonano przy użyciu barwienia hematoksyliną i eozyną. W toku badań zaobserwowano istotne statystycznie zmiany w sztywności tkanek nowotworowych w

porównaniu do istoty białej oraz szarej, a sztywność badanych tkanek wzrastała wraz z określonym histopatologicznie stopniem złośliwości nowotworu. Wykazano ponadto, iż usztywnienie kompresyjne charakteryzuje wszystkie badane nowotwory pierwotne OUN. Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantowi na wnioskowanie, że AFM może być wykorzystywana jako metoda komplementarna do oceny histopatologicznej tkanek.

W kolejnej pracy (publikacja numer 3) w modelu glejaka *in vitro* przeprowadzono, wykorzystując mikroskopię optyczną oraz cytometrię przepływową, badania oceniające wrażliwość komórek hodowanych na matrycach lepkosprężystych na dodany cytostatyk. W doświadczeniach z wykorzystaniem linii komórkowych potwierdzono, iż zwiększona lepkość środowiska zewnątrzkomórkowego znacząco obniża wrażliwość komórek linii glejaka LN-18 oraz LN-229 na obecność temozolomidu. W przeprowadzonym badaniu Doktorant wykazał, że komórki hodowane na podłożach o zwiększonej lepkości wykazują wyższą zdolność do proliferacji pomimo obecności terapeutycznych dawek temozolomidu, a także są mniej wrażliwe na jego przeciwnowotworowe działanie.

Kolejną częścią pracy jest „Dyskusja”, w której Doktorant konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi pochodzącymi z piśmiennictwa. Omówienie uzyskanych wyników w kontekście opublikowanych dotychczas prac świadczy o dobrej znajomości tematu przez Autora i dobrym posługiwaniu się literaturą. W tej części pracy Doktorant obiektywnie ocenia wybraną do przeprowadzenia badań metodologię omawiając nie tylko jej zalety, ale i wady. Zwraca uwagę na fakt, że w hodowli komórek 2-D na sztywnościach fizjologicznych komórki adaptują się do właściwości mechanicznych swojego podłoża, ale mechanizm regulacji sztywności w obrębie trójwymiarowej struktury tkanki jest najprawdopodobniej bardziej złożony i wymaga dalszych badań. Zauważa jednak, że może to być jeden z powodów, dla których zaobserwował różne wartości modułu Younga w pomiarach tkanek w porównaniu do pomiarów wykonanych dla pojedynczych komórek w hodowli 2-D. Zwraca także uwagę na ważne ograniczenia pracy związane z małą liczebnością badanych grup, co z jednej strony powoduje konieczność zachowania ostrożności przed uogólnianiem wniosków, z drugiej zaś wskazuje na ważkość kontynuacji badań na większych grupach pacjentów, by zweryfikować uzyskane wyniki i wyjaśnić zmiany właściwości mechanicznych guzów OUN oraz ich wpływ na efektywność terapeutyczną leków przeciwnowotworowych.

Wyniki badań przedstawione w powyższym cyklu publikacji stały się podstawą do sformułowania przez Doktoranta wniosków będących realizacją przyjętych celów pracy:

1. Właściwości mechaniczne nowotworów OUN są znacząco różne niż te, obserwowane dla tkanki zdrowej czy też tkanki pochodzącej z marginesu zmiany, co ma prawdopodobnie istotny wpływ nie tylko na progresję nowotworu, ale również efektywność terapeutyczną stosowanych leków przeciwnowotworowych.
2. Sztywność tkanek nowotworów OUN wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu.
3. Usztywnienie ze wzrostem kompresji tkanki charakteryzowało wszystkie badane nowotwory pierwotne OUN.
4. Ocena właściwości mechanicznych tkanek zmienionych chorobowo w obrębie OUN z wykorzystaniem AFM w połączeniu z oceną histopatologiczną stwarza nowe możliwości charakterystyki nowotworu w nano- i mikroskali.

Liczba wniosków różni się co prawda od liczby sformułowanych celów, co może wynikać z wspomnianej już wcześniej zbyt dużej ogólności tych drugich, niemniej jednak wnioski odpowiadają celom pracy, a sformułowanie 2 dodatkowych wniosków służy doprecyzowaniu rodzaju stwierdzonych zmian we właściwościach mechanicznych nowotworów OUN. Zwraca ponadto uwagę uwzględnienie w pierwszym wniosku wpływu właściwości mechanicznych nowotworów OUN na efektywność terapeutyczną stosowanych leków przeciwnowotworowych, co nie wynika bezpośrednio z postawionych celów, ale znacząco poszerza uzyskane wyniki.

Praca jest napisana starannie i przejrzysto, zrozumiałym językiem, dobrze opracowana pod względem edytorskim. Czyta się ją dobrze, choć zdarzają się drobne błędy gramatyczne oraz redakcyjne, pojedyncze niezręczności językowe czy powtórzenia.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne nie pomniejszają w żadnej sposób ogólnej wartości pracy.

Podsumowując, Doktorant zaplanował i przeprowadził badania w sposób poprawny pod względem metodologicznym, wykazał się gruntowną wiedzą dotyczącą tematu prowadzonych badań, pozwalającą na przeprowadzenie poprawnej i konstruktywnej dyskusji. Przedłożona praca spełnia wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu, określone w art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r., poz. 1789) oraz w art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn.zm.), dlatego mam zaszczyt przedstawić Senatowi Uniwersytetu

Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie doktoranta mgr inż. Mateusza Cieśluka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie z wielką przyjemnością wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Wniosek o wyróżnienie motywuję wysoką jakością i nowatorstwem prowadzonych badań nad właściwościami mechanicznymi guzów OUN, ważkością uzyskanych wyników dla dalszych badań zarówno nad patogenezą pierwotnych nowotworów OUN jak również efektywnością terapeutyczną leków przeciwnowotworowych oraz publikacją wyników w prestiżowych czasopismach z Listy Filadelfijskiej.

18/11/2022

M. Nojszewska

dr hab. n. med.
Monika Nojszewska
specjalista neurolog
1652664