



Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/16737/2023 P
Data: 2023-09-25

KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII

80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

tel. 0 58 349 14 37

fax 0 58 349 14 19

e-mail: histolog@gumed.edu.pl

Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 15
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	26-09-2023
L. dz. RN-BM/	1671

Gdańsk, 10.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Kamila Cybulskiego

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej lek. **Kamila Cybulskiego** jest: „Ekspresja iryzyny w rakach gruczołu piersiowego”.

Promotorką pracy jest **Pani prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów**, Zakład Badań Ultrastrukturalnych, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Promotorem pomocniczym jest **Pani dr Katarzyna Nowińska**, Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Rak gruczołu piersiowego stanowią poważny problem zarówno medyczny, jak i społeczny. Szacuje się, że co najmniej 2 miliony kobiet zapada rocznie na ten nowotwór; zarazem stanowi on najczęstszą przyczynę zgonów w tej grupie. Pomimo, znaczenie postępu w diagnostyce i terapii, lepszemu poznaniu mechanizmów powstawania oraz progresji raka gruczołu piersiowego, to nadal niezbędne jest poszukiwanie nowych markerów wczesnego wykrywania oraz nowych celów terapeutycznych.

Iryzyna jest hormonem peptydowym powstającym z białka FNDC5 (Fibronectin type III domain-containing protein 5), który pełni istotną rolę w regulacji procesów bioenergetycznych poprzez aktywację syntezy termogeniny (*UCP1*). Wydaje się, to być element niezbędny do przemiana tkanki tłuszczowej żółtej, w brunatną. Natomiast w ekspresję FNDC5 zaangażowany jest białko PGC-1 α . Syntezę iryzyny wykazano nie tylko w tkance mięśniowej, gdzie powstaje, na przykład, w wyniku wysiłku fizycznego, ale również w szeregu innych komórek i tkanek, w tym w komórkach nowotworowych. Niestety, dane na temat roli iryzyny w procesie nowotworzenia, czy progresji nowotworów są dość nieliczne i często sprzeczne. Wydaje się, że z uwagi na wpływ na mitochondria, iryzyna może uczestniczyć w przejściu komórek nowotworowych z fosforylacji oksydacyjnej na glikolizę. Istnieją również pewne sugestie, że iryzyna może mieć wpływ na transformację nabłonkowo-mezenchymalną (EMT). Nie wiele również wiadomo o znaczeniu iryzyny w patogenezie raka gruczołu piersiowego. Przedstawiony argumenty wskazują więc wyraźnie na konieczność dalszych badań.

Rozprawa doktorska **lek. Kamila Cybulskiego** jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół **Prof. dr hab. Marzena Podhorska-Okołów** nad iryzyną, jako potencjalnym markerem prognostycznym w rozwoju różnych nowotworów (np. płaskonabłonkowym krtani czy płuc). Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana zastała w formie manuskryptu (Na podstawie, Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.)). Praca zawiera, **66 stron, w tym, przedruki dwóch publikacji pełnotekstowych**, które są podstawą przedstawionej do oceny rozprawy. Manuskrypt zawiera również oświadczenia współautorów ww. prac dotyczące ich udziału w prezentowanych badaniach. Warto dodać, że badania zostały sfinansowane w ramach projektu Regionalnej Inicjatywy Doskonałości (nr. Granu RID.Z501.19.015). Manuskrypt opiera się na dwóch pracach:

Praca 1. Cebulski K, Nowińska K, Jabłońska K, Romanowicz H, Smolarz B, Dzięgiel P, Podhorska-Okołów M. Expression of Irisin/FNDC5 in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 24;23(7):3530.

Praca 2. Cebulski K, Piotrowska A, Kmiecik A, Haczekiewicz-Leśniak K, Ciesielska U, Grzegorzółka J, Jabłońska K, Romanowicz H, Smolarz B, Dzięgiel P, Podhorska-Okołów M, Nowińska K. The Role of Irisin/FNDC5 Expression and Its Serum Level in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 May 11;24(10):8628.

W obu pracach **lek. Kamil Cybulski jest pierwszym autorem**. Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami współautorów, lek Kamil Cybulski opracował koncepcję obu prac, wykonał również ocenę immunohistochemiczną (IHC) materiału badanego; był współwykonawcą badań molekularnych, w tym oznaczeń RT-PCR; dokonał analizy statystycznych wyników (Praca 2); przygotował manuskrypty oraz dokonał ich korekty zgodnie z zaleceniami recenzentów.

Wydaje się, więc, że udział lekarza Kamila Cybulskiego w wykonaniu części doświadczalnej oraz przygotowaniu publikacji będących podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był znaczący.

b) opis uzyskanych wyników

Rozprawa doktorska Pana lek. Kamila Cybulskiego składa się z dwóch publikacji, w których wykorzystano materiał archiwalny Zakładu Histologii i Embriologii, Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Do badań wykorzystano, 541 bloczków parafinowych z fragmentami guzów raka gruczołu piersiowego oraz 61 mastopatii, jako materiał kontrolny). Zdecydowana większość próbek 521 z 541, pochodzą z raka przewodowego inwazyjnego (IDC), a więc precyzyjne określenie zależności ekspresji iryzyny od podtypu nie było możliwe.

Pierwsza praca dotyczący oceny ekspresji genu FNDC5 (RT-PCR) oraz poziomu iryzyny (metodą immunocytochemiczna – IHC) w tkankach pobranych od pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego. Następnie, wykonano korelację między poziomem iryzyny, a parametrami kliniczno-patologicznymi, w tym stopniem złośliwości histologicznej, stadium zaawansowania, skalą TNM oraz przeżyciem pacjentów. Dodatkowo, zbadano związek ekspresji mRNA FNDC5 oraz poziomu iryzyny z występowaniem markera proliferacji Ki-67 oraz biogenezy mitochondriów PGC-1 α . Wykazano, że poziom immunoreaktywności charakterystycznej dla iryzyny oraz mRNA FNDC5, był znamienne wyższy w tkankach rakowych w porównaniu do mastopatii. Z drugiej strony poziom iryzyny (białko i mRNA), był niższy u pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych, w porównaniu do grupy

bez przerzutów. Natomiast pomimo zaobserwowanej tendencji, nie wykazano znamiennej różnicy w poziomie iryzyny w zależności od wielkości guza (10 mm vs 20 mm). Wykazano natomiast spadek poziomu tego markera wraz ze wzrostem zaawansowania choroby nowotworowej (stadium I vs II). Co istotne, pacjentki z wyższym poziomem iryzyny charakteryzowały się dłuższą przeżywalnością. Wykazano również, pozytywną korelację między poziomem iryzyny a poziomem Ki-67 oraz PGC-1 α . Co ciekawe, niezmienną patologiczną tkankę pobraną z okolicy guza, wykazywała wyższy poziom mRNA dla FNDC5, niż tkanka nowotworowa, czy tkanka kontrolna z mastopatii. Szkoda, że podobnego oznaczenia nie wykonano oznaczeń iryzyny przy wykorzystaniu techniki IHC dla marginesu badanych zmian nowotworowych. Wydaje się, że w przypadku raka gruczołu piersiowego ciekawe byłoby również zbadanie ekspresji iryzyny, w zależności od ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz obecności amplifikacji genu HER2, które to markery stanowią bardzo istotny element w diagnostyce tego groźnego nowotworu.

W drugiej pracy cyklu, zbadano poziom immunoreaktywności charakterystycznej dla białek związanych z EMT, w tym: E-kadheryny, N-kadheryny, SNAIL, SLUG oraz TWIST; oraz zbadano potencjalną korelację tych markerów z poziomem iryzyny. Wykazano, umiarkowaną korelację między poziomem iryzyny, a E-kadheryny; cytoplazmatycznej i jądrowej lokalizacji SNAIL oraz TWIST; ale nie N-kadheryny. Jedynie słabą pozytywną korelację zaobserwowano w przypadku formy cytoplazmatycznej i jądrowej białka SLUG. Chociaż streszczenie rozprawy o tym nie wspomina, to w **Pracy 2** zbadano również poziom iryzyny w surowicy i porównano do rezultatów uzyskanych przy pomocy techniki IHC. Brak korelacji wskazuje, na to, że iryzyna produkowana przez komórki nowotworowe nie trafia do krwiobiegu, ale może być wydzielana na zewnątrz, o czym zresztą świadczą wyniki w **Pracy 1** (Fig. 2). Dodatkowo, w pracy tej porównano ekspresję genu FNDC5 (RT-PCR) oraz poziomu iryzyny (metodą immunofluorescencyjną – IF) w komórkach trzech linii raka gruczołu piersiowego (MCF-7, MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468), w porównaniu do linii kontrolnej (Mel6c). Wykazano, zarówno różnicę w poziomie mRNA dla genu FNDC5, jak i poziomie iryzyny między komórkami rakowymi oraz kontrolnym. Dodatkowo, wykazano również istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi liniami raka piersi. Niestety, w opisie zabrakło informacji, czym pod względem patologicznym różnią się badane linie raka gruczołu piersiowego i czy wykazane różnice w poziomie iryzyny mają jakieś znaczenie prognostyczne. Co ciekawe, w **Pracy 2**, znajdują się również bardzo ciekawe wyniki sublokalizacji komórkowej irydyny w komórkach nowotworowych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej. Niestety, wyniki te zostały pominięte w treści ocenianej rozprawy doktorskiej.

Warto podkreślić, że są to pierwsze badania ekspresji irydyny na tak dużym materiale klinicznym (541 preparatów). Lek. Kamil Cybulski sformułował cztery zasadnicze wnioski z pracy, które można podsumować w sposób następujący: Poziom irydyny w raku gruczołu piersiowego może być dodatkowym markerem diagnostycznymi (zmiany łagodne vs rak) oraz prognostycznym (stadium zaawansowania czy EMT). Jak sam autor zauważa, rola iryzyny w patogenezie i progresji raka gruczołu piersiowego wymaga dalszych badań. Zastanawiam się, jakiego typu badania autor ma na myśli.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, chociaż wydaje się, że niektóre fragmenty są zbyt dosłownym tłumaczeniem z języka angielskiego. Z uwagi na rolę recenzenta zwrócę uwagę tylko na sformułowanie "dodatnia średnia korelacja" na przykład strona 13. Chodziło raczej „umiarkowaną dodatnią korelację”. Drugi zauważalny efektem bezpośredniego tłumaczenia jest nazewnictwo tkanki tłuszczowej. W pracy dwa główne typy tkanki tłuszczowej, określne są jak: biała i brązowa, podczas gdy w polskiej literaturze histologicznej, raczej mówi się o żółtej i brunatnej (Histologia, Sawicki 2012). Szkoda, że manuskrypt jest bardzo skrótowy i pomija niektóre ważne wyniki badań, a z drugiej strony zawiera wiele powtarzających się informacji (np. ogólny opis raka gruczołu piersiowego). Praca nie zawiera rysunków ani tabel, które podsumowywałyby uzyskane wyniki. Oczywiście, publikacje będące integralną częścią rozprawy zawierają wszystkie odpowiednie rysunki i tabele, które pozwalają na dokładne zapoznanie się z całością uzyskanych wyników.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury

Sam treść rozprawy doktorskiej **Pana lek. Kamila Cybulskiego** zawiera, **tylko 23 pozycje literaturowe**, które umieszczone są po wstępie. Są to prace głównie z ostatnich 5 lat. Natomiast uwzględnione publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej posiadają odpowiednią liczbę dobrze dobranych cytacji (odpowiednio: 38 - Praca 1, 42 - Praca 2).

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Rozprawa doktorska lek. Kamila Cybulskiego, posiad prosty i dobrze sformułowanej cel badawczy, którym było określenie poziomu ekspresji iryzyny w raku gruczołu piersiowego. Dodatkowo, każda z prac z cyklu, ma wyodrębnione cele szczegółowe:

Praca 1: lokalizacja oraz poziom immunoreaktywności iryzyny oraz jej związek z parametrami kliniczno-patologicznymi.

Praca 2. Związek iryzyny z markerami EMT i dodatkowo zbadanie poziomu iryzyny w liniach komórkowych przy zastosowaniu metod IF, RT-PCR, mikroskopii elektronowej (immunogold).

Co nieco dziwne, cel przedstawiony dla Pracy 2, zawiera elementy nieomawiane w samej rozprawie (np. mikroskopia elektronowa), z drugiej strony pomija badania poziomu iryzyny w surowicy.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

W przedstawionych badania lek. **Kamila Cybulskiego** wykorzystwała dwa główne modele badawcze: **badania mikromacierzy tkankowych metodami IHC**, oraz badania na **ludzkich komórki raka gruczołu sutkowego**. Zastosowano w badaniach szereg klasycznych technik histologicznych, w tym IHC, IF, mikroskopię elektronową, oraz badania poziomu mRNA (RT-PCR), natomiast technikę ELISA wykorzystano do określenia poziomu irydyiny w surowicy pacjentek. Bardzo ważne w tego typu pracach jest ocena statystyczna uzyskanych wyników, która została wykonana prawidłowo, przy wykorzystaniu odpowiednich narzędzi statystycznych.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca jest bardzo krótka i ograniczona jest do 20 stron po wyłączeniu przedruków dwóch publikacji oraz dodatku stanowiącego oświadczenia współautorów. Układ pracy też jest dość szczególny, gdyż rozprawa zawiera jedynie spis treści, skróty wstęp, założenia i cele pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, przedruk publikacji oraz podsumowanie i wnioski. Na końcu znajdują się oświadczenia współautorów. Rozdział „streszczenie”, zawiera niestety niepełny opis wyników (brakuje między innymi omówienia wyników pomiarów poziomu iryzyny w surowicy oraz mikroskopii elektronowej). Wydaje się, że samo streszczenie powinno się znajdować na początku lub na końcu pracy, natomiast umieszczony w rozprawie rozdział „streszczenie”, to raczej tylko „streszczenie wyników”. Rozdział podsumowanie niewiele wnosi do pracy i jest wersją skróconą streszczenia. W pracy brakuje dyskusji i omówienia wyników w świetle najnowszej literatury.

Przedstawione uwagi, mają raczej charakter edytorski, gdyż główną częścią rozprawy stanowią dwie publikacje, które zawierają wszystkie elementy niezbędne do oceny przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego; w tym wyniki, metody oraz dyskusję, których trochę brakuje w samej treści rozprawy.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska lek. Kamila Cybulskiego oparta jest na dwóch publikacjach, które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Cenny wnioskiem z badań jest obserwacja, że poziom irydyny w raku gruczołu piersiowego może być dodatkowym markerem diagnostycznymi (zmiany łagodne vs rak) oraz prognostycznym (stadium zaawansowania, czy EMT).

Przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pana lek. Kamila Cybulskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, dnia 10.09.2023

Prof. dr hab. Michał Żmijewski