

Agnieszka Ziółkowska, dr hab., prof. UZ
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum Uniwersytetu Zielonogórskiego
65-046 Zielona Góra, ul. Zyty 28
tel.0048 68 328 3105
a.ziolkowska@cm.uz.zgora.pl

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ LEK. AGNIESZKI PINKOWSKIEJ
pt. „ROLA IRYZYNY W RAKACH PŁASKONABŁONKOWYCH KRTANI”
PROMOTOR PRACY: PROF. DR HAB. MARZENNA PODHORSKA-OKOŁÓW
PROMOTOR POMOCNICZY: DR KATARZYNA NOWIŃSKA

Zielona Góra, dnia 16.10.2023 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Lek. Agnieszki Pinkowskiej opiera się na cyklu publikacji, uzupełnionej autoreferatem, oświadczeniami współautorów oraz opinią Komisji Bioetycznej. Praca powstała w Zakładzie Anatomii Katedry Morfologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Doktorantka jest pracownikiem dydaktycznym w Zakładzie Anatomii Katedry Morfologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Jest także lekarzem specjalistą w zakresie medycyny rodzinnej. Wcześniejsza aktywność naukowa Doktorantki zaowocowała współautorstwem dziewięciu publikacji, dziesięciu rozdziałów w monografiach oraz czterech wystąpien na konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych. Łączny dorobek Doktorantki, wraz z publikacjami wchodzącymi w skład cyklu ma wartość wyrażoną współczynnikiem IF: 13,730 oraz 387 punktami MEiN. Głównym obszarem zainteresowań badawczych Doktorantki, mających wyraz w publikacjach, jest aplikacja danych literaturowych dotyczących różnych problemów klinicznych w praktyce lekarskiej. Temat pracy doktorskiej podjętej przez Autorkę wpisuje się w Jej dotychczasowe zainteresowania badawcze i dotyczy ważnego klinicznie i społecznie tematu patogenezy nowotworów oraz poszukiwań markerów nowotworowych znajdujących zastosowanie w diagnostyce oraz rokowaniu w przebiegu choroby nowotworowej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska opiera się na cyklu publikacji, spójnych tematycznie o łącznym wskaźniku IF: 13.730 oraz MEiN: 240:

Agnieszka Pinkowska, Marzena Podhorska-Okolow, Piotr Dziegiel, Katarzyna Nowinska: „The Role of Irisin in Cancer Disease”, *Cells*, 2021, 10, 1479, doi: 10.3390/cells10061479

Agnieszka Pinkowska Katarzyna Nowinska, Urszula Ciesielska, Marzena Podhorska-Okolow:

„Irisin Association with Ki-67, MCM3 and MT-I/II in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx”, *Biomolecules*, 2022, 12, 52, doi.org/10.3390/biom12010052

Obie prace cyklu zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokim wskaźniku IF, a przed publikacją przeszły weryfikację recenzentów.

W pierwszej publikacji, Doktorantka podejmuje temat adipomiokiny o nazwie Irisin, której ekspresja wiązana była pierwotnie z reakcją włókien mięśniowych na wysiłek fizyczny. Jak się jednak później okazało, adipomiokina ta wykazuje ekspresję w innych zdrowych tkankach i narządach, jest także obecna w osoczu. Irisin jest zaangażowana w regulację procesów metabolicznych, wpływa na zmianę fenotypu białej tkanki tłuszczowej w brunatną tkankę tłuszczową. Zwiększa biogenezę mitochondrialną i wpływa na ekspresję termogeniny. Co ciekawe, ekspresję Irisin wykazano także w wielu tkankach nowotworowych i w surowicy pacjentów z rozpoznaniem nowotworem złośliwym, m. in. piersi, płuc, przewodu pokarmowego, układu rozrodczego i kości. W publikacji Doktorantka, wraz z Zespołem, skupia się na przeglądzie danych literaturowych dotyczących ekspresji i potencjalnej roli Irisin w patogenezie nowotworów. Do najciekawszych obserwacji należy stwierdzenie, że Irisin hamuje *in vitro* proliferację, migrację komórek oraz inwazję nowotworu poprzez inhibicję przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Irisin wpływa na ekspresję czynnika transkrypcyjnego Snail, który jest zaangażowany w EMT i hamuje transkrypcję genu kodującego E-kadherynę, co jest charakterystyczne dla komórek pochodzenia nabłonkowego. W przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) obecność ekspresji Irisin zaobserwowano nie tylko w komórkach rakowych, ale także w fibroblastach związanych z rakiem (CAFs). Podwyższony poziom ekspresji Irisin w CAFs wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów i proliferacją komórek NSCLC. Co więcej, CAFs uczestniczą w karcynogenezie, stymulując nowotworową angiogenezę i przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT). Z kolei inne badania wykazały, że Irisin może być zaangażowana w ograniczanie ekspansji nowotworowej. Wykazano, że Irisin hamuje EMT, blokując sygnalizację PI3K/Akt/Snail, wpływając na inhibicję migracji i inwazji komórek raka płuc w modelu *in vitro*. Ponadto wiele badań na modelu *in vitro* wykazało, że Irisin również hamuje proliferację komórek, na przykład w raku piersi, płuc, kości, prostaty i trzustki. Wyniki te są sprzeczne z badaniami, które pokazały, że Irisin nie wpływała na proliferację, adhezję czy tworzenie klasterów komórek nowotworowych w jelita grubego, endometrium, tarczycy czy przełyku. Doktorantka poddaje krytycznej naukowej ocenie fakt występowania niejednoznacznych a czasem sprzecznych wyników badań w materiale pochodzącym z nowotworów rozwijających się w różnych narządach. Tłumaczy je specyfiką nowotworów, zróżnicowanym stadium choroby, zróżnicowaną metodyką badań oraz występowaniem różnych izoform Irisin. Ponadto, wskazuje, iż zaobserwowane różnice poziomu Irisin w surowicy krwi mogą wynikać z wydzielania tej adipomiokiny przez różne tkanki, w związku z czym jej poziom jest wynikiem jednocześnie ekspresji systemowej oraz lokalnej - w komórkach nowotworowych oraz komórkach

podścieliska nowotworu. Doktorantka podejmuje w pracy także temat struktury i występowania receptora dla Irisin oraz prób zastosowania w terapii nowotworów i podkreśla, iż podjęta w pracy tematyka wymaga kolejnych pogłębionych badań.

Druga praca cyklu ma charakter eksperymentalny, w której celem było zbadanie ekspresji Irisin w raku płaskonabłonkowym krtani (LSCC) oraz prześledzenie korelacji 1) ze zdefiniowanymi markerami proliferacji, tj. Ki-67 i MCM3,5,7 i białkami MT-I/II oraz 2) z charakterystyką kliniczną i patomorfologiczną zmiany nowotworowej. Badania zostały przeprowadzone na materiale archiwalnym pochodzącym od 140 pacjentów z rozpoznaniem LSCC, 57 pacjentów z rozpoznaniem brodawczaków krtani (BL) oraz 14 pacjentów z łagodnymi zmianami przerostowymi nabłonka krtani. Pacjenci ostatniej z wymienionych grup stanowili grupę kontrolną. W materiale pochodzącego od pacjentów wykonano mikromacierze tkankowe, które poddano immunohistochemii. Zakres badań został poszerzony także o eksperymenty z użyciem hodowli komórkowej linii nowotworowej HEP-2 oraz linii prawidłowych keratynocytów HaCat - w tych doświadczeniach wykorzystano Western blot i immunofluorescencję. Poziomy ekspresji Irisin na poziomie białka były znacznie wyższe w próbkach pochodzących od pacjentów z rozpoznaniem raku płaskonabłonkowym krtani w porównaniu do pacjentów z rozpoznaniem brodawczaków krtani ($p < 0,0001$) i pacjentów z grupy kontrolnej ($p = 0,001$). Badania wykazały także umiarkowaną i słabą dodatnią korelację między ekspresją Irisin a Ki-67, MCM3 i MT-I/II w tkankach pacjentów z LSCC. Autorzy pracy zaobserwowali korelację pomiędzy poziomem ekspresji Irisin na poziomie białka z wielkością guza (T1-2 vs. T3-4; $p = 0,0348$). Wykazano także związek pomiędzy ekspresją tej adipomiokiny a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej – wyższy poziom ekspresji zaobserwowano w N0 w porównaniu do N1 i N2-3 (odpowiednio, $p = 0,0031$ i $p = 0,0457$). Z kolei doświadczenia z użyciem linii komórkowych wykazały wyższy poziom Irisin w komórkach linii HEP-2 w porównaniu z poziomem ekspresji w komórkach linii HaCat. Powyższe przesłanki skłoniły Doktorantkę do wysnucia wniosku, iż zwiększony poziom ekspresji Irisin w LSCC i korelacja tej ekspresji ekspresją markerów proliferacji oraz z cechami klinicznymi i patomorfologicznymi nowotworu, mogą wskazywać na potencjalną rolę Irisin jako biomarkera w procesie diagnostycznym LSCC. Należy podkreślić, iż publikacja ta pierwszym doniesieniem w literaturze, w którym wykazano ekspresję Irisin w LSCC. Autorzy pracy zaobserwowali także wyższą ekspresję Irisin w przypadku LSCC w porównaniu do tkanek kontrolnych oraz jej związek z rozmiarem guza i przerzutami do węzłów chłonnych.

Praca doktorska ma przejrzysty charakter, stanowi zwartą całość a przedstawione wyniki prezentowane są w logicznej kolejności. Język publikacji i całej pracy jest zrozumiały, a wnioski zawarte w publikacjach są trafne i adekwatne do uzyskanych wyników. Doktorantka nie uniknęła jednak niekonsekwencji dotyczącej odniesienia uzyskanych wniosków do celów pracy: wnioski, umieszczone na stronie 61 pracy wynikają z wyników uzyskanych w drugiej publikacji cyklu i są prawidłowo

sformułowane, jednak nie korespondują z celami pracy ujętymi na stronach 13-14. Ta część pracy wymaga korekty polegającej na przeredagowaniu rozdziału 3 „Założenia i cel pracy doktorskiej”.

Reasumując, stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca doktorska wnosi znaczący merytoryczny wkład w wiedzę na temat związku Irsin z kancerogenezą, w tym szczególnie patogenezą płaskonabłonkowego raka krtani. Spełnia wymogi formalne określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 30 stycznia 2018 r., poz. 261) stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Z związku z powyższym przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Lek. Agnieszki Pinkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, reading "Agnieszka Ziótko". The signature is written in a cursive, flowing style.