



Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/16738/2023 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

wpl.
dnia 26-09-2023

L. dz. RN-BM/ 1672

Gdańsk, 19.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani lek. Agnieszki Pinkowskiej

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Pani lek. Agnieszki Pinkowskiej** jest: „Rola iryzyny w raku płaskonabłonkowym krtani”.

Promotorką pracy jest **Pani prof. dr hab. Marzena Podhorska-Okołów**, 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 płaskonabłonkowy krtani stanowią poważny problem zarówno medyczny, jak i społeczny, szczególnie wśród palących mężczyzn, po 50 roku życia, o niskim statusie socjoekonomicznym. O ile palenie papierosów, staje się coraz mniej popularne w krajach wysokorozwiniętych, to dodatkowy czynnikiem rozwoju tego nowotworu wydaje się być zakażenie wirusem brodawczak HPV. Z uwagi na długi okres bezobjawowy, 60% przypadków raka krtani w Polsce, wykrywanych jest dopiero w stadium T3 lub T4, co związane jest z koniecznością radykalnej laryngektomii i utratą głosu u pacjenta. Dlatego opracowanie nowych metod wczesnej terapii, wydaje się być kluczowe w celu podjęcia mniej inwazyjnej terapii zachowawczej.

Iryzyna to hormon o budowie peptydowej, który powstaje w wyniku proteolitycznej modyfikacji białka FNDC5 (Fibronectin type III domain-containing protein 5). Wykazano, że iryzyna wydzielana jest przez tkankę mięśniową podczas wysiłku fizycznego i uczestniczy w przemiana tkanki tłuszczowej żółtej, w brunatną. Wydaje się jest jednym z istotnych mechanizmów regulowanych przez iryzynę, jest aktywacja syntezy termogeniny (*UPC1*), co może prowadzić do przełączenia metabolizmu komórki z fosforylacji oksydacyjnej na glikolizę. Co istotne, jest to proces bardzo często towarzyszący transformacji nowotworowej, a więc **zbadanie roli iryzyny w rozwoju nowotworów, takich jak rak płaskonabłonkowy krtani jest jak najbardziej słuszne i potrzebne z klinicznego punktu widzenia.**

Rozprawa doktorska **Pani lek. Agnieszki Pinkowskiej** jest kolejną pracą dotyczącą iryzyny, która powstała w zespole **Prof. dr hab. Marzenny Podhorska-Okolów**. Badania te mają na celu określenie roli iryzyny, jako potencjalnego markera prognostycznego w rozwoju nowotworów (inne modele to rak gruczołu piersiowego, 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 **77 stron, w tym, przedruki dwóch publikacji pełnotekstowych**, które są podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Są to:

Praca 1. Pinkowska A, Podhorska-Okolów M, Dzięgiel P, Nowińska K. The Role of Irisin in Cancer Disease. *Cells*. 2021 Jun 12;10(6):1479. doi: 10.3390/cells10061479.

Praca 2. Pinkowska A, Nowinska K, Ciesielska U, Podhorska-Okolow M. Irisin Association with Ki-67, MCM3 and MT-III in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx. *Biomolecules*. 2021 Dec 30;12(1):52. doi: 10.3390/biom12010052.

W obu pracach **lek. Agnieszka Pinkowska jest pierwszym autorem**, z tym, że pierwsza praca jest pracą przeglądową, a tylko **Praca 2**, zawiera dane oryginalne uzyskane w wyniku wykonania zadań badawczych. Zgodnie z dołączonymi do manuskryptu oświadczeniami współautorów, lek. Agnieszka Pinkowska w **Pracy 1**, opracował koncepcję pracy, zebrała odpowiednią literaturę, a następnie przygotowała manuskrypt oraz rysunki. W **Pracy 2**, również, była autorką koncepcji pracy i dokonała przeglądu i zebrania piśmiennictwa. Z dalszej części oświadczenia dowiadujemy się, że udział lek. Agnieszki Pinkowskiej polegał również „**na pomocy**” w wykonaniu części doświadczalnej badań, analizie wyników i opracowaniu manuskryptu. Wydaje się to dość niezręczne oświadczenie, gdyż od kandydatki na stopień doktora oczekuje się raczej wykonania części doświadczalnej. Należałoby również w oświadczeniach, szczegółowo opisać zaangażowanie autora w pracy doświadczalnej. Na przykład „udział polegał na wykonaniu i ocenie preparatów histologicznych”. W samej **Pracy 2**, jako wykonawcę części doświadczalnej podano tylko **dr Katarzyna Nowińską (kopromotor rozprawy)**, która jest zarazem autorem korespondencyjnym. **Należy jednak założyć, że skoro lek Agnieszka Pinkowska jest pierwszym autorem obu publikacji, to jej udział w przygotowaniu przedstawionych do oceny manuskryptów, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, był znaczący.**

b) opis uzyskanych wyników

Pierwsza praca stanowi bardzo rozbudowany przegląd literatury dotyczący badań nad rolą iryzyny w rozwoju i progresji nowotworów. Praca ta w sposób systematyczny i bardzo drobiazgowy omawia strukturę prekursora iryzyny FNDC5 oraz samego hormonu, jego powstawanie oraz potencjalny mechanizm działania. Główną część pracy stanowi opis dotychczasowych badań dotyczących ekspresji iryzyny w różnych nowotworach oraz ocena potencjalnych możliwości zastosowania iryzyny w diagnostyce różnych nowotworach (m. in. prostaty, pęcherza moczowego, nerek, nowotworów przewodu pokarmowego, płuc, tarczycy oraz kości). Warto zaznaczyć, że szereg przedstawionych danych doświadczalnych wskazuje, że **iryzyna hamuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, co może mieć znaczenie praktyczne, a przy równocześnie podkreśla celowość podjętej tematyki.**

Z punktu widzenia recenzenta chciałbym zwrócić uwagę, na pewną niekonsekwencję w opisie. Otóż, na stronie 25 manuskryptu (3 strona pracy 1), autorka wskazuje na to, że

wyniki pomiar poziomu iryzyny w serum podawane są w różnych jednostkach: µg/mL, ng/mL lub pg/mL, co komplikuje porównywanie wyników prezentowanych przez różne grupy. Nie jest to chyba specjalny problem, wystarczy zamienić jednostki, z drugiej strony Tabela 2, zamieszczona na stronach 33-34 (strony 11-12, **Pracy 1**) zawierają dane liczbowe bez podania jednostek.

Podsumowując, należy podkreślić, że jest to **jedna z pierwszych tak obszernych prac przeglądowych podsumowujących wyniki badań nad fizjologiczną aktywnością iryzyny oraz jej ekspresją w różnych nowotworach**. Głównym wnioskiem z dotychczas przeprowadzonych obserwacji, wydaje się być konieczność dalszych badań na większych grupach pacjentów oraz natomiast wykorzystywanie różnych modeli badawczych (badania *in vitro*, na zwierzętach i różnych grupach pacjentów) utrudniają interpretację wyników.

Tak więc, druga praca z cyklu, **świetnie wpisuje w ten nurt światowych badań**. Do wykonania części doświadczalnej opisanych w **Pracy 2**, wykorzystano materiał zebrany od pacjentów leczonych na Oddziale Laryngologii Oddziału Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala im. J. Babińskiego we Wrocławiu, oraz Katedry i Kliniki Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Materiał ten był zarchiwizowany na Katedrze Histologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania immunohistochemicznej wykonano na bazie **140 przypadków guzów płaskonabłonkowych krtani, 57 przypadków brodawczaków krtani, oraz 14 przypadków łagodnych zmian przerostowych** (materiał kontrolny).

Praca 2, obejmuje ocenę ekspresji iryzyny oraz **korelację poziomu iryzyny z markerami proliferacji Ki-67 i MCM3; oraz metalotiotreonin I i II (MT-I/II)**, które uczestniczą w detoksyfikacji poprzez usuwanie wolnych rodników tlenowych oraz metali ciężkich. Ocenę ekspresji wykonano przy zastosowaniu mikromacierzy tkankowych. Dodatkowo, porównano ekspresję iryzyny w dwóch liniach komórkowych: HEP-2, jako model komórkowy raka krtani, oraz HaCaT - nieśmiertelnioną linię keratynocytów, służących jako kontrolę. Wydaje się, że wybór, linii HaCaT nie jest do końca optymalny, gdyż jest to linia pochodząca ze skóry pleców. Być może, lepszą kontrolą byłyby linie nabłonka jamy ustnej, a najlepszą wyprowadzone z nabłonka krtani. O ile linii nienowotworowych jamy ustnej dostępnych jest sporo (nawet pierwotne keratynocyty), to tylko pojedyncze publikacje opisują wyprowadzenie linii komórkowych z nabłonka krtani. Na przykład w depozytorium ATTC jest dostępna linia HuLa-PC (CRL-334).

Warto podkreślić, że są to pierwsze badania ekspresji irydyny na tak dużym materiale klinicznym (ponad 200 preparatów). Lek. Agnieszka Pinkowska sformułowała trzy zasadnicze wnioski z **Pracy 2**, Są to: 1. Podwyższony poziom irydyny w raku krtani w porównaniu do zmian łagodnych, może być dodatkowym markerem diagnostycznym; 2. Poziom irydyny pozytywnie koreluje z badanymi markerami Ki-67, MCM3 oraz MT-I/II; 3. Obniżony poziom irydyny może sugerować występowanie przerzutów (N0 vs N1). Uważna lektura Pracy 2 oraz streszczenia zawartego w manuskrypcie rozprawy doktorskiej, nasuwa kilka pytań. W jaki sposób odróżnić obniżony poziom irydyny w przerzutach, od obniżonego poziomu w zmianach łagodnych? Jak autorka interpretuje pozytywną korelację iryzyny z Ki-67 i MCM3? Generalnie są to markery proliferacji, a więc wydaje się, że podwyższony poziom iryzyny nie jest dobry, chociaż, szereg badań cytowanych w Pracy 1, wskazuje, że iryzyna hamuje

proliferację i migrację komórek nowotworowych? W jak sposób autorka zinterpretowała korelację iryzyny z podwyższonym poziomem MT-I/II?

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

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym oraz stylistycznym. Manuskrypt nie jest rozbudowany i nie zawiera rysunków ani tabel, które podsumowywałyby uzyskane wyniki. Warto jednak podkreślić, że publikacje, w tym praca przeglądowa, które są podstawą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej zawierają wszystkie odpowiednie rysunki i tabele, które pozwalają na dokładne zapoznanie się z całością uzyskanych wyników oraz tabele podsumowujące dotychczasowy stan wiedzy (Praca 1) lub przedstawiające analizę statystyczną (Praca 2).

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury

Wstęp do rozprawy doktorskiej **Pani lek. Agnieszki Pinkowskiej** zawiera, **tylko 35 dobrze dobranych pozycji literaturowych**, które umieszczone są po wstępie. Są to prace głównie z ostatnich lat. Warto podkreślić, że Praca 1, która jest artykułem przeglądowym stanowi bardzo dobre podsumowanie literatury tematycznej z ostatnich lat i zawiera, aż 83 odnośniki. Natomiast publikacja oryginalna (Praca 2) zawiera 51 odpowiednich cytacji. Szkoda, że praca przeglądowa (Praca 1) nie powstała po opublikowaniu pracy prezentującej wyniki będące podstawą rozprawy doktorskiej (Praca 2). Wyniki tam przedstawione z pewnością świetnie uzupełniałyby wyniki dotyczące poziomu iryzyny w innych nowotworach.

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

Rozprawa doktorska lek. Agnieszki Pinkowskiej, posiada rozdział założenia i cel pracy, które można byłoby uprościć do jednego głównego zadania badawczego: Zbadanie poziomu ekspresji iryzyny w raku krtani. Dodatkowo, ocenę korelacji iryzyny z markerami Ki-67, MCM3 oraz MT-I/II. Natomiast, celem **Pracy 1**, było przegląd literatury dotyczącej iryzyny, ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji w nowotworach oraz badań wpływu iryzyny na rozwój (a raczej zahamowanie) progresji nowotworów.

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

W części doświadczalnej **lek. Agnieszka Pinkowska** wykorzystwała dwa główne modele badawcze: **badania mikromacierzy tkankowych metodami IHC**, oraz badania *in vitro* na **ludzkich komórki komórkowych**. Zastosowano dość ograniczony zestaw metod histologicznych, w tym IHC, IF, oraz technikę Western Blot do oceny względnego poziomu badanych białek. Bardzo istotnym aspektem pracy 2, jest przeprowadzona w sposób prawidłowy, rozbudowana ocena statystyczna uzyskanych wyników, która pozwala na wysunięcie konkretnych związków.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca, choć zawiera 77 stron, to w rzeczywistości jest dość krótka i ograniczona jest do 25 stron maszynopisu. Dodatkowe strony zawierają przedruki dwóch publikacji oraz

suplementy, w których umieszczono oświadczenia współautorów czy opisu dorobku naukowego lek. Agnieszki Pinkowskiej. Układ pracy jest specyficzny, ponieważ po spis treści, znajduje się wstęp, założenia i cele pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim. Następnie po kopiach publikacji znajduje się krótki rozdział podsumowanie i wnioski. Natomiast brakuje zupełnie dyskusji. Praca zwiera równie oświadczenia współautorów, kopię zgody komisji bioetycznej na badania oraz szczegółowy opis dorobku naukowego. O ile wstęp, powstały zapewne na bazie Pracy 1, dobrze wprowadza w tematykę, to dalsze rozdziały są chyba trochę zbyt skrótowe. Z drugiej strony praca zawiera szereg powtórzeń, wręcz tych samych fraz. Również rozdział podsumowanie raczej stanowi kolejne streszczenia wyników niż dyskusję, której brakuje w rozprawie. Np. warto byłoby zastanowić się, czy iryzyna może być markerem prognostycznym oraz progresji raka krtani, czy też może być zastosowana w terapii? Lek. Pinkowska wspomina, że lepsze poznanie roli iryzyny w raku krtani, czy też ogólnie w nowotworach, wymaga dalszych badań. Ciekaw jestem, jakie badania (oprócz oczywiście zwiększenia grupy pacjentów), zaproponowałaby autorka?

Oczywiści, przedstawione uwagi, mają raczej charakter edytorski, gdyż główną częścią rozprawy stanowi obszerna praca przeglądu oraz praca badawcza, które to zawierają wszystkie elementy, niezbędne do prawidłowej i rzetelnej oceny dysertacji.

Warto na koniec zwrócić uwagę na **bogaty dorobek publikacyjny lek. Agnieszki Pinkowskiej**. Są to w większości prace lub rozdziały w podręcznikach skierowane do lekarzy, zawierające praktyczne porady oraz rekomendacje, to jednak wskazują na duże zaangażowanie i dociekliwość autorki w tej dziedzinie, co z pewnością wpływa na jej działalność naukową.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska lek. Agnieszki Pinkowskiej oparta jest na jednej publikacji oryginalnej i jednej pracy przeglądowej, które ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Z przedstawionych badań wynika, że poziom irydyny w komórkach raku płaskonabłonkowego krtani może być dodatkowym markerem diagnostycznymi (zmiany łagodne vs rak) oraz być może prognostycznym (stadium zaawansowania i wystąpienie przerzutów).

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 Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani lek. Agnieszki Pinkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra i Zakład Histologii
Gdańskie Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, dnia 19.09.2023

Prof. dr hab. Michał Żmijewski