

Warszawa, 07.02.2023 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Izabeli Baryły pt.

**„Białko WWOX jako wielofunkcyjny modulator transkrypcji w patogenezie cukrzycy ciężowej”**

Cukrzyca ciążowa (*gestational diabetes mellitus*, GDM), której częstość występowania w Polsce i na świecie systematycznie rośnie, zwiększa ryzyko wystąpienia poważnych powikłań położniczych, ale również późniejszych powikłań kardiometabolicznych zarówno u matki jak i dziecka. Patogeneza GDM jest złożona i wciąż nie w pełni poznana, dużą rolę przypisuje się w niej zjawisku stresu oksydacyjnego. Czynnikiem bezpośrednio indukującym stres oksydacyjny jest niedotlenienie (charakterystyczne dla wczesnych etapów ciąży), które powoduje aktywację mechanizmów kompensacyjnych. Jednym z nich jest wzrost ekspresji czynnika indukowanego niedotlenieniem  $1\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1\alpha*, HIF-1 $\alpha$ ), który poprzez regulację aktywności transkrypcyjnej innych genów, w tym między innymi tych zaangażowanych w transport i metabolizm glukozy, jest kluczowym mediatorem komórkowych odpowiedzi adaptacyjnych na niedotlenienie. Do czynników regulujących aktywność HIF-1 $\alpha$  należy białko kodowane przez gen oksydoreduktazy zawierający domenę WW (*WW domain containing oxidoreductase*, WWOX). Wpływ GDM na aktywność szlaku WWOX/HIF-1 $\alpha$  oraz jego rola w metabolizmie glukozy w warunkach hiperglikemii i hipoksji nie zostały jednak w pełni poznane. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi cenne uzupełnienie dotychczasowego stanu wiedzy w tym zakresie. Z punktu widzenia zdrowia publicznego, konieczności poszukiwania nowych metod zapobiegania i leczenia GDM, oraz na podstawie aktualnej literatury naukowej, tematykę pracy Doktorantki uważam za niezwykle aktualną i ważną.

Recenzowana praca została wykonana w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej Katedry Medycyny Molekularnej i Biotechnologii Oddziału Nauk Biomedycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod opieką prof. dr hab. n. med. Andrzeja Bednarka i dr hab. n. med. Elżbiety Płuciennik, co zapewniło Doktorantce dostęp do niezbędnych dla wykonywanej pracy materiałów i technik badawczych.

Dysertacja została przygotowana na podstawie jednej pracy pogładowej oraz dwóch współautorskich prac eksperymentalnych, w których Doktorantka pełniła wiodącą rolę, opublikowanych w czasopismach naukowych z listy Filadelfijskiej (o łącznym współczynniku oddziaływania 14,875). Udział Doktorantki w przygotowaniu opublikowanych prac został szczegółowo opisany oraz potwierdzony poprzez oświadczenia współautorów – nie ma wątpliwości, że wkład pracy mgr inż. Izabeli Baryły był dominujący w każdej publikacji składającej się na ocenianą rozprawę. Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków uzyskanego przez Doktorantkę grantu NCN PRELUDIUM 2015/17/N/NZ4/02805. Fakt, że wszystkie prace łączy jeden problem badawczy, a Doktorantka samodzielnie pozyskała środki na prowadzone badania, świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Składające się na rozprawę publikacje zostały poprzedzone streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim, krótkim wstępem literaturowym oraz opisem metod, najważniejszych wyników wraz z podsumowującymi je wnioskami.

W pierwszej z dwóch publikacji eksperymentalnych będących podstawą pracy doktorskiej, opublikowanej w *PeerJ*, Doktorantka badała poziom ekspresji genów kodujących WWOX i HIF-1 $\alpha$  oraz wybranych genów związanych, między innymi, z transportem glukozy, szlakiem glikolizy, szlakiem Wnt i odpowiedzią zapalną w leukocytach pochodzących od 98 kobiet z GDM i 37 kobiet ciężarnych bez zaburzeń metabolizmu węglowodanów. Stwierdziła, że u pacjentek z GDM dochodzi do znaczącego obniżenia poziomu mRNA WWOX z jednoczesnym wzrostem poziomu mRNA dla HIF1A (i dla indukowanych przez ten czynnik transkrypcyjny genów), co skutkowało około sześciokrotnym zmniejszeniem wskaźnika WWOX/HIF1A. Bardzo interesującym podejściem metodycznym było odniesienie wyników badań przeprowadzonych u kobiet będących w ciąży do wyników ekspresji w/w genów w leukocytach pozyskanych 3 i 12 miesięcy po porodzie. Badania te wykazały, że po porodzie w leukocytach kobiet z wywiadem GDM dochodzi do wzrostu poziomu mRNA dla WWOX do wartości obserwowanych u kobiet bez cukrzycy ciążowej. Publikację wieńczy obszerna, przeprowadzona w dojrzały sposób, dyskusja dotycząca potencjalnych konsekwencji metabolicznych obniżenia wskaźnika WWOX/HIF1A podczas ciąży przyczyniających się do rozwoju GDM. W części dyskusji dotyczącej ograniczeń metodologicznych pracy Doktorantka słusznie zauważa, że leukocyty nie są optymalnym (choć łatwym do pozyskania) materiałem badawczym do analizy ogólnoustrojowych zmian prowadzących do rozwoju GDM. **Dlatego prosilibym**



**Doktorantkę o zaproponowanie podczas publicznej obrony alternatywnych modeli badawczych do analizy opisanych przez Nią zjawisk.**

W drugiej z eksperymentalnych publikacji będących podstawą pracy doktorskiej, opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, Doktorantka kontynuowała badania nad rolą szlaku WWOX/HIF-1 $\alpha$  w rozwoju zaburzeń metabolizmu węglowodanów. Jako model badawczy wykorzystwała ludzkie fibroblasty, w których najpierw dokonała wyciszenia WWOX, a następnie, stosując szereg metod biologii molekularnej, badała ich odpowiedź na hiperglikemię i niedotlenienie. Stwierdziła, że knockout WWOX w komórkach hodowanych w warunkach normoksji i normoglikemii prowadzi do wzrostu ekspresji i aktywności genów zaangażowanych w proces glikolizy i wyższego stężenia mleczanu w porównaniu z kontrolnymi fibroblastami. Z kolei hiperglikemia zarówno w warunkach normoksji jak i w hipoksji prowadziła do zmniejszenia zależnego od insuliny wychwyty glukozy i powodowała dalszy wzrost stężenia mleczanów. Na podstawie przeprowadzonych badań oraz dostępnej literatury Doktorantka wnioskuje, że wyciszenie osi WWOX/HIF-1 $\alpha$  zmienia metabolizm glukozy w fibroblastach, a na poziomie organizmu może predysponować do zaburzeń metabolicznych. We wstępie pracy Doktorantka zaznacza, że wybór fibroblastów do prowadzenia doświadczeń in vitro był podyktowany ich powszechnym występowaniem i udziałem w produkcji macierzy zewnątrzkomórkowej. **Zastanawia mnie jednak, czy w badaniach nad rolą szlaku WWOX/HIF-1 $\alpha$  w rozwoju cukrzycy zasadnym nie byłoby zastosowanie w doświadczeniach np. komórek śródbłonna, jako bezpośrednio zaangażowanych w rozwój indukowanych hipoksją i hiperglikemią powikłań naczyniowych? Uprzejmie proszę Doktorantkę o odniesienie się podczas publicznej obrony do powyższej kwestii.**

Jako podsumowanie tematyki prowadzonych przez Doktorantkę badań należy uznać pracę poglądową zatytułowaną „WWOX and metabolic regulation in normal and pathological conditions” zamieszczoną w *Journal of Molecular Medicine*. W publikacji tej, w oparciu o 112 pozycji literaturowych, Doktorantka przeprowadza rzetelny przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego roli szlaku WWOX/HF-1 $\alpha$ , nie tylko w regulacji przemian węglowodanów, ale również lipidów, hormonów steroidowych i metabolizmu tkanki kostnej. Struktura publikacji jest typowa dla prac przeglądowych, rozdziały i podrozdziały zatytułowane są według merytorycznej treści. Praca wskazuje na szereg procesów metabolicznych regulowanych przez białka szlaku WWOX/HF-

1 $\alpha$  i kończy się konkluzją na temat potencjalnych możliwości terapeutycznych związanych z ingerencją w ten szlak. Dlatego proszę Doktorantkę o krótką charakterystykę kierunków badawczych, w których szlak WWOX/HF-1 $\alpha$  mógłby być wykorzystany dla celów terapeutycznych w chorobach metabolicznych.

Pragnę również podkreślić, że postawione w tej recenzji pytania nie mają na celu umniejszyć wartości przedłożonej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko, a jedynie stanowią przyczynek do dyskusji nad dalszym rozwojem badań w ramach podjętej przez Doktorantkę tematyki.

#### Podsumowanie

Po zapoznaniu się z pracą doktorską Pani Izabeli Baryły uważam, że przedstawiona do oceny dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a tym samym spełnia wszystkie kryteria zawarte w ustawie z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora (t.j. Dz. U. 2017, poz. 1789, art. 13). Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani Izabeli Baryły do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony. Ze względu na rangę podjętego problemu i wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników wnoszę również o wyróżnienie pracy.

