



Łódź, 19 lutego 2023 r.

dr hab. n. med. Ewa Jabłońska, prof. IMP  
Zakład Badań Translacyjnych  
Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi  
ul. Św. Teresy 8, 91-348 Łódź  
tel. 42 6314 785  
e-mail: ewa.jablonska@imp.lodz.pl

### Recenzja

#### rozprawy doktorskiej mgr inż. Izabeli Baryły pt.

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

Promotor rozprawy: prof. dr hab. n. med. Andrzej K. Bednarek

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Elżbieta Płuciennik

Przedmiotem przedstawionej mi do recenzji rozprawy było badanie roli genu *WWOX* w podstawowym metabolizmie glukozy poprzez regulację czynnika odpowiedzi na hipoksję HIF-1 $\alpha$ , ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy ciężowej. Badania realizowano w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w ramach kierowanego przez Doktorantkę grantu NCN Preludium 9.

Wybrane przez Kandydatkę zagadnienie nie było wcześniej przedmiotem badań, dlatego temat rozprawy jest nowy i wydaje się interesujący szczególnie pod kątem badania czynników biorących udział w patogenezie cukrzycy ciężowej. *WWOX* jest genem supresorowym, a interakcja jego białkowego produktu z czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1 była badana do tej pory głównie w patogenezie nowotworów złośliwych. Związek osi regulacyjnej *WWOX/HIF1A* z zaburzeniami metabolicznymi w ciąży pozostaje natomiast niejasny. Doktorantka postanowiła zweryfikować hipotezę o potencjalnym znaczeniu genu *WWOX*, jako regulatora HIF-1 $\alpha$ , w patogenezie zaburzeń metabolicznych, w tym w przebiegu cukrzycy ciężowej. Cukrzyca ciężowa powstaje w wyniku zaburzonej przez łożysko gospodarki hormonalnej i jest najczęstszym zaburzeniem metabolicznym obserwowanym u kobiet ciężarnych. Choroba stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia matki oraz płodu. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za rozwój cukrzycy ciężowej są wciąż niewyjaśnione. Należy zatem uznać, iż potrzeba poszukiwania nowych zaburzeń w komórkowych szlakach regulujących metabolizm glukozy w przebiegu ciąży w pełni uzasadnia podjęte przez Doktorantkę badania.

Rozprawę doktorską stanowi cykl powiązanych ze sobą tematycznie publikacji, w tym dwie prace oryginalne i jeden artykuł przeglądowy, opublikowane w trybie otwartego dostępu, w czasopismach o sumarycznym wskaźniku Impact Factor = 14,875 i posiadających łącznie 380 pkt MNiSW. We wszystkich trzech publikacjach Kandydatka jest pierwszym autorem. Cykl został opatrzony syntetycznym opracowaniem naukowym, którego układ jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na jednaście sekcji poprzedzonych spisem treści, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem użytych skrótów oraz wykazem publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Tekst właściwy zawiera kolejno wstęp, wskazanie hipotezy badawczej i celów pracy, opis materiału, metod, wyników oraz wniosków, wykaz źródeł finansowania badań oraz spis literatury. Na końcu opracowania zamieszczono kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską, oświadczenia współautorów określające ich udział w każdej z publikacji, kopię Zgody Komisji Bioetycznej ds. Badań na Ludziach oraz oświadczenie o prawie autorskim.





**Wstęp** pracy zawiera zwięzłe informacje dotyczące genu *WWOX*, jego roli w zaburzeniach metabolizmu glukozy oraz związku ze stanem hipoksji poprzez regulację czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (a konkretnie jego podjednostki HIF-1 $\alpha$ ). Ponadto, Doktorantka omówiła rolę zjawiska hipoksji w przebiegu ciąży oraz w zaburzeniach metabolicznych, skupiając się na patogenezie cukrzycy ciążowej oraz cukrzycy typu II. W mojej opinii, omówione zagadnienia stanowią wyczerpujące wprowadzenie do podjętej tematyki badawczej.

Następnie, Doktorantka przedstawiła **hipotezę badawczą** oraz cztery szczegółowe **cele badawcze**, które objęły:

1. Określenie profilu ekspresji genów *WWOX*, *HIF1A* i wybranych genów kodujących transportery glukozy (*SLC2A1*, *SLC2A4*) i enzymy szlaku glikolizy (*HK2*, *PFK*, *PKM2*, *LDHA*) w grupie pacjentek ze zdiagnozowaną cukrzycą ciążową oraz w grupie kontrolnej, którą stanowiły kobiety ciężarne o prawidłowym metabolizmie glukozy;
2. Badanie korelacji pomiędzy ekspresją analizowanych genów uczestniczących w metabolizmie glukozy oraz parametrów klinicznych i wyników badań biochemicznych pacjentek, a ekspresją genów *WWOX* i *HIF1A* w leukocytach kobiet z GDM;
3. Określenie wpływu obniżonej ekspresji *WWOX* w badaniach *in vitro* na ekspresję wybranych genów zależnych od czynnika transkrypcyjnego HIF-1 $\alpha$  kodujących transportery glukozy (*SLC2A1*, *SLC2A4*) oraz enzymy zaangażowane w metabolizm glukozy (*HK2*, *ENO1*, *PFK*, *PKM2*, *LDHA*, *PDK1*, *PDHA*, *CS*, *ACLY*) w warunkach hiperglikemii i hipoksji;
4. Poznanie zależności pomiędzy ekspresją *WWOX* a aktywnością transporterów glukozy i wybranych enzymów szlaku glikolizy w warunkach hiperglikemii i hipoksji w linii komórkowej ludzkich fibroblastów.

Cele zostały sformułowane w sposób logiczny i pozwalający na zweryfikowanie hipotezy, iż obniżony stosunek ekspresji *WWOX/HIF1A* jest istotnym czynnikiem biorącym udział w patogenezie zaburzeń metabolicznych, a w szczególności cukrzycy ciążowej.

Część pracy dotycząca **materiału i metod** zawiera zwięzły opis przeprowadzonego badania kliniczno-kontrolnego z udziałem 135 ciężarnych kobiet, oraz badania eksperymentalnego, przeprowadzonego na linii ludzkich fibroblastów z wyciszoną ekspresją genu *WWOX*. Badaniem obserwacyjnym objęto 98 kobiet ze zdiagnozowaną cukrzycą ciążową oraz 37 kobiet ciężarnych z grupy kontrolnej. Cukrzycę ciążową diagnozowano w oparciu o kryteria Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego i WHO. Materiał do badań stanowiła krew, w której oznaczono markery gospodarki węglowodanowej i tłuszczowej, oraz stężenie insuliny i białka CRP, a następnie na podstawie wartości stężeń insuliny i glukozy na czczo, policzone zostały: wskaźnik oporności na insulinę (HOMA-IR), wskaźnik funkcji komórek  $\beta$  trzustki (HOMA-B) oraz indeks wrażliwości na insulinę (QUICK-IS). Ponadto, w leukocytach krwi obwodowej kobiet Doktorantka badała ekspresję 11 genów (stosując metodę qPCR i normalizując wyniki w oparciu o trzy geny referencyjne). W badaniu *in vitro* zastosowano technikę CRISPR/Cas9 celem wyciszenia ekspresji genu *WWOX* w komórkach linii 1BR.3N, a następnie analizowano wpływ knockoutu na ekspresję wybranych genów i ich produktów (stosując odpowiednio metody qPCR i Western Blot), w zależności od różnego stężenia tlenu i glukozy podczas inkubacji. Obok markerów molekularnych, ocena objęła również markery metaboliczne, w tym stężenie kwasu mlekowego w medium hodowlanym oraz aktywność wybranych enzymów glikolitycznych i mitochondrialnych (heksokinazy, dehydrogenazy pirogronianowej, dehydrogenazy mleczanowej i syntazy cytrynianowej). W analizie statystycznej wyników wykorzystano głównie metodę jednoczynnikowej analizy wariancji oraz test t-Studenta. Dobór grupy badanej oraz modelu doświadczalnego, jak również wykorzystane metody i techniki analityczne wydają się właściwe i wystarczające do weryfikacji postawionej przez Doktorantkę hipotezy.





Omawiając **wyniki**, Doktorantka odnosi się osobno do każdej z trzech publikacji wchodzących w skład cyklu. Pierwsza z prac pt. „Identification of a novel association for the *WWOX/HIF1A* axis with gestational diabetes mellitus (GDM)” została opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie PeerJ (IF=3,061; 100 pkt MNiSW) i dotyczy wyników badania obserwacyjnego przeprowadzonego u kobiet ciężarnych. W badaniu tym Doktorantka wykazała niższą ekspresję genu *WWOX* i jednocześnie wyższą ekspresję *HIF1A* u kobiet z cukrzycą ciążową w porównaniu do grupy kontrolnej. Kobiety z GDM charakteryzowały się również niższym stosunkiem ekspresji *WWOX/HIF1A*, który był ujemnie skorelowany z ekspresją *SLC2A1*, *HK2*, *PFK* i *PKM2* oraz dodatnio skorelowany z ekspresją *SLC2A4*. Ponadto, u kobiet z GDM, zaobserwowano zmiany w ekspresji genów kodujących transportery glukozy. Analiza markerów metabolicznych wykazała dodatkowo istotną korelację pomiędzy HbA1c a ekspresją *HIF1A*, *SLC2A1*, *HK2*, *PFK* (korelacja dodatnia) oraz *LDHA* (korelacja ujemna) w cukrzycy ciążowej. W obszernej dyskusji, Autorka wnikliwie analizuje różnice w profilach ekspresji oraz zaobserwowane korelacje pomiędzy poziomami transkryptów, a także ich związek z fenotypem metabolicznym. Obok porównania wyników własnych z istotnymi pracami innych autorów, Kandydatka omówiła potencjalną przyczynę spadku ekspresji *WWOX* w cukrzycy ciążowej, jaką w Jej opinii, może być zaburzony proces metylacji DNA. Na uwagę zwraca postawiona dalej interesująca hipoteza wskazująca, iż obniżenie ekspresji *WWOX* stanowi charakterystyczną cechę zaburzeń ciąży o podłożu cukrzycowym. Uzyskane dane są ciekawe, chociaż zastanawiający jest brak bezpośredniej korelacji pomiędzy *WWOX* i *HIF1A* u kobiet z GDM – być może Doktorantce uda się odnieść do tego spostrzeżenia w trakcie publicznej obrony.

Wskazany w publikacji udział Kandydatki w badaniu obejmował opracowanie koncepcji badawczej, przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych oraz przygotowanie artykułu.

Drua publikacja objęta cyklem, pt. „The *WWOX/HIF1A* Axis Downregulation Alters Glucose Metabolism and Predisposes to Metabolic Disorders” została opublikowana w 2022 r. w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences (IF=6,208; 140 pkt MNiSW). Praca przedstawia wyniki badania *in vitro*, przeprowadzonego na ludzkich fibroblastach o obniżonej ekspresji *WWOX*, z zastosowaniem różnych warunków hodowli, w tym hipoksji i hiperglikemii. W warunkach normalnych (normoksja, normoglikemia) knockout *WWOX* prowadził do wzrostu *HIF1A* na poziomie mRNA i białka, oraz wzrostu ekspresji genów docelowych zależnych od *HIF1A*, a także zwiększonego wychwytu glukozy. Jednocześnie zaobserwowano indukowany pod wpływem knockoutu wzrost ekspresji i aktywności wybranych enzymów glikolitycznych. Na podstawie opisanych zmian, Doktorantka wysunęła przypuszczenie, iż wyciszenie ekspresji *WWOX* prowadzi do efektu Warburga. W tym miejscu muszą zwrócić uwagę, iż w opracowaniu użyto nieprawidłowego sformułowania „glikoliza beztlenowa” w odniesieniu do efektu Warburga (str. 5 i 32), ponieważ zjawisko to opisuje specyficzne przekierowanie metaboliczne zachodzące w warunkach tlenowych. Stąd efekt Warburga określa się zamiennie terminem „glikoliza tlenowa” (a nie „glikoliza beztlenowa”).

Dyskusja wyników, podobnie jak w pierwszej publikacji, jest obszerna i wnikliwa. Autorka w szczególności skupiła się na wpływie obniżonej ekspresji *WWOX* na fenotyp glikolityczny oraz transport glukozy w warunkach hiperglikemii, sugerując rolę *WWOX* w utrzymywaniu wrażliwości fibroblastów na insulinę oraz potencjalne kliniczne znaczenie tego białka w leczeniu cukrzycy ciążowej.

Wskazany w publikacji udział Kandydatki w badaniu obejmował głównie metodykę, przeprowadzenie eksperymentów, analizę i przechowywanie danych oraz przygotowanie artykułu.

W trzeciej publikacji Doktorantka dokonała przeglądu literaturowego dotyczącego obecnego stanu wiedzy na temat udziału *WWOX* w metabolizmie. Praca ukazała się w czasopiśmie Journal of Molecular Medicine w 2022 r. (IF=5,606; 140 pkt MNiSW) i powstała w oparciu o 112 artykułów naukowych, z których ponad połowę stanowią prace opublikowane w ostatnich 10 latach. Na





podstawie wyników badań eksperymentalnych z zastosowaniem modeli komórkowych i zwierzęcych, omówiona została między innymi rola *WWOX* w metabolizmie kości, steroidów, cholesterolu oraz glukozy. Artykuł ma charakter „narrative review”, a udział Kandydatki w przygotowaniu publikacji był największy w porównaniu z pozostałymi dwoma współautorami pracy (objął przegląd literatury i napisanie pracy).

Uzyskane wyniki badań własnych oraz dokonany przegląd literatury skłoniły Doktorantkę do podsumowania rozprawy sześcioma trafnymi i ciekawymi wnioskami, wskazującymi na możliwy udział genu *WWOX* w patogenezie cukrzycy ciężawej, a także występowanie w tej chorobie efektu Warburga, powstającego w wyniku zaburzonej ekspresji *WWOX* i *HIF1A*. Zarówno uzyskane wyniki jak i sformułowane przez Doktorantkę wnioski stanowią istotną wartość naukową, ponieważ dostarczają nowych informacji i hipotez na temat potencjalnych mechanizmów molekularnych leżących u podstaw cukrzycy ciężawej. Ponadto, wyniki mogą mieć znaczenie kliniczne.

Podsumowując, rozprawa dotyczy choroby będącej istotnym w wymiarze globalnym problemem zdrowotnym i jest oparta na ciekawych badaniach o charakterze poznawczym. Publikacje składające się na cykl są spójne tematycznie i w sposób kompleksowy odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom badawczym. Wkład Autorki w opisane badania oraz powstanie publikacji należy uznać za znaczący. Na szczególną uwagę zasługuje próba połączenia obserwacji z badania epidemiologicznego z wynikami eksperymentu mechanistycznego opartego na modelu ludzkich komórek z knockoutem genu *WWOX*. Na podstawie niniejszej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, iż mgr inż. Izabela Baryła potrafi prawidłowo przeprowadzić badania obserwacyjne i empiryczne, a następnie poprawnie zinterpretować ich wyniki. Ponadto, wysoki poziom dyskusji wyników zawartych w pracach oryginalnych świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Kandydatka udowodniła, iż posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

W opinii Recenzenta rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnioskuje do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Izabeli Baryły do dalszych etapów przewodu doktorskiego, oraz o wyróżnienie niniejszej rozprawy, z uwagi na jej wysoki poziom naukowy.

