



# Krakowska Akademia

im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

WYDZIAŁ LEKARSKI I NAUK O ZDROWIU

ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków  
tel. (12) 252 45 05, (12) 252 45 20 fax: (12) 252 45 02  
e-mail: wlnz@afm.edu.pl

Kraków, dn. 26.05.2022

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**mgr Anety Cierzniak**

**pt. „Ocena zmian epigenetycznych związanych z rozwojem oporności na insulinę w komórce tłuszczowej”**

**wykonanej na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
Wydział Lekarski**

***Promotor: prof. dr hab. Tadeusz Dobosz***

***Promotor pomocniczy: dr Małgorzata Małodobra-Mazur***

Przedłożona do recenzji dysertacja Pani mgr Anety Cierzniak przedstawia istotny i wciąż nie do końca poznany problem insulinooporności współistniejącej z otyłością. Doktorantka podejmuje ambitną próbę oceny zmian na poziomie epigenomu, związanych z indukcją insulinooporności powiązaną z otyłością, w oparciu o badania *ex vivo* i *in vivo*. Wpływ modyfikacji epigenetycznych na regulację ekspresji genów oraz możliwość indukcji zmian epigenomu przez czynniki zewnętrzne, m.in. dietę, jest obecnie analizowany pod kątem ich potencjalnego udziału w patogenezie wielu chorób, takich jak toczeń, astma, choroba Leśniowskiego-Crohna, choroby sercowo-naczyniowe czy nowotwory. Ostatnio analiza zmian epigenetycznych, takich jak metylacja DNA lub modyfikacja histonów, została uznana za wysoce użyteczną w identyfikacji nowych biomarkerów lub celów terapii lekowej. Z tego względu podjęty przez Doktorantkę temat wydaje się ważny, ciekawy i niezwykle aktualny.

Rozprawa doktorska przygotowana została jako **cykl trzech** tematycznie spójnych prac (doświadczalnych) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF, *Impact factor*) 14.276 i liczbie punktów MEiN - 300, opublikowanych w latach 2021-2022. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednej drugim, co świadczy o Jej znaczącym udziale w powstawaniu prac. Zabrakło mi jednak oświadczenia w którym Doktorantka wyszczególniłaby procentowo swoje zaangażowanie. W oparciu o załączone oświadczenia współautorów należy zaznaczyć istotne wsparcie ze strony promotora pomocniczego w realizacji badań, co jest istotne dla kształtowania i rozwoju młodego naukowca. Na uwagę zasługuje fakt, iż badania były współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2016/21/D/NZ5/00155) i Ministerstwo Edukacji i Nauki (016/RID/2018/19).

Przedłożona rozprawa doktorska Pani mgr Anety Cierzniaak ma formę cyklu publikacji opatrzonych częścią opisową składającą się z następujących rozdziałów: (1) wykaz publikacji, (2) streszczenie w języku polskim, (3) streszczenie w języku angielskim, (4) wprowadzenie, (5) założenia i cele projektu badawczego, (6) opis publikacji, (7) piśmiennictwo oraz (8) załączniki (publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautorów, zgoda komisji bioetycznej).

Ponieważ oryginalne prace badawcze, które stanowią trzon rozprawy, były oceniane przez niezależnych recenzentów i redakcje czasopism, moja recenzja koncentruje się przede wszystkim na ocenie części opisowej przygotowanej przez Doktorantkę.

#### Streszczenie:

Streszczenie powinno w sposób syntetyczny przedstawić zakres rozprawy doktorskiej oraz jej cel i wnioski płynące z podjętych badań. W streszczeniu niniejszej pracy znajdują się akapity tożsame z akapitami w dalszych rozdziałach monografii, przez co wydaje się ono zbyt szczegółowe i obszerne przez co staje się mniej informatywne.

#### Wprowadzenie:

Doktorantka w zwięzły sposób przedstawia: (a) rolę insuliny w kontroli metabolizmu biomolekuł i indukcji ścieżek sygnałowych z udziałem receptora insuliny, (b) potencjalne mechanizmy wyjaśniające związek otyłości i insulinooporności, (c) przyczyny deregulacji szlaku insulinowego, które prowadzą do rozwoju insulinooporności.

W ostatniej części wprowadzenia Doktorantka stara się opisać zagadnienia związane z epigenetyczną regulacją ekspresji genów. Biorąc pod uwagę tematykę prac badawczych oraz tytuł rozprawy, który brzmi „Ocena **zmian epigenetycznych** związanych z rozwojem oporności na insulinę w komórce tłuszczowej”, ta część wydaje się być potraktowana niewystarczająco wnikliwie. Wzbogacenie tej części o wyjaśnienie w jaki sposób obecność modyfikacji epigenetycznych w cząsteczce DNA i białkach histonowych wpływa na regulację ekspresji genów oraz przedstawienie potencjału różnych czynników środowiska (m.in. diety wysokokalorycznej) do przeprogramowania wzoru epigenetycznego i wywołania otyłości, podniosłoby walor poznawczy tego rozdziału.

Użyte w tej części przez Doktorantkę określenie „Epigenetyka obejmuje kwestie dziedziczenia pozagenowego” jest nieco mylące, gdyż może ono sugerować, iż modyfikacje epigenetyczne są trwałe, niezmiennie i dziedziczone z pokolenia na pokolenie.

W odniesieniu do epigenetyki, zamiast „modyfikacje biochemiczne” bardziej właściwe byłoby użycie terminu „modyfikacje chemiczne”.

Zdanie „Do najpowszechniejszych modyfikacji epigenetycznych zalicza się metylację, acetylację oraz fosforylację” jest nieco mylące w odniesieniu do wcześniejszego zdania, gdyż może sugerować, iż acetylacja i fosforylacja dotyczy również cząsteczki DNA.

Biorąc pod uwagę treść całego akapitu, niezrozumiałe jest zdanie „Innym, równie istotnym mechanizmem jest interferencja ze strony microRNA”, pozostawione bez jakiegokolwiek dodatkowego wyjaśnienia.

Po przeczytaniu wprowadzenia nie mogę oprzeć się wrażeniu, że Doktorantka lepiej czuje się w problematyce związanej z otyłością i insulinoopornością niż w szeroko rozumianych zjawiskach epigenetycznych. Brakuje mi również w tym rozdziale podsumowania w który przedstawiono by uzasadnienie podjęcia zakresu badań i wyboru materiału biologicznego. Dlaczego wybrano dwie frakcje tkanki tłuszczowej tzn. podskórną i trzewną?

#### Założenia i cele projektu:

W tym rozdziale Doktorantka przedstawia jedynie cele szczegółowe rozprawy, mimo informacji w tytule rozdziału brakuje przedstawienia założeń projektu badawczego. Brak wskazania celu głównego, natomiast podanych jest aż 7 celów szczegółowych.

#### Opis publikacji:

W tej części Doktorantka opisała każdą publikację wskazując materiał wykorzystany w badaniach, ich zakres oraz kluczowe wyniki i wnioski.

#### *Analiza treści publikacji nr 1*

W pracy analizowano wpływ otyłości na: (a) regulację epigenetyczną (globalna i miejscowo specyficzna metylacja DNA) i (b) dysregulację ekspresji genów kluczowych dla insulinooporności. Badania wykonano w biopsjach ludzkiej tkanki tłuszczowej frakcji trzewnej (VAT) i podskórnej (SAT), pacjentów podzielono na trzy grupy zależnie od BMI, występowania otyłości i/lub insulinooporności. Wykazano: (1) hypermetylację promotorów genów *PPARG*, *INSR*, *SLC2A4* i *ADIPOQ* u pacjentów z otyłością i insulinoopornością; (2) odwrotną korelację między poziomem metylacji, a ekspresją genów; (3) dodatnią korelację między ekspresją *PPARG* i ekspresją genów ważnych dla właściwego działania insuliny. W podsumowaniu podano, że u pacjentów z otyłością i współistniejącą insulinoopornością obniżony był poziom ekspresji genów istotnych dla szlaku insulinowego, ponadto poziomy ekspresji genów w grupie pacjentów z otyłością i grupie pacjentów z otyłością i insulinoopornością były podobne, co wskazuje iż sama otyłość może prowadzić do deregulacji ekspresji genów i sprzyjać powstawaniu insulinooporności. Wyniki sugerują

również, że regulacja epigenetyczna, poprzez nadmierną metylację, może wiązać się z późniejszą insulinoopornością u osób otyłych.

#### *Analiza treści publikacji nr 2*

W pracy przedstawiono wyniki analizy globalnej metylacji histonu H3 przy lizynie 4 oraz globalnej acetylacji histonu H3 przy lizynie 9 i 14. Ponadto przeanalizowano ekspresję genów kluczowych m.in. dla regulacji wrażliwości na insulinę, a także genów kodujących białka enzymatyczne zaangażowane w procesy epigenetyczne. Materiałem wykorzystanym do badań były bioptyaty ludzkiej tkanki tłuszczowej (frakcja VAT i SAT) oraz komórki pochodzące z hodowli ludzkich preadipocytów i mysie preadipocyty linii 3T3-L1. Preadipocyty (ludzkie i mysie) były różnicowane do adipocytów, a następnie indukowano w nich insulinooporność. Wykazano: (1) niższy poziom modyfikacji histonu H3 w tkance pacjentów z otyłością i insulinoopornością; (2) występowały różnice w metylacji i acetylacji histonów w obrębie genów szlaku insulinowego (*PPARG*, *SLC2A4* i *ADIPOQ*); (3) zmiany epigenetyczne pojawiały się w adipocytach (model *in vitro*) 72 h po indukcji insulinooporności. W podsumowaniu podano, że gen *PPARG* i jego modyfikacje epigenetyczne mają największy wpływ na patogenezę insulinooporności, ponadto zmiany molekularne pojawiają się wcześniej we frakcji VAT niż SAT. Ponadto zaobserwowano udział deacetylaz SIRT oraz ich rolę w działaniu insuliny i patogenezie insulinooporności.

#### *Analiza treści publikacji nr 3*

W pracy oceniano poziom ekspresji genu *IL-10* wraz z metylacją DNA w jego obszarze promotorowym oraz trimetylację histonu H3 przy lizynie 4 i acetylację histonu H3 przy lizynie 9 i 14. Podobnie jak we wcześniejszym badaniu, wykorzystano model *in vitro* tzn. ludzkie i mysie preadipocyty, różnicowane następnie do adipocytów w których indukowano insulinooporność. Wykazano: (1) wzrost ekspresji genu *IL-10*, wzrost metylacji DNA w regionie promotorowym oraz wzrost metylacji i acetylacji histonu H3 w adipocytach z indukowaną insulinoopornością frakcji SAT; (2) w adipocytach frakcji VAT obniżony był poziom ekspresji genu *IL-10* i zwiększony poziom metylacji regionu promotorowego; (3) w komórkach mysich wzrosła ekspresja genu *IL-10*, nastąpił również spadek poziomu metylacji DNA oraz metylacji i acetylacji histonu H3. W podsumowaniu podano, że modyfikacje epigenetyczne mają wpływ na ekspresję genu kodującego *IL-10*, a badane modyfikacje epigenetyczne wzajemnie na siebie wpływają. Ponadto zaobserwowane różnice w profilu ekspresji *IL-10* między frakcją VAT i SAT potwierdzają różnice metaboliczne między komponentą trzewną i podskórną tkanki tłuszczowej.

#### **Podsumowanie opisu publikacji przedstawione przez Doktorantkę**

Opis publikacji przygotowany jest niezbyt starannie i nie zawsze jest spójny z publikacjami. . Pojawia się niezgodność w liczbie badanych pacjentów w porównaniu z liczbą deklarowaną w publikacjach (w opisie 47 a w publikacji [1] 45 pacjentów i publikacji [2] 40 pacjentów).

Kluczowe wyniki przedstawione są w formie punktów, co sprawia, że są one dużo trudniejsze do analizy niż gdyby zestawiono je w tabeli. Doktorantka myli założenie z celem badania i nie definiuje jednoznacznie grupy kontrolnej w prowadzonych badaniach, zarówno w badaniach *ex vivo*, jak i *in vitro*.

Ponadto:

- Liczba kluczowych wyników sięga 24 (w publikacji [1] - 8, w publikacji [2] – 13, w publikacji [3] -3), podczas gdy uwzględniając podsumowania zawarte w publikacjach wydaje się, że nie wszystkie wyniki które opisuje Doktorantka były kluczowe.
- W pkt. 1 (str. 21/22) opisano, że ekspresja genu *SLC2A4* była obniżona w grupie OR w obu frakcjach trzewnej i podskórnej, po czym w tym samym punkcie widnieje informacja o spadku ekspresji *SLC2A4* tylko we frakcji trzewnej. Opis zatem nie jest spójny.
- Pkt. 8 (str. 22) dotyczy analizy korelacji, brak jednak informacji czy korelacja była dodatnia czy ujemna i której badanej grupy dotyczyła.
- Brak przejrzystego opisu grup badanych (str. 24), Doktorantka wspomina o tym, że materiał komórkowy podzielono na dwie grupy IS i IH, ale nie wskazuje czy byli to pacjenci z otyłością.
- Zarówno w opisie publikacji nr 2 jak i w samej publikacji nie ma informacji na temat wykonania analizy metylacji na poziomie DNA. Natomiast na stronie 25, w pkt 4 pojawia się następujący wniosek: „Większość zmian epigenetycznych zarówno na poziomie DNA, jak i histonów pojawia się po 72h”. Wydaje się on nieuprawniony w świetle opisanych wyników. Podobnie jak wniosek w pkt 7 (str. 25) „ekspresja *PPARG* podlega regulacji epigenetycznej zarówno na poziomie DNA, jak i histonów”.
- Występuje niezgodność w opisie grupy badanej w rozprawie i publikacji (dotyczy publikacji nr 3). Doktorantka opisując materiał wykorzystany do badań (str. 28) wymieniła ludzką tkankę tłuszczową, podczas gdy w metodyce publikacji zawarta jest informacja wyłącznie o materiale pochodzącym z hodowli komórkowej.
- Niektóre wnioski wydają się zbyt daleko idące (publikacja nr 3).

Na przykład:

„Miejscowo specyficzne modyfikacje epigenetyczne na poziomie DNA i histonów mogą mieć istotny wpływ na regulację ekspresji *IL10* w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych”. Analiza statystyczna wykazała brak istotności dla 12 z 16 opisanych w publikacji wyników (wykres nr 1).

„Zaobserwowane zależności pomiędzy ekspresją *IL10* a zmianami na poziomie regulacji epigenetycznej w mysim modelu komórkowym mogą sugerować odmienne mechanizmy regulacji transkrypcji przez modyfikacje epigenetyczne u myszy”. Zmiana w ekspresji tylko jednego genu wydaje się nie uprawniać do tak kategorycznego wniosku.

Szkoda, że w prezentowanym omówieniu cyklu publikacji nie znalazł się ważny dla oceny warsztatu naukowego Doktorantki rozdział poświęcony wykorzystanym w pracy metodom badawczym oraz dyskusja. Dopiero analiza publikacji daje obraz spektrum metod wykorzystanych w badaniach, których efektem jest rozprawa mgr Anety Cierzniak. Wachlarz zastosowanych metod jest bardzo szeroki i obejmuje techniki biochemiczne, metody biologii komórki i biologii molekularnej, dzięki którym Doktorantka prowadziła hodowle komórkowe, różnicowała preadipocyty do adipocytów oraz przeprowadziła analizę ekspresji genów, poziomu metylacji DNA i metylacji/acetylacji histonów.

Brak Dyskusji nie pozwolił Doktorantce wykazać swojej dojrzałości naukowej i zdolności do kompleksowej interpretacji uzyskanych wyników w świetle aktualnego piśmiennictwa.

Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów językowych i edytorskich np. *in vitro* (str. 10) i nazwy genów ( np. *SLC2A4*, str. 26) powinny być pisane kursywą, nazwy mysich genów (str. 26) pierwsza litera powinna być wielka pozostałe małe.

Chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedzi na następujące pytania:

1. Dlaczego do badania metylacji histonów wybrano H3K4me3 i acetylację H3K9/14ac?
2. Dlaczego badano ekspresję genów *SITR7* i *SIRT1* biorąc pod uwagę wybraną modyfikację H3K9/14ac?
3. Dlaczego w aspekcie uzyskanych wyników i pozytywnej korelacji ekspresji *SIRT* z ekspresją genów związanych z insuliną stwierdzono, iż odgrywają one kluczową rolę w rozwoju insulinooporności?
4. Dlaczego w prezentowanych wynikach badań (publikacja nr 3) niektóre korelacje, opisane jako dodatnie lub ujemne, nie odpowiadają wprost wynikom prezentowanym na wykresach? Na przykład, przy wzroście ekspresji *IL-10* w komórkach i spadku poziomu DNA oraz metylacji i acetylacji histonu H3 wykazano dodatnią korelację między ekspresją genu *IL-10* a acetylacją H3 po 72 h (wykres 2).


### **Podsumowanie**

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że doświadczenia stanowiące postawę dysertacji wymagały poznania i umiejętnego stosowania wielu metod badawczych przez Doktorantkę. Metody zostały właściwie dobrane biorąc pod uwagę wyznaczone cele. Uzyskane wyniki są interesujące i dostarczają nowej wiedzy w zakresie regulacji epigenetycznej ekspresji kluczowych dla szlaku insulinowego i metabolizmu glukozy genów, których deregulacja może być zaangażowana w indukcję insulinooporności. Zatem, pozytywnie oceniam przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską mgr Anety Cierzniak, a przedstawione w recenzji uwagi i postawione pytania nie umniejszają pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej.

### **Wniosek końcowy**

W mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Anety Cierzniaak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Katedry Genetyki



*dr hab. n med. Anna Sadakierska-Chudy, prof. KAAFM*