



Łódź, 30 maja 2022

Prof. dr hab. n. med. Marta Wiszniewska
Kierownik Kliniki Chorób Zawodowych i Zdrowia Środowiskowego
Instytut Medycyny Pracy imienia prof. dra Jerzego Nofera w Łodzi

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Anety Cierzniak
pt. Ocena zmian epigenetycznych związanych z rozwojem oporności na
insulinę w komórce tłuszczowej

Praca doktorska mgr Anety Cierzniak p.t. „Ocena zmian epigenetycznych związanych z rozwojem oporności na insulinę w komórce tłuszczowej” została zrealizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Dobosza i dr Małgorzaty Małodobrej-Mazur w Zakładzie Techniki Molekularnych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa obejmuje cykl prac opublikowanych w czasopiśmie recenzowanych. Cykl prac poprzedzony jest wprowadzeniem, w którym Doktorantka opisała podstawowe pojęcia i zagadnienia dotyczące obszaru pracy doktorskiej, nakreśliła tematykę, która wymaga jeszcze doprecyzowania i uzasadniła, dlaczego podjęła się zbadania zagadnień związanych z oceną zmian epigenetycznych związanych z rozwojem oporności na insulinę w komórce tłuszczowej. Na kolejnych stronach Doktorantka przedstawiła założenia i cele projektu badawczego oraz opisała publikacje stanowiące spójny cykl tematyczny, wyodrębniając kluczowe wyniki i wnioski dla każdej z prac. W sekcji piśmiennictwo Doktorantka przedstawiła najistotniejsze prace odnoszące się do tematyki rozprawy.

Zasadniczą częścią pracy są trzy prace oryginalne opublikowane w języku angielskim. W dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej drugim autorem. Okres od złożenia pracy do jej przyjęcia trwał odpowiednio 2, 3 i 5 miesięcy, co pozwala przypuszczać, że recenzenci nie mieli wątpliwości, a manuskrypty były poprawne.

Do rozprawy załączono także oświadczenia współautorów publikacji oraz zgodę Komisji Bioetycznej. Jest to kompletny materiał, który może być podstawą recenzowania rozprawy doktorskiej mającej postać monotematycznego cyklu. Temat pracy jest zgodny z warunkami stawianymi rozprawom doktorskim, to znaczy wiąże się z nowym nierozpoznanym problemem badawczym.



Przedmiotem całej rozprawy jest ocena zmian epigenetycznych związanych z rozwojem oporności na insulinę w komórce tłuszczowej. Na cykl składają się następujące trzy prace oryginalne:

- Aneta Cierznia, Dorota Pawełka, Krzysztof Kaliszewski, Jerzy Rudnicki, Tadeusz Dobosz, Małgorzata Małodobra-Mazur: DNA methylation in adipocytes from visceral and subcutaneous adipose tissue influences insulin-signaling gene expression in obese individuals. *International Journal of Obesity* 2021; 45(3): 650-658, doi: 10.1038/s41366-020-00729-7, IF: 5.095, Pkt. MNiSW: 100
- Małgorzata Małodobra-Mazur, Aneta Cierznia, Aneta Myszczyzyn, Krzysztof Kaliszewski, Tadeusz Dobosz: Histone modifications influence the insulin-signaling genes and are related to insulin resistance in human adipocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2021; 137; art.106031, doi: 10.1016/j.biocel.2021.106031, IF: 5.085, Pkt. MNiSW: 100
- Aneta Cierznia, Krzysztof Kaliszewski, Małgorzata Małodobra-Mazur: The preliminary evaluation of epigenetic modifications regulating the expression of IL10 in insulin-resistant adipocytes. *Genes* 2022; 13(2); art.294, doi: 10.3390/genes13020294, IF: 4.096, Pkt. MNiSW: 100.

Dwie pierwsze prace zostały opublikowane w 2021 roku, a ostatnia w 2022 roku. Oceniając poziom cyklu, warto zwrócić uwagę, że wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie mających wg Ministerstwa Edukacji i Nauki 100 punktów. Łączna punktacja za prace przedstawione w cyklu składającym się na rozprawę doktorską wynosi 14.276 IF i 300 pkt MNiSW.

Mimo, że nie ma formalnego wymogu całkowitej zgodności tematycznej wszystkich składowych, Doktorantka opracowała cykl o bardzo logicznej konstrukcji, gdzie poszczególne elementy wzajemnie się uzupełniają. Sformułowała siedem szczegółowych celów badawczych, a każdy z trzech artykułów jest próbą odpowiedzi na problem badawczy powiązanych z danym celem.

W I publikacji Doktorantka podjęła się oceny wpływu otyłości na regulację epigenetyczną w postaci metylacji DNA na poziomie globalnym i miejscowo specyficznym, a także na dysregulację ekspresji genów kluczowych dla insulinooporności. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem materiału biologicznego w formie tkanek tłuszczowych obu frakcji: trzewnej i podskórnej. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że insulinooporności ze współistniejącą otyłością towarzyszą zaburzenia ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego, metabolizmu lipidów, regulacji transkrypcji oraz kodujących adipokiny i enzymy biorące udział w generowaniu metylacji DNA w tkance tłuszczowej, zarówno w komponentie podskórnej, jak i trzewnej. Wykazano znaczne obniżenie ekspresji wspomnianych genów u osób otyłych wykazujących oporność na insulinę. Metylacja DNA stanowiła czynnik regulujący ekspresję genów u osób otyłych z



insulinoopornością o czym świadczyła zaobserwowana zwiększona metylacja DNA w adipocytach osób otyłych z insulinoopornością, zwiększony poziom metylacji regionów promotorowych genów kluczowych dla szlaku insulinowego (SLC2A4), a także regulacji adipogenezy i metabolizmu glukozy (PPARG, ADIPOQ), który korelował ujemnie z poziomem ekspresji tych genów. PPARy jako czynnik transkrypcyjny odgrywał kluczową rolę w rozwoju insulinooporności u osób otyłych poprzez regulację ekspresji innych genów istotnych dla utrzymania wrażliwości na insulinę w komórkach tłuszczowych. W ramach badań wskazano, że regulacja epigenetyczna ekspresji PPARG może stanowić pomost łączący współzależność molekularną pomiędzy otyłością i insulinoopornością a metylotransferaza DNA kodowana przez gen DNMT1 może odgrywać kluczową rolę w regulacji epigenetycznej powiązanej z otyłością i insulinoopornością.

W II publikacji Doktorantka oceniła modyfikacje epigenetyczne na poziomie histonów w badanym materiale biologicznym. Poddała analizie potrójną metylację lizyny 4 (H3K4me3) i acetylację lizyny 9 i 14 (H3K9/14ac) w obrębie histonu 3 na poziomie globalnym oraz miejscowo specyficznym z uwzględnieniem regionów promotorowych genów PPARG, SLC2A4 i ADIPOQ oraz przeanalizowała ekspresję panelu genów kluczowych dla regulacji wrażliwości na insulinę, adipogenezy, metabolizmu lipidów, a także kodujących czynniki transkrypcyjne i białka o aktywności enzymatycznej uczestniczące w tworzeniu modyfikacji epigenetycznych. W analizach wykazano, że modyfikacje epigenetyczne w obrębie histonów mają bezpośredni wpływ na regulację ekspresji genów kluczowych dla insulinooporności, której towarzyszą zaburzenia w ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego (SLC2A4), kodujących czynnik transkrypcyjny PPARy (PPARG) i adiponektynę (ADIPOQ). Wykazano obniżony poziom modyfikacji epigenetycznych u pacjentów z insulinoopornością i zaburzenia w ekspresji badanych genów, który został potwierdzony na modelu komórkowym bazującym na ludzkich komórkach frakcji trzewnej i podskórnej. Większość zmian epigenetycznych zarówno na poziomie DNA, jak i histonów pojawiało się po 72 h od wyidukowania insulinooporności w modelu komórkowym ludzkich/mysich adipocytów. Natomiast tkanka tłuszczowa trzewna wykazywała szybszą podatność na zmiany w regulacji o podłożu epigenetycznym niż jej komponenta podskórna co jak wskazała Doktorantka może świadczyć o jej zwiększonej podatności na zaburzenia o podłożu metabolicznym. Mysi model wykazywał większą spójność z wynikami uzyskanymi z komórek komponenty podskórnej. Ostatnie wnioski z tej części pracy badawczej dotyczyły PPARy jako czynnika transkrypcyjnego, który odgrywał kluczową rolę w rozwoju insulinooporności w adipocytach i deacetylaz, które mogą odgrywać kluczową rolę w regulacji epigenetycznej na poziomie histonów w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych.

III publikacja prezentuje ocenę modyfikacji epigenetycznych na poziomie histonów (H3K4me3; H3K9/14ac) i DNA (metylacja wysp CpG) związanych z regionem promotorowym genu kodującego interleukinę 10 i jej wpływu na ekspresję *IL10* w wykorzystanym materiale biologicznym. Na podstawie wykonanych badań wykazano, że miejscowo specyficzne



modyfikacje epigenetyczne na poziomie DNA i histonów mogą mieć istotny wpływ na regulację ekspresji *IL10* w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych. Modyfikacje epigenetyczne mogą wpływać na siebie, co zaobserwowane zostało w ludzkim modelu komórkowym frakcji podskórnej i trzewnej, gdzie redukcji ilości jednej modyfikacji epigenetycznej towarzyszył wzrost drugiej. Oba zaobserwowane zjawiska zostały potwierdzone wykazaną ujemną korelacją między modyfikacjami epigenetycznymi na poziomie DNA i histonów. Dodatkowo odmienny profil ekspresji *IL10* w modelach komórkowych pochodzenia ludzkiego obu frakcji tkanki tłuszczowej potwierdza różnice metaboliczne między jej komponentą podskórną i trzewną, szczególnie w kontekście podatności na stan zapalny. 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.

W ramach przeprowadzonych badań doktorantka wykazała istotny wpływ regulacji epigenetycznej, zarówno na poziomie DNA jak i histonów, na zmiany w ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego, regulacji adipogenezy i metabolizmu glukozy. Zaburzenia w transkrypcji prowadzące do zmian w syntezie ważnych metabolicznie białek mogą bezpośrednio zakłócać działanie określonych szlaków, jednocześnie prowadząc do rozwoju chorób metabolicznych. Doktorantka wykazała także, że w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych istotną rolę odgrywa strategiczny czynnik transkrypcyjny w postaci PPAR γ , którego ekspresja genu również podlega regulacji epigenetycznej.

Niewątpliwym walorem pracy przedstawionej do recenzji jest forma, polegająca na kompilacji prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach. Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę zwiększające wiedzę o molekularnych mechanizmach odpowiedzialnych za rozwój insulinooporności ze współistniejącą otyłością, która w sprzyjających warunkach może przyczynić się do rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy typu 2, faktycznie mogą w przyszłości znaleźć kliniczne zastosowanie dla opracowania leczenia przyczynowego.

Słabych stron pracy nie odnalazłam. Doktorantka w prezentowanej pracy badała obszar dotyczący zaburzeń tolerancji komórek na insulinę, które przy współistniejącej otyłości mogą prowadzić do rozwoju cukrzycy typu 2. Moje pytanie do Doktorantki dotyczy wskazania klinicznego zastosowania innych wyników badań i wskazania schorzeń, w których ocena zmian na poziomie regulacji epigenetycznej pomogła lub pomoże w opracowaniu leczenia przyczynowego, określenia aktualnie prowadzonych badań i dalszych kierunków badawczych w tym zakresie.



Podsumowując:

Wyniki i wnioski prezentowane w publikacjach, dokładnie odpowiadają postawionym przez Doktorantkę celom badania. Przedawniona praca pod względem merytorycznym spełnia ustawowe warunki, które powinna spełniać praca doktorska, stanowi oryginalne, samodzielne rozwiązanie problemu naukowego. Świadczy o bardzo dużej wiedzy teoretycznej kandydatki, umiejętności poprowadzenia badań naukowych, analiz statystycznych i konstrukcji wniosków.

Zastosowane przez Doktorantkę metody badań oraz analizy statystyczne są bardzo dobrze dobrane i nie budzą zastrzeżeń. Publikacje wchodzące w skład cyklu osiągnęły bardzo wysoki Impact Factor, przewyższający wartości zazwyczaj wymagane na stopień doktora n. medycznych lub doktora nauk o zdrowiu. Na uwagę zasługuje też bardzo staranne opracowanie redakcyjne rozprawy doktorskiej i wyjątkowa poprawność językowa.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska w pełni spełnia kryteria i warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Występuję z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Anety Cierznia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na stopień złożoności prowadzonych analiz, ich wagę naukową i doskonale opublikowane wyniki badań **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Marta Wiszniewska

KIEROWNIK
ODDZIAŁU CHOROÓB ZAWODOWYCH
Klinika Chorób Zawodowych
i Zdrowia Środowiskowego
Wiszniewska
dr hab. n. med. Marta Wiszniewska prof. IMP

