

Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Uniwersytecka 7
25-406 Kielce
tel. 41 349 63 31
email: arabski@ujk.edu.pl

Dr hab. Michał Arabski
Zakład Biologii Medycznej
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Adama Wróblewskiego

Modyfikacje epigenetyczne genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej

Mechanizmy epigenetyczne kontrolują aktywność genów i wpływają na rozwój organizmu, a ich zakłócenie może powodować szereg zmian o charakterze patologicznym przyczyniając się m.in. do otyłości i zmian prowadzących do rozwoju cukrzycy typu 2. Zagadnienie to ma charakter aktualny w świetle prowadzonych badań o zasięgu światowym i dotyczy ono roli epigenetyki zarówno w rozwoju chorób, jak również efektu zmiany epigenetycznych jako odpowiedź na chorobę. Istotne znaczenie obok predyspozycji genetycznych mają tutaj czynniki środowiskowe przyczyniające się do zmienności epigenetycznej w kontekście zaburzeń metabolizmu glukozy, jak procesy starzenia się czy nawyki żywieniowe. Wyniki badań zależności pomiędzy otyłością, a mechanizmami epigenetycznymi wskazują na ich korelację, a zróżnicowana metylacja może być rozpatrywana jako czynnik prognostyczny otyłości. Badania nad podłożem metabolicznym chorób wymagają jednak szerokiego, „omicznego” podejścia metodycznego, co pozwala w świetle badań genetycznych na wnioskowanie dotyczące zarówno poziomu ekspresji genów jak i mechanizmów ich regulujących zaangażowanych w procesy patologiczne towarzyszące cukrzycy. Wiedza ta ma ważne przełożenie aplikacyjne dla przyszłych strategii terapeutycznych w leczeniu otyłości i cukrzycy typu 2. Wyniki pracy doktorskiej Pana Adama Wróblewskiego pt. *Modyfikacje epigenetyczne genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej* dostarczają

nowej wiedzy w zakresie patofizjologii cukrzycy i biologicznej roli tkanki tłuszczowej. Badania te dotyczą efektu modyfikacji epigenetycznych genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością w warunkach zaburzonej gospodarki węglowodanowej. Cel pracy został precyzyjnie sformułowany i zrealizowano go stosując zarówno model *in vitro*, jak i *ex vivo*, co należy podkreślić. W badaniach na modelu *in vitro* wykorzystano komórki wisceralne preadipocytów człowieka HPA-v na trzech etapach rozwoju w warunkach przewlekłej i przejściowej hiperglikemii w porównaniu do komórek kontrolnych. Określono poziom ekspresji wybranych genów i ich regulatorów miRNA związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością na poziomie mRNA i na poziomie białka APN oraz IL-6 oraz poziom acetylacji i metylacji histonów w regionach promotorowych genów *ADIPOQ* i *IL-6*. W modelu *ex vivo* wykorzystano prawidłowo sklasyfikowany materiał kliniczny tj. próbki wisceralnej tkanki tłuszczowej z otrzewnej trzewnej i krwi żyłnej od pacjentów z Oddziału Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W próbkach określono poziom ekspresji genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością na poziomie RNA i ich regulatorów miRNA (panel wybrany na podstawie danych literaturowych).

Praca doktorska Pana Adama Wróblewskiego stanowiąca podstawę do nadania stopnia doktora została wykonana w Zakładzie Biochemii Medycznej pod kierunkiem prof. dr hab. n med. Janusza Szemraja. Badania zostały sfinansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS 2015/17/B/NZ7/03019, jak również w ramach środków Polskiego Towarzystwa Chorób Metabolicznych.

Rozprawę doktorską stanowi cykl spójnych tematycznie trzech publikacji naukowych: dwóch artykułów doświadczalnych oraz artykułu przeglądowego (sumarycznie 420 pkt. MEiN; IF = 14.14) opublikowanych w latach 2019-2023 z dominującym udziałem Doktoranta:

1. Wróblewski A, Strycharz J, Świdarska E, Drewniak K, Drzewoski J, Szemraj J, Kasznicki J, Śliwińska A. Molecular Insight into the Interaction between Epigenetics and Leptin in Metabolic Disorders. *Nutrients*. 2019 Aug 12;11(8):1872. doi: 10.3390/nu11081872. PMID: 31408957; PMCID: PMC6723573.
2. Wróblewski A, Strycharz J, Świdarska E, Balcerczyk A, Szemraj J, Drzewoski J, Śliwińska A. Chronic and Transient Hyperglycemia Induces Changes in the Expression Patterns of IL6 and ADIPOQ Genes and Their Associated Epigenetic Modifications in Differentiating Human Visceral Adipocytes. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 28;22(13):6964. doi: 10.3390/ijms22136964. PMID: 34203452; PMCID: PMC8268546.

3. Wróblewski A, Strycharz J, Oszajca K, Czarny P, Świdorska E, Matyjas T, Zieleniak A, Rucińska M, Pomorski L, Drzewoski J, Śliwińska A, Szemraj J. Dysregulation of Inflammation, Oxidative Stress, and Glucose Metabolism-Related Genes and miRNAs in Visceral Adipose Tissue of Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Med Sci Monit.* 2023 Jul 9;29:e939299. doi: 10.12659/MSM.939299. PMID: 37422695; PMCID: PMC10340125.

Cel badań został osiągnięty a uzyskane wyniki zestawiono z najnowszymi danymi literaturowymi w ramach poszczególnych publikacji naukowych.

Pierwsza z nich (**publikacja 1**) to opracowanie o charakterze pracy przeglądowej stanowiące wprowadzenie do tematyki badawczej realizowanej w ramach pracy doktorskiej. Publikacja stanowi aktualne podsumowanie z zakresu znajomości epigenetycznej regulacji leptyny oraz indukowanych przez leptynę modyfikacji epigenetycznych w zaburzeniach metabolicznych i zjawiskach z nimi związanych. Doktorant we wstępie omówił strukturę, mechanizmy sekrecji i funkcji leptyny. Następnie w rozdziale dotyczącym mechanizmów modyfikacji epigenetycznych, odniósł się do zagadnień związanych z regulacją metylacji DNA, potranslacyjnej modyfikacji histonów oraz interferencją miRNA, wskazując te które ulegają zaburzeniom m.in. w trakcie procesów zapalnych, zmianom związanym z otyłością, w tym w cukrzycy typu 2. W kolejnych częściach pracy wyczerpująco opisał epigenetyczną regulację ekspresji leptyny w zaburzeniach metabolicznych oraz modyfikacje epigenetyczne w nich indukowane leptyną, w konkretnych mechanizmach tj. metylacja DNA, potranslacyjnej modyfikacji histonów, miRNA. Następnie systematycznie i szczegółowo przedstawił aktualną wiedzę z zakresu epigenetyki i leptyny w kontekście adipogenezy oraz zaburzeń metabolicznych w rozwoju płodowym. Do tej części recenzji mam pytanie dotyczące zależności między mikrobiomem jelitowym w bilansie energetycznym gospodarza a funkcjami odpornościowymi. Czy leptyna może w znaczący sposób regulować skład ilościowy lub/i jakościowy flory bakteryjnej?

W **publikacjach 2 i 3** o charakterze doświadczalnym, Doktorant określił wpływ hiperglikemii na możliwość modyfikacji epigenetycznych i ekspresję interleukiny 6 i adiponektyny podczas adipogenezy ludzkich preadipocytów trzewnych. Zaobserwowano, iż badany stan metaboliczny może promować indukcję przewlekłego podprogowego stanu zapalnego oraz insulinooporność. Szczególnym osiągnięciem naukowym jest weryfikacji efektu badanego panelu miRNA oraz potranslacyjnej modyfikacji histonów na zmiany ekspresji genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością. W tej części recenzji mam pytanie dotyczące poziomu swoistości przeanalizowanych miRNA dla zmian towarzyszących cukrzycy typu 2 w odniesieniu do innych

schorzeń w patomechanizmie których można zaobserwować zaburzenia na poziomie procesu zapalnego. Ponadto, ciekawym wnioskiem badań o znaczeniu aplikacyjnym jest opisane zjawisko pamięci metabolicznej związane z utrwaleniem efektu hiperglikemii w adipocytach wisceralnych na drodze zależnej od mechanizmów epigenetycznych. W badaniach *ex vivo*, Doktorant wykazał podwyższoną ekspresję miR-10b-5p, miR-132-3p, miR-20a-5p, miR-21-5p i miR-26a-5p, które jako związane z adipogenezą, stanem zapalnym, metabolizmem glukozy oraz insulinoopornością mogą w sposób pośredni modulować ekspresję genów zaangażowanych w powyższych procesy w tkance tłuszczowej białej w cukrzycy typu 2. Jak podkreśla Doktorant, wymaga to jednak kolejnych badań, a ich efekty mogą mieć znaczenie praktyczne w poszukiwaniu nowych rozwiązań terapeutycznych.

Publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta na którą składa się obiektywna weryfikacja danych i rzetelne wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników oraz bogaty warsztat metodyczny tj. zastosowanie szeregu metod z zakresu analiz transkryptomicznych, technik immunoenzymatycznych oraz narzędzi statystycznych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana Adama Wróblewskiego pt. *Modyfikacje epigenetyczne genów związanych z procesem zapalnym i insulinoopornością w wisceralnych adipocytach hodowanych w hiperglikemii i wisceralnej tkance tłuszczowej pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. po. 1789). Biorąc pod uwagę udokumentowaną umiejętność prowadzenia badań naukowych oraz wiedzę teoretyczną wnosząc do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana Adama Wróblewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

Michał Anielski