

Załącznik nr 2a  
do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

**Alina Kuryłowicz**

**Autoreferat**

**Zespół Kliniczno-Badawczy Epigenetyki Człowieka  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego  
Polskiej Akademii Nauk**

Warszawa 2018

**1. Imię i Nazwisko:** Alina Ewa Kuryłowicz

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.**

- 2002 dyplom ukończenia studiów z wyróżnieniem na I Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny)
- 2006 dyplom doktora nauk medycznych (obrona z wyróżnieniem) uzyskany w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, promotor Prof. dr hab. n. med. Tomasz Bednarczuk, tytuł rozprawy doktorskiej: „Związek polimorfizmów genów układu witaminy D z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa”
- 2007 dyplom ukończenia podyplomowych studiów „Poradnictwo Żywieniowe i Dietetyczne” na wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- 2009 dyplom specjalisty w dziedzinie chorób wewnętrznych, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi
- 2014 dyplom specjalisty w dziedzinie endokrynologii, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi
- 2017 dyplom specjalisty w dziedzinie diabetologii, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

- 2004-2006 studia doktoranckie w Zakładzie Badawczo-Lecznym Endokrynologii IMDiK PAN
- 2006-2007 asystent w Zakładzie Badawczo-Lecznym Endokrynologii IMDiK PAN
- 2007-2017 adiunkt w Zakładzie Badawczo-Lecznym Endokrynologii a następnie w Zespole Kliniczno-Badawczym Epigenetyki Człowieka IMDiK PAN
- od 2010 starszy asystent w Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- od 2017 asystent w Zespole Kliniczno-Badawczym Epigenetyki Człowieka IMDiK PAN

**4. Wykazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

**ZWIĄZANE Z OTYŁOŚCIĄ ZMIANY W EKSPRESJI GENÓW W TKANKACH TŁUSZCZOWYCH CZŁOWIEKA JAKO POTENCJALNY CEL DLA NOWYCH KONCEPCJI TERAPEUTYCZNYCH**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

***Prace oryginalne:***

1) Jonas MI, **Kuryłowicz A\*<sup>#</sup>**, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Wierzbicki Z, Chmura A, Pruszczyk P, Puzianowska-Kuznicka M. Interleukins 6 and 15 levels are higher in subcutaneous adipose tissue, but obesity is associated with their increased content in visceral fat depots. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 25817-25830. **IF: 3,257; KBN/MNiSW: 30**

2) Jonas MI, **Kuryłowicz A\*<sup>#</sup>**, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Domienik-Karłowicz J, Puzianowska-Kuznicka M. Adiponectin/resistin interplay in serum and in adipose tissue of obese and normal-weight individuals. *Diabetol Metab Syndr* 2017; 9: 95. **IF: 2,347; KBN/MNiSW: 20**

3) **Kuryłowicz A<sup>#</sup>**, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik ZA, Wierzbicki Z, Chmura A, Puzianowska-Kuznicka M. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J Transl Med* 2015; 13:31. **IF: 3,694; KBN/MNiSW: 35**

4) **Kuryłowicz A<sup>#</sup>**, Owczarz M, Polosak J, Jonas MI, Lisik W, Jonas M, Chmura A, Puzianowska-Kuznicka M. SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated by microRNAs but not by methylation status. *Int J Obes (Lond)* 2016; 40: 1635-1642. **IF: 5,487; KBN/MNiSW: 40**

5) **Kuryłowicz A<sup>#</sup>**, Wicik Z, Owczarz M, Jonas MI, Kotlarek M, Świerniak M, Lisik W, Jonas M, Noszczyk B, Puzianowska-Kuźnicka M. NGS reveals molecular pathways affected by obesity and weight loss-related changes in miRNA levels in adipose tissue. *Int J Mol Sci* 2017; 19 (1). **IF: 3,226; KBN/MNiSW: 30**

### **Prace poglądowe:**

- 1) **Kuryłowicz A<sup>#</sup>**. Stimulation of thermogenesis via beta-adrenergic and thyroid hormone receptors agonists in obesity treatment – possible reasons for therapy resistance. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 2015; 6:145.
- 2) **Kuryłowicz A<sup>#</sup>**. In search of new therapeutic targets in obesity treatment: sirtuins. *Int J Mol Sci* 2016; 17 (4). pii: E572. **IF: 3,226; KBN/MNiSW: 30**
- 3) Białecka-Florjańczyk E, Fabiszewska AU, Krzyczkowska J, **Kuryłowicz A**. Synthetic and natural lipase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18: 672-683. **IF: 2,661; KBN/MNiSW: 30**

\* **pierwszy, równorzędny autor**

# **autor korespondencyjny**

**Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia: 18,011 (23,898 z pracami poglądowymi)**

**Łączna punktacja KBN/MNiSW: 155 (215 z pracami poglądowymi)**

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

## **I. WSTĘP**

Zmiany dotyczące stylu życia i nawyków dietetycznych, które dokonały się w ciągu ostatnich lat, zaowocowały pandemią otyłości. Otyłość, definiowana jako nadmierne gromadzenie tkanki tłuszczowej w organizmie (powyżej 30% masy ciała u kobiet i powyżej 20% u mężczyzn) jest obecnie uważana za chorobę cywilizacyjną. Według raportu WHO z 2016r aż 39% światowej populacji ma nadwagę, a około 13% jest otyłe. Szacuje się, że na całym świecie liczba osób z nadwagą i otyłością potroiła się w ciągu ostatnich 40 lat, a częstość występowania otyłości szybko wzrasta we wszystkich kategoriach wiekowych.

Dane epidemiologiczne wskazują, że otyłość przyczynia się do wzrostu ogólnej śmiertelności zarówno bezpośrednio jak i pośrednio, poprzez zwiększenie ryzyka wystąpienia takich powikłań jak cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM), dyslipidemia, choroby układu krążenia, układu oddechowego i choroby nowotworowe. Rosnąca liczba osób otyłych przekłada się na rosnące koszty leczenia tych chorób i stanowi obecnie istotny problem społeczno-ekonomiczny [Klaus JR, 2009].

Podstawowym celem leczenia otyłości staje się więc obecnie nie tylko redukcja masy ciała, ale również zapobieganie rozwojowi związanych z nią powikłań. Niestety, większość dostępnych nieinwazyjnych metod leczenia osób otyłych (opartych na stosowaniu diet niskoenergetycznych, zwiększonym wysiłku fizycznym czy lekach zmniejszających wchłanianie tłuszczów w przewodzie pokarmowym lub wpływających na ośrodkową kontrolę głodu i sytości) nie przynosi trwałych rezultatów. Z kolei zabiegi bariatryczne, choć

skuteczne, są kosztowne i obciążone ryzykiem powikłań. Dlatego też istnieje ciągła potrzeba badań nad patogenezą otyłości w celu opracowania nowych, nieinwazyjnych metod jej leczenia.

Badania ostatnich lat wykazały, że tkanka tłuszczowa biała nie jest wyłącznie magazynem energetycznym organizmu, ale również źródłem wielu związków o działaniu auto- i parakrynnym, w tym klasycznych cytokin (np. interleukin, IL) jak i swoistych cytokin zwanych adipokinami, hormonów, czynników wzrostu i substancji wazoaktywnych. Ponadto, w obrębie tkanki tłuszczowej białej wykazano obecność brązowych adipocytów, których liczba i aktywność może determinować efektywność termogenezy. Stwierdzono, że w przebiegu otyłości dochodzi nie tylko do zwiększenia ilości tkanki tłuszczowej, ale również do zmian w jej aktywności metabolicznej i wydzielniczej, a również do zmiany proporcji między białymi i brązowymi adipocytami. Zmiany te mają negatywny wpływ na funkcję wielu narządów i tkanek, a zatem przyczyniają się do rozwoju przewlekłych chorób towarzyszących otyłości [Hamdy O, 2006]. Dlatego w przywróceniu prawidłowej funkcji tkanki tłuszczowej upatruje się metodę leczenia otyłości i związanych z nią powikłań.

## II. CEL BADAŃ

W moich badaniach, w celu wyznaczenia potencjalnych nowych koncepcji terapeutycznych, oceniałam związane z otyłością zmiany w ekspresji wybranych genów w tkankach tłuszczowych oraz rolę, jaką mogą w tym procesie odgrywać modyfikacje epigenetyczne (metylacja DNA i interferencja mikroRNA).

## III. MATERIAŁ I METODY

Wszystkie opisane poniżej badania przeprowadziłam na unikalnym materiale, jaki stanowiły tkanki tłuszczowe i surowice uzyskane od 50 osób otyłych (43 kobiet i 7 mężczyzn) w wieku 20-59 lat (średnia 42,02 lat; odchylenie standardowe (SD) 10,33 lat). Zgodnie z klasyfikacją WHO, u wszystkich pacjentów zdiagnozowano otyłość klasy III, a ich średni wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*, BMI) wynosił 47,02 kg/m<sup>2</sup> (SD 4,91 kg/m<sup>2</sup>, zakres 35,43-59,26 kg/m<sup>2</sup>), natomiast średni obwód talii – 1,25 m (SD 0,18 m, zakres 0,97-1,67 m). Średnia zawartość tkanki tłuszczowej oceniana metodą impedancji bioelektrycznej wynosiła 63,86% (SD 8,74%, zakres 47,9-79,4%). U 25 otyłych uczestników badania (50%) zdiagnozowano T2DM lub stan przedcukrzycowy (nieprawidłowa glikemia na czczo lub upośledzona tolerancja glukozy), u 31 (62%) nadciśnienie tętnicze, a u 30 (60%) hiperlipidemię. Na podstawie kryteriów zaproponowanych przez International Diabetes Federation dla Europejczyków (obwód talii powyżej 80 cm u kobiet i 94 cm u mężczyzn, oraz współwystępowanie 2 z 3 schorzeń: nadciśnienia tętniczego, dyslipidemii i zaburzeń tolerancji węglowodanów), zespół metaboliczny (ZM) rozpoznano u 33 (66%) osób.

Grupa kontrolna składała się z 28 osób (20 kobiet, 8 mężczyzn), w wieku 22-63 lat (średnia 46,46 lat, SD 14,6 lat), których BMI mieściło się w zakresie normy (20,1-24,93 kg/m<sup>2</sup>, średnia 23,28 kg/m<sup>2</sup>, SD 1,65 kg/m<sup>2</sup>). Chociaż skład ciała nie był w tej grupie oceniany, na podstawie prawidłowych wyników badań krwi i negatywnego wywiadu

chorobowego dotyczącego chorób przewlekłych, w tym składowych ZM, osoby te uznano za zdrowe metabolicznie.

Próbki tkanek tłuszczowych trzewnych (ang. *visceral adipose tissue*, VAT) i podskórnych z okolicy podbrzusza (ang. *subcutaneous adipose tissue*, SAT) pobierane były od pacjentów otyłych podczas operacji bariatrycznych, a tkanki kontrolne – od pacjentów z prawidłową masą ciała podczas planowej cholecystektomii (VAT) lub operowanych z powodu przepukliny pachwinowej (SAT). Dodatkowo, od 19 pacjentów, którym wskutek operacji bariatrycznej udało się zredukować masę ciała, po 24 miesiącach od zabiegu pobrane zostały próbki SAT z okolicy podbrzusza w trakcie zabiegu plastyki powłok brzusznych. Próbek VAT od tych pacjentów nie można było uzyskać, ponieważ podczas zabiegu plastyki powłok brzusznych nie jest otwierana jama otrzewnej. Utworzenie banku tkanek tłuszczowych możliwe było dzięki nawiązaniu przeze mnie współpracy z Prof. dr hab. med. Wojciechem Lisikiem z Kliniki Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr hab. med. Bartłojem Noszczykiem z Kliniki Chirurgii Plastycznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

Bezpośrednio po pobraniu, tkanki były zamrażane w ciekłym azocie, a krew – odwirowywana. Do czasu przeprowadzenia badań tkanki i surowice były przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ze zgromadzonych tkanek wyizolowałam białka oraz kwasy nukleinowe (genomowe DNA i całkowite RNA). Do analizy ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA zastosowałam metodę PCR czasu rzeczywistego (ang. *real-time PCR*). Za pomocą tej samej metody, poprzedzonej trawieniem DNA enzymami wrażliwymi na metylację, analizowałam stopień metylacji regionów regulatorowych wybranych genów. W badaniu interferencji microRNA zastosowałam metodę sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS), której wyniki weryfikowałam metodą *real-time PCR*. W celu pomiaru stężeń wybranych interleukin i adipokin na poziomie białka w surowicy i w tkankach tłuszczowych, zastosowano metodę chemiluminescencji opartą na ELISA.

Wszystkie opisane poniżej projekty zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (decyzje KB/147/2009, KB/91/A/2010 i KB 117/A/2011) i od wszystkich uczestników uzyskano pisemne zgody na udział w badaniach.

## IV. WYNIKI

### 1. Aktywność zapalna tkanki tłuszczowej u osób otyłych i o prawidłowej masie ciała

U osób otyłych rozwija się przewlekły stan zapalny zwany zapaleniem metabolicznym (ang. *metainflammation*). Podwyższony poziom wykładników stanu zapalnego koreluje z ryzykiem rozwoju poważnych powikłań związanych z otyłością, takich jak choroby układu sercowo-naczyniowego, T2DM i dyslipidemia, oraz stymuluje naciekanie śródbłonna przez limfocyty, a także migrację komórek mięśni gładkich naczyń, promując rozwój miażdżycy. Zapalenie może więc stanowić wspólny patomechanizm łączący otyłość z pozostałymi składowymi zespołu metabolicznego. Badania *in vitro* sugerują, że do inicjacji procesu zapalnego dochodzi w samej tkance tłuszczowej w odpowiedzi na nadmiar składników odżywczych. Kumulacja lipidów prowadzi do zwiększonej ekspresji genów kodujących

cytokiny, chemokiny i cząsteczki adhezyjne w adipocytach, co przyciąga komórki układu odpornościowego, które produkują kolejne mediatory zapalne [Gregor MF i Hotamisligil GS, 2011].

Choć zaobserwowano, że otyłości towarzyszy przewlekły stan zapalny, jak dotąd nie ustalono, która z tkanek tłuszczowych, podskórna czy trzewna, odgrywa dominującą rolę w tych procesach. Badania morfologiczne porównujące intensywność nacieku zapalnego w tkankach tłuszczowych o różnej lokalizacji wykazały, że zarówno u osób otyłych jak i o prawidłowej masie ciała, próbki VAT zawierają więcej makrofagów niż SAT [Zhu Y, 2015]. Jednak badania, w których dokonywano korelacji stężeń cytokin w surowicy z częstością występowania chorób związanych z otyłością i z rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej [Mathieu P, 2009; Neeland IJ, 2013] lub z poziomami mRNA dla różnych cytokin [Fox CS, 2007] nie dały jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. Dlatego postanowiłam zmierzyć stężenia wybranych prozapalnych interleukin bezpośrednio na poziomie białka w tkankach tłuszczowych pochodzących od osób otyłych i o prawidłowej masie ciała. Aby ocenić znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, skorelowałam je z parametrami klinicznymi i biochemicznymi, a także z występowaniem chorób związanych z otyłością.

Spośród wielu genów kandydujących kodujących białka zaangażowane w rozwój przewlekłego stanu zapalnego w tkance tłuszczowej, do analizy wybrane zostały cztery interleukiny: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i IL-15. Wybór był podyktowany ich udokumentowanym w badaniach *in vitro* i *in vivo* udziałem w patogenezie powikłań związanych z otyłością, jak również wcześniejszymi doniesieniami o ich podwyższonych stężeniach w surowicach i/lub tkankach tłuszczowych osób otyłych [Nov O, 2013; Eder K, 2009; Nielsen AR, 2008; Strackowski M, 2002]. Warto zauważyć, że dotychczas opublikowano zaledwie kilka badań, w których podjęto próbę bezpośredniego pomiaru stężeń tych cytokin w tkance tłuszczowej, a ich wyniki były niejednoznaczne [Bastard JP, 2000; Pierce JR, 2015].

Moje wyniki wskazują na SAT jako podstawowe miejsce syntezy badanych cytokin, ponieważ oceniane na poziomie białka stężenia IL-6, IL-15 i IL-1 $\beta$  u osób otyłych były znacząco wyższe w SAT niż w VAT. Dodatkowo stwierdziłam, że stężenia IL-6 i IL-15 były wyższe w SAT w porównaniu z VAT również u osób o prawidłowej masie ciała. Z drugiej strony, otyłość wiązała się ze zwiększoną aktywnością prozapalną tkanki tłuszczowej trzewnej, ponieważ VAT osób otyłych zawierała istotnie więcej IL-6 i IL-15 niż VAT osób o prawidłowej masie ciała. To odkrycie jest zgodne z wynikami badań obserwacyjnych łączącymi otyłość centralną z większym nasileniem stanu zapalnego i z większym ryzykiem powikłań metabolicznych, w tym insulinooporności, hiperlipidemii i nadciśnienia tętniczego [Pou KM, 2007; Alexopoulos N, 2014]. Ponadto, w badaniach *in vitro* zaobserwowano, że adipocyty od osób otyłych pochodzące z VAT uwalniają więcej mediatorów prozapalnych (w tym IL-1 $\beta$  i IL-6) niż podskórne adipocyty [Fain JN, 2004]. Poczyniona przeze mnie obserwacja, że osoby otyłe które spełniły kryteria diagnostyczne dla zespołu metabolicznego miały wyższe średnie poziomy IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-15 w VAT niż otyli bez ZM, również popiera tę hipotezę.

W literaturze istnieją jednak również doniesienia o dominującej roli SAT w rozwoju zapalenia metabolicznego, w tym niedawne badanie wykazujące, że poziomy mRNA kilku prozapalnych interleukin były wyższe w SAT niż w VAT otyłych pacjentów [Spoto B, 2014]. Istotnie, otyłość centralna jest często związana ze zwiększoną ilością brzusznej SAT, która

ma unikalny profil ekspresji genów, różny niż SAT pobrana z innych lokalizacji co skutkuje jej wyższą aktywnością metaboliczną w porównaniu np. z tkanką SAT zlokalizowaną w okolicy pośladkowo-udowej [Elbers JM, 1999]. Nasza obserwacja, że brzuszna SAT jest dominującym miejscem syntezy co najmniej części prozapalnych cytokin popiera pogląd, że zwiększona ilość SAT u otyłych może również przyczyniać się do rozwoju zapalenia metabolicznego.

Podsumowując tę część mojej pracy, przeprowadzając analizę ekspresji genów kodujących ważne prozapalne cytokiny na poziomie mRNA i białka, podjęłam próbę odpowiedzi na pytanie, która z tkanek tłuszczowych (podskórna czy trzewna) przyczynia się do rozwoju związanego z otyłością stanu zapalnego. Stwierdziłam, że nawet jeżeli stężenia badanych cytokin są wyższe w tkankach podskórnych niż w trzewnych, otyłość i zespół metaboliczny wiążą się ze zwiększoną aktywnością prozapalną VAT. **Powyższe wyniki zawarłam w pierwszej publikacji składającej się na osiągnięcie naukowe [Jonas M, Kuryłowicz A, 2015].**

## ***2. Związane z otyłością zmiany w syntezie adiponektyny i rezystyny w tkance tłuszczowej***

Z opublikowanych dotychczas badań wynika, że otyłość może prowadzić do zmian w profilu wydzielanych przez tkankę tłuszczową adipokin. Wraz ze wzrostem objętości tkanki tłuszczowej dochodzi do obniżenia w surowicy stężeń adipokin o właściwościach korzystnych metabolicznie na rzecz tych o działaniu sprzyjającym rozwojowi powikłań związanych z otyłością. Prawidłowość ta dotyczy, między innymi, działającej przeciwzapalnie, przeciwmiażdżycowo i anorektycznie adiponektyny, której stężenia mierzone w surowicy osób otyłych były znacząco niższe w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała i korelowały ujemnie z obecnością powikłań metabolicznych [Li S, 2009]. Z kolei towarzyszące otyłości wysokie stężenia działającej prozapalnie i diabetogennie rezystyny korelują z ryzykiem rozwoju insulinooporności i T2DM, miażdżycy tętnic i chorób układu krążenia [Azuma K, 2003]. Biorąc pod uwagę przeciwstawne działanie adiponektyny i rezystyny zasugerowano, że wzajemne oddziaływanie pomiędzy tymi dwoma adipokinami może determinować profil metaboliczny osób otyłych i odpowiadać za rozwój powikłań związanych z otyłością. Zaproponowano, że wskaźnik adiponektyna/rezystyna (AR) może służyć do oceny ryzyka metabolicznego w otyłości, ponieważ jego wartość koreluje dodatnio z ryzykiem rozwoju T2DM i zespołu metabolicznego [Lau CH, 2011].

Nie ustalono jednak, w której z tkanek tłuszczowych, VAT czy SAT, dokonują się związane z otyłością zmiany w syntezie adipokin, tym bardziej, że wszystkie przeprowadzone dotychczas badania oceniały stężenia adipokin na poziomie mRNA. Dlatego w mojej kolejnej pracy postanowiłam zbadać, jak kształtują się poziomy adiponektyny i rezystyny na poziomie białka w surowicy i w tkankach tłuszczowych w zależności od masy ciała oraz jak zmiany stężeń tych adipokin mogą wpłynąć na występowanie związanych z otyłością powikłań.

W badanej przeze mnie grupie stężenia adiponektyny w surowicy u osób otyłych były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej, jednak nie korelowały z obecnością powikłań metabolicznych. Natomiast stężenia rezystyny w surowicy u otyłych uczestników badania



były istotnie wyższe niż u osób o prawidłowej masie ciała i korelowały dodatnio ze stężeniami trójglicerydów, a ujemnie – z poziomami lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*, HDL). Stężenia rezystyny w surowicy były również wyższe u otyłych uczestników badania, którzy cierpieli na nadciśnienie i/lub spełniali kryteria diagnostyczne dla zespołu metabolicznego. Obliczony u badanych pacjentów wskaźnik adiponektyna/rezystyna (AR) był znacznie wyższy w surowicy osób otyłych, szczególnie w tych z ZM, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań. Na tej podstawie można wnioskować, że o ryzyku metabolicznym związanym z otyłością nie decydują stężenia pojedynczych adipokin, a dopiero zachodzące między nimi interakcje.

W kolejnym etapie pracy badałam, jak kształtują się zależności pomiędzy stężeniami adiponektyny i rezystyny w tkankach tłuszczowych w zależności od masy ciała aby ustalić, która z tkanek tłuszczowych: podskórna czy trzewna, odgrywa dominującą rolę w syntezie tych dwóch adipokin. W tym celu oceniona została w badanych tkankach ekspresja genów *ADIPOQ* i *RETN* (kodujących odpowiednio adiponektynę i rezystynę) na poziomie mRNA i białka. W przypadku żadnej z adipokin nie stwierdziłam korelacji pomiędzy stężeniem mRNA i białka, co sugeruje, że w regulacji ekspresji tych dwóch genów istotną rolę mogą odgrywać mechanizmy potranskrypcyjne. Bezpośredni pomiar stężeń obu adipokin w tkankach tłuszczowych pozwolił stwierdzić, że w SAT osób otyłych, poziom adiponektyny jest znacznie niższy, podczas gdy rezystyny – zwiększony w porównaniu z tkankami uzyskanymi od grupy kontrolnej. To odkrycie wspiera hipotezę o dominującej roli SAT w wydzielaniu adipokin i mediatorów stanu zapalnego, a tym samym w rozwoju powikłań związanych z otyłością. Ponadto, w badanej grupie osób otyłych stężenia adiponektyny w surowicy korelowały dodatnio z poziomami mRNA genu *ADIPOQ* w SAT, co wcześniej obserwowali już inni autorzy [Liu M, 2009; Spoto B, 2014].

Na podstawie tych danych nie mogę jednak jednoznacznie stwierdzić, że SAT jest dominującym źródłem adiponektyny i/lub rezystyny w organizmie, ponieważ w żadnej z badanych grup nie zaobserwowałam korelacji pomiędzy stężeniami tych adipokin oznaczonymi na poziomie białka w SAT i ich stężeniami w surowicy. Z drugiej strony stwierdziłam ujemną korelację między stężeniem adiponektyny w surowicy a jej poziomem w VAT u osób otyłych, co pośrednio wskazuje na SAT jako główne źródło tej adipokiny w otyłości. Trudność w jednoznacznym określeniu, która z tkanek tłuszczowych u osób otyłych, trzewna czy podskórna, ma większy wpływ na stężenie adiponektyny i rezystyny w surowicy może wynikać z działania czynników zakłócających uwalnianie adipokin z tkanki tłuszczowej, takich jak zmiany struktury białka, multimeryzacja cząsteczek i lokalne zmiany w środowisku zapalnym.

Warto zauważyć, że w przeciwieństwie do pomiarów wykonanych w surowicy, indeks AR obliczony w tkankach tłuszczowych był niższy w SAT u osób otyłych w porównaniu z grupą kontrolną i nie odzwierciedlał ryzyka metabolicznego. Można to wytłumaczyć faktem, że tkanka tłuszczowa nie jest jedynym źródłem rezystyny w organizmie, dlatego jej poziomy w surowicy są wyższe niż te zmierzone w tkance tłuszczowej [Nogueiras R, 2003].

Podsumowując, stwierdziłam, że poziomy mRNA genów *ADIPOQ* i *RETN* nie korelowały z stężeniami adiponektyny i rezystyny w tkankach tłuszczowych pochodzących od osób otyłych i zdrowych, co sugeruje rolę mechanizmów potranskrypcyjnych w regulacji

ekspresji tych genów. Wykazałam również, że obserwowane w otyłości zmiany w syntezie adiponektyny i rezystyny w tkance tłuszczowej dotyczą głównie SAT. Na koniec stwierdziłam, że indeks AR oparty na pomiarach stężeń adipokin bezpośrednio w tkankach tłuszczowych ma inną wartość prognostyczną w niż wskaźnik AR oznaczany w surowicy i nie odzwierciedla ryzyka metabolicznego u osób otyłych. **Wyniki te zostały opublikowane w drugiej z prac składających się na osiągnięcie naukowe [Jonas M, Kuryłowicz A, 2017].**

Badania nad funkcją tkanki tłuszczowej nie tylko przybliżają nam patogenezę otyłości, ale także mają na celu wskazanie nowych koncepcji jej leczenia. Dlatego w moich innych pracach skoncentrowałam się na potencjalnych molekularnych celach leczenia otyłości i powiązanych z nią powikłań.

### **3. Aktywacja termogenezy jako koncepcja leczenia otyłości**

Istotę rozwoju otyłości prostej stanowi zaburzenie równowagi pomiędzy ilością energii przyjmowanej i energii wydatkowanej oraz przełamanie mechanizmów chroniących organizm przed nadmiernym gromadzeniem substancji zapasowych. Zgodnie z tą definicją, leczenie osób otyłych może być oparte albo na zmniejszeniu ilości przyjmowanej energii, albo na zwiększeniu wydatków energetycznych. Stwierdzenie obecności brązowych adipocytów rozproszonych w tkance tłuszczowej białej wzbudziło zainteresowanie aktywacją termogenezy jako metodą leczenia otyłości.

W celu zweryfikowania tej hipotezy badano szereg zwierząt doświadczalnych, u których dokonano nokautów wybranych genów związanych z termogenezą, jednak wyniki tych eksperymentów były niejednoznaczne i podkreśliły złożoność mechanizmów kontrolujących termogenezę [Marsili A, 2011; Bachman ES, 2002; Pelletier P, 2008; Ukropec J, 2002; Gong DW, 2000]. Prowadzone są również badania *in vitro* dotyczące wykorzystania aktywatorów termogenezy w leczeniu otyłości, takich jak selektywni agoniści receptorów hormonów tarczycy (ang. *thyroid hormone receptors*, THR) czy receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (ang. *adrenergic receptors beta*, ADRB) [Tseng YH, 2010]. Zastosowanie tych związków w leczeniu wymaga jednak potwierdzenia, iż wytypowane białka odgrywają rolę również w rozwoju otyłości u ludzi. Aby odpowiedzieć na to pytanie postanowiłam przeprowadzić analizę porównawczą ekspresji wybranych genów związanych z termogenezą, których produkty mogłyby stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu otyłości, w tkankach tłuszczowych pochodzących od osób otyłych i o prawidłowej masie ciała.

Badane przeze mnie geny tworzyły trzy grupy. W skład pierwszej weszły geny kodujące receptory  $\beta$ -adrenergiczne. Wyniki badań *in vitro* i badań na modelach zwierzęcych sugerują, że prawidłowa funkcja receptorów ADRB2 i ADRB3 jest niezbędna dla przebiegu termogenezy i lipolizy w tkance tłuszczowej [Bachman ES, 2002]. W mojej pracy stwierdziłam, że poziomy mRNA genów *ADRB2* i *ADRB3* w tkankach tłuszczowych osób otyłych są niższe niż u osób o prawidłowej masie ciała, co z jednej strony może przyczyniać się do nieprawidłowego przebiegu lipolizy i termogenezy, a z drugiej – daje podstawy by przypuszczać, że skuteczność agonistów receptorów beta-adrenergicznych u tych chorych będzie ograniczona. Warto zauważyć, że w badanych tkankach nie zaobserwowałam różnic w poziomach mRNA dla *ADRB1*. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami wcześniejszych badań,

w których stwierdzono, że blokada ADRB1 nie hamuje indukowanej zimnem termogenezy u ludzi [Wijers SL, 2001].

Druga analizowana przez mnie grupa składała się z genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm i działanie hormonów tarczycy, najważniejszych hormonów regulujących produkcję energii w mitochondriach. Badania na zwierzętach wykazały, że nokaut dejodynaz (DIO, enzymów metabolizujących hormony tarczycy) zwiększa podatność na otyłość spowodowaną dietą, podczas gdy zwierzęta z nokautem genu *thra* (kodującego receptor hormonów tarczycy  $\alpha$ ) są bardzo wrażliwe na niskie temperatury z powodu całkowitego braku reaktywności brązowych adipocytów na stymulację noradrenergiczną [Marsieli A, 2011; Pelletier P; 2008]. W mojej pracy zaobserwowałam, że tkanki tłuszczowe osób otyłych charakteryzują się niskimi stężeniami mRNA dla genów *DIO2*, *THRA* i *THRB* (kodujących odpowiednio dejodynazę typu 2, receptory hormonów tarczycy  $\alpha$  i  $\beta$ ) co może sprzyjać progresji otyłości i odpowiadać za trudności w utracie masy ciała i oporności na terapie ukierunkowane na ten szlak aktywacji termogenezy. Ta hipoteza jest zgodna z obserwacjami klinicznymi, w których stwierdzono, że otyli pacjenci, pozostający klinicznie w eutyreozie, mają w surowicy wyższe stężenia wolnej trijodotyroniny (fT3) w porównaniu do osób szczupłych [Nannipieri M, 2009]. Można zatem założyć, że zmniejszona liczba receptorów THRA i THRB w tkance tłuszczowej u osób otyłych zmienia fenotyp adipocytów w taki sposób, że stają się one częściowo "oporne" na fT3. Zmniejszona ekspresja *DIO2* skutkująca niższą miejscową konwersją T4 do T3 i obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia T3 może również przyczyniać się do tego zjawiska. W konsekwencji stężenie fT3 w surowicy wzrasta, aby przeciwdziałać oporności tkanek obwodowych na ten hormon, ale może to być wzrost niewystarczający do przywrócenia prawidłowego przebiegu szlaków metabolicznych zależnych od T3 w adipocytach.

Trzecią analizowaną przeze mnie grupę stanowiły geny kodujące białka rozprzegające termogenezę (ang. *uncoupling proteins*, UCPs). Ponieważ ekspresja ich wszystkich jest aktywowana przez T3, można się było spodziewać, że w tkankach tłuszczowych osób otyłych, u których zmniejszona jest ekspresja *THRA*, *THRB* i *DIO2*, stężenia mRNA wszystkich genów kodujących UCP będą obniżone. W badanych przeze mnie tkankach zjawisko to dotyczyło jednak tylko genu *UCP2*, którego warianty genetyczne mają związek z podstawową przemianą materii oraz z występowaniem powikłań metabolicznych otyłości, a uzyskane przeze mnie dane wydają się potwierdzać rolę tego białka w regulacji metabolizmu u ludzi [Brondani LA, 2014]. Nie stwierdziłam natomiast różnic w ekspresji genów kodujących pozostałe dwa białka rozprzegające – UCP1 i UCP3.

Dotychczas niewiele było danych o różnicach w aktywności termogenetycznej między VAT a SAT. Stwierdzenie, że "beżowe" adipocyty występują głównie w SAT mogło sugerować jej dominujący udział w termogenezie [Elabd C, 2009]. Moje badania, w których stwierdziłam, że ekspresja *DIO2*, *ADRB2* i *ADRB3* u otyłych osób była znacznie niższa w VAT niż w SAT, wskazują na niższy potencjał lipolityczny i termogeniczny VAT, co jest zgodne z tą hipotezą.

Przedstawione powyżej wyniki pozwalają stwierdzić, że tkanki tłuszczowe osób otyłych charakteryzują się zmniejszoną ekspresją kluczowych genów związanych z aktywacją termogenezy. Na tej podstawie można przypuszczać, że tkanka tłuszczowa osób otyłych jest

mniej podatna zarówno na bodźce hormonalne, jak i adrenergiczne, a zatem mniej aktywna termogenetycznie niż u osób o prawidłowej masie ciała. Jak wykazałam, zjawisko to może dotyczyć zwłaszcza tkanki tłuszczowej trzewnej. Sprawia to, że w leczeniu otyłości u ludzi skuteczność związków aktywujących termogenezę poprzez wpływ na badane przeze mnie szlaki może być ograniczona. **Powyższe wyniki zawarłam w trzeciej publikacji składającej się na osiągnięcie naukowe [Kuryłowicz A, 2014]. W oparciu o uzyskane dane doświadczalne dokonałam również przeglądu piśmiennictwa na temat zaburzeń termogenezy u osób otyłych i wynikających z tego ograniczeń w zastosowaniu jej aktywatorów w leczeniu otyłości [Kuryłowicz, A 2015].**

#### ***4. Sirtuiny jako cel dla nowych terapii leczenia otyłości***

W moich kolejnych badaniach nad potencjalnymi celami terapeutycznymi w leczeniu otyłości zajęłam się sirtuinami. Sirtuiny (ang. *silent information regulators*, SIRT) są zależnymi od NAD<sup>+</sup> deacetylazami biorącymi udział w potranslacyjnych modyfikacjach białek, a przez to – w regulacji różnych szlaków komórkowych, w tym procesów metabolicznych, zapalnych, wytwarzaniu reaktywnych form tlenu, jak również w kontroli cyklu komórkowego [Kiran S, 2015].

U ssaków zidentyfikowano 7 genów sirtuin (*SIRT1-7*). Ekspresję genów *SIRT* stwierdzono w różnych tkankach ludzkich, w tym tych o kluczowym znaczeniu dla kontroli metabolizmu, tj.: w podwzgórzu, wątrobie, wyspach trzustkowych, mięśniach szkieletowych i w adipocytach [Michishita E, 2005]. W tkankach tych sirtuiny, poprzez modyfikację histonów, czynników transkrypcyjnych i kofaktorów kontrolują aktywność genów istotnych dla regulacji równowagi energetycznej. Udział SIRT w patogenezie otyłości i zespołu metabolicznego wykazano *in vivo* na modelach zwierzęcych: wyciszenie genów *sirt1* i *sirt3* sprzyja rozwojowi otyłości i związanych z nią powikłań metabolicznych, podczas gdy nadekspresja lub nadmierna aktywacja – przyspiesza metabolizm i prowadzi do zmniejszenia masy tkanki tłuszczowej, chroni przed rozwojem zapalenia metabolicznego, insulinooporności i stłuszczenia wątroby [Gillum MP, 2011; Hirschey MD, 2011]. Szczególne znaczenie w kontekście leczenia zaburzeń metabolicznych ma fakt, że szereg czynników środowiskowych takich jak kaloryczność i skład diety, aktywność fizyczna i ekspozycja na niskie temperatury, ma wpływ na ekspresję i aktywność SIRT [Kelly GS, 2015 a & b].

Mając to na uwadze, w kolejnej mojej pracy postanowiłam zbadać, czy otyłość jest związana ze zmianami w ekspresji genów kodujących sirtuiny w tkance tłuszczowej. Co istotne, większość poprzednich prac dotyczących udziału sirtuin w rozwoju otyłości u człowieka koncentrowała się wyłącznie na SIRT1. Moja praca była więc pierwszą, w której oceniona została ekspresja wszystkich siedmiu genów *SIRT* w ludzkiej tkance tłuszczowej.

Stwierdziłam, że średnie poziomy mRNA *SIRT1* w tkankach osób otyłych są niższe, a *SIRT7* – wyższe niż w grupie kontrolnej, podczas gdy ekspresja pozostałych pięciu genów sirtuin jest podobna w tkankach tłuszczowych niezależnie od BMI. Wyniki dotyczące ekspresji *SIRT1* są zgodne z danymi literaturowymi. W pilotażowych badaniach przeprowadzonych na małych grupach pacjentów, SAT osób otyłych charakteryzowała się ponad dwukrotnie niższymi poziomami mRNA *SIRT1*, które wzrastały po redukcji masy ciała [Pedersen SB, 2008; Moschen AR, 2013]. W moim badaniu przeprowadzonym na 156

tkankach potwierdziłam tę obserwację. Dodatkowo, Song i wsp. [Song YS, 2013] wykazali, że najniższe poziomy mRNA *SIRT1* stwierdza się u pacjentów otyłych, u których zdiagnozowano cukrzycę typu 2, podczas gdy w moim badaniu zjawisko to dotyczyło osób z zespołem metabolicznym. Na podstawie tych danych można wnioskować, że zmniejszony poziom działającej lipolitycznie i przeciwzapalnie SIRT1 w tkankach tłuszczowych osób otyłych skutkuje zwiększoną tendencją do kumulacji kwasów tłuszczowych i rozwoju przewlekłego zapalenia o niskim stopniu nasilenia, które jest ważnym czynnikiem ryzyka cukrzycy typu 2 i chorób układu krążenia..

Podczas gdy SIRT1 jest najczęściej badaną z ludzkich sirtuin, wiedza na temat roli SIRT7 w patogenezie otyłości jest ograniczona, a jej ekspresja w ludzkiej tkance tłuszczowej nie została wcześniej udokumentowana. Wiadomo jednak, że u gryzoni nokaut *sirt7* chroni przed rozwojem otyłości spowodowanej dietą wysokotłuszczową, stłuszczeniem wątroby i nietolerancją glukozy. Na poziomie molekularnym zjawiska te można wytłumaczyć udziałem *sirt7* w aktywacji genów odpowiedzialnych za wychwyt kwasów tłuszczowych i syntezę trójglicerydów w wątrobie, a także genów zaangażowanych w termogenezę [Yoshizawa T, 2014]. Dlatego wyniki moich badań wykazujące, że związany z otyłością u ludzi wzrost ilości mRNA *SIRT7* w tkankach tłuszczowych koreluje z hiperlipidemią, jest zgodna z danymi uzyskanymi w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

W literaturze opisywano również bezpośrednią interakcję między SIRT1 i SIRT7 na poziomie molekularnym w testach immunoprecypitacji. W badaniach *in vivo*, obserwowano zwiększone poziomy białka i aktywności enzymatycznej sirt1 w tkance tłuszczowej zwierząt z nokautem *sirt7* [Fang J, 2017]. W moim badaniu zaobserwowałam także ujemną korelację między poziomami mRNA *SIRT1* i *SIRT7* w tkankach tłuszczowych osób otyłych.

Porównując ekspresję genów *SIRT1* i *SIRT7* w tkankach tłuszczowych o różnej lokalizacji, tylko w przypadku *SIRT7* stwierdziłam, że poziom jej mRNA był znamienne wyższy w VAT, w odniesieniu do SAT osób otyłych. W przypadku *SIRT1* nie zaobserwowałam różnic w jej ekspresji w zależności od lokalizacji tkanki tłuszczowej zarówno u osób otyłych jak i o prawidłowej masie ciała.

Podsumowując tę część pracy – wykazałam, że w otyłości dochodzi do obniżenia poziomu mRNA dla genu *SIRT1* i zwiększenia – dla genu *SIRT7* w tkankach tłuszczowych, co wiąże się z niekorzystnym profilem metabolicznym. **Wyniki te zawarłam w publikacji nr 4 w dorobku składającym się na osiągnięcie naukowe [Kuryłowicz A, 2016].**

Im więcej wiadomo na temat wpływu sirtuin na bilans energetyczny organizmu, metabolizm lipidów i glukozy oraz regulację adipogenezy, tym bardziej atrakcyjna jest koncepcja, że ich aktywatory i inhibitory mogą być przydatne w leczeniu otyłości i związanych z nią powikłań. Dane z badań zwierząt transgenicznych dowodzą, że istnieją korzyści wynikające z aktywacji poszczególnych enzymów SIRT. Należy jednak pamiętać, że aktywność SIRT nie ogranicza się do regulacji metabolizmu i obejmuje między innymi kontrolę długowieczności, onkogenezę, a także regulację układu nerwowego i sercowo-naczyniowego. Ponadto, ponieważ działanie SIRT może być specyficzne tkankowo, tylko ukierunkowane podejścia terapeutyczne mogą być skuteczne i umożliwić uniknięcie potencjalnie szkodliwych skutków ubocznych globalnej aktywacji/dezaktywacji SIRT. Dlatego nadal nie możemy powszechnie stosować związków regulujących działanie SIRT w

leczeniu otyłości u ludzi. Jednak wiele takich substancji jest poddawanych obecnie ocenie klinicznej i jest bardzo prawdopodobne, że w najbliższej przyszłości zostaną zarejestrowane nowe strategie terapeutyczne ukierunkowane na selektywną i swoistą tkankowo modulację aktywności SIRT w leczeniu otyłości i jej powikłań. **Rozważania na temat terapeutycznego zastosowania aktywatorów i inhibitorów sirtuin w odniesieniu do badań własnych zawarłam w pracy poglądowej [Kuryłowicz A, 2016].**

### **5. Rola mechanizmów epigenetycznych w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej.**

Patogeneza otyłości jest wieloczynnikowa i składają się na nią złożone interakcje między czynnikami środowiskowymi i genetycznymi. Odkrycie, że tkanka tłuszczowa osób otyłych charakteryzuje się zmienioną ekspresją genów kodujących potencjalne cele terapeutyczne, skłoniło mnie do zbadania, jakie mechanizmy mogą być odpowiedzialne za to zjawisko.

Ostatnie lata przyniosły wiele dowodów na rolę modyfikacji epigenetycznych jako ważnych, aktywowanych przez bodźce środowiskowe, mechanizmów regulujących ekspresję genów. Epigenetykę definiuje się jako częściowo dziedziczne modyfikacje takie jak metylacja DNA, modyfikacje histonów (np. acetylacja, metylacja, fosforylacja lub ubikwitynacja) i interferencja RNA, które wpływają na aktywność genów bez zmiany w sekwencji DNA. W moich badaniach dotyczących roli mechanizmów epigenetycznych w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej stosowałam dwa podejścia badawcze: analizę genów kandydatów oraz analizę wielkoskalową.

#### *a) Badania oparte na analizie genów kandydatów*

#### Rola metylacji DNA w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej

Metylacja DNA jest powszechną cechą genomu i polega na dodaniu grupy metylowej do cytozyny umieszczonej w sekwencji nukleotydów obok guaniny (CpG). Regiony, w których dinukleotydy CpG występują z dużą częstotliwością noszą nazwę wysp CpG. Metylacja DNA w regionach regulatorowych genów powoduje hamowanie ich transkrypcji poprzez ograniczenie dostępu czynników transkrypcyjnych lub aktywację zmieniających strukturę chromatyny korepresorów [Herrera BM, 2011]. Wykazano, że dieta, w tym ubogokaloryczna, może znacząco wpływać na metylację różnych genów w tkance tłuszczowej, a profil tych zmian koreluje ze skutecznością interwencji dietetycznej [Bouchard L, 2010].

Ponieważ aktywność genów związanych z termogenezą, jak i genów kodujących sirtuiny, zależy od czynników środowiskowych, takich jak dieta czy ekspozycja na niskie temperatury, postanowiłam zbadać, czy zaobserwowane przeze mnie zmiany w ich ekspresji w przebiegu otyłości mogą być związane ze stopniem metylacji regionów regulatorowych.

Badanie metylacji genów poprzedziłam analizą *in silico* regionów regulatorowych za pomocą programów CpG Islands Searcher ([www.cpgislands.com](http://www.cpgislands.com)) i CpG Plot (<http://www.ebi.ac.uk>). Obecność wysp CpG stwierdziłam w przypadku 5 genów związanych

z termogenezą, których poziomy mRNA znacząco różniły się w tkankach tłuszczowych osób otyłych i szczupłych (*ADRB2*, *ADRB3*, *THRA*, *THRB* i *DIO2*). Wyspy CpG znalazłam również w sekwencjach regulatorowych *SIRT1* i *SIRT7*. W badanych tkankach nie stwierdziłam jednak znamiennej statystycznie różnicy w stopniu metylacji regionów regulatorowych tych genów między pacjentami z prawidłową masą ciała i z otyłością, a także między próbkami VAT i SAT. Ponadto, poziom metylacji badanych genów nie był związany z poziomem ich mRNA. Wynik ten można wytłumaczyć na wiele sposobów. Po pierwsze, metylacja może nie być głównym mechanizmem regulującym aktywność tych genów w tkance tłuszczowej. Po drugie, analizowane regiony wytypowane na drodze analiz bioinformatycznych w rzeczywistości mogą nie być kluczowe dla regulacji aktywności badanych genów. Po trzecie, w mojej pracy analizowałam całkowitą metylację regionów regulatorowych, podczas gdy dla aktywności transkrypcyjnej mogą mieć znaczenie różnice w metylacji specyficznych cytozyn znajdujących się w miejscach wiązania silnych aktywatorów transkrypcji. Dlatego potrzebne są dalsze badania z wykorzystaniem innych metod analitycznych, aby wyjaśnić, czy metylacja DNA odgrywa rolę w regulacji aktywności genów związanych z termogenezą i genów sirtuin w tkance tłuszczowej w przebiegu otyłości. **Powyższe wyniki zostały opublikowane w pracach nr 3 i 4 wchodzących w skład osiągnięcia naukowego [Kuryłowicz A, 2014 i Kuryłowicz A, 2016].**

#### Rola interferencji miRNA w regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej

Brak związku między stopniem metylacji badanych genów, poziomami ich mRNA w tkance tłuszczowej a otyłością, skłonił mnie do poszukiwania innych mechanizmów epigenetycznych, które mogłyby być odpowiedzialne za obserwowane różnice w ekspresji tych genów w tkankach tłuszczowych osób otyłych.

MikroRNA (miRNA) stanowią klasę niekodujących, endogennych, małych RNA regulujących ekspresję genów przez hamowanie translacji. miRNA mogą wiązać się z komplementarnymi miejscami docelowymi w mRNA powodując hamowanie, cięcie, deadenylację i degradację docelowego mRNA. Co ważne, pojedynczy miRNA może kontrolować ekspresję wielu genów. W literaturze opublikowano szereg doniesień łączących nieprawidłową ekspresję miRNA z rozwojem lub progresją zaburzeń metabolicznych. Ostatnio postulowany jest również udział miRNA w kontroli adipogenezy i rozwoju otyłości [Alexander R, 2011]. Stwierdzono także, że tkanki tłuszczowe osób otyłych i o prawidłowej masie ciała różnią się ekspresją miRNA uczestniczących w adipogenezie i metabolizmie adipocytów [Oger F, 2014; Ortega FJ, 2010].

Z danych literaturowych wynika, że miRNA uczestniczą w regulacji ekspresji badanych przeze mnie genów *SIRT* i niektórych genów powiązanych z termogenezą w tkankach innych niż tkanka tłuszczowa. W moich badaniach wyboru miRNA do analizy dokonałam dwuetapowo. W pierwszym etapie przeprowadziłam o analizę *in silico* za pomocą programów predykcyjnych TargetScanHuman (<http://www.targetscan.org>), miRanda-mirSVR (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) i Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de>) na podstawie których wytypowałam szereg miRNA potencjalnie interferujących z mRNA dla *SIRT1*, *SIRT7* i *UCP2*, w przypadku których istniały dane literaturowe potwierdzające w

badaniach funkcjonalnych ich rzeczywistą interakcję. Do analizy interferencji z mRNA *SIRT1* wybrałam hsa-miR-22-3p, hsa-miR-34a-5p i hsa-miR-181a-3p ; hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p i hsa-miR-193a-3p dla mRNA *SIRT7* i hsa-miR-214-5p i hsa-miR-424-5p dla mRNA *UCP2* [Yamakuchi M, 2008; Cirera S, 2010; Huang S, 2012; Li H, 2013; Yu G, 2016].

Stwierdziłam, że niezależnie od BMI stężenia hsa-miR-34a-5p są wyższe w tkance trzewnej niż w podskórnej. Natomiast poziomy dwóch innych miRNA interferujących z *SIRT1*: hsa-miR-22-3p i hsa-miR-181a-3p, były niższe w SAT osób otyłych. Obydwa te miRNA biorą udział w regulacji adipogenezy. hsa-miR-22-3p hamuje różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku adipocytów [Ortega FJ, 2010]; natomiast hsa-miR-181a-3p promuje różnicowanie adipocytów [Huang S, 2012]. Co istotne, zaobserwowałam ujemną korelację między poziomami mRNA *SIRT1* i wszystkich wyżej wymienionych miRNA w VAT u osób otyłych, co sugeruje, że właśnie te miRNA przyczyniają się do związanej z otyłością zmniejszonej ekspresji *SIRT1*.

Poziomy wszystkich wytypowanych miRNA interferujących z mRNA *SIRT7* były niższe w tkankach tłuszczowych osób otyłych niż w tkankach kontrolnych. Stężenia hsa-miR-125a-5p były wyższe w tkankach pochodzących od osób o prawidłowej masie ciała i ujemnie korelowały z poziomami mRNA *SIRT7*. Ujemną korelację zaobserwowałam również pomiędzy poziomami mRNA *SIRT7* i hsa-miR-125b-5p, którego ekspresja była wyższa w VAT osób o prawidłowej masie ciała, ale obserwowana różnica nie osiągnęła istotności statystycznej. Podobnie zachowywały się poziomy hsa-miR-193a-3p, ostatniego badanego przez mnie miRNA interferującego z mRNA dla *SIRT7*. Można więc postawić hipotezę, że związany z otyłością obniżony poziom hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p i hsa-miR-193a-3p może być częściowo odpowiedzialny za zwiększone poziomy mRNA *SIRT7* w tkankach tłuszczowych osób otyłych.

Zaobserwowałam również znaczące ujemne korelacje między poziomem ekspresji hsa-miR-214-5p, hsa-miR-424-5p a mRNA *UCP2* w VAT osób otyłych. Można zatem wnioskować, że zmniejszona ekspresja mRNA *UCP2* w przebiegu otyłości może wynikać z interferencji z hsa-miR-214-5p i hsa-miR-424-5p w tkance trzewnej, natomiast za niższą ekspresję *UCP2* w SAT u otyłych pacjentów mogą odpowiadać inne miRNA lub inne nie poznane dotychczas mechanizmy.

Podsumowując, w moich badaniach stwierdziłam ujemne korelacje pomiędzy poziomami mRNA *UCP2* i *SIRT1* u osób otyłych i *SIRT7* u osób o prawidłowej masie ciała i ekspresją odpowiednich miRNA. Chociaż obserwacje te dotyczyły tkanki tłuszczowej trzewnej, na ich podstawie można przypuszczać, że miRNA odgrywają decydującą rolę w związanych z otyłością zmianach w ekspresji *UCP2*, *SIRT1* i *SIRT7* w tkankach tłuszczowych, a metody terapeutyczne prowadzące do zmiany stężeń wybranych miRNA mogą mieć znaczenie dla przywrócenia poziomów ekspresji tych genów właściwym tkankom osób o prawidłowej masie ciała. **Wyniki dotyczące roli miRNA w regulacji ekspresji genów kodujących sirtuiny zawarłam w publikacji nr 4 wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego [Kuryłowicz A, 2016].**



## b) Badania wielkoskalowe

### Analiza miRNomu tkanki tłuszczowej jako sposób identyfikacji szlaków molekularnych związanych z otyłością

Zarówno badania genów kandydatów jak i analizy całych transkryptomów wykazały, że tkanki tłuszczowe osób otyłych różnią się profilem ekspresji genów w porównaniu do tkanek osób o prawidłowej masie ciała, jednak mechanizmy molekularne leżące u podstaw tego zjawiska pozostają w dużej mierze nieznane. W badaniach dotyczących innych chorób wieloczynnikowych wykazano, że precyzyjna charakterystyka miRNomu może służyć jako podstawa do identyfikacji procesów komórkowych i szlaków molekularnych zaburzonych w przebiegu badanej patologii [Arner P, 2012].

Większość badań analizujących związane z otyłością zmiany w ekspresji miRNA w tkance tłuszczowej przeprowadzono za pomocą mikromacierzy obejmujących tylko kanoniczne sekwencje miRNA zdeponowane w bazach danych. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) pozwala na identyfikację nowych izoform miRNA i było z powodzeniem wykorzystane do analizy miRNomów w innych tkankach, ale nigdy wcześniej w tkance tłuszczowej. Dlatego zdecydowałam się zastosować NGS do identyfikacji miRNA, których ekspresja zmienia się w tkankach tłuszczowych w przebiegu otyłości. Uzyskane wyniki, dzięki współpracy z dr Zofią Wicik z Albert Einstein College of Medicine w Nowym Jorku, poddano analizie bioinformatycznej w celu identyfikacji szlaków molekularnych, na które mogły wpłynąć obserwowane zmiany w ekspresji miRNA.

Za pomocą NGS zidentyfikowałam 344 miRNA, których poziom ekspresji w badanych tkankach wniósł  $\geq 5$  odczytów na milion (ang. *reads per million*, RPM). Stosując jako punkt odcięcia zmiany ekspresji na poziomie  $> 2$  i  $< -2$  krotności stwierdziłam, że tkanki VAT-O (VAT od osób otyłych) i SAT-O (SAT od osób otyłych) różnią się znamienne ekspresją 54 miRNA, SAT-O i SAT-N (SAT od osób o prawidłowej masie ciała) – 20 miRNA, SAT-PO (SAT od pacjentów po operacji bariatrycznej) i SAT-N – 79 miRNA, a SAT-PO i SAT-O – 61 miRNA. Jak nadmieniałam w dziale *Materiał i metody*, tkanki VAT od osób otyłych po operacji bariatrycznej nie były dostępne.

Wśród miRNA, których stężenia były wyższe w SAT-O w porównaniu z SAT-N były te o działaniu adipogennym, jak również te hamujące adipogenezę, co popiera hipotezę, że otyłość wiąże się z zaburzeniem różnicowania adipocytów. W SAT-O stwierdziłam również wyższe poziomy miRNA zaangażowanych w regulację odpowiedzi immunologicznej, działających zarówno jako inhibitory, jak i aktywatory stanu zapalnego. Wykonana w oparciu o wyniki NGS analiza ontologiczna wykazała, że tkanki SAT-O w porównaniu z SAT-N, charakteryzuje „nadreprezentacja” szlaków molekularnych związanych z działaniem cytokin i chemokin. Co istotne, termin "nadreprezentacja" odnosi się do zwiększonej regulacji danego szlaku, ale nie wskazuje jednoznacznie, czy jest on aktywowany, czy hamowany. Niemniej jednak dane literaturowe i opisane powyżej badania własne wskazują na zwiększoną prozapalną aktywność tkanki tłuszczowej u osób otyłych. Do innych szlaków molekularnych „nadreprezentowanych” w badanych przeze mnie tkankach tłuszczowych osób otyłych należały te związane z działaniem endoteliny, białka p53 i przebiegiem apoptozy. Jest to zgodne z danymi literaturowymi z których wynika, że otyłość jest związana ze zwiększonym

stężeniem endoteliny i proapoptotycznym fenotypem tkanki tłuszczowej [Schinzari F, 2017; Alkhoury N, 2010; Vergoni B, 2016]. Co ciekawe, analizy ontologiczne wykazały, że w SAT-O „niedostatecznie reprezentowany” jest szlak sygnalizacyjny ADRB2, co jest spójne z wynikami moich wcześniejszych badań [Kuryłowicz A, 2015].

Jedynym miRNA, którego stężenia były znamienne niższe w SAT-O w porównaniu do SAT-N był hsa-miR-205-5p. Choć nie był on wcześniej opisywany jako powiązany z otyłością, należy zauważyć, że wśród jego potencjalnych celów znajdują się mRNA genów zaangażowanych w rozwój powikłań otyłości, np. kodujących interleukiny, apolipoproteiny i ich receptory. Obniżony poziom tego miRNA w tkance tłuszczowej osób otyłych może więc sprzyjać rozwojowi związanego z otyłością stanu zapalnego i zaburzeń lipidowych [Lopategi A, 2016]. Z kolei jedynym miRNA, którego stężenie było znamienne wyższe w VAT-O w porównaniu z VAT-N, był hsa-miR-424-3p niezbędny do właściwego różnicowania adipocytów i odkładania kwasów tłuszczowych [Hu YW, 2015]. Dlatego zwiększony poziom tego miRNA u osób otyłych może przyczyniać się do dysfunkcji tkanki tłuszczowej.

Zastosowana przeze mnie metoda NGS pozwoliła stwierdzić, że utrata masy ciała jest związana ze znaczącymi zmianami w profilu miRNA tkanki tłuszczowej. Zmiany te dotyczą, między innymi, równowagi między miRNA zaangażowanymi w regulację adipogenezy i co istotne, po schudnięciu stężenia tych miRNA nie uzyskują poziomu właściwego osobom o prawidłowej masie ciała, co sugeruje, że otyłość może powodować nieodwracalne zmiany w miRNomie tkanki tłuszczowej. W porównaniu z SAT-O, SAT-PO charakteryzowała się również innym profilem ekspresji miRNA zaangażowanych w regulację odpowiedzi immunologicznej, a analizy ontologiczne wskazały na zmniejszoną aktywność regulacyjną szlaków związanych z zapaleniem w tkankach tłuszczowych osób po utracie masy ciała. Wśród innych miRNA, których stężenia w SAT-PO były niższe niż przed operacją, były te kluczowe dla metabolizmu lipidów, sygnalizacji insuliny, starzenia się, onkogenezy, rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i chorób neurodegeneracyjnych. Można więc przypuszczać, że zachodzące po utracie masy ciała zmiany w profilu miRNA w tkankach tłuszczowych mogą stanowić mechanizm łączący utratę wagi ze zmniejszeniem ryzyka powikłań związanych z otyłością.

Analiza miRNomu pozwoliła również zauważyć, że podczas gdy u osób o prawidłowej masie ciała nie było znaczącej różnicy w poziomach miRNA między VAT a SAT, otyłość powodowała wyraźne różnice w miRNomie tych dwóch rodzajów tkanki tłuszczowej. Analizy ontologiczne pozwoliły stwierdzić w VAT osób otyłych „nadreprezentację” szlaków związanych ze stanem zapalnym i z działaniem interleukin. Wynik ten jest spójny z opisanymi przeze mnie powyżej badaniami dotyczącymi ekspresji cytokin prozapalnych [Jonas MI & Kuryłowicz A, 2016]

Podsumowując, przeprowadzona przeze mnie kompleksowa analiza miRNomu za pomocą metody NGS wykazała znaczące różnice w poziomach miRNA między tkankami tłuszczowymi osób otyłych i o prawidłowej masie ciała oraz pozwoliła scharakteryzować zmiany w profilu miRNA tkanki tłuszczowej podskórnej wynikające z utraty masy ciała. W oparciu o uzyskane wyniki, za pomocą metod bioinformatycznych ustaliłam, że zaobserwowane zmiany w miRNomie mogą być odpowiedzialne za związane z otyłością zmiany w szlakach sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za, między innymi, rozwój stanu

zapalnego, sygnalizację cytokinową, działanie receptorów adrenergicznych i inicjację apoptozy. **Spostrzeżenia te, zawarte w publikacji nr 5 wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego [Kuryłowicz A, 2017], stanowią podstawę dla dalszych badań, w tym funkcjonalnych, dotyczących patogenezy otyłości i powiązanych z nią powikłań.**

#### IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły zachodzących w przebiegu otyłości zmian w regulacji ekspresji wybranych genów w tkankach tłuszczowych. Ich podstawowym celem było poznanie patogenezy powikłań związanych z otyłością, które stanowią obecnie poważny problem kliniczny, ekonomiczny i społeczny a także wytypowanie nowych celów terapeutycznych.

Rozwijając teorię zapalenia metabolicznego wykazałam, że u osób otyłych, zwłaszcza tych ze współistniejącym zespołem metabolicznym, stężenia cytokin prozapalnych są wyższe w tkance tłuszczowej trzewnej niż w podskórnej. Obserwacja ta może mieć szczególne znaczenie w przypadku oceny ryzyka metabolicznego i wdrożenia działań prozdrowotnych u osób z wartościami wskaźnika BMI w granicach prawidłowych, które charakteryzują się zwiększonym obwodem talii (odzwierciedlającym pośrednio zawartość tkanki tłuszczowej trzewnej).

Prognozowaniu ryzyka metabolicznego służyły również badania dotyczące oceny ekspresji w tkankach tłuszczowych genów kodujących adiponektynę i rezystynę. Na ich podstawie wykazałam, że ryzyko to u osób otyłych jest determinowane ogólnoustrojową produkcją tych dwóch adipokin (wyrażoną wartością wskaźnika AR w surowicy) a nie lokalną równowagą ich stężeń w tkance tłuszczowej. Ten prosty do oznaczenia parametr może być przydatny w ustalaniu algorytmów postępowania i wskazań do intensyfikacji leczenia osób otyłych.

Biorąc pod uwagę ograniczoną dostępność i skuteczność nieinwazyjnych metod terapeutycznych, niezależnym celem prowadzonych przeze mnie badań była próba znalezienia nowych molekularnych punktów uchwytu w leczeniu otyłości. Wykazałam, że z uwagi na zmniejszoną ekspresję w tkankach tłuszczowych osób otyłych m.in. wybranych genów kodujących receptory beta-adrenergiczne, receptory dla hormonów tarczycy, dejodynazy czy białka rozprzegające termogenezę, skuteczność związków aktywujących termogenezę w leczeniu otyłości może być ograniczona. Wyniki moich badań pozwalają jednak wiązać pewne nadzieje w leczeniu otyłości z zastosowaniem związków aktywujących lub inaktywujących sirtuiny, ponieważ wykazałam, że w otyłości dochodzi do obniżenia poziomu mRNA dla genu *SIRT1* i zwiększenia – dla genu *SIRT7* w tkankach tłuszczowych, co wiąże się z niekorzystnym profilem metabolicznym. Taką funkcję mogłyby pełnić miRNA, które, jak wykazałam, odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów (w tym *SIRT1* i *SIRT7*) w tkance tłuszczowej.

Znaczenie miRNA dla aktywności genów w tkance tłuszczowej podkreśliła również przeprowadzona przeze mnie analiza wielkoskalowa z zastosowaniem metody NGS. Nie tylko potwierdziła ona wyniki wcześniejszych badań genów kandydackich (w tym tych

wiązających się z aktywnością zapalną i termogenetyczną tkanki tłuszczowej osób otyłych), ale również pozwoliła wytypować nowe szlaki komórkowe, dając podstawę dla dalszych badań dotyczących patogenezy otyłości i powiązanych z nią powikłań.

## V. LITERATURA

1. Klaus JR, Hurwitz BE, Llabre MM, Skyler JS, Goldberg RB, Marks JB, Bilsker MS, Schneiderman N. Central obesity and insulin resistance in the cardiometabolic syndrome: pathways to preclinical cardiovascular structure and function. *J Cardiometab Syndr* 2009; 4: 63-71.
2. Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2: 367-373.
3. Gregor, M.F.; Hotamisligil, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 415-445.
4. Zhu Y, Tchkonja T, Stout MB, Giorgadze N, Wang L, Li PW, Heppelmann CJ, Bouloumié A, Jensen MD, Bergen HR, Kirkland JL. Inflammation and the depot-specific secretome of human preadipocytes. *Obesity* 2015; 23: 989-999.
5. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després JP. Visceral obesity: The link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 2009; 53: 577-584.
6. Neeland IJ, Ayers CR, Rohatgi AK, Turer AT, Berry JD, Das SR, Vega GL, Khera A, McGuire DK, Grundy SM, de Lemos JA. Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity* 2013; 21: 439-447
7. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasani RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: Association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116: 39-48.
8. Nov O, Shapiro H, Ovadia H, Tarnovskii T, Dvir I, Shemesh E, Kovsan J, Shelef I, Carmi Y, Voronov E, Apte RN, Lewis E, Haim Y, Konrad D, Bashan N, Rudich A. Interleukin-1 $\beta$  regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS ONE* 2013; 8: e53626
9. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res* 2009; 58: 727-736.
10. Nielsen AR, Hojman P, Erikstrup C, Fischer CP, Plomgaard P, Mounier R, Mortensen OH, Broholm C, Taudorf S, Krogh-Madsen R, Lindgaard B, Petersen AM, Gehl J, Pedersen BK. Association between interleukin-15 and obesity: Interleukin-15 as a potential regulator of fat mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4486-4493.
11. Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- $\alpha$  system. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4602-4606.
12. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3338-3342.
13. Pierce JR, Maples JM, Hickner RC. IL-15 concentrations in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans: local effects of IL-15 on adipose tissue lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 308: 1131-1139.
14. Alexopoulos N, Katritsis D, Raggi P. Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014; 233: 104-112.
15. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasani RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116: 1234-1241
16. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145: 2273-2282.
17. Spoto B, di Betta E, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardei A, Parlongo RM, Pizzini P, Pisano A, Vermi W, Testa A, Cutrupi S, D'Arrigo G, Lonardi S, Tripepi G, Cancarini G, Zoccali C. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24: 1137-1143.

18. Elbers JM, de Jong S, Teerlink T, Asscheman H, Seidell JC, Gooren LJ. Changes in fat cell size and in vitro lipolytic activity of abdominal and gluteal adipocytes after a one-year cross-sex hormone administration in transsexuals. *Metabolism* 1999; 48: 1371–1377.
19. Jonas MI, Kurylowicz A, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Wierzbicki Z, Chmura A, Pruszczyk P, Puzianowska-Kuznicka M. Interleukins 6 and 15 Levels Are Higher in Subcutaneous Adipose Tissue, but Obesity Is Associated with Their Increased Content in Visceral Fat Depots. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 25817-25830
20. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009; 302: 179–188.
21. Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 2003; 11: 997–1001.
22. Lau CH, Muniandy S. Novel adiponectin–resistin (AR) and insulin resistance (IRAR) indexes are useful integrated diagnostic biomarkers for insulin resistance, type 2 diabetes and metabolic syndrome: a case control study. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10: 8.
23. Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C. Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* 2003; 548: 21–27.
24. Jonas MI, Kurylowicz A, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Domienik-Karłowicz J, Puzianowska-Kuznicka M. Adiponectin/resistin interplay in serum and in adipose tissue of obese and normal-weight individuals. *Diabetol Metab Syndr* 2017; 9: 95.
25. Marsili A, Aguayo-Mazzucato C, Chen T, Kumar A, Chung M, Lunsford EP, Harney JW, Van-Tran T, Gianetti E, Ramadan W, Chou C, Bonner-Weir S, Larsen PR, Silva JE, Zavacki AM. Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PLoS One* 2011; 6: e20832.
26. Bachman ES, Dhillion H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB.  $\beta$ AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 2002; 297: 843-845.
27. Pelletier P, Gauthier K, Sideleva O, Samarut J, Silva JE. Mice lacking the thyroid hormone receptor  $\alpha$  gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology* 2008; 149: 6471-6486.
28. Ukropec J, Anunciado RP, Ravussin Y, Hulver MW, Kozak LP. UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1<sup>-/-</sup> mice. *J Biol Chem* 2006, 281: 31894-31908.
29. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 2000; 275: 16251-16257.
30. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 465-482.
31. Bachman ES, Dhillion H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB.  $\beta$ AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 2002; 297: 843-845.
32. Wijers SL, Schrauwen P, van Baak MA, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD.  $\beta$ -adrenergic receptor blockade does not inhibit cold-induced thermogenesis in humans: possible involvement of brown adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 96: E598-E605.
33. Marsili A, Aguayo-Mazzucato C, Chen T, Kumar A, Chung M, Lunsford EP, Harney JW, Van-Tran T, Gianetti E, Ramadan W, Chou C, Bonner-Weir S, Larsen PR, Silva JE, Zavacki AM. Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PLoS One* 2011; 6: e20832.
34. Pelletier P, Gauthier K, Sideleva O, Samarut J, Silva JE. Mice lacking the thyroid hormone receptor  $\alpha$  gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology* 2008; 149: 6471-6486.
35. Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, Camastra S, Niccolini P, Lamacchia M, Rossi M, Iervasi G, Ferrannini E. Expression of thyrotropin and thyroid hormone receptors in adipose tissue of patients with morbid obesity and/or type 2 diabetes: effects of weight loss. *Int J Obes* 2009; 33: 1001-1006.
36. Brondani LA, Assmann TS, de Souza BM, Bouças AP, Canani LH, Crispim D. Meta-Analysis Reveals the Association of Common Variants in the Uncoupling Protein (UCP) 1-3 Genes with Body Mass Index Variability. *PLoS One* 2014; 9: e96411
37. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, Pénicaud L, Kristiansen K, Bouloumié A, Casteilla L, Dani C, Ailhaud G, Amri EZ. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 2009; 27: 2753-2760.
38. Kurylowicz, A.; Jonas, M.; Lisik, W.; Jonas, M.; Wicik, Z.A.; Wierzbicki, Z.; Chmura, A.; Puzianowska-Kuznicka, M. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J Transl Med* 2015; 13: 31
39. Kurylowicz A. Stimulation of Thermogenesis via Beta-Adrenergic and Thyroid Hormone Receptors Agonists in Obesity Treatment – Possible Reasons for Therapy Resistance. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 2015; 6: 145.

40. Kiran S, Oddi V, Ramakrishna G. Sirtuin<sub>7</sub> promotes cellular survival following genomic stress by attenuation of DNA damage, SAPK activation and p53 response. *Exp Cell Res* 2015; 331: 123-141.
41. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4623-35.
42. Gillum MP, Kotas ME, Erion DM, Kursawe R, Chatterjee P, Nead KT, Muise ES, Hsiao JJ, Frederick DW, Yonemitsu S, Banks AS, Qiang L, Bhanot S, Olefsky JM, Sears DD, Caprio S, Shulman GI. Sirt1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes* 2011; 60: 3235-3245.
43. Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B, Stančáková A, Goetzman E, Lam MM, Schwer B, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Kakar S, Bass NM, Kuusisto J, Laakso M, Alt FW, Newgard CB, Farese RV Jr, Kahn CR, Verdin E. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell* 2011; 44: 177-190.
44. Kelly GS. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev* 2010; 15: 245-263.
45. Kelly GS. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 2. *Altern Med Rev* 2010; 15: 313-328.
46. Pedersen SB, Ølholm J, Paulsen SK, Bennetzen MF, Richelsen B. Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1250-1255.
47. Song YS, Lee SK, Jang YJ, Park HS, Kim JH, Lee YJ, Heo YS. Association between low SIRT1 expression in visceral and subcutaneous adipose tissues and metabolic abnormalities in women with obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 101: 341-348.
48. Moschen AR, Wieser V, Gerner RR, Bichler A, Enrich B, Moser P, Ebenbichler CF, Kaser S, Tilg H. Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity. *J Hepatol* 2013; 59: 1315-1322.
49. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab* 2014; 19: 712-721.
50. Fang J, Ianni A, Smolka C, Vakhrusheva O, Nolte H, Krüger M, Wietelmann A, Simonet NG, Adrian-Segarra JM, Vaquero A, Braun T, Bober E. Sirt7 promotes adipogenesis by binding to and inhibiting autocatalytic activation of Sirt1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E8352-E8361.
51. Kurylowicz A, Owczarz M, Polosak J, Jonas MI, Lisik W, Jonas M, Chmura A, Puzianowska-Kuznicka M. SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated by microRNAs but not by methylation status. *Int J Obes* 2016; 40: 1635-1642.
52. Kurylowicz A. In Search of New Therapeutic Targets in Obesity Treatment: Sirtuins. *Int J Mol Sci* 2016; 19: 17.
53. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* 2011; 69: 41-49.
54. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Pérusse L, Vohl MC. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 309-320.
55. Alexander R, Lodish H, Sun L. MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 623-636.
56. Oger F, Gheeraert C, Mogilenko D, Benomar Y, Molendi-Coste O, Bouchaert E, Caron S, Dombrowicz D, Pattou F, Duez H, Eeckhoutte J, Staels B, Lefebvre P. Cell-specific dysregulation of microRNA expression in obese white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 2821-2833.
57. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fernández-Real JM. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS ONE* 2010; 5: e9022.
58. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13421-13426.
59. Cirera S, Birck M, Busk PK, Fredholm M. Expression profiles of miRNA-122 and its target CAT1 in minipigs (*Sus scrofa*) fed a high-cholesterol diet. *Comp Med* 2010; 60: 136-141.
60. Huang S, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, Li H, Han Q, Zhao RC. Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2531-2540.
61. Li H, Chen X, Guan L, Qi Q, Shu G, Jiang Q. MiRNA-181a regulates adipogenesis by targeting tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the porcine model. *PLoS One* 2013; 8: e71568.
62. Yu G, Wang J, Xu K, Dong J. Dynamic regulation of uncoupling protein 2 expression by microRNA-214 in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep* 2016; 36: 3.
63. Arner P, Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11: 276-288.

64. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, Li A, Xie Y, Li J, Zhao X, He Z, Mo D. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: Profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genom.* 2010; 11: 320.
65. Schinzari F, Tesauro M, Cardillo C. Endothelial and perivascular adipose tissue abnormalities in obesity-related vascular dysfunction: Novel targets for treatment. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 2017; 69: 360–368.
66. Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR, Feldstein AE. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem* 2010; 285: 3428–3438
67. Vergoni B, Cornejo PJ, Gilleron J, Djedaini M, Ceppo F, Jacquet A, Bouget G, Ginet C, Gonzalez T, Maillet J, Dhennin V, Verbanck M, Auberger P, Froguel P, Tanti JF, Cormont M. DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes* 2016; 65: 3062–3074.
68. Lopategi A, López-Vicario C, Alcaraz-Quiles J, García-Alonso V, Rius B, Titos E, Clària J. Role of bioactive lipid mediators in obese adipose tissue inflammation and endocrine dysfunction. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 419: 44–59.
69. Hu YW, Zhao JY, Li SF, Huang JL, Qiu YR, Ma X, Wu SG, Chen ZP, Hu YR, Yang JY, Wang YC, Gao JJ, Sha YH, Zheng L, Wang Q. RP5-833A20.1/miR-382-5p/NFIA-dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 87–101.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Po uzyskaniu w 2006 roku stopnia doktora nauk medycznych brałam udział w realizacji kilku projektów naukowych, których wyniki nie wchodzą w skład wyżej opisanego osiągnięcia naukowego.

### 1. *Badania nad genetycznym podłożem otyłości u dzieci*

W ramach badań nad patogenezą otyłości uczestniczyłam w pracach dr Joanny Gajewskiej z Zespołu Badań Przesiewowych Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie, które miały na celu poznanie związku pomiędzy wariantami genetycznymi genów kodujących adipokiny i ich receptory z rozwojem otyłości i skutecznością interwencji dietetycznych u dzieci (grant N N407 173534). Biorąc pod uwagę wzrastającą częstość występowania nadwagi i otyłości w najmłodszych grupach wiekowych oraz fakt, że otyłość pozostawia „piętno metaboliczne” na całe życie, niezmiernie istotne jest poznanie markerów genetycznych zwiększonego ryzyka otyłości a także czynników prognostycznych pozwalających przewidzieć skuteczność wdrażanych interwencji terapeutycznych. Badania te objęły 101 dzieci otyłych i 67 dzieci o prawidłowej masie ciała, które stanowiły grupę kontrolną. W ramach tych badań przeprowadziłam analizę 5 funkcjonalnych polimorfizmów w genach kodujących leptynę (*LEP*: -2548G>A i Q223R) receptor leptyny (*LEPR*: K656N) i adiponektynę (*ADIPOQ*: -11377C>G i -11426A>G). Stwierdziliśmy, że nosicielstwo allelu G polimorfizmu -11377C>G genu adiponektyny wiąże się z ryzykiem rozwoju otyłości u dzieci, a homozygotyczność pod względem tego allelu – z niższymi stężeniami adiponektyny w surowicy, co stanowi marker ryzyka rozwoju powikłań metabolicznych, niezależnie od BMI i nawyków żywieniowych. Z kolei dzieci posiadające allel G polimorfizmu K665N i allel A polimorfizmu Q223R receptora leptyny odpowiadały największym spadkiem tłuszczowej masy ciała w odpowiedzi na interwencję dietetyczną.

1) Gajewska J, **Kuryłowicz A**, Ambroszkiewicz J, Mierzejewska E, Chełchowska M, Szamotulska K, Weker H, Puzianowska-Kuźnicka M. ADIPOQ -11377C>G polymorphism increases the risk of adipokine abnormalities and child obesity regardless of dietary intake. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016; 62: 122-129. **IF: 2,799; KBN/MNiSW: 30**

2) Gajewska J, **Kuryłowicz A**, Mierzejewska E, Ambroszkiewicz J, Chełchowska M, Weker H, Puzianowska-Kuźnicka M. Complementary effects of genetic variations in LEPR on body composition and soluble leptin receptor concentration after 3-month lifestyle intervention in prepubertal obese children. *Nutrients* 2016; 8 (6). pii: E328. **IF: 3,550; KBN/MNiSW: 35**

## 2. *Badania nad genetycznym i epigenetycznym podłożem starzenia i chorób związanych z wiekiem*

W trakcie pracy w Zakładzie Badawczo-Lecznym Endokrynologii a następnie w Zespole Kliniczno-Badawczym Epigenetyki Człowieka IMDiK PAN uczestniczyłam w badaniach dotyczących genetycznego i epigenetycznego podłoża starzenia i chorób związanych z wiekiem. We współpracy, między innymi, z Prof. dr hab. Moniką Puzianowską-Kuźnicką, dr hab. Małgorzatą Mossakowską i Prof. dr hab. Edwardem Frankiem, w ramach realizowanych m. in. w IMDiK projektu POLSENIOR (*Aspekty medyczne, psychologiczne, socjologiczne i ekonomiczne starzenia się ludzi w Polsce*), jak również projektu POLGENOM (*Polski genom referencyjny dla diagnostyki genomowej i medycyny spersonalizowanej*), współtworzyłam bank genomowego DNA od ponad 5000 osób starszych i długowiecznych, oraz od osób młodych zdrowych i takich, u których przed 50 rż wystąpiły choroby związane z wiekiem (T2DM i choroba niedokrwienna serca). Badania przeprowadzone z wykorzystaniem pozyskanego w trakcie realizacji tych projektów materiału biologicznego i danych klinicznych pozwoliły stwierdzić że:

- genotyp GG polimorfizmu -2548 G>A *LEP* występuje znamienne częściej, a genotyp AA polimorfizmu K109R *LEPR* – rzadziej u zdrowych stulatków niż w młodszych grupach wiekowych a także wśród chorych z T2DM i chorobą niedokrwienną serca, co pozwala przypuszczać, że szlak sygnałowy leptyny może być związany z regulacją długości życia poprzez modulację ryzyka rozwoju chorób związanych z wiekiem;
- poziomy mRNA dla izoformy receptora leptyny (OB-Ra) w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej były niższe u osób długowiecznych w porównaniu z młodszymi grupami wiekowymi i zmiany te nie są prawdopodobnie skutkiem zwiększonej metylacji promotora genu *LEPR*, ponieważ metylacja wysp CpG w regionie +20 do +281bp nie zmieniała się z wiekiem;
- genotyp AA polimorfizmu -11391G>A *ADIPOQ* występuje znamienne częściej u długowiecznych kobiet i wiąże się z wyższymi stężeniami izoform adiponektyny, co może przekładać się na korzystny profil kardiometaboliczny;
- genotyp AA polimorfizmu -351A>G w genie receptora estrogenowego  $\alpha$  (*ESR1*) występuje częściej u osób z chorobą niedokrwienną serca i wiąże się z niekorzystnymi zmianami w lipidogramie;
- wraz z wiekiem w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej dochodzi do obniżenia poziomu mRNA dla genów *WRN* i *XPD* kodujących helikazy biorące udział w naprawie DNA



a zmiany te mogą być związane ze zwiększoną metylacją wysp CpG w regionach regulatorowych tych genów.

- 1) Roszkowska-Gancarz M, Jonas M, Owczarz M, **Kuryłowicz A**, Polosak J, Franek E, Słusarczyk P, Mossakowska M, Puzianowska-Kuznicka M. Age-related changes of leptin and leptin receptor variants in healthy elderly and long-lived adults. *Geriatr Gerontol Int* 2015; 15: 365-371. **IF: 2,229; KBN/MNiSW: 25**
- 2) Roszkowska-Gancarz M, **Kuryłowicz A**, Polosak J, Mossakowska M, Franek E, Puzianowska-Kuznicka M. Functional polymorphisms of the leptin and leptin receptor genes are associated with longevity and with the risk of myocardial infarction and of type 2 diabetes mellitus. *Endokrynol Pol* 2014; 65: 11-16. **IF: 0,993; KBN/MNiSW: 15**
- 3) Roszkowska-Gancarz M, Bartoszewicz Z, Polosak J, **Kuryłowicz A**, Jonas M, Mossakowska M, Franek E, Puzianowska-Kuznicka M. Total and high molecular weight adiponectin and level-modifying polymorphisms of ADIPOQ in centenarians. *Endokrynol Pol* 2012; 63: 439-446. **IF: 1,070; KBN/MNiSW: 10**
- 4) Roszkowska-Gancarz M, **Kuryłowicz A**, Polosak J, Ambroziak M, Puzianowska-Kuznicka M. The -351A/G polymorphism of ESR1 is associated with risk of myocardial infarction but not with extreme longevity. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1883-1887. **IF: 2,389; KBN/MNiSW: 32**
- 5) Polosak J, **Kuryłowicz A**, Roszkowska-Gancarz M, Owczarz M, Puzianowska-Kuznicka M. Aging is accompanied by a progressive decrease of expression of the WRN gene in human blood mononuclear cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66: 19-25. **IF: 4,598; KBN/MNiSW: 40**
- 6) Polosak J, Roszkowska-Gancarz M, **Kuryłowicz A**, Owczarz M, Dobosz P, Mossakowska M, Szybiska A, Puzianowska-Kuznicka M. Decreased expression and the Lys751Gln polymorphism of the XPD gene are associated with extreme longevity. *Biogerontology* 2010;11: 287-297. **IF: 3,411; KBN/MNiSW: 32**
- 7) Puzianowska-Kuznicka M, **Kuryłowicz A**, Jonas M. Medycyna przeciwstarzeniowa: suplementacja hormonalna – argumenty za i przeciw. *Medycyna po Dyplomie* 2013; 2: 26-29. **KBN/MNiSW: 5**
- 8) Jonas M, **Kuryłowicz A**, Puzianowska-Kuznicka M. Aging and the endocrine system. *Postępy nauk medycznych (Progress in Medicine)* 2015; 7:451-457.

### 3. *Badania nad genetycznym podłożem choroby Gravesa-Basedowa*

Bezpośrednio po uzyskaniu stopnia doktora realizowałam, jako kierownik, grant: *Związek polimorfizmów genów kodujących białka szlaku czynnika jądrowego  $\kappa B$  (ang. nuclear factor, NF- $\kappa B$ ) z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa (2P05B 120 29)*. Stanowił on kontynuację badań dotyczących genetycznego podłoża choroby Gravesa (ang. *Graves disease*, GD) podjętych w trakcie studiów doktoranckich pod promotorstwem Prof. dr hab. Tomasza Bednarczuka. W ramach tych badań rozbudowałam o 300 próbek bank genomowego DNA pochodzącego od chorych z GD i utworzyłam bank 500 próbek DNA od osób zdrowych bez autoimmunologicznych chorób tarczycy. Następnie, w oparciu o zgromadzony materiał biologiczny, opracowałam metodę i przeprowadziłam analizę

polimorfizmów -94ins/del ATTG w genie *NFKB1* (kodującym NF-κB), oraz 3 polimorfizmów w genie *IKBL* (rs2071592, rs2071591 i rs3130062) i 3 polimorfizmów w genie *NFKBIA* (rs696, rs2233409, rs2233406), kodujących 2 inhibitory NF-κB.

W badaniach tych wykazałam związek allelu -94del ATTG w genie *NFKB1* z rozwojem GD w populacji polskiej. Dzięki współpracy z Prof. Yuji Hiromatsu z Kurume University School of Medicine badanie to zostało przeprowadzone również w populacji japońskiej i wykazało związek allelu -94del ATTG z ryzykiem rozwoju związanej z GD orbitopatii oraz wcześniejszym wiekiem zachorowania. W badaniach dotyczących inhibitorów NF-κB wykazałam, że haplotyp AT utworzony przez polimorfizmy rs2071592 i rs2071591 w genie *IKBL* zwiększa ryzyko wystąpienia GD w populacji polskiej, a allele -297T (rs2233409) and -826T (rs2233406) polimorfizmów genu *NFKBIA* zwiększają ryzyko klinicznie jawnej orbitopatii.

Kontynuowałam również współpracę z Prof. Klausem Badenhoop z Uniwersytetu we Frankfurcie nad Menem, który był moim opiekunem naukowym w trakcie stypendium DAAD w 2004r. W ramach tej współpracy wzięłam udział w badaniach nad rolą polimorfizmu genu kodującego ligand 10 chemokin (ang. chemokine (C-X-C motif) ligand 10, CXCL10) w ryzyku rozwoju GD.

Ponadto, w ramach współpracy z dr Piotrem Miśkiewiczem z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii WUM, badając rozkład alleli głównego układu zgodności tkankowej u chorych z GD, wzięłam udział w realizacji projektu dotyczącego czynników ryzyka wystąpienia w tej grupie pacjentów celiakii i innych chorób autoimmunologicznych.

- 1) **Kuryłowicz A**, Hiromatsu Y, Jurecka-Lubieniecka B, Kula D, Kowalska M, Ichimura M, Koga H, Kaku H, Bar-Andziak E, Nauman J, Jarzab B, Ploski R, Bednarczuk T. Association of *NFKB1* -94ins/del ATTG promoter polymorphism with susceptibility to and phenotype of Graves' disease. *Genes Immun* 2007; 8: 532-538. **IF: 4,088; KBN/MNiSW: 32**
- 2) **Kuryłowicz A**, Nauman J, Bednarczuk T. The influence of vitamin D deficiency on cancers and autoimmune diseases development *Endokrynol Pol.* 2007; 58: 140-152. **KBN/MNiSW: 6**
- 3) **Kuryłowicz A**, Nauman J. The role of nuclear factor-kappaB in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment. *Acta Biochim Pol* 2008; 55: 629-647. **IF: 1,448; KBN/MNiSW: 20**
- 4) **Kuryłowicz A**, Miśkiewicz P, Bar-Andziak E, Nauman J, Bednarczuk T. Association of polymorphism in genes encoding kappaB inhibitors (*I*kappaB) with susceptibility to and phenotype of Graves' disease: a case-control study. *Thyroid Res* 2009; 2: 10. **KBN/MNiSW: 2**
- 5) Brück P, Bartsch W, Sadet D, Penna-Martinez M, **Kuryłowicz A**, Bednarczuk T, Robbers I, Paunkovic J, Böhme A, Badenhoop K, Ramos-Lopez E. A CXC motif ligand 10 polymorphism as a marker to predict severity of Graves' disease. *Thyroid* 2010; 20: 343-345. **IF: 4,327; KBN/MNiSW: 27**
- 6) Miskiewicz P, Gos-Zajac A, **Kuryłowicz A**, Plazinska TM, Franaszczyk M, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Pirko-Kotela K, Rupinski M, Jarosz D, Regula J, Ploski R, Bednarczuk T. HLA DQ2 haplotype, early onset of Graves' disease, and positive family history of autoimmune disorders are risk factors for developing celiac disease in patients with Graves' disease. *Endocr Pract* 2015; 21: 993-1000. **IF: 2,074; KBN/MNiSW: 25**

#### 4. Opracowanie algorytmu diagnostycznego u kobiet z zespołem hiperandrogenizacji

Od stażu podyplomowego w 2002r pracuję jako lekarz w Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii WUM, gdzie uzyskałam kolejno tytuły specjalisty w zakresie chorób wewnętrznych, endokrynologii i diabetologii. Oprócz pracy klinicznej biorę udział w licznych projektach badawczych. Jeden z nich poświęcony był ustaleniem algorytmu diagnostycznego u kobiet z zespołem hiperandrogenizacji (ZA). We współpracy z dr Urszulą Ambroziak dokonaliśmy retrospektywnej analizy pacjentek hospitalizowanych w Klinice z powodu ZA ustalając jaki zestaw badań hormonalnych pozwala na postawienie właściwej diagnozy i ocenę ryzyka metabolicznego. Wykazałyśmy, między innymi że:

- w diagnostyce wrodzonego przerostu nadnerczy zastosowanie chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) do oznaczania stężeń androgenów i 17OHprogesteronu w surowicy zmniejsza prawdopodobieństwo fałszywie dodatnich rozpoznań, podczas gdy stosowanie w tym celu testu z syntetycznym ACTH – zwiększa to ryzyko;
- u kobiet z zespołem policystycznych jajników wyższe wartości wskaźnika całkowity testosteron/dihydrotestosteron oznaczone metodą LC-MS wiążą się ze zwiększonym ryzykiem metabolicznym;
- oznaczenia testosteronu w ślinie nie odzwierciedlają jego stężeń w surowicy i nie są przez to pomocne w wykrywaniu hiperandrogenizmu i ustaleniu rozpoznania u kobiet z ZA.

1) Ambroziak U, Kępczyńska-Nyk A, **Kuryłowicz A**, Wysłouch-Cieszyńska A, Małunowicz EM, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Jaźwiec R, Pawłowska E, Szcześniak M, Dadlez M, Bednarczuk T. LC-MS/MS improves screening towards 21-hydroxylase deficiency. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31: 296-300. **IF: 1,413; KBN/MNiSW: 15**

2)\* Ambroziak U, Kępczyńska-Nyk A, **Kuryłowicz A**, Małunowicz EM, Wójcicka A, Miśkiewicz P, Macech M. The diagnosis of nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, based on serum basal or post-ACTH stimulation 17-hydroxyprogesterone, can lead to false-positive diagnosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 84: 23-29. **IF: 3,327; KBN/MNiSW: 30**

3) Ambroziak U, **Kuryłowicz A**, Kępczyńska-Nyk A, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Jaźwiec R, Samborowska E, Dadlez M, Wysłouch-Cieszyńska A, Bednarczuk T. Total testosterone to dihydrotestosterone ratio assessed by LC-MS/MS predicts a worse metabolic profile not only in PCOS patients. *Ginek Pol* 2017; 88: 5-8. **IF: 0,576; KBN/MNiSW: 15**

4) Ambroziak U, **Kuryłowicz A**, Kępczyńska-Nyk A, Kondracka A, Gajda S, Sieńko D. Salivary testosterone may not serve as a screening test in the diagnosis of biochemical hyperandrogenism. *J Obstet Gynaecol Res* 2018; Mar 8. **IF: 1,099; KBN/MNiSW: 15**

\* na wyniki tej pracy powołują się autorzy opublikowanych w marcu 2018r w *J Clin Endocrinol Metab* wytycznych Endocrine Society dotyczących diagnostyki i leczenia hirsutyizmu (doi: 10.1210/jc.2018-00241)

## 5. *Inne prace kliniczne*

Pracując jako internista i endokrynolog sprawowałam opiekę, diagnozowałam i leczyłam pacjentów z różnymi schorzeniami endokrynologicznymi. Swoje doświadczenia miałam możliwość opublikować w pracach przedstawiających opisy przypadków a także w artykułach poglądowych, w ramach cykli szkoleniowych przeznaczonych dla osób specjalizujących się w dziedzinie endokrynologii.

- 1) **Kuryłowicz A**, Wesołowska AS, Wolska A, Pachucki J, Bednarczuk T, Ambroziak U. Safety and effectiveness of symptomatic hyponatremia treatment according to the European Society of Endocrinology guidelines: a retrospective study. *Pol Arch Intern Med* 2017; 127: 205-208. **IF: 2,309; KBN/MNiSW: 25**
- 2) Jańczyk A, Ambroziak U, **Kuryłowicz A**, Bednarczuk T. 60-letnia kobieta z hiponatremią *Medycyna Praktyczna* 2014; 277: 101-106. **KBN/MNiSW: 4**
- 3) Kępczyńska-Nyk A, **Kuryłowicz A**, Ambroziak U, Witkowska M, Kaczmarska-Turek D, Bednarczuk T. Trudności w leczeniu przewlekłej niedoczynności kory nadnerczy. *Trendy w Endokrynologii* 2013; 4: 11-18.
- 4) **Kuryłowicz A**, Ambroziak U., Bednarczuk T. 60-letnia kobieta z nadciśnieniem tętniczym i przypadkowo wykrytym guzem nadnercza. *Medycyna Praktyczna* 2013; 272: 89-96. **KBN/MNiSW: 4**
- 5) **Kuryłowicz A**, Niewiński G, Kański A, Derlatka P, Czajkowski K, Bednarczuk T, Ambroziak U. Severe gestational hyperthyroidism complicated by cardiac arrest - a case report. *Ginekol Pol.* 2017; 88: 43-44. **IF: 0,576; KBN/MNiSW: 15**
- 6) **Kuryłowicz A**, Miśkiewicz P, Bednarczuk T. 40-letni mężczyzna z przypadkowo wykrytą zmianą ogniskową w tarczycy. *Medycyna Praktyczna* 2013; 265: 109-114. **KBN/MNiSW: 4**
- 7) Czajka-Oraniec I, Zgliczynski W, **Kuryłowicz A**, Mikula M, Ostrowski J. Association between gynecomastia and aromatase (CYP19) polymorphisms. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 721-727. **IF: 3,791; KBN/MNiSW: 27**

*Szczegółowe omówienie dorobku naukowego znajduje się w załączniku nr 4.*

### **Analiza bibliometryczna**

Jestem autorem lub współautorką **43** artykułów oraz **7** rozdziałów w podręcznikach. Artykuły opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie ISI Web of Science: **33** (w tym **26** po uzyskaniu stopnia doktora):

- prace oryginalne opublikowane w czasopismach posiadających IF: **28** (w tym **21** po uzyskaniu stopnia doktora)
- prace oryginalne opublikowane w czasopismach bez IF: **1**
- opisy przypadków opublikowane w czasopismach posiadających IF: **1**
- opisy przypadków opublikowane w czasopismach bez IF: **3**
- prace przeglądowe opublikowane w czasopismach posiadających IF: **3**
- prace przeglądowe opublikowane w czasopismach bez IF: **4**
- prace pełnotekstowe opublikowane w suplementach czasopism bez IF: **1**
- listy do redakcji opublikowane w czasopismach posiadających IF: **2**

Sumaryczny IF wg Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania: **86,334** (w tym **71,885** po uzyskaniu stopnia doktora)

Łączna punktacja KBN/MNiSW: **869** (w tym **751** po uzyskaniu stopnia doktora)

Liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS), bez autocytowań: **398**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **11**

### **Wykłady oraz ustne wystąpienia zjazdowe**

- 1) Association of the vitamin D receptor (VDR) gene Fok polymorphism with Graves' Disease in German and Polish populations. 23 Colloquium Endocrinologicum, 2004r, Moguncja, Niemcy.
- 2) Związek polimorfizmów genu receptora jądrowego witaminy D (VDR) z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej. XVIII zjazd Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, 2005r, Kraków, Polska.
- 3) Obustronne krwawienie do nadnerczy – opis przypadku i przegląd piśmiennictwa. VIII Kurs Kształcenia Ustawicznego z Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Metabolicznych, 2011r, Kazimierz nad Wisłą, Polska.
- 4) Obesity is Associated with a Decreased Expression Of Type 2 5- Iodothyronine Deiodinase Gene in Adipose Tissue. 18th World Congress of International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders, 28-31.08.2013r, Stambuł, Turcja.
- 5) SIRT1 and SIRT7 expression in adipose tissues of obese and normal-weight individuals is regulated by microRNAs but not by methylation status. XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, 2016r Katowice, Polska.

### **Konferencje naukowe**

Doniesienia zjazdowe (autor prezentujący): 10 (3 krajowe, 7 międzynarodowych)

Doniesienia zjazdowe (współautor): 12 (4 krajowe, 8 międzynarodowych)

### **Projekty badawcze**

- 1) Projekt badawczy 2P05B 120 29, 2005-2007, *Związek polimorfizmów genów kodujących białka szlaku czynnika jądrowego  $\kappa B$  (ang. nuclear factor – NF- $\kappa B$ ) z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa*. Kierownik projektu.
- 2) Projekt badawczy N N407 173534, 2008-2011: *Badanie zależności pomiędzy stężeniem leptyny i jej receptora we krwi, wybranymi polimorfizmami genów kodujących te białka a podatnością na rozwój otyłości prostej u dzieci w okresie przedpokwitaniowym*. Wykonawca.
- 3) Projekt badawczy N404 026 31/1581, 2007-2010, *Ocena wpływu polimorfizmów Gln223Arg genu receptora leptyny (LER) i polimorfizmu(-2548) G/A regionu promotora genu leptyny (PRO) na gęstość mineralną kości u otyłych kobiet z i bez osteoporozy pomenopauzalnej*. Wykonawca.

- 4) Projekt badawczy zamawiany PBZ-MEiN-9/2/2006 umowa nr K143/P01/2007, 2006-2010, *Rozbudowa banku genomowego DNA osób starszych i długowiecznych oraz organizacja banku DNA osób młodych. Poszukiwanie polimorfizmów mających potencjalny wpływ na długość życia*. Główny wykonawca.
- 5) Projekt badawczy N N402 467939, 2010-2014, *Badanie wpływu stężenia witaminy D w tkance tłuszczowej i w surowicy na stan zapalny u osób otyłych*. Główny wykonawca.
- 6) Projekt badawczy N N402 557440, 2011-2014, *Wpływ modyfikacji epigenetycznych na ekspresję genów związanych z termogenezą w tkance tłuszczowej osób otyłych i o prawidłowej masie ciała*. Kierownik projektu.
- 7) Projekt badawczy 2012/05/B/NZ5/01536, 2013-2016, *Otyłość u człowieka: potencjalna rola genów sirtuin i epigenetycznej kontroli ich aktywności*. Kierownik projektu.

## Nagrody

**2017** - Nagroda Dyrektora IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego za pracę opublikowaną w czasopiśmie o wysokim 5-letnim IF, *Int J Obes (Lond)* 2016; 40 (11): 1635-1642.

**2016** - Nagroda Dyrektora IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego za pracę opublikowaną w czasopiśmie o wysokim 5-letnim IF, *J Transl Med* 2015; 13: 31.

**2014** - stypendium dla młodych doktorów w ramach projektu *Nowoczesne metody, leki i terapie dla ochrony zdrowia i gospodarki Europy XXI wieku – interdyscyplinarne kształcenie w obszarze nauk biomedycznych na studiach II i III stopnia*, nr POKL.04.03.00-00-060/12, 2014r

**2012** - Nagroda Dyrektora IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego za pracę opublikowaną w czasopiśmie o wysokim 5-letnim IF, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66 (1): 19-25.

**2012** - Nagroda Akademii Nauk krajów Grupy Wyszehradzkiej w dziedzinie medycyny za całokształt pracy naukowej.

**2009** - Nagroda Dyrektora IMDiK PAN im. M. Mossakowskiego za pracę opublikowaną w czasopiśmie o wysokim 5-letnim IF, *Genes Immun* 2007; 8 (7): 532-538.

**2006** - Wyróżnienie rozprawy doktorskiej *Związek polimorfizmów genów układu witaminy D z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa* przyznane przez Radę Naukową IMDiK PAN.

**2004** - Stypendium naukowe Deutscher Akademischer Austauschdienst we Frankfurcie nad Menem (6 miesięcy).

## Staże

**2004** – Staż w Laboratorium Biologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii Uniwersytetu im J.W. Goethego we Frankfurcie nad Menem (6 miesięcy).

## **Dydaktyka i popularyzacja nauki**

- 1) W latach **2009-2017** – wykłady w ramach kursów organizowanych przez Zakład Geriatrii i Gerontologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.
- 2) Od **2014r** – wykłady w ramach posiedzeń naukowych Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- 3) Wykłady w ramach Festiwalu Nauki w IMDiK PAN w **2010r** i w **2016r**.
- 4) Od **2006r** opieka merytoryczna nad doktorantami CMKP i IMDIK PAN a także stażystami z innych ośrodków badawczych i uczelni realizującymi projekty badawcze w Zakładzie Badawczo-Lecznym Endokrynologii a następnie w Zespole Kliniczno-Badawczym Epigenetyki Człowieka IMDiK PAN
- 5) Od **2010r** opieka merytoryczna nad lekarzami stażystami w trakcie staży podyplomowych z chorób wewnętrznych i lekarzami w trakcie staży specjalizacyjnych z endokrynologii w ramach specjalizacji z chorób wewnętrznych, kardiologii, diabetologii, endokrynologii i onkologii.

## **Praca lekarza klinicysty**

- 1) Od **2002r** – praca lekarza internisty, a następnie endokrynologa i diabetologa w Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii WUM: diagnozowanie i leczenie chorych oraz pełnienie dyżurów lekarskich w Klinice.
- 2) Od **2007r** – praca z chorymi otyłymi w charakterze dietetyka w ramach prywatnej praktyki lekarskiej (doświadczenia zebrane w tej pracy zawarłam w publikacji przeglądowej dotyczącej zastosowania inhibitorów lipaz w leczeniu otyłości [Białecka-Florjańczyk E, 2018]).
- 3) W latach **2009-2012** – praca w charakterze lekarza pierwszego kontaktu w Przychodni Lekarskiej przy ul. A. Malczewskiego 47a w Warszawie.
- 4) Od **2012r** – praca w charakterze endokrynologa w Przychodni Lekarskiej przy ul. Ciołka 11 w Warszawie.

