

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Oddział Nauk Biomedycznych Wydziału Lekarskiego
Zakład Biologii Strukturalnej

mgr Katarzyna Mac-Marcjanek

ROZPRAWA DOKTORSKA

Zróżnicowanie profili ekspresji genów *PPARG* i *SIRT1* oraz genów powiązanych z genem *SIRT1* w cukrzycy ciążowej (GDM)

Promotor pracy

prof. dr hab. Lucyna A. Woźniak

Łódź 2022

Streszczenie

Cukrzyca ciążowa, czyli każda postać nietolerancji glukozy, pojawiająca się lub rozpoznana po raz pierwszy w czasie ciąży jest najczęstszą chorobą występującą w czasie ciąży, powodującą jej powikłania jak również mającą wpływ na zdrowie i jakość życia, zarówno matki jak i dziecka w okresie poporodowym. Patofizjologia GDM nie jest do końca poznana pomimo jej podobieństwa do wczesnych stadiów cukrzycy typu 2.

Celem badań, których wynikiem jest przedstawiony w niniejszej dysertacji cykl prac oryginalnych, było pogłębienie wiedzy na temat podłoża molekularnego GDM, poprzez zweryfikowanie zmian transkryptomicznych wybranych genów (*SIRT1*, *PPARG*, *IL-6*) zaangażowanych w metabolizm węglowodanów i lipidów oraz procesy zapalne, a także powiązanie ekspresji tych genów z cechami antropometrycznymi oraz parametrami biochemicznymi pacjentek w trzecim trymestrze ciąży.

Dodatkowo prześledziłam, analizując, jak zmiana obowiązujących w trakcie realizacji części badawczej pracy (2010-2015), kryteriów diagnostycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego - PTD (PTD 2011 na PTD 2014) wpłynęła na liczebność grup diagnozowanych jako GDM. Wykazałam na podstawie zmiany ekspresji genu *IL-6* wpływ kryteriów na analizę statystyczną parametrów klinicznych, biochemicznych oraz samego poziomu ekspresji genu *IL-6*.

W badaniach wykorzystałam leukocyty wyizolowane z krwi obwodowej pacjentek w trzecim trymestrze ciąży z GDM oraz pacjentek normoglikemicznych, będących pod opieką Kliniki Chorób Wewnętrznych i Diabetologii w Łodzi, gdzie pacjentki miały przeprowadzoną diagnostykę antropometryczną i biochemiczną.

Do realizacji projektu badawczego, obejmującego ocenę ekspresji genów *SIRT1* i *PPARG*, wykorzystałam metodę PCR. W kolejnym etapie badań, w którym określałam, na grupie wyselekcjonowanych 16 pacjentek (GDM= 9, NGT= 7) ekspresję genów związanych z podwyższoną ekspresją genu *SIRT1*, wykorzystałam mikromacierze DNA dedykowane cukrzycy (Human Diabetes RT² Profiler™ PCR Array). Wyselekcjonowane metodą mikromacierzy geny (*ACLY*, *G6PD*, *IL-6*, *IRS2*, *SREBF1*, *SNAP23*), zweryfikowałam przy użyciu RT-qPCR w całej populacji pacjentek o podwyższonej ekspresji genu *SIRT1* a uzyskane dane wykorzystałam do przeprowadzenia korelacji z cechami antropometrycznymi i parametrami

biochemicznymi pacjentek oraz do analizy biostatystycznej z wykorzystaniem platformy bioinformatycznej IPA (QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis).

Wykazałam podwyższoną ekspresję genu *SIRT1*, *PPARG* i *IL-6* (kryteria diagnozowania PTD 2011) i ich pozytywną korelację z wartościami stężenia glukozy we krwi obwodowej, co sugeruje, że ich nadekspresja może być związana z hiperglikemią występującą u pacjentek GDM. Gen *PPARG* ponadto negatywnie korelował z stężeniem cholesterolu HDL. Zaobserwowałam zróżnicowaną ekspresję genu *SIRT1* w grupie GDM i przy pomocy analizy statystycznej wyodrębniłam dwie wyraźne podgrupy: o znaczącej nadekspresji genu *SIRT1*-GDM/*SIRT1*(↑) (n= 30, p< 0,05) i umiarkowanej nadekspresji genu *SIRT1*- GDM/*SIRT1*(↔) (n= 92, p> 0,05) w porównaniu do grupy kontrolnej.

Potwierdziłam w całej populacji pacjentek znaczącą statystycznie zmianę ekspresji czterech genów wyselekcjonowanych z 11 genów zidentyfikowanych za pomocą mikromacierzy DNA. Jedynie gen liazy ATP-cytrynianowej (*ACLY*) różnił się poziomem ekspresji pomiędzy grupami GDM/*SIRT1*(↑) a GDM/*SIRT1*(↔). Jego obniżona ekspresja w grupie o znaczącej nadekspresji *SIRT1* GDM/*SIRT1*(↑) stwarza możliwości wykorzystania go w przyszłości, jako potencjalnego biomarkera. Wyniki eksperymentalne wraz z analizą IPA, wskazują, że nadekspresja *SIRT1* w leukocytach w warunkach hiperglikemii związana jest z podwyższoną ekspresją *IL6*, *G6PD*, i *SNAP23* oraz obniżoną ekspresją *ACLY*, genów związanych z cukrzycą typu 2 i zaangażowanych w regulację metabolizmu, stanów zapalnych oraz związanych z transportem molekularnym.

Porównując dwa kryteria diagnozowania GDM, wykazałam, że grupa GDM diagnozowana według kryteriów PTD 2011, wykazuje wyższe stężenia glukozy na czczo (FPG), wyższe stężenie glukozy w drugiej godzinie testu OGGTT oraz hemoglobiny glikowanej – HbA1c oraz niższe stężenie HDL cholesterolu. Natomiast grupa GDM PTD 2014 miała wyższe stężenie FPG, wyższe stężenie glukozy w pierwszej godzinie testu OGGTT, HbA1c, HOMA-IR oraz niższe wartości QUICKI-IS. Ekspresja genu *IL-6* według PTD 2011 jest istotnie statystycznie podwyższona w grupie GDM, natomiast według PTD 2011, w grupie GDM ekspresja jest niezmienną w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnice w fenotypie metabolicznym pacjentek, tak samo jak różnice w ekspresji genu *IL-6* oraz korelacje pomiędzy grupami GDM a NGT, wynikające z użycia odmiennych kryteriów diagnozowania, są związane ze zmianami w ciężowym statusie tolerancji glukozy, co wiąże się bezpośrednio z zastosowaniem kryteriów PTD 2014.

Summary

Gestational diabetes, i.e. any form of glucose intolerance, occurring or diagnosed for the first time during pregnancy, is the most common condition of pregnancy, resulting in complications, and affecting the health and life quality of both the mother and the child in the post-partum period. GDM pathophysiology has not been entirely elucidated, despite its similarity to the early stages of type 2 diabetes.

The purpose of the study, whose result is the cycle of original works presented in this dissertation, was to gain more knowledge on the molecular basis of GDM, through verification of the transcriptomic changes of selected genes (*SIRT1*, *PPARG*, *IL-6*) involved in carbohydrate and lipid metabolism and inflammation processes, as well as relation of these genes' expression to the anthropometric characteristics and biochemical parameters of patients in the third trimester of pregnancy.

Moreover, I have reviewed and analysed how the change of the Polish Diabetes Association's (PTD) diagnostic criteria (PTD 2011 to PTD 2014), applicable during the research part of the thesis (2010-2015), affected the size of groups diagnosed with GDM. Based on the change of the *IL6* gene's expression, I have shown how the criteria affect the statistical analysis of clinical, biochemical parameters and the level of the *IL-6* gene's expression itself.

In the study I used leukocytes isolated from peripheral blood of patients with GDM in the third trimester and normoglycemic patients, treated by the Internal Medicine and Diabetology Hospital in Łódź (Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii w Łodzi), where the patients underwent anthropometric and biochemical diagnostics.

To carry out the research project, involving evaluation of expression of the *SIRT1* and *PPARG* genes, I used the PCR method. During the next stage of the study, in which, based on a group of selected 16 patients (GDM= 9, NGT= 7), I determined the expression of the genes associated with higher expression of the *SIRT1* gene, I used diabetes-dedicated DNA micromatrices (Human Diabetes RT² Profiler™ PCR Array). I verified the genes selected using the micromatrix method (*ACLY*, *G6PD*, *IL-6*, *IRS2*, *SREBF1*, *SNAP23*) with RT-qPCR in the whole population of the patients with increased expression of the *SIRT1* gene, and I used the obtained data for the correlation with anthropometric characteristics

and biochemical parameters of the patients, and for a biostatistical analysis using the IPA bioinformatics platform (QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis).

I showed higher expression of the *SIRT1*, *PPARG* and *IL-6* genes (PTD 2011 diagnostics criteria) and their positive correlation with glucose concentration values in peripheral blood, which suggests that their overexpression may be associated with hyperglycaemia in patients with GDM. Moreover, the *PPARG* gene showed a negative correlation with HDL cholesterol concentration. I observed varied expression of the *SIRT1* gene in the GDM group and, using statistical analysis, I determined two distinct subgroups: with significant overexpression of the *SIRT1*- GDM/*SIRT1*gene (\uparrow) (n= 30, p< 0.05) and moderate overexpression of the *SIRT1*- GDM/*SIRT1*gene (\leftrightarrow) (n= 92, p> 0.05) compared to the control group.

In the whole patient population I confirmed a statistically significant change of expression of four genes selected from 11 genes identified using DNA micromatrices. Only the ATP citrate lyase gene (*ACLY*) has a different expression level between GDM/*SIRT1*(\uparrow) and GDM/*SIRT1* groups (\leftrightarrow). Its reduced expression in the group with significant overexpression *SIRT1* GDM/*SIRT1*(\uparrow) makes it possible to use it in the future, as a potential biomarker. Experimental results with the IPA analysis show that overexpression of *SIRT1* in leukocytes under the conditions of hyperglycaemia is associated with higher expression of *IL-6*, *G6PD*, and *SNAP23* and reduced expression of *ACLY*, genes related to type 2 diabetics and involved in the regulation of metabolism, inflammations and conditions associated with molecular transport.

After comparing two GDM diagnosis criteria, I showed that the GDM group diagnosed based on the PTD 2011 criteria shows higher fasting glucose concentrations (FPG), higher glucose concentration in the second hour of the OGGTT test and glycated haemoglobin – HbA1c, as well as reduced HDL cholesterol concentration. However, the GDM PTD 2014 group showed higher FPG concentration, higher glucose concentration in the first hour of the OGGTT, HbA1c, HOMA-IR test, and lower QUICKI-IS values. The *IL-6* gene expression according to PTD 2011 is significantly statistically higher in the GDM group, however, according to PTD 2011, expression in the GDM group remains unchanged compared to the control group. The differences in the patient's metabolic phenotype, as well as the differences in the *IL-6* gene expression, and the correlation between GDM and NGT groups resulting from using different diagnosis criteria are related to the changes in the glucose tolerance status in pregnancy, which is directly associated with using the PTD 2014 criteria.