

prof. dr hab. n. med. Małgorzata Myśliwiec

Gdańsk, dnia 26.05. 2014 r.

Katedra i Klinika Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębinki 7

80-952 Gdańsk

tel. 058 349 28 98, 602 661 590

## **Recenzja**

### **pracy na stopień doktora nauk medycznych**

**lek. med. Elizy Skały-Zamorowskiej**

### **p.t. „Kliniczna i metaboliczna charakterystyka dzieci z cukrzycą uwarunkowaną mutacjami w genie glukokinazy”**

Przedstawiona mi do oceny praca obejmuje: 129 stron tekstu, 100 pozycji cytowanego piśmiennictwa.

Układ pracy jest klasyczny i obejmuje: Wstęp (str. 17-41), Założenia i cele pracy (str. 42), Materiały i metody badań (str. 43-48), Wyniki (str. 49-91), Dyskusję (str. 92-115), Wnioski (str. 116-117). W pracy zawarto również: Spis treści, Wykaz tabel oraz rycin, Indeks skrótów oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim.

Cel pracy został przedstawiony jasno i precyzyjnie. Lek. med. Eliza Skała - Zamorowska podjęła próbę opracowania algorytmu dotyczącego prowadzenia diagnostyki w kierunku cukrzycy MODY 2.

Cel pracy był realizowany w oparciu o:

1. Ocenę genetyczną i metaboliczną oraz charakterystykę fenotypu klinicznego dzieci z cukrzycą MODY.
2. Wykrycie nosicieli mutacji wśród członków rodziny pacjenta z MODY 2.
3. Charakterystykę fenotypu klinicznego rodziców i rodzeństwa dzieci z rozpoznąną cukrzycą MODY 2 będących, objawowymi lub bezobjawowymi nosicielami mutacji.

Oryginalną częścią postawionego celu pracy była próba stworzenia kompleksowego opracowania dotyczącego dzieci z cukrzycą uwarunkowaną mutacjami w genie glukokinazy.

Obszerny wstęp prezentuje współczesną wiedzę na temat klasyfikacji i epidemiologii cukrzycy, kryteriów diagnostycznych jej rozpoznania. Ponadto Doktorantka we wstępie w sposób bardzo wnikliwy przedstawiła dotychczasową wiedzę na temat epidemiologii, diagnostyki i terapii cukrzyc monogenowych ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy MODY 2 opierając się na starannie dobranym piśmiennictwie.

Doktorantka słusznie podkreśliła we wstępie pracy, że jednym z najważniejszych osiągnięć ostatnich lat jest coraz większy dostęp do badań genetycznych. W Polsce dzięki wspaniałej, profesjonalnej współpracy z prof. dr hab. med. Wojciechem Młynarskim i dr hab. med. Maciejem Borowcem w Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Chorób Dzieci i Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi jest możliwość od lat wykonywania badań genetycznych, które pozwalają nie tylko na zdiagnozowanie pacjentów z nietypowym przebiegiem klinicznym cukrzycy, ale także pozwalają na zweryfikowanie wcześniej postawionego rozpoznania cukrzycy i zindywidualizowanie leczenia. Ponadto rozszerzenie badań genetycznych w rodzinie, w której występuje cukrzyca monogenowa MODY 2 mają charakter nie tylko diagnostyczny, ale również prognostyczny. Należy podkreślić, że testy prognostyczne odnoszą się do osób, które w chwili badania są zdrowe, ale ze względu na autosomalny dominujący sposób dziedziczenia mają duże ryzyko zachorowania na cukrzycę monogenową. Prawdopodobieństwo odziedziczenia zmutowanego genu w każdym pokoleniu wynosi statystycznie aż 50%. Wykrycie nosicieli mutacji, którzy do tej pory nie zachorowali lub pozostawali nieświadomi rozpoznania pozwala na wczesne wykrycie zaburzeń metabolizmu glukozy, na wdrożenie właściwej terapii, a tym samym na utrzymanie prawidłowego wyrównania metabolicznego stanowiąc działanie prewencyjne rozwoju w przyszłości chorób sercowo-naczyniowych.

Pragnę podkreślić, że cukrzyca MODY 2, uwarunkowana mutacją w genie glukokinazy jest łagodną postacią cukrzycy, ujawniającą się często dopiero u młodych dorosłych lub u osób w późniejszym wieku i często pozostaje niezdiagnozowana w okresie dzieciństwa, z tego powodu podjęte przez lek. Med. Elizę Skałę - Zamorowską badania mające na celu wskazanie czynników sugerujących wykonanie badań genetycznych w kierunku rozpoznania cukrzycy MODY 2 już w okresie dzieciństwa są w pełni uzasadnione.

Badaniami objęto 27 dzieci (11 dziewcząt oraz 16 chłopców), którzy byli diagnozowani lub leczeni w Klinice Pediatrii, Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej SUM oraz pozostających pod opieką Poradni Diabetologicznej GCZD w Katowicach w latach 2007-2012. W okresie objętym badaniem cukrzycę rozpoznano i/lub leczono u około 800

pacjentów. Kryteria przeszukiwania bazy danych, celem identyfikacji pacjentów o dużym prawdopodobieństwie monogenowego podłoża choroby, były oparte na nietypowym przebiegu klinicznym cukrzycy.

Kryteriami włączenia do badania były:

1. Zaburzenia węglowodanowe pod postacią hiperglikemii na czczo lub zaburzeń tolerancji glukozy
2. Cukrzyca typu 1 o niskim dobowym zapotrzebowaniu na insulinę po 2 latach od zachorowania
3. Cukrzyca o łagodnym przebiegu klinicznym mimo obecności klasycznych markerów immunologicznych i/lub obecnym w stężeniach fizjologicznych C-peptydem
4. Cukrzyca z brakiem obecności klasycznych markerów immunologicznych przy rozpoznaniu i/lub brakiem obecności w stężeniach fizjologicznych C-peptydu.

U wszystkich pacjentów, którzy spełniali kryteria włączenia do badania oraz u członków rodziny pacjentów z rozpoznaną cukrzycą typu MODY 2 wykonano badania genetyczne w akredytowanym ośrodku badań genetycznych Pracowni Immunopatologii i Genetyki, Kliniki Chorób Dzieci i Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Ponadto u wszystkich osób badanych oznaczono stężenie hemoglobiny glikowanej HbA1c, C-peptydu, poziom klasycznych markerów immunologicznych, wykonano doustny test tolerancji glukozy oraz obliczono wskaźnik masy ciała (BMI) na podstawie dokonanych pomiarów antropometrycznych. Dodatkowo u dzieci oznaczono lipidogram, stężenie TSH, fT4 oraz poziom przeciwciał przeciw tyreoglobulinie przeciw peroksydazie tarczycowej.

Podnoszącą znacznie wartość pracy jest zebrany dokładny wywiad ogólnopediatryczny, diabetologiczny i rodzinny obejmujący dane osobowe i okoliczności, wiek diagnozy, czas trwania choroby, rodzaj terapii, aktualne dobowe zapotrzebowanie na insulinę, dane dotyczące chorób przewlekłych, stosowanych leków, informacje z wywiadu rodzinnego dotyczące zaburzeń metabolicznych oraz innych chorób występujących u pozostałych członków rodziny.

Średni wiek pacjentów, w chwili zakończenia rekrutacji do badania wynosił 15,01 lat, natomiast średni wiek zachorowania wynosił około 9,46 lat. Średni czas jaki upłynął od rozpoznania cukrzycy lub zaburzeń gospodarki węglowodanowej do zakwalifikowania pacjenta do diagnostyki genetycznej w kierunku cukrzycy monogenowej wynosił 1,85 lat.

Zaprogramowane w ten sposób założenia pracy lek. med. Elizy Skąły- Zamorowskiej wniosły szereg istotnych spostrzeżeń, ważnych przede wszystkim z punktu widzenia klinicznego.

Spośród licznych uzyskanych wyników badań na uwagę zasługuje uzyskany wynik udziału procentowego - 4,5% występowania cukrzycy MODY 2 wśród wszystkich dzieci z rozpoznaną cukrzycą leczonych w GCZD. Dotychczas częstość występowania, jak również rozmieszczenia cukrzyc monogenowych w populacji osób chorych na cukrzycę jest ciągle przedmiotem badań i dyskusji. Badania epidemiologiczne prowadzone na świecie dotyczą głównie osób dorosłych, nieliczne tylko są poświęcone częstości występowania cukrzycy MODY 2 w populacji wieku rozwojowego. Za sprawą projektu „Polish Registry for Pediatric and Adolescent Diabetes – National Genetic Screening for Monogenic Diabetes” realizowany przez Klinikę Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii UM w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. med. Wojciecha Młynarskiego Polska należy do krajów, w których badania epidemiologiczne w kierunku cukrzyc monogenowych u dzieci są najbardziej zaawansowane. Wzorowa współpraca licznych ośrodków diabetologicznych w Polsce pozwoliła na stworzenie rejestru cukrzyc monogenowych w populacji wieku rozwojowego w naszym kraju. Szacuje się, że w Polsce rozpowszechnienie cukrzyc monogenowych stanowi 3,1-4,2% dzieci z cukrzycą, a cukrzyca MODY 2 odpowiada za 83% przypadków wszystkich cukrzyc monogenowych. Śląski ośrodek diabetologiczny, w którym Doktorantka wykonywała badania, kierowany przez prof. dr hab. med. Przemysławę Jarosz-Chobot znacząco przysłużył się w powstaniu tego rejestru i wyodrębnieniu nowych cukrzyc monogenowych, które wcześniej klasyfikowane były do innych typów cukrzycy.

Jako diabetolog pragnę podkreślić, iż wyniki uzyskane przez lek. med. Elżę Skąłę-Zamorowską mają istotne znaczenie w codziennej praktyce lekarskiej diabetologa. Wykazany przez Doktorantkę łagodny, praktycznie bezobjawowy klinicznie charakter cukrzycy MODY 2 w okresie dzieciństwa może być w tym okresie niezdiagnozowany. Może ujawnić się dopiero w okresie ciąży przy okazji wykonywania badań przesiewowych w kierunku diagnostyki zaburzeń gospodarki węglowodanowej lub też choroba może pozostawać niezdiagnozowana do 50 roku życia. Szkoda, że Doktorantka w przeprowadzonym wywiadzie rodzinnym nie ujęła informacji na temat występowania chorób sercowo-naczyniowych, w tym urazu mózgu u członków rodziny dzieci z rozpoznana cukrzycą MODY 2. Przeprowadzony dokładny wywiad rodzinny w kierunku chorób sercowo-naczyniowych może znacznie zwiększyć szansę postawienia prawidłowego rozpoznania cukrzycy monogenowej. Nadal brak refundacji badań genetycznych w Polsce w kierunku diagnostyki cukrzyc

monogenowych jest istotnym czynnikiem poza heterogennością obrazu klinicznego cukrzycy MODY 2 oraz rzadkością jej występowania sprawia, że wielu pacjentów chorych na cukrzycę nadal pozostaje w grupie pacjentów niesklasyfikowanych lub źle sklasyfikowanych, co ma istotne implikacje terapeutyczne.

Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników i obserwacji podkreśla, że przeprowadzenie badań genetycznych w kierunku cukrzycy MODY 2 odgrywają znaczącą rolę diagnostyczną i prognostyczną. Z całą mocą podkreśla, że zasadniczą konsekwencją postawienia właściwej diagnozy jest włączenie adekwatnej terapii. W swojej pracy badawczej wykazała, że właściwa diagnoza przyczyniła się do podjęcia decyzji o modyfikacji terapii. W przypadku 7 dzieci z rozpoznaną wcześniej cukrzycą typu 1 insulinoterapia została zastąpiona doustnymi lekami hipoglikemizującymi, co znacznie zwiększyło komfort życia pacjenta dotychczas leczonego insuliną i wpłynęło pozytywnie na postrzeganie przez rodziców choroby dziecka.

Oryginalną częścią niniejszej rozprawy doktorskiej było objęcie diagnostyką genetyczną także członków rodziny dzieci z rozpoznaną cukrzycą MODY 2. Przeprowadzenie badań genetycznych także u członków rodziny oprócz charakteru diagnostycznego i prognostycznego odegrało w pracy także rolę prewencyjną. Na podstawie badań molekularnych wykryto 10 bezobjawowych nosicieli mutacji. Wczesne wykrycie zaburzeń metabolizmu glukozy, wdrożenie na odpowiednim etapie choroby właściwej terapii pozwoli na utrzymanie prawidłowych wartości glikemii i prewencji w przyszłości rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy oraz powikłań naczyniowych.

Interesującą częścią rozprawy doktorskiej było wykazanie przez Doktorantkę dodatnich przeciwciał przeciw antygenom wysp trzustkowych u prawie 70% badanych dzieci z rozpoznaną cukrzycą MODY 2. Słusznie Doktorantka podkreśla, że na dzień dzisiejszy nie ma konsensusu dotyczącego występowania przeciwciał przeciwko antygenom wysp trzustkowych w cukrzycy monogenowej. Dlatego nie należy dyskwalifikować pacjentów z dodatnim profilem immunologicznym z badań genetycznych w kierunku cukrzycy monogenowych, szczególnie jeśli obraz choroby odbiega od typowego dla cukrzycy typu 1.

Spośród licznych uzyskanych przez Doktoranta wyników przeprowadzonych badań na uwagę zasługują następujące istotne spostrzeżenia.

1. U 37% badanych pacjentów z rozpoznaną cukrzycą MODY 2 średni poziom HbA1c był wyższy niż 6,5%, co może sugerować, że nie zawsze pacjent z cukrzycą uwarunkowaną mutacją w genie glukokinazy spełnia kryteria prawidłowego wyrównania glikemii i nie każdy przebieg cukrzycy MODY 2 można uznać za łagodny.

2. Występowanie przeciwciał przeciwko antygenom komórek beta trzustki nie miało negatywnego wpływu na wydzielanie C-peptydu.
3. Konieczność zastosowania insulinoterapii u pacjentów z cukrzycą MODY 2 wiązało się z rozpoznaniem cukrzycy na podstawie wyniku testu doustnego obciążenia glukozą oraz niższym poziomem C-peptydu poniżej stężenia fizjologicznego. Natomiast u dzieci z rozpoznaną cukrzycą MODY 2, u których poziom C-peptydu występował w stężeniach fizjologicznych dokonano zmiany terapii z insuliny na leki doustne oraz leczenie dietetyczne.

### **Końcowe wnioski oceniającego:**

1. Praca stanowi prawidłowo napisaną publikację, w której przedstawiono ocenę genetyczną i metaboliczną oraz charakterystykę fenotypu klinicznego dzieci z cukrzycą MODY 2, a także identyfikację nosicieli mutacji w genie glukokinazy wśród członków rodziny pacjenta. Doktorantka potrafiła powiązać wyniki badań, biochemicznych, immunologicznych i genetycznych ze stanem klinicznym osób chorych na cukrzycę typu MODY 2 i sprecyzować wnioski wynikające z tych współzależności. Świadczy to o zaangażowaniu osobistym w realizację badań i dobrej współpracy z licznymi osobami w zakresie badań immunologicznych i genetycznych.
2. Wyniki z niniejszego badania pozwoliły na wstępne opracowanie algorytmu dotyczącego prowadzenia diagnostyki w kierunku cukrzycy MODY 2. Niewątpliwą zaletą przeprowadzonych badań jest analiza kliniczna, biochemiczna, immunologiczna i genetyczna przeprowadzona po raz pierwszy w Polsce u dzieci z podejrzeniem cukrzycy MODY 2.
2. Prezentacja wyników badań własnych, w tym tabele i ryciny stanowią wzorowo przygotowaną dokumentację naukowo-badawczą.
3. Wstęp do pracy i prawidłowo przeprowadzona dyskusja świadczą o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie diabetologii oraz umiejętności precyzowania spostrzeżeń i wniosków wynikających z przeprowadzonych badań.

Z obowiązku recenzenta pragnę wniesć kilka uwag.

1. Zachęcam do dalszych badań na znacznie szerszej grupie pacjentów z cukrzycą MODY 2. Doktorantka sama zauważyła, że istotnym ograniczeniem pracy była mała liczebność badanej grupy, a szczególnie utworzonych podgrup. Dlatego obecne uzyskane wyniki badań należy uznać za wstępne, wymagające weryfikacji na większej populacji dzieci w ramach badań wieloośrodkowych. Ze swojej strony jako

Kierownik Kliniki Pediatrii Diabetologii i Endokrynologii GUMed deklaruje gdański ośrodek diabetologiczny do współpracy w zakresie prowadzonych badań.

2. We wstępie, w rozdziale dotyczącym diagnostyki zaburzeń gospodarki węglowodanowej należy wnieść poprawki w zakresie kryteriów rozpoznawania cukrzycy na podstawie pomiaru glikemii na czczo i glikemii przygodnej. Prawidłowo glikemia na czczo  $\geq 126$  mg/dl, glikemia przygodna  $\geq 200$  mg/dl pozwala na rozpoznanie cukrzycy według Zaleceń PTD.
3. Na stronie 19 wystąpił błąd redakcyjny zamiast słowo trzustki jest wpisane słowo rzustki

Powyższe uwagi, w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy doktorskiej, stanowią tylko zachętę do dalszej działalności naukowej.

Ogólna ocena pracy na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Elizy Skały - Zamorowskiej jest wysoce pozytywna, spełnia ona wszelkie warunki określone przez aktualną Ustawę o tytule naukowym i stopniach naukowych i wnioskuję o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Lekarskiego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach lek. med. Elizy Skały - Zamorowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz równocześnie **wnioskuję o wyróżnienie pracy „Kliniczna i metaboliczna charakterystyka dzieci z cukrzycą uwarunkowaną mutacjami w genie glukokinazy”**, ponieważ stanowi ona cenny wkład kliniczny w dziedzinie diabetologii.

**Wykazane przez Doktorantkę w czasie realizacji pracy doktorskiej prawidłowe myślenie, wysoce profesjonalne wykorzystanie dostępnych badań biochemicznych, immunologicznych i genetycznych dla rozwiązywania postawionych sobie zadań badawczych, oraz poprawność merytoryczna i rzetelność ich wykonania, uzasadniają wniosek o wyróżnienie w/w pracy.**