

prof. dr hab. med. Artur Mazur

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Izabela Krzyśko-Pieczka

**„Charakterystyka kliniczna dzieci z otyłością
w relacji do polimorfizmów *NR3C1* „**

Otyłość jest wynikiem długotrwałego zaburzenia równowagi między ilością dostarczonej energii a jej wydatkowaniem. Regulacja energetyczna organizmu podlega zarówno czynnikom genetycznym, jak i środowiskowym. Obecnie szacuje się, że udział czynnika genetycznego w powstawaniu otyłości wynosi 40–60%. Analizując przyczyny otyłości, należy również wziąć pod uwagę, że predyspozycja genetyczna nie ogranicza się do konkretnej liczby genów, lecz bardziej złożonego kompleksu ogromnej różnorodności genów. Geny te mogą pośrednio lub bezpośrednio oddziaływać wzajemnie na siebie na wielu poziomach, wskutek czego kilka lub więcej genów może funkcjonować współdziałając lub zachowywać się jak modyfikatory oddziałujące na fenotyp. Oprócz interakcji genów względem siebie, również środowisko może współdziałać z układem genetycznym na wielu poziomach. Identyfikacja klinicznie istotnych genów wymaga przeprowadzenia odpowiednich badań typowania genów kandydujących, które mają lub sugerują związek z przemianami metabolicznymi. Dzięki postępowi biologii molekularnej możliwa jest analiza występowania polimorfizmów w tych genach.

Tym większa jest wartość badań podjętych przez lek. med. Izabelę Krzyśko-Pieczka zakończonych pracą pod tytułem „ Charakterystyka kliniczna dzieci z otyłością w relacji do polimorfizmów *NR3C1* „, stanowiącą ważny element w wyjaśnieniu etiologii, diagnostyki i ewentualnych możliwości leczenia otyłości u dzieci i młodzieży.

Redakcja przedłożonej pracy, poprawność metodyczna, wartość merytoryczna przedstawionych wyników, ocena wniosków pracy.

Praca (117 stronicowa) napisana jest w układzie typowym dla rozpraw doktorskich: składa się z obszernego *Wstępu* zawierającego 3 podrozdziały oraz *Części badawczej*, w której autorka przedstawiła *Założenia i Cele pracy*, *Materiał i metody*, *Wyniki badań* oraz *Dyskusję* zakończoną sześcioma *Wnioskami*, 164 pozycjami aktualnego i starannie dobranego *Piśmiennictwa* oraz zwięzłym i rzetelnym *Streszczeniem*, dopełnionych właściwymi spisami rycin i tabel.

Następujące po sobie podrozdziały *Wstępu* wprowadzają czytelnika w aktualny przegląd zagadnień związanych z tematyką pracy takich jak: kryteria rozpoznania otyłości, epidemiologia, etiologia, genetyczne podłoże otyłości. W kolejnym podrozdziale wstępu Autorka przedstawia najnowsze informacje związane z powikłaniami otyłości u dzieci i młodzieży. Na szczególną uwagę zasługuje 2 podrozdział wstępu dotyczący zaburzeń hormonalnych w otyłości, w którym doktorantka opisała w jasny i klarowny sposób skomplikowane zagadnienia dotyczące mechanizmów powstawania między innymi insulinooporności, zmian w zakresie osi tarczycowej, osi hormonu wzrostu, wreszcie w osi podwzgórze-przysadka nadnercza. Ostatnia bardzo interesująca część wstępu dotyczyła glikokortykosteroidów. Doktorantka przedstawiła aktualne informacje na temat ich roli w organizmie, a w szczególności: mechanizmu ich działania, wpływu na metabolizm glukozy, białek i lipidów oraz na wybrane układy i narządy. Szczególne zainteresowanie i uwagę w tej części wstępu wzbudziły aktualne informacje na temat polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidowego (*NR3C1*).

Rozpoczynając *Część badawczą* Autorka przedstawiła zasadnicze założenia i cele swojej pracy jakimi były:

- rozpoznanie, jak często w populacji dzieci i młodzieży z otyłością występują określone polimorfizmy genu *NR3C1*: N363S (rs6195; rs56149945), BclII (rs41423247) oraz ER22/23EK (rs6189+rs6190), warunkujące mniejszą lub większą wrażliwość na działanie GKS ;
- oraz ustalenie, czy występują korelacje między obecnością badanych wariantów *NR3C1*, a manifestacją kliniczną otyłości u badanych pacjentów.

Cele szczegółowe zawierały się w pytaniach:

- Czy w populacji dzieci z otyłością częściej niż w populacji osób szczupłych występują polimorfizmy związane z większą wrażliwością na GKS, a rzadziej te związane z większą opornością na GKS?
- Czy występowanie polimorfizmu związanego z większą wrażliwością na GKS koreluje z większym ryzykiem rozwoju wybranych powikłań otyłości?
- Czy występowanie polimorfizmu związanego z większą opornością na GKS koreluje z metabolicznie korzystniejszym profilem chorego?

Wyznaczone cele Autorka realizowała dzięki przemyślanej i doskonale opracowanej metodyce badania oraz przeprowadzonej analizie statystycznej przedstawionych w rozdziale *Materiał i metody*. Zgodę na przeprowadzenie badania wydała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu Medycznego (Uchwała 233/13).

Pacjenci włączeni do badań byli rekrutowani spośród dzieci kierowanych do Kliniki Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu celem diagnostyki zagrożeń komplikacjami z powodu występującej u nich nadmiernej masy ciała (nadwagi bądź otyłości). Przebadano 247 dzieci (132 dziewcząt i 115 chłopców) w wieku od 2 do 17 lat. Średnia wieku wynosiła $12,37 \pm 3,60$ lat. Spośród osób u których oceniano stopień dojrzewania płciowego – 22% znajdowało się w okresie przedpokwitaniowym (stadium I według skali Tannera), a 78% w okresie pokwitania i po jego zakończeniu (stadium II-V według skali Tannera).

U wszystkich dzieci w związku z powodem przyjęcia do Kliniki rutynowo wykonano badania charakteryzujące ich cechy antropometryczne, stan metaboliczny oraz hormonalny. Ponadto, przedstawicielom ustawowym pacjentów przedstawiano cele i metody badania, a po wyrażeniu przez nich pisemnej zgody na badania genetyczne, pobierano dodatkową porcję 5 ml krwi do probówek z EDTA. W przypadku nieletnich po ukończeniu 16-tego roku życia była też uzyskiwana ich zgoda na udział w badaniu. Pobraną krew przekazywano do Zakładu Patologii Molekularnej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, gdzie prowadzone były analizy molekularne polimorfizmów genu *GR NR3C1*: N363S (rs6195; rs56149945), BclII (rs41423247) oraz ER22/23EK (rs6189+rs6190).

Grupę kontrolną dla badań genetycznych stanowiło 568 zdrowych i szczupłych dorosłych. Ich anonimowe próbki krwi uzyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolечnictwa w Poznaniu. Do badań wykorzystano krew pozostającą po badaniach wymaganych dla kwalifikacji krwiodawców. Dostępne dane kliniczne obejmowały wiek, płeć oraz BMI ochotników. Średnia ich wieku wynosiła $38,10 \pm 10,20$ lat, a średnia BMI $23,60 \pm 1,30$ kg/m². Nie przeprowadzono u nich żadnych dodatkowych badań celem oceny parametrów antropometrycznych, stanu metabolicznego czy hormonalnego, ale zakwalifikowanie ich jako dawców krwi, było uwarunkowane tym, że nie posiadali oni żadnych chorób przewlekłych w tym autoimmunizacyjnych, cukrzycy, czy chorób układu sercowo-naczyniowego. Do wykorzystania w projekcie wybrano próbki krwi od osób, których BMI wskazywał na brak otyłości lub nadwagi.

W grupie badanej przeprowadzono badania antropometryczne, ocenę składu masy ciała, test doustnego obciążenia glukozą, oraz poziom insuliny, obliczono wskaźniki insulinooporności, wykonywano badania lipidogramu, hemoglobiny glikowanej, przeciwciał przeciwko insulinie, fosfatazie tyrozyny, dekarboksylazie kwasu glutaminowego, tyroperoksydazie, tyreoglobulinie. Materiał do badań molekularnych stanowiło DNA izolowane z leukocytów krwi obwodowej osób badanych. Analizy molekularne polimorfizmów genu receptora GKS (*NR3C1*) przeprowadzono w Zakładzie Patologii Molekularnej, Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, w ramach współpracy w programie badawczym - grant im. Profesora Artura Czyżyka pozyskany z Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego: „Znaczenie genów kontrolujących dostępność i działanie glikokortykosteroidów dla rozwoju insulinooporności i zagrożenia cukrzycą typu 2 u dzieci i młodzieży z otyłością”.

Wyniki swoich badań Autorka czytelnie przedstawiła na 5 rycinach i w 30 tabelach. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania trzech badanych wariantów polimorficznych między osobami otyłymi i szczupłymi (wszystkie wartości $p > 0,05$). W odniesieniu do badanych zmian skórnych, w przypadku polimorfizmu rs6195, wbrew wstępnym założeniom, rogowacenie ciemne stwierdzono istotnie częściej u homozygot typu dzikiego (AA), niż u osób z testowanym polimorfizmem (genotypy AG i GG): (odpowiednio 71,7% i 36,0%) ($p < 0,001$). W odniesieniu do składu masy ciała, w przypadku polimorfizmu rs6195, również wbrew wstępnym założeniom, u osób z polimorfizmem (genotypy AG i GG), w porównaniu do osób z typem dzikim genu (genotyp AA), stwierdzono niższą średnią ($p = 0,007$) i procentową ($p = 0,016$) zawartość całkowitej masy tłuszczowej w organizmie odpowiednio $24,72 \pm 10,53$ kg ($35,13 \pm 4,64\%$ masy ciała) i

33,41 ± 15,15 kg (39,16 ± 7,41% masy ciała), w tym mniejszą średnią ($p=0,010$) i procentową ($p=0,007$) zawartość masy tłuszczowej w obrębie tułowia – odpowiednio 10,88 ± 4,75 kg (29,76 ± 5,09% masy ciała) i 14,29 ± 5,70 kg (34,29 ± 7,27% masy ciała) oraz wyższą całkowitą zawartość wody w organizmie ($p=0,014$) – odpowiednio 47,49 ± 3,42% masy ciała i 46,89 ± 3,84% masy ciała. W zakresie badanej równowagi insulinowo-glikemicznej w odniesieniu do polimorfizmu rs6189+rs6190, u nosicieli polimorfizmu (heterozygoty GA/GA), w porównaniu do homozygot typu dzikiego (GG/GG), ponownie wbrew wstępnym założeniom, odnotowano istotnie wyższe stężenie insuliny w 120 minucie OGTT ($p=0,025$) – odpowiednio 145,23 ± 108,78 $\mu\text{U/ml}$ i 74,03 ± 58,64 $\mu\text{U/ml}$. W obrębie badanych przeciwciał, w przypadku polimorfizmu rs6195 istotną statystycznie różnicę stwierdzono dla przeciwciał antyGAD charakterystycznych dla cukrzycy typu 1 ($p=0,009$), które występowały u większej liczby osób z polimorfizmem (genotypy AG lub GG) (20%), w porównaniu do osób bez jego obecności (AA) (4,08%).

Uznanie recenzenta wzbudził rozdział *Dyskusja*, w którym Doktorantka bez powtórzeń, analizuje wyniki swoich badań. Uzyskane przez siebie wyniki dyskutuje, zestawiając je w kontrpropozycjach do osiągnięć najważniejszych badaczy z omawianego tematu. Podkreślić należy swadę i łatwość zestawiania kluczowych problemów, wynikających z oceny uzyskanych w rozprawie wyników z opiniami innych autorów, co świadczy o dużej wiedzy Autorki. Uznanie recenzenta wzbudził również podział dyskusji na części omawiające zalety swojego badania, jego ograniczenia oraz perspektywy dalszych badań.

Czynnikami ograniczającymi i budzącymi wątpliwości w opinii recenzenta może być dysproporcja liczebna między przedstawicielami nosicieli polimorfizmu, a homozygotami typu dzikiego, szczególnie w odniesieniu do rs6195 i rs6189+rs6190 co zauważyła również Autorka, pisząc o tym w ograniczeniach pracy. Wątpliwość może prowokować także dobór grupy kontrolnej wyłącznie z osób dorosłych i porównanie wyników z grupą badaną w wieku rozwojowym. Czynnikiem utrudniającym ocenę wyników jest fakt, że grupę badaną stanowili pacjenci z otyłością, która sama w sobie jest stanem różnorodnego wpływu wielu polimorfizmów genów oraz wpływów środowiskowych skutkujących zaburzeniami zarówno metabolicznymi jak i w regulacji wielu procesów, które w sposób bezpośredni i pośredni mogą wpływać na sekrecję i metabolizm steroidów, w tym kortyzolu. Bardzo interesującym wynikiem pracy jest w przypadku polimorfizmu rs6195 stwierdzenie statystycznie istotnie różnicy dla przeciwciał antyGAD charakterystycznych dla cukrzycy typu 1 ($p=0,009$), które występowały u większej liczby osób z polimorfizmem (genotypy AG lub GG), w porównaniu do osób bez jego obecności (AA). To odkrycie, powinno być przedmiotem dalszych badań w

kontekście możliwości wyjaśnienia rozwijających się u osób otyłych powikłań metabolicznych.

Po przeprowadzonej dyskusji Doktorantka przedstawiła wnioski, które były odpowiedzią na postawione przez siebie cele pracy. W ocenianej pracy Recenzent znalazł niewielkie błędy interpunkcyjne, ujednolicenia wymagałoby forma przedstawienia pozycji piśmiennictwa, które zawiera 164 dobrze dobranych i aktualnych pozycji, głównie obcojęzycznych i pod tym względem nie budzi zastrzeżeń.

Wniosek końcowy

Mimo przedstawionych wyżej uwag recenzowana rozprawa doktorska Pani Izabeli Krzyśko-Pieczka „Charakterystyka kliniczna dzieci z otyłością w relacji do polimorfizmów *NR3C1*” jest oryginalnym i rzetelnym wkładem w rozwój wiedzy na ten temat. Odpowiada w pełni warunkom stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych, dlatego wnioskuję o dopuszczenie Pani Izabeli Krzyśko-Pieczka do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej, według stosownych wymagań i przepisów prawa.

Artur Mazur

