

Recenzja  
rozprawy doktorskiej Lek. Izabela Krzyśko-Pieczka  
pt.: „Charakterystyka kliniczna dzieci z otyłością w relacji do polimorfizmów *NR3C1*”

Praca doktorska wykonana w Klinice Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor: dr hab. Marta Fichna

Zwiększająca się liczba osób z nadwagą i otyłością w ciągu ostatnich lat, ale również większa świadomość negatywnego wpływu tych zaburzeń na zdrowie człowieka przyczyniają się do prowadzenia badań nad podłożem występowania tych zaburzeń.

Intensywny rozwój genetyki w ciągu ostatnich lat spowodował poszukiwanie przyczyn wielu chorób na poziomie genomu. Wykazano, że w przypadku otyłości postać monogenowa jest wyjątkowo rzadka. Zatem konieczne wydało się prowadzenie dalszych badań w poszukiwaniu zespołów wielu genów, w których zmiany uzupełniająco składają się na predyspozycję do tzw. otyłości wielogenowej. Jednym z tematów badawczych jest efekt zmienności genetycznej składników szlaku sygnałowego glikokortykosteroidów - GKS, w tym genu receptora glikokortykosteroidowego (GR) - *NR3C1*. Wykazano, że różne warianty tego genu mogą wywierać wpływ na ekspresję i charakterystykę białka GR, wrażliwość komórek na GKS, co może sprzyjać różnym zaburzeniom metabolicznym.

Badaniami objęto 247 pacjentów Kliniki Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (132 dziewcząt i 115 chłopców) w wieku od 2 do 17 lat ( $12,37 \pm 3,60$  lat), spośród dzieci kierowanych celem diagnostyki zagrożeń komplikacjami z powodu występującej u nich nadmiernej masy ciała (nadwagi bądź otyłości). W grupie tej ponad  $\frac{3}{4}$  dzieci było w okresie w okresie pokwitania i po jego zakończeniu (stadium II-V według skali Tannera).

U wszystkich rutynowo wykonano badania charakteryzujące ich cechy antropometryczne, stan metaboliczny oraz hormonalny, a także badania polimorfizmów genu *GR NR3C1*: N363S (rs6195; rs56149945), BclI (rs41423247) oraz ER22/23EK (rs6189+rs6190).

Grupę kontrolną dla badań genetycznych stanowiło 568 zdrowych i szczupłych dorosłych anonimowych dawców krwi, średnia ich wieku wynosiła  $38,10 \pm 10,20$  lat, a średnia BMI  $23,60 \pm 1,30$  kg/m<sup>2</sup>. Nie zostały przeprowadzone u nich żadne dodatkowe badania 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 cukrzycy, czy chorób układu sercowo-naczyniowego. Do wykorzystania w projekcie wybrano próbki krwi od osób, których BMI wskazywało na brak otyłości i nadwagi.

Z zainteresowaniem przeczytałam Wstęp, w którym na blisko 25 stronach Doktorantka przedstawiła zagadnienia występowania otyłości, jej etiologii zarówno uwarunkowanej genetycznie jak i środowiskowo, a także powikłań mogących towarzyszyć temu zaburzeniu. Opisała również jako organ endokryny tkankę tłuszczową i implikacje kliniczne spowodowane wydzielaniem przez nią różnych aktywnych substancji. Autorka przedstawiła również istotne zaburzenia hormonalne występujące w otyłości oraz rolę glikokortykoidów, ich receptorów w organizmie, istotne funkcjonalnie polimorfizmy genu receptora glikokortykosteroidowego (*NR3C1*), a także zespół Cushinga wynikający z długotrwałego narażenia na nadmierne działanie glikokortykoidów.

Celem pracy była ocena, jak często w populacji dzieci i młodzieży z otyłością występują polimorfizmy genu *NR3C1*: N363S (rs6195; rs56149945), BclI (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.

Doktorantka wysunęła kilka hipotez, które pomogły osiągnąć zamierzony cel pracy:

1. 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?
2. Czy występowanie polimorfizmu związanego z większą wrażliwością na GKS koreluje z większym ryzykiem rozwoju wybranych powikłań otyłości?
3. Czy występowanie polimorfizmu związanego z większą opornością na GKS koreluje z metabolicznie korzystniejszym profilem chorego?

Doktorantka w rozdziale 3. opisała grupę pacjentów, a także metody zastosowane w pracy: oceniane wskaźniki antropometryczne, ocenę składu masy ciała, test doustnego obciążenia glukozą wraz z kryteriami jego interpretacji, kryteria insulinooporności, które zostały przyjęte na potrzeby pracy oraz metody oznaczeń laboratoryjnych, w tym zasady i sposób przeprowadzenia analizy molekularnej. W opisie oznaczeń parametrów lipidowych wskazane byłoby umieszczenie wartości referencyjnych dla badanej grupy. Opisała statystyczne metody analiz, w tym zgodność rozkładu genotypów z równowagą Hardy-Weinberga dla każdego locus.

Autorka przedstawiła w 6 podrozdziałach wyniki przeprowadzonych badań i szczegółowych analiz.

W podrozdziale 1. zaprezentowano grupę badaną, składającą się z 247 osób, stwierdzając u 168 dzieci otyłość trzewną, u ponad połowy zmiany skórne oraz zaburzone ciśnienie krwi.

W podrozdziale 2. Doktorantka porównywała częstość występowania polimorfizmów genu *NR3C1* wśród grupy badanej i kontrolnej, nie stwierdzając różnic w ich występowaniu. Wykazała również, że najczęściej obserwowany zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej był haplotyp G-A-G, który zawierał allele typu dzikiego wszystkich trzech polimorfizmów.

W podrozdziale 3. Autorka opisała związki polimorfizmów genu *NR3C1* z cechami klinicznymi otyłych dzieci i młodzieży. Występowanie polimorfizmu rs6195 współistniało z rogowaceniem ciemnym, szczególnie u homozygot typu dzikiego (AA), natomiast nie wpływało na wczesne ujawnienie się otyłości, otyłość brzuszną, występowaniem rozstępów, występowaniem zaburzeń ciśnienia krwi. Nie stwierdzono różnic w wartościach masy urodzeniowej, z-score masy ciała, wzrostu oraz BMI. U nosicieli polimorfizmu rs6195 AA stwierdzono istotnie większą masę tłuszczową, większą procentową zawartość masy tłuszczowej masy ciała, większą masę tłuszczową tułowia i jej procentową zawartość masy ciała, a także mniejszą istotnie całkowitą zawartość wody w masie ciała. W ocenie Recenzenta zawarcie w tytułach tabel sformułowania „Ocena zależności między polimorfizmem rs6195 genu *NR3C1*a np. ilościowymi cechami klinicznymi” wydaje się nie dość precyzyjna, sugeruje bowiem istnienie korelacji pomiędzy danym genotypem a badanym parametrem, podczas gdy Doktorantka porównuje te parametry pomiędzy grupami, których stwierdzono występowanie danego genotypu. Nie stwierdzono różnic w wartościach badanych parametrów przy występowaniu wariantów polimorfizmu rs41423247 oraz polimorfizmu rs6189+rs6190.

W podrozdziale 4. Autorka omówiła wyniki oznaczeń profilu lipidowego oraz gospodarki węglowodanowej wśród badanych otyłych dzieci

Tytuł tego podrozdziału nie jest odzwierciedleniem wieku badanej grupy, ponieważ obejmuje ona przedział wiekowy 2- 17 lat. W ocenie Recenzenta powinno zostać użyte sformułowanie „w badanej grupie”. Ze względu na rozpiętość wiekową wartości parametrów gospodarki lipidowej powinny być przeanalizowane w odniesieniu do wieku, tym bardziej, że maksymalne wartości cholesterolu całkowitego, LDL cholesterolu i trójglicerydy przekraczały istotnie przyjęte normy, nawet dla dorosłych. W badanej grupie stwierdzono u blisko 10% osób nieprawidłową glikemię na czczo, a u 12% nieprawidłową tolerancję glukozy, a u 2,4% rozpoznano cukrzycę, natomiast blisko 50% wykazywało insulinooporność.

W podrozdziale 5. Doktorantka analizowała badane parametry gospodarki lipidowej i węglowodanowej w odniesieniu do wariantu polimorficznego genu wśród badanych otyłych dzieci i młodzieży, stwierdzając jedynie prawie 2-krotnie wyższe stężenie insuliny w 120' testu OGTT u nosicieli wariantu polimorficznego rs6189+rs6190 w porównaniu do homozygot typu dzikiego (GG/GG).

W podrozdziale 6. Autorka przeanalizowała stężenie różnych autoprzeciwciał w surowicy, stwierdzając u blisko 1/3 badanych pacjentów obecność przeciwciał IAA, natomiast u ok.10% przeciwciała anti-IA2 i anti-TG. U 20% nosicieli polimorfizmu rs6195( genotypy AG i AA) występowały przeciwciała anti-GAD w porównaniu do 4% homozygot AA. W ocenie Recenzenta ciekawa byłaby dodatkowa analiza powiązania obecności tych przeciwciał z parametrami antropometrycznymi oraz gospodarki lipidowej i węglowodanowej.

Założone cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane, co więcej autorce udało się wykazać powiązanie występowania niektórych cech klinicznych, w tym parametrów składu ciała z polimorfizmami genu *NR3C1*. Należy podkreślić, że tego typu badań nie wykonywano w tej grupie wiekowej, były przeprowadzane w populacji osób dorosłych. Ciekawym aspektem pracy jest analiza polimorfizmów badanego genu *NR3C1* w odniesieniu do występowania przeciwciał, zarówno trzustkowych jak i tarczycowych. Może wskazane byłoby prowadzenie dalszych badań w tym zakresie.

Autorka przedstawiła, co ważne, ograniczenia własnej pracy, co świadczy o rzetelnym podejściu do uzyskanych wyników.

Praca doktorska lek. Izabeli Krzyśko-Pieczka obejmuje 91 strony tekstu oraz 11 stron (164 pozycji) piśmiennictwa. Cytowane piśmiennictwo zawiera najnowsze prace z obszaru endokrynologii i diabetologii: 57 z zamieszczonych 164 pozycji w pracy to prace z ostatnich 5 lat. Autorka odnosi się również do badań innych autorów sprzed wielu lat. W pozycji 123

brakuje roku wydania. Praca zawiera dodatkowo szczegółowy spis treści, oraz wykaz tabel (30 tabel) i rycin (5 rycin) oraz wykaz nazw zwyczajowych i skrótów

Język i styl pracy są poprawne. Podkreślenia wymaga strona edytorska pracy, liczne tabele zostały bardzo starannie przygotowane, a zastosowanie kolorów, znacznie zwiększa przejrzystość prezentowanych rycin. Należałoby jednak uporządkować nazwę genu *NR3C1*, który pisany raz jest prawidłowo kursywą, w innych miejscach pracy czcionką prostą.

Przeprowadzona analiza statystyczna wystarczająco pozwoliła na zobiektywizowanie uzyskanych wyników badań. Dodatkowo przedstawienie niektórych wyników, zależnych od wieku, w wartościach z-score, umożliwiło ich porównywanie bez względu na wiek badanej osoby.

Przestawione uwagi Recenzenta w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy.

Badania zostały wykonane w ramach projektu naukowego finansowanego przez 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”.

**W podsumowaniu:** stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Izabeli Krzyśko-Pieczka pt.: Charakterystyka kliniczna dzieci z otyłością w relacji do polimorfizmów *NR3C1* ” spełnia wymogi stawiane rozprawie doktorskiej zawarte w Ustawie o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

**Stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie lek. Izabeli Krzyśko-Pieczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

24 marzec 2020 r.

*Dr hab. Ewa Barg*

*Ewa Barg*  
dr hab. n. med. EWA BARG  
specjalista endokrynolog  
specjalista endokrynolog  
i diabetolog dziecięcy  
specjalista pediatra  
2713 000