

Prof. dr hab. n med. Katarzyna Zorena  
Kierownik  
Zakład Immunobiologii  
i Mikrobiologii Środowiska  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 7  
80-211 Gdańsk  
Tel. 58 3491766  
email:katarzyna.zorena@gumed.edu.pl

### RECENZJA

na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej rozprawy doktorskiej pt. *Podłoże genetyczne niezdefiniowanych monogenowych form cukrzycy*, mgr Pauliny Jakiel.

Promotor: prof. dr hab. n med. Maciej Borowiec, Zakład Genetyki Klinicznej, Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Katedry i Zakładu Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Zmysłowska

Cukrzyca to grupa chorób metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią wynikającą z defektów wydzielania bądź działania insuliny, lub obu tych zjawisk występujących jednocześnie. Przewlekła hiperglikemia może prowadzić do uszkodzenia oraz niewydolności różnych narządów a w konsekwencji do mikro- i/lub makroangiopatii. W świetle współczesnych badań przedstawiono kilka mechanizmów doprowadzających do rozwoju cukrzycy, począwszy od deficytu insuliny spowodowanego destrukcją komórek  $\beta$  trzustki na drodze autoimmunologicznej, poprzez zaburzenia działania insuliny wobec braku odpowiedzi tkankowej, kończąc na zdefiniowanych molekularnie mechanizmach genetycznych. Poszukiwanie rzadkich wariantów genetycznych predysponujących do rozwoju zaburzeń metabolizmu glukozy, co w konsekwencji może doprowadzić do ujawnienia cukrzycy jest jednym z kierunków badań prowadzonych przez wiele lat w Zakładzie Genetyki Klinicznej, Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.



Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska obejmuje łącznie 95 stron w tym: Wstęp (str. 6-34), Cele pracy (str. 35), Materiał i Metody (str. 36-45), Wyniki (str. 46- 64), Dyskusja (str. 65- 73), Wnioski (str 74). Doktoranta zamieściła również streszczenie w języku polskim i angielskim ( str. 75-78), piśmiennictwo w liczbie 162 pozycje (str. 79-91), spis rycin (92-94) oraz spis tabel na str. 95.

Na realizację badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi RNN/148/13/KE.

Doktorantka, we wstępie na podstawie danych WHO i zgodnych ze stanowiskiem Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego, omówiła wszystkie typy cukrzycy w tym cukrzyce monogenowe, ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy typu MODY.

Cukrzyca monogenowa u wielu pacjentów jest błędnie diagnozowana jako cukrzyca typu 1 lub typu 2, z powodu nakładających się cech klinicznych. Należy podkreślić, że prawidłowe rozpoznanie kliniczne pacjentów i diagnostyka molekularna cukrzycy monogenowej ma kluczowe znaczenie dla rozpoczęcia odpowiedniego leczenia, określenia rokowania pacjentów oraz identyfikacji cukrzycy wśród ich krewnych.

Pomimo wielu badań zarówno w Polsce, jak też na świecie cukrzyca bez względu na typ wciąż pozostaje ciężką, przewlekłą chorobą, pełną wyzwań zarówno diagnostycznych jak też terapeutycznych. Dlatego też, Doktorantka w swej dysertacji podjęła próbę:

1. Identyfikacji nowych genów kandydatów, potencjalnie odpowiedzialnych za rozwój cukrzycy monogenowej, na podstawie analizy ogólnodostępnych publikacji naukowych oraz baz danych.
2. Poszukiwania potencjalnie sprawczych wariantów w wybranych genach kandydatów u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem cukrzycy monogenowej o niezdefiniowanym podłożu molekularnym, u których wykluczona zostanie obecność wariantów w znanych i zdefiniowanych genach predysponujących do rozwoju cukrzycy monogenowej.
3. Oceny wpływu obecności wariantów w wybranych genach predysponujących do cukrzycy MODY u badanych pacjentów.

Materiał i metody: Doktorantka przebadła 994 pacjentów w wieku od 10-18 lat skierowanych w latach 2016-2022 do Poradni Genetyki Klinicznej w Łodzi z podejrzeniem



cukrzyca monogenowa z 12 Polskich Centrów Diabetologicznych. Pacjenci zostali włączeni do badania na podstawie obecności hiperglikemii lub cukrzyca rozpoznanej zgodnie z definicją WHO, dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzyca, braku przeciwciał charakterystycznych dla cukrzyca typu 1 oraz zachowanego wydzielania insuliny. Dla wszystkich pacjentów analizowano następujące parametry: wartość HbA1c przy rozpoznaniu cukrzyca, stężenie peptydu C na czczo, obecność przeciwciał specyficznych dla cukrzyca typu 1 (IAA, ICA, IA2, GADA, ZnT8A), wskaźnik masy ciała (BMI), rodowód oraz stosowany sposób leczenia.

W pierwszym etapie badań Doktorantka u wszystkich pacjentów z grupy badanej przeprowadziła sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) i przeanalizowała panel 15 genów: *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PAX4*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *APPL1*, *KLF11*, *CEL*, *BLK*, *PDX1*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS* i *WFS1*, w których obecność patogennych wariantów odpowiada za rozwój cukrzyca monogenowej. Następnie wyniki uzyskane od pacjentów, którzy byli negatywni pod względem obecności patogennych zmian w 15 badanych genach, poddano ponownej analizie i poszukiwano potencjalnie sprawczych wariantów w dziewięciu genach, wytypowanych jako geny potencjalnie odpowiedzialne za rozwój cukrzyca typu MODY-X (*MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2*, *NKX6-1*). Obecność zidentyfikowanych wariantów w genach predysponujących do rozwoju cukrzyca została potwierdzona sekwencjonowaniem metodą Sangera. Do identyfikacji wariantów w badanych genach Doktorantka zastosowała metodę NGS na platformie Illumina NextSeq 550. Autorski panel genów został zaprojektowany przy użyciu platformy SureDesign i obejmował 24 geny sprawcze i kandydujące związane 38 z wystąpieniem cukrzyca monogenowej (*HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PAX4*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *APPL1*, *KLF11*, *CEL*, *BLK*, *PDX1*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *INS*, *WFS1*, *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2*, *NKX6-1*). Bibliotekę DNA do sekwencjonowania nowej generacji przygotowano z wykorzystaniem automatycznej stacji pipetującej Bravo (Agilent, SantaClara, USA), zgodnie z instrukcją producenta.

Doktorantka w sekcji wyniki wykazała, że spośród 994 pacjentów z grupy badanej poddanych sekwencjonowaniu NGS, u 377 (37,9%) zidentyfikowano patogene lub prawdopodobnie patogene warianty w 8 różnych, znanych genach odpowiedzialnych za rozwój cukrzyca monogenowej. Najwięcej potencjalnie sprawczych wariantów wykryto w genach *GCK* (n=288), *HNF1A* (n=37) oraz *HNF1B* (n=11). Najczęściej rozpoznawanymi wśród pacjentów

 3

typami cukrzycy monogenowej były cukrzyca *GCK-MODY* (*MODY2*) (76,39%) oraz *HNF1A-MODY* (*MODY3*) (9,81%). W dalszej kolejności były to: cukrzyca *HNF1B-MODY* (*MODY 5*) (2,92%), cukrzyca noworodkowa z wariantami w genie *KCNJ11* (2,65%), *HNF4A-MODY* (*MODY1*) (2,65%) oraz inne rzadkie formy cukrzycy *MODY* (z wariantami w genach *ABCC8*, *PDX1*, *WFS1*).

Następnie u 617 pacjentów, u których nie zidentyfikowano wariantów patogennych w 15 badanych genach, poddano ponownej analizie pod kątem obecności wariantów sprawczych w dziewięciu wytypowanych genach: *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2*, *NKX6-1*. Reanaliza uzyskanych wyników pozwoliła na identyfikację trzynastu heterozygotycznych, potencjalnie sprawczych wariantów w genach predysponujących do rozwoju cukrzycy typu *MODY*. Trzy z nich wykryto w genie *MTOR*, jeden w genie *TBC1D4*, dwa w genie *CACNA1E*, jeden w genie *MNX1*, trzy w genie *RFX6*, dwa w genie *NKX2-2* oraz jeden w genie *NKX6-1*. W genach *SLC19A2* i *KCNH6* nie zidentyfikowano żadnego wariantu, który mógłby być odpowiedzialny za wystąpienie cukrzycy *MODY* w badanej grupie pacjentów.

W kolejnym etapie badań Doktorantka przedstawiła wyselekcjonowane potencjalnie sprawcze warianty genów w wersji graficznej oraz zinterpretowała otrzymane wyniki genetyczne z parametrami klinicznymi. Istotnym celem prowadzonych badań było zapewnienie pacjentom diagnostyki choroby na poziomie molekularnym i w określonych przypadkach umożliwienie zmiany leczenia opartego z przyjmowania insuliny na terapię pochodnymi sulfonilomocznika lub dietę o niskim indeksie glikemicznym. Zastosowanie wielogenowego badania panelowego opartego na sekwencjonowaniu następnej generacji w rutynowej diagnostyce pacjentów, umożliwiło zidentyfikowanie potencjalnie sprawczych wariantów w nowych, wybranych predysponujących genach związanych z metabolizmem węglowodanów i sygnalizacją insulinową. Przeprowadzona diagnostyka molekularna zwiększa szansę na trafne rozpoznanie niezwykle rzadkich typów cukrzycy typu *MODY*, a tym samym wdrożenie u pacjentów odpowiedniego leczenia.

Rzetelnie przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników własnych w odniesieniu do wyników innych badaczy w pełni potwierdza umiejętność i dojrzałość naukową Doktorantki. Ponadto, Doktorantka przedstawiła cztery trafne wnioski, które są dowodem na zrealizowanie w pełni celów badań. Dobór cytowanego piśmiennictwa nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to,



że tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i nowatorska w świetle obecnych badań. W streszczeniu przygotowanym w języku polskim i angielskim Doktorantka przedstawiła jasno i zwięźle wszystkie rozdziały rozprawy doktorskiej.

Przeprowadzone badania są pierwszymi badaniami analizującymi sekwencję genów *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2* oraz *NKX6-1* u polskich pacjentów z podejrzeniem cukrzycy MODY-X, przy użyciu metody NGS. Uzyskane wyniki stanowią niezmiernie ważną, naukową oraz kliniczną wartość wpisującą się w nurt diabetologii. Poprawna diagnostyka różnicowa niesie ze sobą praktyczne korzyści w postaci wyboru odpowiedniej formy terapii lub też zmiany sposobu leczenia.

Pragnę potwierdzić wysoką jakość naukową oraz kliniczną ocenianej przeze mnie pracy, co zapewne jest także wynikiem zaangażowania, pracowitości oraz wieloletniego doświadczenia Promotora niniejszej rozprawy doktorskiej- prof. dr hab. n med. Macieja Borowca.

Nieliczne uchybienia edytorskie stwierdzone w dysertacji nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej np. brak autorów w poz. 5 piśmiennictwa, czy wyrażenie „geny kandydackie” – bardziej odpowiednią formą mogłoby być... geny predysponujące do rozwoju danego typu cukrzycy. Ważne, aby Doktorantka zwróciła uwagę przy przygotowaniu publikacji, które winny ukazać się tak szybko jak to możliwe.

**Podsumowując** - stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej pt. *Podłoże genetyczne niezdefiniowanych monogenowych form cukrzycy*, mgr Pauliny Jakiel, **jest pozytywna i jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, wykazuje bardzo dobre przygotowanie warsztatu badawczego jak też umiejętności korzystania z dostępnych prac badawczych innych autorów. Doktorantka nabyła umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej,** co odpowiada warunkom określonym w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym



oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Jednocześnie, wnoszę do Szanownej Rady Dyscypliny Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Pauliny Jakiel do dalszych etapów rozpraw doktorskiej.

**Ze względu na nowatorski charakter przeprowadzonych badań, kliniczne zastosowanie uzyskanych wyników wnoszę wniosek do Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Jakiel.**

KIEROWNIK  
Zakładu Immunobiologii  
i Mikrobiologii Środowiska  
**Katarzyna Żorena**  
prof. dr hab.n.med, Katarzyna Żorena