

Szczecin, 08.11.2021 r.

Dr hab. n. med. Karolina Kłoda  
ul. Polskich Marynarzy 68C/4  
71-050 Szczecin  
Tel: 502 165 341  
e-mail: wikarla@gazeta.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Ewy Gąterskiej pt. „Ocena wpływu mutacji C34T oraz A860T genu *AMPDI* (adenosine monophosphate deaminase 1) na wybrane parametry kliniczne i biochemiczne u chorych na cukrzycę typu 2 i chorobę wieńcową”**

**Promotor: dr hab. n. med. Maria Pietrzak-Nowacka**

Gen *AMPDI* koduje enzym – mięśniową deaminazę adenylomonofosforanu (AMP), który katalizuje jego deaminację do monofosforanu inozyny (IMP). Mutacje tego genu mogą prowadzić do zmniejszenia aktywności enzymu, co skutkuje kumulacją AMP i następczą aktywacją kinazy białkowej AMPK. Jako, że AMPK zwiększa ekspresję i translokację transportera GLUT4, stymuluje tym samym wychwyt glukozy przez mięśnie, a także m.in. hamuje wytwarzanie glukozy w wątrobie oraz hamuje lipolizę i syntezę lipidów. Na tej podstawie związek zaburzeń metabolicznych ze zmianami w genie *AMPDI* znalazł się w obszarze zainteresowań naukowców. O ile jednak powstały prace wiążące polimorfizm C34T z chorobą niedokrwienną serca i niewydolnością serca, to doniesienia dotyczące potencjalnych związków zmian w genie *AMPDI* z cukrzycą są nadal nieliczne. Stąd podjęta przez Doktorantkę analiza ma potencjał wniesienia nowych, istotnych z naukowego punktu widzenia, informacji.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa ma typowy układ i liczy 48 stron, zawiera 7 tabel i 5 rycin. Zbudowana jest z 7 rozdziałów (Wstępu, Celów Pracy, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków i Piśmiennictwa), wykazu tabel, wykazu rycin, streszczeń w językach polskim i angielskim oraz wykazu stosowanych skrótów. Piśmiennictwo obejmuje 68 pozycji.

**Tytuł** rozprawy koresponduje w pełni z jej zawartością. **Wstęp** wprowadza w tematykę zarówno choroby wieńcowej, jak i cukrzycy typu 2 (sekcje 1.1 – 1.5) oraz podstaw genetycznych obu schorzeń (sekcje 1.6 i 1.7). Pewien niedosyt w sekcji 1.6 budzi brak informacji dotyczącej związku cukrzycy typu 2 z genem *AMPDI*. Muszę jednak przypomnieć,

że prace dotyczące takiej tematyki są nieliczne. Publikowane były przez zespół PUM w Szczecinie (Safranow K i wsp., 2009, 2011) i na nie Doktorantka powołuje się w dalszej części Wstępu (sekcja 1.8) lub obejmują inne warianty genetyczne niż analizowane przez Doktorantkę (np. Goodarzi M i wsp., 2005).

Doktorantka sprecyzowała dwa główne **Cele Pracy**:

1. Ocena częstości występowania mutacji C34T i A860T genu *AMPD1* u pacjentów z chorobą wieńcową z towarzyszącą cukrzycą typu 2.
2. Analiza zależności genotyp-fenotyp obejmująca mutacje C34T i A860T genu *AMPD1* oraz cech klinicznych z uwzględnieniem elementów zespołu metabolicznego oraz parametrów biochemicznych krwi u pacjentów z chorobą wieńcową i cukrzycą typu 2.

Oba punkty sformułowane są prawidłowo i przejrzyste.

Rozdział **Material i Metody** rozpoczyna się od charakterystyki trzech, włączonych do badania grup:

- 196 dorosłych pacjentów (54 kobiety i 142 mężczyzn) z cukrzycą typu 2 oraz chorobą wieńcową potwierdzoną koronarograficznie,
- 200 noworodków (104 dziewczynki i 96 chłopców) urodzonych w latach 2004-2005 jako populacyjną grupę kontrolną dla badań genetycznych,
- 136 dorosłych pacjentów (27 kobiet i 109 mężczyzn) z chorobą wieńcową, bez cukrzycy.

Niewątpliwą siłą ocenianej rozprawy jest analizowanie 3 populacji, o łącznej liczbie 532 osób. Użycie dwóch grup kontrolnych pozwoliło zarówno na ocenę różnic genetycznych, jak i cech klinicznych badanych pacjentów. Zadania badawcze realizowano w:

- Poradni Diabetologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego (SPSK) Nr 2 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (PUM) w Szczecinie,
- Zakładzie Biochemii Klinicznej i Molekularnej PUM w Szczecinie,
- Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej SPSK nr 2 PUM w Szczecinie.

Zastosowane i szczegółowo opisane metody genetyczne oraz biochemiczne są adekwatne, a metody analizy statystycznej dobrane prawidłowo. Oceniono zgodność rozkładu genotypów z prawem równowagi Hardy-Weinberga (HWE). Protokół badania nie budzi wątpliwości etycznych - uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej PUM w Szczecinie (**KB-0012/44/13**).

**Wyniki** przedstawione są w sposób zrozumiały, w formie opisowej jak i tabelarycznej. Doktorantka w analizie wyników wychodzi od charakterystyki grupy badanej CAD(+)DM(+) i grupy kontrolnej CAD(+)DM(-), z której dowiadujemy się, że pacjenci z cukrzycą typu 2 mieli m.in. istotnie wyższe BMI i istotnie wyższy odsetek otyłości. Charakteryzowali się również istotnie częstszym występowaniem wielonaczyniowej postaci CAD przy jednocześnie

istotnie rzadziej stwierdzanej niewydolności serca. W dalszej części opisu wyników Doktorantka przechodzi do analizy dystrybucji genotypów i alleli obu badanych polimorfizmów genu *AMPDI*, wskazując istotne różnice w częstości genotypu AT i allelu T pomiędzy grupą kontrolną CAD(+)DM(-) a pozostałymi dwiema grupami. Na końcu czytelnik może zapoznać się ze związkiem parametrów klinicznych i biochemicznych grupy badanej w zależności od genotypów obu badanych polimorfizmów. Interesujący z klinicznego punktu widzenia wydaje się być związek allelu T polimorfizmu C34T z istotnie wyższym stężeniem cholesterolu całkowitego, jego frakcją LDL, jak i wcześniejszym wiekiem wystąpienia objawów CAD. Prezentacja wyników kończy się porównaniem wieku rozpoznania CAD i DM w zależności od kombinacji analizowanych genotypów. Wykazano istotne różnice w wieku rozpoznania CAD w zależności od układu genotypów. Dla DM nie obserwowano takiej zależności. Zwraca uwagę umiejętność Doktorantki do skupienia się na najbardziej istotnych wynikach i prezentacji ich w sposób przejrzysty, a także głębszego analizowania tych, które mogą mieć znaczenie kliniczne lub znaczenie tłumaczące potencjalne związki pomiędzy poszczególnymi parametrami.

**Podsumowanie wyników** przedstawia najważniejsze z obserwacji i jest sformułowane w 4 punktach:

1. Częstości genotypów i alleli mutacji C34T *AMPDI* w grupie badanej CAD(+)DM(+) oraz w grupach kontrolnych CAD(+)DM(-) i w populacyjnej grupie noworodków nie różniły się istotnie między analizowanymi grupami.
2. Analiza częstości genotypów i alleli mutacji A860T genu *AMPDI* w grupie badanej CAD(+)DM(+) oraz grupach kontrolnych CAD(+)DM(-) i noworodków wykazała, że częstość genotypu AT oraz allela T nie różniła się istotnie pomiędzy grupą badaną CAD(+)DM(+) a grupą kontrolną noworodków, ale w obu tych grupach była istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej CAD(+)DM(-).
3. Analiza parametrów antropometrycznych i biochemicznych pacjentów z grupy badanej CAD(+)DM(+) podzielonych wg. genotypu polimorfizmu C34T *AMPDI* wykazała, że nosiciele allela T (CT+TT) w stosunku do homozygot CC mieli istotnie wyższe stężenie Chol, Chol LDL, wcześniejszy wiek wystąpienia objawów oraz istotnie dłuższy czas trwania CAD.
4. Analiza parametrów antropometrycznych i biochemicznych u pacjentów grupy badanej CAD(+)DM(+) podzielonych wg genotypu mutacji A860T *AMPDI* wykazała, że heterozygoty AT w stosunku do homozygot AA były istotnie starsze, a objawy CAD występowały u nich w starszym wieku.

**Dyskusja** rozpoczyna się od podsumowania celów pracy oraz najważniejszych wyników. Prowadzona jest w sposób argumentacyjny, odnosząc się do poczynionych obserwacji w kontekście doniesień innych autorów. Szczególną uwagę zwraca dyskurs z wcześniejszymi pracami prof. Safranowa i wsp., uzupełniający aktualny stan wiedzy. Z przyjemnością przeczytałam też próbę klinicznego wytłumaczenia implikacji związku allelu T polimorfizmu C34T z istotnie wyższym stężeniem cholesterolu całkowitego, jego frakcją LDL, jak i wcześniejszym wiekiem wystąpienia objawów CAD. Doktorantka słusznie wskazuje potencjalny wpływ wyższego stężenia cholesterolu LDL jako czynnika aterogennego na wystąpienie CAD, jednocześnie celnie podnosząc znaczenie okresu przed przyjmowaniem statyn. Ważnym elementem dyskusji jest omówienie potencjalnie „ochronnego” działania allelu T, drugiego z analizowanych polimorfizmów genu *AMPDI* (A860T) w stosunku do wystąpienia CAD. Zestawiając ze sobą powyższe informacje łatwo można konkludować, co czyni Doktorantka, że allel 34T wydaje się przyspieszać, zaś allel 860 T opóźniać rozwój CAD, co jest najprawdopodobniej pierwszym takim doniesieniem. Mój niedosyt, jako czytelnika i recenzenta, wynika z małej ilości badań omawianych w dyskusji. Trudno jednak uznać to zarzut w sytuacji gdy oceniana praca ma nowatorski charakter a szeroki wybór piśmiennictwa nie jest dostępny. W podsumowaniu **Dyskusji** Doktorantka wskazuje co odróżnia jej pracę od doniesień prof. Safranowa i wsp. oraz jaki obszar wiedzy uzupełnia.

Tekst rozprawy jest zakończony trzema **Wnioskami**:

1. Mniejsza częstość allela 860T *AMPDI* u pacjentów z CAD bez DM niż u noworodków, ale taka sama u pacjentów z CAD i DM jak u noworodków, w połączeniu z obserwacją, że objawy CAD u nosicieli allela 860T z DM pojawiają się później niż u homozygot 860AA z DM, skłaniają do sformułowania hipotezy, że allel 860T *AMPDI* chroni przed CAD ale tylko osoby bez DM. Przy obecności DM wpływ ochronny znika lub jest ograniczony tylko do osób młodszych.
2. Obserwowany u pacjentów z DM istotnie wcześniejszy wiek rozpoznania CAD wśród nosicieli allela 34T *AMPDI*, a późniejszy wśród nosicieli allela 860T w odniesieniu do homozygot typu dzikiego (34CC, 860AA), sugerują przeciwstawny wpływ alleli 34T i 860T na wiek ujawnienia się CAD u osób z DM.
3. Genotypy C34T i A860T *AMPDI* nie wydają się być związane z obecnością poszczególnych antropometrycznych i biochemicznych cech zespołu metabolicznego u pacjentów z CAD i towarzyszącą DM.

**Piśmiennictwo** jest aktualne i adekwatne.

Z obowiązku recenzenta wskazuję błędy typograficzne, które nie przekładają się na wartość merytoryczną pracy, ale wymagają korekty przed ewentualną publikacją wyników:

- podwójne odstępy między wyrazami, które zdarzają się w różnych wierszach rozprawy;
- w obrębie streszczenia w języku angielskim, strona 12, 4 linijka od dołu, ostatnie zdanie zaczyna się małą literą „a”, zamiast wielką „A”;
- używanie skrótu DM dla określenia cukrzycy typu 2 może być mylące przy publikacji wyników, bardziej adekwatnym wydaje się być określenie DM2.

Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi interesujące i metodyczne opracowanie dokładające kolejną „cegiełkę” wiedzy do poznania funkcjonalnego wpływu polimorfizmów C34T i A860T w genie *AMPD1*. Zaletą pracy jest oparcie się na 3 populacjach, co umożliwiło porównania genetyczne, jak i kliniczne. Kolejną zaletą jest wskazanie konkretnych cech klinicznych związanych z danym allelem lub genotypem. Powstanie kompletnych map genotypów predysponujących do rozwoju danej choroby lub działających ochronnie oraz interakcji między nimi dla różnych populacji wydaje się być coraz bliższe. Niniejsza praca dostarcza informacji, które w takim celu mogłyby być wykorzystane.

Opisane w recenzji pojedyncze uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy oraz jej wysokiej oceny. Dlatego stwierdzam, że przygotowana przez Doktorantkę praca spełnia wymogi dla rozpraw doktorskich określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Przedkładam zatem wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medycyny Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie lek. Ewy Gąterskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Karolina Kłoda

Dr hab. n. med. Karolina Kłoda  
lekarz specjalista  
medycyny rodzinnej  
2304452