

Iwona Solecka

**Podłoże molekularne i charakterystyka kliniczna
cukrzycy MODY związanej z mutacjami genu
glukokinazy w regionie małopolskim**

PRACA DOKTORSKA

prof. dr hab. med. Maciej T. Małecki

PROMOTOR



Katedra Chorób Metabolicznych
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków 2018

WYKAZ SKRÓTÓW

A	adenina
ABCC8	ang. <i>ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8</i>
ACR	współczynnik albumina / kreatynina (ang. <i>albumin / creatinine ratio</i>)
ADP	adenozynodifosforan
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
ATP	adenozynotrifosforan
BLK	kinaza limfocytów B (ang. <i>B-lymphocyte kinase</i>)
BMI	indeks masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
bp	para zasad (ang. <i>base pair</i>)
C	cytozyna
CEL	esteraza cholesterolowa (ang. <i>carboxyl-ester lipase</i>)
CHOD-PAP	ang. <i>Cholesterol Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase</i>
CKD-EPI	ang. <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
Cys	cysteina
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	enzymatyczny test immunoadsorpcyjny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
G	guanina
GCK	glukokinaza, gen glukokinazy (ang. <i>glucokinase</i>)
GFR	wskaźnik filtracji kłębuszkowej (ang. <i>glomerular filtration rate</i>)
GKAs	aktywatory glukokinazy (ang. <i>glucokinase activators</i>)
GKRP	białko regulatorowe glukokinazy (ang. <i>glucokinase regulatory protein</i>)
Gln	glutamina
Gly	glicyna
GOD-PAP	ang. <i>Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminophenazone Peroxidase</i>
GPO-PAP	ang. <i>Glycerol Phosphate Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase</i>
HbA1c	hemoglobina glikowana
HDL	lipoproteiny dużej gęstości (ang. <i>high density lipoproteins</i>)
HGMD	baza mutacji genów człowieka (ang. <i>Human Gene Mutation Database</i>)
His	histydyna
HNF	hepatocytowy czynnik jądrowy (ang. <i>hepatocyte nuclear factor</i>)
HOMA-IR	wskaźnik insulinooporności HOMA (ang. <i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>)
HPLC	wysokowydajna chromatografia cieczowa (ang. <i>high performance liquid chromatography</i>)

IDF	Międzynarodowa Federacja Cukrzycowa (ang. <i>IDF – International Diabetes Federation</i>)
IFG	nieprawidłowa glikemia na czczo (ang. <i>impaired fasting glucose</i>)
IGT	upośledzona tolerancja glukozy (ang. <i>impaired glucose tolerance</i>)
INS	gen insuliny
IPF1	czynnik promotora insuliny 1 (ang. <i>insulin promoter factor 1</i>)
Kir6.2	podjednostka kanału potasowego (ang. <i>inwardly rectifying potassium (K+) channel</i>)
KLF11	czynnik transkrypcyjny homologiczny z białkiem Krüppela (ang. <i>Kruppel-like factor 11</i>)
LADA	utajona autoimmunologiczna cukrzyca dorosłych (ang. <i>latent autoimmune diabetes of the adults</i>)
LDL	lipoproteiny małej gęstości (ang. <i>low density lipoproteins</i>)
Leu	leucyna
MIDD	cukrzyca z głuchotą dziedzicząca się w sposób matczyny (ang. <i>maternally inherited diabetes with deafness</i>)
MODY	cukrzyca typu dorosłych występująca u młodzieży (ang. <i>maturity-onset diabetes of the young</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NEUROD1	neurogeny czynnik różnicowania 1 (ang. <i>neurogenic differentiation factor 1</i>)
OGTT	doustny test obciążenia glukozą (ang. <i>oral glucose tolerance test</i>)
PCR	polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDX1	ang. <i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
Phe	fenyloalanina
PNDM	przetrwała cukrzyca noworodkowa (ang. <i>permanent neonatal diabetes mellitus</i>)
Pro	prolina
RCAD	torbiele nerek i cukrzyca (ang. <i>renal cysts and diabetes</i>)
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SD	odchylenie standartowe (ang. <i>standart deviation</i>)
Ser	seryna
SUR1	receptor sylfonylomocznika 1 (ang. <i>sulphonylurea receptor 1</i>)
T	tymina
Thr	treonina
tRNA	transportujący RNA, kwas rybonukleinowy (ang. <i>transfer rybonucleic acid</i>)
Trp	tryptofan
UJ CM	Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
USG	ultrasonografia, badanie ultrasonograficzne
Val	walina
VNTR	zmienna liczba tandemowych powtórzeń (ang. <i>variable number tandem repeats</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

WHR wskaźnik talia / biodro (ang. *waist to hip ratio*)

SKRÓTY NAZW AMINOKWASÓW

A	Alanina
D	Kwas asparaginowy
F	Fenylalanina
G	Glicyna
H	Histydyna
I	Izoleucyna
L	Leucyna
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
R	Arginina
S	Seryna
T	Treonina
V	Walina
Y	Tyrozyna

SPIS TABEL

Tabela 1. Nazewnictwo oraz kryteria diagnostyczne stanów hiperglikemicznych.	9
Tabela 2. Klasyfikacja cukrzycy wg WHO, 1999.	10
Tabela 3. Inne specyficzne typy cukrzycy.	11
Tabela 4. Podtypy cukrzycy MODY.	16
Tabela 5. Primery użyte do amplifikacji badanych fragmentów genu GCK podczas sekwencjonowania.	29
Tabela 6. Wyniki sekwencjonowania DNA u 119 probantów ze Zbioru Rodzin MODY.	36
Tabela 7. Częstość poszczególnych mutacji wśród rodzin GCK-MODY w Zbiorze Rodzin MODY.	37
Tabela 8. Charakterystyka kliniczna 61 pacjentów z rodzin GCK-MODY włączonych do badania... ..	39
Tabela 9. Częstość poszczególnych mutacji wśród rodzin GCK-MODY włączonych do badania.	46
Tabela 10. Zaburzenia gospodarki węglowodanowej u 57 pacjentów z mutacją w genie glukokinazy.	65

Tabela 11. Porównanie średniego odsetka HbA1c wśród nosicieli mutacji w genie GCK w zależności od sposobu leczenia. Z analizy wykluczono osoby z klinicznymi cechami cukrzycy typu 1.....	66
Tabela 12. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych nosicieli mutacji w genie GCK z cukrzycą i ze stanem przedcukrzycowym.	69
Tabela 13. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych nosicieli mutacji w genie GCK z grupą zdrowych ochotników bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.	71
Tabela 14. Porównanie niektórych parametrów klinicznych oraz biochemicznych oraz sposobu leczenia w grupie pacjentów z GCK-MODY przy włączeniu do projektu oraz przy ponownym badaniu.....	73

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schematyczna ilustracja koncepcji spektrum typów cukrzycy i podłoża genetycznego w poszczególnych fenotypach choroby. Na podstawie: Vaxillaire M, Froguel P (2008) Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. Endocrine Rev 29: 254-264.	12
Rycina 2. Struktura białka glukokinazy.	21
Rycina 3. Struktura genu glukokinazy.	22
Rycina 4. Mutacja c.449_451delTCT F150del w rodzinie M070. Wydruk z sekwenatora.	44
Rycina 5. Lokalizacja mutacji w genie GCK wykrytych w badanych rodzinach.	45

SPIIS TREŚCI

1. WSTĘP	8
1.1. Klasyfikacja i rozpoznawanie cukrzycy	8
1.2. Cukrzyca monogenowa	12
1.3. Definicja cukrzycy MODY	13
1.4. Obraz kliniczny cukrzycy MODY	14
1.5. Rola glukokinazy w metabolizmie glukozy	19
1.6. Obraz kliniczny GCK-MODY a implikacje diagnostyczne i terapeutyczne	23
1.7. Diagnostyka GCK-MODY i kryteria kwalifikacyjne do badań genetycznych	25
2. CELE PRACY	26
3. METODYKA	27
3.1. Poszukiwanie, charakterystyka i ocena częstości mutacji w genie GCK w rodzinach z autosomalnym dominującym modelem dziedziczenia cukrzycy z Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY.	27
3.2. Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie GCK.	30
3.3. Ocena wpływu diagnozy molekularnej GCK-MODY na postępowanie terapeutyczne i wyrównanie metaboliczne.	34
4. WYNIKI	35
4.1. Wyniki poszukiwania, charakterystyka i ocena częstości mutacji w genie GCK w rodzinach z autosomalnym dominującym modelem dziedziczenia cukrzycy z Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY.	35
4.1.1. Wyniki poszukiwania mutacji w genie GCK oraz ocena ich częstości w rodzinach z Polski Południowo-Wschodniej.	35
4.1.1.1. Wyniki poszukiwania mutacji w genie GCK oraz ocena ich częstości w rodzinach ze Zbioru Rodzin MODY.	39
4.1.1.2. Wyniki poszukiwania mutacji w genie GCK oraz ocena ich częstości w rodzinach włączonych do badania.	45
4.1.2. Analiza segregacji mutacji w genie GCK w przebadanych rodzinach	46
4.1.3. Rodowody rodzin GCK-MODY	47
4.1.3.1. Rodzina M003 – mutacja G318R w genie GCK	48
4.1.3.2. Rodzina M051 – mutacja G/A split-site w genie GCK	49
4.1.3.3. Rodzina M106 – mutacja G318R w genie GCK	50
4.1.3.4. Rodzina M133 – mutacja V86G w genie GCK	51
4.2. Charakterystyka kliniczna przebadanych nosicieli mutacji w genie GCK.	62

4.3. Ocena wpływu diagnozy molekularnej GCK-MODY na postępowanie terapeutyczne, obraz kliniczny i wyrównanie metaboliczne.....	72
5. DYSKUSJA	74
6. WNIOSKI.....	84
7. PIŚMIENICTWO.....	85
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	97
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	100
10.ZAŁĄCZNIKI.....	103
Załącznik A. Ankieta genetyczna o charakterze przesiewowym dotycząca dziedziczenia cukrzycy w rodzinie.....	103
Załącznik B. Szczegółowa ankieta kliniczna stosowana u członków rodzin GCK-MODY	104

1. WSTĘP

Według aktualnie obowiązującej definicji WHO cukrzyca jest określana jako grupa schorzeń metabolicznych, których wspólnym mianownikiem jest hiperglikemia, będąca rezultatem defektu wydzielania insuliny przez komórki β trzustki lub jej działania obwodowego, lub też obu tych czynników jednocześnie. Przewlekła hiperglikemia powoduje uszkodzenie, zaburzenia czynności i niewydolność różnych narządów, szczególnie oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych [1]. Choroba ta stanowi rosnący problem na całym świecie, a Organizacja Narodów Zjednoczonych ogłosiła cukrzycę „epidemią XXI wieku”. Międzynarodowa Federacja Cukrzycy (*IDF – International Diabetes Federation*) przewiduje, że jeżeli nie zostaną podjęte stanowcze działania prewencyjne, liczba osób żyjących z cukrzycą na świecie wzrośnie z 382 milionów w 2013 r. do 592 milionów do roku 2035. Z tych przybliżonych szacunków wynika, że na świecie co 10 sekund na cukrzycę zapadają trzy kolejne osoby, a to oznacza 10 milionów nowych przypadków choroby rocznie [2]. Według raportu opublikowanego w 2016 r. przez Zespół zadaniowy ds. oceny epidemiologii cukrzycy w Polsce i jakości statystyki publicznej w tym zakresie, działający pod przewodnictwem Prof. Tomasza Zdrojewskiego, szacuje się, że w Polsce na cukrzycę cierpi ok. 7,6% społeczeństwa, tj. około 3 miliony osób, z czego prawie milion osób nie jest leczonych i nie ma świadomości choroby. Lawinowy wzrost liczby zachorowań na cukrzycę jest przede wszystkim związany z narastającym problemem otyłości, która jest kluczowym czynnikiem ryzyka cukrzycy typu 2.

Cukrzyca oraz jej powikłania wpływają na jakość życia chorego na wielu płaszczyznach, są przyczyną absencji w pracy, trwałego inwalidztwa oraz zwiększonej umieralności. Szacuje się, że rocznie w Polsce bezpośrednio z powodu cukrzycy i jej powikłań umiera przedwcześnie 23 tysiące osób. W Polsce na leczenie cukrzycy wydaje się około 7 miliardów złotych, a terapia powikłań choroby pochłania aż połowę tych kosztów [2]. Cukrzyca jest więc ogromnym wyzwaniem dla całego środowiska medycznego, pacjentów i ich rodzin oraz rządów i całych społeczeństw.

1.1. Klasyfikacja i rozpoznawanie cukrzycy

Wspólnym mianownikiem wszystkich typów choroby jest hiperglikemia. Cukrzycę według zaleceń Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego można rozpoznać w następujących sytuacjach klinicznych: na podstawie dwukrotnie oznaczonej glukozy na czczo wynoszącej co najmniej 7

mmol/l (126 mg/dl), w teście obciążenia 75 g glukozy, gdy w 120 minucie testu glikemia $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) oraz na podstawie przygodnej glikemii $\geq 11,1$ mmol/l z towarzyszącymi objawami klinicznymi. Nazewnictwo oraz kryteria diagnostyczne stanów hiperglikemicznych przedstawia poniższa tabela.

Tabela 1. Nazewnictwo oraz kryteria diagnostyczne stanów hiperglikemicznych.

Rodzaj pomiaru	Stężenie glukozy w osoczu	Interpretacja wyniku
Oznaczenie glikemii przygodnej	≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l)	Rozpoznanie cukrzycy przy występowaniu typowych objawów choroby
Oznaczenie glikemii na czczo	< 100 mg/dl (5,6 mmol/l)	Prawidłowa glikemia na czczo
	100 – 125 mg/dl (5,6 – 6,9 mmol/l)	Nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG – <i>impaired fasting glucose</i>)
	≥ 125 mg/dl (7,0 mmol/l)	Cukrzyca
Oznaczenie glikemii w 120 minucie doustnego testu obciążenia glukozą (OGTT – oral glucose tolerance test)	< 140 mg/dl (7,8 mmol/l)	Prawidłowa tolerancja glukozy
	140 – 199 mg/dl (7,8 – 11,0 mmol/l)	Nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT – <i>impaired glucose tolerance</i>)
	≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l)	Cukrzyca

Według: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2018. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego, Diabetologia Kliniczna 2018, tom 4 Supl. A. Zmodyfikowane.

W aktualnie obowiązującej, etiologicznej klasyfikacji cukrzycy według WHO, chorobę podzielono na 4 typy. Najczęstszym jest cukrzyca typu 2, stanowiąca około 85-90% jej przypadków oraz cukrzyca typu 1 – około 10% przypadków choroby. W grupie trzeciej znalazły się formy cukrzycy o znanej przyczynie, a więc genetycznie uwarunkowane defekty komórki β trzustki, genetyczne defekty działania insuliny, cukrzyca związana z chorobami zewnątrzwydzielniczej części trzustki, z endokrynopatiami, infekcjami, cukrzyca wtórna do stosowania niektórych leków i substancji chemicznych, rzadkie autoimmunologiczne formy cukrzycy oraz genetycznie uwarunkowane zespoły związane niekiedy z cukrzycą. Grupę czwartą stanowi cukrzyca ciążowa.

Tabela 2. Klasyfikacja cukrzycy wg WHO, 1999.

I. Cukrzyca typu 1
• Spowodowana procesem autoimmunologicznym • Idiopatyczna
II. Cukrzyca typu 2
III. Inne specyficzne typy
• Genetyczne defekty czynności komórek β • Genetyczne defekty działania insuliny • Choroby zewnątrzwydzielniczej części trzustki • Endokrynopatie • Cukrzyca wywołana przez leki i inne substancje chemiczne • Zakażenia • Rzadkie postaci wywołane procesem immunologicznym Inne zespoły genetyczne niekiedy związane z cukrzycą
IV. Cukrzyca ciążowa

Tabela 3. Inne specyficzne typy cukrzycy.

Genetyczne defekty czynności komórek β	Genetyczne defekty działania insuliny
- Chromosom 20, HNF4a (MODY1) - Chromosom 7, glukokinaza (MODY2) - Chromosom 12, HNF1a (MODY3) - Chromosom 13, IPF1 (MODY4) - Chromosom 17, HNF4b (MODY5) - Chromosom 2, NEUROD1 (MODY6) - Chromosom 2, KLF11 (MODY7) - Chromosom 9, CEL (MODY8) - DNA mitochondrialne, pozycja 3243 (MIDD) - Chromosom 11, KCNJ11 (PNDM) - Chromosom 11, SUR1 (PNDM) - Inne	- Insulinooporność typu A - Leprechaunizm - Zespół Rabsona-Mendenhalla - Cukrzyca lipoatroficzna - AGPAT2 (CGL1) - BSCL2 (CGL2) - FPLD1 - LMNA (FPLD2) - PPARG (FPLD3) - Inne
Choroby zewnątrzwydzielniczej części trzustki	Endokrynopatie
- Pankreatopatia włóknisto-wapniejąca - Zapalenie trzustki - Uraz/pankreatopatia - Nowotwór - Mukowiscydoza - Hemochromatoza - Inne	- Zespół Cushinga - Akromegalia - Guz chromochłonny - Glukagonoma - Nadczynność tarczycy - Somatostatinoma - Inne
Cukrzyca wywołana przez leki i inne substancje chemiczne	Zakażenia
- Kwas nikotynowy - Glukokortykoidy - Hormony tarczycy - Agoniści receptorów α-adrenergicznych - Agoniści receptorów β-adrenergicznych - Tiazydy - Interferon α - Inne	- Różyczka wrodzona - Cytomegalowirus - Inne
Rzadkie postacie wywołane procesem immunologicznym	Inne zespoły genetyczne niekiedy związane z cukrzycą
- Przeciwciała skierowane przeciw insulinie - Przeciwciała skierowane przeciw receptorowi insulinowemu (insulinooporność typu B) - Zespół sztywnego człowieka. - Inne	- Zespół Downa, ataksja Friedriechea, płasawica Huntingtona, zespół Klinefeltera, zespół Lawrence-Moon-Biedela, - dystrofia miotoniczna, porfiria, zespół Prader-Williego, zespół Turnera, zespół Wolframa - Inne

Na podstawie: Skupień J, Małecki MT (2007) Rozbudowywanie podziału cukrzycy - nowe podtypy i możliwości lecznicze. Diabetologia Praktyczna; 8: 1-12. Zmodyfikowane.

1.2. Cukrzyca monogenowa

Z punktu widzenia podłoża molekularnego można wyróżnić formy wielogenowe oraz monogenowe cukrzycy. W patogenezie o wiele częściej występującej cukrzycy wielogenowej, zarówno typu 2 jak i typu 1, znaczenie ma wpływ czynników zewnętrznych, środowiskowych oraz osobnicza predyspozycja związana z polimorfizmami wielu genów. Allele tych polimorfizmów występują z różną częstością u osób zdrowych i chorych. Pojedyncze polimorfizmy mają niewielki wpływ na rozwój choroby, a dopiero ich wzajemne oddziaływanie i sumowanie może zwiększać ryzyko zachorowania. Nie należy więc uważać pojedynczych polimorfizmów za czynniki jednoznacznie determinujące rozwój cukrzycy, a jedynie za elementy wielu składowych genetycznej predyspozycji do zachorowania. Obraz kliniczny cukrzycy poligenowej jest zatem wypadkową pewnej predyspozycji uwarunkowanej czynnikami dziedzicznymi oraz oddziaływania czynników środowiskowych.

Cukrzyca monogenowa to heterogenna grupa schorzeń, których przyczyną jest mutacja pojedynczego genu. Skutkiem mutacji jest poważna zmiana struktury, a co za tym idzie funkcji, lub poziomu ekspresji produktu zmutowanego genu: najczęściej białka lub rzadziej tRNA. Mutacje pojedynczego genu są czynnikiem determinującym obraz kliniczny choroby, który w niewielkim tylko stopniu podlega modyfikacjom przez czynniki zewnętrzne lub obecność polimorfizmów. Rolę czynników genetycznych i środowiskowych w patogenezie różnych form cukrzycy przedstawia schematycznie rycina 1.

Rycina 1. Schematyczna ilustracja koncepcji spektrum typów cukrzycy i podłoża genetycznego w poszczególnych fenotypach choroby. Na podstawie: Vaxillaire M, Froguel P (2008) *Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes*. Endocrine Rev 29: 254-264.



Częstość cukrzycy monogenowej szacowana jest na 2-5% wszystkich przypadków tego schorzenia [3]. Fenotyp zależy od charakteru genu, rodzaju mutacji, a także od liczby zmutowanych alleli danego genu, czyli od tego, czy dotknięty osobnik jest homozygotą, złożoną heterozygotą czy też posiada tylko jeden nieprawidłowy allel. Monogenowe formy cukrzycy zwykle dziedziczone są zgodnie z zasadami Mendla, ale w niektórych przypadkach ich przyczyną może być mutacja *de novo* lub mutacje DNA mitochondrialnego dziedziczące się w linii matczynej. [4]. Cukrzycę monogenową można podzielić na dwie grupy: związaną z nieprawidłową funkcją komórki β trzustki lub upośledzonym obwodowym działaniem insuliny. Przykłady genów, których mutacje prowadzą do cukrzycy monogenowej, to geny kodujące insulinę, receptor insuliny, glukokinazę, podjednostki Kir6.2 i SUR1 ATP-zależnego kanału potasowego, czynniki transkrypcyjne HNF1A, HNF4A, HNF1B, gen LMNA kodujący laminę A/C oraz geny mitochondrialnego DNA, którego mutacja w pozycji 3243 tRNA leucyny powoduje zespół objawów z cukrzycą o wczesnym początku, głuchotą sensoryczną, a czasem także miopatią, retinopatią, kardiomiopatią oraz ogniskowym stwardnieniem kłębuszków nerkowych [5,6].

Monogenowe formy cukrzycy, chociaż rzadkie i mające niewielki udział w chorobowości całej populacji, stanowią obszar, w którym dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu molekularnego podłoża cukrzycy. Szczegółowa wiedza na temat genetycznych defektów tych specyficznych form cukrzycy pozwala często już dziś na zmianę terapii na dostosowaną do patogenezy choroby. Skutkiem diagnozy molekularnej może być na przykład zaprzestanie stosowania farmakoterapii w GCK-MODY, zastąpienie insulinoterapii pochodną sulfonilomocznika w mutacjach czynników transkrypcyjnych HNF oraz w przetrwałej cukrzycy noworodkowej (PNDM – *permanent neonatal diabetes mellitus*) spowodowanej defektem kanału potasowego - Kir6.2 lub SUR1, czy też dołączenie metforminy do insulinoterapii w genetycznie uwarunkowanych zespołach insulinooporności. Z szerszego punktu widzenia, z uwagi na intensywne badania nad ich podłożem, monogenowe formy cukrzycy są istotne dla postępu w dziedzinie genetyki, farmakogenetyki, a w przyszłości być może także i terapii molekularnej.

1.3. Definicja cukrzycy MODY

MODY jest heterogenną grupą cukrzyc o autosomalnym dominującym typie dziedziczenia, łagodnym początku i wczesnym wieku rozpoznania, u podłoża których leżą monogenowe defekty komórki β . Cechują się one zachowaną w pewnym stopniu endogenną produkcją insuliny.

Pierwsze opisy cukrzycy o relatywnie łagodnym przebiegu, trudno uchwytnym początku, rozpoznawanej u młodych pacjentów i dobrze reagującej na terapię pochodną sulfonilomocznika (tolbutamidem) pochodzą z lat 60-tych XX wieku. Akronim „MODY” (Maturity Onset Diabetes of the Young), co można przetłumaczyć jako cukrzycę wieku dojrzałego u młodych osób, użyto w publikacji z 1975 r. [7]. Cukrzycę dzielono wówczas na insulinozależną i insulinoniezależną lub odpowiednio cukrzycę młodzieńczą i wieku dojrzałego. Podział ten nie odzwierciedlał patomechanizmu schorzenia, a uwzględniał jedynie obraz kliniczny oraz wiek zachorowania. Opisana nowa forma cukrzycy łączyła niektóre cechy obu klas cukrzycy: z jednej strony młody wiek zachorowania, a z drugiej kliniczną insulinoniezależność i, w większości przypadków, dobrą odpowiedź na leczenie pochodnymi sulfonilomocznika. Obecnie cukrzyca MODY w obowiązującej aktualnie, etiologicznej klasyfikacji WHO z 1999 r. umieszczona jest w grupie III, wśród „innych specyficznych typów cukrzycy”, jako podgrupa „defektów genetycznych komórki β trzustki” [8].

1.4. Obraz kliniczny cukrzycy MODY

Do tej pory opisano kilkanaście podtypów MODY. Poza GCK-MODY (dawniej MODY2), związanej z mutacjami w genie enzymu glukokinazy, która zostanie szczegółowo omówiona poniżej, pozostałe podtypy związane są głównie z mutacjami w genach czynników transkrypcyjnych. Białka te odpowiadają za ekspresję innych genów, podział i różnicowanie się komórek, rozwój tkanek i narządów oraz procesy metaboliczne komórek. Czynniki transkrypcyjne związane z MODY regulują syntezę i wydzielanie insuliny, biorą udział w procesie rozwoju trzustki oraz różnicowaniu się komórek β . Z uwagi na ich pleiotropowe działanie, MODY związanej z mutacjami w genach czynników transkrypcyjnych często towarzyszą objawy pozatrzustkowe [9]. Geny, których mutacje są przyczyną cukrzycy MODY związanej z czynnikami transkrypcyjnymi, to znajdujący się na chromosomie 12 gen HNF1A (*hepatocyte nuclear factor 1 alpha* – hepatocytowy czynnik jądrowy 1 α , a obecnie: *homebox A*), który odpowiada za rozwój cukrzycy zwanej uprzednio MODY3, następnie HNF4A na chromosomie 20 (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha* – hepatocytowy czynnik jądrowy 4 α), odpowiedzialny za rozwój MODY1 [10-13]. Kolejno opisane geny to powodujący formę zwaną uprzednio MODY5 gen czynnika transkrypcyjnego, znajdujący się na chromosomie 17 HNF1B (*hepatocyte nuclear factor 1 beta* – hepatocytowy czynnik jądrowy 1 β , a obecnie: *homebox B*), następnie gen IPF1 (*insulin promoter factor 1* – czynnik promotora insuliny 1), noszący obecnie nazwę PDX1 (*pancreatic and duodenal homebox 1*). Gen znajduje się

na chromosomie 4 i jego mutacje są przyczyną podtypu zwanego dawniej MODY4 [14,15]. W 1999 r. został opisany kolejny podtyp – nazwany wówczas MODY6. W tym przypadku cukrzyca rozwija się na skutek mutacji w genie czynnika transkrypcyjnego, zwanego NEUROD 1 (*neurogenic differentiation factor 1*), położonego na chromosomie 2 [16]. Działanie czynników transkrypcyjnych jest często ze sobą powiązane: białka HNF1A i HNF1B tworzą heterodimery, HNF4A reguluje ekspresję genu HNF1A, czynniki PDX1 i NEUROD1 również wchodzi z sobą w interakcje [10, 13].

Ostatnie lata przyniosły odkrycia następnych mutacji w genach czynników transkrypcyjnych związanych z fenotypem MODY. W 2005 r. zidentyfikowano gen KLF11 (*Kruppel-like factor 11*), którego mutacje segregowały się z cukrzycą w 2 francuskich rodzinach (MODY7). Produkt genu KLF11 reguluje proliferację komórek zewnątrzwydzielniczych trzustki i zachowuje się jak supresor nowotworzenia, a także ma znaczenie w metabolizmie glukozy w komórkach β trzustki [17]. Gen czynnika transkrypcyjnego PAX4 (*paired domain 4*), zidentyfikowany w 2007 r. odpowiedzialny jest za fenotyp MODY, który opisano w 2 tajskich rodzinach [18]. Z kolei w 2006 r. stwierdzono w 2 rodzinach norweskich segregację cukrzycy o fenotypie MODY z występowaniem delecji w obrębie tzw. VNTR (*variable number tandem repeats*) genu CEL (*carboxyl ester lipase*). Gen koduje enzym trawienny – esterazę cholesterolową, a mechanizm rozwoju cukrzycy jest zupełnie inny niż w pozostałych podtypach MODY. W tym przypadku cukrzyca rozwija się wtórnie do postępującej, zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki [19].

Tabela 4. Podtypy cukrzycy MODY.

Geny odpowiedzialne za fenotyp cukrzycy MODY	Nazwa według poprzedniej nomenklatury
Chromosom 20, gen HNF4 α	MODY1
Chromosom 7, gen GCK	MODY2
Chromosom 12, gen HNF1 α	MODY3
Chromosom 13, gen IPF1 (PDX1)	MODY4
Chromosom 17, gen HNF1 β	MODY5
Chromosom 2, gen NEUROD1	MODY6
Chromosom 2, gen KLF11	MODY 7
Chromosom 9, gen CEL	MODY 8
Chromosom 7, gen PAX4	MODY 9
Chromosom 11, gen INS	MODY 10
Chromosom 8, gen BLK	MODY 11
Chromosom 11, gen ABCC8	MODY 12
Chromosom 11, gen KCNJ11	MODY 13

Według: Anik A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. (2015) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 28(3-4):251-63, zmodyfikowane.

Obecnie klasyczne nazewnictwo podtypów MODY poprzez kolejne nadawane im numery zostało zastąpione skrótami systematycznych nazw genów, których mutacje są przyczyną poszczególnych podtypów MODY. Tak więc MODY3 obecnie jest określane jako HNF1A MODY, MODY2 – GCK-MODY itd.

Wszystkie podtypy MODY dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący, niezależnie od płci. Cukrzyca występuje we wszystkich pokoleniach, mutacje cechują się wysoką penetracją fenotypową, a w związku z tym około połowa członków rodzin (prawie wszyscy nosiciele mutacji) jest dotknięta chorobą. Do rozpoznania dochodzi zwykle w młodym wieku, zazwyczaj w drugiej lub trzeciej dekadzie życia, rzadko później. Ta ostatnia sytuacja dotyczy głównie starszych pokoleń, dla których badania diagnostyczne prowadzone były przy dużo niższej świadomości medycznej i dostępności badań. Cukrzyca MODY ma zwykle powolny, skąpoobjawowy początek, a przy rozpoznaniu nie występuje kwasica ketonowa czy ketoza. Związane jest to z zachowanym endogennym wydzielaniem insuliny. Cukrzyca cechuje się kliniczną insulinoniezależnością na początku choroby, która utrzymuje się przez wiele lat od rozpoznania. Choroba stopniowo jednak

postępuje, co jest wynikiem progresji defektu wydzielania insuliny; najszybciej w podtypie HNF1B MODY. Podtypy MODY związane z mutacjami w genach czynników transkrypcyjnych cechują się generalnie dobrą wrażliwością na pochodne sulfonilomocznika: najlepszą w HNF1A MODY, dobrą w HNF4A MODY. Jedynie w podtypie HNF1B skuteczność tej grupy leków jest niska, a chorzy szybko wymagają włączenia insulinoterapii. MODY, z uwagi na wczesny początek choroby i długi czas jej trwania, cechuje się znacznym ryzykiem rozwoju powikłań mikronaczyniowych. Natomiast ryzyko rozwoju powikłań makronaczyniowych jest znacznie mniejsze wśród pacjentów z MODY niż w cukrzycy typu 2, jako że ta monogenowa forma cukrzycy występuje z reguły bez klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, a więc otyłości, zaburzeń lipidowych, nadciśnienia tętniczego. Częstość tych czynników wśród pacjentów z MODY jest zbliżona do ich częstości w populacji ogólnej [9, 10, 12, 20].

Poza tymi wspólnymi cechami klinicznymi, poszczególne podtypy MODY charakteryzują się pewnymi szczególnymi, pozatrzustkowymi objawami, związanymi na przykład z wpływem czynników transkrypcyjnych na szereg procesów wzrostu i różnicowania się komórek w różnych narządach i układach.

Cukrzyca HNF1A MODY, najczęstsza spośród podtypów MODY, związana jest z mutacją genu, którego ekspresja zachodzi w trzustce, wątrobie, jelitach i nerkach. Białko to reguluje rozwój narządów oraz zachodzące w nich procesy metaboliczne, a także proliferację komórek β , syntezę i wydzielanie insuliny. Cukrzyca charakteryzuje się przede wszystkim upośledzonym wydzielaniem insuliny w odpowiedzi na bodziec hiperglikemiczny, czy to posiłkowy, czy też w testach obciążeniowych. Choroba ma charakter progresywny i wymaga stopniowej intensyfikacji terapii. W początkowym okresie pacjenci mogą być leczeni metodami nefarmakologicznymi, następnie doustnymi lekami hipoglikemizującymi, a po kilkunastu latach trwania choroby jedna trzecia chorych wymaga włączenia insulinoterapii [13]. Charakterystyczną cechą tego podtypu MODY jest wysoka penetracja fenotypowa mutacji, bardzo dobra odpowiedź na pochodne sulfonilomocznika oraz obecność objawów pozatrzustkowych [21,22]. Najlepiej poznany jest obniżenie progu nerkowego dla glukozy, co skutkuje glukozurią nawet przy dobrej kontroli glikemii [23]. W wyniku obniżonego progu nerkowego dla glukozy i glukozurii obniża się osoczowe stężenie 1,5-anhydroglucitolu - deoksymonosacharydu, ulegającego w warunkach normoglikemii całkowitemu wchłanianiu zwrotnemu w nerkach. Jego poziom ujemnie koreluje z epizodami hiperglikemii poposiłkowej. Rzadko w obrazie klinicznym HNF1A MODY pojawiają się zaburzenia rozwojowe nerek i wady układu moczowo-płciowego. HNF1A jest również genem supresorowym onkogenezy, co wiąże się z powstawaniem mnogich gruczolaków wątroby, zagrażającym występowaniem groźnych dla życia krwotoków. Powstawanie gruczolaków uwarunkowane jest inaktywacją genu HNF1A w obu allelach, co zachodzi w mechanizmie utraty heterozygotyczności w komórkach

somatycznych [24, 25]. Progresywny przebieg HNF1A MODY i narastająca hiperglikemia skutkują występowaniem powikłań mikroangiopatycznych. Częstość powikłań makronaczyniowych jest mniejsza niż w typie 2 cukrzycy z uwagi na rzadsze występowanie innych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z tym podtypem MODY.

Przebieg kliniczny HNF4A MODY jest zbliżony do HNF1A MODY, oba geny są ze sobą funkcjonalnie powiązane. W podtypie HNF4A MODY nie stwierdza się obniżonego progu nerkowego dla glukozy, nie występuje glukozuria, wady rozwojowe nerek, ani gruczolaki wątroby. Stwierdzono natomiast dyskretne upośledzenie funkcji syntetycznej wątroby w postaci obniżonego stężenia apolipoprotein oraz triglicerydów w surowicy krwi. U około 60% nosicieli mutacji występuje makrosomia (waga urodzeniowa > 4000 g), a u około 15% - hipoglikemia hiperinsulinemiczna w okresie noworodkowym [11, 26].

Mutacje HNF1B odpowiadają za stosunkowo rzadko występującą postać cukrzycy monogenowej, bo stanowiącą około 5% przypadków wszystkich MODY. Uwarunkowana jest ona mutacją genu kodującego białko powiązane czynnościowo z HNF1A i tworzące z nim heterodimery. Charakteryzuje się ona najcięższym przebiegiem klinicznym, głębokim i postępującym upośledzeniem syntezy i wydzielania insuliny oraz znacznie obniżoną odpowiedzią na bodziec hiperglikemiczny. Pochodne sulfonilomocznika są w tej formie cukrzycy krótko skuteczne, a chorzy szybko wymagają wdrożenia terapii insuliną. W niektórych przypadkach dochodzić może do rozwoju kwasicy ketonowej [27]. Pacjentów z tym podtypem MODY cechuje znaczna wątrobowa insulinooporność i związana z nią hipertriglicerydemia oraz obniżone stężenie HDL-cholesterolu. U większości chorych stwierdza się również nieco zwiększoną aktywność transaminaz w surowicy krwi. Jednak najbardziej charakterystyczną cechą HNF1B MODY są zaburzenia rozwojowe i funkcjonalne nerek, najczęściej pod postacią mnogich torbieli korowych [28]. Występowanie torbieli nerek może nawet wyprzedzać objawy hiperglikemii i jest tak powszechne, że wprowadzono określenie zespołu RCAD, będącego synonimem HNF1B MODY (*RCAD – renal cysts and diabetes* – torbiele nerek i cukrzyca) [29]. Zaburzeniom morfologicznym często towarzyszą zaburzenia funkcjonalne: białkomocz, spadek filtracji kłębuszkowej, prowadzące czasem do rozwoju przewlekłej niewydolności nerek. W rzadszych przypadkach w podtypie HNF1B MODY stwierdza się wady układu moczowo-płciowego (agenezję jajnika, macicę dwurożną) oraz inne zaburzenia rozwojowe nerek: agenezję, hipoplazję czy ektopię nerki oraz zwężenia moczowodu [30,31]. Niekiedy stwierdza się też hipotrofię trzustki, będącą przyczyną subklinicznej niewydolności zewnątrzwydzielniczej narządu, hiperurykemię i dnę moczanową [32].

PDX1 MODY i NEUROD1 MODY to bardzo rzadkie formy MODY o zbliżonym obrazie klinicznym. Czynniki transkrypcyjne NEUROD1 bezpośrednio aktywuje gen insuliny i jest

odpowiedzialny za rozwój embrionalny trzustki. Produkt genu NEUROD1, wspólnie z PDX1 przyłącza się do promotora genu insuliny w obrębie tzw. mini-enhancera, regulując syntezę hormonu. U niektórych nosicieli mutacji cukrzycy może ujawniać się w czwartej, a nawet w późniejszych dekadach życia, często współistnieje otyłość i insulinooporność, a przebieg kliniczny zbliżony jest do cukrzycy typu 2 [14-16, 33].

Szacuje się, że cukrzyca MODY stanowi około 2-5% wszystkich przypadków cukrzycy [9]. Za najczęstszy uważa się podtyp HNF1A MODY, stanowi on około 20-50% wszystkich przypadków MODY, z podobną częstością występuje GCK MODY [34]. Duże różnice w ocenie częstości występowania tych dwóch podtypów wynikają z różnych kryteriów rekrutacyjnych przyjętych w poszczególnych badaniach. Z uwagi na skąpoobjawowy przebieg, opóźnione rozpoznanie i wynikający z nich niepełny wywiad rodzinny, uważa się, że częstość GCK-MODY może być niedoszacowana [35]. Podtypy HNF4A i HNF1B MODY są rzadkie, stanowią po około 5% przypadków MODY, a PDX1 i NEUROD1 MODY – mniej niż 1% przypadków MODY. Szacuje się, że nawet 20% przypadków cukrzycy o fenotypie MODY nie udaje się potwierdzić obecnością mutacji w żadnym z obecnie zidentyfikowanych genów [34].

1.5. Rola glukokinazy w metabolizmie glukozy

Przyczyną GCK-MODY, są mutacje w genie kodującym enzym metabolizujący glukozę, a w związku z tym inny jest patomechanizm powstawania zaburzeń gospodarki węglowodanowej i inny ich przebieg kliniczny niż w przypadku mutacji genów czynników transkrypcyjnych. Za GCK-MODY odpowiedzialny jest, zidentyfikowany w 1992 r., znajdujący się na chromosomie 7, gen GCK, który ulega ekspresji w komórkach β trzustki, innych komórkach neuroendokrynnych oraz hepatocytach [36]. Enzym glukokinaza odgrywa kluczową rolę jako czujnik glukozy (glukosensor) w komórkach β trzustki, integrując poziom glukozy i jej metabolizm z wydzielaniem insuliny [37]. Enzym ten, zwany także heksokinazą IV, jest z jedną z izoform heksokinaz, która katalizuje pierwszą reakcję glikolizy – fosforylację glukozy do glukozo-6-fosforanu w obecności ATP jako drugiego substratu [38]. Unikalna funkcja glukokinazy jako czujnika glukozy opiera się na regulacji enzymu odmiennej od regulacji innych heksokinaz. Enzym ma niskie powinowactwo do substratu i nie podlega zwrotnemu hamowaniu przez produkt katalizowanej reakcji. Dodatkowo aktywność glukokinazy może być modyfikowana przez cząstki białkowe, które modulują aktywność katalityczną oraz dystrybucję wewnątrzkomórkową enzymu w komórkach β trzustki i/lub

hepatocytach [39-41]. Najlepiej poznanym regulatorem aktywności enzymu w komórkach wątrobowych jest białko regulatorowe glukokinazy (GKRP – *glucokinase regulatory protein*), które jest kompetycyjnym inhibitorem enzymu, konkurującym o miejsce wiązania z glukozą. Białko to reguluje ponadto jądrowo-cytoplazmatyczną lokalizację enzymu, wpływa na stabilizację magazynów glukokinazy w jądrze komórkowym, kiedy jej aktywność nie jest konieczna [42-44].

Tempo fosforylacji glukozy przez glukokinazę w zdrowych komórkach β zależy od zawartości w nich enzymu oraz od stężenia substratu – glukozy. Im bardziej intensywne jest tempo glikolizy, tym szybciej zachodzi przemiana związków wysokoenergetycznych: przy wysokim stężeniu glukozy ADP (adenozynodifosforan) zostaje zamieniony w ATP (adenozynotrifosforan). Wzrost stężenia ATP powoduje zamknięcie się kanałów potasowych w błonie komórki β , depolaryzację błony komórkowej, otwarcie kanałów wapniowych, napływ jonów wapnia do wnętrza komórki β oraz wydzielanie insuliny na drodze egzocytozy. Glukokinaza komórek β działa jako regulator metabolizmu glukozy pełniąc rolę glukosensora w tym procesie, wpływając na tempo zużycia glukozy w zależności od jej stężenia we krwi i płynie tkankowym. Bezpośrednio kontroluje ona glukozozależne wydzielanie insuliny. Nawet niewielkie zmniejszenie aktywności enzymu skutkuje zatem w komórce β podwyższeniem progu rozpoznawania hiperglikemii i wydzielaniem insuliny przy wyższym stężeniu glukozy. Wykazano, że nieznaczne zmniejszenie aktywności glukokinazy w komórkach β trzustki (rzędu 15-20%) może podnieść punkt odcięcia dla rozpoznawania poziomu glukozy, powodując w ten sposób hiperglikemię [45,46].

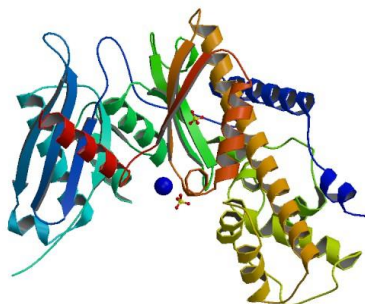
W przeciwieństwie do trzustkowej glukokinazy, częściowe zmniejszenie aktywności enzymu wątrobowego może być kompensowane przez inne procesy metaboliczne. Po posiłku glukokinaza hepatocytów uczestniczy w usuwaniu glukozy i jej magazynowaniu w postaci wątrobowego glikogenu. Jednak około 75% glikogenu może być syntezowane w procesach enzymatycznych niezależnych od glukozy, z mleczanu i pirogronianu, powstających w toku procesów metabolicznych w wątrobie, mięśniach i innych organach, bez udziału glukokinazy [46].

Badania strukturalne wykazały, że glukokinaza jest enzymem monomerycznym, z pojedynczym miejscem aktywnym. Posiada małą i dużą domenę, które są oddzielone głębokim rowkiem, będącym miejscem wiązania substratu - glukozy. Enzym może przyjmować trzy strukturalne konformacje. Przy braku glukozy enzym przyjmuje konformację nieaktywną tzw. super-otwartą. Po związaniu substratu enzym przechodzi konformacyjne zmiany, prowadzące najpierw do przyjęcia formy pośredniej, otwartej, a następnie w pełni aktywnej, zamkniętej, która wiąże również Mg-ATP [47,48].

Regulacja aktywności enzymu odbywa się na kilku poziomach, włączając w to ekspresję genu, tempo degradacji białka, aktywację substratem oraz modyfikacje allosteryczne [49,50]. Gen wyposażony w dwa promotory warunkuje konstytutywną syntezę glukokinazy w układzie

neuroendokrynnym, w tym w komórkach β trzustki i gonadotropach, oraz w wątrobie. W wątrobie transkrypcję genu GCK indukuje insulina. Za szybką regulację aktywności enzymu odpowiada jego substrat – glukoza oraz allosteryczne regulatory, takie jak GKRP (*glucokinase regulatory protein*), GKAs (*glucokinase activators*) oraz redystrybucja enzymu wewnątrz struktur komórkowych: jądra, mitochondriów, aparatu Golgiego [40, 51]. Aktywacja enzymu przez jego substrat – glukozę, odbywa się w zakresie fizjologicznych stężeń glukozy 4-12 mmol/l i prowadzi do wyżej opisanej zmiany konformacji enzymu z otwartej, o niskim powinowactwie do glukozy, do zamkniętej, o wysokim powinowactwie do substratu oraz szybkiego wzrostu aktywności katalitycznej, gdy stężenie glukozy przekracza stan euglikemii (5 mmol/l)[49, 52]. W hepatocytach szybka regulacja aktywności enzymu odbywa się głównie przy udziale białka regulującego (GKRP – *glucokinase regulatory protein*). Przy niskim stężeniu glukozy enzym związany z białkiem regulującym jest transportowany do jądra komórkowego, a przy wzroście stężenia glukozy, glukokinaza dysocjuje od GKRP i jest transportowana do cytoplazmy, gdzie ułatwia absorpcję glukozy i jej konwersję do glikogenu [41, 51]. Długoterminową regulację aktywności glukokinazy w hepatocytach warunkuje zwiększona ekspresja genu po stymulacji insuliną [52, 53].

Rycina 2. Struktura białka glukokinazy.

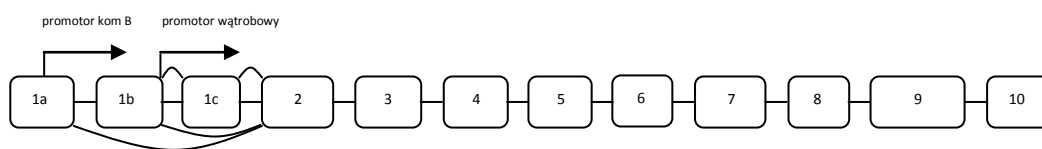


Na podstawie: Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase (2004) *Structure* 12: 429-438.

Ludzki gen GCK występuje w jednej kopii na chromosomie 7p (7p15.3 – p15.1), ma długość 15,5 kilobaz, zawiera 12 egzonów wielkości 96-977 par zasad, oddzielonych jedenastoma intronami, a jego produktem jest białko zbudowane z 465 aminokwasów, które tworzą 13 helis α i 13 harmonijek β . Geny GCK innych ssaków są homologiczne z genem ludzkim [54]. Gen posiada dwa różne regiony regulatorowe transkrypcji, a więc dwa różne promotory. Alternatywne sekwencje pierwszego 5'-końcowego egzonu pozwalają na tkankowo specyficzną produkcję dwóch różnych izoform enzymu [54, 55, 56]. Promotor aktywny w komórkach β trzustki

(*upstream promoter*) oraz promotor aktywny w hepatocytach (*downstream promoter*) są oddalone od siebie o co najmniej 15 kilobaz. W ludzkim genie egzony 1a i 2-10 kodują mRNA glukokinazy komórek β trzustki. W wątrobie zidentyfikowano dwa różne mRNA glukokinazy: główny transkrypt kodowany przez egzony 1b i 2-10 oraz drugi, kodowany przez egzony 1b, 1c i 2-10 [57]. Obecność dwóch promotorów w genie GCK warunkuje różną regulację ekspresji genu w wątrobie i komórkach β trzustki. Transkrypcja genu GCK w wątrobie podlega regulacji przez hormony i inne czynniki, podczas gdy w komórkach β trzustki ekspresja genu jest konstytutywna. Pozwala to wątrobowej glukokinazie adaptować się do zmian w stanie odżywienia i hormonalnym organizmu, a aktywność glukokinazy wątroby pozostaje stabilnym wykładnikiem tempa metabolizmu glukozy i wydzielania insuliny przez komórki β [46].

Rycina 3. Struktura genu glukokinazy.



Opracowano na podstawie: Matschinsky FM (2002) Regulation of pancreatic glucokinase. From basics to therapeutics. Diabetes 51 (Supplement 3), S394-S404. Zmodyfikowane.

Dotychczas opisano ponad 600 mutacji w genie GCK, które są przyczyną różnych monogenowych zaburzeń gospodarki węglowodanowej [58]. Heterozygotyczne mutacje aktywujące są przyczyną hipoglikemii hiperinsulinowej noworodków (HHI – *hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy*). Inaktywujące mutacje obu alleli genu powodują głęboki deficyt aktywności glukokinazy, a w konsekwencji ciężką hiperglikemię obecną już od urodzenia – przetrwałą cukrzycę noworodkową (PNDM – *permanent neonatal diabetes mellitus*). Inaktywujące mutacje jednego allelu są natomiast przyczyną łagodnej hiperglikemii – MODY2 (MODY – *maturity-onset diabetes of the young type 2*), a według obecnie obowiązującej nomenklatury – GCK-MODY [58-64]. Potencjalną patogenność mutacji można przewidzieć na podstawie zmian, jakie wprowadza ona do struktury białka. Mutacje typu nonsense, które powodują znaczące skrócenie łańcucha białkowego, zmieniają ramkę odczytu, czy też całkowite lub częściowe delecje dużych partii genu, mają oczywisty skutek w postaci braku prawidłowej funkcji białka. Trudniej jest przewidzieć efekt mutacji zmiany sensu czy też zmiany miejsca wycinania intronów. Bardzo pomocne w takich przypadkach jest potwierdzenie segregacji mutacji w rodzinie z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. Istotnym uzupełnieniem procesu oceny znaczenia zmiany w sekwencji DNA są badania funkcjonalne białka.

1.6. Obraz kliniczny GCK-MODY a implikacje diagnostyczne i terapeutyczne

Obraz kliniczny GCK-MODY znacznie odbiega od przebiegu cukrzycy MODY związanej z mutacjami genów czynników transkrypcyjnych. W tej postaci MODY defekt dotyczy pojedynczego, "biochemicznego" elementu w procesie wydzielania insuliny, a więc procesy różnicowania i proliferacji komórek β oraz syntezy hormonu pozostają niezakłócone. Nieobecne są również inne morfologiczne lub biochemiczne objawy pozatrzustkowe, na przykład wady rozwojowe [65]. Istota patomechanizmu polega na tym, że uszkodzony enzym, który katalizuje pierwszą reakcję glikolizy, pełni rolę glukosensora. Chorzy z obniżoną aktywnością glukokinazy reagują wydzielaniem insuliny przy wyższym stężeniu glukozy niż osoby zdrowe. Charakterystycznym objawem GCK-MODY jest hiperglikemia na czczo, zwykle nie przekraczająca 8 mmol/l (144 mg/dl). W testach obciążeniowych zachowana jest sekrecja insuliny, a przyrost glikemii pomiędzy 0 a 120 minutą doustnego testu obciążenia 75 g glukozy (*OGTT – oral glucose tolerance test*) nie przekracza zwykle 3 mmol/l. Tylko u około połowy nosicieli mutacji można rozpoznać cukrzycę zgodnie z kryteriami WHO [66]. Pozostali spełniają kryteria rozpoznania stanu przedcukrzycowego – nieprawidłowej glikemii na czczo i/lub nietolerancji glukozy. Choroba ma przebieg łagodny, a hiperglikemia nie ulega znaczącej progresji, o ile nie nakłada się na nią proces rozwoju cukrzycy typu 2 lub typu 1 [67, 68]. Niewielkie jest również ryzyko rozwoju przewlekłych makro- i mikroangiopatycznych powikłań cukrzycy, co jest odzwierciedleniem faktu, że hemoglobina glikowana zwykle nieznacznie przekracza górny zakres normy dla osób zdrowych [69-73]. Dodatkowym objawem w GCK MODY jest insulinooporność wątrobowa, będąca skutkiem obniżenia aktywności wątrobowej glukokinazy. W wyniku tego zmniejszona jest poposiłkowa synteza glikogenu w wątrobie i relatywnie zwiększa się glukoneogeneza, co dodatkowo przyczynia się do wzrostu glikemii na czczo [74]. Zjawisko insulinooporności wątrobowej ma jednak niewielki wpływ na przebieg kliniczny choroby. Wyjątkiem mogą być sytuacje, w których z czasem dochodzi do akumulacji typowych metabolicznych czynników ryzyka, zmniejszających insulinowrażliwość. W takich przypadkach hiperglikemia może ulec progresji, a fenotyp GCK-MODY może zbliżyć się do fenotypu obserwowanego w cukrzycy typu 2 [60]. Ze względu na skąpoobjawowy przebieg, choroba jest zwykle wykrywana przypadkowo, na przykład w trakcie badań okresowych, w trakcie ciąży czy też w czasie chorób infekcyjnych lub zabiegów operacyjnych. U wielu nosicieli nie stawia się rozpoznania cukrzycy nigdy lub stawia się je dopiero w wieku podeszłym, pomimo, że defekt enzymatyczny i hiperglikemia są obecne od urodzenia [65, 75].

Istotną obserwacją jest wpływ obecności mutacji u matki i płodu na wagę urodzeniową. Dziecko zdrowej matki, które odziedziczyło mutację po ojcu, na skutek hipoinsulinemii, ma

obniżoną masę urodzeniową [76]. Jeżeli natomiast płód nie odziedziczył mutacji, a jego matka jest nosicielką, takie dziecko może urodzić się z makrosomią [77, 78]. Obecność mutacji i u dziecka, i u matki znosi wzajemnie swój efekt, a waga urodzeniowa dziecka nie odbiega od średniej wagi urodzeniowej zdrowych dzieci matek bez cukrzycy [79, 80].

Postawienie właściwego rozpoznania u pacjenta z GCK-MODY ma istotne znaczenie z uwagi na możliwość włączenia optymalnego sposobu postępowania, określenia rokowania u członków rodziny, w tym również u potomstwa, oraz przeprowadzenia poradnictwa genetycznego. Ze względu na wczesny wiek rozpoznania pacjenci o fenotypie GCK-MODY często niewłaściwie mają rozpoznawaną cukrzycę typu 1 i leczeni są przy pomocy insulinoterapii, co znacznie obniża ich jakość życia i jest nieefektywne [81]. Z kolei typowo stosowana jako leczenie pierwszego rzutu w cukrzycy typu 2 terapia metforminą jest nieskuteczna w cukrzycy GCK-MODY.

Wysoka penetracja mutacji i niewielki wpływ czynników środowiskowych na przebieg kliniczny GCK-MODY powoduje, że profilaktyka pierwotna jest praktycznie niemożliwa. Również interwencje behawioralne czy farmakologiczne nie zmieniają przebiegu i tempa progresji choroby. Z uwagi na mechanizm hiperglikemii i łagodny przebieg GCK-MODY podstawą leczenia w tym podtypie MODY jest postępowanie nefarmakologiczne i zastosowanie diety cukrzycowej z ograniczeniem węglowodanów prostych i o wysokim indeksie glikemicznym. Leczenie metforminą, innymi doustnymi lekami hipoglikemizującymi czy insuliną nie ma wpływu na poziom hemoglobiny glikowanej w tej grupie pacjentów [69, 82]. Brak odpowiedzi na leczenie farmakologiczne wynika z faktu, że wydzielanie insuliny oraz włączenie mechanizmów kontrregulacyjnych odbywa się w GCK-MODY przy wyższych poziomach glikemii. Łagodny przebieg oraz minimalne ryzyko powikłań sprawiają, że farmakoterapia, poza okresem ciąży, jest niepotrzebna. Należy natomiast zapobiegać wystąpieniu i ewentualnie leczyć inne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, głównie otyłość, które mogą pogorszyć przebieg kliniczny GCK-MODY, poprzez nakładanie się fenotypu cukrzycy typu 2 na fenotyp MODY.

Rokowanie w GCK-MODY jest bardzo dobre. Zaburzenie charakteryzuje się łagodnym przebiegiem, hiperglikemia nie ulega progresji z czasem, pacjenci zwykle nie wymagają leczenia farmakologicznego, a schorzenie nie niesie ze sobą ryzyka przewlekłych powikłań.

1.7. Diagnostyka GCK-MODY i kryteria kwalifikacyjne do badań genetycznych

W 2008 roku grupa ekspertów zaproponowała kryteria kwalifikujące chorych z podejrzeniem MODY do badań genetycznych i diagnostyki molekularnej w obrębie najczęstszych genów: HNF1A, GCK i HNF4A [83]. Kryteria opracowane zarówno dla dzieci i dorosłych wskazują sytuacje kliniczne, w których pacjenta należy skierować do dalszej diagnostyki genetycznej. W przypadku GCK-MODY kryteria europejskiej grupy ekspertów wskazują na celowość poszukiwania mutacji w genie GCK, gdy:

- glikemia na czczo wynosi $\geq 5,5$ mmol/l w przynajmniej trzech niezależnych oznaczeniach i jest stabilnie podwyższona od miesięcy lub lat,
- poziom HbA_{1c} jest nieznacznie podwyższony i nie przekracza 7,5%,
- różnica pomiędzy glukozą na czczo a glukozą w drugiej godzinie testu obciążenia 75 g glukozy wynosi poniżej 4,6 mmol/l (najczęściej nie przekracza 3 mmol/l),
- u jednego z rodziców pacjenta stwierdza się nieznacznie podwyższoną glikemię na czczo (zwykle w przedziale 5,5 – 8 mmol/l) lub ma on rozpoznaną „łagodną cukrzycę typu 2” z nieobecnymi przewlekłymi powikłaniami. Wyjątkiem są rzadkie sytuacje powstania mutacji *de novo* – wówczas wywiad rodzinny jest ujemny.

Ponadto sytuacją kliniczną skłaniającą do diagnostyki w kierunku cukrzycy monogenowej GCK-MODY jest cukrzyca ciążowa i współistniejące okoliczności:

- stale podwyższony poziom glukozy na czczo w przedziale 5,5-8,0 mmol/l, zarówno przed, w trakcie, jak i po ciąży,
- różnica pomiędzy glukozą na czczo a glukozą w drugiej godzinie testu obciążenia 75 g glukozy wynosi poniżej 4,6 mmol/l (w trakcie trwania lub po ciąży),
- łagodna postać cukrzycy u jednego z rodziców, ale dodatni wywiad rodzinny nie jest konieczny do rozpoczęcia diagnostyki.

Z uwagi na powszechność oznaczania glukozy u pacjentek ciężarnych, do wysunięcia podejrzenia tego typu cukrzycy monogenowej na podstawie charakterystycznego przebiegu glikemii w testach obciążeniowych, wywiadu przetrwałej łagodnej hiperglikemii oraz często dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku łagodnych zaburzeń gospodarki węglowodanowej, dochodzi właśnie w ciąży.

2. CELE PRACY

Celem pracy było badanie podłoża molekularnego oraz wybranych cech klinicznych cukrzycy GCK-MODY w regionie Polski Południowo-Wschodniej.

Szczegółowe cele obejmowały:

1. Poszukiwanie, charakterystykę i ocenę częstości mutacji w genie GCK w rodzinach z autosomalnym dominującym modelem dziedziczenia cukrzycy z Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY.
2. Charakterystykę kliniczną nosicieli mutacji w genie GCK.
3. Ocenę wpływu diagnozy molekularnej GCK-MODY na postępowanie terapeutyczne, obraz kliniczny i wyrównanie metaboliczne.

3. METODYKA

3.1. Poszukiwanie, charakterystyka i ocena częstości mutacji w genie GCK w rodzinach z autosomalnym dominującym modelem dziedziczenia cukrzycy z Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY.

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano stworzony w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych UJ CM Małopolski Zbiór Rodzin MODY, do którego włączane są rodziny z podejrzeniem tej formy cukrzycy z regionu Polski Południowo-Wschodniej. W trakcie prowadzonych badań kontynuowano poszukiwanie mutacji u członków wcześniej włączonych rodzin, rekrutowano nowe osoby i rodziny oraz przeprowadzono aktualne badania kliniczne i biochemiczne.

Przy rekrutacji do wspomnianego Zbioru Rodzin MODY stosowano następujące ogólne kryteria włączenia poszczególnych pacjentów i rodzin do badań molekularnych nad podłożem genetycznym cukrzycy:

1. Obecność cukrzycy lub zaburzeń gospodarki węglowodanowej w co najmniej 3 pokoleniach w rodzinie oraz ich autosomalny typ dziedziczenia;
2. Diagnoza cukrzycy lub stanu przedcukrzycowego u co najmniej 2 osób w rodzinie przed 30 rokiem życia.
3. W przypadku rozpoznania cukrzycy jej kliniczna insulinoniezależność (brak terapii insuliną kilka lat po rozpoznaniu lub niewielka dawka insuliny, gdy została ona wdrożona: $<0,5$ j/kg m.c.).

Celem określenia, czy rodzina spełnia założone kryteria, probant (czyli osoba z cukrzycą lub zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, przez którą nawiązano kontakt z rodziną), proszona była o wypełnienie dwóch standardowych ankiet. Pierwsza z nich, o charakterze przesiewowym, pozwalała wstępnie zakwalifikować rodzinę do dalszego postępowania rekrutacyjnego. Druga ankieta miała charakter szczegółowy i dostarczała ważnych informacji klinicznych dotyczących wieku zachorowania, sposobu leczenia, obecności powikłań, współistniejących chorób itd. Takie same ankiety otrzymywali pozostali członkowie rodziny włączonej do badania. Ponadto każdy uczestnik badania otrzymywał szczegółową informację na

temat celów i sposobu przeprowadzania badania oraz wyrażał pisemną zgodę na przetwarzanie danych osobowych, na wykonanie badań DNA i badań biochemicznych (załącznik 10A i 10B).

Ponadto, mając na uwadze charakterystyczny przebieg cukrzycy związanej z mutacją w genie GCK opisany we wstępie niniejszej pracy, podczas rekrutacji rodzin wyłącznie do badań nad podłożem molekularnym GCK-MODY przyjęto bardziej liberalne kryteria włączenia, obejmujące dodatni wywiad rodzinny w dwóch pokoleniach. Zgodnie z zaleceniami międzynarodowej grupy ekspertów odnośnie kwalifikacji chorych z podejrzeniem GCK-MODY do badań molekularnych czyniono tak w sytuacji [83]:

1. Łagodnej hiperglikemii na czczo, przekraczającej 5,5 mmol/l, stabilnie podwyższonej od miesięcy lub lat.
2. W przypadku stosowania doustnych leków hipoglikemizujących przy braku ich skuteczności w obniżaniu hiperglikemii na czczo.
3. Braku innych składowych zespołu metabolicznego: nadwagi/otyłości, zaburzeń gospodarki lipidowej, nadciśnienia tętniczego.
4. Braku progresji zaburzeń gospodarki węglowodanowej przez długi czas od rozpoznania cukrzycy lub stanu przedcukrzycowego.
5. Braku przewlekłych powikłań choroby lub niewielkiego stopnia ich zaawansowania.

Rekrutację uczestników projektu prowadzono pośród pacjentów Poradni Kliniki Chorób Metabolicznych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, a także pośród chorych z podejrzeniem cukrzycy monogenowej, kierowanych do Kliniki przez lekarzy diabetologów pracujących w Poradniach Diabetologicznych na terenie Polski Południowo-Wschodniej, głównie województwa małopolskiego.

Do wstępnych badań poszukiwawczych mutacji (*screening*) w genie GCK użyto wyizolowanego standardową metodą DNA jednej osoby chorującej z każdej rodziny włączonej do badania tzw. probanta. Poszukiwanie mutacji przeprowadzono metodą bezpośredniego sekwencjonowania i dotyczyło wszystkich 10 egzonów genu wraz z przylegającymi częściami intronów. Wyżej wymienione odcinki genu zostały namnożone za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) przy użyciu primerów o sekwencji przedstawionej w Tabeli 5. Oczyszczone produkty amplifikacji były sekwencjonowane przy zastosowaniu urządzenia ABI Prism 377 DNA Sequencer, zgodnie z protokołem i przy użyciu odczynników zalecanych przez producenta (Applied Biosystems). Mutacje wpływające na strukturę aminokwasową produktu białkowego genu, zmieniające tzw. *splicing-sites* (miejsca wycinania intronów) lub powodujące zmianę ramki odczytu genu i przedwczesną terminację translacji produktu białkowego, były badane pod kątem segregacji z cukrzycą w rodzinie (w miarę dostępności innych członków rodziny). Korzystając

z dostępnych baz danych (patrz niżej) oraz wcześniejszych publikacji, określano czy znalezione zmiany w materiale genetycznym nie są polimorfizmami, a więc wariantami genu, które występują w populacji z częstością większą niż 1%. Jeżeli mutacja segregowała się z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej w rodzinie oraz nie była obecna u zdrowych członków rodziny, przyjęto założenie, że jest ona przyczyną zaburzeń metabolizmu glukozy. Dodatkowym ważnym argumentem były wcześniejsze publikacje dotyczące patogenicznej roli danej mutacji. Wpływ mutacji na strukturę białka oraz ich lokalizacja w obrębie domen enzymu oceniana była na podstawie baz danych NCBI, Ensembl i dostępnego piśmiennictwa. W przypadku nowych mutacji do analizy patogenności wariantu genetycznego użyto programów Poly-Phen2 oraz SIFT.

Tabela 5. Primery użyte do amplifikacji badanych fragmentów genu GCK podczas sekwencjonowania.

Primery		Długość produktu
GTTCCAGACTATTGACTGACCCG GCATAAACTGGGACTGGTGGC	sens non-sens	695bp
GGAGACCCTGAGACACTGCCC GGTTTGAGGTTCACTACAGTTTCC	sens non-sens	589bp
GAAGGACACTAAGCCCCACAGC GGCACCCCTGGCAAGACC	sens non-sens	505bp
GGGTCAGAAGACAGAAGGAGGC CTGTCTCGGGCTGGCTGTG	sens non-sens	415bp
CCTTAGTCCCTTGTGCCTTCC CCGCTCTCCCCACCCCTG	sens non-sens	388bp
CAGCAGAGCATTGACAGTATCC GGGGCTACATTTGAAGGCAGAG	sens non-sens	690bp
CTCCAGTATATGTTAGCAGCCACG GATACCCCAAGACCACCCAGG	sens non-sens	504bp
GGGGAGCGGGAGAGGGAC AGAGGTCTGGGCTTATCACATCAC	sens non-sens	500bp
GGTTTCGGAGGGACTGGATG CCTCTCCGCACACCTCTCC	sens non-sens	478bp
CACTCAGCGACCGCCCTAC CCGTCCCTCCTCCACCTC	sens non-sens	462bp
GTGGGAGGAGGGACGGCAG CCCCTGGCTGCCCTTTTG	sens non-sens	653bp
GGCTCTGGGAAGGGGTGC CAGCTGGTCTGTCACTCCTCAC	sens non-sens	688bp
GGCAGGGGGCAGAGTATTTGAG GGAGGGGTGGTGGGCAGAG	sens non-sens	459bp

Sekwencjonowanie genu GCK zostało przeprowadzone w Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W przypadku jednej rodziny bezpośrednie sekwencjonowanie wykonano w Wielkiej Brytanii, w Peninsula Medical School Uniwersytetów Exeter i Plymouth. Badanie prowadzono w oparciu o akceptację Komisji Bioetycznej UJ, a wszyscy pacjenci podpisywali formularz informacji o badaniu oraz zgody na udział w badaniu.

Za referencyjny punkt odniesienia posłużyła sekwencja opublikowana w bazie danych Ensembl (*European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory, www.ensembl.org*) pod numerem ENSG00000106633. Do analizy wykrytych zmian w sekwencji nukleotydów wykorzystano bazę polimorfizmów Ensembl, bazę dbSNP z NCBI (*National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov*), bazę HGMD (*Human Gene Mutation Database, Institute of Medical Genetics, Cardiff, www.hgmd.cf.ac.uk*), bazę danych Medline oraz dostępne piśmiennictwo.

3.2. Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie GCK.

Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji w genie GCK została przeprowadzona na podstawie ankiety, dokumentacji medycznej, badania podmiotowego i przedmiotowego pacjentów oraz analiz biochemicznych.

U wszystkich osób włączonych do badania przeprowadzono badanie ankietowe. Ankieta ta zawierała pytania dotyczące rozpoznania i leczenia zaburzeń gospodarki węglowodanowej, wywiadu rodzinnego, obecności innych schorzeń, takich jak nadciśnienie, zaburzenia lipidowe, choroby serca oraz obecności powikłań cukrzycy. Analizowano także dostępną dokumentację medyczną.

U każdej osoby włączonej do analizy przeprowadzono badanie fizykalne, obejmujące pomiar wzrostu, wagi, obwodu pasa, bioder oraz ciśnienia tętniczego. Na podstawie pomiaru wzrostu i wagi wyliczono BMI (*body mass index*) – wskaźnik masy ciała – według wzoru:

$$\text{waga [kg]}/\text{wzrost [m]}^2$$

Dla osób dorosłych zastosowano klasyfikację stanu odżywienia na podstawie BMI [kg/m²] według WHO [84]:

- <18,5 niedowaga
- 18,5-24,99 normowaga
- 25-29,99 nadwaga
- 30-34,99 I stopień otyłości
- 35-39,99 II stopień otyłości
- ≥40 III stopień otyłości.

U każdego pacjenta zmierzono obwód pasa i obwód bioder w centymetrach. Obwód pasa mierzono w połowie odległości pomiędzy dolnym brzegiem łuku żebrowego a górnym brzegiem grzebieni biodrowych, a więc w największym miejscu tułowia. Obwód bioder mierzono na wysokości krętarzy większych kości udowych. Na podstawie tych dwóch pomiarów wyliczono wskaźnik WHR (*waist to hip ratio*) na podstawie wzoru:

$$\text{obwód talii [cm] / obwód bioder [cm]}.$$

Zgodnie z wytycznymi IDF (International Diabetes Federation) z 2005 r. dotyczącymi populacji europejskiej, otyłość brzuszna definiuje obwód talii u kobiet ≥ 80 cm, a u mężczyzn ≥ 94 cm [85]. Do określenia otyłości brzusznej wykorzystuje się również wskaźnik WHR. Wartość wskaźnika większa niż 0,9 u mężczyzn i 0,8 u kobiet świadczy o otyłości brzusznej.

Pomiaru ciśnienia tętniczego dokonano na tętnicy ramiennej, dwukrotnie, w pozycji siedzącej, po co najmniej 5-cio minutowym odpoczynku, przy pomocy manometru rtęciowego. Mankiet o szerokości co najmniej 2/3 obwodu ramienia założono 2-3 cm powyżej zgięcia łokciowego. Ciśnienie tętnicze skurczowe odczytywano przy pierwszym słyszalnym tonie, ciśnienie tętnicze rozkurczowe – przy zaniknięciu ostatniego słyszalnego tonu. Z wykonanych dwóch pomiarów wyliczono średnie ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe dla każdego pacjenta.

U osób z rodzin GCK-MODY w warunkach na czczo pobrano krew do ekstrakcji DNA, a także do oznaczenia poziomu kreatyniny, lipidogramu, HbA1c, glukozy, insuliny i c-peptydu, a także mocz do oznaczenia wskaźnika albumina/kreatynina (ACR – *albumin / creatinine ratio*). U uczestników badania został również wykonany doustny test obciążenia 75 g glukozy z oznaczeniem glukozy, insuliny i c-peptydu w 0 i 120 minucie. Test wykonano u osób pozostających bez leczenia zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Osoby stosujące dietę z ograniczeniem węglowodanów lub farmakoterapię były proszone o zaprzestanie stosowania diety i odstawienie stosowanych leków hipoglikemizujących na co najmniej 7 dni przed badaniem. Oznaczenia biochemiczne wykonano w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Poziom kreatyniny w surowicy oraz w moczu oznaczano metodą Jaffego

z kompensacyjną próbą ślepą, stężenie glukozy oznaczano metodą enzymatyczną GOD-PAP (*Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminophenazone Peroxidase*) z materiału pobranego do naczynia zawierającego fluorek sodu jako inhibitor glikolizy, oznaczenie cholesterolu całkowitego wykonano metodą enzymatyczną CHOD-PAP (*Cholesterol Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase*), a poziom triglicerydów metodą GPO-PAP (*Glycerol Phosphate Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase*), natomiast stężenie LDL-cholesterolu w surowicy wyliczano przy użyciu formuły Friedewalda:

$$LDL\text{-cholesterol} = \text{cholesterol całkowity} - HDL\text{-cholesterol} - \text{Triglicerydy} / 5$$

Powyższe pomiary wykonywano przy pomocy analizatora Hitachi 917 lub Modular P. Stężenie albuminy w moczu oznaczano metodą immunonefelometryczną aparatem Nephelometer II. Poziom peptydu C oraz insuliny oznaczano metodą elektrochemiluminescencji „ECLIA”. Odsetek hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) oznaczano w Pracowni Biochemicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie przy zastosowaniu metody wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) aparatem Variant, BioRad.

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej rozpoznawano na podstawie poziomu glukozy w 0 i 120 minucie testu obciążenia 75 g glukozy, zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego obowiązującymi w tym względzie od kilkunastu lat, przytoczonymi wyżej we wstępie. U pacjentów stosujących insulinoterapię, u których wykonanie OGTT nie było możliwe, lub którzy nie wyrazili zgody na wykonanie testu, rozpoznanie cukrzycy weryfikowano na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej.

Na podstawie oznaczenia poziomu glukozy i insuliny na czczo obliczono wskaźnik insulinooporności HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*). W tym celu użyto kalkulatora dostępnego na stronie internetowej: <http://www.dtu.ox.ac.uk/homa> Uniwersytetu w Oxfordzie. Kalkulator określa wskaźnik HOMA-IR w zakresie stężeń glukozy 3,0-25 mmol/l i insuliny 2,9-57,6 µU/ml. Z uwagi na bardzo niskie stężenie insuliny < 2,9 µU/ml określenie wskaźnika HOMA-IR nie było możliwe u 7 pacjentów z mutacją GCK-MODY.

Obecność przewlekłych powikłań cukrzycy: retinopatii, neuropatii i cukrzycowej choroby nerek oraz schorzeń współistniejących: nadciśnienia tętniczego, zaburzeń lipidowych, choroby niedokrwiennej serca oceniano na podstawie wywiadów, badania ankietowego oraz badań dodatkowych.

Obecność retinopatii cukrzycowej oceniano na podstawie dostarczonych przez pacjentów lub obecnych w dokumentacji opisów badania okulistycznego.

Cukrzycową chorobę nerek definiowano na podstawie istnienia przynajmniej jednej nieprawidłowości w wykonanych badaniach biochemicznych:

1. wartości wskaźnika albumina / kreatynina w moczu $> 2,26$ mg/mmol,
2. obniżonego wskaźnika filtracji kłębuszkowej < 60 ml/min/1,73m² (GFR - *glomerular filtration rate*) obliczonego na podstawie wzoru CKD-EPI.

Obecność nadciśnienia tętniczego stwierdzano na podstawie obecności jednego z kryteriów:

1. uprzednio postawionej diagnozy lekarskiej;
2. stosowania przez pacjenta leków hipotensyjnych;
3. wartości ciśnienia tętniczego skurczowego ≥ 140 mmHg lub/i wartości ciśnienia tętniczego rozkurczowego ≥ 90 mmHg.

Obecność choroby niedokrwiennej serca stwierdzano na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej i badania ankietowego.

Wybrane parametry biochemiczne (poziom glukozy i insuliny na czczo oraz w 120 minucie OGTT, przyrost glikemii i insulinemii w teście obciążenia 75 g glukozy, parametry lipidowe, poziom c-peptydu, wskaźnik insulinooporności – HOMA-IR) w badanej grupie pacjentów z mutacją w genie GCK porównano z grupą kontrolną osób zdrowych. Analizę przeprowadzono dla 42 osób z GCK-MODY powyżej 18 roku życia. Grupa kontrolna w liczbie 42 osób została dobrana spośród 495 zdrowych ochotników zgromadzonych w bazie danych Kliniki Chorób Metabolicznych dla potrzeb badań nad podłożem molekularnym cukrzycy. Niniejsza grupa kontrolna została dobrana do grupy badanej pod względem płci, wieku oraz wskaźnika BMI.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono dla cech ilościowych przy pomocy testu t-Studenta w przypadku normalnego rozkładu w obydwu grupach. Normalność rozkładu sprawdzano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Jeśli rozkład nie był normalny, to zastosowano test U-Manna-Whitneya w celu porównania median w grupie badanej z kontrolną. Przyjęto poziom istotności 5%.

3.3. Ocena wpływu diagnozy molekularnej GCK-MODY na postępowanie terapeutyczne i wyrównanie metaboliczne.

Wszyscy uczestnicy badania otrzymali wynik badania genetycznego oraz konsultację diabetologiczną dotyczącą znaczenia diagnozy GCK-MODY. Pacjenci, u których potwierdzono obecność mutacji w genie GCK otrzymali zalecenie zgłoszenia się do Rejonowej Poradni Diabetologicznej. Po okresie minimum 6 miesięcy nawiązano ponownie kontakt z tą grupą osób. Oceniono w jaki sposób diagnoza molekularna zaburzeń gospodarki węglowodanowej wpłynęła na postępowanie terapeutyczne i wybrane elementy kliniczne. Pod uwagę wzięto: rodzaj oraz liczbę stosowanych leków, obecną masę ciała oraz wyrównanie metaboliczne oceniane na podstawie odsetka hemoglobiny glikowanej. Aktualną masę ciała oraz wartość HbA_{1c} porównano z wartościami początkowymi.

4. WYNIKI

4.1. Wyniki poszukiwania, charakterystyka i ocena częstości mutacji w genie GCK w rodzinach z autosomalnym dominującym modelem dziedziczenia cukrzycy z Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY.

4.1.1. Wyniki poszukiwania mutacji w genie GCK oraz ocena ich częstości w rodzinach z Polski Południowo-Wschodniej.

W latach 1999 – 2014 w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych w ramach tworzonego Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY do badań genetycznych zakwalifikowano 186 rodzin. W chwili pisania niniejszej rozprawy wynik badania DNA uzyskano u 119 probantów i/lub ich rodzin. Pozostałych 67 probantów oczekiwało na wynik badania genetycznego. Spośród tych 119 rodzin w 53 przypadkach na podstawie obrazu klinicznego podejrzewano GCK-MODY, a w 63 – cukrzycę MODY związaną z czynnikami transkrypcyjnymi. Z uwagi na obraz kliniczny oraz sposób dziedziczenia trzy rodziny zakwalifikowano do sekwencjonowania DNA mitochondrialnego i potwierdzono rozpoznanie cukrzycy mitochondrialnej. Spośród 53 osób podejrzanych o GCK-MODY, u 42 probantów potwierdzono mutację w genie GCK, u 11 wynik był negatywny. Spośród probantów, u których obraz kliniczny wskazywał na cukrzycę MODY związaną z czynnikami transkrypcyjnymi, u 40 potwierdzono obecność mutacji w genie HNF1A, w jednej rodzinie zidentyfikowano mutację w genie NEUROD, a w jednej – mutację w genie HNF4A. W 21 przypadkach wynik sekwencjonowania był negatywny. Reasumując, spośród 119 rodzin podejrzewanych o cukrzycę monogenową, w 84 przypadkach potwierdzono obecność cukrzycy MODY: w 42 rodzinach zidentyfikowano mutację w genie GCK (50%) i w 42 rodzinach cukrzycę związaną z mutacją genu czynnika transkrypcyjnego (50%). Tabela przedstawia wyniki sekwencjonowania DNA u 119 probantów.

Tabela 6. Wyniki sekwencjonowania DNA u 119 probantów ze Zbioru Rodzin MODY.

Wynik badania DNA	Liczba rodzin	% rodzin
Mutacja genu GCK	42	35,3%
Mutacja genu HNF1A	40	33,6%
Mutacja genu HNF4A	1	0,8%
Mutacja genu NEUROD	1	0,8%
Mutacja mitochondrialnego DNA	3	2,5%
Brak mutacji	32	27%

Poniższa tabela przedstawia rodzaj mutacji oraz liczbę zidentyfikowanych rodzin GCK-MODY znajdujących się w Zbiorze Rodzin MODY.

Tabela 7. Częstość poszczególnych mutacji wśród rodzin GCK-MODY w Zbiorze Rodzin MODY.

Lp.	Pozycja nukleotydowa z uwzględnieniem heterozygotyczności	Pozycja aminokwasowa	Pozycja nukleotydowa	Liczba rodzin
1	c.[952G>A];[=]	p.(G318R)	c.952G>A	9
2	c.[781G>A];[=]	p.(G261R)	c.781G>A	2
3	c.[776C>T];[=]	p.(A259V)	c.776C>T	2
4	c.[.635C>T];[=]	p.(S212F)	c.635C>T	2
5	c.[1148C>T];[=]	p.(S383L)	c.1148C>T	2
6	c.[.-84C>G];[=]	p.(=)	c.-84C>G	2
7	c.[904G>C];[=]	p.(V302L)	c.904G>C	2
8	c.[1217T>C];[=]	p.(V406A)	c.1217T>C	2
9	c.[944T>A];[=]	p.(L315H)	c.944T>A	2
10	c.[131G>A];[=]	p.(G44D)	c.131G>A	1
11	c.[491T>C];[=]	p.(L164P)	c.491T>C	1
12	c.[703A>G];[=]	p.(M235)	c.703A>G	1
13	c.[683C>T];[=]	p.(T228)	c.683C>T	1
14	c.[472G>T];[=]	p.(D158Y)	c.472G>T	1
15	c.[106C>T];[=]	p.(R36W)	c.106C>T	1
16	c.[1313T>C];[=]	p.(F438S)	c.1313T>C	1
17	c.[764C>A];[=]	p.(T255N)	c.764C>A	1
18	c.[490C>G];[=]	p.(L164V)	c.490C>G	1
19	c.[844_846del];[=]	p.(A282del)	c.844_846del	1
20	c.[449_451del];[=]	p.(F150del)	c.449_451del	1
21	c.[1130G>T];[=]	p.(R377L)	c.1130G>T	1
22	c.[593A>T];[=]	p.(D198V)	c.593A>T	1
23	c.[1043T>A];[=]	p.(I348N)	c.1043T>A	1
24	c.[257T>G];[=]	p.(V86G)	c.257T>G	1
25	c.[679+1G>A];[=]	G/A splice-site	c.679+1G>A	1
26	c.[660C>A];[=]	p.(Cys220*)	c.660C>A	1
27	c.[579G>T];[=]	p.(=)	c.579G>T	1

Spośród 42 probantów/rodzin ze zidentyfikowaną mutacją w genie GCK na udział w projekcie badawczym zgodę wyraziło 21 osób. Poniżej przedstawione są wyniki odnoszące się do tych rodzin.

Wśród rodzin, w których zastosowano kryteria rekrutacji obejmujące trzypokoleniowy wywiad zaburzeń gospodarki węglowodanowej, do badania w ramach niniejszego projektu włączono 16 rodzin. Na podstawie wywiadu, badania ankietowego lub przeprowadzonego w trakcie badania doustnego testu obciążenia 75 g glukozy w rodzinach tych zidentyfikowano 102 osoby z cukrzycą lub stanem przedcukrzycowym. Spośród członków tych rodzin badanie genetyczne przeprowadzono u 73 osób, z czego obecność mutacji w genie GCK potwierdzono u 48 osób. Stosując łagodniejsze kryteria włączenia do badania (dwupokoleniowy wywiad zaburzeń gospodarki węglowodanowej) do projektu zakwalifikowano 5 rodzin. W tych rodzinach zidentyfikowano 23 osoby z cukrzycą lub stanem przedcukrzycowym. Spośród dostępnych członków tych rodzin badanie DNA przeprowadzono u 15 osób, wśród których obecność GCK-MODY potwierdzono u 13 osób. Łącznie we wszystkich 21 rodzinach zidentyfikowano 125 osób z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. Badanie genetyczne przeprowadzono u 88 osób, z czego u 61 osób stwierdzono obecność mutacji w genie GCK.

W grupie 61 nosicieli mutacji było 28 mężczyzn (46%) i 33 kobiety (54%) w wieku od 10 do 79 lat; średni wiek pacjentów wynosił 34 lata. Czas od rozpoznania cukrzycy lub stanu przedcukrzycowego do włączenia do niniejszego badania wynosił od 0 do 28 lat, średnio 5,4 lat. Średni wiek rozpoznania wynosił 29,1 lat.

W chwili włączenia do badania spośród nosicieli mutacji w genie GCK 22 osoby pozostawały bez jakiegokolwiek leczenia, 17 osób stosowało dietę, 11 osób – doustne leki hipoglikemizujące, a 11 osób leczonych było insuliną. Średni poziom HbA_{1c} wynosił 6,6%. Charakterystykę cech klinicznych nosicieli przedstawia poniższa tabela 6.

Tabela 8. Charakterystyka kliniczna 61 pacjentów z rodzin GCK-MODY włączonych do badania.

Płeć (kobiety/mężczyźni)	33/28
Wiek w momencie badania (lata)	34,04 (14,15)
Wiek w momencie rozpoznania cukrzycy lub stanu przedcukrzycowego (lata)	29,1 (12,7)
Czas od rozpoznania choroby (lata)	5,4 (6,7)
BMI (kg/m ²)	23,6 (4,1)
WHR	0,8 (0,1)
Ciśnienie tętnicze skurczowe (mmHg)	116,9 (13,6)
Ciśnienie tętnicze rozkurczowe (mmHg)	72,37 (8,5)
HbA _{1c} (%)	6,6 (0,7)
Sposób leczenia:	Liczba pacjentów:
Insulina	11
Leki doustne	11
Dieta	17
Bez leczenia	22

W tabeli dane dotyczące płci i sposobu leczenia podano jako liczbę pacjentów. Dla pozostałych danych przedstawiono średnią, w nawiasach podano odchylenie standardowe

4.1.1.1. Wyniki poszukiwania mutacji w genie GCK oraz ocena ich częstości w rodzinach ze Zbioru Rodzin MODY.

W 42 zidentyfikowanych rodzinach GCK-MODY, które wzięły udział w badaniu najczęstszą stwierdzoną mutacją była mutacja punktowa G318R (obecna w 9 rodzinach), powodująca substytucję glicyny arginina w kodonie 318. Następujące mutacje stwierdzono w dwóch rodzinach: V302L, V406A, G261R, A259V, S212F, S383L, L315H, c.-84C>G. Według wywiadu członkowie tych rodzin nie byli ze sobą spokrewnieni. Pozostałe znalezione mutacje stwierdzono w pojedynczych rodzinach – łącznie 27 różnych mutacji. 5 z opisanych mutacji stanowią nowe warianty genetyczne, które dotychczas nie zostały opisane: L164V, V86G, D158Y, F438S oraz A282del.

W analizowanych rodzinach znaleziono:

- 12 mutacji zmiany sensu: G318R (w 9 rodzinach), w 2 rodzinach mutacje: V302L, V406A, G261R, A259V, S212F, S383L, L315H oraz w pojedynczych rodzinach: T255N, L164V, R377L, D198V, I348N, V86G, G44D, L164P, M235V, T228M, D158Y, R36W, F438S.
- 2 delecje z zachowaną ramką odczytu (F150del i A282del).
- 2 mutacje prowadzące do zmiany miejsca składania egzonów (splicing-site): c.579G>T i c.679+1G>A.
- 1 mutację w regionie promotorowym genu GCK (c.-84C>G)
- 1 mutację nonsensowną p.(Cys220*).

Niemal wszystkie mutacje zmiany sensu, poza mutacjami punktowymi D198V, D158Y i R36W, zlokalizowane były w ewolucyjnie konserwatywnych obszarach genu GCK.

Punktowa mutacja zmiany sensu **G318R** polega na zamianie guaniny na adeninę (GGG/AGG) w pozycji 952 (c.952G>A, GGG>AGG), co powoduje substytucję glicyny arginina w konserwatywnym kodonie 318, w egzonie 8. Mutacja została opisana jako powodująca fenotyp cukrzycy również w innych populacjach [86-88].

Punktowa mutacja zmiany sensu **G261R** powodują zamianę guaniny na adeninę w pozycji 781 (c.781G>A, GGG/AGG), co skutkuje substytucją glicyny arginina w kodonie 261, w egzonie 7. Gly-261 w strukturze enzymu formuje część pętli pomiędzy harmonijką β 11 a helisą α 6, która prowadzi bezpośrednio do miejsca wiążącego glukozę. Substytucja arginina wprowadza w miejsce małej, hydrofobowej reszty aminokwasowej glicyny o wiele dłuższy boczny łańcuch o dodatnim ładunku, który może interferować z prawidłową konformacją enzymu w pobliżu miejsca aktywnego. Mutacja ta, zmieniając strukturę białka, zmienia jego aktywność i znacznie zmniejsza powinowactwo do glukozy oraz Vmax (maksymalną szybkość reakcji enzymatycznej) [57, 89]. Mutacja została opisana w wielu publikacjach i potwierdzono jej związek z występowaniem cukrzycy [46, 86, 89-91].

Punktowa mutacja **A259V** polega na zamianie cytozyny na tyminę w pozycji 776, w egzonie 7 (c.776C>T). Skutkuje to zamianą adeniny na walinę w kodonie 259, będącym częścią pętli łączącej β harmonijkę 11 z α helisą 6. Mutacja została opisana w populacji polskiej i francuskiej [114, 58].

Mutacja punktowa zmiany sensu **S212F**, spowodowana jest zamianą cytozyny na tyminę w pozycji 635, w egzonie 6, co skutkuje z kolei zamianą seryny na fenyloalaninę w kodonie 212 α helisy 5. Mutacja została opisana w populacji hiszpańskiej i francuskiej [58, 97, 115].

Mutacja zmiany sensu **S383L**, opisana po raz pierwszy w 2002 r w hiszpańskiej rodzinie, spowodowana jest zamianą cytozyny na tyminę w pozycji 1148 (c.1148C>T; TCG/TTG), w egzonie 9 [92]. Wynikiem mutacji jest substytucja seryny leucyną w kodonie 383, tworzącym α helisę 11,

utworzoną przez aminokwasy w pozycjach 361-494. Mutacja została opisana w hiszpańskiej, czeskiej, polskiej oraz innych populacjach [86, 87, 92].

Mutacja w regionie promotorowym genu GCK **c.1a-84C>G** została opisana w USA u dwójki dzieci z dwóch różnych rodzin i przeciwnym obrazem klinicznym. U pierwszego chłopca stwierdzono hiperglikemię z typowymi objawami klinicznymi, do leczenia włączono długodziałający analog insuliny uzyskując dobrą kontrolę metaboliczną. W wywiadzie rodzinnym wielu członków rodziny matki chorowało na cukrzycę o wczesnym początku, która nie powodowała rozwoju przewlekłych powikłań choroby. Po potwierdzeniu mutacji w regionie promotorowym genu GCK odstawiono insulinę. Po okresie 12 miesięcy HbA1c wynosiła 5,6%. Druga dziewczynka w 5 miesiącu życia prezentowała obraz hipoglikemii hiperinsulinemicznej i wymagała przewlekłego stosowania diazoksydu [116].

Punktowa mutacja **V302L** polega na zamianie guaniny na cytozynę (c.904G>C; GTG/CTG) w kodonie 302 egzonu 8, co skutkuje substytucją waliny leucyną w łańcuchu polipeptydowym glukokinazy. Kodon V302 jest częścią α helisy 8, utworzonej przez aminokwasy w pozycjach 196-203. Mutacja została opisana w piśmiennictwie jako powodująca fenotyp GCK MODY w populacji polskiej [99].

Wynikiem mutacji zmiany sensu **V406A** jest zastąpienie tyminy cytozyną (c.1217T>C; GTG/GCG), co powoduje substytucję waliny alaniną w kodonie 406, w egzonie 10. Kodony 402-410 tworzą β harmonijkę 12. Mutacja została opisana w populacji polskiej jako powodująca fenotyp GCK-MODY [86].

Punktowa mutacja zmiany sensu **L315H** polega na zamianie tyminy na adeninę w pozycji 944 (c.944T>A), w egzonie 8. Wynikiem mutacji jest substytucja aminokwasu leucyny na histydynę w kodonie 315 będącym częścią pętli łączącej α helisy 8 i 9. Zmutowany enzym wykazuje zbliżoną kinetykę do prawidłowego enzymu: podobne powinowactwo do glukozy, podobną szybkość katalizy i tylko nieznacznie obniżone powinowactwo do ATP. L315H-GCK wykazuje natomiast zmniejszoną odpowiedź na hamujące działanie wątrobowego białka regulatorowego GGRP (*glucokinase regulatory protein*) i istotnie mniejszą stabilność termiczną w porównaniu do enzymu dzikiego [94]. Mutacja została opisana w populacji Czech i Słowacji jako powodująca fenotyp GCK-MODY [94, 95].

Mutacja zmiany sensu **G44D** polega na zamianie guaniny na adeninę w pozycji 131 (c.131G>A), w egzonie 2. Jej skutkiem jest substytucja glicyny na kwas asparaginowy w kodonie 44 będącym częścią α helisy 2. Mutacja została opisana w populacji brytyjskiej, czeskiej i polskiej [88, 103, 114].

Punktowa mutacja zmiany sensu **L164P** polega na zamianie tyminy na cytozynę w pozycji 491, w egzonie 5 (c.491T>C). Skutkiem mutacji jest substytucja leucyny proliną w kodonie 164

będącym częścią β harmonijki 7 w drugorzędowej strukturze białka. Mutacja została opisana w populacji koreańskiej [117], a także kanadyjskiej i europejskiej jako powodująca fenotyp GCK-MODY [58].

Punktowa mutacja zmiany sensu **M235V** polega na zamianie adeniny na guaninę w pozycji 703, w egzonie 7 (c.703A>G). Skutkiem mutacji jest substytucja metioniny waliną w kodonie 235 będącego częścią β harmonijki 10 w drugorzędowej strukturze białka. Zmutowany enzym jest termostabilny, ale charakteryzuje się zmniejszoną szybkością katalizy w porównaniu do prawidłowego enzymu [58]. Mutacja została opisana między innymi w populacji hiszpańskiej [118], a także innych populacjach europejskich jako powodująca fenotyp GCK-MODY [58].

Mutacja zmiany sensu **T228M** polega na zamianie cytozyny na tyminę w pozycji 683 w egzonie 7 (c.683C>T), co powoduje substytucję treoniny metioniną w kodonie 228, będącym częścią β harmonijki 9 w drugorzędowej strukturze białka. Mutacja została opisana w populacjach kaukaskich [57, 58, 94], a także japońskiej [119].

Mutacja zmiany sensu **D158Y** polega na zamianie guaniny na tyminę w pozycji 472 w egzonie 4 (c.472G>T), co skutkuje zamianą kwasu asparaginowego na tyrozynę w kodonie 158, będącym częścią β harmonijki 6 w drugorzędowej strukturze białka. Mutacja prawdopodobnie stanowi nowy wariant genetyczny.

Punktowa mutacja zmiany sensu **R36W** polega na zamianie cytozyny na tyminę w pozycji 106, w egzonie 2 (c.106C>T). Jej skutkiem jest substytucja argininy tryptofanem w kodonie 36, który w drugorzędowej strukturze białka jest częścią α helisy 2. Mutacja została opisana w wielu populacjach europejskich [58, 94, 120].

Mutacja zmiany sensu **F438S** polega na zamianie tyminy na cytozynę w pozycji 1313 w egzonie 10 genu GCK (c.1313T>C). Skutkiem tej mutacji jest substytucja fenyloalaniny seryną w kodonie 438, który w drugorzędowej strukturze białka jest częścią β harmonijki 13. Mutacja prawdopodobnie stanowi nowy wariant genetyczny.

Mutacja zmiany sensu **T255N** polega na zamianie cytozyny na adeninę w pozycji 764 (c.764C>A) i jej skutkiem jest substytucja treoniny na asparaginę w kodonie 255, w egzonie 7. Kodon ten jest częścią β harmonijki 11, utworzonej przez aminokwasy w pozycjach 251-258. Mutacja została opisana w populacji polskiej jako powodująca fenotyp GCK-MODY [86].

Punktowa mutacja zmiany sensu **L164V** powoduje zamianę cytozyny na guaninę w konserwatywnym kodonie 164, w egzonie 5 (c.490C>G), co skutkuje zamianą leucyny na walinę. Kodony 161-166 tworzą β harmonijkę 7 w drugorzędowej strukturze białka. Jest to nowy wariant genetyczny. Analiza przeprowadzona przy pomocy programów Poly-Phen2 oraz SIFT sugeruje, że jest to wariant patogeny, co dodatkowo potwierdza zaprezentowana niżej analiza segregacji

występowania fenotypu GCK-MODY z obecnością wariantu L164V u przebadanych członków rodziny M089.

Mutacja **A282del** z zachowaną ramką odczytu, w egzonie 7, polega na delecji trzech nukleotydów (c.[844_846delGCA]), co skutkuje delecją aminokwasu alaniny w kodonie 282. Dotychczas brak jest informacji w publikacjach i bazach danych na temat tego wariantu genetycznego. Jest to nowy wariant genetyczny. Jest to zmiana typu „*in frame*”, delecja 1 kodonu, która nie powoduje zmiany ramki odczytu i nie powoduje przedwczesnej terminacji translacji – nie generuje się przedwcześnie kodon stop. Powstaje białko krótsze o 1 aminokwas. Aminokwas alanina w pozycji 282 jest konserwatywnym aminokwasem tylko pomiędzy *H.sapiens*, *P.troglodytes*, *M.mulatta*. Program SIFT sugeruje że, jest to mutacja patogenna, zmieniająca funkcję białka (Confidence Score - 0.894). Analiza segregacji tego allelu u członków rodziny, w której on występuje, wykazała związek z cukrzycą MODY. Sugeruje to, że ten nowy wariant genetyczny jest mutacją patogenną i może mieć znaczenie patologiczne, będąc przyczyną fenotypu GCK-MODY.

Mutacja z zachowaną ramką odczytu **F150del**, w egzonie 4, polega na delecji trzech nukleotydów (c.449_451delTCT), powoduje delecję aminokwasu fenyloalaniny w kodonie 150. Kodon ten tworzy β harmonijkę 5 wraz z aminokwasami w pozycjach 141-152. Mutacja została opisana przez innych autorów jako powodująca fenotyp GCK-MODY [96; 97].

Mutacja **R377L** powoduje zamianę guaniny na tyminę (c.1130G>T) w kodonie 377, w egzonie 9, co powoduje substytucję argininy leucyną w łańcuchu polipeptydowym glukokinazy. W drugorzędowej strukturze enzymu kodon ten jest częścią α helisy 11 utworzonej przez aminokwasy w pozycjach 361-394. Mutacja została opisana w populacji polskiej jako powodująca fenotyp GCK-MODY [86].

Kolejna mutacja zmiany sensu **D198V** powoduje zamianę adeniny na tyminę (c.593A>T), co skutkuje zamianą kwasu asparaginowego na walinę w kodonie 198, w egzonie 6. W strukturze drugorzędowej białka kodon ten jest częścią β harmonijki 8, utworzonej przez kodony 196-209. Mutacja została opisana w populacji polskiej jako powodująca fenotyp GCK-MODY [86].

Punktowa mutacja zmiany sensu **I348N** powoduje zamianę tyminy na adeninę (c.1043T>A), powoduje zamianę izoleucyny na asparaginę w kodonie 348. Kodon znajduje się w egzonie 9 i jest częścią α helisy 10 utworzonej przez kodony 344-355 w drugorzędowej strukturze białka. Mutacja została opisana w innych populacjach jako powodująca fenotyp GCK-MODY [86; 93].

Punktowa mutacja zmiany sensu **V86G** powoduje zamianę tyminy na guaninę w pozycji 257 (c.[257T>G]; ATG/AGG), co skutkuje zamianą waliny na glicynę kodonie 86, w egzonie 3. Kodon ten jest częścią β harmonijki 3, utworzonej przez aminokwasy kodowane w pozycjach 82-

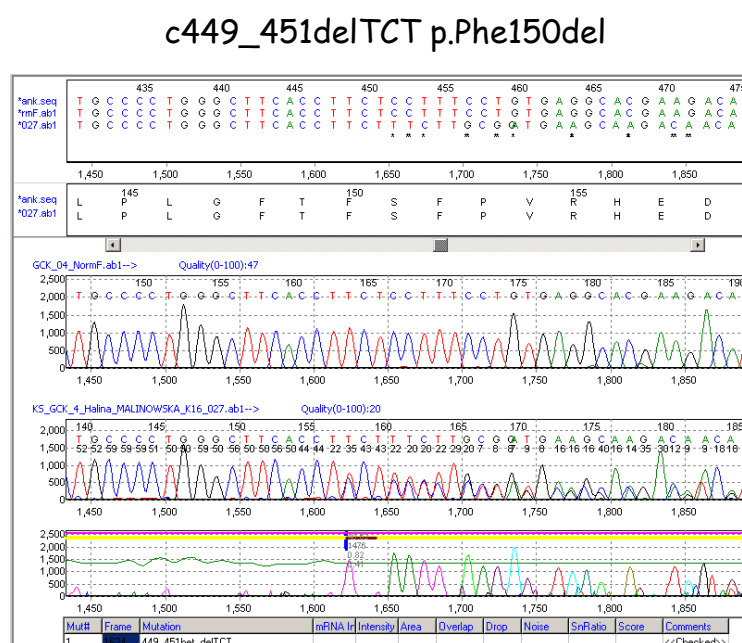
92. Jest to nowy wariant genetyczny, dotychczas nie opisany w publikacjach, a analiza przeprowadzona przy pomocy programów Poly-Phen2 oraz SIFT sugeruje, że jest to wariant patogenny (Confidence Score 1,000). Aminokwas walina w pozycji 86 jest wysoce konserwatywnym aminokwasem pomiędzy *H.sapiens*, *P.troglodytes*, *M.mulatta*, *B.taurus*, *M.musculus*, *R.norvegicus*, *G.gallus*, *D.rerio*, *X.tropicalis*. Zamiana tego aminokwasu na inny, o innych właściwościach z dużym prawdopodobieństwem może powodować zmianę funkcji białka.

Heterozygotyczna mutacja, stwierdzona u jednej osoby, polega na zamianie guaniny na adeninę GT/AT w split-site intronu 6 genu GCK (**c.679+1G>A**). Jest to mutacja będąca przyczyną fenotypu GCK-MODY opisana w populacji hiszpańskiej [98].

Punktowa mutacja nonsensowna **p.(Cys220*)** polega na zamianie cytozyny na adeninę w pozycji 660 w egzonie 6 (c.660C>A), co skutkuje kodonem stop w miejscu cytozyny. Mutacja została opisana w populacji czeskiej, niemieckiej, brytyjskiej jako będąca przyczyną fenotypu GCK-MODY [58, 88].

Heterozygotyczna mutacja **c.579G>T** polega na zamianie guaniny na tyminę w pozycji 579, w intronie 5 genu glukokinazy i najprawdopodobniej wpływa na proces składania egzonów (splicing). Mutacja została opisana w populacji włoskiej w 2017 r. [121].

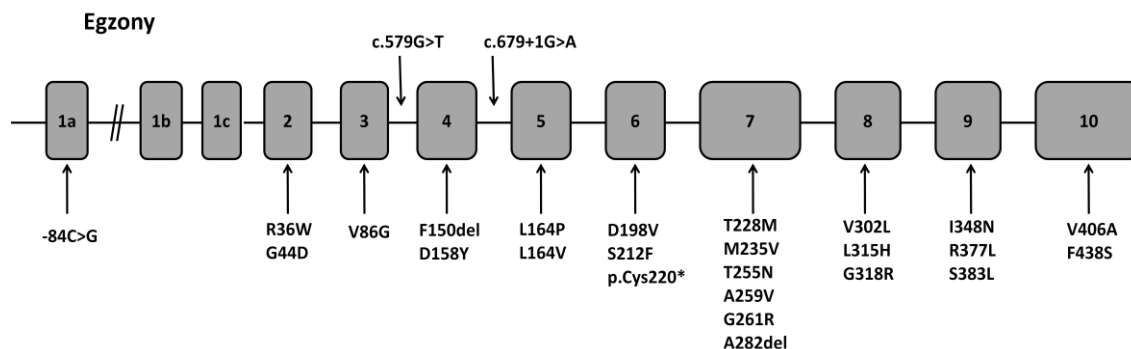
Rycina 4. Mutacja c.449_451delTCT F150del w rodzinie M070. Wydruk z sekwenatora.



Najczęściej mutacje stwierdzono w egzonie 7 – 6 mutacji, a także w egzonach 6, 8 i 9 – po 3 mutacje w każdym z nich. W egzonie 2, 4, 5 i 10 znaleziono po dwie mutacje. Pojedyncze mutacje

stwierdzono w egzonie 3, w regionie promotorowym oraz w intronach 5 i 6. Lokalizację mutacji w genie GCK przedstawia rycina 5.

Rycina 5. Lokalizacja mutacji w genie GCK wykrytych w badanych rodzinach.



4.1.1.2. Wyniki poszukiwania mutacji w genie GCK oraz ocena ich częstości w rodzinach włączonych do badania.

W 21 zidentyfikowanych rodzinach GCK-MODY, które wzięły udział w badaniu najczęstszą stwierdzoną mutacją była mutacja punktowa G318R (obecna w 5 rodzinach), powodująca substytucję glicyny arginina w kodonie 318. W dwóch rodzinach stwierdzono mutację V302L (substytucja waliny leucyną w kodonie 302) i również w dwóch – mutację V406A (substytucja waliny alaniną w kodonie 406). Według wywiadu członkowie tych rodzin nie byli ze sobą spokrewnieni. Pozostałe znalezione mutacje stwierdzono w pojedynczych rodzinach – łącznie 15 różnych mutacji. 3 z opisanych mutacji stanowią nowe warianty genetyczne, które dotychczas nie zostały opisane: L164V, V86G oraz A282del.

Tabela 9. Częstość poszczególnych mutacji wśród rodzin GCK-MODY włączonych do badania.

Lp.	Mutacja	Liczba rodzin	% rodzin	Liczba nosicieli	% nosicieli
1	G318R	5	24	15	24,6
2	V302L	2	9,5	8	13
3	V406A	2	9,5	6	9,8
4	T255N	1	4,75	4	6,5
5	L164V	1	4,75	5	8
6	G261R	1	4,75	4	6,5
7	A282del	1	4,75	3	4,9
8	F150del	1	4,75	3	4,9
9	R377L	1	4,75	4	6,5
10	D198V	1	4,75	2	3,3
11	I348N	1	4,75	2	3,3
12	S383L	1	4,75	2	3,3
13	L315H	1	4,75	1	1,8
14	V86G	1	4,75	1	1,8
15	G/A splice site	1	4,75	1	1,8

W analizowanych rodzinach znaleziono:

- 12 mutacji zmiany sensu: G318R (w pięciu rodzinach), V302L (w dwóch rodzinach), V406A (w dwóch rodzinach) oraz w pojedynczych rodzinach: T255N, L164V, G261R, R377L, D198V, I348N, S383L, L315H, V86G.
- 2 delecje z zachowaną ramką odczytu (F150del i A282del)
- 1 mutację prowadzącą do zmiany miejsca składania egzonów (splicing-site).

4.1.2. Analiza segregacji mutacji w genie GCK w przebadanych rodzinach.

Przez segregację mutacji w genie GCK rozumiano obecność fenotypu chorobowego u ich nosicieli i jednoczesny brak zaburzeń gospodarki węglowodanowej u osób wolnych od mutacji. W

grupie zgenotypowanych 88 osób w 21 rodzinach obecność mutacji potwierdzono u 61 osób, u 17 nie stwierdzono mutacji w genie GCK. Średnia liczba nosicieli w rodzinie wynosiła 2,9. Wśród nosicieli mutacji w genie GCK możliwe było określenie stopnia zaburzeń gospodarki węglowodanowej na podstawie wykonanego doustnego testu obciążenia glukozą lub dostępnej dokumentacji medycznej u 57 osób. Spośród nich u 35 rozpoznano cukrzycę, u 21 – stan przedcukrzycowy, 1 nosicielka nie wykazywała zaburzeń metabolizmu glukozy. Wśród 17 osób negatywnych pod względem obecności mutacji w genie GCK, u 7 pacjentów w 4 rodzinach zdiagnozowano zaburzenia gospodarki węglowodanowej w postaci cukrzycy (u 4 osób) oraz stanu przedcukrzycowego (u 3 osób). Dwóch pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą stosowało doustne leki hipoglikemizujące, a 1 osoba – dietę, 1 pozostawała bez leczenia. Pacjenci ze stanem przedcukrzycowym pozostawali bez leczenia. Średni wiek tych pacjentów wynosił 68 lat, średni wiek diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej wynosił 67,3 lat. Późniejszy wiek zachorowania, niż u pozostałych członków rodziny z potwierdzoną cukrzycą monogenową, obecność otyłości lub nadwagi oraz innych cech zespołu metabolicznego w postaci nadciśnienia tętniczego i dyslipidemii u tych osób przemawia za rozpoznaniem cukrzycy typu 2. Osoby te w rodowodach rodzin GCK-MODY stanowią fenokopie, co jest nierzadkie w rodzinach z autosomalnie dominującą cukrzycą o wczesnym początku.

4.1.3. Rodowody rodzin GCK-MODY

W poniższych rodowodach przyjęto następujące oznaczenia: pola puste oznaczają osoby bez cukrzycy. Czarne, pełne pola oznaczają osoby z cukrzycą, czarno-białe – osoby ze stanem przedcukrzycowym (nieprawidłową glikemią na czczo lub/i nietolerancją glukozy), szare pola – osoby z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej w wywiadzie (u których nie zweryfikowano rodzaju zaburzeń gospodarki węglowodanowej na podstawie OGTT lub dostępnej dokumentacji medycznej). Pole puste z kropką oznacza zdrowego nosiciela. Symbolem okręgu oznaczono kobiety, kwadratu – mężczyzn, rombu – osoby, o których płci nie zebrano informacji. Osoby, które wzięły udział w badaniu opisane są w następujący sposób: pierwsza linia zawiera genotyp: M oznacza obecność mutacji, N – prawidłową sekwencję genu GCK. W drugiej linii podano wiek w chwili rozpoznania zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz wiek w momencie włączenia do badania. Dodatkowe symbole opisujące poszczególne osoby: NT – nadciśnienie tętnicze, R – retinopatia, PNO – polineuropatia obwodowa, CHNS – choroba niedokrwienna serca, CHOL – hipercholesterolemia, TG – hipertriglicerydemia, HLP – hiperlipidemia mieszana, MI – zawał

mięśnia sercowego. Dodatkowo w opisie osób z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej podano sposób leczenia. Strzałką oznaczono probantów.

Oddzielnego omówienia wymagają rodowody 4 rodzin. W trzech z tych rodzin obecność mutacji w genie GCK udało się potwierdzić tylko u probanta. W jednej rodzinie pojawił się nietypowy dla GCK-MODY obraz kliniczny cukrzycy. Były to rodziny: M051, M106, M133 i M173. Młody wiek rozpoznania, cechy kliniczne GCK-MODY oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku zaburzeń gospodarki węglowodanowej, typowy dla dziedziczenia autosomalnego dominującego, pozwalał przypuszczać, że przyczyną stwierdzonej o tych osób cukrzycy lub stanu przedcukrzycowego jest mutacja w genie GCK. Ponadto mutacje stwierdzone w wyżej wymienionych rodzinach zostały opisane w piśmiennictwie jako sprawcze w stosunku do fenotypu GCK-MODY. Rodowody tych rodzin zostaną omówione poniżej.

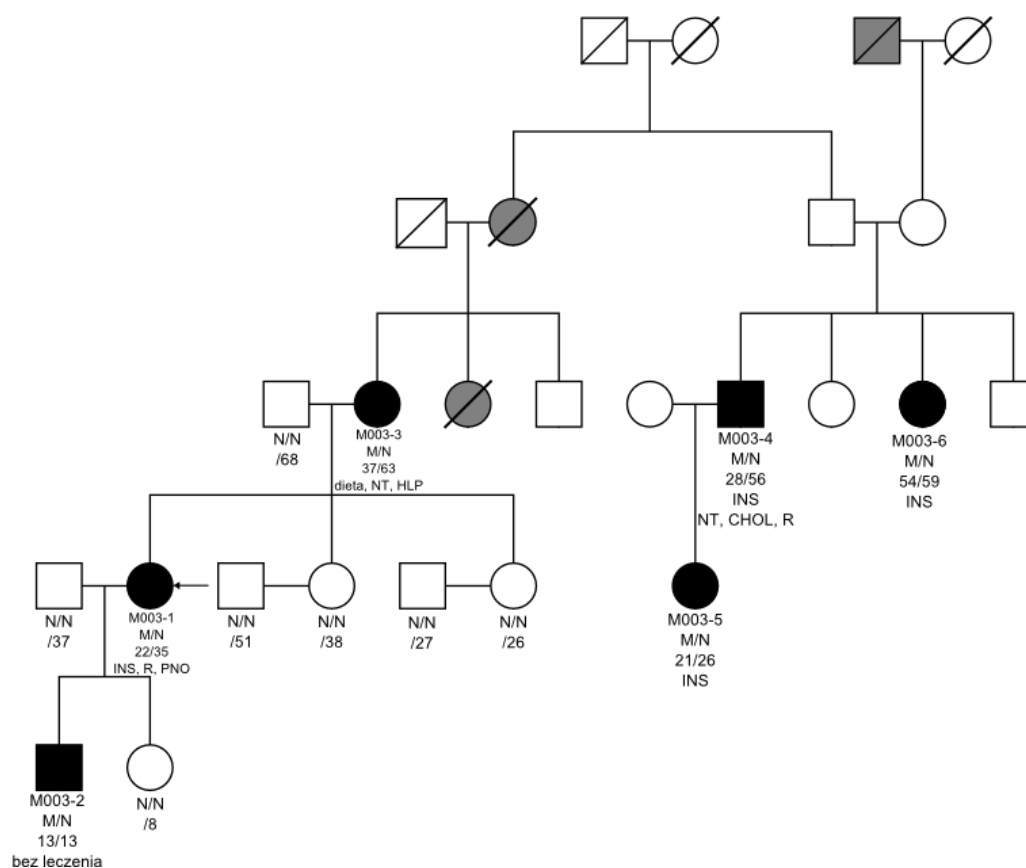
4.1.3.1. Rodzina M003 – mutacja G318R w genie GCK

Rodzina ta zasługuje na oddzielne omówienie z uwagi na odrębny od typowej cukrzycy GCK-MODY obraz kliniczny i prawdopodobne nakładanie się cukrzycy typu 1 na obecność mutacji w genie GCK. W rodowodzie oznaczono kolejnymi numerami nosicieli mutacji. U probantki (M003-1), jej syna (M003-2) i matki (M003-3) stwierdzono łagodną hiperglikemię o wczesnym początku, bez objawów klinicznych. U probantki w badaniu okulistycznym opisano początkową retinopatię nieproliferacyjną, ponadto rozpoznano polineuropatię obwodową. Przy włączeniu do badania pacjentka była leczona insuliną w niewielkiej dawce, < 0,5 j/kg m.c., odsetek HbA1c wynosił 6,1%. U nosicielki mutacji M003-3 cukrzycę rozpoznano w 37 r.ż., hiperglikemię charakteryzował brak progresji w czasie, w momencie włączenia do badania leczona była dietą, a odsetek HbA1c wynosił 6,9%. U pacjentki tej stwierdzono ponadto otyłość (BMI 36,4 kg/m²), nadciśnienie tętnicze i zaburzenia lipidowe. Natomiast u kuzyna probantki (M003-4) rozpoznanie cukrzycy nastąpiło w młodym wieku (28 lat), wśród objawów hiperglikemii (polidypsji, poliurii) i kwasicy ketonowej. Cukrzyca od początku leczona była insuliną, a od rozpoznania do momentu włączenia do badania minęło 28 lat. U nosiciela M003-4 rozpoznano nieproliferacyjną retinopatię cukrzycową obu oczu, ponadto zdiagnozowano u niego nadciśnienie tętnicze i hipercholesterolemię. Odsetek HbA1c wynosił 9,1%, a poziom c-peptydu - 0,044 ng/ml, BMI wynosiło 25,9 kg/m². U nosicielki M003-5 przy rozpoznaniu cukrzycy w wieku 21 lat również obecne były objawy hiperglikemii oraz kwasica ketonowa. Przy włączeniu do badania odsetek HbA1c wynosił również 9,1%, poziom c-peptydu 0,188, a oznaczone przeciwciała anty-GAD były ujemne. Pacjentka od rozpoznania cukrzycy

leczona była insuliną. BMI wynosiło 23,2 kg/m². Nie stwierdzono przewlekłych powikłań choroby. W obliczu tych faktów należy przyjąć, że u tej dwójki nosicieli mutacji w genie GCK (M003-4 i M003-5) współistnieje cukrzyca typu 1. Pacjentów M003-4 i M003-5 nie włączono do analizy cech biochemicznych nosicieli mutacji w genie GCK.

Rodzina M003

Mutacja G318R

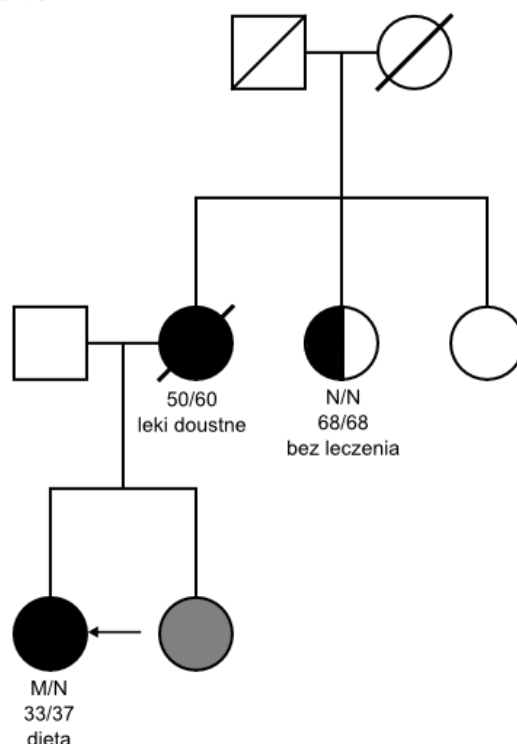


4.1.3.2. Rodzina M051 – mutacja G/A split-site w genie GCK

U probantki rozpoznano cukrzycę w 33 r.ż. W momencie włączenia do badania stosowała jedynie dietę cukrzycową. Wykonane badanie genetyczne potwierdziło obecność mutacji w genie GCK. Według wywiadu matka probantki również chorowała na cukrzycę, stosowała doustne leki hipoglikemizujące. Zmarła z powodu choroby nowotworowej przed pobraniem materiału do badań genetycznych. U siostry probantki również rozpoznano zaburzenia gospodarki węglowodanowej, ale nie zgłosiła się ona celem przeprowadzenia badań genetycznych. Sekwencjonowanie DNA nie potwierdziło obecności mutacji w genie GCK u ciotki probantki, u

której na podstawie OGTT rozpoznano nieprawidłową glikemię na czczo i stanowi prawdopodobnie fenokopię w opisanej rodzinie. Mutacja została opisana w populacji hiszpańskiej jako powodująca fenotyp GCK-MODY [98].

Rodzina M051 Mutacja G/A split-site

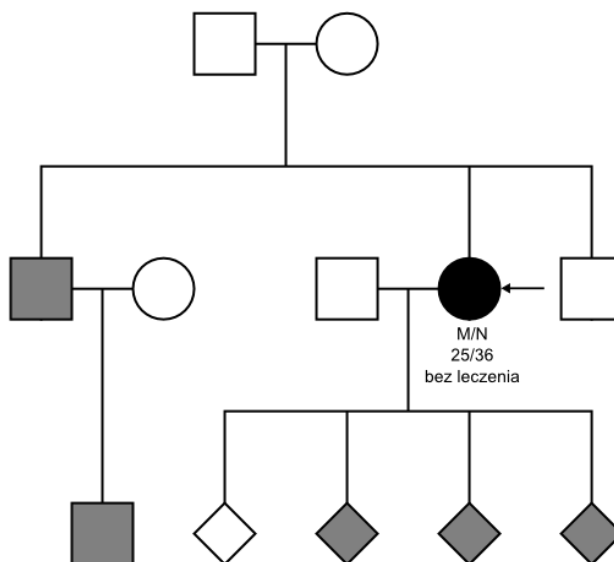


4.1.3.3. Rodzina M106 – mutacja G318R w genie GCK

Probantka w tej rodzinie została włączona do badania na podstawie charakterystycznego przebiegu klinicznego: cukrzycę rozpoznano u niej w młodym wieku (25 lat), a w ciągu 11 lat do momentu włączenia do projektu nie stwierdzono progresji hiperglikemii ani rozwoju przewlekłych powikłań choroby pomimo braku leczenia. Pacjentka charakteryzowała się niskim BMI (18,6 kg/m²), brakiem innych składowych zespołu metabolicznego oraz brakiem objawów klinicznych hiperglikemii. W wywiadzie rodzinnym zaburzenia gospodarki węglowodanowej stwierdzono u trójki spośród czwórki dzieci probantki, jej brata oraz syna brata, jednak pozostali członkowie rodziny nie zgłosili się do badań genetycznych. Na podstawie charakterystycznego obrazu klinicznego i wywiadu rodzinnego, ale przede wszystkim na podstawie dostępnego piśmiennictwa

opisu mutacji w innych populacjach przyjęto, że w niniejszej rodzinie przyczyną zaburzeń gospodarki węglowodanowej jest potwierdzona u probantki mutacja w genie GCK.

Rodzina M106 Mutacja G318R



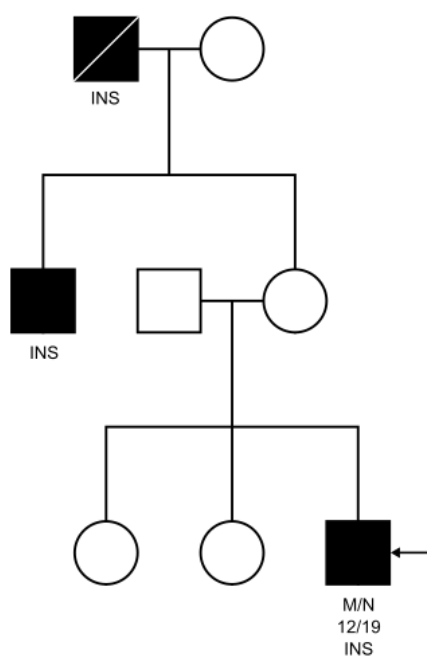
4.1.3.4. Rodzina M133 – mutacja V86G w genie GCK

U probanta cukrzycę rozpoznano w wieku 12 lat. Według jego relacji przy rozpoznaniu obecne były polidypsja, poliuria i utrata masy ciała, co wydaje się mało prawdopodobne, biorąc pod uwagę, że przez około rok w leczeniu cukrzycy stosowano dietę. Dokumentacja medyczna z okresu rozpoznania cukrzycy u probanta nie była dostępna. Po około roku wobec nieskuteczności postępowania dietetycznego u pacjenta włączono insulinoterapię, początkowo w modelu wielokrotnych wstrzyknięć, a następnie ciągły podskórny wlew insuliny przy pomocy pompy osobistej. Ten model leczenia charakteryzowało bardzo niewielkie zapotrzebowanie na insulinę (kilkanaście jednostek na dobę), a praktycznie cała dawka była podawana we wlewie podstawowym. W wywiadzie rodzinnym brat oraz ojciec matki chorowali na cukrzycę, początkowo obaj byli leczeni lekami doustnymi, a następnie insuliną. Z uwagi na obraz kliniczny cukrzycy, trzypokoleniowy wywiad rodzinny w kierunku cukrzycy, stosunkowo wysoki poziom c-peptydu u probanta - wynoszący 2,78 ng/ml - podjęto decyzję o odstawieniu insuliny i włączeniu

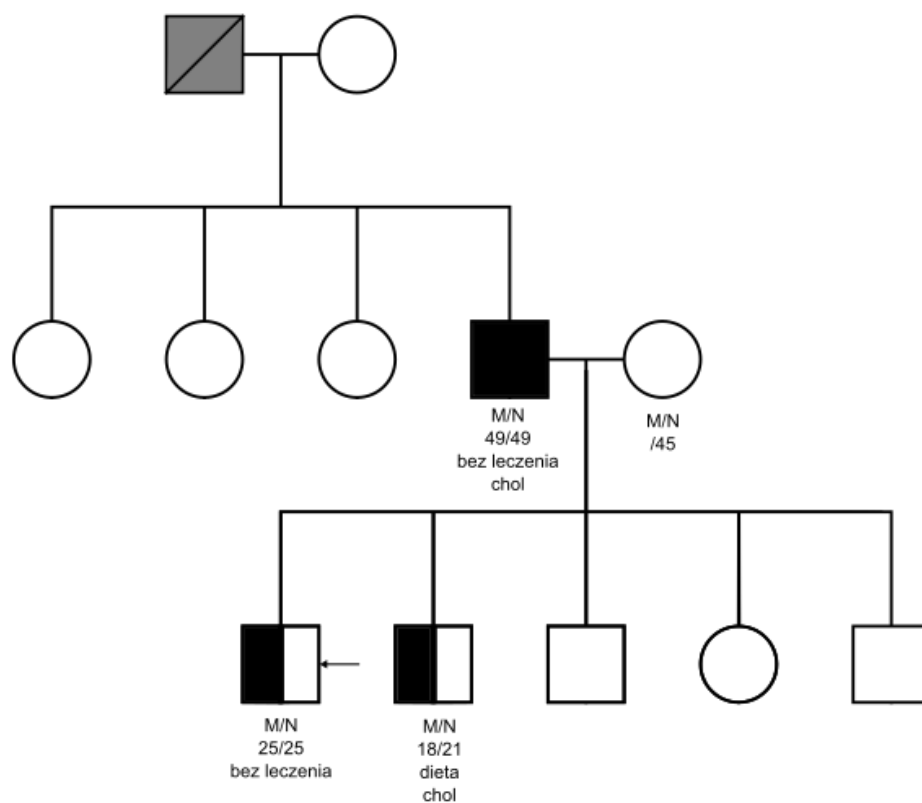
poходnej sulfonylomocznika. Uzyskano wyrównanie metaboliczne na poziomie normoglikemii, a chorego włączono do badania w kierunku cukrzycy monogenowej. Badanie DNA potwierdziło obecność heterozygotycznej mutacji w genie GCK. Pozostali członkowie rodziny nie byli dostępni do badania.

Rodzina M133

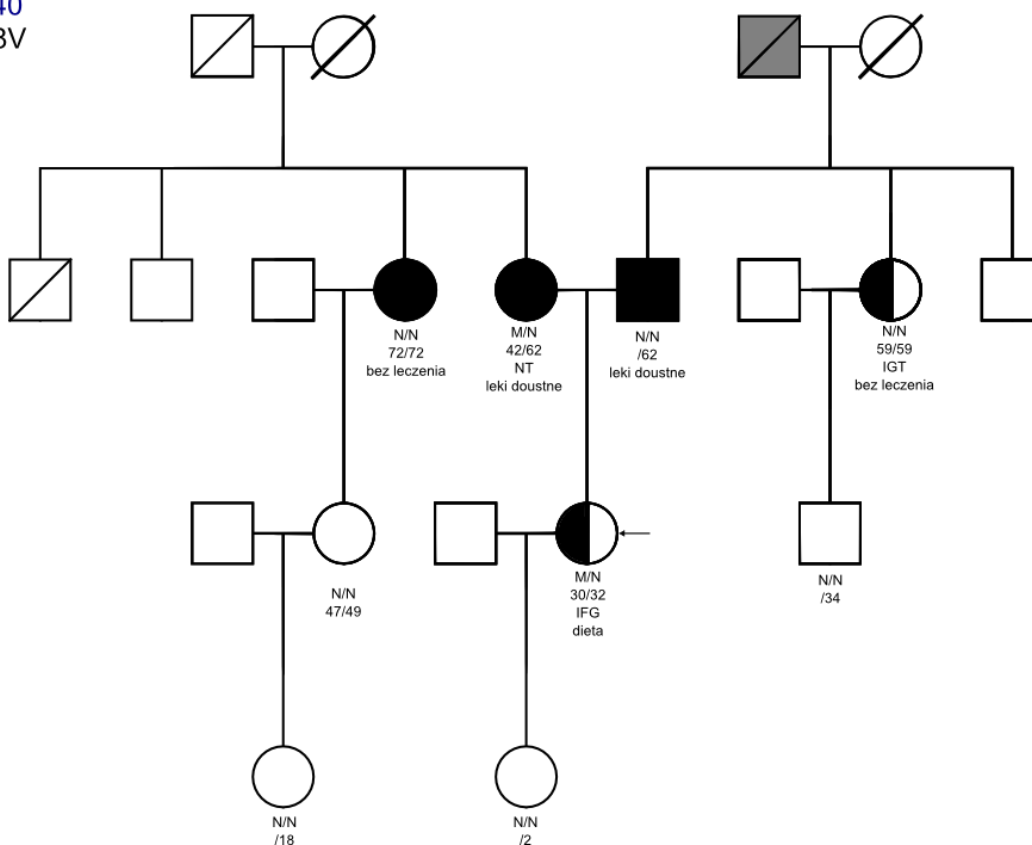
Mutacja V86G



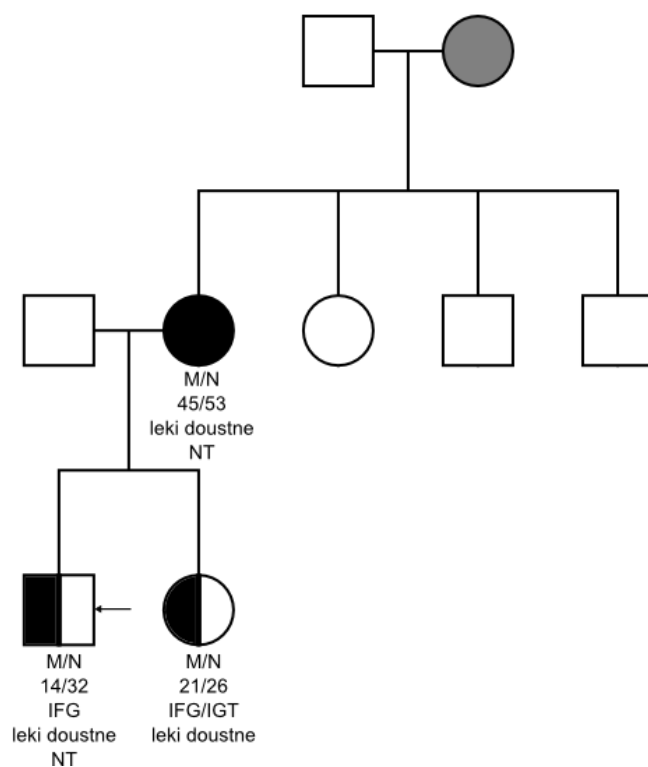
Rodzina M020
Mutacja G318R



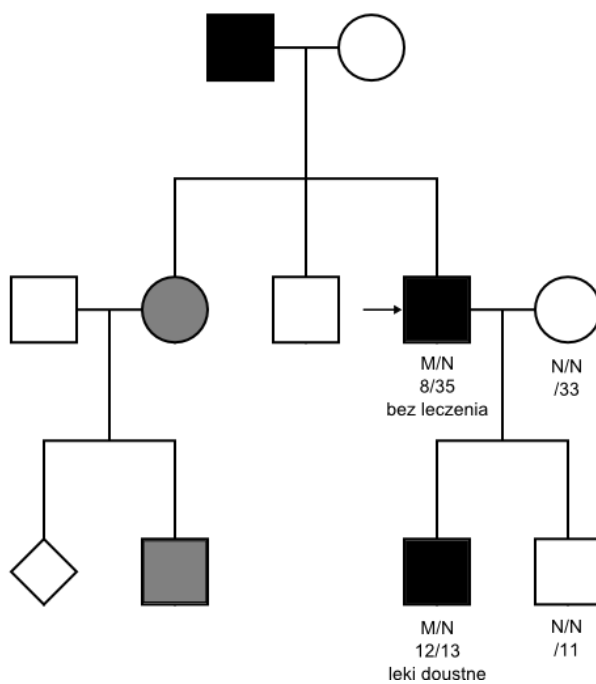
Rodzina M040
Mutacja D198V



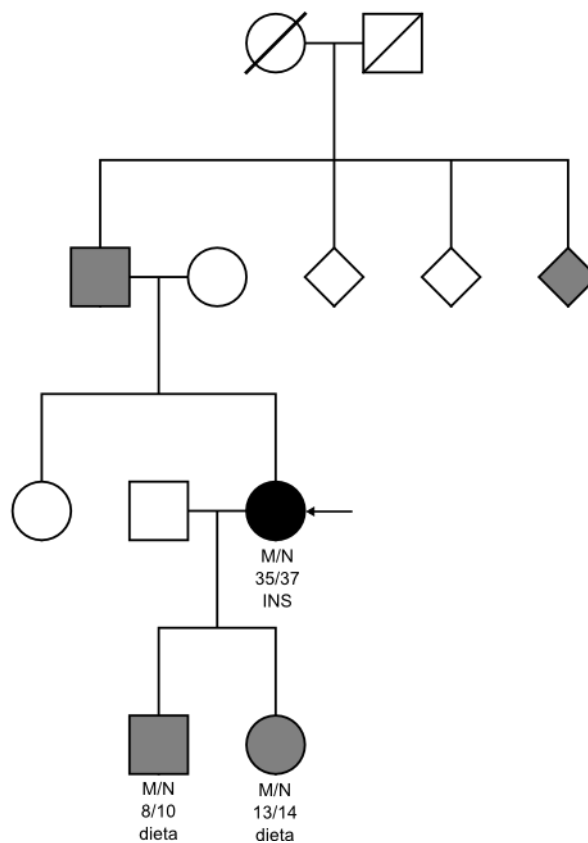
Rodzina M056
Mutacja G318R



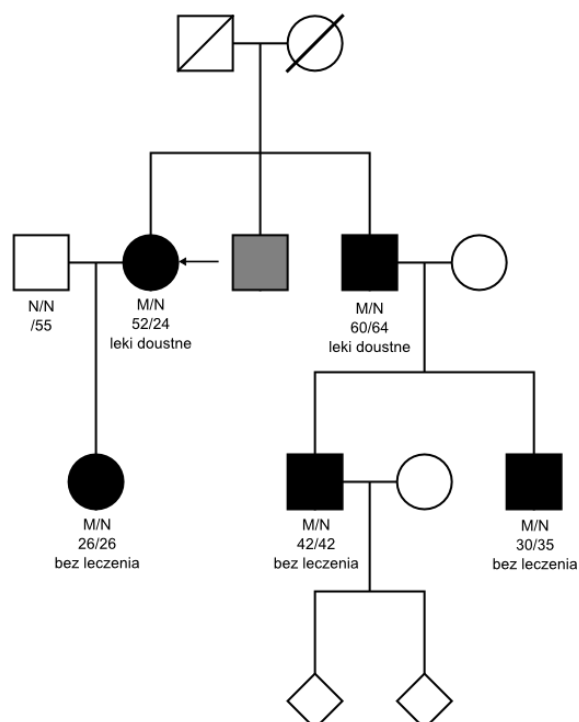
Rodzina M057
Mutacja A282del



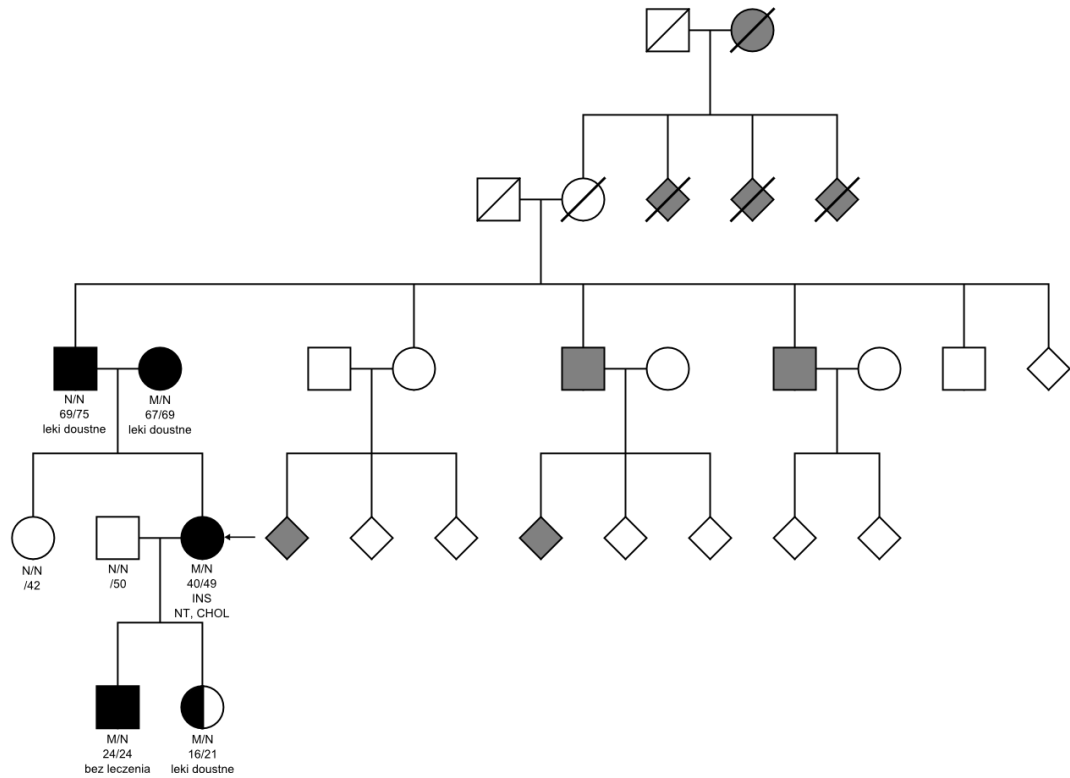
Rodzina M070
Mutacja F150del



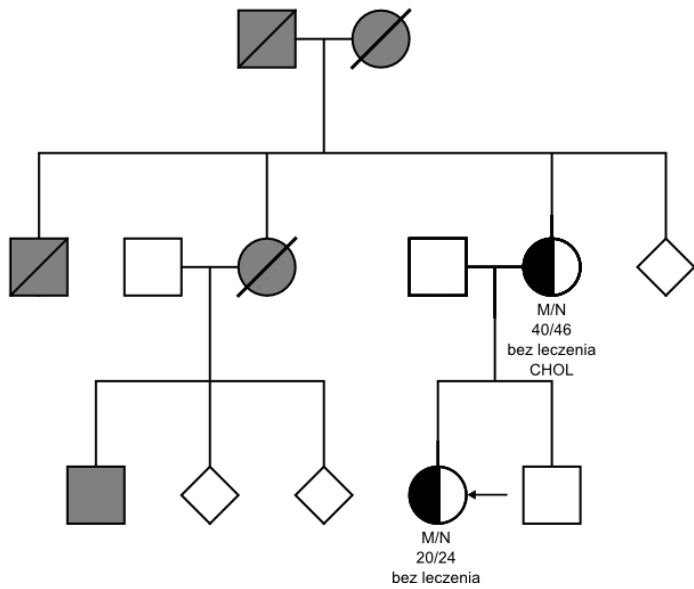
Rodzina M072
Mutacja T255N



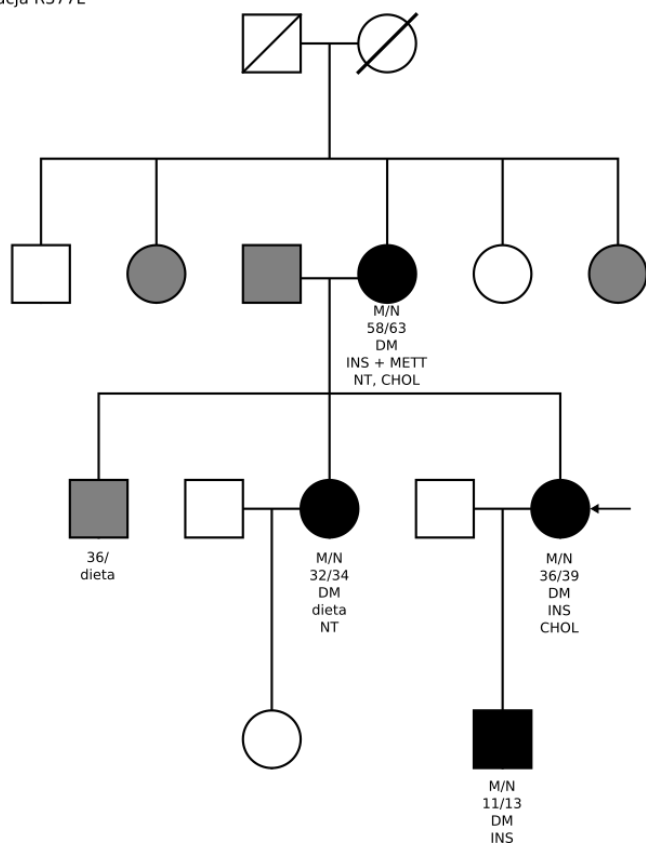
Rodzina M073
Mutacja G261R



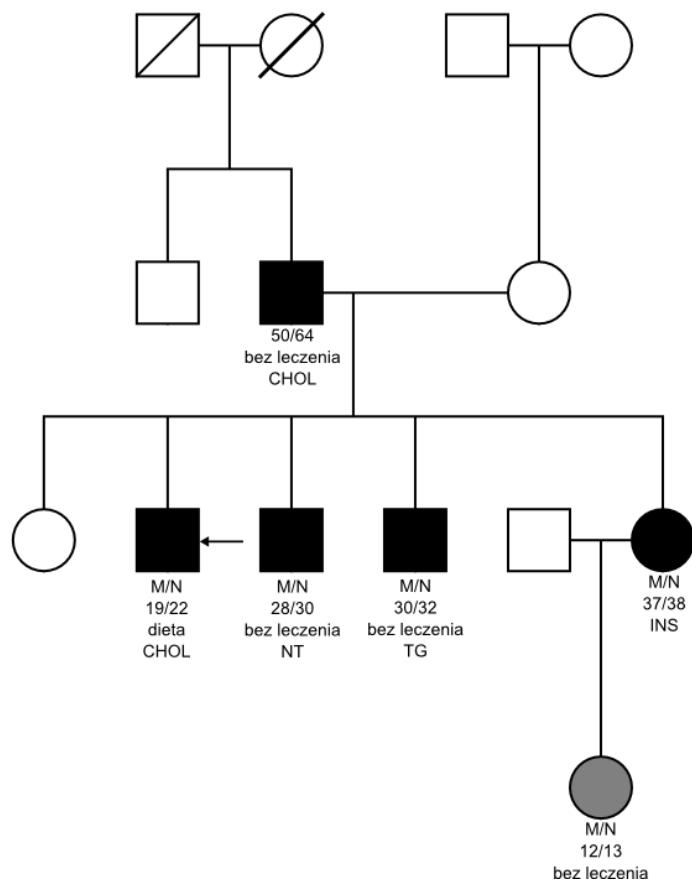
Rodzina M084
Mutacja G318R



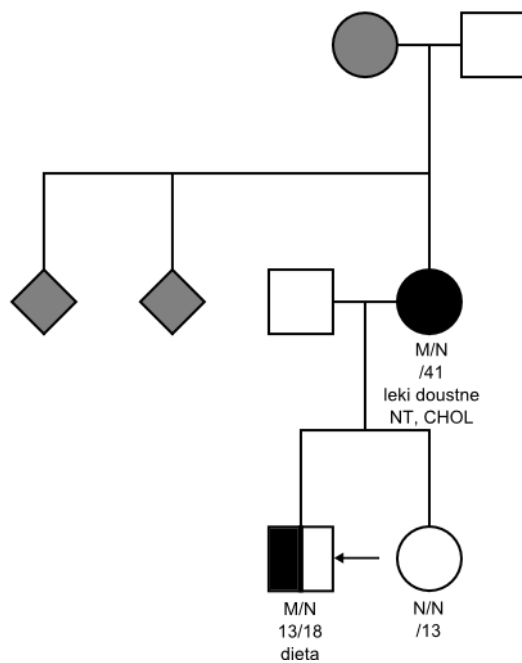
Rodzina M087
Mutacja R377L



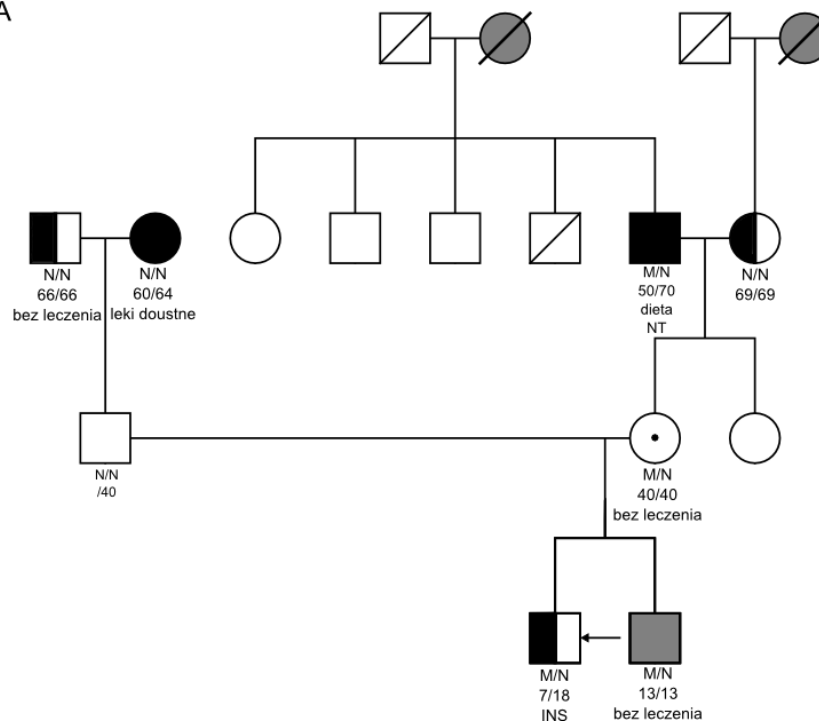
Rodzina M089
Mutacja L164V



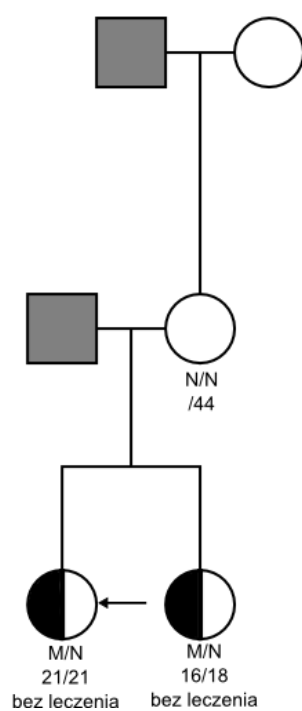
Rodzina M091
Mutacja I348N



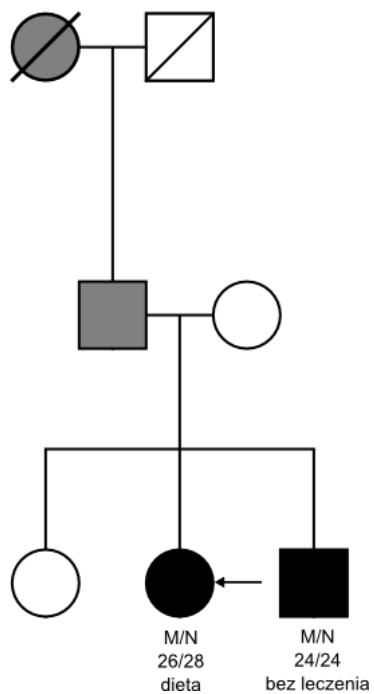
Rodzina M092
Mutacja V406A



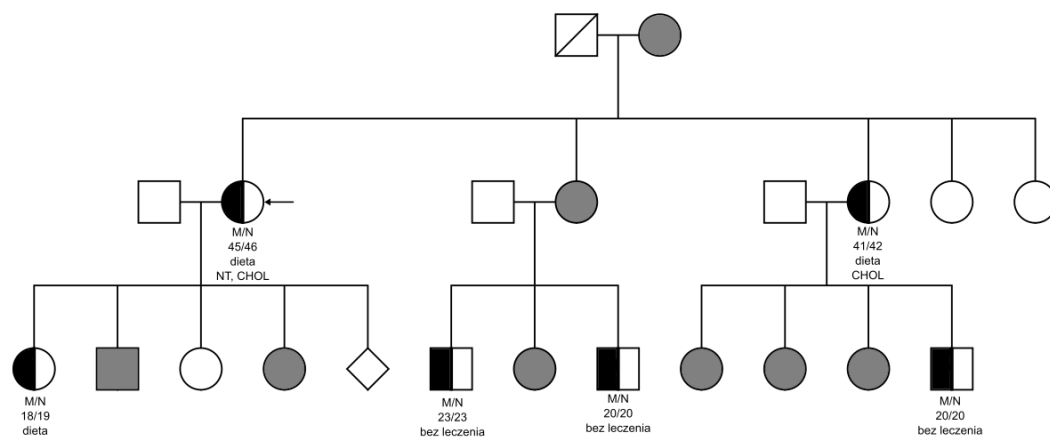
Rodzina M111
Mutacja V302L



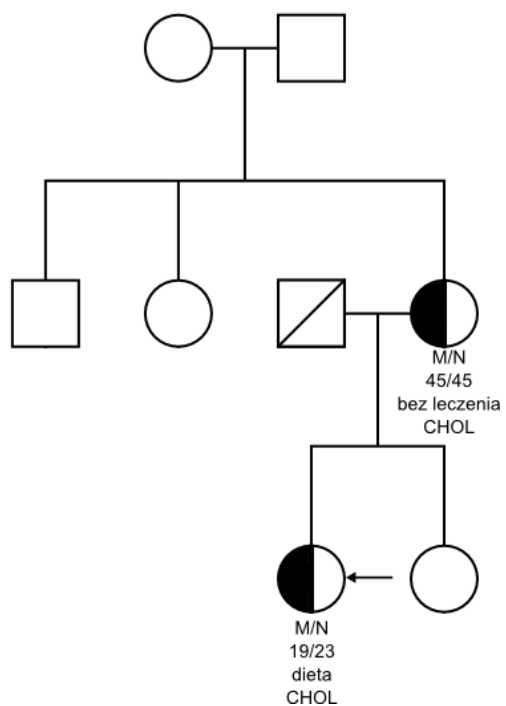
Rodzina M125
Mutacja S383L



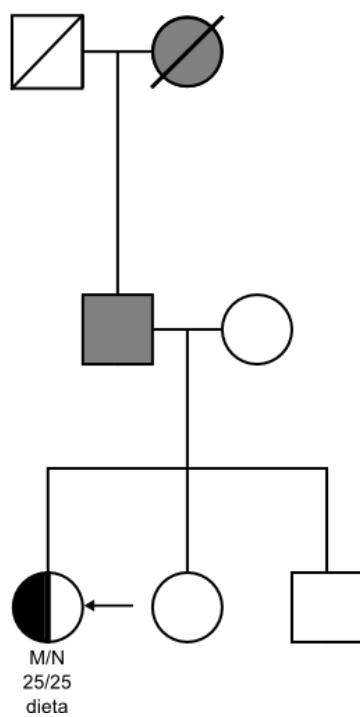
Rodzina M186
Mutacja V302L

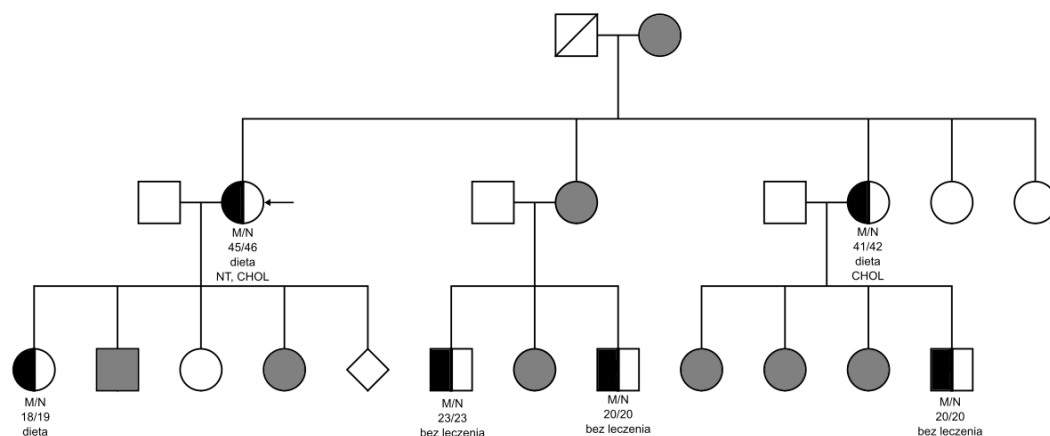


Rodzina M134
Mutacja V406A



Rodzina M173
Mutacja L315H





4.2. Charakterystyka kliniczna przebadanych nosicieli mutacji w genie GCK.

W trakcie niniejszego projektu zidentyfikowano 61 nosicieli mutacji w genie GCK, w tym 28 mężczyzn (46%) i 33 kobiety (54%). Średni wiek pacjentów wynosił 34 lata, zakres od 10 do 79 lat. Średni wiek rozpoznania zaburzeń gospodarki węglowodanowej wynosił 29,1 lat, a diagnoza stawiana była w różnym wieku, od 5 do 67 r.ż.:

- poniżej 10 r.ż. – 4 pacjentów,
- od 10 do <20 r.ż. – 15 pacjentów,
- od 20 do < 30 r.ż. – 15 pacjentów,
- od 30 do < 40 r.ż. – 9 pacjentów,
- od 40 do < 50 r.ż. – 11 pacjentów,
- ≥ 50 r.ż. – 7 osób.

U 14 osób diagnozę zaburzeń gospodarki węglowodanowej postawiono w ramach badania rodzin, w których wcześniej zidentyfikowano mutację w genie GCK. Jedna nosicielka patogenicznej mutacji w genie GCK nie rozwinęła żadnych zaburzeń gospodarki węglowodanowej, a wynik testu obciążenia 75 g glukozy był prawidłowy. Przed 30 rokiem życia diagnozę zaburzeń gospodarki węglowodanowej postawiono u 34 osób (55,7%).

Średni wiek rozpoznania zaburzeń gospodarki węglowodanowej w grupie najmłodszych nosicieli, przed 30 r. ż., wynosił 16,96 lat ($n=28$ osób, 47%). W grupie pacjentów badanych

między 30 a 49 r.ż. średni wiek diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej wynosił 33,52 lat ($n=21$; 35%), natomiast w grupie najstarszych nosicieli mutacji, ≥ 50 r.ż., liczącej 11 osób (18%), średni wiek rozpoznania zaburzeń gospodarki węglowodanowej wynosił 50,09 lat. Analiza wariancji wykazała, że różnice dotyczące wieku diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej pomiędzy tymi trzema grupami są istotne statystycznie: $p \leq 0,0001$. Czas od rozpoznania cukrzycy i stanu przedcukrzycowego do momentu włączenia do badania wynosił średnio 5,4 lat, od 0 do 28 lat. W grupie 61 nosicieli u 11 pacjentów (18%) od diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej minęło więcej niż 10 lat, w tym u 6 nosicieli (9,8%) od diagnozy cukrzycy minęło co najmniej 20 lat.

Analizując rodowody rodzin z mutacją w genie GCK włączonych do badania, w najmłodszym pokoleniu średni wiek nosicieli wynosił 21,7 lat ($n=30$, 50%). Wśród najmłodszych nosicieli średni wiek postawienia diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej wynosił 19 lat. W drugim pokoleniu, liczącym 22 nosicieli (36,7%) średni wiek nosicieli wynosił 40,2 lat, a rozpoznanie cukrzycy lub stanu przedcukrzycowego nastąpiło średnio w wieku 35,3 lat. W rodzinach GCK-MODY, w najstarszym pokoleniu ($n=8$, 13,3%) średni wiek nosicieli mutacji wynosił 64,4 lat, a średni wiek rozpoznania zaburzeń gospodarki węglowodanowej – 49,3 lat. Analiza wariancji wykazała, że różnice dotyczące wieku diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej pomiędzy tymi trzema grupami są istotne statystycznie: $p \leq 0,0001$. Z analizy wykluczono zdrową nosicielkę.

Do dalszych badań włączono osoby dorosłe, powyżej 18 roku życia. W tej grupie pomiar wzrostu i wagi ciała przeprowadzono u 51 osób. Średnie BMI wynosiło 23,6 kg/m², minimalnie 17 kg/m², maksymalnie 36,4 kg/m². BMI > 25 kg/m² stwierdzono u 16 osób (31,4%), w tym u 7 kobiet (21,2% grupy kobiet) i u 9 mężczyzn (32,1% grupy mężczyzn), a ponadto BMI > 30 kg/m² stwierdzono u 4 osób (7,8%) i były to kobiety. Pomiar obwodu talii i bioder przeprowadzono u 45 pacjentów, 18 mężczyzn i 27 kobiet. Średnio WHR wynosił 0,8, minimalnie 0,65, maksymalnie 1,05. WHR przekraczający 0,8 stwierdzono u 10 kobiet (37%). WHR $> 0,9$ stwierdzono u 4 spośród 18 mężczyzn (16,6%). Obwód pasa powyżej 80 cm stwierdzono również u 10 kobiet (37%), obwód pasa przekraczający 94 cm - u jednego mężczyzny (5,5%).

Lipidogram oznaczono u 45 osób. Rozpoznanie zaburzeń gospodarki lipidowej postawiono u 17 osób (38%), w tym u 15 – hipercholesterolemię, u jednej – hiperlipidemię mieszaną i również u jednej – hipertriglicydemię. W grupie osób z zaburzeniami gospodarki lipidowej 2 pacjentów w momencie włączenia do badania przyjmowało leki hipolipemizujące. Poziom cholesterolu całkowitego $> 4,5$ mmol/l stwierdzono u 23 osób (51,1%), w tym poziom cholesterolu całkowitego przekroczył 5,0 mmol/l u 15 osób (33,3%). Poziom cholesterolu LDL $> 2,6$ mmol/l stwierdzono u 19 nosicieli (42,2%), w tym u 12 osób wynosił on $> 3,0$ mmol/l (26,6%). Oznaczony poziom

triglicerydów przekroczył 1,7 mmol/l u 2 osób (4,4%). W grupie 18 mężczyzn poziom cholesterolu HDL poniżej 1,0 mmol/l stwierdzono u 3 (16,6%), a w grupie kobiet poziom cholesterolu HDL wynoszący < 1,3 stwierdzono u 1 spośród 27 kobiet (3,7%).

W badanej grupie nosicieli mutacji w genie GCK w wykonanych pomiarach średnie ciśnienie tętnicze skurczowe wynosiło 116,9 mmHg (minimalnie 80 mmHg, maksymalnie 160 mmHg), a średnie ciśnienie tętnicze rozkurczowe 72,37 mmHg (minimalnie 60 mmHg, maksymalnie 95 mmHg). W momencie włączenia do badania 15 pacjentów miało postawione rozpoznanie nadciśnienia tętniczego (25%), w tym 9 osób regularnie przyjmowało leki hipotensyjne. U 2 pacjentów (3,2%) rozpoznano chorobę niedokrwienną serca, w tym jedna osoba przeżyła zawał mięśnia sercowego.

Pośród nosicieli mutacji w genie GCK zmiany na dnie oczu w postaci cukrzycowej retinopatii nieproliferacyjnej stwierdzono w badaniu okulistycznym u 2 osób (3,3%), żadna z nich nie wymagała wykonania zabiegów laserokoagulacji naczyń siatkówki do momentu włączenia do badania. Jeden z tych pacjentów charakteryzował się długim, bo 28-letnim wywiadem cukrzycy klinicznie insulinozależnej, o gwałtownym początku, z kwasicą ketonową przy rozpoznaniu. Przypadek ten został oddzielnie omówiony powyżej (rodzina M003). Cukrzycową polineuropatię obwodową stwierdzono u 1 osoby (1,6%). Podwyższony wskaźnik ACR > 2,26 mg/mmol stwierdzono u 3 osób (7,5%) spośród 40, u których wykonano badanie moczu. Żaden z analizowanych nosicieli nie charakteryzował się obniżonym GFR.

Doustny test obciążenia 75 g glukozy wykonano u 32 osób spośród 61 nosicieli mutacji w genie GCK. U 25 nosicieli dostępna była dokumentacja medyczna, na podstawie której możliwe było postawienie diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej. U czwórki dzieci w wieku 10-14 lat brak było dokumentacji medycznej, odstąpiono również od wykonania OGTT. Na podstawie dokumentacji medycznej oraz oznaczeń glikemii przy pomocy glukometru u dzieci tych stwierdzono podwyższone poziomy glukozy na czczo. Łącznie u 57 nosicieli możliwe było postawienie następujących zaburzeń gospodarki węglowodanowej:

- cukrzycę rozpoznano u 35 osób,
- u 18 osób stwierdzono jedynie nieprawidłową glikemię na czczo,
- u 3 pacjentów stwierdzono zarówno nieprawidłową glikemię na czczo jak i
- nietolerancję glukozy,
- u jednej nosicielki mutacji w genie GCK nie stwierdzono żadnych zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Tak duża liczba pacjentów z rozpoznaniem jedynie stanu przedcukrzycowego (prediabetes), a zwłaszcza nieprawidłowej glikemii na czczo, jest cechą charakterystyczną mutacji w genie GCK. Należy przy tym zaznaczyć, że u członków jednej rodziny, nosicieli tej samej mutacji, obserwowano różny fenotyp, a więc stwierdzano różny stopień zaburzeń gospodarki węglowodanowej, od całkowicie prawidłowego wyniku testu obciążenia 75 g glukozy, przez prediabetes (nieprawidłowa glikemia na czczo, nietolerancja glukozy), do cukrzycy. Wymieniona powyżej kobieta bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej była jedyną nosicielką z prawidłową glikemią na czczo.

Tabela 10. Zaburzenia gospodarki węglowodanowej u 57 pacjentów z mutacją w genie glukokinazy.

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej	Liczba pacjentów	Odsetek (%)
Cukrzyca	35	61,4
Nieprawidłowa glikemia na czczo	18	31,6
Nieprawidłowa glikemia na czczo i nietolerancja glukozy	3	5,3
Brak	1	1,7

U większości chorych rozpoznanie stawiane było przypadkowo, w trakcie badań okresowych do pracy, rutynowych badań biochemicznych wykonywanych przez lekarza Podstawowej Opieki Zdrowotnej lub w ciąży. W trzech przypadkach, w dwóch rodzinach, rozpoznanie cukrzycy postawiono wśród typowych objawów hiperglikemii: polidypsji, poliurii, utraty masy ciała, z tego w dwóch przypadkach wystąpiła kwasica ketonowa. Te trzy przypadki odmienne od typowego przebiegu GCK-MODY zostały omówione powyżej (rodziny M003 oraz M133).

Spośród 35 pacjentów z rozpoznaną cukrzycą, w momencie włączenia do badania 11 leczonych było insuliną (31,4%), 8 – lekami doustnymi (22,9%), 6 osób – jedynie dietą (17,1%), a 10 pacjentów (28,6%) pozostawało bez jakiegokolwiek leczenia. W grupie chorych z rozpoznaną nieprawidłową glikemią na czczo (n=18) 2 osoby leczone były doustnymi lekami hipoglikemizującymi (11,1%), 7 osób leczonych było dietą (38,9%), a 9 osób pozostawało bez leczenia (50%). Wśród pacjentów z nieprawidłową glikemią na czczo i nietolerancją glukozy, n=3, jedna osoba stosowała doustne leki hipoglikemizujące (33,3%), a dwie osoby stosowały dietę (66,67%). U jednej osoby oznaczenia glikemii na czczo i w 120 minucie doustnego testu obciążenia 75 g glukozy były prawidłowe, a pacjentka ta nie stosowała żadnego leczenia. U pozostałych

członków tej rodziny stwierdzono zaburzenia gospodarki węglowodanowej w postaci cukrzycy, nieprawidłowej glikemii na czczo i nietolerancji glukozy (rodzina M092). Stosowanie insulinoterapii wynikało z pierwotnie postawionego, z uwagi na młody wiek chorych przy rozpoznaniu oraz brak innych składowych zespołu metabolicznego, rozpoznania cukrzycy typu 1. Z kolei stosowanie doustnych leków hipoglikemizujących było rezultatem błędnie postawionego rozpoznania cukrzycy typu 2, na którą mogła wskazywać niewielka hiperglikemia przy rozpoznaniu i brak jej typowych objawów klinicznych.

Odsetek HbA1c w grupie nosicieli mutacji w genie GCK oznaczono u 42 osób i wynosił on średnio 6,6%, minimalnie 5,4%, maksymalnie 8,4%. W grupie tej analizowano średni poziom HbA1c w zależności od sposobu leczenia (Tabela 9). Wśród nosicieli pozostających bez jakiegokolwiek leczenia średni odsetek HbA1c wynosił 6,58%. W grupie osób leczonych niefarmakologicznie, a więc stosujących dietę cukrzycową, średni odsetek HbA1c wynosił 6,68%. Wśród nosicieli mutacji w genie GCK stosujących farmakoterapię średni odsetek HbA1c wynosił 6,72% w grupie leczonych doustnymi lekami hipoglikemizującymi, a 6,51% w grupie stosujących insulinoterapię. W grupach tych średni odsetek HbA1c nie różnił się istotnie ($p=0,939$).

Tabela 11. Porównanie średniego odsetka HbA1c wśród nosicieli mutacji w genie GCK w zależności od sposobu leczenia. Z analizy wykluczono osoby z klinicznymi cechami cukrzycy typu 1.

SPOSÓB LECZENIA	LICZBA OSÓB	ŚREDNI ODSETEK HbA1c (%)	SD
Bez leczenia	16	6,5	0,91
Dieta cukrzycowa	13	6,6	0,62
Leki doustne	6	6,7	0,44
Insulinoterapia	7	6,5	0,35

W zaleceniach wielu towarzystw naukowych wartość HbA1c $\geq 6,5\%$ jest punktem odcięcia dla rozpoznania cukrzycy. W oparciu o pracę Steele i wsp. [112] przeprowadzono dodatkowo analizę poziomu HbA1c w badanej grupie nosicieli mutacji w genie GCK wg wartości zaproponowanych jako typowe dla GCK-MODY w określonych grupach wiekowych. Autorzy wyżej przytoczonego opracowania podjęli próbę określenia wartości HbA1c charakterystycznych dla GCK-MODY na podstawie jej oznaczenia u 123 nosicieli mutacji w genie GCK. Określili oni zakres wartości HbA1c dla pacjentów z GCK-MODY w zależności od wieku: ≤ 40 r.ż 5,6-7,3%, a > 40 r.ż – 5,9-7,6%. W przytoczonym opracowaniu przyjęto, że odsetek HbA1c wyższy niż dolna granica (5,6% dla osób w wieku ≤ 40 r.ż. i 5,9% dla osób > 40 r.ż.) może kwalifikować osoby z rodzin GCK-

MODY do badań molekularnych. Natomiast odsetek HbA1c wyższy niż przyjęta górna granica ($7,3\% \leq 40$ r.ż. i $7,6\% > 40$ r.ż.) sugeruje inny typ cukrzycy lub sytuację, w której u nosiciela mutacji w genie GCK, na skutek kumulacji innych czynników ryzyka, rozwinęła się cukrzyca typu 2 [112]. Stosując sugerowane kryteria wartości HbA1c w grupie scharakteryzowanych w niniejszej pracy doktorskiej pacjentów z GCK-MODY, wśród osób młodych ≤ 40 r.ż. tylko jedna nosicielka mutacji miała odsetek HbA1c 5,4%. Była to młoda, 24-letnia kobieta z prawidłowym BMI i nieprawidłową glikemią na czczo w doustnym teście obciążenia glukozą. Omawiana już powyżej zdrowa nosicielka, z prawidłowym wynikiem OGTT, w momencie włączenia do badania miała 40 lat i graniczny poziom HbA1c wynoszący 5,6%. Ponadto w grupie nosicieli u 4 osób w wieku 18-23 lata stwierdzono niski poziom HbA1c wynoszący 5,6-5,9% (średnio 5,7%). Wszystkie te osoby charakteryzowały się prawidłowym BMI i łagodnymi zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, w postaci nieprawidłowej glikemii na czczo stwierdzonej na podstawie OGTT. W grupie nosicieli > 40 r.ż. nie stwierdzono osób z poziomem HbA1c $< 5,9\%$. W grupie nosicieli mutacji w genie GCK u 2 osób > 40 r.ż. (70 i 49 lat) stwierdzono poziom HbA1c $> 7,6\%$ wynoszący odpowiednio 8,0% i 8,4%). Pierwszy mężczyzna miał nadwagę, drugi natomiast – prawidłowe BMI. Nie byli oni spokrewnieni ze sobą. W obu tych przypadkach można przypuszczać, że na skutek kumulacji innych czynników (wieku, nadwagi oraz być może czynników dziedzicznych), na typowy obraz GCK-MODY nałożyły się cechy cukrzycy typu 2. W grupie młodych nosicieli ≤ 40 r.ż. u czterech mężczyzn w wieku 21-32 lata stwierdzono podwyższony poziom HbA1c, od 7,4% do 8,2% (średnio 7,75%). Trzech z nich miało nieznacznie podwyższony wskaźnik BMI do maksymalnie 26,8 kg/m². W grupie nosicieli z poziomem HbA1c znacznie przekraczającym średnie wartości charakterystyczne dla GCK-MODY były osoby spokrewnione.

W grupie 42 nosicieli mutacji w genie GCK porównano osoby z rozpoznaną zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego cukrzycą z osobami ze stanem przedcukrzycowym (nieprawidłową glikemią na czczo lub/i nietolerancją glukozy) pod względem parametrów klinicznych i biochemicznych. Z analizy wykluczono zdrową nosicielkę bez stwierdzonych w doustnym teście obciążenia glukozą zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz nosicieli z kliniczną insulinozależnością. Porównano 21 osób z cukrzycą (12 kobiet, tj. 57% i 9 mężczyzn, tj. 43%) i 21 osób ze stanem przedcukrzycowym (13 kobiet, tj. 62% i 8 mężczyzn, tj. 38%). Grupy te różniły się sposobem leczenia. W grupie osób z cukrzycą 7 osób pozostawało bez leczenia, 4 osoby stosowały dietę, 10 osób było leczonych farmakologicznie, w tym 7 insulinoterapią, a 3 – doustnymi lekami hipoglikemizującymi. W grupie pacjentów ze stanem przedcukrzycowym 9 osób nie stosowało żadnego leczenia, również 9 osób stosowało dietę, a 3 osoby – doustne leki hipoglikemizujące. Żaden z pacjentów nie był leczony insulinoterapią. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy tymi dwoma grupami

przedstawiono w tabeli 10. Średni wskaźnik BMI, talia/biodro (WHR), HOMA-IR, ACR, obwód pasa oraz średni poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, HDL, triglicerydów, kreatyniny, c-peptydu nie różniły się istotnie pomiędzy dwoma grupami. Pacjenci z GCK-MODY i cukrzycą byli znacząco starsi od nosicieli ze stanem przedcukrzycowym (39,9 i 26,9 lat odpowiednio, $p=0,0031$). Stwierdzono istotne statystycznie różnice w średnim poziomie glikemii w 0 i 120 minucie doustnego testu obciążenia 75 g glukozy, co wynika z charakteru porównywanych grup – w grupie osób z rozpoznaną cukrzycą wartości te były wyższe. Również w grupie nosicieli mutacji w genie GCK z cukrzycą średni odsetek HbA1c był wyższy (6,9%) w porównaniu do grupy ze stanem przedcukrzycowym (6,3%). Natomiast rozpoznanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej wśród pacjentów z cukrzycą nastąpiło istotnie później, średnio w wieku 34,4 lat, w porównaniu do nosicieli ze stanem przedcukrzycowym – średnio w wieku 22,9 lat. W grupie pacjentów z GCK-MODY i cukrzycą stwierdzono również istotnie wyższe skurczowe ciśnienie tętnicze (średnio 123 mmHg) w porównaniu do nosicieli z nieprawidłową glikemią na czczo lub/i nieprawidłową tolerancją glukozy (średnio 112,5 mmHg).

Tabela 12. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych nosicieli mutacji w genie GCK z cukrzycą i ze stanem przedcukrzycowym.

PARAMETR	IFG/IGT (n=21)	CUKRZYCA (n=21)	Wartość p
Płeć:			1,0
- kobiety	13	12	
- mężczyźni	8	9	
Sposób leczenia:			0,02
- bez leczenia	9	7	
- dieta	9	4	
- leki doustne	3	3	
- insulina	0	7	
Wiek w chwili badania [lata]	26,9 (9,7)	39,9 (15,6)	<0,001
Wiek rozpoznania [lata]	22,9 (11,4)	34,4 (13,1)	0,001
BMI [kg/m ²]	23,4 (3,9)	23,6 (4,5)	0,87
WHR	0,80 (0,06)	0,82 (0,09)	0,34
Obwód pasa [cm]	77,8 (10,71)	79,71 (12,78)	0,60
Ciśnienie tętnicze skurczowe [mmHg]	112,5 (9,6)	123 (15,8)	0,05
Ciśnienie tętnicze rozkurczowe [mmHg]	70,2 (6,0)	75,9 (9,4)	0,07
Glikemia w 0 min OGTT [mmol/l]	6,3 (0,3)	7,1 (0,8)	<0,001
Glikemia w 120 min OGTT [mmol/l]	6,9 (1,3)	10,9 (3,0)	<0,001
c-peptyd na czczo [ng/ml]	1,76 (0,39)	1,63 (0,74)	0,83
HbA1c [%]	6,3 (0,6)	6,9 (0,7)	<0,001
Kreatynina [μmol/l]	65,5 (9,3)	65,0 (12,8)	0,88
Cholesterol całkowity [mmol/l]	4,5 (0,9)	4,8 (0,9)	0,30
Cholesterol LDL [mmol/l]	2,5 (0,8)	2,7 (0,7)	0,48
Cholesterol HDL [mmol/l]	1,6 (0,3)	1,6 (0,5)	0,84
Triglicerydy [mmol/l]	0,7 (0,2)	1,1 (0,6)	0,08
HOMA-IR	1,1 (0,4)	1,2 (0,6)	0,97
Wskaźnik ACR [mg/mmol]	0,98 (0,93)	1,3 (1,6)	0,28

Płeć i sposób leczenia podano jako wartości bezwzględne, pozostałe wartości są wyliczoną średnią, w nawiasach podano wartość odchylenia standardowego. Z analizy lipidogramu wykluczono osoby przyjmujące statynę lub fibrat.

Spośród 61 nosicieli mutacji w genie GCK do analizy porównawczej parametrów klinicznych i biochemicznych włączono 42 osoby powyżej 18 r.ż. Grupę tą porównano z grupą kontrolną zdrowych ochotników, bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej, dobranych pod względem płci, wieku i BMI w stosunku 1:1. Wyniki tej analizy podsumowano w tabeli 11.

W doustnym teście obciążenia 75 g glukozy (OGTT) zarówno poziom glukozy na czczo, w 120 minucie testu, jak i przyrost glikemii był istotnie wyższy w grupie nosicieli mutacji w genie GCK w porównaniu do zdrowych osób. Znamienne statystycznie różnice ($p \leq 0,0001$) w średnich stężeniach glukozy oraz w średnim przyroście glikemii w trakcie OGTT ($p = 0,0011$) były oczywiste, zważywszy, iż porównywano osoby z prawidłową glikemią i grupę, którą stanowiły osoby z cukrzycą lub stanem przedcukrzycowym. Natomiast poziom insuliny w 0 i 120 minucie testu oraz przyrost insulinemii nie różniły się istotnie pomiędzy grupą nosicieli i osób zdrowych. Świadczy to o zachowanym, prawidłowym wydzielaniu insuliny w odpowiedzi na bodziec hiperglikemiczny u pacjentów z GCK-MODY.

Porównanie 42 nosicieli mutacji genu GCK z grupą kontrolną zdrowych osób wykazało znamienne statystycznie różnice w poziomie c-peptydu na czczo oraz HDL-cholesterolu. Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic pomiędzy średnimi poziomami pozostałych parametrów gospodarki lipidowej. Chociaż średni poziom cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL był nieznacznie niższy w grupie GCK-MODY (4,7 mmol/l i 2,6 mmol/l odpowiednio) niż w grupie osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (4,8 mmol/l i 2,9 mmol/l odpowiednio), to jednak te różnice nie były znamienne statystycznie ($p = 0,63$ i $p = 0,13$). Średni poziom triglicerydów w grupie nosicieli mutacji w genie GCK wynosił 0,9 mmol/l i nie różnił się istotnie od średniego poziomu triglicerydów w grupie kontrolnej – 1,2 mmol/l ($p = 0,12$). Z analizy wykluczono osoby przyjmujące leczenie hipolipemizujące. Poziom c-peptydu w grupie GCK-MODY wynosił średnio 1,7 ng/ml i był niższy niż w grupie kontrolnej ($p = 0,03$), w której wynosił 2,4 ng/ml ($p = 0,03$). Na podstawie poziomu glukozy oraz insuliny na czczo wyliczono wskaźnik insulinowrażliwości HOMA-IR, który w grupie nosicieli mutacji w genie GCK ($n = 37$) wynosił średnio 1,16, a w grupie kontrolnej osób zdrowych, bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej ($n = 32$) – 0,97. Różnica pomiędzy grupami była istotna statystycznie ($p = 0,03$).

Tabela 13. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych nosicieli mutacji w genie GCK z grupą zdrowych ochotników bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Analizowana zmienna	GCK-MODY	Kontrole	Wartość p
Płeć (mężczyźni/kobiety)	16/26	16/26	1,00
Wiek w momencie badania	34,0	34,6	0,60
BMI [kg/m ²]	23,6	24,9	0,09
Glikemia na czczo (OGTT 0 min) [mmol/l]	6,6	4,5	<0,001
Glikemia 2 godz (OGTT 120 min) [mmol/l]	8,6	4,5	<0,001
Przyrost glikemii [mmol/l] pomiędzy 0 a 120 min OGTT	2,0	0,1	<0,001
Insulina 0 min [μIU/ml]	7,4	7,3	0,47
Insulina 120 min [μIU/ml]	28,7	23,3	0,08
Przyrost insulinemii w OGTT [μIU/ml]	21,6	16,9	0,09
Cholesterol całkowity [mmol/l]	4,7	4,8	0,63
Cholesterol LDL [mmol/l]	2,6	2,9	0,13
Cholesterol HDL [mmol/l]	1,6	1,4	0,01
Trójglicerydy [mmol/l]	0,9	1,2	0,12
Peptyd C na czczo [ng/ml]	1,7	2,4	0,03
HOMA-IR	1,16	0,97	0,04

Wśród nosicieli mutacji w genie GCK 15 pacjentów miało rozpoznane nadciśnienie tętnicze, w tym 9 osób w momencie włączenia do badania regularnie przyjmowała leki hipotensyjne. W grupie osób zdrowych 3 osoby miały rozpoznane i leczone nadciśnienie tętnicze. Zarówno wśród pacjentów z mutacją GCK, jak i w grupie kontroli, u 2 osób rozpoznano chorobę niedokrwienną serca. Jedna osoba w grupie nosicieli mutacji w genie GCK i jedna osoba w grupie osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej przybyła zawał mięśnia sercowego.

4.3. Ocena wpływu diagnozy molekularnej GCK-MODY na postępowanie terapeutyczne, obraz kliniczny i wyrównanie metaboliczne.

Każdy z nosicieli mutacji w genie GCK, zgodnie z rutynową praktyką kliniczną, otrzymał wynik badania genetycznego wraz z pisemną i ustną informacją na temat charakteru mutacji oraz rokowania, a następnie pozostawał pod opieką lekarza prowadzącego. Po upływie minimum 6 miesięcy przeanalizowano ponownie dane medyczne pacjentów, celem oceny wpływu diagnozy molekularnej na postępowanie terapeutyczne, stopień wyrównania metabolicznego, masę ciała i inne parametry kliniczne. Spośród 61 nosicieli mutacji w genie GCK dane dostępne były u 53 osób, po średnio 3,8 latach od przeprowadzenia badania genetycznego (od 6 miesięcy do 6 lat). W tej grupie pod kontrolą specjalistycznej poradni diabetologicznej pozostawało 15 osób, pozostali korzystali z opieki lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Z analizy wyłączono chorych z klinicznymi cechami cukrzycy typu 1. W grupie 53 osób w okresie ostatnich 6 miesięcy poziom HbA_{1c} był kontrolowany u 19 pacjentów. Średni poziom HbA_{1c} w tej grupie wynosił 6,5% (minimalnie 5,7%, maksymalnie 7,2%) i nie zmienił się po postawieniu diagnozy molekularnej. Analizowano również aktualną masę ciała oraz sposób leczenia cukrzycy. Po średnio 4 latach obserwacji BMI w badanej grupie wzrosło do 24,2 kg/m², ale był to wzrost nieznamienny statystycznie. Żaden z pacjentów (poza dwójką pacjentów z kliniczną insulinozależnością i współistniejącą mutacją w genie GCK) nie był leczony insuliną. Cechy kliniczne oraz sposób leczenia w badanej grupie pacjentów z GCK-MODY przy włączeniu do badania oraz po okresie obserwacji przedstawia poniższa tabela.

Badanie miało charakter obserwacyjny i oparte było głównie na analizie dokumentacji medycznej nosicieli mutacji w genie GCK.

Tabela 14. Porównanie niektórych parametrów klinicznych oraz biochemicznych oraz sposobu leczenia w grupie pacjentów z GCK-MODY przy włączeniu do projektu oraz przy ponownym badaniu.

Parametr	Włączenie do badania (61 nosicieli)	Po okresie obserwacji (53 nosicieli)	P
BMI [kg/m ²]	23,6 [SD 4,5]	24,2 [SD 5,2]	0,384
HbA _{1c} [%]	6,6 [SD 0,7]	6,59 [SD 0,4]	0,805
Sposób leczenia			
Insulina	9 [15,3%]	0	<0,001
Leki doustne	11 [18,6%]	8 [15,1%]	<0,001
Wyłącznie dieta	17 [28,8%]	24 [45,3%]	<0,001
Bez leczenia	22 [37,3%]	21 [39,6%]	0,614

5. DYSKUSJA

Badania w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej składały się z kilku części. Po pierwsze obejmowały rekrutację rodzin z autosomalną dominującą cukrzycą o wczesnym początku do badań genetycznych w kierunku GCK-MODY. Kolejnym elementem projektu było poszukiwanie i charakterystyka mutacji w genie GCK u probantów rodzin włączonych do badania oraz analiza segregacji mutacji w rodzinach z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. Następnym etapem było opracowanie charakterystyki klinicznej nosicieli mutacji oraz porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych w grupie nosicieli mutacji w genie GCK z grupą osób zdrowych. Ostatnim etapem pracy była ocena wpływu postawienia diagnozy molekularnej GCK-MODY na sposób leczenia i wyrównanie metaboliczne osób włączonych do badania.

MODY jest stosunkowo rzadką formą cukrzycy, ostatnie badania sugerują, że jej częstość nie przekracza 1-2% wszystkich pacjentów z cukrzycą [100]. GCK-MODY i HNF1A-MODY reprezentują najczęstsze typy MODY w Europie. Częstość cukrzycy GCK-MODY wśród wszystkich pacjentów MODY różni się w zależności od rejonu geograficznego i przyjętych kryteriów włączenia do badań genetycznych: od 46-56% we Francji [72, 101], 41-63,4% we Włoszech [96; 97], 25-41% w Hiszpanii [92, 102], 31% w Republice Czech [88], do 11-20% w Wielkiej Brytanii [103], 10% w Danii [104], 8% w Niemczech [105], i wreszcie 3,5% w Skandynawii [106]. W te światowe dane wpisuje się odsetek rodzin z GCK-MODY w Małopolskim Zbiorze Rodzin MODY, w którym spośród 84 potwierdzonych badaniem molekularnym przypadków MODY, cukrzyca związana z mutacją w genie GCK stanowi 50% (42 rodziny). Częstość GCK-MODY może być niedoszacowana, z uwagi na łagodną hiperglikemię i często bezobjawowy przebieg u nosicieli mutacji. W większości wspomnianych powyżej badań publikowanych w literaturze światowej stosowano podobne do przyjętych w niniejszej pracy kryteria kwalifikacji pacjentów lub rodzin do badań genetycznych.

Natomiast w badaniu jordańskim kwalifikowano pacjentów do badań genetycznych w kierunku GCK-MODY na podstawie wczesnego wieku zachorowania <25 r. ż., obecności łagodnej hiperglikemii, ujemnych markerów immunologicznych oraz dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy w co najmniej dwóch następujących po sobie pokoleniach. Jednak w tym badaniu aż 30% nosicieli mutacji w genie GCK miało ujemny wywiad rodzinny w kierunku zaburzeń gospodarki węglowodanowej [107]. W tym badaniu 100 pacjentów podejrzanych o GCK-MODY na podstawie obrazu klinicznego oraz 150 osób z grupy kontrolnej, bez wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy przebadano pod kątem obecności następujących mutacji w genie GCK: 682A>T, p.T228A, 895G>C, 1148C>A oraz p.S383X. Mutacji tych, opisanych w populacji kaukaskiej, nie stwierdzono w populacji jordańskiej, ani wśród osób podejrzanych o GCK-MODY, ani w grupie

zdrowych kontroli. W badaniu chilijskim do diagnostyki molekularnej w kierunku cukrzycy MODY zakwalifikowano dzieci z łagodną hiperglikemią, trzypokoleniowym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy oraz ujemnymi markerami immunologicznymi [108]. Spośród 14 przebadanych dzieci, u 7 (50%) potwierdzono obecność mutacji w genie GCK [108].

W niniejszej pracy, ze względu na ograniczenia organizacyjne i finansowe, nie stosowano kryterium ujemnych markerów immunologicznych. Jednak w nielicznych przypadkach ujemny wynik badania w kierunku przeciwciał anty-GAD i/lub przeciwciał przeciwwyspowych był dostępny (dane nie pokazane, wynik ujemnych przeciwciał anty-GAD uzyskano u 8 probantów), co znacznie ułatwiało decyzję o przeprowadzeniu badania genetycznego, zwłaszcza, gdy warunek wielopokoleniowego wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy nie był spełniony. W przypadku większości rodzin zastosowano kryterium trzypokoleniowego wywiadu rodzinnego w kierunku zaburzeń gospodarki węglowodanowej, jednak 5 rodzin zakwalifikowano do przeprowadzenia diagnostyki molekularnej w przypadku jedynie dwupokoleniowego wywiadu i charakterystycznego obrazu klinicznego u młodych probantów.

Innym ważnym aspektem niniejszego badania była charakterystyka mutacji w genie GCK i jej związek z rozwojem cukrzycy monogenowej w populacji Małopolski. Chociaż ze względów organizacyjnych badane rodziny pochodziły z regionu Polski Południowo-Wschodniej, głównie Małopolski, to jednak z uwagi na jednorodność etniczną i genetyczną kraju, rezultaty przedstawione w niniejszej pracy można odnieść do populacji polskiej. Podsumowując wyniki dotyczące rodzaju i umiejscowienia poszczególnych mutacji w odniesieniu do poszczególnych egzonów genu, większość znalezionych różnic sekwencji była mutacjami zmiany sensu polegającymi na podstawieniu jednego aminokwasu przez inny. Taki charakter mutacji obecny był w 36 rodzinach. W dwóch rodzinach znaleziono delecje z zachowaną ramką odczytu, również w dwóch przypadkach - mutacje prowadzące do zmiany miejsca składania egzonów (splicing-site), oraz w pojedynczych rodzinach: mutację regionu promotorowego genu GCK i mutację nonsensowną. Najczęstszą mutacją zmiany sensu, znalezioną w 9 niespokrewnionych ze sobą rodzinach, była mutacja G318R. W przypadku tej mutacji możemy mieć do czynienia z efektem założyciela. Większość znalezionych mutacji zostało opisanych w innych populacjach i wszystkie, poza mutacjami punktowymi D198V, D158Y i R36W znajdowały się w konserwatywnych rejonach genu GCK. Znalezione mutacje najczęściej lokalizowały się w egzonie 7, 8 i 9 genu GCK. Za patogennym charakterem mutacji przemawia ich segregacja z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej w rodzinach, w których zostały stwierdzone, opisy innych populacji i badania funkcjonalne zmienionego białka oraz konserwatywność miejsc aminokwasowych, których dotyczą. Ta duża częstość mutacji zmiany sensu i ich zdecydowana przewaga nad innymi

rodzajami mutacji w genie GCK w populacji Małopolski jest podobna do opisów innych populacji z różnych rejonów geograficznych [94].

Analizując rolę poszczególnych mutacji genu GCK w powstawaniu fenotypu cukrzycy MODY warto zastanowić się nad argumentami przemawiającymi za patogennym charakterem opisywanych zmian sekwencji genu. W tego typu analizach bierze się pod uwagę kilka dowodów naukowych. Pierwszym z nich jest segregacja mutacji z fenotypem choroby, np. GCK-MODY, w badanych rodzinach. Po drugie bada się, czy występuje ona w dużej grupie niespokrewnionych osób bez cukrzycy czy innych zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Ponadto ważnym argumentem jest analiza konserwatywności rejonów zmian, stopnia ingerencji w strukturę aminokwasową białka czy też sekwencję promotora. Pożądanym jest także, aby ocenić w badaniach funkcjonalnych znaczenie biologiczne mutacji. Ten ostatni punkt jest realizowany tylko w niektórych badaniach i nie ma charakteru rutynowego. Oczywistymi argumentami przemawiającymi za przyczynową rolą mutacji w powstawaniu danego fenotypu jest jej segregacja z chorobą w rodzinie, w tym przypadku z GCK-MODY, niewystępowanie w grupie kontrolnej, zmiana konserwatywnego aminokwasu oraz upośledzenie funkcji białka powstającego w jej wyniku.

Przystępując do analizy poszczególnych mutacji należy zauważyć, że większość została opisana i uprzednio prowadzone badania dostarczyły dowodów na ich patogenną rolę w powstawaniu fenotypu GCK-MODY u ludzi. W niniejszej pracy doktorskiej 5 znalezionych wariantów genetycznych jest wariantami nowymi, dotychczas nie opisanymi w piśmiennictwie. Są to 4 mutacje zmiany sensu: L164V, V86G, D158Y, F438S oraz jedna delecja z zachowaną ramką odczytu: A282del. O ich patogenności może świadczyć konserwatywność regionu, którego dotyczą oraz analiza zmienionego białka przeprowadzona przy pomocy programów Poly-Phen2 i SIFT, która może dowodzić, że produkt zmutowanego genu ma upośledzoną funkcję, a tym samym jest przyczyną charakterystycznego fenotypu cukrzycy monogenowej GCK-MODY.

Na szczególną uwagę zasługuje mutacja zmiany sensu G261R, opisana w niniejszym materiale w jednej małopolskiej rodzinie i potwierdzona u czterech jej członków: u probantki, jej ojca i dwójki jej dzieci (rodzina M073). Probantka w momencie włączenia do badania miała rozpoznaną cukrzycę przed 9 laty, leczona była insuliną w dawne ok. 38 j/d. Po postawieniu diagnozy molekularnej GCK-MODY odstawiono insulinę i włączono leczenie dietetyczne. Po zabiegu operacyjnym z powodu urazowego złamania kości udowej doszło do pogorszenia wyrównania metabolicznego i koniecznym stało się włączenie farmakoterapii, początkowo pochodną sulfonilomocznika, którą następnie skojarzono z inhibitorem DPP4. Ojciec probantki w momencie postawienia diagnozy molekularnej wymagał stosowania doustnych leków hipoglikemizujących. U syna probantki na podstawie doustnego testu obciążenia glukozą

rozpoznano cukrzycę, a u młodszej córki – nieprawidłową glikemię na czczo. W doustnym teście obciążenia glukozą u żadnego z wymienionych nosicieli przyrost glikemii nie przekroczył 3 mmol/l. Syn pozostawał bez jakiegokolwiek leczenia, a córka stosowała metforminę. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że matka probantki miała również rozpoznaną cukrzycę typu 2 (stanowiła fenokopię w rodzinie) i inne dziedziczne czynniki mogły mieć wpływ na cięższy obraz kliniczny GCK-MODY u opisywanej pacjentki. Jednak opisy rodzin z innych populacji z tą samą mutacją wskazują, że sam charakter mutacji może mieć istotne znaczenie dla przebiegu klinicznego choroby. Fińska rodzina z tą samą mutacją charakteryzowała się zróżnicowanym fenotypem u poszczególnych jej członków, również z obrazem cukrzycy zdiagnozowanej w okresie noworodkowym, z istotnym, przekraczającym 3 mmol/l przyrostem glikemii w 2 godzinie testu obciążenia glukozą i znaczną hiperglikemią wymagająca w wielu przypadkach farmakoterapii [91]. Heterozygotyczna mutacja zmiany sensu polega na substytucji glicyny arginina w residue 261 w egzonie 7 genu GCK. Badania funkcjonalne GCK-G261R wykazały zmniejszone powinowactwo do glukozy i Mg-ATP zmutowanego enzymu oraz jego obniżoną aktywność. Mutacja G261R wydaje się prowadzić do relatywnie ciężkiego fenotypu GCK-MODY, bardziej zbliżonego obrazem klinicznym do HNF1A-MODY. W fińskiej rodzinie, pomimo, że większość jej członków była dobrze kontrolowana dietą, to doświadczali oni istotnej hiperglikemii poposiłkowej, gdy spożywali posiłki bogate w węglowodany, co skutkowało nawet glukozurią. Mutacja charakteryzuje się również pewnego stopnia insulinoopornością, pomimo prawidłowego BMI nosicieli, wynikającą z wpływu mutacji na wątrobowy metabolizm glukozy. Ten cięższy przebieg GCK-MODY uwarunkowanej mutacją G261R tłumaczą badania strukturalne zmienionego białka. Gly261 zlokalizowana jest w pętli łączącej β -harmonijkę i helisę $\alpha 6$ dużej domeny enzymu. Mutacja zmiany sensu G261R ma tak znaczący wpływ na funkcję glukokinazy, ponieważ mała reszta glicyny zostaje zastąpiona dużym hydrofobowym łańcuchem argininy o dodatnim ładunku. Substytucja powoduje lokalną rearanżację, która obejmuje również kodony Leu266 i Leu270. Ten proces skutkuje destabilizacją lokalnej struktury białka [89].

Analizując obraz kliniczny GCK-MODY w opisanej grupie pacjentów z Polski Południowo-Wschodniej należy zwrócić uwagę na stosunkowo wysoki stopień penetracji mutacji wśród jej nosicieli. Tylko jedna nosicielka mutacji nie wykazywała żadnych zaburzeń gospodarki węglowodanowej w doustnym teście obciążenia glukozą. Wysoki był również odsetek pacjentów z rozpoznaną na podstawie OGTT cukrzycą, bo wynosił aż 61,4%. Obecność mutacji niemal jednoznacznie determinowała wystąpienie zaburzeń gospodarki węglowodanowej, co jest zgodne z doniesieniami z innych populacji [94; 96-97; 101-105]. Niemniej analiza zamieszczonych w niniejszej rozprawie doktorskiej rodowodów pokazuje, że nawet pomiędzy nosicielami tej samej mutacji w jednej rodzinie istnieją różnice dotyczące stopnia ciężkości zaburzeń gospodarki

węglowodanowej (od prawidłowej tolerancji glukozy, poprzez stan przedcukrzycowy, aż do cukrzycy). U poszczególnych członków tej samej rodziny cukrzyca bądź stan przedcukrzycowy diagnozowane były w różnym wieku. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być wcześniejsze wykrywanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej w młodszych pokoleniach w porównaniu do generacji ich rodziców czy dziadków. Może to wynikać z efektywniejszego wykrywania zaburzeń gospodarki węglowodanowej przez współczesną medycynę, a także z większej świadomości choroby w rodzinach, w których wielu jej członków jest przez nią dotkniętych. Należy zastanowić się, co jeszcze może mieć wpływ na te różnice. Fenotyp GCK-MODY podlega wpływom czynników zewnętrznych, np. warunkom rozwoju wewnątrzmacicznego, otyłości, niskiej aktywności fizycznej, ale także czynników dziedzicznych, które mogą modyfikować fenotyp tej cukrzycy monogenowej. W dwóch przypadkach – ojca i córki (rodzina M003) – obraz kliniczny i przebieg cukrzycy, z gwałtownym początkiem i kwasicą ketonową przy rozpoznaniu sugerował cukrzycę typu 1, pomimo ujemnych markerów immunologicznych, a opisani pacjenci charakteryzowali się całkowitą insulinozależnością. Takiego obrazu klinicznego nie wyjaśnia potwierdzona badaniem genetycznym heterozygotyczna mutacja w genie GCK. Należy wziąć pod uwagę wpływ innych czynników dziedzicznych, które zmodyfikowały w przedstawionej rodzinie typowy fenotyp GCK-MODY (rodzina M003). W opisanych powyżej przypadkach ojca i córki mamy najpewniej do czynienia z cukrzycą typu 1 u nosicieli mutacji w genie GCK.

Szereg elementów obrazu klinicznego GCK-MODY w populacji Polski Południowo-Wschodniej jest zbliżona do opisów innych grup etnicznych. Należy zwrócić uwagę na pewne odrębności, które wyróżniają opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej pacjentów z mutacją w genie GCK. Po pierwsze grupa nosicieli mutacji w genie GCK nie była otyła, ani nie miała cech zespołu metabolicznego, chociaż u jednej trzeciej pacjentów takie skojarzenie miało miejsce (31,4% pacjentów z nadwagą lub otyłością, 31% pacjentów z podwyższonym wskaźnikiem talia/biodro). W porównaniu do grupy osób zdrowych nosiciele mutacji w genie GCK mieli istotnie wyższy wskaźnik insulinooporności (HOMA-IR): 0,97 vs 1,16, co wynika ze zmniejszonej aktywności enzymu nie tylko w trzustce, ale również w wątrobie i współistniejącej insulinooporności wątrobowej o niewielkim nasileniu. Częstość nadciśnienia tętniczego nie różniła się istotnie od grupy osób zdrowych. Zwraca uwagę stosunkowo duża częstość zaburzeń gospodarki lipidowej (38%) i znikoma liczba pacjentów stosujących leczenie hipolipemizujące w momencie włączenia do badania. Pomiędzy grupą osób zdrowych i pacjentów z GCK-MODY stwierdzono nieznamiennie różnice w poziomie cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL. Poziom triglicerydów wśród nosicieli mutacji w genie GCK (0,9 mmol/l) był nieco niższy niż w grupie zdrowych kontroli (1,2 mmol/l), ale różnica ta była nieistotna statystycznie. Natomiast znamienność stwierdzono w poziomie cholesterolu HDL, którego wyższy poziom stwierdzono u

pacjentów z cukrzycą monogenową (1,6 mmol/l) w porównaniu do grupy kontrolnej (1,4 mmol/l). Profil lipidowy zbliżony do osób zdrowych powoduje niskie ryzyko sercowo-naczyniowe w GCK-MODY. W badaniu skandynawskim wykazano podobny profil metaboliczny pacjentów z GCK-MODY i osób zdrowych, oraz znamienne niższy poziom trójglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych u nosicieli mutacji w genie GCK, pomimo podwyższonej glikemii. [70]. W tym badaniu porównywano profil metaboliczny pacjentów z cukrzycą typu 2, cukrzycą monogenową uwarunkowaną mutacjami w genach czynników transkrypcyjnych (HNF4A i HNF1A), mutacjami w genie GCK oraz zdrowych kontroli. Niewielka grupa chorych z GCK-MODY (11 osób) była nieco starsza niż opisana w niniejszej pracy (średni wiek 43 lata), średnie BMI wynosiło 26,4 kg/m², glikemia na czczo – 7,0 mmol/l, a HbA_{1c} 6,6%. Stwierdzono niższy poziom wolnych kwasów tłuszczowych i triglicerydów u pacjentów z GCK-MODY w porównaniu do osób zdrowych bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej, pomimo wyższego poziomu glikemii na czczo i poposiłkowej oraz odsetka HbA_{1c} na poziomie odcięcia dla diagnozy cukrzycy. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być zmniejszona aktywność glukokinazy wątrobowej u nosicieli mutacji, a w związku z tym niewielka insulinooporność wątrobowa. Prowadzi to zmniejszonej syntezy glikogenu i malonylo-CoA w wątrobie. Ten drugi związek jest regulatorem metabolizmu lipidów. Konsekwencją jego zmniejszonego poziomu jest wzrost utleniania oraz zmniejszenie syntezy kwasów tłuszczowych, których jest prekursorem. W wyniku zredukowanej aktywności glukokinazy zmniejszona jest produkcja glicerolo-3-fosforanu w procesie glikolizy, nieefektywna jest również estryfikacja kwasów tłuszczowych do triglicerydów. W konsekwencji zmniejszonej aktywności glukokinazy wątrobowej produkcja kwasów tłuszczowych i triglicerydów, a także metabolizm glukozy ulegają zahamowaniu. Może to tłumaczyć fakt, że chorzy z GCK-MODY, pomimo podwyższonego poziomu glukozy i HbA_{1c} rzadko rozwijają przewlekłe powikłania cukrzycy, tak charakterystyczne dla innych typów choroby, a zwłaszcza cukrzycy typu 2. Częściowo można to wyjaśnić także łagodnym charakterem hiperglikemii obserwowanym w tym typie cukrzycy monogenowej. Podwyższony poziom lipidów, hiperglikemia prowadzą do gluko- i lipotoksyczności, która przyczynia się do pogłębienia insulinooporności, postępującego uszkodzenia komórki β trzustki, przyspieszonego procesu miażdżycowego, a to jest związane ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. W GCK-MODY poziom glukozy jest podwyższony, ale jest on kompensowany niskim stężeniem lipidów, co może tłumaczyć, przynajmniej częściowo, łagodny charakter schorzenia oraz niską częstość przewlekłych powikłań cukrzycy w tej grupie chorych. W innych badaniach chorzy z GCK-MODY również charakteryzowali się niskim stężeniem triglicerydów w porównaniu do osób zdrowych czy pacjentów z innymi typami cukrzycy [109, 110]. W pracy porównującej stężenia lipidów w grupie polskich pacjentów z GCK-MODY, HNF1A-MODY, z cukrzycą typu 1 oraz zdrowych kontroli wykazano istotnie niższy poziom HDL

cholesterolu wśród nosicieli mutacji w genie GCK. Jednak analiza subpopulacji lipoprotein wykazała wyższe stężenia dużych cząstek HDL, a niskie – pośrednich i małych HDL w porównaniu do grupy kontrolnej [109]. Analizowana grupa chorych z GCK-MODY była stosunkowo nieliczna (22 osoby), średni wiek wynosił 25,05 lat, BMI 24 kg/m², HbA_{1c} 6,25%, a średni poziom cholesterolu HDL – 45 mg/dl (1,16 mmol/l). Pomimo niskiego poziomu HDL cholesterolu w analizie subfrakcji pacjenci z GCK-MODY charakteryzują się ochronnym profilem lipidowym, co niewątpliwie przyczynia się do ich niskiego ryzyka sercowo-naczyniowego.

Średni odsetek HbA_{1c} w opisaney w niniejszym projekcie grupie pacjentów z GCK-MODY (6,6%) pozostawał zbliżony do odsetka HbA_{1c} opisywanego w innych populacjach europejskich nosicieli mutacji w genie GCK [71, 73, 94]. Natomiast inne populacje światowe charakteryzowały się wyższą glikemią na czczo i wyższym odsetkiem HbA_{1c}. W badaniu jordańskim grupa nosicieli mutacji w genie GCK, chociaż młodsza o prawie 10 lat (średni wiek wynosił 25,4 lat), charakteryzowała się otyłością (średnie BMI 30,87 kg/m²), co zapewne miało wpływ na wyższy poziom glukozy na czczo (178,5 mg/dl) i znacząco wyższy odsetek HbA_{1c} (10,44% vs 6,6% w niniejszej pracy) [107]. W badaniu japońskim opisano cechy kliniczne 78 nosicieli mutacji w genie GCK. Stwierdzono wyższy niż w niniejszej pracy średni poziom glukozy na czczo oraz wyższy odsetek HbA_{1c} – 9,3 mmol/l vs 6,6 mmol/l oraz 7,3% vs 6,6%. Przyczynę tego zjawiska należy upatrywać w wyższym BMI Japończyków, większym nasileniu insulinooporności, a w związku z tym z nakładaniem się cech zespołu metabolicznego i cukrzycy typu 2 na typowy obraz GCK-MODY w rodzinach, w których bardzo częsta była także cukrzyca typu 2. Pomimo nakładania się cech cukrzycy typu 2 u nosicieli mutacji w genie GCK w populacji japońskiej stwierdzono niską częstość przewlekłych powikłań mikronaczyniowych [111].

Odrębnym zagadnieniem jest częstość powikłań mikro- i makronaczyniowych w grupie opisanych pacjentów z GCK-MODY. Częstość powikłań naczyniowych była porównywalna do ich częstości w innych populacjach światowych, ale częstość retinopatii była istotnie niższa od tej raportowanej w innych grupach etnicznych [73]. Podobnie, jak w innych doniesieniach, żaden z nosicieli mutacji w genie GCK nie wymagał wykonania zabiegów laserokoagulacji siatkówki. U trzech nosicieli w pojedynczym badaniu porannego moczu stwierdzono podwyższony wskaźnik ACR przy prawidłowym eGFR, co nie stanowiło wystarczającej podstawy do rozpoznania cukrzycowej choroby nerek. Pacjentom tym zalecono powtórzenie badania dwukrotnie w ciągu trzech miesięcy po wykluczeniu zakażenia układu moczowego. O niewielkim ryzyku powikłań makronaczyniowych wśród nosicieli mutacji w genie GCK świadczą doniesienia o braku wpływu przewlekłej hiperglikemii w tej grupie pacjentów na grubość kompleksu intima-media [113].

W niniejszej pracy doktorskiej nosiciele mutacji w genie GCK charakteryzowali się stosunkowo niskim odsetkiem HbA_{1c}, kryteria rozpoznania cukrzycy na podstawie OGTT spełniało

ponad 60% z nich. Dowodzi to, że mutacje genu GCK w populacji polskiej w większości wiążą się z typowym, łagodnym obrazem fenotypowym. Należy zaznaczyć, że z analizy wykluczono osoby z kliniczną insulinozależnością i klinicznym obrazem cukrzycy typu 1.

Postawienie diagnozy molekularnej, wyjaśnienie pacjentom oraz lekarzom prowadzącym łagodnego charakteru tego typu cukrzycy spowodowało w badanej grupie pacjentów z GCK MODY dwa ważne zjawiska. Po pierwsze u wszystkich pacjentów leczonych dotychczas insuliną zaprzestano tej terapii (poza dwójką chorych z klinicznymi cechami insulinozależności, co opisano powyżej). Zmniejszyła się również liczba pacjentów stosujących doustne leki przeciwcukrzycowe, a zwiększyła - liczba pacjentów stosujących dietę cukrzycową. Należy zauważyć, że zmiana terapii nie wpłynęła na poziom HbA_{1c} w badanej grupie pacjentów, pomimo niewielkiego, choć nieistotnego statystycznie wzrostu BMI. Drugie zaobserwowane zjawisko dotyczyło sprawowania opieki diabetologicznej nad pacjentami z GCK-MODY. Większość osób zaprzestała regularnej kontroli lekarskiej, a tylko 15 pacjentów pozostawało pod systematyczną kontrolą poradni specjalistycznej.

Po postawieniu diagnozy molekularnej u większości pacjentów możliwe było zaprzestanie farmakoterapii. Nie spowodowało to istotnego pogorszenia wyrównania metabolicznego, a odsetek HbA_{1c} pozostał stabilny. Wyniki te pozostają w zgodności z doniesieniami światowymi [82, 108]. W analizowanej grupie odsetek pacjentów z GCK-MODY stosujących farmakoterapię: insulinę lub doustne leki hipoglikemizujące, był wyższy niż w przytoczonych doniesieniach i wynosił 34,4% (w porównaniu do np. 22% w badaniach brytyjskich). W badaniu hiszpańskim członkowie tylko jednej rodziny otrzymywali doustne leki hipoglikemizujące, a pozostali pacjenci z GCK-MODY osiągnęli dobrą kontrolę metaboliczną przy zastosowaniu jedynie diety i wysiłku fizycznego [92].

W przytoczonej wyżej pracy brytyjskiej analizowano wpływ farmakoterapii na poziom HbA_{1c} w grupie 799 pacjentów z heterozygotycznymi mutacjami genu GCK. Nie stwierdzono różnic w odsetku HbA_{1c} pomiędzy pacjentami leczonymi farmakologicznie (insuliną lub doustnymi lekami antyhiperglikemicznymi – metforminą lub pochodną sulfonilomocznika), a tymi pozostającymi bez leczenia. HbA_{1c} wynosiła w obydwu grupach odpowiednio 6,5% i 6,4%. Chorzy leczeni lekami doustnymi byli starsi w momencie postawienia diagnozy (średnio 28 lat) i mieli wyższe BMI (25,6 kg/m²) w porównaniu z grupą chorych na insulinie (średnio 20 lat, BMI 23,0 kg/m²) lub nie leczonych (średnio 17 lat, BMI 23,1 kg/m²). Kontynuowano obserwację 16 nosicieli mutacji w genie GCK, którzy zaprzestali stosowania farmakoterapii i porównano odsetek HbA_{1c} z nosicielami, którzy nigdy nie stosowali leczenia farmakologicznego. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie HbA_{1c} zarówno podczas stosowania farmakoterapii, jak i po jej zaprzestaniu, a także pomiędzy grupą leczoną w przeszłości i tą pozostającą bez leczenia farmakologicznego.

Wyniki publikacji są zgodne z opisem populacji Polski południowo-wschodniej, chociaż w niniejszej pracy zdecydowanie wyższy był odsetek pacjentów stosujących farmakoterapię (insulinę lub doustne leki antyhiperglikemiczne), bo wynosił ponad 34%. Jak wspomniano wyżej, po postawieniu diagnozy molekularnej wszyscy pacjenci z GCK-MODY stosujący dotychczas insulinoterapię - zaprzestali jej. Zmniejszyła się również liczba pacjentów stosujących leki doustne (z 18,6% na 15,1%) , a zwiększyła – liczba chorych stosujących dietę cukrzycową (z 28,8% na 45,3%). Ten ostatni fakt należy wiązać z pełną informacją, którą otrzymali pacjenci z GCK-MODY w momencie postawienia diagnozy molekularnej na temat istoty ich schorzenia, jego łagodnego przebiegu oraz skuteczności postępowania dietetycznego. Ta sama uspokajająca informacja najpewniej spowodowała również drugie zjawisko – a mianowicie większość pacjentów zaprzestała regularnej kontroli w diabetologicznych poradniach specjalistycznych.

Stosowanie farmakoterapii u pacjentów z cukrzycą MODY wynika z błędnie postawionej diagnozy cukrzycy typu 1 u młodych chorych i wdrożenia w związku z tym insulinoterapii, a u starszych pacjentów - z nieprawidłowej diagnozy cukrzycy typu 2 i wdrożenia doustnych leków hipoglikemizujących, najczęściej pochodnych sulfonilomocznika. W niniejszej pracy nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku HbA1c pomiędzy nosicielami mutacji w genie GCK stosującymi farmakoterapię i tymi pozostającymi bez leczenia farmakologicznego. Wynika to z faktu, że przy niewielkich dawkach egzogennej insuliny zachodzi zjawisko kompensacyjnego hamowania wydzielania insuliny endogennej, bez zmiany w poziomie glikemii. Poziom glukozy w GCK-MODY obniża się jedynie w warunkach podawania ponad-fizjologicznych dawek insuliny [82]. W analizowanej grupie pacjentów z GCK-MODY zarówno stosowane dawki insuliny, jak i dawki doustnych leków hipoglikemizujących były niewielkie i nie mogły spowodować całkowitego zahamowania sekrecji endogennej insuliny. Zmiana terapii w GCK-MODY po postawieniu diagnozy molekularnej jest przykładem farmakogenetyki, obserwowanej także w innych formach cukrzycy monogenowej. W cukrzycy uwarunkowanej mutacją w genie HNF1A, czy HNF4A skuteczne są małe dawki pochodnych sulfonilomocznika, a w aktywujących mutacjach genu KCNJ11/ABCC8 najskuteczniejszą formę leczenia stanowią pochodne sulfonilomocznika w dużych dawkach. W GCK-MODY zaprzestanie leczenia farmakologicznego nie tylko nie zmienia glikemii, wyrównania metabolicznego i nie zwiększa ryzyka przewlekłych powikłań, ale co chyba najistotniejsze dla pacjentów, znacznie poprawia jakość ich życia.

W większości przypadków nosiciele mutacji w genie GCK nie wymagają innego leczenia niż postępowanie dietetyczne, a hiperglikemia pozostaje stabilna przez lata. W niniejszym materiale można już po krótkim okresie obserwacji zauważyć niewielki, ale istotny wzrost masy ciała pacjentów z GCK-MODY, bez wzrostu odsetka HbA1c. Może to prowadzić do wzrostu insulinooporności, która nie tylko zależy od czynników środowiskowych, ale również od czynników

genetycznych. Te niekorzystne determinanty poligenowe są prawdopodobnie rozpowszechnione w populacji, co wiąże się z lawinowym wzrostem zachorowań na cukrzycę typu 2. Insulinooporność może mieć wpływ na obraz kliniczny i progresję zaburzeń gospodarki węglowodanowej w GCK-MODY. W badaniu francuskim na nielicznej grupie pacjentów z tym typem cukrzycy monogenowej wykazano istotnie wyższe poziomy glikemii w OGTT oraz wzrost insulinooporności w odstępie 11 lat, chociaż funkcja wydzielnicza komórki β pozostała stabilna [68]. Może to być związane z relatywnie stabilnym defektem glukokinazy, który nie prowadzi do zmniejszenia wydzielania insuliny wraz z upływem czasu. Jednak kiedy dochodzi do rozwoju insulinooporności hiperglikemia ulega progresji [68]. Wpływ zaobserwowanego wzrostu masy ciała na parametry gospodarki węglowodanowej, sekrecji insuliny, stopień wyrównania metabolicznego oraz rozwój przewlekłych powikłań w opisanej w niniejszej rozprawie doktorskiej grupie nosicieli mutacji w genie GCK wymaga dalszej, wieloletniej obserwacji.

6. WNIOSKI

1. Cukrzyca spowodowana mutacjami w genie GCK jest jedną z najczęstszych form cukrzycy MODY i stanowi ok. 50% wszystkich przypadków MODY w Polsce.
2. Diagnoza GCK-MODY stawiana jest w różnych okresach życia. Obserwujemy obniżenie się wieku diagnozy w kolejnych pokoleniach w rodzinach GCK-MODY.
3. Charakter zidentyfikowanych w genie GCK mutacji w rodzinach z regionu Polski Południowo-Wschodniej jest zbliżony do rodzaju mutacji opisywanych w innych populacjach europejskich. Najczęściej miały one charakter zmiany sensu i dotyczyły egzonów 7, 8 i 9.
4. Większość nosicieli mutacji w genie GCK charakteryzowała się brakiem otyłości, zaburzeń lipidowych, nadciśnienia tętniczego, co odróżnia ich od chorych z uwarunkowaną wielogenowo cukrzycą typu 2.
5. Większość pacjentów z GCK-MODY nie wymaga leczenia farmakologicznego, a jego odstawienie nie powoduje pogorszenia glikemii.
6. Wśród nosicieli mutacji w genie GCK na obraz cukrzycy MODY mogą nakładać się inne typy cukrzycy, np. cukrzyca typu 1 lub 2.
7. Pacjenci z GCK-MODY nie cechują się ryzykiem wystąpienia zaawansowanych powikłań przewlekłych cukrzycy.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Organization WH (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Geneva: World Health Organization.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.
3. Ledermann HM (1995) Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet* 345: 648.
4. Schwitzgebel VM (2014) Many faces of monogenic diabetes. *J Diabetes Invest* 5:121–133.
5. Maassen JA, Kadowaki T (1996) Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia* 39: 375-382.
6. Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT (2008) Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet med* 25: 383-399
7. Tattersall RB, Fajans SS. (1975) A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24: 44–53.
8. Skupień J, Małecki MT (2007) Expanding diabetes classification – New subtypes and therapeutic options. *Diabetologia Praktyczna* 8: 1-12.
9. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345, 971-980.
10. Hattersley AT (1998) Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Med* 15: 15-24.
11. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, et al. (1996) Mutations of the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384, 458-460.
12. Fajans SS, Bell GI (2011) MODY: history, genetics, patophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care* 34, 1878-1884.
13. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J,

- Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky , Bell GI (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1a gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384, 455-458.
14. Stoffers D, Ferrer J, Clarke W, Habener J (1997) Early-onset diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17:138–139.
 15. Cockburn BN, Bermanno G, Boodram LL et al (2004) Insulin promoter factor-1 mutations and diabetes in Trinidad: identification of a novel diabetes-associated mutation (E224K) in an Indo-Trinidadian family. *J Clin Endocrinol Metab* 89:971–978.
 16. Malecki MT, Jhala U, Antonellis A et al (1999) Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 23:323–328.
 17. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, et al. (2005) Role of transcription factor KLF 11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4807-4812.
 18. Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Vishi M, et al. (2007) PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2821-2826.
 19. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, et al. (2006) Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet* 38:54–62.
 20. Tattersall RB, Mansell PI (1991) Maturity onset-type diabetes of the young (MODY): one condition or many? *Diabet Med* 8: 402-410.
 21. Sovik O, Njolstad P, Folling I, et al. (1998) Hyperexcitability to sulphonylurea in MODY3. *Diabetologia* 41: 607-608.
 22. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, et al. (2003) Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 362: 1275-1281.
 23. Menzel R, Kaisaki PJ, Rjasanowski I, et al. (1998) A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) gene. *Diabet Med* 15: 816-820.

24. Malecki MT, Skupien J, Gorczynska-Kosiorz S, et al. (2005) Renal malformations may be linked to mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 (MODY3) gene. *Diabetes Care* 28: 2774-2776.
25. Reznik Y, Dao T, Coutant R et al. (2004) Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY) 3 families. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1476-1480.
26. Shih DQ, Dansky HM, Fleisher M et al. (2000) Genotype/phenotype relationships in HNF4alpha/MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein(CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes* 49: 832-837.
27. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M et al (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384–385.
28. Hiesberger T, Bai Y, Shao X, et al. (2004) Mutation of hepatocyte nuclear factor-1-beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. *J Clin Invest* 113: 814-825.
29. Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT (2006) Mutations in hepatocyte nuclear factor-1b and their related phenotypes. *J Med Genet* 43: 84-90.
30. Nishigori H, Yamada S, Kohama T et al. (1998) Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 47: 1354-1355.
31. Lindner TH, Njolstad PR, Horikawa Y, et al. (1999) A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet* 8: 2001-2008.
32. Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D et al. (2005) Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes* 54:3126–3132.
33. Kristinsson SY, Thorolfsdottir ET, Talseth B et al. (2001) MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1alpha and a novel mutation in NeuroD1. *Diabetologia* 44: 2098-2103.
34. Mc Carthy MI, Hattersley AT (2008) Learning from molecular genetics. Novel insights arising from the definition of genes for monogenic and type 2 diabetes. *Diabetes* 57: 2889-2898.
35. Nyunt O, Wu Jy, McGown I, Harris M, Huynh T, Leong GM, Cowley DM, Cotterill AM (2009) Investigating maturity onset diabetes of the young. *Clin Biochem Rev* 30: 67-74.

36. Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, Wainscoat JS (1992) Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 339:1307-10.
37. Zelent D, Najafi H, Odili S, Buettger C, Weik-Collins H, et al. (2005) Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans* 33: 306-310.
38. Garcia-Herrero C-M, Rubio-Cabezas O, Azriel S, Gutierrez-Nogues A, Aragonés A, et al. (2012) Functional characterization of MODY 2 mutations highlights the importance of the fine-tuning of glucokinase and its role in glucose sensing. *PLoS ONE* 7(1): e30518.
doi:10.1371/journal.pone.0030518.
39. Ilyedjian PB (2009) Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 66: 27-42.
40. Agius L (2008) Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414: 1-18.
41. Matschinsky FM (2009) Assessing a potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8: 399-416.
42. Van Schaftingen E, Dethieux M, Veiga da Cunha M (1994) Short-term control of glucokinase activity: role of regulatory protein. *Faseb J* 8: 414-419.
43. Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA (1999) Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274: 37125-37130.
44. Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B, St Denny I, Connelly S, et al. (2001) Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 50: 1813-1820.
45. Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652.
46. Matschinsky FM, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, et al. (1993) Glucokinase as pancreatic β cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* 92: 2092-2098.
47. Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-438.

48. Molnes J, Teigen K, Aukrust I, Bjørkhaug L, Søvik O, Flatmark T, Njølstad PR (2011) Binding of ATP at the active site of human pancreatic glucokinase – nucleotide-induced conformational changes with possible implications for its kinetic cooperativity. *FEBS Journal* 278: 2372-2386.
49. Zelent B, Odili S, Buettger C, Zelent DK, Chen P, Fenner D, Bass J, Stanley C, Laberge M, et al. (2011) Mutational analysis of allosteric activation and inhibition of glucokinase. *Biochem J* 440: 203-215.
50. Postic C, Shiota M, Magnuson MA (2001) Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 56: 195-218.
51. Sorenson RL, Stout LE, Brelje TC, Jetlon T, Matschinsky FM (2007) Immunohistochemical evidence for the presence of glucokinase in the gonadotropes and thyrotropes of the anterior pituitary gland of rat and monkey. *J Histochem Cytochem* 55:555-566.
52. Shenping L, Ammirati MJ, Song X, Knafels JD, Zhang J, Greasley SE, Pfefferkorn JA, Qiu X (2012) Insights into mechanism of glucokinase activation. *J Biol Chem* 287(17): 13596-13610.
53. Ilyedjian PB, Gjinovci A, Renold AE (1988) Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rat. *J Biol Chem* 263: 740-744.
54. Magnuson MA, Andreone TL, Printz RL, Koch S, Granner DK (1989) Rat glucokinase gene: Structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(13): 4838-4842.
55. Magnuson MA (1990) Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 39(5):523-527.
56. Tanizawa Y, Matsutani A, Chiu CK, Permutt MA (1992) Human glucokinase gene: isolation, structural characterization, and identification of a microsatellite repeat polymorphism. *Mol Endocrinol* 6: 1070-1081.
57. Stoffel M, Froguel PH, Takeda J, Zouali H, Vionnet H, Nishi S, Weber IT, Harrison RW et al. (1992) Human glucokinase gene: Isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 89: 7698-7702.
58. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellane-Chantelot C, Ellard S, Gloyn AL (2009) Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mut* 30: 1512-1526.

59. Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, et al. (1992) Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356: 721-722.
60. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT (2008) Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4: 200-213.
61. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougere F et al. (1992) Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356, 162–164.
62. Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM et al. (1998) Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 338, 226–230.
63. Njølstad PR, Søvik O, Cuesta-Munoz A, Bjørkhaug L, Massa O, Barbetti F, Undlien DE, Shiota C, Magnuson MA, Molven A et al. (2001) Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med* 344, 1588–1592.
64. Njølstad PR, Sagen JV, Bjørkhaug L, Odili S, Shehadeh N, Bakry D, Sarici SU, Alpay F, Molnes J, Molven A et al. (2003) Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose–insulin signaling pathway. *Diabetes* 52, 2854–2860.
65. Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Froguel P, Hattersley AT (2001) Beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 50 Suppl 1:S101-S107.
66. Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, et al. (2002) The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia* 45: 427-435.
67. Velho G, Froguel P, Clement K, et al. (1992) Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet* 340: 444-448.
68. Martin D, Bellanne-Chantelot C, Deschamps I, Froguel P, Robert J-J, Velho G (2008) Long-term follow-up of oral glucose tolerance test-derived glucose tolerance and insulin secretion and insulin sensitivity indexes in subjects with glucokinase mutations (MODY2). *Diabetes Care* 31: 1321–1323.

69. Gill-Carey O, Shields B, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT (2007) Finding a glucokinase mutation alters patient treatment. *Diabet Med* 24(Suppl 1):6 (Abstract).
70. Spégel P, Ekholm E, Tuomi T, Groop L, Mulder M, Filipsson K (2013) Metabolite profiling reveals normal metabolic control in carriers of mutations in the glucokinase gene (MODY2). *Diabetes* 62: 653-661.
71. Page RCL, Hattersley AT, Levy JC, et al. (1995) Clinical characteristics of subjects with a missense mutation in glucokinase. *Diabetic Medicine* 12: 209–217.
72. Velho G, Blanche H, Vaxillaire M, et al. (1997) Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 40: 217–224.
73. Steele AM, Shields BM, Wensley KJ, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT (2014) Prevalence of vascular complications among patients with glucokinase mutations and prolonged, mild hyperglycemia. *JAMA* 311: 279-286.
74. Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel P, Shulman GI (1996) Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest* 98: 1755-1761.
75. Ellard S, Beards F, Allen LI, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, Hattersley AT (2000) A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia* 43:250-253.
76. Hattersley AT, Beards F, Ballantyne E, Appleton M, Harvey R, Ellard S (1998) Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nat Genet* 19: 268-270.
77. Singh R, Pearson ER, Clark PM, Hattersley AT (2007) The long-term impact on offspring of exposure to hyperglycemia in utero due to maternal glucokinase gene mutations. *Diabetologia* 50: 620-624.
78. Spyer G, Hattersley AT, Sykes JE, Sturley RH, MacLeod KM (2001) Influence of maternal and fetal glucokinase mutations in gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 185:240–241.
79. Velho G, Hattersley AT, Froguel P (2000) Maternal diabetes alters birth weight in glucokinase-deficient (MODY2) kindred but has no influence on adult weight, height, insulin secretion or insulin sensitivity. *Diabetologia* 43: 1060-1063.

80. Spyer G, MacLeod KM, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT (2009) Pregnancy outcome in patients with raised blood glucose due to a heterozygous glucokinase gene mutation. *Diabet Med* 26: 14-18.
81. Schnyder G, Mullis P, Ellard S, Hattersley AT, Fluck C (2005) Genetic testing for glucokinase mutations in clinically selected patients with MODY: a worthwhile investment. *Swiss Med Wkly* 135: 352-356.
82. Stride A, Shields B, Carey OG, Chakera AJ, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT (2014) Cross-sectional and longitudinal studies suggest pharmacological treatment used in patients with glucokinase mutations does not alter glycaemia. *Diabetologia* 57: 54-56.
83. Ellard S, Bellane-Chantelot C, Hattersley AT (2008) Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the Young. *Diabetologia* 51: 546-553.
84. WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva, World Health Organization 1995.
85. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Brussels, International Diabetes Federation 2006.
86. Borowiec M, Antosik K, Fendler W, Deja G, Jarosz-Chobot P, Myśliwiec M, Zmysłowska a, Małecki M, Szadkowska A, Młynarski W (2012) Novel glucokinase mutations in patients with monogenic diabetes - clinical outline of GCK-MD and potential for founder effect in Slavic population. *Clin Genet* 81: 278-83.
87. Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z et al (2010) Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* (11): 529-535.
88. Pruhova S, Ek J, Lebl J, Sumnik Z, Saudek F, et al. (2003) Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia* 46: 291–295.
89. Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, Carluccio C, Capobianco V, et al. (2012) Glucokinase (GCK) Mutations and Their Characterization in MODY2 Children of Southern Italy. *PLoS ONE* 7(6): e38906. doi:10.1371/journal.pone.0038906.
90. Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vinnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D et al (1993) Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type2)

diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: Implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci* (90): 1932-36.

91. Cuesta-Munoz AL, Tuomi T, Cobo-Vuilleumier N, Koskela H, Odili S, Stride A, Buettger C (2010) Clinical heterogeneity in monogenic diabetes caused by mutations in the glucokinase gene (GCK-MODY). *Diabetes Care* (33): 290-292.
92. Barriso R, Bellanné-Chantelot C, Moreno JC, Morel V, Calle H, Alonso M, Mustieles C (2002) Nine novel mutations in maturity-onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2532-2539.
93. Yellapu N, Mahto MK, Valasani KR, Sarma PV, Matcha B (2014) Mutations in exons 10 and 11 of human glucokinase result in conformational variations in the active site of the structure contributing to poor substrate binding - explains hyperglycemia in type 2 diabetic patients. *J Biomol Struct Dyn* (15): 1-14.
94. Valentínova L, Beer NL, Staník J, Tribble ND, van de Bunt M, et al. (2012) Identification and Functional Characterisation of Novel Glucokinase Mutations Causing Maturity-Onset Diabetes of the Young in Slovakia. *PLoS ONE* 7(4): e34541.
doi:10.1371/journal.pone.0034541.
95. Pinterova D, Ek J, Kolostova K, Pruhova S, Novota P, et al. (2007) Six novel mutations in the GCK gene in MODY patients. *Clin Genet* 71: 95–96.
96. Massa O, Meschi F, Cuesta-Munoz A, Caumo A, Cerutti F, et al. (2001) High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. Diabetes Study Group of the Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP). *Diabetologia* (44): 898–905.;
97. Lorini R, Klersy C, d'Annunzio G, Massa O, Minuto N, et al. (2009) Maturity onset diabetes of the young in children with incidental hyperglycemia: a multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care* 32: 1864–1866.
98. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, Bilbao JR, Vazquez JA, San Pedro JI, Busturia MA, Castaño L; Spanish MODY Group. (2007) Mutations in GCK and HNF1a explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:538-546.
99. Fendler W, Rizzo M, Borowiec M, et al. (2014) Less but better: cardioprotective lipid profile of patients with GCK-MODY despite lower HDL cholesterol level. *Acta Diabetologica*. 51:625-632.

100. Owen K, Hattersley AT (2001) Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 15: 309-323.
101. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G et al. (1993) Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of Diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 328: 697-702.
102. Costa A, Bescos M, Velho G, Chevre J et al. (2000) Genetic and clinical characterization of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *Eur J Endocrinol* 142: 380-386.
103. Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K, Batten M et al. (2003) Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat* 22: 417.
104. Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O et al. (2005) Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK and TCF1. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4607-4614.
105. Lindner TH, Cockburn BN, Bell GI (1999) Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 42: 121-123.
106. Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C et al. (1999) High frequency of mutations in MODY and mitochondria genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* 42: 1131-1137.
107. Khalil R, Al-Sheyab F, Khamaiseh E, Halaweh MA, Abder-Rahman HA (2009) Screening of mutations in the GCK gene in Jordanian maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY2) patients. *Genetics and Molecular Research* 8: 500-506.
108. Codner E, Rocha A, Deng L, Martinez-Aguayo A, Godoy C, Mericq V, Chung WK (2009) Mild fasting hyperglycemia in children: high rate of glucokinase mutations and some risk of developing type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 10: 382-388.
109. Fendler W, Borowiec M, Antoisik K, Szadkowska A, Deja G, Jarosz-Chobot P, Myśliwiec M, Wyka K, Pietrzak I, Skupien J, Malecki MT, Mlynarski W (2011) HDL cholesterol as a diagnostics tool for clinical differentiation of GCK-MODY from HNF1A-MODY and type 1 diabetes in children and young adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75:321-327.
110. Tinto N, Zagari A, Capuano M, De Simone A, Capobianco V, Daniele G, Giugliano M, Spadaro R, Franzese A, Sacchetti L (2008) Glucokinase gene mutations: structural and genotype-

- analyses in MODY children from South Italy. PLoS One 3:e1870.doi:10.1371/journal.pone.0001870.
111. Kawakita R, Hosokawa Y, Fujimaru R, Tamagawa N, Urakami T et al. (2014) Molecular and clinical characterization of glucokinase maturity-onset diabetes of the Young (GCK-MODY) In Japanese patients. Diabetic Medicine 31, doi:10.1111/dme.12487.
 112. Steele AM, Wensley KJ, Ellard S, Murphy R, Shepherd M, et al. (2013) Use of HbA1c in the identification of patients with hyperglycaemia caused by glucokinase mutation: observational case control studies. PLoS ONE 8(6): e65326. Doi:10.1371/journal.pone.0065326.
 113. Pruhova S, Dusatkowa P, Kraml PJ, Kulich M, Prochazkova Z, Broz J, Zikmund J, Cinek O, Andel M, Pedersen O, Hansen T (2013) Chronic mild hyperglycemia in GCK-MODY patients does not increase carotid-intima media thickness. International Journal of Endocrinology <http://dx.doi.org/10.1155/2013/718254>.
 114. Borowiec M, Fendler W, Antosik K, Baranowska A, Gnys P, Zmyslowska A, Malecki M, Mlynarski W. (2012) Doubling the referral rate of monogenic diabetes through a nationwide information campaign – update on glucokinase gene mutations in a Polish cohort. Clin Genet: 82: 587–590.
 115. Garin I, Rica I, Estalella I, Oyarzabal M, Rodríguez-Rigual M, San Pedro JI, Pérez-Nanclares G, Fernández-Rebollo E, Busturia MA, Castaño L, Pérez de Nanclares G; Spanish MODY Group. (2008) Haploinsufficiency at GCK gene is not a frequent event in MODY2 patients. Clin Endocrinol (Oxf): 68:873-8.
 116. Feldt M. (2012) SAT-615: Opposing Phenotypes (Maturity Onset Diabetes of the Young and Congenital Hyperinsulinism) in a Novel Glucokinase Promoter Mutation (-84C>G). The Endocrine Society's 94th Annual Meeting and Expo, June 23-26, 2012 – Houston, TX.
 117. Nam JH, Lee HC, Kim YH, Cha BS, Song YD, Lim SK, Kim KR, Huh KB. (2000) Identification of glucokinase mutation in subjects with post-renal transplantation diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract. 50:169-76.
 118. García-Herrero CM, Galán M, Vincent O, Flández B, Gargallo M, Delgado-Alvarez E, Blázquez E, Navas MA. (2007) Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. Diabetologia 50:325-33.

119. Yokota I, Moritani M, Nishisho K, Miyoshi T, Kotani Y, Kagami S. (2011)
Detection of glucokinase gene defects in non-obese Japanese children diagnosed with diabetes by school medical examinations. *Endocr J.* 58:741-6.
120. Hager J, Blanche H, Sun F, Vaxillaire NV, Poller W, et al. (1994) Six mutations in the glucokinase gene identified in MODY by using a nonradioactive sensitive screening technique. *Diabetes* 43: 730–733.
121. Aloï C, Salina A, Minuto N, Tallone R, Lugani F, Mascagni A, Mazza O, Cassanello M, Maghnie M, d'Annunzio G. (2017) Glucokinase mutations in pediatric patients with impaired fasting glucose. *Acta Diabetol* 54:913-923

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

MODY jest heterogenną grupą cukrzyc o autosomalnym typie dziedziczenia, łagodnym początku i wczesnym wieku rozpoznania, u podłoża których leżą defekty komórki β trzustki przy zachowanej częściowo endogennej produkcji insuliny. Szacuje się, że MODY stanowi około 2-5% wszystkich przypadków cukrzycy. Dotychczas opisano kilkanaście podtypów MODY, związanych głównie z mutacjami genów czynników transkrypcyjnych odpowiadających za ekspresję innych genów, podział, różnicowanie się komórek, rozwój tkanek i narządów oraz procesy metaboliczne komórek. Czynniki transkrypcyjne związane z MODY regulują syntezę i wydzielanie insuliny, biorą udział w rozwoju trzustki i różnicowaniu się komórek β .

Wśród cukrzyc MODY wyróżnia się GCK-MODY, cukrzyca związana z mutacją genu enzymu regulującego wydzielanie insuliny – glukokinazy. W tym podtypie cukrzycy monogenowej inny jest patomechanizm powstawania zaburzeń gospodarki węglowodanowej i przebieg kliniczny choroby niż w przypadku mutacji genów czynników transkrypcyjnych. Glukokinaza odgrywa kluczową rolę jako czujnik poziomu glukozy (glukosensor) w komórkach β trzustki, integrując poziom glukozy i jej metabolizm z wydzielaniem insuliny. Gen GCK znajduje się na ramieniu krótkim chromosomu 7, zawiera 12 egzonów, oddzielonych 11 intronami. Charakterystycznym objawem GCK-MODY jest hiperglikemia na czczo, a w testach obciążeniowych zachowana jest sekrecja insuliny. Choroba ma przebieg łagodny, hiperglikemia nie ulega progresji w czasie, niewielkie jest ryzyko przewlekłych powikłań choroby, nie występują objawy pozatrzustkowe, a chorzy zwykle nie wymagają leczenia farmakologicznego, a jedynie postępowania dietetycznego.

Celem niniejszej pracy było badanie podłoża molekularnego oraz wybranych cech klinicznych GCK-MODY w regionie Polski południowo-wschodniej. Rekrutację pacjentów do badania prowadzono w oparciu o co najmniej trzypokoleniowy wywiad rodzinny w kierunku zaburzeń gospodarki węglowodanowej, ich autosomalnie dominujący typ dziedziczenia, zachorowanie u co najmniej dwóch członków rodziny przed 30 r.ż., kliniczną insulinoniezależność. W niektórych przypadkach pacjentów kwalifikowano na podstawie dwupokoleniowego wywiadu rodzinnego oraz charakterystycznego obrazu klinicznego schorzenia. Poszukiwanie mutacji u probantów prowadzono metodą bezpośredniego sekwencjonowania genu GCK. Po potwierdzeniu mutacji u probantów, poszukiwano jej u członków ich rodzin.

W trakcie pisania niniejszej pracy doktorskiej korzystano z tworzonego w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych Małopolskiego Zbioru Rodzin MODY. Spośród 119 probantów i/lub ich rodzin z podejrzeniem cukrzycy genetycznie uwarunkowanej, u których uzyskano wynik badania DNA, u 42 potwierdzono mutację w genie GCK, u 40 – mutację genu HNF1A, w 3 przypadkach

mutację mitochondrialnego DNA i pojedynczych rodzinach mutację genu HNF4A oraz genu NEUROD. W 32 przypadkach wynik sekwencjonowania DNA był negatywny. W 42 zidentyfikowanych rodzinach GCK-MODY stwierdzono 27 różnych mutacji. Najczęstszym typem mutacji były mutacje zmiany sensu – 21, ponadto stwierdzono 2 delecje z zachowaną ramką odczytu, 2 mutacje prowadzące do zmiany miejsca składania egzonów (splicing-site), 1 mutację w regionie promotorowym genu GCK i 1 mutację nonsensowną. Najczęstszą, bo stwierdzoną w 9 niespokrewnionych rodzinach, była mutacja G318R. Znalezione 5 nowych mutacji, dotychczas nie opisanych w innych populacjach: L164V, V86G, D158Y, F438S i A282del. Spośród 42 rodzin z GCK-MODY na dalszy udział w badaniu wyraziło zgodę 21 rodzin, w których zidentyfikowano łącznie 61 nosicieli mutacji w genie GCK.

Grupę nosicieli mutacji w genie GCK scharakteryzowano pod kątem parametrów antropometrycznych, biochemicznych, schorzeń współistniejących, przewlekłych powikłań cukrzycy oraz sposobu leczenia. Następnie grupę tą porównano z grupą kontrolną osób zdrowych, dobranych w stosunku 1:1 pod względem wieku, płci i BMI. Średni wiek pacjentów z GCK-MODY wynosił 34 lata, a średni wiek postawienia diagnozy zaburzeń gospodarki węglowodanowej – 29,1 lat. Na podstawie OGTT z 75 g glukozy cukrzycę rozpoznano w 61,4% przypadków, prediabetes w postaci nieprawidłowej glikemii na czczo (IFG) i/lub nietolerancji glukozy (IGT) u 36,9%, a u jednej nosicielki mutacji nie stwierdzono żadnych zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Dwie osoby prezentowały kliniczne cechy cukrzycy typu 1. Tak duża liczba pacjentów z rozpoznaniem jedynie stanu przedcukrzycowego, a zwłaszcza nieprawidłowej glikemii na czczo (31,6%) jest cechą charakterystyczną GCK-MODY. W momencie włączenia do badania, spośród 61 nosicieli mutacji w genie GCK, 11 osób było leczonych insuliną, 11 – lekami doustnymi, 17 osób stosowało tylko dietę, a 22 osoby pozostawały bez leczenia.

W analizowanej grupie pacjentów z GCK-MODY z regionu Polski Południowo-Wschodniej stwierdzono wysoki stopień penetracji mutacji. Grupa ta nie była otyła (średnie BMI wynosiło 23,6 kg/m²), w większości przypadków nie miała cech zespołu metabolicznego, chociaż w prawie 1/3 przypadków takie skojarzenie miało miejsce. Częstość nadciśnienia tętniczego nie różniła się istotnie od grupy kontrolnej osób zdrowych, zwracała uwagę natomiast wysoka częstość zaburzeń gospodarki lipidowej, wynosząca aż 38% i znikomy odsetek osób leczonych z powodu dyslipidemii. Średni odsetek HbA_{1c} wynosił 6,6%. Nie stwierdzono ciężkich postaci przewlekłych powikłań mikroangiopatycznych cukrzycy.

Po zakończeniu badania każdy z nosicieli mutacji w genie GCK zgodnie z praktyką kliniczną otrzymał wynik badania genetycznego oraz ustną i pisemną informację na temat charakteru mutacji i rokowania, a następnie został skierowany do lekarza prowadzącego. Po upływie co najmniej 6 miesięcy analizowano ponownie dane medyczne pacjentów, oceniając wpływ diagnozy

molekularnej na postępowanie terapeutyczne, obraz kliniczny oraz stopień wyrównania metabolicznego. Wszyscy chorzy stosujący dotychczas insulinoterapię zaprzestali jej stosowania. Zmniejszyła się liczba pacjentów stosujących leki doustne, a zwiększyła – stosujących dietę cukrzycową. Ta zmiana postępowania terapeutycznego pozostała bez wpływu na stopień wyrównania metabolicznego.

We wnioskach należy stwierdzić, że GCK-MODY występuje w regionie Polski południowo-wschodniej z podobną częstością jak w innych populacjach. Również charakter zidentyfikowanych mutacji jest zbliżony do rodzaju mutacji opisywanych w innych populacjach europejskich. Diagnoza tej cukrzycy monogenowej stawiana jest w różnych okresach życia i można zaobserwować zjawisko obniżenia się wieku diagnozy w kolejnych pokoleniach rodzin z GCK-MODY. Większość nosicieli mutacji w genie GCK cechuje się prawidłowym BMI, a także brakiem innych cech zespołu metabolicznego, takich jak nadciśnienie tętnicze i zaburzenia lipidowe. Większość nosicieli mutacji w genie GCK nie wymaga leczenia farmakologicznego, a jego odstawienie nie powoduje pogorszenia wyrównania metabolicznego. Wśród osób z GCK-MODY nie rozwijają się zaawansowane powikłania cukrzycy. Na obraz kliniczny GCK-MODY mogą nakładać się inne typy cukrzycy, np. typu 1 lub 2.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

MODY is a heterogenic group of autosomal dominant diabetes, with mild and early onset. The background of this type of diabetes is a pancreatic β -cell's defect with partially preserved endogenic insulin production. It is estimated that MODY constitutes 2-5% of all diabetes. Several types of MODY were described. Most of them are mutations of transcription factors that are responsible for other genes' expression, division and differentiation of cells, tissues, organs' development and some metabolic processes. Transcription factors associated with MODY fenotype regulate insulin synthesis, secretion and participate in pancreatic development and differentiation of the β -cells.

Amongst MODY the GCK-MODY can be differentiated. This is the type of diabetes related to the mutation of the enzyme regulating insulin secretion – glucokinase. In this monogenic diabetes the pathogenesis of carbohydrate metabolism disorders and clinical features of the disease are different than in transcription factors mutations. Glucokinase is a key regulatory enzyme that acts as a glucosensor in pancreatic β -cell and correlates the insulin secretion according to glucose level and metabolism. GCK gene is located in the short arm of chromosome 7, composed of 12 exons, wich are separated by 11 introns. Fasting hyperglycemia is a characteristic feature of GCK-MODY and insulin secretion is perserved in glucose tolerance tests. The disease has a mild course, hyperglycemia does not progress, the risk of chronic diabetes complications is low, symptoms outside the pancreas don't occur and farmacological treatment is usually not necessary. Proper diet is sufficient to keep good metabolic control.

The aim of the study was to investigate the molecular background and some clinical features of GCK-MODY in south-eastern Poland. The recrutation of patients was based on at least three-generation family history of carbohydrate metabolism disorders, autosomal dominant inheritance, icidence of diabetes before the age of 30 in two family members, as well as clinical insulin independence. In some cases patients were recruited on the basis of two-generation family history and characteristic clinical features of the disease. Direct sequencing of GCK gene was used to search for mutations in probants. After confirmation of the presence of mutation in probant, it was searched in other family members.

The files of GCK-MODY families from Lesser Poland, was gathered in the Department of Metabolic Diseases and it was used in this study. Among 119 probants or/and their families suspected of monogenic diabetes, in which the result of DNA testing was available, GCK gene mutation was found in 42 of tchem. The HNF1A gene mutation was found in 40 families, in three cases mitochondrial DNA mutation was observed and in single families HNF4A gene mutation and

NEUROD gene mutation were found. In 32 cases the result of DNA sequencing was negative. In 42 identified GCK-MODY families 27 different mutations were found. The missense mutations were the most frequent types of mutations found in 21 families. In addition two in-frame deletions, two splicing-site mutations, one mutation in gene promoter region and one non-sense mutation were found. The missense mutation G318R was the most frequent mutation identified in nine unrelated families. 5 novel mutations were found: L164V, V86G, D158Y, F438S and A282del. Among 42 GCK-MODY families, 21 of them, with 61 identified GCK gene mutation carriers agreed to continue the study.

The group of GCK gene mutation carriers was characterised by anthropometric and biochemical parameters, as well as, comorbidities, chronic diabetes complications and methods of treatment. This group was compared to the group of healthy subjects matched 1:1 by age, sex and Body Mass Index (BMI). The mean age of GCK-MODY patients was 34 years, the mean age of carbohydrate metabolism disorders diagnosis was 29,1 years. Based on oral glucose tolerance test, diabetes was diagnosed in 61,4% of cases, prediabetes (impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance) in 36,9% of cases and one mutation carrier had normal glucose level. Two patients were presenting with clinical features of type 1 diabetes. Such a high number of patients diagnosed with prediabetes only, especially with impaired fasting glucose (31,6%), is a characteristic feature of GCK-MODY. At the time of the acceptance for this research, out of 61 GCK gene mutation carriers 11 were treated with insulin, 11 – with oral hypoglycaemic agents, 17 – with the diet only and 22 were not treated at all.

The high rate of mutations' penetration was confirmed in the analysed group of GCK-MODY patients from the south-eastern Poland region. The patients were not obese (mean BMI was 23,6 kg/m²) and in majority of cases the features of metabolic syndrome were absent, however in 1/3 of all cases such association was observed. The incidence of the hypertension did not differ from the healthy control group. The noticeable fact was the high rate of lipid disorders in GCK-MODY group (38%) and a very low percentage of treated individuals. The mean HbA_{1c} was 6,6%. Severe chronic diabetes complications were absent.

According to good clinical practice after the termination of the study each GCK gene mutation carrier received the result of genetic testing, oral explanation and written information about the character of the mutation and prognosis and was referred to general practitioner or diabetologist. After at least 6 months medical data of the patients was reanalyzed and the influence of molecular diagnosis on therapeutic proceedings, clinical picture and metabolic control was assessed. All patients treated with insulin stopped this treatment. The number of patients treated with oral hypoglycaemic agents decreased and the number of patients on diet – increased. This change of therapeutic approach didn't influence the metabolic control of diabetes.

I concluded that GCK-MODY occurs in south-eastern Poland region with similar frequency as in other populations. The character of mutations described in this study is also similar to mutations described in other European populations. This monogenic diabetes is diagnosed in different phases of life and the phenomenon of the younger age at the time of diagnosis in consecutive generations of GCK-MODY families may be observed. The majority of GCK gene mutation carriers have normal BMI and features of metabolic syndrome, such as; hypertension and lipid disorders are absent. In most cases of GCK-MODY pharmacological treatment is not needed, and its discontinuation doesn't cause worsening of metabolic control. GCK-MODY patients don't develop severe diabetes complications. Other types of diabetes, such as; type 1 or type 2 diabetes, may overlap with clinical picture of GCK-MODY.

10. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik A. Ankieta genetyczna o charakterze przesiewowym dotycząca dziedziczenia cukrzycy w rodzinie

Imię i nazwisko:

		Cukrzyca			Wiek zachorowania
		TAK	NIE	NIE WIEM	
Osoba wypełniająca ankietę		X			
Rodzice					
	Matka				
	Ojciec				
Dziadkowie:					
	Matka Matki				
	Ojciec Matki				
	Matka Ojca				
	Ojciec Ojca				
Rodzeństwo (od najstarszego)					
	1 rodzeństwo				
	2 rodzeństwo				
	3 rodzeństwo				
	4 rodzeństwo				
	5 rodzeństwo				
Dzieci (od najstarszego)					
	1 dziecko				
	2 dziecko				
	3 dziecko				
	4 dziecko				
	5 dziecko				
Ciotki/Wujkowie (od najstarszego)					
	1 rodzeństwo Matki				
	2 rodzeństwo Matki				
	3 rodzeństwo Matki				
	4 rodzeństwo Matki				
	5 rodzeństwo Matki				
	1 rodzeństwo Ojca				
	2 rodzeństwo Ojca				
	3 rodzeństwo Ojca				
	4 rodzeństwo Ojca				
	5 rodzeństwo Ojca				
Kuzynki/Kuzyni (od najstarszego)					
	1 kuzynka/kuzyn				
	2 kuzynka/kuzyn				

3 kuzynka/kuzyn
4 kuzynka/kuzyn
5 kuzynka/kuzyn
6 kuzynka/kuzyn
7 kuzynka/kuzyn

Inne osoby z rodziny chorujące na cukrzycę (prosimy o podanie wieku zachorowania):

1. _____
2. _____
3. _____

Załącznik B. Szczegółowa ankieta kliniczna stosowana u członków rodzin GCK-MODY

ANKIETA GENETYCZNA

DATA ANKIETY:.....

IMIĘ I NAZWISKO:.....

Adres:.....

Numer telefonu:.....

Wywiad chorobowy: Prosimy o zastanowienie się nad odpowiedziami i umieszczenie ich we właściwych rubrykach.

1. Rok rozpoznania cukrzycy:.....Ile Pan/Pani miał(a) wtedy lat.....

2. Aktualna metoda leczenia (podkreślić właściwe):

Bez leczenia

Dieta

Leki doustne

Insulina

JEŻELI STOSOWANA JEST INSULINA, to w ile lat po rozpoznaniu cukrzycy zaczęto ją stosować ?..... Jaki to był rok ?.....

JEŻELI STOSOWANA JEST INSULINA, to jaka jest jej dobową dawkę?.....

3. Prosimy o podanie swojej **daty urodzenia** Dzień.....Miesiąc.....Rok.....

4. Prosimy o podanie swojego **wzrostu**:.....cm

5. Prosimy o podanie swojej **wagi**:.....kg

6. Jaka była Pan/Pani **największa waga w życiu** i kiedy to miało miejsce?

Waga.....kg

Wiek.....

W pytaniach zamieszczony poniżej prosimy w odpowiednich miejscach o **podkreślenie** prawidłowej odpowiedzi TAK lub NIE

7. Czy Pan/Pani lekarz powiedział kiedykolwiek, że ma Pan/Pani wysokie ciśnienie tętnicze lub nadciśnienie?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, czy aktualnie stosuje Pan/Pani leki obniżające ciśnienie tętnicze krwi ?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy wymienić te leki:.....

.....

8. Czy lekarz powiedział Panu/Pani kiedykolwiek, że miał/a Pan/Pani atak serca lub dusznicę bolesną?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę:.....

9. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek hospitalizowany(a) z powodu zawału serca?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę/y hospitalizacji:.....

10. Czy lekarz kiedy powiedział Panu/Pani, że ma Pan/Pani **chorobę nerek (nefropatię)** związaną z cukrzycą?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy podać kiedy to miało miejsce:.....

11. Czy lekarz powiedział Panu/Pani kiedykolwiek, że ma Pan/Pani **retinopatię** lub inne problemy oczne związane z cukrzycą?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy podać kiedy to miało miejsce.....

Czy miał Pan/Pani kiedykolwiek wykonywany zabieg laseroterapii?

NIE

TAK

12. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek leczony z powodu innej choroby?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy o ich wymienienie.....

.....

13. Czy aktualnie jest Pan/Pan leczony następującymi lekami (prosimy o podkreślenie stosowanych leków):

Accupro	Benalapril	Capoten	Captopril	Enap	Enarenal
Gopten	Inhibace	Lotensin	Prestarium		

WYWIAD RODZINNY

Prosimy o odpowiedź na poniższe pytania dotyczące problemów zdrowotnych Pani/Pana rodziny.

Wszystkie pytania dotyczą rodzin biologicznych (nie dotyczą macoch, ojczymów, dzieci adoptowanych).

W pytaniach zamieszczony poniżej prosimy w odpowiednich miejscach o **podkreślenie** prawidłowej odpowiedzi TAK lub NIE albo NIE WIEM

DZIADKOWIE

Czy któreś z Pani/Pana babć lub dziadków chorowało na cukrzycę?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy zaznaczyć, którego z nich to dotyczyło:

ojciec ojca	TAK	NIE	NIE WIEM
matka ojca	TAK	NIE	NIE WIEM
ojciec matki	TAK	NIE	NIE WIEM
matka matki	TAK	NIE	NIE WIEM

Ile/u ma Pani/Pan żyjących babć lub dziadków:

RODZICE

MATKA

1. Rok urodzenia.....

2. Czy rozpoznano u niej kiedykolwiek cukrzycę?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wieku.....

3. Czy rozpoznano u niej kiedykolwiek nadciśnienie tętnicze?

NIE

TAK

OJCIEC

1. Rok urodzenia.....

2. Czy rozpoznano u niego kiedykolwiek cukrzycę (właściwe zakreślić)?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wieku.....

3. Czy rozpoznano u niego kiedykolwiek nadciśnienie tętnicze?

NIE

TAK

CIOTKI STRYJENKI/WUJKOWIE

Ilu braci i siostr miała Pana/Pani matka?Ilu żyje?.....

U ilu z nich wystąpiła cukrzyca?.....Ilu z nich żyje?.....

Czy u któregoś z Pana/Pani kuzynów lub kuzynek ze strony twojej matki wystąpiła cukrzyca?

NIE

TAK

Ilu braci i siostr miał Pani/Pana ojciec?Ilu żyje?.....

U ilu z nich wystąpiła cukrzyca?.....Ilu z nich żyje?.....

Czy u któregoś z Pani/Pana kuzynów lub kuzynek ze strony twojego ojca wystąpiła cukrzyca?

NIE

TAK

RODZENÍSTWO

Czy ma Pan/Pani braci lub siostry?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o ich wymienienie począwszy od najstarszych:

1. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

2. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

3. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

4. Rok urodzeniapłeć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to w jakim wiekui jaki jest sposób leczenia.....

Czy żyje

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to kiedy nastąpił zgon.....

Liczba dzieci.....Liczba dzieci z cukrzycą.....

DZIECI

Czy ma Pani/Pan dzieci?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to u ilu z nich wystąpiła cukrzyca.....

PALENIE TYTONIU

1. Czy palił Pan/Pani kiedykolwiek papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to prosimy o pominięcie pozostałych pytań.

JEŻELI TAK, to w jakim wieku zaczął/a Pan/Pani palić regularnie?

Wiek.....

2. Czy aktualnie pali Pan/Pani papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o przejście do pytania 3.

JEŻELI NIE, to w jakim wieku rzucił/a Pan/Pani palenie? Wiek.....

Ile średnio paczek papierosów wypalał/a Pan/Pani dziennie w czasie ostatniego miesiąca palenia papierosów (prosimy zakreślić)?.....

Wyrażam zgodę na pobranie krwi celem izolacji DNA do badań genetycznych.

podpis wypełniającego ankietę.....

Prosimy o podanie nazwisk i adresów **żyjących sióstr lub braci**

Nazwisko i imię:.....

Adres i telefon:

Nazwisko i imię:.....

Adres i telefon:

Nazwisko i imię:.....

Adres i telefon: