

Recenzja pracy doktorskiej lek. Joanna Wilimborek
**„Zmienność stężenia aktywnych metabolitów witaminy D
w zależności od pory roku, stanu odżywienia
oraz wskaźników uszkodzenia przeszczepionego narządu
u pacjentów w odległym okresie po przeszczepieniu nerki”**

Witaminy D są aktywnymi biologicznie substancjami chemicznymi rozpuszczalnymi w tłuszczach, należącymi do hormonów steroidowych, będącymi czynnikami transkrypcyjnymi genów licznych białek docelowych. Witamina D jest w około 80% wytwarzana w skórze. Pozostałe 20% pochodzi z pożywienia (pokarmy z dużą zawartością witaminy D to: ryby, podroby i żółtka jaj). Wytworzony w skórze cholekalcyferol oraz dostarczony z pokarmem ergokalcyferol ulegają hydroksylacji w wątrobie przez 25-hydroksylazę do kalcyfedioli [25(OH)D]. Kalcyfediole są nieaktywnymi prohormonami i stanowią postacie zapasowe witaminy D w organizmie. W nerkach, w wyniku 1-hydroksylacji, powstają aktywne pochodne kalcytriolu. W nerkach dochodzi do wytworzenia 15-20% całkowitej ilości powstającego kalcytriolu w organizmie. Pozostałe 80% kalcytriolu powstaje w tkankach obwodowych, w których również występuje 1-hydroksylaza. Kalcytriol pochodzenia nerkowego działa endokrynnie. Dlatego narządem determinującym stężenie aktywnych metabolitów witaminy D są nerki.

Receptory witaminy D znajdują się w jądrze komórkowym. Pobudzenie tych receptorów reguluje ekspresję genów licznych białek. Receptory witaminy D znajdują się w większości komórek organizmu, lecz istotne znaczenie kliniczne mają głównie te, które

zlokalizowane są w enterocytach błony śluzowej jelita cienkiego. Witamina D i jej aktywne metabolity odgrywają podstawową rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej zwiększając wchłanianie wapnia i fosforanów w jelitach. W przewlekłej chorobie nerek dochodzi do zmniejszenia wywarzania aktywnych metabolitów witaminy D w nerkach. Po udanym przeszczepieniu nerki liczne zaburzenie endokrynne i metaboliczne występujące u chorych z zaawansowaną przewlekłą chorobą nerek ustępują. Tematem recenzowanej rozprawy są badania nad zmiennością stężeń aktywnych metabolitów witaminy D u chorych w odległym okresie po przeszczepieniu nerki.

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ. Liczy 124 strony, w tym 11 rycin i 39 tabel. Pod koniec pracy po spisie rycin i tabel zamieszczone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim. Spis dobrze dobranej, aktualnego i właściwie przytoczonego piśmiennictwa (267 pozycji) jest zamieszczony na końcu pracy.

W obszernym, ciekawie napisanym *wstępie* Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę pracy zamieszczając szczegółowe informacje dotyczące budowy, występowanie witaminy D i jej metabolizmu. W tej części rozprawy doktorskiej Doktorantka przedstawiła dane dotyczące witaminy D w przewlekłej chorobie nerek. Następnie Doktorantka przeszła do zagadnień tzw. niedoboru witaminy D. Omówiła m.in. zaburzenia gospodarki mineralnej u chorych po przeszczepieniu nerki, w patogenezie których może uczestniczyć witamina D. Przedmiotem kolejnej części *wstępu* były wyniki badań obserwacyjnych oceniających związki pomiędzy małym stężeniem witaminy D w osoczu a współchorobowością u chorych po przeszczepieniu nerki. *Wstęp* został zakończony omówieniem badań analizujących związki pomiędzy małym stężeniem witaminy D w osoczu a śmiertelnością u chorych po przeszczepieniu nerki. *Wstęp* rozprawy doktorskiej jest starannie napisany i dowodzi szerokiej wiedzy Doktorantki. Informacje podane w nim są odpowiednio usystematyzowane, niezmiernie szczegółowe i wyczerpujące. Na uwagę zasługuje fakt podkreślenia różnic

poniędzy hipotezami badawczymi wynikającymi z badań obserwacyjnych a wynikami badań interwencyjnych zarówno u chorych z PChN jak bez zaburzeń czynności nerek. Poza tekstem, we wstępie Autorka zamieściła ryciny ilustrującą zagadnienie metabolizmu witaminy D jak i 4 tabele.

Po wstępie rozprawy doktorskiej Doktorantka zamieściła rozdział *Założenia i cel pracy*. W tym krótkim rozdziale Autorka uzasadniła w sposób zwięzły celowość przeprowadzonych badań. Wymienionymi przez Doktorantkę celami pracy doktorskiej były: ocena stężenia aktywnych metabolitów witaminy D w surowicy oraz ich zmienności w zależności od pory roku u pacjentów ze stabilną czynnością nerki przeszczepionej w odległym okresie po przeszczepieniu nerki, ocena wpływu stężenia aktywnych metabolitów witaminy D na wskaźniki uszkodzenia nerki przeszczepionej, profil lipidowy oraz parametry stanu zapalnego, oraz ocena wpływu stanu odżywienia chorych po przeszczepieniu nerki na stężenie aktywnych metabolitów witaminy D.

Podjęty przez lek. Joannę Wilimborek temat porusza istotne i jak dotąd w nieznacznym stopniu zbadane zagadnienia dotyczące chorych po przeszczepieniu nerki i jest trafny, z punktu widzenia poznawczego, jak i mogący mieć istotne implikacje kliniczne. Jedynie pewne zastrzeżenie budzi w celach pracy sformułowanie: „ocena wpływu”. W pracy będącej badaniem obserwacyjnym można analizować jedynie związki pomiędzy badanymi parametrami. Dlatego też w celach pracy bardziej poprawnie należałoby użyć sformułowania: „ocena związku”.

Jak to przedstawiono w rozdziale *Metody*, badanie kliniczne, którego wyniki są przedmiotem pracy doktorskiej miało charakter badania prospektywnego, obserwacyjnego. Do tego badania zakwalifikowano 105 chorych w odległym okresie po przeszczepieniu nerki przeszczepieniu nerki ze stabilną czynnością nerki przeszczepionej poddawanych typowemu leczeniu immunosupresyjnemu, a całe badanie ukończyło 64 chorych. Kryteria kwalifikacji

do badania jak i kryteria wykluczające z udziału w badaniu zostały ustalone w sposób bardzo staranny. Wykluczono m.in. chorych z zaburzeniami gospodarki wapniowo-fosforanowej, oraz ze znanymi czynnikami wpływającymi na stężenie kalcydiolu i kalcytriolu tj. stosowaniem witaminy D i zwiększoną ekspozycją na słońce wynikającą z zagranicznych podróży. U chorych poddanych badaniu dwukrotnie tj. latem i zimą oceniono parametry antropometryczne, przeprowadzono analizę składu ciała za pomocą badania spektroskopii bioimpedancyjnej, oraz oznaczono w surowicy krwi żyłnej stężenia m.in.: kreatyniny, albuminy, białka całkowitego, PTH, wapnia, fosforu, cholesterolu, cholesterolu HDL, triglicerydów, glukozy, białka, CRP, 25(OH)D, 1,25(OH)₂D i FGF 23. Ponadto oznaczono stężenie albuminy i kreatyniny w porannej próbce moczu. Następnie wyliczono stężenie cholesterolu LDL, eGFR i wskaźnik albuminuria/kreatyninuria.

Na podstawie stężenia 25(OH)D w surowicy chorych zakwalifikowano do następujących grup:

- 50-30 ng/ml: prawidłowe, optymalne stężenie witaminy D
- 15-30 ng/ml: hipowitaminoza, niedostateczne stężenie witaminy D
- <15 ng/ml: znaczący niedobór stężenie witaminy D
- <5 ng/ml: ciężki niedobór stężenie witaminy D

W rozprawie przejrzyste i szczegółowo scharakteryzowano grupę badaną, co wskazuje na dobrą znajomość podejmowanej w pracy tematyki.

Metodyka badań i metody analizy statystycznej nie budzą istotnych zastrzeżeń i zostały przedstawione w rozdziale *Metody* w sposób wyczerpujący. Na uwagę zasługują fakt przeprowadzenie licznych wielokierunkowych badań wykonanych przy użyciu zarówno metod laboratoryjnych i fizycznych. O złożoności protokołu i licznych istotnych klinicznie kryteriów wykluczających chorych z badania świadczy najlepiej fakt ukończenia całego badania przez ok. 60% uczestników, którzy badanie rozpoczęli. Pewne zdziwienie budzi jedynie fakt podania w charakterystyce badanej grupy długości geograficznej, które nie ma

przecież związku z analizowanymi parametrami, w tym ze stężeniami aktywnych metabolitów witaminy D. Określając natomiast szerokość geograficzną należałoby podać zakres szerokości geograficznej miejsca zamieszkania chorych. Literalnie czytając tę część doktoratu można by powziąć zapewne mylne podejrzenie, że uczestnicy badania zamieszkują niewielki obszar o wielkości ok. 3 km² co zapewne nie jest zgodne ze stanem faktycznym. Te drobne uwagi nie wpływają jednak w sposób istotny na wysoką ocenę metodyki pracy.

W rozdziale *Wyniki* Autorka prezentuje w sposób uporządkowany uzyskane wyniki. Na początku tego rozdziału dysertacji Doktorantka przedstawiła charakterystykę grupy badanej, a następnie dokonała porównania badanych parametrów latem i zimą. W pracy stwierdzono m.in. lepszą czynność nerki przeszczepionej, większe BMI i większy wskaźnik tkanki tłuszczowej zimą niż latem. Wykazano mniejsze stężenia aktywnych metabolitów witaminy D przy wyższych stężeniach wapnia i fosforanów i FGF 23 w surowicy zimą niż latem. W kolejnej części rozdziału *wyniki* doktorantka przedstawiła parametry antropometryczne, biochemiczne oraz skład ciała u chorych po przeszczepieniu nerki w zależności od zasobów witaminy D. W tej części pracy Doktorantka podzieliła badanych chorych na wcześniej określone 3 podgrupy: chorych z prawidłowym stężeniem kalcydiolu w osoczu, z niedostatecznym stężeniem kalcydiolu w osoczu i ze znacznym niedoborem kalcydiolu. Taki podział spowodował, że liczby badanych w porównywanych podgrupach różniły się znacznie. W podgrupie chorych z populacyjnie uznawanym za prawidłowe stężeniem 25(OH)D w surowicy było jedynie 4 chorych. W tej części pracy próbując znaleźć zależności pomiędzy stężeniem kalcydiolu w surowicy a parametrami antropometrycznymi, biochemicznymi oraz składem ciała korzystniej byłoby podzielić badanych chorych na równoliczne 3 podgrupy kierując się tercylami stężeniem kalcydiolu w surowicy, lub na 2 podgrupy biorąc pod uwagę medianę stężeniem kalcydiolu w surowicy.

W badaniu oceniano wskaźnik albuminuria/kreatyninuria. Dlatego poprawnym w rozdziale *wyniki* jest używanie pojęcia albuminuria a nie białkomocz.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie nie występowania korelacji pomiędzy stężeniami kalcydiolu i kalcytriolu w surowicy.

Porównując biorców według wskaźnika tkanki tłuszczowej stwierdzono istotnie statystycznie większe stężenie kalcydiolu w surowicy u chorych z wskaźnikiem tkanki tłuszczowej < 90 percentyla w porównaniu do chorych z wskaźnikiem tkanki tłuszczowej \geq 90 percentyla. Wykazano wynikającą z wyników analizy korelacji odwrotną zależność stężenia kalcydiolu w surowicy i wskaźnika tkanki tłuszczowej (FTI). Wyniki te wskazują, że u chorych po przeszczepieniu nerki, podobnie jak w populacji ogólnej, nadmiar tkanki tłuszczowej jest czynnikiem ryzyka tzw. niedoboru witaminy D.

Dyskusja prowadzona ciekawie zawiera rzeczową i samodzielną interpretację wyników, a Doktorantka skonfrontowała własne wyniki z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów prac. W tej części dysertacji Autorka podkreśla występowanie wątpliwości dotyczących wartości stężeń kalcydiolu w osoczu uznawanych za prawidłowe. Dyskusja jakkolwiek poprowadzona bardzo szeroko i skrupulatnie, pominęła dwie ciekawe obserwacje uzyskane w pracy, a podane w rozdziale *wyniki*. Pierwsza z nich jest występowanie wyższych stężeń wapnia i fosforanów w surowicy przy mniejszych stężeniach aktywnych metabolitów witaminy D zimą niż latem. Drugą z nich natomiast jest stwierdzenie lepszej czynności nerki przeszczepione zimą niż latem, co może mieć istotne znaczenie kliniczne, jakkolwiek pozostaje poza głównym nurtem problematyki dysertacji.

Rozprawę kończą wnioski, których treść jest zgodna z celami pracy.

Piśmiennictwo obejmuje prace do 2019 roku, które są prawidłowo dobrane i odpowiednio cytowane w tekście.

W mojej opinii rozprawa zawiera drobne niedoskonałości o charakterze edytorskim i językowym np. używanie określenia *ilość* zamiast *liczba* przy rzeczownikach policzalnych, czy też stosowanie żargonu: np. „włączanie chorych do leczenia”, „włączanie leku do leczenia”. Z obowiązku recenzenta chciałbym również zwrócić uwagę, że w pracy stwierdza się nieliczne błędy typograficzne. Powyżej opisane drobne niedoskonałości w żadnej mierze nie wpływają jednak na wysoką ocenę przeprowadzonych badań i samej rozprawy.

Oceniając pracę, należy podkreślić umiejętność skonfrontowania własnych wyników z danymi literaturowymi. Praca jest dobrym opracowaniem odpowiednio dobranego materiału klinicznego z zastosowaniem w przeważającej mierze adekwatnych narzędzi badawczych. Ponadto poza opisanymi powyżej niedoskonałościami rozprawa została poprawnie opracowana pod względem edytorskim.

Autorka dowiodła zdolności prowadzenia oryginalnych badań klinicznych oraz wykazała się dobrym przygotowaniem merytorycznym i umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania problemów naukowych.

Kończąc pragnę jeszcze raz podkreślić istotne walory poznawcze wykonanych badań. Za najważniejsze osiągnięcie badawcze ocenianej rozprawy należy uznać wykazanie przez Doktorantkę, że podobnie jak w populacji ogólnej u chorych po przeszczepieniu nerki nadmiar tkanki tłuszczowej jest czynnikiem ryzyka tzw. niedoboru witaminy D.

Rozprawa doktorska lek. Joanny Wilimborek spełnia ustawowe wymogi uzyskania stopnia naukowego doktora.

Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Joanny Wilimborek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

H Adamczak

Prof. dr hab. n. med. Marcin Adamczak