Katedra i Klinika Nefrologii i Transplantologii
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum w Krakowie

27.10.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani lek. Barbary Musiałowskiej-Lejczyk zatytułowanej: ***„Stężenie witaminy D i białka wiążącego witaminę D (vit. D BT) u pacjentów Podstawowej Opieki Zdrowotnej".***

Przewód doktorski prowadzony jest **w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.**

Szacuje się, że niedobór witaminy D dotyczy nawet 90% populacji polskiej. Witamina D odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu organizmu. Poza działaniem klasycznym, czyli kalcemicznym, które polega na regulacji wchłaniania i wydalania wapnia oraz wpływie na metabolizm tkanki kostnej, ostatnio coraz częściej wskazuje się na działanie plejotropowe,

W 2018 r. ukazała się nowelizacja rekomendacji dotyczących zasad suplementacji i leczenia witaminą D dla Polski, które są nadal obowiązujące. Autorzy zwracają uwagę, że profilaktyczna suplementacja witaminą D jest konieczna w całej populacji, jednak dawkowanie powinno być zindywidualizowane w zależności od wieku, masy ciała, pory roku oraz diety i trybu życia. Doskonale wiemy, że choroby układu krążenia są główną przyczyną zgonów na świecie. W wielu doniesieniach wykazano, że zachorowalność i śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia witaminy D w surowicy, a ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych, również tych niezakończonych zgonem, jest nawet 7-krotnie większe.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Barbary Musiałowskiej-Lejczyk ma 124 strony wydruku komputerowego, podzielonego na 6 rozdziałów, poza tym

zamieszczony jest wykaz stosowanych skrótów, podsumowanie w postaci streszczenia w języku polskim i języku angielskim najważniejszych wyników badawczych. W pracy zamieszczono 35 tabel, 38 rycin wraz z opisem, a piśmiennictwo liczy 134 pozycji. Ponadto dane uzupełniające zawierają Formularz Świadomej Zgody na Udział w Badaniu oraz Zgodę Komisji Bioetycznej.

W liczącym 24 stron *Wstępie* Doktorantka w sposób wyczerpujący przedstawiła charakterystykę i metabolizm wit. D, aktywność biologiczną receptora dla wit. D oraz omówiła rolę w praktyce klinicznej z uwzględnieniem chorób układu krążenia wraz z nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą i przewlekłą chorobą nerek (PChN).

Przedstawiła także *Wytyczne suplementacji witaminy D dla populacji ogólnej i dla grup ryzyka w Polsce*, zaktualizowane w 2023 roku, które zostały opracowane przez Polskie Towarzystwo Endokrynologii Dziecięcej i Cukrzycy we współpracy z panelem ekspertów w postaci konsultantów z różnych dziedzin medycyny.

Warte podkreślenia są zawarte w tabeli 4 *Zalecenia suplementacji witaminy D w polskiej populacji ogólnej w zależności od wieku,* ale także ujęte objawy toksycznego działania witaminy D. Doktorantka odniosła się do wytycznych KDIGO *(Kidney Disease Improving Global Outcome)* z 2012 roku dotyczące gospodarki mineralno-kostnej u chorych w przewlekłą chorobą nerek (PChN). Niedosyt budzi może brak ujęcia aktualizacji zaleceń *KDIGO* z 2017 roku.

Wstęp dowodzi znajomości Doktorantki na temat mechanizmów biochemicznych, patomechanizmu działania witaminy D, głównych źródeł witaminy, metabolizmu, korzyści, jak i skutków ubocznych, aktualnych wytycznych dotyczących leczenia, co dobrze rokuje na możliwość przeprowadzenia badań i postawienie celów badawczych.

Cele pracy zostały sformułowane czytelnie pod postacią 3 głównych założeń:

-ocena stężenia witaminy D, białka wiążącego witaminę D i receptora witaminy D w populacji ogólnej Podstawowej Opieki Zdrowotnej,

-ocena ich stężenia w grupie pacjentów z chorobami współistniejącymi, takimi jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, PChN.

oraz w grupie pacjentów z innymi wybranymi chorobami przewlekłymi w populacji Podstawowej Opieki Zdrowotnej.

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku na posiedzeniu 31 stycznia 2019 roku (nr zgody R-I-002/24/2019)- zgoda umieszczona w aneksie-X.

MK

Z punktu oceny recenzenta jestem zobowiązany do zwrócenia uwagi o zamieszczeniu w tekście na stronie 35 błędnej informacji: na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Uchwała nr: R-I-002/238/2011) (Aneks).

Materiał i metody badawcze przedstawione w rozdziale 3, gdzie do analizy włączono 256 dorosłych pacjentów w wieku 19-65 lat będących pod opieką Akademickiej Praktyki Medycyny Rodzinnej w Białymstoku.

W zależności od występujących chorób grupę podzielono na grupę referencyjną, obejmującą 56 pacjentów bez chorób przewlekłych oraz grupę badaną, stanowiącą 196 pacjentów z chorobami przewlekłymi. Grupę tą podzielono na 4 grupy ze względu na występowanie nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, PChN i zaburzeń lipidowych. Mediana wieku pacjentów w grupie badanej wynosiła 58 lat. Kobiety stanowiły 76,1% pacjentów, mężczyźni zaś 23,9%. U 125 pacjentów (63,7%) występowało: nadciśnienie tętnicze, u 27 (13,7%) cukrzyca, u 97 (49%) zaburzenia lipidowe, natomiast u 8 pacjentów (4%) występowała PChN.

W grupie referencyjnej nie występowały choroby przewlekłe i pacjenci nie stosowali leczenia farmakologicznego, mediana wieku wynosiła 49,5 lat.

U wszystkich pacjentów z grupy badanej i referencyjnej oznaczono w surowicy stężenia całkowitej witaminy D_3 (Total 25(OH)), 1,25-dihydroksywitaminy D_3, białka wiążącego witaminę D oraz receptora witaminy D za pomocą immunoenzymatycznych testów ELISA.

W prezentowanej pracy wykorzystano oprogramowanie Statistica 13, natomiast do analizy rozkładu badanych cech posłużono się testem Shapiro-Wilka oraz sprawdzono jednorodność wariancji testem Levene'a. W sytuacji gdy badane zmienne miały rozkład zbliżony do normalnego, do oceny istotności różnic stosowano test t-Studenta, jeżeli rozkład odbiegał od normalnego, stosowano test Manna-Whitneya. Różnicę między zmiennymi uznawano za istotną statystycznie przy $p<0,05$. Analizowane dane ilościowe przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe lub wartości mediany z przedziałem ufności. Do oceny zależności między zmiennymi losowymi zastosowano współczynnik korelacji Pearsona. Analiza statystyczna pracy została przeprowadzona poprawnie.

Doktorantka przedstawiła *Wyniki* pracy na 11 stronach, zawierając je w 27 tabelach i na 35 rycinach.

W badanej populacji niedobór witaminy D w postaci obniżonego stężenia $25(OH)D_3$ dotyczył 43,9% pacjentów. Przy podziale grupy badanej ze względu na płeć Doktorantka zaobserwowała istotne statystycznie wyższe stężenie 1,25-dihydroksywitaminy D_3 u kobiet w porównaniu z

IK

mężczyznami. W całej grupie badanej zaobserwowano istotny statystycznie spadek stężenia wit. D 25(OH) total wraz ze wzrostem stężenia triglicerydów oraz ze wzrostem stężenia glukozy na czczo. Osoby, które suplementowały witaminę D grupy badanej mieli istotne statystycznie wyższe stężenie 25-hydroksywitaminy w porównaniu z pacjentami niesuplementującymi witaminę D, a suplementujący witaminę K mieli istotnie statystycznie wyższe stężenia 25-hydroksywitaminy D_3 w porównaniu z pacjentami niesuplementującymi witaminy K oraz wyższe stężenie VDBP niż pacjenci nie stosujący preparatów witaminy K.

Cenną obserwacją pracy jest przełożenie danych na obserwacje kliniczną pacjentów z nadciśnieniem, cukrzycą, PChN, dyslipidemią, niewydolnością serca i niedoczynnością tarczycy, gdzie wartości stężeń $25(OH)D_3$, $1\alpha,25(OH)_2D_3$, VDBP oraz VDR nie różniły się istotnie statystycznie w porównaniu z grupą referencyjną.

Kandydatka wykazała, że pacjenci z cukrzycą mieli istotnie statystycznie wyższe stężenie VDR w porównaniu z pacjentami bez cukrzycy w grupie badanej. Natomiast istotne statystycznie korelacje metabolitów witaminy D, VDBP i VDR występowały zaś w szczegółowej analizie w zależności od zmiennych, takich jak, płeć, masa ciała, BMI, wartości ciśnienia tętniczego, czynności serca, stężenia parametrów biochemicznych oraz współistnienia innych chorób. Badając dalej wpływ leków przewlekłych w grupie badanej Doktorantka sugeruje, że pacjenci stosujący ACE-I mieli istotne statystycznie niższe stężenia $1\alpha,25$-hydroksywitaminy D_3 w porównaniu z pacjentami nieprzyjmującymi tej grupy leków, zaś stosujący diuretyki mieli istotne statystycznie wyższe stężenie $25(OH)D_3$ w porównaniu z pacjentami nieprzyjmującymi diuretyków.

Pragnę zauważyć, że w nomenklaturze używamy stężenia witaminy D, a nie jak niejednokrotnie jest używane poziom stężenia.

W rozdziale poświęconym *Dyskusji* Kandydatka w sposób staranny i dokładny odniosła się do uzyskanych wyników, które analizowała w trakcie obserwacji. Opisała charakterystykę grupy badanej na tle danych dostępnych w literaturze, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu witaminy D na układ sercowo-naczyniowy, zaburzenia metaboliczne m in. cukrzycę oraz PChN.

Sama *Dyskusja*, którą Doktorantka przeprowadziła na 10 stronach jest przykładem precyzyjnego i systematycznego odniesienia się do uzyskanych wyników oraz porównania ich z dostępnymi publikacjami. Jak podkreśla w piśmiennictwie istnieją sprzeczne informacje na temat efektu suplementacji witaminy D. W pracy Kandydatki zaobserwowano istotne statystycznie wyższe stężenia 25-hydroskywitaminy D_3 związane z mniejszą masą ciała, mniejszymi wartościami BMI, niższym ciśnieniem rozkurczowym oraz niższą częstością pracy

MK

serca. Dodatkowo zaobserwowano wzrost stężenia VDR oraz stężenia 1α,25$(OH)_2D_3$ wraz ze wzrostem masy ciała oraz ze wzrostem czynności serca.

W dalszej części *Dyskusji* Doktorantka wykazała, że wśród pacjentów ze współistniejącym nadciśnieniem i nikotynizmem stwierdzono spadek stężenia VDBP wraz ze wzrostem ciśnienia skurczowego i rozkurczowego. Tę samą zależność zaobserwowano pomiędzy VDBP a ciśnieniem rozkurczowym w grupie kobiet z nadciśnieniem, palących wyroby tytoniowe Natomiast u mężczyzn ze współistniejącym nadciśnieniem i nikotynizmem stwierdzono istotny statystycznie spadek stężenia 1,25 OHVD3 wraz ze wzrostem wartości BMI oraz spadek 1,25 OHVD3 wraz ze wzrostem częstości pracy serca. Wyniki otrzymane przez Kandydatkę w grupie pacjentów z niewydolnością serca nie wykazały istotnych statystycznie różnic w stężeniach parametrów witaminy D w porównaniu z grupą referencyjną, a jak sama uważa może to wynikać prawdopodobnie z małej liczebności tej grupy.

Analizując osoby z cukrzycą stężenie receptora witaminy D było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z pacjentami bez cukrzycy. Zaobserwowano również ujemną korelację między stężeniem 25-hydroksywitaminy D, a czynnością serca oraz ujemną korelację między 1α,25-dihydroksywitaminą D_3, a masą ciała oraz BMI. Kandydatka zauważa, że w dostępnej literaturze brakuje badań dotyczących związku pomiędzy stężeniami metabolitów witaminy D, VDR i VDBP a zmiennymi, jak czynność serca i wartości ciśnienia tętniczego u chorych na cukrzycę.

Dobrze znany jest patomechanizm zmniejszenia stężenia 1α,25-dihydroksywitaminy D_3, które związane jest z uszkodzeniem nerek w przebiegu PChN i następowym zaburzeniem ekspresji 1α-hydroksylazy. Badając pacjentów z PChN w badanej grupie osób, nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach poszczególnych parametrów witaminy D w porównaniu z grupą referencyjną. Wyniki te prawdopodobnie były spowodowane związane z małą liczebnością grupy – pacjenci z PChN stanowili zaledwie 4,1% grupy badanej.

Warte uwagi są natomiast spostrzeżenia Doktorantki dotyczące profilu lipidowego w grupie referencyjnej. Zaobserwowano w tej grupie ujemną korelację pomiędzy stężeniem 25-hydroksywitaminy D_3 a LDL. Dodatkowo zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem VDR a cholesterolem całkowitym, Nie-HDL oraz TG. Kandydatka wysunęła tezę, że wyniki te mogą świadczyć o wpływie leków hipolipemizujących na stężenia metabolitów witaminy D, powodując ich wzrost, co koreluje z wynikami uzyskanymi w dostępnym piśmiennictwie. Dodatkowo możliwy jest również wpływ tych leków na stężenie jej receptora oraz białka transportującego, jednak w dostępnej literaturze brak danych na ten temat.

Pracę kończy 8 starannie przedstawionych wniosków, podsumowujących rozprawę i odpowiadających na postawione cele pracy. Niezwykle cenne jest zauważenie przez Kandydatkę wpływu niektórych leków, takich jak statyny, inhibitory konwertazy angiotensyny i leki moczopędne na stężenia metabolitów witaminy D, zaś na stężenie VDBP wpływa palenie wyrobów tytoniowych.

Z roli recenzenta chciałabym zasugerować konieczność przeprowadzania dalszych analiz wpływu witaminy D na szereg chorób towarzyszących w celu ustalenia kierunku działań dotyczących metod poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych, co byłoby cenne dla przygotowania publikacji. W toku dalszych badań warto pewnie zwiększyć liczbę chorych zakwalifikowanych do badania, także z innych ośrodków.

Praca doktorska Pani lek. Barbary Musiałowskiej-Lejczyk ma bardzo staranną szatę edycyjną, jest napisana czytelnym językiem. Opisy tabel i rycin ułatwiają orientację w analizowanych wynikach. Ułatwieniem jest zamieszczenie wykazu skrótów, które zostały zamieszczone na początku Dysertacji. Zestawienie piśmiennictwa i cytacje są poprawne.

Wielce Szanowny Panie Dziekanie,
Szanowni Państwo Przewodniczący Rady Nauk o Zdrowiu

Rozprawa doktorska lek. Barbary Musiałowskiej-Lejczyk jest przykładem kompleksowego, dobrze zaplanowanego badania o cennych implikacjach praktycznych i klinicznych.

Mając powyższe na uwadze, wnoszę o dopuszczenie lek. Barbary Musiałowskiej-Lejczyk do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim, gdyż przedstawiona przez Nią rozprawa spełnia warunki określone w art. 179 Ustawy 1 z dnia 03 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (dz.U. z 2018roku poz.1669 z późn. zm.) w związku z art.13 ust. 1. Ustawy z dnia 15 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789).

Dr hab. n.med. Marcin Krzanowski
Katedra i Klinika Nefrologii i Transplantologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski
specjalista chorób wewnętrznych
NEFROLOG
REUMATOLOG
1488013