



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
 Katedra Histologii,
 Gdański Uniwersytet Medyczny,
 ul. Dębinki 1a, Pokój 15
 80-210 Gdańsk, Pomorskie
 Polska
 Tel: +48 583491455
 Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 08.11.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Marka Wójcika

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr Marka Wójcika jest: „**Analiza zależności genotyp fenotyp biochemiczny na podstawie parametrów gospodarki wapniowo fosforanowej, metabolitów witaminy D, markerów obrotu kostnego oraz składu ciała u pacjentów z podejrzeniem nadwrażliwości na witaminę D**”

Promotor pracy: **dr hab. n. med. Paweł Płudowski, prof. IPCZD**
 Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej
 Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Witamina D od wielu lat wiązana jest z prawidłowym funkcjonowaniem naszego ciała, ze szczególnym uwzględnieniem układu kostnoszkieletowego. Dobrze poznana jest rola witaminy D w regulacji poziomu wapnia i fosforanów, które to mają kluczowe znaczenie dla właściwego działania tkanki kostnej, mięśniowej, nerwowej, nabłonkowej, czy też aktywności układu immunologicznego. Pomimo udowodnionego związku niedoboru witaminy D z występowaniem oraz nasileniem się objawów wielu chorób, takich jak krzywica czy osteoporoza, jej zastosowanie w profilaktyce, czy też w terapii, było do niedawna w dużej mierze ograniczone. Główny powodem było potencjalne zagrożenie hiperkalcemią, spowodowaną podwyższonym poziomem witamin D. Coraz więcej jednak wiadomo o mechanizmach wywołujących zależną od witaminy D hiperkalcemię i co istotne, wydaje się, że kluczową rolę odgrywają w jej rozwoju inne czynniki, niż suplementacja witaminą D. Stopniowo też zmienia się wśród lekarzy podejście do witaminy D, na co wpływają zapewne zmiany w rekomendacjach oraz coraz jej większej dostępności na rynku. Tak, więc rozprawa doktorska mgr **Marka Wójcika** dotycząca **znacznie witaminy D i jej metabolitów u pacjentów z podejrzeniem nadwrażliwości na tę witaminę**, świetnie wpisuje się w nurt najnowszych badań i przyczyni się zapewne do lepszego zrozumienia jej plejotropowego charakteru.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Marka Wójcika została przygotowana w formie monografii, w tak zwanym „starym trybie” (Zgodnie z rozporządzeniem

MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 r; będącym nowelizacją art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Manuskrypt zawiera: 98 stron, w tym: 4 ryciny i 20 tabel. Zgodnie z informacjami podanym przez autora (strony 79-80) wyniki przedstawione w ramach rozprawy zostały już częściowo opublikowane:

- Janiec A, Halat-Wolska P, Obrycki Ł, Ciara E, Wójcik M et al. (2020) Long-term outcome of the survivors of infantile hiperkalcemia with CYP24A1 and SLC34A1 mutations. *Nephrol Dial Transplant*;1-9: 10.1093
- Kowalska E, Rola R, Wójcik M, Łaszcz N et al. (2021) Analysis of vitamin D3 metabolites in survivors of infantile idiopathic hyperkalcemia caused by CYP24A1 mutation or SLC34A1 mutation. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; w druku.

Należy odnotować, że są to wieloautorskie prace badawcze, w których mgr **Marek Wójcik** był odpowiednio piątym i trzecim autorem, a jego wkład w te badania nie został dokładnie określony. Natomiast tematyk tych prac pokrywa się z prezentowanymi wynikami w rozprawie doktorskiej. Warto, również dodać, że prezentowane w pracy doktorskiej wynik uzyskano w trakcie realizacji projektu badawczego UMO 2013/11/B//NZ4/03832.

b) ocena uzyskanych rezultatów

Głównym celem prezentowanej rozprawy jest wieloparametrowa ocena stanu zdrowia dzieci hospitalizowanych na oddziale lub przyjętych w poradni Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (IPCZD), u których w okresie niemowlęcym stwierdzono hiperkalcemię ($Ca > 2,69$ mmol/l) o nieznannej przyczynie, lub będących pod opieką poradni IPCZD w latach 80-tych oraz 90-tych XX wieku z powodu wystąpienia hiperkalcemii idiopatycznej.

Rozprawa doktorska Pana mgr **Marka Wójcika** oparta jest o badania przeprowadzone na grupie 67 osób z udokumentowanymi epizodami hiperkalcemii idiopatycznej w dzieciństwie, którą porównano do dobrze dobranej grupy kontrolnej (n=83). Warto podkreślić, że skompletowanie tak licznej grupy badawczej, było możliwe dzięki włączeniu pacjentów IPCZD z okresu obejmującym ponad trzydzieści lat. O ile takie podejście umożliwiło zebranie tak licznej grupy badawczej, to z drugiej należy założyć, że na efekt pomiarów mógł mieć wpływ wiek badanego, czas od ostatniego epizodu hiperkalcemii, zastosowana terapia, czy działania profilaktyczna. U wszystkich uczestników badań wykonano szereg oznaczeń biochemicznych, pomiarów densytometrycznych oraz badań genetycznych, mających na celu ocenę parametrów gospodarki wapniowo-fosforowej, markerów obrotu kostnego, metabolizmu witaminy D, czy też analizy antropometrycznej. Badania te miały na celu stwierdzenie, czy występowanie idiopatycznej hiperkalcemii związane jest z nadwrażliwością na witaminę D.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przedstawionych badań, należy wymienić:

1. Potwierdzono, że u pacjentów z mutacją CYP24A1 stosunek $25(OH)D_3/24,25(OH)_2D_3$ jest większy niż w przypadku osób bez mutacji; natomiast sama stężenie $24,25(OH)_2D_3$

jest niższe u pacjentów z mutacją w porównaniu do osób zdrowych, pacjentów z hiperkalcemią bez stwierdzonej mutacji, oraz osób z mutacją w genie SLC34A1. Wynik ten wskazuje na zastosowanie tego parametru w diagnostyce hiperkalcemii związanej z mutacją w genie CYP24A1.

2. Osoby, z epizodem hiperkalcemii w wywiadzie, mają podwyższone poziom witaminy D (stężenie 25(OH)D w surowicy oraz 1,25(OH)₂D₃), co jest szczególnie widoczne w grupie osób z mutacją w genie CYP24A1. Wynik ten sugeruje istnienie dodatkowych czynników wpływających na podwyższenie stężenia 25(OH)D w tej grupie pacjentów, co wymaga za pewne dalszych badań.
3. Osoby, z epizodem hiperkalcemii w wywiadzie wykazywał właściwy poziomu wapnia w surowicy, pomimo zaobserwowanej przetrwałej hiperkalciurii. Efekt ten był niezależny od obecności mutacji w genie CYP24A1.
4. Przeprowadzone badania potwierdziły zahamowanie wydzielania PTH u pacjentów z mutacją CYP24A1. Z drugiej strony zaobserwowano podwyższone stężenia cystatyny C, oraz zmiany profilu stężenia mocznika i kreatyniny, co może mieć znaczenie kliniczne.
5. Przebycie w dzieciństwie epizodu hiperkalcemii nie wpływało na wartości parametrów antropomorficznych, z wyjątkiem masy tkanki tłuszczowej. Ciekawy jestem jak autor interpretuje tę obserwację.
6. U osób z zaburzeniami gospodarki wapniowo-fosforanowej obserwowano zwiększonego całkowity obrót kostny (zarówno markerów kościotworzenia, jak resorpcji kości).

Należy podkreślić, że praca jest bardzo obszerna i zawiera imponującą ilość oznaczeń biochemicznych, a wyniki omówione są w sposób systematyczny i rzetelny. Wydaje mi się, że w tabelach przedstawiających wyniki mogłyby się znaleźć wartości referencyjne (są one opisane w Materiałach i metodach badawczych). Mam również pytania dotyczące grupy badawczej. Czy brano pod uwagę porę roku, kiedy przeprowadzono pomiary poziomu metabolitów witamin D? Czy brano pod uwagę suplementację i dietę?

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Rozprawa napisana jest poprawnie, chociaż zawiera sporo nieścisłości, które być może nie mają znaczenia merytorycznego dla samej pracy, ale wymagają wyjaśnienia i poprawy, oto kilka przykładów:

- Strona 5. Prof. A Windaus nie do końca dostał nagrody Nobla za witaminę D, w dziedzinie chemii w 1928 r. Nagrodę przyznano bardziej ogólnie za pracę nad sterolami i ich związkami z witaminami. Natomiast warto byłoby w tym miejscu wspomnieć, że to Prof. Windaus opracował i opatentował metodą syntezy witaminy D, co stało się przełomem, jeśli chodzi o produkcję suplementów z witaminą D.
- Strona 5/6. Obie formy witaminy D (D₂ i D₃), nie mogą mieć takiego samego wzoru sumarycznego C₂₈H₄₃OH (raczej powinno być C₂₈H₄₄O), bo witamina D₂ ma dodatkową grupę hydroksylową i wiązanie podwójne, zresztą jest to opisane w następnym zdaniu. A więc witamina D₂ C₂₈H₄₄O, a D₃ C₂₇H₄₄O.
- Strona 6. Witamina D₂ występuje u grzybów i glonów, które generalnie według najnowszej systematyki stanowią oddzielne królestwa, natomiast rośliny produkują

raczej D₃, chociaż tylko niektóre i w małych ilościach. Warto dodać, że lumisterol i jego pochodne wykazują aktywność biologiczną (*Cell Biochem Biophys.* 2020 Jun;78(2):165-180).

- Strona 6. Lumisterol oraz tachysterol są naturalnymi izomerami witamin D, które generalnie powstają podobnie jak witamin D w wyniku przerwania łańcuch B i to powstają w podobnych ilościach. Podwyższona temperatura sprzyja izomeryzacji do witamin D. Natomiast nadmierna ekspozycja na UVB powoduje dalsze przemiany, co prowadzi do powstawanie np. superasteroli.
- Strona 8. Cyp27A1 nie jest głównym enzymem będącym 25-hydroksylazą witamin D, warto o tym pamiętać. Enzymem tym jest CYP2R1.
- Strona 9. „Heterodimer VDR-RXR oddziałuje za pośrednictwem 1,25(OH)₂D ze specyficznymi sekwencjami DNA.” Miejsce wiązania witaminy D znajduje się w innej domenie VDR, niż miejsce wiązania do DNA.
- Strona 19. Glikokortykosteroidów raczej glikokortykosteroidów
- Strona 23. „Stężenie następujących parametrów” raczej wartości parametrów lub stężenie markerów.
- Strona 25. Warto byłoby stosować jedną nomenklaturę dotyczącą badania DXA, raczej jest to technika densytometria dwuwiązkowa lub podwójnej wiązki promieniowania Rtg – DEXA, oczywiście są to dwie wiązki o różnej energii.
- Strona 34 i dalej „nie odbiegały znacząco od wartości oczekiwanych w fizjologii.” Może lepiej wartości fizjologicznych, a chyba najlepiej było napisać wartość w granicach normy lub wartości referencyjnych.
- Strona 34. „nie różniły się istotnie od wartości zero” – o jaką wartość chodzi? Czy o wartość referencyjną czy o „0”?
- Strona 53 i inne strony. Warto byłoby stosować tę samą nomenklaturę raz jest ilorazu 25(OH)D₃ /24,25(OH)₂D₃, raz mowa jest o stosunku, a w tabeli 16 jest współczynnik R.
- Strona 60 – „markera kości otworzenia” czy chodziło o marker kościotworzenia?
- Strona 85 - „kidney function and function,” – powtórzenie.

Chciałbym podkreślić, że niewielki błędy, które wymieniłem, nie wpływają na ogólną ocenę pracy i są zrozumiałe w przypadku tak obszernego opracowania (blisko 100 stron).

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

Praca mgr Marka Wójcika zawiera 108 dobrze dobranych odnośników literaturowych. Niestety, prace z ostatnich 5 lat, stanowią tylko niewielką część cytowanej literatury. Natomiast autor umiejętnie wykorzystuje literaturę tłumacząc skomplikowane interakcje oraz zaburzenie gospodarki wapniowo-fosforanowej leżące u podstaw idiopatycznej hiperkalcemii.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Podjęta tematyka badawcza jest niezmiernie istotna nie tylko z klinicznego punktu widzenia, ale też w wymiarze społecznym. Od wielu lat, bowiem toczy się debata na temat suplementacji witaminą D w kontekście dawkowania i potencjalnej toksyczności. Przez ponad 50 lat, stosowanie witaminy D było w dużej mierze ograniczone z uwagi na potencjalne efekty uboczne, w tym wystąpienie hiperkalcemii, hiperkalciurii, czy kamicy nerkowej. W połączeniu z powszechnymi obawami przed ekspozycją na światło słoneczne, brak odpowiedniej suplementacji wywołał globalną pandemię deficytu witaminy D. Badania ostatnich lat, w tym zaprezentowane w recenzowanej rozprawie, w pewnym sensie „odczarowują” witaminę D, wskazując, że przyczyną rozwoju nadwrażliwości na witaminę D i występowanie idiopatycznej hiperkalcemii, nie jest jej nadmierna suplementacja, tylko może mieć podłoże genetyczne.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

Bardzo ciekawym i poniekąd wymuszonym przez dostępność pacjentów, wydaje się przeprowadzenie badań na dwóch grupach pacjentów: dzieci, u których w trakcie diagnostyki w IPCZD stwierdzono idiopatyczną hiperkalcemię, oraz młodych dorosłych, którzy w dzieciństwie byli hospitalizowani właśnie z tego powodu. Takie podejście badawcze umożliwiło zarówno ocenę stanu pacjentów w trakcie epizodu hiperkalcemii, jak i odległych efektów, liczonych w latach po hospitalizacji. Warto podkreślić jest również kompleksowość badań, a więc połączenie analizy profili biochemicznych, ocenę masy kostnej i składu ciała z badaniami genetycznymi.

Rozdział Materiały i metody badawcze zawiera opis poszczególnych oznaczeń badanych markerów. Niestety, opis ten jest bardzo ogólny i w dużej mierze ogranicza się do wyjaśnienia zasady działania danego testu, a nie konkretnego sposobu wykonania oznaczeń, który umożliwiłby ich powtórzenie. Nie do końca jest również jasne, które oznaczenia wykonywał doktorant, a które laboratorium IPCZD lub inne podmioty. Najprostszą i coraz częściej stosowaną metodą jest podawanie konkretnych nazw zestawów wraz z numerami katalogowymi oraz producentem, a następnie odniesienie metodyki do instrukcji dołączonej przez producenta.

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy zaprezentowany w pracy Pana mgr Marka Wójcika.** Bardzo wiele prac niestety ogranicza się do wykonania kilku najprostszych oznaczeń, a tylko taka kompleksowa analiza oraz połączenie analizy parametrów biochemicznych z badaniami genetycznymi pozwala na wyciągnięcie właściwych wniosków.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma klasyczny układ, zawiera szczegółowy spis treści, bardzo obszerny wstęp systematycznie wprowadzający czytelnika w tematykę witaminy D. Wstęp rozpoczyna się od rysu historycznego, a później omawia wszystkie istotne zagadnienia związane z witaminą D (syntezę, metabolizm, źródła i deficyt). Szczególnie istotne z punktu widzenia rozprawy są rozważania dotyczące przyczyn niedoboru oraz nadwrażliwości na witaminę D. Następnie, praca zawiera dość rozbudowany cel pracy, oraz wypunktowane trzy cele cząstkowe. Kolejny rozdział opisuje materiały i metody badawcze. W tym, miejscu warto zwrócić uwagę na bardzo

istotny dodatek (Rozdział 3.4 Kryteria oceny parametrów biochemicznych), który jest niezbędny do prawidłowej interpretacji wyników. Jak już wspominałem powyżej, szkoda, że wartości referencyjne dla poszczególnych parametrów nie zostały powtórzone w tabelach z wynikami. Następnie umieszczone zostały rezultaty, dyskusja oraz spis literatury. Dodatkowo manuskrypt zawiera omówienie dwóch publikacji, które podobnie jak prezentowana do oceny rozprawa doktorska, powstały w ramach projektu badawczego (UMO 2013/11/B//NZ4/03832). Manuskrypt uzupełniony jest o spis rycin i tabel, ale nie zawiera spisu skrótów, który za pewne by się przydał.

Praca jest przejrzysta, a ryciny i tabele są czytelne. Dyskusja jest bardzo dojrzała, a autor konsekwentnie w oparciu o dane literaturowe przedstawia wnikliwą analizę uzyskanych wyników. Pracy zawiera bardzo cenny rozdział Wnioski, który w ośmiu punktach podsumowuje najważniejsze osiągnięcia przedstawione w pracy. Streszczenie jest stosunkowo długie i ogranicza się do omówienia wyników, brakuje troszeczkę podsumowania. Bardzo zastanawiający są wyniki dotyczące osób z grupy badanej (z epizodem hiperkalcemii w wywiadzie), ale bez mutacji CYP24A1 lub SLC34A1. Osoby te mają podwyższony poziom $25(\text{OH})\text{D}_3$ oraz $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ przy obniżonym poziomie $24,25(\text{OH})_2\text{D}$. Czy autor może zaproponować jakąś interpretację tych wyników i co może być w tej grupie przyczyną hiperkalcemii?

Chciałbym podkreślić, że wszystkie uwagi, pytania i sugestie zawarte w przedstawionej recenzji, w żadnej mierze nie umniejszają dokonań **mgr Marka Wójcika** oraz wysokiej wartości poznawczej prezentowanych wyników, a raczej stanowią zachętę do dalszej pracy nad warsztatem badawczym oraz umiejętnością prezentacji wyników.

3) wnioski końcowe (konkluzja).

Podsumowując, monografia mgr Marka Wójcika oparta jest o bardzo dobrze dobraną grupę badawczą, zestaw testów biochemiczny, pomiary składu ciała, oraz badań genetycznych. Wyniki zostały dobrze opisane i zilustrowane, a dyskusja w bardzo konsekwentnie i wnikliwie omawia rezultaty badań w odniesieniu do dostępnej literatury. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a kandydat wykazał się zarówno wiedzą jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Uważam, więc że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, wniosek o dopuszczenie magistra Marka Wójcika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dnia 08.11.2021

Prof. dr hab. Michał Żmijewski

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny