

Białystok, 7 listopada 2021

Opinia na temat rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Marka WÓJCIKA

zatytułowanej

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

Opinię niniejszą sporządziłem w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Instytutu Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie na recenzenta w przewodzie doktorskim Kandydata.

Rozprawa stanowi zwieńczenie wielodyscyplinarnych, prowadzonych w trybie długofalowym, badań w ramach szerszego niż temat rozprawy, obszernego projektu NCN (grant UMO-2013/11/B/NZ4/03832), którego beneficjentem był Instytut. Na wstępie zaznaczam, że należy uznać za ważny, nobilitujący i wartościowy fakt udziału doktoranta w takim przedsięwzięciu. Praca została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Pawła Płudowskiego z Zakładu Biochemii, Radioimmunologii i Med. Doświadczalnej IPCZD, znanego i liczącego się nie tylko w Polsce eksperta z zakresu badań nad witaminą D. Ujęcie tematu podjętego przez doktoranta Marka Wójcika jest bardzo szerokie i wielowątkowe, mimo iż sam temat dotyczy, w rzeczy samej, choroby rzadkiej, albo raczej patologii bardzo niszowej i – właśnie z tego powodu – rzadko wykrywanej, a w konsekwencji nieuświadamianej przez szerszy świat medyczny. Ambitny charakter tego opracowania wynika z: 1) trudnej, ciągle mało poznanej i niebanalnej materii badawczej jaką jest hiperkalcemia idiopatyczna 2) złożonej metodologii i wyrafinowanego warsztatu badawczego, z genetyką i badaniami molekularnymi włącznie. Warto dodać, że zagadnienie ma charakter wielospecjalistyczny (nefro, metabo, endo) i jest z pogranicza dziedzin klinicznych i laboratoryjnych.

Praca mgr M. Wójcika jest jasna pod względem przekazu oraz celów/założeń, ale jest jednocześnie dość skomplikowana dla czytelnika, gdy chodzi o warstwę semantyczną i wielorakość wątków. Wymaga dużego skupienia i wielokrotnego odwoływania się do metodologii w trakcie studiowania wyników i dyskusji. Jako przykład ilustrujący poziom skomplikowania podaję tytuł pracy, który jest bardzo złożony i szczegółowy, ale jednocześnie – stwierdzam obiektywnie – oddaje w pełni istotę podjętych badań. Z pozytywnych uwag ogólnych dodam, że badanie zostało bardzo dobrze zaplanowane, a protokół jest czytelny. Wynika to jasno również z publikacji załączonych do pracy doktorskiej, a tematycznie związanych ściśle z zagadnieniem rozprawy. Pan Marek Wójcik jest bowiem współautorem dwóch artykułów dotyczących długoterminowego monitorowania i późnych skutków zdrowotnych niemowlęcej hiperkalcemii w wieku dorosłym, a także oceny metabolitów witaminy D₃ u osób z samoistną hiperkalcemią wieku dziecięcego (*infantile idiopathic hypercalcemia*, IHH), potwierdzoną mutacjami: albo CYP24A1 albo SLC34A1. Wprawdzie Doktorant nie jest 1-wszym autorem tych prac – napisanych tu z prof. M. Litwinem w roli *senior author* – ale występuje w gronie autorskim dwukrotnie wraz z promotorem i miał w nich ważny merytoryczny udział. Od razu pragnę wyrazić opinię, że współautorstwo tych publikacji, zamieszczonych w wybitnych, renomowanych czasopismach [Kowalska E, Rola R, Wójcik (...) M Litwin M. Analysis of vitamin D₃ metabolites in survivors of infantile idiopathic hypercalcemia caused by CYP24A1 mutation or

SLC34A1 mutation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2021; Janiec A (...) Wójcik M, Płudowski P (...) Litwin M. Long-term outcome of the survivors of infantile hypercalcaemia with CYP24A1 and SLC34A1 mutations. *Nephrol Dial Transplant.* 2021], uwiarygadnia tę rozprawę.

Rozprawę doktorską stanowi zwarty manuskrypt napisany na 98 stronach, ułożony w sensownym logicznym układzie, podzielonym standardowo na rozdziały, opatrzone czytelnym spisem treści, w tym przypadku niezbędnym do komfortowego poruszania się w zawartości. Pod względem formalnym rozdziały są kompletne, kolejność odpowiednia, lista Piśmiennictwa zawierająca 109 pozycji – zredagowana prawidłowo. Na końcu znajdują się dwujęzyczne streszczenia, które są moim zdaniem za długie. Niestety w pracy brakuje ważnego elementu czyli wykazu skrótów i akronimów. Wprawdzie nie jest to formalnie wymagane, ale w rozprawie o tak wysokim poziomie złożoności i bogatej nomenklaturze jakaś alfabetyczna lista skrótów umieszczona na początku byłaby bardzo pomocna.

Za cel pracy Autor przyjął biochemiczną i densytometryczną ocenę stanu zdrowia pacjentów z hiperkalcemią samoistną (tj. co najmniej jednokrotnym pomiarem kalcemii i wynikiem podwyższonego stęż. wapnia $>2,69$ mmol/l) pozostających pod opieką IPCZD (hospitalizowanych w dzieciństwie lub prowadzonych w poradniach Instytutu), u których uzyskano w tamtym czasie również wynik stęż. 25(OH)D i/lub 1,25(OH)₂D. Badanie kliniczno-kontrolne miało charakter długofalowej obserwacji retrospektywno-prospektywnej, co wnosi istotny walor w poznawcze i naukowe elementy rozprawy. Obserwację prowadzono mianowicie u pacjentów (i/lub sparowanych, prawidłowo dobranych kontroli) rejestrowanych od 2000 roku w IPCZD. Cele szczegółowe (zdefiniowane przez Autora jako 3 cele „częstkowe”, co nie jest w moim odczuciu określeniem zbyt trafnym) zakładały ocenę BMD/BMC i składu ciała metodą DXA, ocenę „zakresu i kierunku zmian, którym podlega profil biochemiczny...” – co z kolei w moim rozumieniu powinno być nazwane *oceną dynamiki*, a także weryfikację algorytmu diagnostycznego do wstępnego wykrywania hiperkalcemii idiopatycznej. Zastanawia mnie dlaczego wśród tych celów nie pojawia się termin „fenotyp biochemiczny”, który jest określeniem zawartym w tytule pracy, ani też nie znajdują tu pytania o wyrażoną w tytule pracy zależność genotyp-fenotyp. W sumie jednak pytania badawcze postawione są zrozumiałe, a cele szczegółowe służą tu opisaniu albo osiągnięciu celu zasadniczego, jakim była analiza odległych skutków zdrowotnych, a raczej biochemiczno-laboratoryjnych u osób z podejrzeniem IH lub przeżytym epizodem samoistnej hiperkalcemii.

We wstępie, na 15 stronach, mgr M. Wójcik zredagował w sposób bardzo obszerny stan wiedzy na temat wit. D, w tym powiązania między badaniami podstawowymi i kliniką, mechanizmy działania biologicznego, metabolizm, zapotrzebowanie i zagadnienie niedoborów wit. D. W tym rozdziale pewne fragmenty mogły zostać pominięte, gdyż są poza głównym nurtem rozprawy, jak np. „Historia badań nad witaminą D...”, czy też „zawartość wit. D w produktach żywnościowych polskich”, zwłaszcza że „polskość” tych produktów w tytule Tab. 1 jest określeniem niefortunnym. Natomiast najcenniejszy wydaje się tutaj szczegółowy i dobrze napisany podrozdział 1.4. „Nadwrażliwość na wit. D”, ściśle merytorycznie związany z tematem i tytułem, a poza tym gruntownie poparty literaturą.

Metodologia w pracy jest kompletna, pod każdym względem prawidłowa, oparta na jasnych kryteriach doboru grup, bez zarzutu opracowana pod względem statystycznym i odzwierciedla w zasadzie metody użyte we wspomnianych publikacjach zagranicznych komentujących rozprawę. Jakość badań wynika z nowoczesnych technik i unikalnego warsztatu laboratoryjnego zastosowanych w tym projekcie tj. oprócz standardowego oznaczenia gospodarki Ca/P w krwi i moczu, są to: LC z tandemową spektrometrią mas do oznaczenia metabolitów wit. D, chemiluminescencja (25OHD, 1,25[OH]₂D; bALP OC, CTx, PINP fosfataza kwasna winianooporna – czyli markery resorpcji i kościotworzenia), ELISA, immunoradiometria (PTH), immunoenzymatyczna metoda do oceny FGF-



23 i białka Klotho. Warte uwagi jest przy tym uczciwe podanie przez Doktoranta źródła wyników danych genetycznych (rodzaj wykrytej mutacji) jako ważnej dla podziału pacjentów czyli informacji pochodzącej z tzw. grantu głównego. Generalnie ten rozdział dowodzi wysokiego profesjonalnego poziomu i kompetencji Doktoranta w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej, biochemii klinicznej oraz wprawy w operowaniu technikami, mechanizmami, podstawą teoretyczną i terminologią. Mam tu jedynie pewne drobne zastrzeżenia. Na str. 29 występuje oparta na literaturze tabela „zakresów referencyjnych metabolitu 24,25(OH)2D oraz współczynnika ratio R (...)”, która nie ma tytułu, a stanowi jednak oddzielną tabelę. I jeszcze jeden komentarz dotyczący materiału badawczego: Mianowicie charakterystyka grup badanych jest zbyt lapidarna i uboga, aczkolwiek rozumiem, że rekrutacja uczestników badania po wielu latach i retrospektywa uniemożliwiła zebranie dokładnych cech i danych. Z pełną akceptacją rozumiem, że harmonogram badań nie u wszystkich mógł być zrealizowany – jak to przyznaje dojrzały sam Doktorant. Ponadto na str. 30 rozdz. *Metody* widnieją kryteria BMI wg WHO będące podstawą podziału uczestników. Po pierwsze: nie widzę w tekście tego rozdziału szczegółowych informacji nt. antropometrii i technik pomiaru, ani też wzoru na wyliczenie BMI, po drugie zastosowanie podziału i kategorii WHO dla BMI w tym badaniu może być błędne, zważywszy na wiek uczestników (17,1±8,3 lat). To odchylenie standardowe wskazuje, że mogły tu być osoby zarówno młode dorosłe, jak i dzieci (<18 r.ż.), a w takim przypadku należałoby zastosować centylowe kryteria klasyfikujące BMI. Te wyjaśnienia i stosowny świadomy komentarz Autora pojawiają się, owszem, dopiero w rozdziale „Wyniki”. W tym miejscu chciałbym zaznaczyć, że metodologia powinna być jasno oddzielona od rozdziału Wyniki, podczas gdy w „Wynikach” znajduje się kilka zbędnych powtórzeń, dublujących informacje dotyczące metod.

Wyniki przedstawiają komplet danych (tam gdzie jest to możliwe) i powiązań kliniczno-biochemiczno-genetycznych u 67 osób z IHH, w odniesieniu do grupy kontrolnej (n=83). Skrupulatność, pasja do diagnostyki laboratoryjnej i wnikliwość Doktoranta spowodowały, że jest to rozdział wyjątkowo obszerny (31 stron), wymagający dwukrotnego przeczytania w celu oswojenia się z sekwencją i przekazem (przynajmniej w moim przypadku), ale wszystkie niezbędne i wartościowe fakty zostały tu zawarte i są zrozumiałe. Pozwalają one na logiczne i wiarygodne sformułowanie późniejszych wniosków (*vide infra*), aczkolwiek przyznaję, że niektóre z tych wyników łatwiej analizuje się i przyswaja z syntetycznej i skondensowanej zawartości w/w komplementarnych publikacji w *J Steroid Biochem Mol Biol* oraz *Nephrol Dialys Transplant* niż z samej rozprawy. Zastrzeżenia w tej części, które wyartykułuję tu od razu, dotyczą tylko szczegółów konstrukcyjnych, gramatyki albo niuansów stylu. Na przykład: obok czystych obiektywnych wyników pojawiają się czasem zbędne komentarze lub powtórzone wyjaśnienia metodologiczne; następnie w części tabel ich tytuły brzmią [cyt.] „Analiza statystyczna...”, a powinny być to po prostu „średnie stężenia, porównanie, charakterystyka... etc.”, analiza jest przypisana „Metodom”; Tabele 10 i 11 mogły być połączone w jedną; Tab. 10, 18 i kilka innych: „skrajne stężenia” można było zastąpić terminem „zakres”. Cztery ryciny (zależności/krzywe regresji) są wymowne i potrzebne, ale stanowią częściowo powielenie danych z tekstu i tabel. Tab. 17: w kolumnie „podgrupa/pary pacjentów” zastosowana kolejność: ‘wiek, wzrost, waga, BMI, płeć (na końcu)’ jest niezręczna, bowiem z reguły potrzebujemy standardowej informacji kolejności: najpierw wiek, płeć itd. a poza tym w każdej z tych kategorii należałoby podać jednostki miary, których tu brakuje. W rozdziale „Wyniki” brakuje czasem legend i wyjaśnień skrótów w tabelach, zdarzają się nieczytelne oznaczenia albo pomyłki typu ‘z mutacją i bez określonej mutacji’ (zamiana skrótów M i BM). I wreszcie pewna uwaga dotycząca raportowania istotności statystycznej (*p*) w całym tekście rozdziału „Wyniki”. Moim zdaniem w przypadku jej braku w testach statystycznych absolutnie zbędne jest pisanie „*p*>0,05”, a należałoby wpisać albo dokładną wartość *p*, albo dla ułatwienia lektury oznaczyć to np. ‘NS’.

Dyskusja została podzielona na podrozdziały, których wspólnym ogniwem jest hiperkalcemia idiopatyczna, zestawiana w poszczególnych częściach kolejno z: antropometrią, wynikami densytometrycznego pomiaru składu ciała, metabolizmem wit. D, gospodarką wapniowo-fosforanową czy markerami obrotu kostnego. Doktorant przyjął taką właśnie koncepcję, co oceniam z uznaniem, bo taki układ czyni lekturę rozdziału w miarę komfortową, a przekaz czytelnym i bardziej logicznym, niż zwarta ciągła narracja. Stwierdzam, że Autor bardzo dobrze radzi sobie z polemiczną dyskusją w tej dziedzinie. Nadwrażliwość na D_3 utożsamiana z idiopatyczną hiperkalcemią – mimo iż występuje rzadko – jest przecież zagadnieniem niezwykle trudnym i jest ważnym wyzwaniem z perspektywy praktyki klinicznej. Zjawisko wiąże się z faktem, że osoby z rozpoznaną w dzieciństwie nawet epizodyczną IHH (albo nawet jej podejrzeniem) mogą później rozwinąć przewlekłą chorobę nerek (*chronic kidney disease, CKD*), a nawet mają większe ryzyko krańcowej niewydolności nerek, a z pewnością są narażone na nafrokalcynozę i kamicę nerkową. Ten wątek znajdujemy dobrze omówiony przez Autora w Dyskusji. Rozważania pana Marka Wójcika są kompetentne, dość dobrze napisane, właściwie wsparte cytacjami z piśmiennictwa fachowego, dowodząc odczytania, swobody w korzystaniu z bibliografii naukowej oraz niewątpliwej umiejętności Doktoranta w poruszaniu się w literaturze przedmiotu. W tym rozdziale dysertacji daje się szczególnie dostrzec dojrzałe operowanie wiedzą specjalistyczną z zakresu biochemii i diagnostyki laboratoryjnej, a zwłaszcza znowstwo tematyki witaminy D. Lista 109 pozycji piśmiennictwa jest dobrze dobrana i aktualna, została zacytowana w całości, dokładnie i w kontekście. Czasem może brakuje zdolności do syntetycznego ujęcia problemu (np. zbyt rozwlekłe „Posumowanie” wieńczące Dyskusję), ale tematyka jest naprawdę trudna i pełna niuansów naukowych,

Rozprawę kończą wnioski sformułowane jako 8 punktów (aż osiem), Konkluzje te są szczegółowe i stanowią miejscami przepracowany duplikat „Wyników”. Zasadniczo odpowiadają one celom pracy, chociaż trochę zabrakło w tej części uogólnień i bardziej uniwersalnego przekazu. Ich redakcja oraz kolejność też mogą budzić drobne zastrzeżenia. Moim zdaniem przerezagowanie i skrócenie rozdziału „Wnioski” nadałoby bardziej klarowny przekaz tej ambitnej pracy. W niektórych stwierdzeniach brakuje precyzji, np.: #1: „(...) mieściły się w granicach wartości oczekiwanych (...) z wyjątkiem masy tkanki tłuszczowej” (należy napisać czy było zatem tkanki tłuszczowej za dużo, czy za mało). #6: „W grupie pacjentów z mutacją CYP24A1 zaobserwowano (...) zmiany profilu stężenia mocznika i kreatyniny” (ale: Jaki jest kierunek zmian?). Moim zdaniem najważniejsze i przełomowe są dwie konkluzje tj.: wniosek #4, gdzie Autor podkreśla występowanie przetrwałej hiperkalciurii u osób z przebytą IHH, mimo prawidłowych wartości kalcemii (to może mieć przełożenie na praktykę!) oraz #8, który pokazuje, że niektórzy z ozdowieńców z IHH mający wariant mutacji CYP24A1, mimo normalnego stężenia $25(OH)D_3$, wykazują podwyższony iloraz $25(OH)D_3$ do $24,25(OH)_2D_3$. I właśnie ta ilościowa proporcja (ratio: $25(OH)D_3/24,25(OH)_2D_3$) może różnicować pacjentów z mutacją CYP24A1 od tych bez mutacji. To jest przecież kluczowa informacja potwierdzająca walor obszernych badań i tej rozprawy, zatem w mojej opinii powinna być po prostu wyeksponowana na początku.

Manuskrypt zawiera pewne nieścisłości, Autor nie ustrzegł się drobnych błędów interpunkcyjnych i stylistycznych (co ma minimalne znaczenie) oraz literówek w nomenklaturze. W tekście kilkakrotnie używa określenia „surowica krwi”. Jest to nieścisłe, bowiem w przypadku surowicy nie należy dodawać „krwi”. Podobnie w miejsce „waga”, „wzrost”, powinno być raczej: masa ciała/ciężar i wysokość, ale są to drobiazgi. Powyższe obiekcje nie mają istotnego wpływu na całość pracy i aspekt formalny.

Podsumowując stwierdzam, że – niezależnie od wypunktowanych w mojej recenzji uwag krytycznych – rozprawa doktorska pana Marka Wójcika jest ciekawym, ambitnym warsztatowo i dojrzałym

UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
Klinika Pediatrii, Reumatologii, Immunologii
i Chorób Metabolicznych Kości

UDSK, ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok
Tel.: (85) 7450 622 Fax: (85) 7450 644
Email: pediatria@umb.edu.pl

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Jerzy Konstantynowicz
Email: jurekonstant@o2.pl Mobile: 510567715



opracowaniem wyjątkowo niszowego problemu, akcentuje ważny i niedoceniany temat, wnosząc tym samym cenną informację do poznania zjawiska, a być może również do praktyki.

Rozprawę pana Marka Wójcika oceniam pozytywnie i wysoko. Całość dowodzi kompetencji i zaangażowania Doktoranta jako badacza i naukowca. Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki prawnie określone w art. 179 ust. 1 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 (Dz. U. z 2018 poz. 1669) w związku z art. 13 ust. 1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dziennik Ustaw z 2017 r. poz. 1789). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Pomnik-CZD z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Marka Wójcika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Konstantynowicz
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2472364
Prof. dr hab. n. med.
Jerzy Konstantynowicz
specjalista pediatrii
specjalista medycyny rodzinnej
tel. 510 567 715, jurekonstant@o2.pl