

Katowice 24. 02. 2017

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Marty Myszkii pt. „Badania nad zasobami 25 hydroksywitaminy D oraz 1,25 dihydroksywitaminy D u chorych leczonych nerkozastępczo – powiązania ze stanem układu immunologicznego”

W ciągu ostatnich kilkunastu lat witamina D stała się przedmiotem dużego zainteresowania badaczy i klinicystów. Wykazano, że poza znanym od dawna udziałem tej witaminy w przemianie wapniowo-fosforanowej i chorobach kości aktywny metabolit witaminy D, czyli 1,25 (OH)₂ D, wywiera też działanie parakryne i autokryne uczestnicząc w takich procesach jak różnicowanie komórek, proliferacja komórek, w procesach immunomodulacji. Wykazano, że 1,25(OH)₂D wywiera wpływ na ekspresję ponad 200 genów. W przewlekłej chorobie nerek zmniejsza się wytwarzanie aktywnego metabolitu witaminy D na skutek zahamowania aktywności enzymu – 1-alfa- hydroksylazy w nerkach przez FGF23 jak też w wyniku zmniejszającej się dostępności tego enzymu wraz ze zmniejszającą się liczbą czynnych nefronów. Jednocześnie u chorych z upośledzoną czynnością nerek często zmniejszona jest podaż witaminy D w pożywieniu na skutek restrykcji dietetycznych i niedożywienia oraz zmniejsza się też synteza tej witaminy w skórze, co dodatkowo nasila niedobór aktywnego metabolitu. Niedobór 1,25(OH)₂D w przewlekłej chorobie nerek jest ważnym ogniwem w powstawaniu wtórnej nadczynności przytarczyc a w leczeniu tej endokrynopatii zaleca się stosowanie różnych postaci witaminy D oraz jej analogów. W chwili obecnej istnieje wiele kontrowersji dotyczących wyboru preparatu i sposobu dawkowania witaminy D u osób z przewlekłą chorobą nerek. W tej grupie chorych nie ustalono też jednoznacznie jakie powinno być optymalne stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy, uważane powszechnie za wskaźnik ustrojowych zasobów tej witaminy. Nie ustalono też jakich stężeń 25(OH)D nie należy przekraczać w czasie leczenia. Oznaczanie aktywnego metabolitu witaminy D u chorych w schyłkowym stadium przewlekłej choroby nerek, ze względu na trudności metodyczne, było przedmiotem tylko nielicznych prac. Temat wybrany przez Doktorantkę, ocena stężeń zarówno 25(OH)D jak i aktywnego metabolitu witaminy D (1,25(OH)₂D) u chorych z niewydolnością nerek jest zatem bardzo ciekawy,

nowatorski oraz może mieć w przyszłości implikacje kliniczne. Drugi aspekt pracy ocena zależności pomiędzy stężeniami 25(OH)D i 1,25(OH)₂D a populacjami limfocytów u chorych z niewydolnością nerek ma również istotne znaczenie poznawcze w aspekcie oddziaływania aktywnego metabolitu witaminy D na układ immunologiczny. Na szczególne podkreślenie zasługuje zakres wykonanych badań układu immunologicznego u chorych leczonych nerkozastępczo i u osób zdrowych obejmujący liczebność populacji limfocytów T, limfocytów B, komórek NK oraz ośmiu subpopulacji limfocytów T. Dodatkowym atutem pracy jest fakt, że badania zostały wykonane w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w ośrodku o ustalonej renomie w zakresie badań nad układem immunologicznym u osób z przewlekłymi chorobami nerek.

Przedstawiona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych ma typowy układ dla pracy doktorskiej. Cała rozprawa liczy 111 stron tekstu, a w tym 24 tabele, 34 rysunki oraz 203 pozycje piśmiennictwa. Wstęp obejmujący 17 stron został podzielony na rozdziały, w których Autorka bardzo obszernie omawia metabolizm witaminy D i mechanizm działania o tej witaminy jak i zaburzenia odpowiedzi immunologicznej u chorych w krańcowym stadium przewlekłej choroby nerek. W rozdziale tym metabolizm i mechanizm działania witaminy D został omówiony zarówno w stanie fizjologii jak również w przewlekłej chorobie nerek. Autorka zwróciła uwagę na odmienności w syntezie i mechanizmie działania tej witaminy występujące zwłaszcza w krańcowym stadium przewlekłej choroby nerek. W dalszej części wstępu bardzo szczegółowo została też przedstawiona rola witaminy D w układzie immunologicznym, zwłaszcza w nawiązaniu do zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej u osób leczonych nerkozastępczo. W ostatniej części wstępu Autorka obszernie przedstawiła zaburzenia odpowiedzi immunologicznej u chorych z niewydolnością nerek, zwłaszcza u chorych dializowanych. Bardzo dokładnie omówiona została rola poszczególnych komórek biorących udział w procesie odpowiedzi immunologicznej, z podkreśleniem zaburzeń występujących u chorych dializowanych. Rozdział ten, ilustrowany dodatkowo rysunkami stanowi bardzo dobre przygotowanie do badań własnych, świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w dziedzinie będącej przedmiotem pracy, a cytowane piśmiennictwo jest niezwykle obszerne, dobrze dobrane i nowoczesne.

Cele pracy Autorka przedstawiła szczegółowo w 8 punktach. Praca miała na celu ocenę zasobów witaminy D u chorych z przewlekłą chorobą nerek leczonych nerkozastępczo i u zdrowych ochotników oraz ustalenie przydatności oznaczania aktywnej formy witaminy D (1,25 (OH)₂D) do oceny funkcjonalnych zasobów witaminy D u chorych leczonych nerkozastępczo. Ponadto Autorka postawiła sobie za cel zbadanie poszczególnych populacji

limfocytów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej u chorych leczonych nerkozastępczo i u osób zdrowych i ocenę wpływu sposobu leczenia nerkozastępczego na zachowanie się tych komórek. Celem pracy była również ocena zależności pomiędzy liczebnością i składem badanych populacji limfocytów we krwi obwodowej a zasobami witaminy D u chorych z niewydolnością nerek i w grupie kontrolnej.

W rozdziale „Materiał i metodyka” Autorka dokładnie charakteryzuje badane grupy chorych przedstawiając dane demograficzne chorych oraz niektóre parametry laboratoryjne w postaci dwóch tabel. W rozdziale tym przedstawiono też bardzo szczegółowo zastosowane w pracy metody diagnostyczne zarówno metody oznaczania stężenia 25-hydroksywitaminy D (25(OH)D) w surowicy jak stężenia 1,25-dihydroksywitaminy D (1,25(OH)₂D). Niezwykle precyzyjnie przedstawiono też metody oznaczania liczebności wszystkich badanych populacji limfocytów T, B i komórek NK. Wybrane przez Autorkę metody badawcze są nowoczesne a ich sposób przedstawienia perfekcyjny.

Wybrane przez Autorkę metody statystyczne są prawidłowe.

Wyniki badań przedstawiono bardzo obszernie na 31 stronach tekstu oraz w 24 tabelach i na 24 rysunkach. W rozdziale tym autorka prezentuje wyniki oznaczania stężeń 25(OH)D jak i 1,25(OH)₂D we wszystkich badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej biorąc też pod uwagę różnice sezonowe w stężeniu witaminy D oraz zależność stężeń tej witaminy od stosowanej przez chorych suplementacji. Stwierdzono obniżone stężenie 25(OH)D u znacznego odsetka chorych hemodializowanych, dializowanych otrzewnowo, chorych po przeszczepieniu nerki i u osób zdrowych, natomiast stężenie 1,25(OH)₂D było znamienne niższe u chorych hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo w porównaniu z osobami zdrowymi i chorymi po przeszczepieniu nerki. W dalszej części Autorka przedstawia wyniki oznaczania liczebności limfocytów T, limfocytów B komórek NK i ośmiu subpopulacji limfocytów T we wszystkich badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej stwierdzając istotne różnice w liczebności tych komórek u chorych leczonych nerkozastępczo w porównaniu z grupą osób zdrowych. W ostatniej części tego rozdziału przedstawiono wyniki badań korelacyjnych pomiędzy stężeniami 25(OH)D i 1,25(OH)₂D a poszczególnymi subpopulacjami limfocytów we wszystkich badanych grupach. Zakres wykonywanych badań jest bardzo duży a sposób przedstawienia wyników rzetelny i przejrzysty.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka, w pierwszej kolejności odnosi wyniki własnych oznaczeń stężenia 25(OH)D i 1,25(OH)₂D do badań wykonanych przez innych autorów w aspekcie przydatności tych oznaczeń w celu określenia niedoboru witaminy D oraz monitorowania suplementacji aktywnymi metabolitami tej witaminy. Autorka sugeruje

potencjalną przydatność oznaczania $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ w monitorowaniu suplementacji aktywnymi metabolitami i analogami witaminy D u chorych leczonych nerkozastępczo, ale zwraca uwagę na trudności w powszechnym zastosowaniu metody oznaczania tego metabolitu. Podkreśla też niedoskonałości własnej pracy, głównie związane ze zbyt małą grupą chorych stosujących aktywne metabolity witaminy D. W dalszej części tego rozdziału Autorka, bardzo szczegółowo porównuje wyniki wykonanych przez siebie oznaczeń poszczególnych populacji limfocytów z badaniami innych autorów zwracając uwagę, że prace, w których oceniano tak szeroko stan układu immunologicznego chorych leczonych nerkozastępczo są bardzo nieliczne. W końcowej części dyskusji Autorka analizuje badaną w pracy zależność pomiędzy zasobami witaminy D a poszczególnymi populacjami limfocytów dochodząc do wniosku, że regulacja liczebności limfocytów T w niewielkim stopniu zależy od stężeń $25(\text{OH})\text{D}$ i $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ w surowicy u chorych leczonych nerkozastępczo. Dyskusja jest wyczerpująca, świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu oraz aktualnego piśmiennictwa dotyczącego badanego zagadnienia.

Głównie wnioski pracy to stwierdzenie niewielkiej przydatności oznaczania $25(\text{OH})\text{D}$ w surowicy w celu oceny zasobów witaminy D u chorych leczonych nerkozastępczo, stwierdzenie odmienności w liczebności badanych populacji limfocytów u chorych leczonych nerkozastępczo w porównaniu z osobami zdrowymi oraz niewielki wpływ stężeń $25(\text{OH})\text{D}$ i $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na liczebność badanych populacji limfocytów. Wnioski, trochę nadmiernie rozbudowane są odpowiedzią na postawione w pracy pytania. Niektóre stwierdzenia zawarte we wnioskach stanowią wyniki pracy, zatem warto byłoby nieco przeredagować tę część rozprawy.

Pracę kończą streszczenia w języku polskim i angielskim.

Po przeczytaniu pracy nasuwają się pewne spostrzeżenia.

Charakteryzując chorych hemodializowanych Autorka wymieniła przyczyny przewlekłej choroby nerek u 70 na 92 chorych a u dializowanych otrzewnowo u 15 na 24 chorych.

Prawdopodobnie u pozostałych chorych przyczyna przewlekłej choroby nerek nie była znana, warto to zaznaczyć. Warto również wspomnieć w jaki sposób została zrekrutowana grupa kontrolna. Nie znalazłam też informacji, czy osoby stanowiące grupę kontrolną stosowały preparaty witaminy D.

Na stronie 25 Autorka, prawdopodobnie przez przeoczenie, informuje, że 9 chorych dializowanych otrzewnowo stosowało alfakalcydol w dniach bez dializ, należałoby uściślić sposób podawania tego preparatu wit. D u tych chorych.

Na pewno bardziej korzystne z punktu widzenia klinicznego byłyby badania przydatności oznaczania stężeń 25(OH)D i 25(OH)2D u chorych leczonych nerkozastępczo stosujących preparaty witaminy D, gdyby badane grupy miały większą liczebność. Ten problem Autorka poruszyła w rozdziale „Dyskusja”.

Przy przygotowaniu pracy do druku warto również poprawić pewne drobne nieścisłości np. oznaczanie fosforanów (a nie fosforu) w surowicy.

Poniższe uwagi nie wpływają w istotny sposób na całkowitą ocenę pracy, którą uważam za bardzo ciekawą i nowatorską, a zakres wykonanych badań jest imponujący. Wyniki przeprowadzonych przez Autorkę badań mają nie tylko aspekt poznawczy, ale też znaczenie praktyczne. Autorka wykazała się dużą wiedzą i pracowitością oraz zdolnością do krytycznej oceny wyników własnych badań.

Przedstawiona do recenzji praca całkowicie spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej. Mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Marty Myszkii do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy, bardzo obszerny zakres badań i rzetelny sposób ich przeprowadzenia uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa zasługuje na wyróżnienie. \

Dr hab. Teresa Nieszporek

Dr hab. n. med.
Teresa Nieszporek
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista nefrolog, hipertensjolog
ZUS 8565018