



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Dr hab. Ewa Słomińska
Katedra i Zakład Biochemii
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk

TEL: +48 58 349 1464
FAX: +48 58 349 1460
email: eslom@gumed.edu.pl
www.gumed.edu.pl

Gdańsk, 3 maja 2016

Dr hab. Jacek Sapa, prof. UJ
Dziekan Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum

Recenzja pracy doktorskiej mgr Agaty Franczyk pt. „Wpływ witaminy D i jej metabolitu na gospodarkę mineralną, ciśnienie tętnicze i parametry ściany naczyń”.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy wpływu witaminy D na układ sercowo-naczyniowy. Powstająca w skórze lub absorbowana z przewodu pokarmowego witamina D jest transportowana do wątroby, gdzie pod wpływem 25-hydroksylazy przekształca się w 25-OH witaminę D (25(OH)D; cholekalcyferol). Aktywny metabolit witaminy D – 1,25(OH)₂D (kalcytriol) powstaje w wyniku działania 1- α -hydroksylazy, głównie w nerkach, ale także w mniejszych ilościach w innych tkankach i komórkach organizmu (między innymi: płucach, jelicie grubym, mięśniach gładkich naczyń krwionośnych, kardiomiocytach, monocytach i makrofagach). Hydroksylacja przy 24 atomie węgla w cząsteczce powoduje powstanie biologicznie nieaktywnej formy witaminy D – kwasu kalcytroinowego, usuwanego z organizmu z żółcią i moczem.

Witamina D wpływa na metabolizm tkanki kostnej (utrzymuje homeostazę fosforanowo-wapniową, regulując wzrost i kształtowanie kości), układ pokarmowy (zwiększa wchłanianie wapnia i fosforanów), nerki (zwiększa zwrotną resorpcję jonów Ca²⁺), przytarczyc (hamuje wydzielanie parathormonu), komórek β trzustki (zwiększa wydzielanie insuliny) czy układ immunologiczny (hamuje syntezę makrofagów, komórek NK oraz cytokin prozapalnych).

Kalcytriol oddziałuje także na układ sercowo-naczyniowy zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio. Działanie bezpośrednie – poprzez aktywację jądrowego receptora VDR, związane jest z wpływem na aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron, układu współczulnego, na procesy zapalne i układ krzepnięcia krwi. Pośrednie działanie witaminy D, tzw. pozareceptorowe jest dużo szybsze, i związane między innymi ze: stymulacją napływu jonów Ca²⁺ do cytozolu, otwarciem kanałów chlorkowych, aktywacją cykazy guanylanowej, kinazy białkowej C (PKC) i kinazy aktywowanej przez mitogeny (MAPK). Witamina D wpływa pośrednio na metabolizm glukozy, lipidów, a także na ciśnienie tętnicze.

Od kilku już lat trwają badania nad wpływem witaminy D na układ sercowo-naczyniowy, jednak dotychczasowe wyniki są niejednoznaczne. Doktorantka w ramach rozprawy doktorskiej podjęła próbę poszukiwania współzależności pomiędzy stężeniem witaminy D – 25(OH)D w surowicy krwi, wydalaniem kwasu kalcytroinowego w moczu a parametrami gospodarki mineralnej, ciśnieniem

tętnicznym, parametrami struktury ściany naczyń w populacji osób z regionu krakowskiego. Badania te wpisują się w aktualne światowe nurty badawcze.

Przeprowadzone badania potwierdziły niedobór witaminy D u 261 osób w populacji osób z regionu krakowskiego. Nie podano jednak jaki to procent badanej populacji. Niższe stężenie witaminy D w osoczu korelowało z wyższym wskaźnikiem BMI i większą zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie, co zostało także wykazane wcześniej przez innych badaczy.

Niewątpliwie najciekawszym i unikatowym wynikiem prowadzonych badań jest oznaczenie stężenia kwasu kalcytroinowego w moczu i skorelowanie tego stężenia z parametrami czynności układu sercowo-naczyniowego. Średnie wydalanie kwasu kalcytroinowego z moczem w badanej populacji wynosiło $16.8 \pm 36.9 \mu\text{g}/24\text{h}$ i co jest szczególnie interesujące, wydalanie to jest wyższe u osób z nadciśnieniem tętniczym.

Ponadto, zaobserwowano kilka ciekawych zależności pomiędzy metabolizmem witaminy D a oznaczanymi parametrami ciśnienia tętniczego i parametrami struktury ściany naczyń, takich jak:

- 1) Dodatnią korelację pomiędzy skurczowym ciśnieniem tętniczym (całodobowym, jak również z dnia i nocy), a stosunkiem wydalania kwasu kalcytroinowego z moczem do stężenia witaminy D w osoczu
- 2) Dodatnią korelację pomiędzy dobowym wydalaniem kwasu kalcytroinowego z moczem, a grubością kompleksu infima-media tętnic szyjnych i wskaźnikiem kostka-ramię
- 3) Ujemną zależność pomiędzy stężeniem witaminy D w osoczu, a parametrem uszkodzenia naczyniowego – wskaźnikiem kostka-ramię.
- 4) Dodatnią korelację pomiędzy stosunkiem wydalania kwasu kalcytroinowego z moczem do stężenia witaminy D w osoczu, a dobowym wydalaniem jonu sodowego z moczem oraz cząstkowym wydalaniem jonu litowego (wskaźnika resorpcji sodu)
- 5) Zależność pomiędzy stężeniem witaminy D w osoczu, a stężeniem mieloperoksydazy w osoczu.

Uzyskane zależności wnikliwie przedyskutowano i porównano z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy przedstawionymi w światowym piśmiennictwie naukowym.

Praca doktorska pod względem redakcyjnym jest napisana poprawnie. Układ pracy jest typowy, z podziałem na wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusję, przy zachowaniu właściwych proporcji poszczególnych części. Drobne uwagi dotyczące niedociągnięć poszczególnych rozdziałów zostały przedstawione w dalszej części. Piśmiennictwo cytowane przez Autorkę, włącznie z najnowszymi doniesieniami, obejmuje 119 pozycji i jest umiejętnie dobrane oraz właściwie wykorzystane w pracy.

Autorka w swoich badaniach wykorzystuje zróżnicowane metody badawcze. Poszczególne analizy prowadzone były w kilku ośrodkach. W I Klinice Kardiologii i Elektrokardiologii Interwencyjnej oraz Nadciśnienia Tętniczego przeprowadzono pomiary antropometryczne, pomiar zawartości tkanki tłuszczowej, pomiary ciśnienia tętniczego, badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych, badanie aortalno-udowej prędkości fali tętna, pomiar wskaźnika kostkowo-ramiennego. Rutynowe badania biochemiczne (morfologię krwi z rozmazem, stężenie kreatyniny, kwasu moczowego, CRP, glukozy, insuliny, elektrolitów, lipidogram oraz stężenie witaminy D (formę 25(OH)D) i parathormonu przeprowadzono w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej, a w Zakładzie Biochemii Klinicznej oznaczono parametry układu renina-angiotensyna-aldosteron oraz stężenie IL-6 i mieloperoksydazy. W Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej oznaczono stężenie kwasu kalcytroinowego, a w Pracowni Biopierwiastków Zakładu Bromatologii - stężenie litu. Doktorantka nie zaznaczyła jednak, które oznaczenia wykonywała samodzielnie, a w których uczestniczyła jako obserwator lub które zostały zlecone do wykonania, przez co trudno jest ocenić stopień samodzielności mgr Agaty Franczyk w wykonywaniu tych badań.

Ogólnie rozprawę doktorskiej oceniam jako dobrą, jednak mam kilka zastrzeżeń i pytań:

- Brak jest we „Wstępie” opisu wyników dotychczasowych badań dotyczących wpływu witaminy D na układ sercowo-naczyniowy. Bardzo tego brakuje, szczególnie do uzasadnienia przyjętych celów badawczych niniejszej rozprawy. Aspekt ten jest wspomniany dopiero w „Dyskusji”.
- Podobnie brak we „Wstępie” informacji dotyczących powiązania stężenia litu z witaminą D czy układem sercowo-naczyniowym. Problem ten jest poruszony dopiero w „Dyskusji”, podczas gdy powinien być uwzględniony we wstępie, żeby uzasadnić celowość przeprowadzenia tych oznaczeń.
- Niepotrzebnie w dwóch miejscach opisano budowę naczynia - na str. 26 ogólnie, a na str. 29 bardziej kompletnie.
- Rola komórek śródbłonna jak i angiotensyny II w układzie sercowo-naczyniowym i nadciśnieniu zostały potraktowane zbyt pobieżnie (str. 31).
- Mam też techniczną uwagę dotyczącą analizy z wykorzystaniem LC/MS. Standard wewnętrzny powinien być dodany przed ekstrakcją próbki, a nie dopiero po jej rozpuszczeniu bezpośrednio przed analizą. Nie jest też jasny sposób wykonania krzywej kalibracyjnej, czy była wykonana w wodzie czy matrycy. Obie te rzeczy mogły w znaczący sposób wpłynąć na stężenie oznaczanego związku.
- Skoro w badaniu uczestniczyły osoby z nadciśnieniem tętniczym, jak i osoby z prawidłowym ciśnieniem, dlaczego nie przeprowadzono wszystkich analiz z podziałem na te grupy badawcze.
- Tab. 8 str. 57 - czy dane dotyczące stężenia witaminy D w osoczu zostały uzyskane w jednej czy w różnych porach roku?
- Ryc. 10 str. 61 - czy dane dotyczące stężenia witaminy D w zależności od miesiąca pobrania było wykonane w każdym okresie w tej samej grupie pacjentów? Dlaczego nie podano wartości SD bądź SEM? Znamienność statystyczna dotyczy jakiego okresu?
- Ryc. 11 str. 66 dlaczego nie podano liczby osób badanych, a także SD lub SEM dla wartości średnich
- Str. 75, 76, co oznacza sformułowanie „wskaźnik aktywacji pozanerkowej witaminy D”

Mam też kilka uwag do strony redakcyjnej:

- Str. 11 – 25-hydroksywitamina D jest metabolitem a nie prekursorem.
- W rozdziale „Wykaz najczęściej stosowanych skrótów”:
 - powinny być wymienione wszystkie używane synonimy 25(OH)D – 25-hydroksywitamina D, kalcydiol, cholekalcyferol
 - HPLC – to metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej a nie wysokosprawnościowej
 - CRP – to białko C-reaktywne (białko z grupy białek ostrej fazy)
- w organizmie fosfor nie występuje w stanie wolnym, lecz w formie anionu fosforanowego PO_4^{3-} i dlatego poprawnie powinno się używać określenia – „stężenie fosforanów”. W rozprawie Doktorantka raz używa określenia fosfor, a w innym miejscu fosforan
- Str. 26 - w rozprawie doktorskiej pisanej w języku polskim powinno się używać określenia komórki śródbłonna, a nie endothelium.

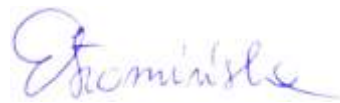
- Str.43 - TQD jest potrójnym kwadрупolem, a nie podwójnym (takiego aparatu nie ma).

- Str. 44, Tab. 3 - nie ma w spektrometrii masowej czegoś co zostało określone jako potencjał Cone'a – jest natomiast potencjał stożka (*ang. cone voltage*)

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej wartości naukowej. Praca stanowi znaczący wkład w badania nad rolą witaminy D w układzie sercowo-naczyniowym. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria pracy doktorskiej.

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie mgr Agaty Franczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



Dr hab. n. med. Ewa Słomińska