



Kraków, 10 .02. 2021

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Radom

**pt. „WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA STĘŻENIE 25(OH)D₃ W
SUROWICY KRWI KOBIET, KTÓRE BYŁY LECZONE Z POWODU RAKA
SUTKA”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska napisana została pod kierunkiem prof. dr hab. Przemysława Tomasika, zawiera 133 strony maszynopisu, 8 tabel i 28 rycin wraz z opisem. Całość pracy została zredagowana bardzo starannie, czytelnie, z zachowaniem logiki merytorycznej. Praca zawiera wykaz zastosowanych w pracy 85 skrótów z ich rozszerzeniem oraz Aneks – niewyodrębniony, jako rozdział, w którym Autorka zamieszcza dwa załączniki: 1. Opinia Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz 2. Formularz Ankiety diagnostycznej zatytułowany „Ankieta – witamina D₃”

Z praktycznego punktu widzenia pracę można podzielić na dwie części. Pierwsza o charakterze teoretycznym, przedstawia znaczenie biologiczne witaminy D i jej metabolizmu w zakresie podstawowego działania na układ kostno-stawowy oraz działania pleiotropowego. Ta część jest napisana bardzo obszernie i sprawnie, szczegółowo omawia podstawowe założenia onkoprotekcyjnego działania witaminy D₃. Mgr A. Radom bardzo dokładnie przedstawia molekularne podstawy przemian zachodzących w metabolizmie witaminy D jak i procesy, w których witamina D bierze udział. Ta część wstępu poparta jest bardzo precyzyjnie dobranym materiałem literaturowym. Jest to dobre wprowadzenie do części drugiej, będącej istotą przeprowadzonych badań.

Część druga jest odpowiedzią na wyznaczone cele pracy, które zostały sformułowane w sposób jasny, wyznaczając trzy obszary badań:

1. Ocenę stężenia witaminy D w surowicy kobiet po leczeniu raka sutka w zależności od pory roku,

2. Ocenę wpływu pór roku, nawyków żywieniowych i społecznych, suplementacji witaminą D₃ oraz rekomendacji lekarzy prowadzących [...], a także
3. Wpływu oznaczeń stężenia witaminy D na poprawę jej statusu w kolejnych badaniach oraz na zmianę zachowań mających na celu uzyskanie i utrzymanie zalecanego surowiczego stężenia witaminy D.

Do realizacji zaplanowanych celów przeprowadzono badania z udziałem 187 kobiet, które podzielono na trzy grupy. W skład grupy A wchodziły 62 kobiety z rozpoznaniem i leczonym w przeszłości nowotworem sutka, do grupy B zaliczono 32 kobiety o podobnej historii choroby onkologicznej. Grupę kontrolną stanowiły 92 kobiety z obciążonym chorobą nowotworową wywiadem rodzinnym. Wiek oraz analiza cech somatycznych, we wszystkich grupach mieściły się w granicach cech porównywalnych, nie stwierdzono różnic statystycznych pomiędzy analizowanymi parametrami dla masy ciała, wzrostu i stanu odżywienia. W obu grupach badanych (grupa A i B) średni wiek, w którym rozpoznano raka sutka był porównywalny i wynosił odpowiednio 52 i 53 lata. Badania stężenia 25(OH)D w surowicy krwi przeprowadzono dla każdej z grup badanych dwukrotnie: 1x w okresie zimy i 1 oznaczenie w lecie, a dla grupy kontrolnej: jednorazowo w zimie. Badania stężenia 25(OH)D przeprowadzono w grupie A po 13.8 ± 11.5 i dla grupy B po 11.3 ± 12.7 latach od rozpoznania choroby nowotworowej. Dokonano analiz porównawczych z uwzględnieniem suplementacji witaminą D₃, pór roku, edukacji prozdrowotnej i znaczenia witaminy D₃ w utrzymaniu zdrowia i jej wpływu na procesy onkologiczne.

Witamina D₃ przez lata od jej odkrycia łączona jest z metabolizmem kości i zachowaniem ich prawidłowej struktury i funkcji. Odkrycie receptora jądrowego dla witaminy D w różnych tkankach od układu pokarmowego, przez oddechowy do nerwowego – pozwoliło stworzyć hipotezę pleiotropowego działania jej aktywnej formy. Rozszerzone badania następnych lat wykazywały obecność receptora w tkankach całego organizmu, wyznaczono różnice w jego ekspresji, także w tkankach objętych procesami nowotworowymi. Znaczenie witaminy D zostało w istotny sposób rozszerzone i jest przedmiotem dalszych badań. Ostatnie lata to zwiększone zainteresowanie protekcyjną rolą witaminy D w onkogenezie, a wyniki protekcyjnej roli witaminy najszerzej prezentowane są w publikacjach dotyczących nowotworów jelita grubego i gruczołu sutkowego. Jednak w dalszym ciągu witaminę D₃ łączy się z metabolizmem układu kostno-stawowego, kreując w opracowaniach popularnonaukowych jej rolę, przedstawiając społeczeństwu, jako podstawowy element „zdrowych kości” z zaleceniem powszechnej suplementacji doustnej. Tak jednak nie jest, należy pamiętać, że witamina D

jest grupą rozpuszczalnych w tłuszczach związków steroidowych o ogólnoustrojowym działaniu hormonalnym, z wpływem na wchłanianie jelitowe wapnia, a tym samym pośrednio na gospodarkę wapniowo-fosforanową. Przyjmując, że w przyrodzie występuje pod postacią nieaktywnych prowitamin, albo prohormonów, jako kalcyferol – witamina D₁, ergokalcyferol – witamina D₂ oraz cholekalcyferol – witamina D₃. Spożywana przez człowieka wraz z pokarmami, w niewielkim stopniu wpływa na pokrycie zapotrzebowania, gdyż przyjmuje się, że 80 – prawie 100% dobowego zapotrzebowania na witaminę D jest pokrywane przez syntezowane pod wpływem promieniowania słonecznego UV-B o długości fali 290 – 315 nm w skórze. Oczywiście, suplementacja doustna ma znaczenie w miesiącach, gdy ekspozycja na promienie słoneczne jest niewystarczająca lub w sytuacji związanej z bytowaniem w miejscach o szerokości geograficznej, zmniejszającej ilość docierającego światła słonecznego. Ewolucja modyfikowała kluczowe elementy metabolizmu witaminy D i pozyskiwanie jej w zależności od warunków środowiskowych, w którym przebywa człowiek. W niekorzystnych warunkach ekspozycji na światło, głównym źródłem staje dieta. Sposób żywienia mieszkańców okolic koła polarnego charakteryzuje się spożyciem większej ilości tłuszczu i mięsa głównie rybiego, z kolei okolice równikowe o dużej ekspozycji – sprzyjają mnożeniu się melanocytów w skórze właściwej. Zarówno witamina D₂ jak i D₃ nie posiadają aktywności biologicznej, uzyskują ją dopiero po dwuetapowej hydroksylacji zachodzącej w pozycji 1 i 25 węgla cząsteczki. Pierwszy etap hydroksylacji na 25 węglu zachodzi w wątrobie, do której zarówno ergokalcyferol wchłonięty w jelitach, jak i cholekalcyferol pochodzący z jelit i syntezy w skórze transportowane są w połączeniu z białkiem wiążącym witaminę D. Reakcja hydroksylacji katalizowana jest przez zespół hydoksylaz wchodzących w skład cytochromu P450. Produktem hydroksylacji jest nieaktywna 25(OH)-D, która wraz z białkiem wiążącym przetransportowana zostaje do nerek. W nerkach pod wpływem 1- α -hydroksylazy 25(OH)-D przekształcone zostaje do 1 α -25(OH)₂D o właściwej biologicznie aktywności hormonalnej. Szybkość tego procesu uzależniona jest od ilości wydzielonego Parathormonu, sprzężonego ze stężeniem wapnia w surowicy krwi. Niskie stężenie wapnia powoduje wzrost wydzielania Parathormonu uruchamiając system RANKL-RANK ze zwiększeniem ekspresji osteoklastów, jako pierwszy efekt reakcji homeostazy wapniowej. Jako drugi należy przyjąć - znaczne przyspieszenie powstawania dwuhydroksylowanej witaminy z substratu jakim jest 25(OH)-D. Doktorantka doskonale zna tą zależność, ponieważ pisze o tym we Wstępie do pracy. Zasoby 25(OH)-D₃ w takim rozumieniu modelu zależą z jednej strony od ilości tworzonej w skórze lub pozyskiwanej z przewodu pokarmowego prowitaminy D, wydolności enzymatycznej wątroby w tworzeniu 25(OH)-D i z drugiej strony szybkości jego zużycia, jako produktu pośredniego w

procesie tworzenia $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}$. Równowaga pomiędzy dostarczaniem substratu do powstania $25(\text{OH})\text{-D}$ (synteza skórna, wchłanianie jelitowe ergokalcyferolu i/lub cholekalcyferolu, sprawność hydroksylacji wątrobowej), a jego zużywaniem (zależna od parathormonu szybkość hydroksylacji nerkowej do $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}$) zależna jest od stanu ustalonego homeostazy wapniowo-fosforanowej. Równowaga ta może być zmieniona w każdej chwili przez czynnik o pierwszorzędym znaczeniu, jakim jest obniżenie stężenia wapnia w surowicy krwi (zależność: wchłanianie jelitowe wapnia – stężenie wapnia w surowicy – stężenie parathormonu w surowicy – hydroksylacja do $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}$).

Z uwag recenzenckich: szkoda, że wśród wybranych przez Panią mgr Agnieszkę Radom czynników wpływających na stężenie $25(\text{OH})\text{-D}_3$ w surowicy krwi kobiet leczonych z powodu choroby onkologicznej nie zdecydowano się na włączenie oznaczenia stężenia Parathormonu i wapnia w surowicy krwi. Pozwoliłoby to dokonać rozszerzonej analizy dynamicznej zmiany zasobów $25(\text{OH})\text{-D}_3$. W efekcie takiego zaniechania otrzymujemy wynik statyczny (dla stanu ustalonego w chwili oznaczenia). Za czynniki zmienne Autorka przyjmuje zależność od pory roku – lato/zima, suplementację witaminową – tak/nie, świadomość znaczenia witaminy D_3 przez pacjentki wynikającą z programów edukacyjnych oraz nawyki żywieniowe.

Cele pracy zostały w większości zrealizowane, jednak istnieje istotna kolizja metodyczno-merytoryczna pomiędzy stwierdzeniem: „*Cel drugi zrealizowano przez analizę danych z badania ankietowego w tym: •Analizę nawyków żywieniowych jak i społecznych (opalanie i aktywność na świeżym powietrzu)...*” [str.45], a przedstawioną ANKIETĄ – WITAMINA D_3 – pozycja 22 pytanie diagnostyczne: „*Czy spożywa Pani pokarmy bogate w witaminę D w codziennej diecie? Zaznacz X we właściwej rubryce*” oraz zamieszczona tabela wyróżniająca pokarmy bogate w witaminę D_3 i dystraktory: „*2 razy w tygodniu; 1 raz w tygodniu; sporadycznie*” [str. 134]. Nie można określać wielkości spożycia przy braku precyzyjnych danych ilościowych np. informacja o spożyciu węgorka czy śledzi w oleju w definiującej ilości sporadycznie lub 2 razy w tygodniu jest niewystarczająca do jakichkolwiek analiz. Uzyskane dane muszą prowadzić do wątpliwych wniosków: „*Na podstawie badań ankietowych oceniono spożycie pokarmów bogatych w witaminę D tj. ryb [...], mleka i jego przetworów, oleju roślinnego oraz wątróbki w badanych grupach. Zaskakujący jest fakt, że w grupie pacjentek badanych w zimie odnotowano istotnie niższy poziom witaminy D u kobiet spożywających mleko 1-2 razy na tydzień w porównaniu do tych, które mleka nie spożywały [...]*” [str. 86]. Przypomnieć należy, że zalecana ilość mleka w codziennej diecie wynosi 500 ml, co stanowi $\frac{1}{2}$ realizacji dobowego zapotrzebowania na wapń. Informacja o spożyciu 1-2 razy na tydzień jest wykluczająca

ten parametr, ponieważ nie wiemy czy było to rekomendowane spożycie dzienne, czy tylko dodatek mleka do zabielenia kawy. Przy pełnym pokryciu zapotrzebowania dobowego na wapń i podaż w diecie produktów bogatych w witaminę D, nie mielibyśmy „zaskakującego faktu”, o którym pisze Doktorantka [str. 86]. Zastanawiające, jest także niespójne logicznie stwierdzenie: *„Pomimo, że dieta nie ma istotnego znaczenia dla statusu witaminy D w organizmie, należy dążyć do rozszerzania diety o pokarmy bogate w witaminę D ponieważ właściwie zbilansowana dieta ma korzystny wpływ na całokształt funkcjonowania organizmu”* [str. 86-87]. Jeżeli „coś” nie ma istotnego znaczenia, to nie ma potrzeby dążyć do jakiegokolwiek zmiany (w tym przypadku rozszerzania diety). Logiczne także staje się pytanie, jak rozumieć suplementację witaminą D w świetle powyższych stwierdzeń? – jest to przecież zgodnie z definicją suplementacji, uzupełnianie diety. Kolizję metodyczną można także stwierdzić dokonując analizy Tabeli. 7 *„Spożywanie produktów bogatych w witaminę D przed pierwszą i drugą serią oznaczeń witaminy D w grupie badanej”* – [str. 73] – w zestawieniu tabelarycznym wyników przedstawiane jest spożycie segregowane wg dystraktorów „Rzadziej niż 1 x w tygodniu” – kolumna druga, „1-2 x w tygodniu” oraz „Więcej niż 2 x w tygodniu” – kolejne kolumny, podczas gdy w formularzu ankiety diagnostycznej takich dystraktorów nie ma [str. 134]. Podobnie nieprecyzyjne są informacje dotyczące ekspozycji na światło słoneczne – patrz punkty 23, 24, 25, 26 [str. 134]. W sytuacji braku precyzyjnych danych do analiz klinicznych, a tak dzieje się przy analizie diety i ekspozycji na światło, dokonywanie jakichkolwiek korelacji statystycznych, nie da wiarygodnych wyników, dlatego te dwa parametry należy odrzucić i nie mogą być traktowane jako „wybrane czynniki” wpływające na stężenie 25(OH)D₃ w surowicy krwi.

Pracę kończy przedstawienie 7 wniosków, z których jako recenzent proponowałbym usunąć wniosek 3, ponieważ nie dokonano rzetelnej analizy ilościowego (dobowego) spożycia składników pokarmowych, a jest to podstawa jakiegokolwiek oceny zarówno spożycia, jak i jakości diety.

Wniosek 6, należy przeredagować z: *„Monitorowanie stężenia witaminy D korzystnie wpływa na utrzymanie optymalnego stężenia witaminy D u kobiet po leczeniu raka sutka”*, na: Monitorowanie stężenia witaminy D pozwala na bardziej precyzyjne modyfikowanie dawki suplementacji witaminą.

Niewątpliwą wartością przedstawionej do oceny pracy jest doskonale przedstawione molekularne zasady działania plejotropowego witaminy D. Na pozytywną ocenę zasługuje także próba dokonania analizy wieloczynnikowej zależności, w uzyskiwanych wynikach oznaczeń stężenia 25(OH)-D w surowicy krwi kobiet po przebytych epizodzie choroby nowotworowej. Niezaprzeczalną wartością jest przedstawienie wyników populacyjnych

badań kobiet po leczeniu raka sutka, co stanowić będzie przyczynek do szerokich badań prowadzonych na świecie dla tej grupy chorych.

Piśmiennictwo zawiera 219 pozycji literaturowych, autorów zagranicznych i polskich. Cytowane jest poprawnie z wnikliwą analizą danych i dobrym komentarzem Autorki lub merytoryczną ilustracją w postaci odniesień do własnego materiału lub doświadczeń klinicznych zespołów medycznych, publikujących opracowania diagnostyki i terapii chorób nowotworowych, a podkreślających znaczenie witaminy D₃.

Praca posiada typowy układ, proporcje poszczególnych rozdziałów zostały zachowane. Pewnym niedociągnięciem stylistycznym jest określanie „poziom witaminy”, gdy chodzi o jej stężenie i powtarza się to wielokrotnie w całej pracy.

Autorka rozprawy wykazała pełną znajomość przedmiotu, umiejętność prowadzenia badań analitycznych i naukowego dyskusowania uzyskanych wyników.

Zamieszczone w tekście rozprawy tabele i ryciny są wykonane bardzo starannie, zgodne (poza tabelą 7) merytorycznie z tekstem podstawowym i ilustrują w czytelny sposób uzyskane wyniki analiz, ułatwiając przez to ocenę całości rozprawy.

Przedstawiona dysertacja doktorska dotyczy szalenie ważnego problemu o znaczeniu klinicznym z zakresu problematyki granicznej pomiędzy biochemią/fizjologią, a klinicznymi aspektami onkologii i profilaktyki onkologicznej. Tym bardziej, z uwagi na zauważenie tego problemu, należy uznać przedstawione opracowanie mgr Agnieszki Radom, jako wartościowe klinicznie.

W podsumowaniu stwierdzam, że niezależnie od przedstawionych w recenzji uwag i wątpliwości, rozprawa doktorska zatytułowana „WPŁYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA STĘŻENIE 25(OH)D₃ W SUROWICY KRWI KOBIET, KTÓRE BYŁY LECZONE Z POWODU RAKA SUTKA” spełnia warunki określone w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych, dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Radom do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Górska