

Olsztyn, 02.09.2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Marty Ziemińskiej
„Rola endogennej witaminy K w procesie przebudowy kości szczurów
z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek”

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Pawlak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Beata Sieklucka

Zakład Farmakoterapii Monitorowanej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Ziemińskiej była kompleksowa ocena metabolizmu endogennej witaminy K (VK) poprzez pomiar stężenia VK1 (filochinon) oraz MK-4 i MK-7 (menachinony) w surowicy zdrowych zwierząt oraz w modelu CKD indukowanym chirurgiczną nefrektomią.

Przewlekła choroba nerek (CKD) jest poważnym stanem zdrowotnym, który charakteryzuje się stopniową utratą funkcji nerek. W miarę postępowania choroby naczynia krwionośne nerek ulegają uszkodzeniom, co prowadzi do zaburzeń w wydalaniu produktów przemiany materii i regulacji równowagi elektrolitowej w organizmie. Jednym z powszechnych powikłań CKD jest zespół zaburzeń mineralnych i kostnych (CKD-MBD), który jest wynikiem nieprawidłowego przetwarzania minerałów i hormonów w organizmie pacjenta. W CKD-MBD dochodzi do zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej, co prowadzi do nieprawidłowego poziomu wapnia i fosforanów we krwi. Niedobór wapnia może prowadzić do osłabienia kości, a nadmiar fosforanów może uszkadzać naczynia krwionośne i narządy wewnętrzne. Przewlekła choroba nerek wpływa na produkcję i metabolizm witaminy D oraz hormonu przytarczyc. Zmiany w stężeniu tych substancji mają wpływ na przyswajanie wapnia z przewodu pokarmowego oraz resorpcję wapnia z kości. W rezultacie może dojść do zwiększonego wydzielania hormonu przytarczyc, co powoduje zmiany w strukturze i gęstości kości prowadzące do osteodystrofii nerkowej. To stan, w którym dochodzi do zmian w strukturze i gęstości kości. Osoby z CKD-MBD są narażone na ryzyko złamań kości, osteopenię (zmniejszenie gęstości mineralnej kości) i osteoporozę.

Te zaburzenia mineralne i kostne w CKD-MBD mogą również wpływać na zwiększone ryzyko rozwoju zaburzeń sercowo-naczyniowych (chorób serca, nadciśnienia tętniczego i innych problemów układu sercowo-naczyniowego).

Osoby z CKD-MBD potrzebują opieki lekarskiej i edukacji na temat odpowiedniego zarządzania swoim stanem, aby zmniejszyć ryzyko powikłań kostnych i sercowo-naczyniowych oraz poprawić jakość życia. Profilaktyka i wczesna interwencja w przypadku CKD-MBD są kluczowe dla zdrowia pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Leczenie CKD-MBD opiera się na kontrolowaniu poziomów minerałów i hormonów w organizmie pacjenta oraz na łagodzeniu objawów (ból kostny, mrowienia w kończynach, skurczy mięśni, łamliwości kości, zmęczenia, osłabienia). Częścią terapii jest dieta ubogofosforanowa, suplementacja witaminy D oraz w zaawansowanych przypadkach dializa nerkowa. Istotne jest systematyczne wykonywanie badań laboratoryjnych oraz współpraca z lekarzem specjalistą w dziedzinie nefrologii.

Pani Doktorantka oceniała w surowicy stężenie białek zależnych od VK (VKDP), takich jak osteokalcyna (OC), jej forma nieukarboksylowana (Glu-OC) oraz nieukarboksylowane białko macierzy Gla (ucMGP). W kości oznaczała obie formy OC: karboksylowaną (Gla-OC) i Glu-OC, a następnie dokonała oceny recyklingu VK poprzez analizę ekspresji genów – VKORC1, GGCX i UBIAD1.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Ziemińskiej posiada następujący układ: zestawienie publikacji, rozprawa doktorska, artykuły stanowiące cykl prac włączonych do rozprawy doktorskiej, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników, wnioski, bibliografia, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, publikacja nr 1, publikacja nr 2, oświadczenie autora rozprawy doktorskiej, oświadczenie współautorów.

Rozprawa doktorska mgr Marty Ziemińskiej stanowi cykl dwóch prac opatrzonych wspólnym tytułem pt. „Rola endogennej witaminy K w procesie przebudowy kości szczurów z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek”. Jedna z publikacji jest pracą przeglądową, a druga oryginalną. Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1) Marta Ziemińska, Beata Sieklucka, Krystyna Pawlak, Vitamin K and D supplementation and bone health in chronic kidney disease - apart or together? *Nutrients* 2021, 13, 809 doi.org/10.3390/nu13030809, praca przeglądowa

2) Marta Ziemińska, Dariusz Pawlak, Beata Sieklucka, Katarzyna Chilkievicz, Krystyna Pawlak; Vitamin K-Dependent Carboxylation of Osteocalcin in Bone—Ally or

Adversary of Bone Mineral Status in Rats with Experimental Chronic Kidney Disease? *Nutrients* 2022, 14, 4082 doi.org/10.3390/nu14194082, praca oryginalna.

Rozprawa jest napisana poprawną polszczyzną, jednak w pracy pojawiają się nieliczne błędy interpunkcyjne i edytorskie. Te problemy edytorskie nie mają wpływu na zrozumienie i przejrzystość formy pracy. Prace składające się na rozprawę doktorską były opublikowane w latach 2021-2022. W obu publikacjach Pani Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączna punktacja wskaźnika oddziaływania (Impact Factor) przedstawionego cyklu dwóch publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej wynosi ok. 13, a w punktach MEiN 280. Wszystkie publikacje wchodzące w skład cyklu są wynikiem współpracy. Pani Doktorantka udokumentowała rzetelnie swój udział w poszczególnych pracach zgodnie z przyjętymi standardami. W skład cyklu publikacji, wchodzi praca poglądowe, która wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy o wpływie VK i VD na przebudowę kości w CKD w oparciu o istniejące wyniki badań przedklinicznych i dowody kliniczne. Mechanizmy działania i wpływ tych witamin na kości są odmienne, dlatego starano się znaleźć dowody na synergii między nimi w odniesieniu do metabolizmu kości, aby odpowiedzieć na pytanie, czy łączona suplementacja VK i VD będzie bardziej wpływała na strukturę kości u chorych na CKD, niż podawanie każdej z tych witamin osobno. W celu ustalenia związku między VKDP, a stanem mineralnym kości uzyskane wyniki zestawiono z pomiarami densytometrycznymi. W ocenianej pracy Pani Doktorantka analizowała metabolizm endogennej witaminy K. Pani Doktorantka wykryła obniżone stężenie VK1, któremu towarzyszył wzrost MK-4 i MK-7 w surowicy szczurów z CKD, w związku ze wzmożoną konwersją VK1 do postaci menachinonów. Dodatkowo wykazano wzrost stężenia całkowitej OC spowodowany jej kumulacją we krwi szczurów z CKD, natomiast zwiększone stężenie Glu-OC może być konsekwencją pobudzania jej syntezy przez parathormon (PTH).

Pani Doktorantka udowodniła, że tkanka kostna posiada zestaw enzymów umożliwiający recykling witaminy K oraz konwersję VK1 do postaci menachinonów, jednak nie dochodzi do produkcji odpowiedniej ilości aktywnej formy osteokalcyny, a to powoduje nieprawidłową mineralizację tkanki kostnej w przebiegu CKD.

Pani mgr Marta Zielińska w wyniku prowadzonych badań, zauważyła, że przyczyną powyższych zaburzeń może być nadczynność przytarczyc i nasilanie przez PTH procesu osteoblastogenezy, w wyniku którego powstają niedojrzałe osteoblasty, niezdolne do produkcji odpowiedniej ilości aktywnej formy OC. Było to możliwe do zaobserwowania po analizie zależności występujących pomiędzy parametrami stanu mineralnego kości,

ekspresją enzymów cyklu witaminy K i zależnych od niej białek uczestniczących w procesie mineralizacji. Doktorantka posiada wszechstronny warsztat eksperymentatora, szczegółowo opisany w rozdziale „Materiały i metody”.

W recenzowanej pracy w rozdziale „Wnioski” Doktorantka w sposób zwięzły w punktach podsumowała uzyskane wyniki. W mojej opinii taki sposób prezentacji ułatwia całościowy odbiór pracy, ze względu na ogromną ilość bardzo cennych wyników. Pani Doktorantka sformułowała cztery poprawne wnioski, mówiące że:

1) obniżony poziom witaminy K1 obserwowany w surowicy szczurów z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek jest wynikiem przyspieszonej konwersji filochinonu do postaci menachinonów;

2) w tkance kostnej in situ znajduje się zestaw enzymów umożliwiający recykling witaminy K oraz biokonwersję witaminy K1 do postaci menachinonów;

3) w kościach szczurów z CKD i współistniejącą nadczynnością przytarczyc, dochodzi do nasilenia procesu osteoblastogenezy i powstawania niedojrzałych osteoblastów, które produkują niewystarczające ilości aktywnej formy osteokalcyny, co w konsekwencji zaburza proces mineralizacji, prowadząc do obniżenia stanu mineralnego kości;

4) badanie stężenia całkowitej osteokalcyny i jej formy nieukarboksylowanej – Glu-OC w surowicy, ma niewielkie zastosowanie diagnostyczne w przewlekłej chorobie nerek, szczególnie przy współistnieniu nadczynności przytarczyc, a jest powszechnie wykorzystywane jako marker niedoboru witaminy K.

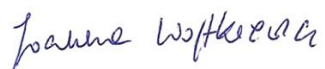
Moje krytyczne uwagi dotyczą pojedynczych błędów oraz opisu niektórych rycin np. zbyt małe napisy opisujące sprawiają, że na wydruku trudno zaobserwować opisywane zmiany, a przez to są mało czytelne. Jednak w wersji PDF jakość jest bardzo dobra. Moje krytyczne uwagi są znikome w porównaniu z wartością merytoryczną tej pracy i bogactwem metod zaprezentowanych przez Panią Doktorantkę, dlatego nie zmieniają ogólnej bardzo dobrej oceny recenzowanej dysertacji.

Poddana recenzji praca doktorska ma duże znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne, a jej wyniki mogą być punktem wyjścia do dalszych badań nad zrozumieniem analizowanych mechanizmów.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w stosownej ustawie (ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Marty Ziemińskiej do dalszych etapów

przewodu doktorskiego przed Senatem Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Jednocześnie należy zaznaczyć, że praca wnosi znaczący, nowatorski wkład w dotychczasowy stan wiedzy, wyróżnia się oryginalnością, a uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, dlatego wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Ziemińskiej.

prof. dr. hab. n. med. Joanna Wojtkiewicz

A handwritten signature in blue ink that reads "Joanna Wojtkiewicz". The signature is written in a cursive style and is positioned below the printed name.

**Uzasadnienie wyróżnienia pracy doktorskiej Pani mgr Marty Ziemińskiej
„Rola endogennej witaminy K w procesie przebudowy kości szczurów
z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek”**

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Pawlak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Beata Sieklucka

Zakład Farmakoterapii Monitorowanej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wnioskuje o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Marty Ziemińskiej. Pomiar stężenia całkowitej OC i jej formy nieukarboksylowanej – Glu-OC w surowicy, są powszechnie wykorzystywane jako markery niedoboru witaminy K, a to wydaje się mieć niewielkie zastosowanie w warunkach CKD, szczególnie przy współistnieniu nadczynności przytarczyc. Niemniej jednak, w przypadku pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, zwłaszcza przy współistnieniu nadczynności przytarczyc, interpretacja wyników może być bardziej skomplikowana i to wymaga dalszych badań. Uzyskane wyniki mogą stać się w przyszłości punktem wyjścia do opracowania protokołów badawczych wykorzystywanych w dalszych etapach badań przedklinicznych, jak również mogą być podstawą do aplikowania o finasowanie zewnętrzne ze względu na wysoką wartość poznawczą oraz aplikacyjną. Ze względu na uzyskane wyniki i potencjał przydatności w translacji z modelu zwierzęcego na pacjenta, istotne jest dalsze kontynuowanie badań przedklinicznych na modelach zwierzęcych.

prof. dr. hab. n. med. Joanna Wojtkiewicz

