

Gdańsk 12.08.2023

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ  
NA STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA  
W DZIEDZINIE NAUKI MEDYCZNE I NAUKI O ZDROWIU  
DYSCYPLINIE NAUKI MEDYCZNE**  
mgr analityki medycznej Marty Ziemińskiej  
zatytułowanej: **Rola endogennej witaminy K w procesie przebudowy kości szczurów  
z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek**

Do oceny przedstawiono rozprawę doktorską, którą stanowi cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pod wspólnym tytułem: „Rola endogennej witaminy K w procesie przebudowy kości szczurów z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek”. W skład cyklu wchodzi dwie prace (1 poglądowa, 1 oryginalna) opublikowane w latach 2021-2022. Łączna wartość współczynnika oddziaływania (IF) prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi 13.412, a liczba punktów MEiN (na podstawie Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 1 grudnia 2021 r.) 280 pkt. W obu pracach pierwszym autorem jest Doktorantka.

Do oceny dostarczono spięte w całość: bardzo szeroki opis rozprawy doktorskiej w formie manuskryptu, kopie publikacji, wykaz dorobku naukowego oraz oświadczenia Doktorantki i współautorów. Dostarczony materiał przygotowany jest edytorsko bardzo starannie.

Przewlekła choroba nerek (CKD) jest populacyjnie jedną z najczęściej występujących przewlekłych chorób, ponadto towarzyszy jej znaczna chorobowość. Upośledzenie funkcji nerek wiąże się z wystąpieniem wielu powikłań co w połączeniu z chorobowością znacząco wpływa na jakość i długość życia chorych. Rozwój zaburzeń gospodarki kostnej i mineralnej określany angielskim terminem CKD-MBD, *Chronic Kidney Disease – Mineral Bone Disorders*, jest wpisany w krajobraz choroby. W przebiegu CKD-MBD dochodzi do upośledzenia struktury kostnej i zmniejszenia jej

wytrzymałości. CKD-MBD istotnie przyczynia się do zwiększonego ryzyka złamań, które jest czterokrotnie wyższe niż w populacji ogólnej. Proces regeneracji tkanki kostnej jest kluczowym elementem zapewniającym odnowę uszkodzonej kości, uzależniony jest on od działania hormonów, witamin i czynników wzrostu – głównie parathormonu (PTH), kalcytoniny, witaminy D a także witaminy K. Istnieje niewiele doniesień dokumentujących związek między niedoborem witaminy K a ryzykiem BMD-MBD u pacjentów z CKD. Nie obserwuje się również wyraźnego postępu w skutecznym leczeniu CKD-MBD. Dlatego cenne mogą być badania dotyczące wpływu suplementacji witaminy D i K2 na stan kości w badaniach z eksperymentalną CKD w modelu zwierzęcym.

## Ocena rozprawy doktorskiej

W obliczu przytoczonych powyżej faktów w opinii recenzenta uzasadniony jest cel badań podjętych przez mgr. analityki Martę Ziemińską, którym było przybliżenie się do zrozumienia roli endogennej witaminy K w procesie mineralizacji kości w przebiegu CKD.

Połączenie cyklu prac w rozprawę doktorską jest uzasadnione. Prace stanowią spójną całość i mają za zadanie rozwiązanie problemu naukowego. Poniżej wymieniono prace wchodzące 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(3): 809

IF = 6.706, MNISW = 140

2. Marta Ziemińska, Dariusz Pawlak, Beata Sieklucka, Katarzyna Chilkwicz, 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 (19): 4082

IF = 6.706, MNISW = 140



Na podstawie załączonych oświadczeń współautorów należy uznać, że Doktorantka miała znaczący wkład w ich powstanie. Doktorantka omówiła zagadnienie będące tematem rozprawy w manuskrypcie, który koncentruje się na pracy Nr 2, czyli zawierającej oryginalne wyniki badań.

We wstępie do manuskryptu Doktorantka ze znajomością tematu i w oparciu o piśmiennictwo wprowadza czytelnika w omawiane w pracy zagadnienie, uzasadniając tym przekonująco celowość wykonanych badań. Dużo miejsca poświęca na omówienie roli witaminy K w przebudowie kości i omówieniu statusu witaminy K u pacjentów z CKD.

Kolejny rozdział stanowią cele pracy, czyli kompleksowa ocena metabolizmu endogennej witaminy K w eksperymentalnym, szczurzym modelu CKD, ocena białek zależnych od witaminy K na poziomie surowicy oraz kości, a także ocena recyklingu witaminy K w kości. Ostatnim celem jest ustalenie związku występującego między białkami zależnymi od witaminy K (VKDP) a stanem mineralnym kości u szczurów z CKD.

Materiał i metody omówione zostały szczegółowo w wyżej zacytowanej pracy jak również w manuskrypcie. Badania wykonano zgodnie z dyrektywą UE 2010/63/UE, a zgodę na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach uzyskano od Lokalnej Komisji Etycznej (24 kwietnia 2013; numer zgody: 29/2013). Zwierzęta były losowo podzielone na dwie grupy: grupa kontrolna (n = 10) została poddana „pozorowanej operacji”, natomiast u zwierząt z grupy badanej (n = 16) przeprowadzono dwuetapową chirurgiczną nefrektomię 5/6, prowadzącą do przewlekłej choroby nerek. Eksperyment prowadzono przez 24 tygodnie. Materiałem badawczym była krew (po odwirowaniu surowica) i kość udowa. Badano stężenia witaminy K1, witaminy K2 i także białek zależnych od VK. Autorka podaje, że dodatkowo wykorzystwała wyniki wcześniejszych badań, w których oznaczono poziomy markerów czynności nerek (mocznik, kreatynina), PTH oraz 1,25-dihydroksywitaminy D3 u szczurów z eksperymentalną mocnicą [pozycja z piśmiennictwa z manuskryptu 78, z pracy 44].

Badania przeprowadzono również w homogenatach kości, gdzie oznaczano karboksylowaną i nieukarboksylowaną osteokalcynę oraz ekspresję genów zaangażowanych w recykling witaminy K (VKORC1, GGXC i UBIAD1). W celu wykrycia zależności między ekspresją enzymów cyklu witaminy K, a kluczowymi genami zaangażowanymi w etapy osteoblastogenezy wykorzystano wyniki

wcześniejszych badań [pozycja z piśmiennictwa z manuskryptu 79, z pracy 46], gdzie oznaczona została ekspresja genu FOXO1 (*Forkhead Box Transcription Factor 1*), ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), RUNX2, ALP oraz BGLAP. Autorka analizowała zależności między obiema badanymi formami osteokalcyny Gla/OC/Glu-OC oraz stosunkiem Gla-OC/Glu-OC w kości a stanem mineralnym kości udowych szczurów z CKD, co było możliwe dzięki wykorzystaniu skanów densytometrycznych wykonanych w ramach wcześniej opublikowanej [78/44].

Pytanie recenzenta: wspomina Pani o wynikach opublikowanych we wcześniejszej pracy (78 i 79 z manuskryptu, i odpowiednio 44 i 46 z publikacji) - proszę o komentarz, czy to były te same grupy zwierząt.

Metody statystyczne, wyniki i ich omówienie są precyzyjnie zaprezentowane w oryginalnej pracy jak również w manuskrypcie opisującym dysertację. Wykorzystane metody pozwoliły Autorce na bardzo wnikliwą analizę metabolizmu endogennej witaminy K w eksperymentalnym, szczurzym modelu CKD, ocenę białek zależnych od witaminy K na poziomie surowicy oraz kości czyli realizację celów dysertacji. Dokonano tego wykorzystując wyniki wcześniej opublikowanych badań.

W badaniach wykazano, że tkanka kostna szczura z CKD posiada zestaw enzymów potrzebnych do metabolizmu VK1. Pomimo tego nie dochodzi do produkcji odpowiedniej ilości aktywnej formy osteokalcyny, co powoduje nieprawidłową mineralizację tkanki kostnej. Autorka analizując zależności pomiędzy parametrami stanu mineralnego kości, ekspresją enzymów cyklu witaminy K i zależnych od niej białek uczestniczących w procesie mineralizacji wykazała, że może to być następstwem typowej dla CKD nadczynność przytarczyc i wzrostu PTH. Autorka wysuwa przypuszczenie, że w wyniku nasilonej przez PTH osteoblastogenezy dochodzi do powstania niedojrzałych, dysfunkcyjnych osteoblastów, niezdolnych do efektywnej produkcji osteokalcyny.

Autorka wyciąga z przeprowadzonych badań 4 wnioski, odpowiadające zasadniczo na cele pracy i reasumujące wyżej wymienione zależności.



Dodatkowo Autorka stwierdza, że pomiar stężenia całkowitej osteokalcyny i jej formy nieukarboksylowanej, które są powszechnie wykorzystywane jako markery niedoboru witaminy K, wydają się mieć niewielkie zastosowanie w warunkach CKD, szczególnie przy współistnieniu nadciśnienia przytarczyc.

Pytanie recenzenta: czy takie stwierdzenie można odnieść do chorych z CKD?

Do manuskryptu załączone jest piśmiennictwo (87 prac), właściwie cytowanych i w większości z ostatnich 20 lat.

Streszczenie w języku polskim i angielskim zamyka opis oryginalnej części pracy.

Pierwsza wymieniona przez Autorkę praca wchodząca w skład cyklu ma charakter poglądowy, została opublikowana w *Nutriens* w 2021 roku, ma 34 strony. Autorzy poruszają w niej zagadnienia związane z niedoborem witaminy K i witaminy D w CKD. Podkreślają brak konsensusu co do tego, jakie poziomy VK i VD w surowicy można uznać za wystarczające w tej konkretnej populacji oraz brak jednoznacznych wytycznych dotyczących sposobu suplementacji tych witamin w przebiegu CKD. Praca jest bardzo wnikliwym przeglądem istniejących badań przedklinicznych i klinicznych i ma na celu omówienie wpływu VK i VD na przebudowę kości w CKD. Autorzy podkreślają, że mechanizmy działania i wpływ tych witamin na kości są różne, ale jednak starają się znaleźć dowody na synergię między nimi w odniesieniu do metabolizmu kostnego, aby odpowiedzieć na pytanie, czy łączna suplementacja VK i VD będzie bardziej korzystna dla zdrowia kości w populacji z CKD. Autorzy po wnikliwej analizie piśmiennictwa stwierdzają, że pacjenci z CKD stanowią grupę kliniczną wysokiego ryzyka niedoboru obu witamin i są narażeni na wiele konsekwencji tego stanu w tym zwiększone ryzyko złamań. Większość analizowanych badań z randomizacją i grupą kontrolną przeprowadzonych na pacjentach z osteoporozą bez CKD sugeruje, że skojarzona suplementacja VK i VD może być bardziej korzystna w zapobieganiu i leczeniu utraty masy kostnej. Co więcej, suplementacja tymi witaminami jest łatwo dostępna, bezpieczna w stosowaniu i stosunkowo niedroga. Jednak nadal nie ma wystarczających dowodów, aby zalecać suplementację VK i VD u chorych na CKD. Na podstawie

badań w populacji ogólnej można jednak podejrzewać, że suplementacja VD i VK u pacjentów z CKD może być możliwym celem terapeutycznym. Stwarza to potrzebę dalszych badań, w których należy zwrócić większą uwagę na zbadanie potencjalnego efektu synergistycznego skojarzonej suplementacji VD i VK na zdrowie kości w tej populacji.

Praca ta jest bardzo cennym podsumowaniem wiedzy na temat witaminy K i witaminy D w CKD.

Obie prace są starannie napisane, zawierają precyzyjnie przygotowane ryciny i tabele z wynikami. Prace te opublikowano w recenzowanych czasopismach.

Podsumowując uważam, że przedstawiona dysertacja w formie 2 publikacji jest powiązaniem spójnych tematycznie artykułów naukowych i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Rozprawa doktorska jest uzupełnieniem wiedzy dotyczącej metabolizmu witaminy K w CKD, w połączeniu z dalszymi badaniami klinicznymi może rozszerzyć możliwości terapeutyczne w CKD-MBD.

Przedstawiona do recenzji dysertacja prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane przez Autorkę wyniki są nowatorskie. Wyjaśnienie roli endogennej witaminy K w przebudowie kości może pomóc w stworzeniu podstaw, które w przyszłości mogą odegrać kluczową rolę w profilaktyce zaburzeń mineralno-kostnych, a być może nawet pozwolą doprowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu tego powikłania wśród pacjentów z CKD, co jest istotną implikacją badań eksperymentalnych przeprowadzonych przez Doktorantkę dla praktyki klinicznej.

#### Ocena pozostałego dorobku Kandydatki do stopnia naukowego doktora

Poza cyklem publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr. analityki Marta Ziemińska jest współautorem 1 pracy (IF 5,924, MNiSW 140 pkt.) oraz 3 doniesień na konferencje naukowe.

W mojej opinii przedstawiona rozprawa **mgr. analityki Marty Ziemińskiej** spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j.Dz.U. z 2022r. poz. 574) toteż zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie **mgr analityki Marty Ziemińskiej** do dalszych etapów postępowania.

Ze względu na nowatorski charakter prac i opublikowanie ich w renomowanych czasopismach wnoszę o wyróżnienie dysertacji.



Prof. dr hab. M. Alicja Dębska-Ślizień

Kierownik Katedry i Kliniki Nefrologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
Gdański Uniwersytet Medyczny