

WYDZIAŁ LEKARSKI W ZABRZU Z ODDZIAŁEM LEKARSKO-DENTYSTYCZNYM,  
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH

Katedra i Klinika Pediatrii

ul. 3 Maja 13/15, 41- 800 Zabrze, sekretariat - tel.(032) 3704 283 (fax. 292)

e-pocztą: pedzab@sum.edu.pl

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziara

Recenzent: Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska

---

Zabrze, 26.07.2018 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Iwony Artemiuk

**" Ocena metabolizmu tkanki kostnej u dzieci z hiperkalciurią idiopatyczną".**

Zgodnie z uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z 20.06.2018 roku, przedstawioną w piśmie z dnia 28.06.2018 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. redakcji przedłożonej pracy
4. znaczenia klinicznego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

### 1. Wartość celu badawczego

Mianem hiperkalciurii idiopatycznej (HI) określa się zwiększone wydalanie wapnia z moczem, przy prawidłowym stężeniu wapnia w surowicy krwi u pacjenta pozostającego na diecie normokalcemicznej. HI jest najczęstszym zaburzeniem metabolicznym, które prowadzi u 30–80% chorych do powstania kamicy nerkowej a u 30–62% do obniżenia gęstości mineralnej kości już w wieku pediatrycznym. Hiperkalciuria idiopatyczna dotyczy 2,2–6,4% dzieci w zależności od rejonu geograficznego.

Z uznaniem należy odnotować, że lek. Iwona Artemiuk podjęła się opracowania, ważnego z klinicznego punktu widzenia, zagadnienia jakim jest ocena gęstości mineralnej kości oraz markerów biochemicznych metabolizmu wapniowo-fosforanowego łącznie z

markerami metabolizmu kostnego u dzieci z HI. Analizowała także wpływ i bezpieczeństwo suplementacji oraz rolę witaminy D<sub>3</sub> w metabolizmie kości w wieku rozwojowym.

W dostępnym piśmiennictwie nadal brakuje bardziej kompleksowej oceny tego zjawiska i czynników ryzyka odległych powikłań u dzieci z HI. Nie zostały ustalone do tej pory standardy zapobiegania rozpoczętemu już w okresie dzieciństwa procesowi redukcji tkanki kostnej w przebiegu HI. Wobec powyższego badania przeprowadzone przez Doktorantkę są w tym aspekcie pionierskie.

We wstępie poza rysem historycznym, definicją i objawami klinicznymi HI Doktorantka w sposób dokładny opisała rolę wapnia w organizmie człowieka oraz etiopatogenezę HI z uwzględnieniem mechanizmów regulacji jelitowej, nerkowej i kostnej homeostazy wapniowo-fosforanowej.

Następnie lek. **Iwona Artemiuk** przedstawiła szczegółowo charakterystykę procesu zwrotnego wchłaniania wapnia w różnych odcinkach nefronu z wymienieniem dróg transportu, poszczególnych kanałów, kotransporterów, receptorów i wzajemnych powiązań czynnościowych.

Kolejny fragment wstępu został poświęcony opisowi tła genetycznego HI oraz mechanizmów immunologicznych mogących mieć związek z obniżeniem masy kostnej u dzieci z HI a także wpływu czynników środowiskowych m.in. diety bogatosodowej, bogatobiałkowej i suplementacji witaminy D. Doktorantka wymieniła również inne przyczyny hiperkalciurii.

Kolejny rozdział Rozprawy został poświęcony tkance kostnej – procesom wzrastania kości na długość, modelowaniu i remodelowaniu. W sposób szczegółowy Doktorantka omawia markery obrotu kostnego, dzieląc je na markery tworzenia i resorpcji kości. Uwzględnia je również w aspekcie markerów aktywujących jak i hamujących. Osobny podrozdział został poświęcony sklerostynie jako glikoproteinie regulującej kościotworzenie. Lek. **Iwona Artemiuk** wyjaśniła także rolę osi FGF23-Klotho w homeostazie fosforanowej i modulowaniu aktywności CYP27B1 1 $\alpha$ -hydroksylazy i CYP24A 24-hydroksylazy a co za tym idzie stężenia kalcytriolu. We wstępie Doktorantka omówiła również zastosowanie densytometrii jako metody diagnostycznej tkanki kostnej dla określenia bezwzględnej masy mineralnej kości i gęstości mineralnej kości z oceną kręgosłupa lędźwiowego oraz oceny całego ciała, z wyłączeniem głowy.

Z tego i dalszych fragmentów Rozprawy wynika niezbicie, że Doktorantka jest bardzo dobrze zaznajomiona z przedmiotem wykonywanych badań.

Lek. **Iwona Artemiuk** zasadnicze cele pracy podała w podpunktach, które są sformułowane jasno i objęły następujące zagadnienia:

1. Ocena gęstości mineralnej kości u dzieci z HI.
2. Ocena markerów biochemicznych metabolizmu kostnego u dzieci z HI.
3. Ocena czynników ryzyka obniżenia gęstości mineralnej kości u dzieci z HI.
4. Ocena wpływu witaminy D<sub>3</sub> (suplementacja i spożycie) na gęstość mineralną kości i wybrane parametry biochemiczne metabolizmu wapniowo-fosforanowego u dzieci z HI.
5. Ocena bezpieczeństwa suplementacji witaminy D<sub>3</sub> u dzieci z HI.

Należy szczególnie podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania są pierwszymi, wykonanymi w takim szczegółowym zakresie w dziedzinie nefrologii dziecięcej w Polsce.

## 2. Poprawność metodyczna

### 2.1 Materiał i metody

Doktorantka objęła badaniami 47 dzieci (22 chłopców, 25 dziewcząt) w wieku od 5 do 18 lat (średnia wieku  $9,5 \pm 3,7$  lat) z HI stosujących dietę normowapniową, hospitalizowanych w Klinice Pediatrii i Nefrologii WUM w latach 2013–2015. Dzieci nie mające ukończonego piątego roku życia Doktorantka wyłączyła z badania. Nie została podana przyczyna takiego ustalenia kryterium wiekowego.

Doktorantka badania przeprowadziła w dwóch etapach. W **pierwszym etapie** (u wszystkich dzieci) wykonano badanie przekrojowe - badanie densytometryczne kości (odcinka lędźwiowego (L1–L4 BMD) i całego ciała (TB BMD) - wyniki przedstawiono jako Z-score oraz ocenę stężenia wybranych parametrów biochemicznych metabolizmu wapniowo-fosforanowego. Dodatkowo w grupie dzieci z HI wykonano zdjęcie rtg nadgarstka dla oceny wieku kostnego. W **drugim etapie** – po rocznej obserwacji - u 38 pacjentów oceniono wpływ spożycia witaminy D<sub>3</sub> pochodzącej z suplementacji i z diety, na gęstość mineralną kości i parametry biochemiczne przemian kostnych.

Badania laboratoryjne obejmowały (w surowicy krwi): stężenie wapnia, fosforu nieorganicznego, fosfatazy alkalicznej, natywnego parathormonu, sklerostyny, osteokalcyny, sRANKL, osteoprotegeryny, FGF-23, 25OHD<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; (w moczu): w grupie badanej w dobowej zbiorce moczu wydalanie: wapnia, fosforanów, kreatyniny, w porcji moczu wskaźniki krystalizacji: wapniowo-kreatyninowy, fosforanowo-kreatyninowy, w grupie kontrolnej: w porcji moczu wskaźniki krystalizacji: wapniowo-kreatyninowy, fosforanowo-kreatyninowy. Analizowano również dietę dzieci z HI.

Doktorantka do dalszych porównań podzieliła grupę badaną ze względu na: obniżoną i prawidłową gęstość mineralną kości (GMK), płeć, występowanie lub brak kamicy nerkowej oraz obniżony i optymalny poziom witaminy D<sub>3</sub>.

Grupę kontrolną stanowiło 33 zdrowych dzieci (14 chłopców, 19 dziewcząt) w średnim wieku  $10,9 \pm 3,3$  lat.

Zastosowano właściwe metody analizy statystycznej danych.

## 2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób niezwykle szczegółowy. Przedstawienie danych i porównania wybranych parametrów przedstawiono w 16 czytelnych i bardzo dobrze dopracowanych graficznie tabelach oraz 29 wykresach i rycinach.

Doktorantka w swojej Rozprawie udokumentowała, że:

1. W pierwszym etapie badania obniżenie GMK w jednej z projekcji stwierdzono u 31,9% dzieci z HI; w zakresie L1-L4 BMD Z-score u 29,8%, w TB BMD Z-score u 14,9%. W obu projekcjach obniżenie GMK występowało u 13% dzieci. Istotnie niższą średnią GMK w zakresie L1-L4 BMD Z-score odnotowano u dzieci z HI w stosunku do dzieci z grupy kontrolnej.
2. Dzieci z HI wykazują niższe średnie stężenie sklerostyny i wyższe średnie stężenie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej, a jedynie dziewczynki również wyższe stężenie sRANKL.
3. Dzieci z HI i obniżoną GMK były starsze od dzieci z prawidłową GMK. Wiek ujemnie korelował z TB BMD Z-score u dzieci z HI.
4. Dzieci z HI i obniżeniem GMK miały wyższe średnie stężenie osteokalcyny oraz niższe średnie stężenie FGF-23 i 25OHD<sub>3</sub> niż dzieci z HI i prawidłową GMK.
5. U dzieci z HI istniała dodatnia korelację między L1-L4 BMD Z-score a średnim stężeniem witaminy D<sub>3</sub>.
6. W podgrupie z obniżeniem GMK dominowała płeć żeńska. U chłopców z HI i obniżeniem GMK stwierdzono wyższe średnie stężenie osteokalcyny. U obu płci stwierdzono niższe średnie stężenie witaminy D<sub>3</sub> w stosunku do dzieci z prawidłową GMK. Dziewczynki z HI i obniżoną GMK były istotnie starsze od dziewczynek z prawidłową GMK.
7. U chłopców z HI istniała dodatnia korelacja średniego stężenia sklerostyny ze średnim stężeniem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, u dziewczynek natomiast korelacja pomiędzy tymi parametrami była ujemna.
8. U 46,8% dzieci z HI stwierdzono występowanie kamicy nerkowej; dodatkowo 45,4% z nich ujawniło przynajmniej w jednej z projekcji obniżenie GMK. U dzieci z kamicy

odnotowano niższą GMK w zakresie L1-L4 i TB BMD Z-score w stosunku do dzieci w grupie bez kamicy. Dzieci z kamicią były istotnie starsze od dzieci bez kamicy.

9. W grupie z HI stężenie witaminy  $D_3 < 20$  ng/ml stwierdzono u 68%, w grupie kontrolnej – u 51,5% dzieci. Określono, że istnieje ponad dwukrotnie większe prawdopodobieństwo uzyskania prawidłowej gęstości mineralnej kości w zakresie L1–L4 BMD u dzieci ze stężeniem witaminy  $D_3 > 20$  ng/ml, niż u dzieci ze stężeniem witaminy  $D_3 < 20$  ng/ml.
10. W wyniku rocznej obserwacji u dzieci otrzymujących suplementację witaminy  $D_3$  w dawce 400j.m/dobę istotnie wzrósł jej poziom w stosunku do dzieci, które witaminę  $D_3$  otrzymywały wyłącznie w diecie jednak bez poprawy w zakresie GMK w L1-L4 i TB BMD Z-score.
11. Podawanie witaminy  $D_3$  nie wpłynęło istotnie na wydalanie wapnia z moczem, kalcemię oraz tworzenie nowych kamieni nerkowych.

### **3. Redakcja przedłożonej pracy**

Rozprawę rozpoczyna spis treści, spis rycin i spis tabel 6-7; wykaz skrótów str. 8-11; streszczenie w języku polskim z wnioskami: str. 12-16; streszczenie w języku angielskim z wnioskami: str. 17-21; następnie typowy układ: wstęp: str. 22-45; hipoteza badawcza i cel pracy: str. 46; materiał i metody: str. 47-55; wyniki: str. 56-90; omówienie wyników: str. 91-103; wnioski: str. 104; opinia komisji bioetycznej: str. 105. Piśmiennictwo zawiera 255 pozycji, w tym 249 w języku angielskim i 63 od roku 2013, co jak widać wymagało od Doktorantki ogromnego nakładu pracy w zebraniu odpowiedniej literatury. W pozycji 210 brakuje roku publikacji.

Praca napisana jest poprawnym językiem polskim, Bardzo dobrze się ją czyta. Skorygowania wymagają drobne błędy stylistyczne oraz sposób przedstawienia skrótów z odpowiadającym tłumaczeniem z języka angielskiego (np. LRP5/LRP6, NHERF-1, Wnt).

### **4. Wartość kliniczna i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz**

W dyskusji Doktorantka konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki w odniesieniu do danych z piśmiennictwa światowego.

Doktorantka podkreśla, że u dzieci z HI mimo często łagodnego przebiegu dochodzi do niepożądanych następstw: kamicy nerkowej i obniżenia gęstości mineralnej kości, stanowiących istotną przyczynę chorobowości, jak i obciążenie ekonomiczne w aspekcie społecznym. Według aktualnych doniesień kamicią nerkową obserwuje się u 50–60% dorosłych z HI. Podobnie jak inni autorzy, Doktorantka wykazała, że hiperkalciuria wiąże się z utratą lub istotnym zahamowaniem wzrostu tkanki kostnej a niższy BMD Z-score u dzieci z HI jest obserwowany w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, z uwagi na przeważającą tam kość

beleczkową, która w stanach ujemnego bilansu wapniowego ulega najszybciej resorpcji. Ważną obserwacją wynikającą z Rozprawy jest fakt, że zapoczątkowany w dzieciństwie proces utraty tkanki kostnej skutkuje osteoporozą w wieku dorosłym. Uzyskane więc w Rozprawie wyniki zachęcają do kontynuacji badań na reprezentatywnej populacji dzieci z HI oraz do śledzenia dynamiki zmian w aspekcie wieloletnim. W świetle uzyskanych przez Doktorantkę własnych wyników jest celowe wykonywanie badań prospektywnie – np. w odstępach rocznych, co już zostało zapoczątkowane - dla oceny przebiegu klinicznego wystąpienia powikłań kostnych i wdrożenia działań profilaktycznych.

Doktorantka stwierdziła, że analizując mechanizm działania sklerostyny w odniesieniu do badań prowadzonych na myszach, można sądzić, że u dzieci z HI i obniżoną GMK dochodzi do obniżenia stężenia sklerostyny, aby odbudowywać częściowo zresorbowaną już kość do czego niezbędna jest przewaga procesów osteoblastogenezy nad osteoklastogenezą, regulowana przez sklerostynę. Dodatnia korelację stężenia kalcytriolu i stężenia sklerostyny obserwowana była u chłopców i może wynikać ze zwiększenia wrażliwości tkanek na  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , co prowadzi do zachwiania równowagi wskaźnika RANKL/OPG i zwiększonej resorpcji kości. Fragment Rozprawy dotyczący zagadnienia sklerostyny uważam za niezwykle ważne i nowatorskie osiągnięcie Doktorantki.

Niezmiernie ważną obserwacją, było stwierdzenie, że u dzieci z HI wzrasta stężenie FGF-23, przy jednocześnie istotnie wyższym poziomie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Doktorantka podkreśla, że za wysokie stężenie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u dzieci z HI może odpowiadać białko Klotho, będące kofaktorem dla FGF-23, które pośredniczy w zmianach we wchłanianiu zwrotnym wapnia i fosforu w nerkach, a jednocześnie łącznie z iPTH może uczestniczyć w zwiększeniu produkcji RANKL i zmniejszeniu syntezy OPG w osteoblastach.

W badaniach własnych Doktorantka wykazała, że dzieci z HI i obniżoną gęstością mineralną kości charakteryzowały się wyższymi stężeniami osteokalcyny w surowicy krwi, przy prawidłowej aktywności fosfatazy alkalicznej. Lek. Iwona Artemiuk podkreśla, że osteokalcynę można więc traktować jako marker remodelingu kości u dzieci z HI, na wczesnym etapie trwania choroby i marker oceny nasilenia procesów resorpcyjnych poprzez określenie intensywności mechanizmów naprawczych. Zwiększony obrót kostny i przyspieszone procesy naprawcze były charakterystyczne dla chłopców z HI, dowodem na co, jest istotnie wyższy u nich poziom osteokalcyny w surowicy krwi. Można sądzić, że procesy resorpcyjne są bardziej nasilone u dziewczynek, o czym świadczy wyższy poziom sRANKL w surowicy krwi.

**Lek. Iwona Artemiuk** podkreśla, że w literaturze można znaleźć rozbieżne dane dotyczące suplementacji witaminą D<sub>3</sub> u pacjentów z HI. Ciekawą obserwacją z praktycznego punktu widzenia, co Doktorantka uwypukla, jest spostrzeżenie, że mimo dodatkowej suplementacji witaminą D<sub>3</sub>, nie zaobserwowano u badanych dzieci wzrostu kalcemii, kalciurii ani tendencji do tworzenia nowych kamieni nerkowych co wskazuje na bezpieczeństwo stosowania niskich dawek witaminy D<sub>3</sub> u dzieci z HI.

Zachęcam gorąco Doktorantkę do kontynuacji badań ze zwiększeniem liczebności grupy pacjentów co podniosłoby walory przyszłych publikacji.

Sformułowanych 5 wniosków stanowi w pełni odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

### WNIOSEK KOŃCOWY

Biorąc pod uwagę nowoczesność, wartość merytoryczną pracy, ważny aspekt kliniczny i praktyczny oraz przeprowadzenie rzeczowej dyskusji oceniam Rozprawę jako spełniającą wymagania stawiane rozprawom na **stopień doktora nauk medycznych** określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882 z późn. zm.).

Mam więc zaszczyt przedłożyć **Wysokiej Radzie I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego** wniosek o dopuszczenie **lek. Iwony Artemiuk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę innowacyjny charakter badań oraz duży wkład pracy Doktorantki włożony w opracowanie rozprawy doktorskiej, mam zaszczyt wnioskować o przyznanie pracy wyróżnienia.

6354679 Prof. dr hab. n. med.  
Maria Szczepańska  
specjalista pediatra, nefrolog  
nefrolog ozonoterapeuta  
Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska