Wrocław, 2025-07-22

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Rozmus pt.
Wpływ wybranych polimorfizmów w genach VDBP i VDR na stężenie witaminy D oraz jej transportera u pacjentów ze zdiagnozowanym obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego
wykonanej pod kierunkiem
dr hab. Anny Cieślińskiej, prof. UWM oraz dr hab. n. med. Janusza Płomińskiego, prof. CMPK

Prezentowany cykl publikacji dotyczy ważnego i słabo zbadanego obszaru badań ortopedycznych: czynników molekularnych i genetycznych mogących przyczyniać się do obluzowania protezy po całkowitej endoprotezoplastyce stawu biodrowego (THA). Chociaż THA jest dobrze ugruntowaną i powszechnie wykonywaną interwencją chirurgiczną, obluzowanie protezy pozostaje istotnym, długotrwałym powikłaniem, często wymagającym kosztownych i złożonych operacji rewizyjnych. Niniejsze badania, prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej, analizują rolę układu endokrynnego witaminy D – a konkretnie polimorfizmów genów receptora witaminy D (VDR) i białka wiążącego witaminę D (VDBP) – we wpływie na wyniki endoprotezoplastyki stawu biodrowego. Dwa opublikowane badania stosują analizę genetyczną, testy biochemiczne i fenotypowanie kliniczne, co łącznie daje nowe spojrzenie na to, jak indywidualna zmienność metabolizmu witaminy D może wpływać na integrację implantu z kością i stabilność protezy. Publikacje te tworzą spójny i nowatorski wkład naukowy, łączący genetykę molekularną, ortopedię i medycynę spersonalizowaną.

Recenzowana rozprawa doktorska jest więc cyklem 2 publikacji: (1) *International Journal of Molecular Sciences* (IJMS), 2024; (2) *Nutrients,* 2025, w których mgr. Inż. Dominika Rozmus jest pierwszą autorką, a dołączone oświadczenia potwierdzają jej wiodący udział w prowadzeniu tych badań i przygotowaniu publikacji. Autorka przygotowała także ogólne omówienie wyników swoich badań, wraz z wprowadzeniem w omawiane w publikacjach zagadnienia. Omówienie to jest bardzo dobrze przygotowane i świetnie wprowadza czytelnika w szczegóły naukowe jej zainteresowań badawczych. Mgr inż. Dominika Rozmus przedstawiła także dobrze sformułowaną, dwuczęściową hipotezę badawczą dotyczącą z jednej strony różnic genetycznych pomiędzy pacjentami z obluzowaną endoprotezą stawu biodrowego a pacjentami bez obluzowania oraz zdrowymi osobami, a z drugiej strony różnic w poziomach VDBP oraz witaminy D (25(OH)D) między tymi grupami badanymi. Zarysowała także zadania badawcze, które posłużyły do udowodnienia założonych hipotez. Autorka streściła także metodykę badawczą zastosowaną w publikacjach oraz opisała uzyskane wyniki. Tekst ten jest starannie przygotowany, jednakże, być może przez nieuwagę, wkradły się błędy, takie, jak stwierdzenie, że witamina D jest białkiem (str. 14: „Literatura naukowa potwierdza ważną rolę witaminy D w równowadze mineralnej kości, a jej aktywna forma ($1,25(OH)_2D$) może również działać jako bioaktywne białko,…"), czy brak precyzji dotyczący nazewnictwa: kalcytriol, jest aktywną formą witaminy D_3, zatem prawidłowo powinien być określony, jako $1,25(OH)_2D_3$ a nie $1,25(OH)_2D$ – co sugeruje, zarówno witaminę D_2, jak i D_3 (str. 17).

Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

Pierwsza publikacja z *IJMS*, 2024 dotyczy polimorfizmów genu VDR w kontekście wyników endoprotezoplastyki stawu biodrowego. We wstępie szczegółowo przedstawiono kliniczne tło endoprotezoplastyki stawu biodrowego, metabolizm witaminy D oraz uzasadnienie badania zmienności genu VDR. W niniejszym badaniu analizowano związek między czterema powszechnymi polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP) w genie VDR – *ApaI*, *BsmI*, *FokI* i *TaqI* – a wynikami THA. Autorka podzieliła pacjentów na trzy grupy: z prawidłowo funkcjonującymi protezami (CA), z obluzowaniem protezy (L) oraz zdrową grupę kontrolną (C). Badanie wykazało, że niektóre genotypy i haplotypy VDR są istotnie częstsze u pacjentów z obluzowaniem protezy. Warto zauważyć, że genotyp *tt (TaqI)*, *BB (BsmI)* i *FF (FokI)* były związane ze zwiększonym ryzykiem, a haplotyp ACAC (*AtBF*) był ponad dwukrotnie częstszy w grupie L (OR = 2,35, p = 0,001). W badaniu zastosowano odpowiednie techniki

biologii molekularnej, w tym genotypowanie i ilościową ocenę stężenia VDR i 25(OH)D w surowicy. Grupy pacjentów zostały jasno zdefiniowane, a analiza statystyczna (w tym testy Hardy'ego-Weinberga, chi-kwadrat i regresja logistyczna) była odpowiednia.

Dyskusja jest wyważona i umieszcza wyniki w kontekście przebudowy kości, osteointegracji i czynników immunologicznych wpływających na THA. W obszernej tabeli, przygotowanej na potrzeby tej dyskusji, Autorka zebrała dotychczasowe dane literaturowe, w których poruszano problematykę polimorfizmów *VDR* w kontekście chorób kości, ale oceny porównawcze nie dotyczyły THA. To podkreśla nowatorski charakter Jej badań. Autorka w dyskusji wskazuje również na ograniczenia i potrzebę dalszych badań, zwłaszcza funkcjonalnych i prospektywnych. Autorka zauważa również, że jakkolwiek stężenie VDR w surowicy/osoczu może odzwierciedlać procesy patologiczne, zwłaszcza związane ze stanem zapalnym lub przebudową tkanek (np. w przypadku obluzowania protezy), nie jest to jednak wiarygodny ani samodzielny biomarker aktywności witaminy D i najlepiej stosować go w połączeniu z danymi genetycznymi, biochemicznymi (np. 25(OH)D) i klinicznymi. Potrzebne są dalsze badania (może Doktorantka się ich podejmie w przyszłości?), aby określić użyteczność badania VDR w osoczu/surowicy, jego pochodzenie, kinetykę i swoistość. Podstawową więc zaletą tej publikacji jest integracja istotnych danych klinicznych z wynikami badań molekularnych, zaś pewnym ograniczeniem jest nieuwzględnienie takich czynników, mogących potencjalnie zakłócać otrzymane wyniki, jak np. aktywność fizyczna, spożycie wapnia itp. w analizach wieloczynnikowych.

Druga publikacja dotyczy związków polimorfizmów genu VDBP z wynikami endoprotezoplastyki stawu biodrowego i opublikowana została w *Nutrients*, 2025. Jest to jedno z niewielu badań łączących polimorfizmy w genie VDBP z poziomem tego białka w surowicy i z obluzowaniem protezy. Wstęp dobrze umieszcza te badania w szerszym kontekście metabolizmu witaminy D i powikłań związanych z protezami. Logicznie opiera się na wcześniejszych pracach (w tym na własnym badaniu autorów dotyczącym VDR – *IJMS*, 2024). Tak więc, niniejsze badanie obserwacyjne ocenia znaczenie dwóch kluczowych polimorfizmów w *VDBP*, rs4588 i rs7041, dla wyników THA oraz ocenia ich związek z poziomami VDBP i 25(OH)D w surowicy. Przeanalizowano trzy grupy pacjentów zdefiniowane tak samo jak poprzednio. Wykazano, że stężenia VDBP i 25(OH)D w surowicy różniły się istotnie między grupami, szczególnie między grupą z obluzowaną endoprotezą a grupą kontrolną. Genotyp TT rs4588 był związany z wyższym ryzykiem obluzowania protezy (w niektórych porównaniach). Statystycznie istotny związek polimorfizmu rs4588 (w szczególności genotypu TT) ze zwiększonym ryzykiem obluzowania to nowe odkrycie kliniczno-genetyczne. Badanie wprowadza dodatkową nowość poprzez korelację polimorfizmów genów VDBP z fenotypem biochemicznym (poziomy VDBP i 25(OH)D), wzmacniając związek mechanistyczny. Badanie to jest solidne metodologicznie, z jasnymi protokołami pobierania próbek, zwalidowanymi technikami genotypowania i odpowiednią analizą statystyczną (OR, chi-kwadrat, korelacja Kruskala-Wallisa i Spearmana). Chociaż wykazano, że poziomy VDBP różnią się istotnie, związek przyczynowo skutkowy między wariantami genetycznymi a wynikami klinicznymi opiera się na obserwacjach (podobnie jak w pierwszej pracy), ale nie został udowodniony eksperymentalnie, nie przeprowadzono żadnych testów funkcjonalnych w celu walidacji biologicznego wpływu polimorfizmów. Ponadto potencjalne czynniki mogące zakłócać wyniki badania, jak np. aktywność fizyczna, spożycie wapnia nie są szczegółowo kontrolowane ani omawiane. Warto podkreślić, że Autorka zdaje sobie sprawę z ograniczeń własnych badań i wyraźnie podkreśla to w dyskusji, zwłaszcza tej drugiej pracy.

Dyskusja ogólnie dobrze interpretuje uzyskane wyniki, sugerując mechanizmy, poprzez które zmienność genetyczna w VDBP może wpływać na biodostępność witaminy D i wyniki THA. Jednakże, w publikacji tej, Autorka szeroko dyskutuje wyniki innych autorów w kontekście metod stosowanych do oceny poziomu witaminy D, ale nie analizuje swojej metodyki badawczej i uzyskanych wyników pod kątem oceny stężenia VDBP. Wiele zestawów ELISA wykorzystuje przeciwciała monoklonalne, które mogą nie rozpoznawać wszystkich izoform VDBP w równym stopniu. Na przykład niektóre zestawy preferencyjnie wykrywają GC1F lub GC1S, co prowadzi do systematycznego niedoszacowania u osób z allelami GC2. Nawet w przypadku testu poliklonalnego, różnice w modyfikacjach potranslacyjnych między izoformami mogą wpływać na wiązanie przeciwciał. Mimo to, badania Doktorantki nie opierają się wyłącznie na

bezwzględnych poziomach VDBP; analizuje ona również powiązania genotypowo-fenotypowe, co wzmacnia wnioski pomimo ograniczeń testu. Jednakże, Autorka powinna doprecyzować, czy użyty przez nią test opiera się na przeciwciałach mono- czy poliklonalnych, podać szerszą jego charakterystykę i przedyskutować, jak to może wpływać na interpretację wyników.

Dodatkowo, jednym z czynników, które nie zostały uwzględnione w analizie przedstawionej w tej publikacji jest albumina, która obok VDBP odgrywa istotną rolę w transporcie witaminy D w osoczu. Należy zauważyć, że około 10–15% 25(OH)D w krążeniu jest związane właśnie z albuminą, a jedynie <1% występuje w formie wolnej (niezwiązanej). Choć stężenie tej wolnej frakcji jest niewielkie, to właśnie forma wolna oraz ta związana z albuminą są uznawane za biologicznie dostępne - czyli aktywne metabolicznie i zdolne do wejścia do komórek. Z tego względu pomiar wyłącznie całkowitego stężenia VDBP i 25(OH)D, bez jednoczesnej analizy poziomu albuminy, może zaburzać interpretację rzeczywistej dostępności witaminy D dla tkanek. Jest to szczególnie istotne w kontekście pacjentów po operacjach ortopedycznych, ponieważ stan zapalny, uraz lub choroby przewlekłe itp., mogą prowadzić do obniżenia poziomu albuminy w surowicy. W takich sytuacjach może dojść do przesunięć w równowadze między frakcjami 25(OH)D, co nie jest widoczne, jeśli oceniamy jedynie całkowite stężenie witaminy D czy VDBP. Zatem pominięcie albuminy w analizie stanowi potencjalne ograniczenie badania, które warto uwzględnić w interpretacji wyników. Jeśli założymy, że stężenie VDBP i 25(OH)D są wystarczającymi markerami metabolicznego statusu witaminy D, może to prowadzić do niedoszacowania lub przeszacowania ryzyka obluzowania endoprotezy. Uzupełnienie przyszłych analiz o oznaczenie albuminy oraz obliczenie tzw. bioaktywnej witaminy D (na podstawie wzorów uwzględniających VDBP, 25(OH)D i albuminę) mogłoby znacząco zwiększyć wartość predykcyjną badań i przyczynić się do bardziej spersonalizowanego podejścia w leczeniu pacjentów ortopedycznych.

Natomiast pewnym ograniczeniem obu prezentowanych badań/publikacji jest brak danych dotyczących stężenia wapnia w surowicy, który jest kluczowym elementem układu endokrynnego witaminy D. Ponieważ aktywność biologiczna witaminy D odgrywa fundamentalną rolę w regulacji homeostazy wapniowo-fosforanowej, pomiar stężenia wapnia dostarczyłby cennych informacji na temat funkcjonalnych konsekwencji obserwowanych zmienności genetycznych. W szczególności ocena stężenia wapnia w surowicy mogłaby pomóc wyjaśnić, czy zidentyfikowane polimorfizmy VDR i VDBP wpływają na stabilność protezy poprzez klasyczne mechanizmy mineralizacji i przebudowy kości. Ponadto, stężenie wapnia, najlepiej interpretowane łącznie ze stężeniem fosforanów i parathormonu, pozwoliłoby na pełniejsze zrozumienie środowiska metabolicznego wpływającego na osteointegrację. Pominięcie tych parametrów ogranicza możliwość wnioskowania, czy wpływ zmienności szlaków metabolicznych witaminy D wynika z wpływu na równowagę mineralną szkieletu, czy też jest realizowany poprzez szlaki alternatywne, takie jak immunomodulacja lub lokalne procesy zapalne. W związku z tym warto byłoby przeprowadzić dalsze badania obejmujące markery metabolizmu wapnia w celu potwierdzenia i rozszerzenia obecnych ustaleń.

Pomimo powyższych uwag, czy raczej zagadnień do dyskusji, uważam, że obie prace są spójne naukowo i wnoszą nowe spostrzeżenia na temat genetycznego i biochemicznego podłoża obluzowania protezy po całkowitej endoprotezoplastyce stawu biodrowego. Poprzez analizę polimorfizmów w genach VDR i VDBP, a także odpowiadających im poziomów białka i witaminy D, badania te dostarczają cennych informacji na temat tego, jak indywidualne różnice w metabolizmie i sygnalizacji witaminy D mogą wpływać na stabilność implantu. Badania te mogą przyczynić się do dalszego rozwoju dziedziny nutrigenomiki i farmakogenetyki ortopedycznej, oferując możliwy wkład w poprawę stratyfikacji ryzyka, spersonalizowanego leczenia pacjentów, a być może nawet strategii badań przesiewowych przedoperacyjnych w opiece ortopedycznej. Zrozumienie tych czynników molekularnych może ostatecznie doprowadzić do lepszych wyników chirurgicznych i zmniejszenia częstości rewizji. Dalsze badania z udziałem większych kohort, poszerzenie analiz o stężenie albuminy czy o analizy parametrów związanych z przebudową kości oraz analizy funkcjonalne byłyby logicznym kolejnym krokiem.

Wobec powyższego, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Rozmus spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie

wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Rozmus do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Pomimo pewnych ograniczeń przeprowadzonych badań, które wskazałam w recenzji, uważam, że są one nowatorskie i pokazują nowe, nie publikowane dotąd obserwacje, które mogą mieć istotne znaczenie kliniczne, a także otwierają szerokie pole do dalszych, niezwykle interesujących analiz. Ponadto, mgr Dominika Rozmus jest autorką 12 publikacji (zgodnie z PubMed), w tym dwóch wchodzących w skład niniejszej rozprawy, zaś w 4 jest pierwszą autorką, a więc jest aktywnym młodym naukowcem, co w mojej opinii zasługuje na wyróżnienie. Zatem składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.