

Prof. dr hab. Ewa Ziemann,

Królowej Jadwigi 27/39

61-867 Poznań

e-mail: [ziemann@awf.poznan.pl](mailto:ziemann@awf.poznan.pl)

### *Recenzja*

**rozprawy doktorskiej mgr Karola Danielika pt.: „Stężenie całkowitej oraz wolnej witaminy D w surowicy krwi a wybrane elementy stylu życia u sportowców”. Promotorem dysertacji jest Pani prof. dr hab. Małgorzata Słowińska-Lisowska, a badania przeprowadzono w Akademii Wychowania Fizycznego im. Polskich Olimpijczyków we Wrocławiu.**

Rozprawa doktorska mgr Karola Danielika ma strukturę typową dla dysertacji doktorskich. Liczy łącznie 145 stron; zawiera 40 tabel i 9 wykresów w tekście głównym oraz rozdział załączników prezentujących wykorzystane w badaniach kwestionariusze i dzienniczek żywieniowy. Wyniki badań autor opisał w obszernych streszczeniach w języku polskim i języku angielskim. Autor ocenił zależności między stężeniem całkowitej oraz wolnej witaminy D mierzonej w surowicy krwi, a wybranymi elementami stylu życia u sportowców. Postawił cztery pytania badawcze dotyczące zmian stężenia wolnej i całkowitej witaminy D w zależności od pory roku i od miejsca treningu; poziomu aktywności fizycznej oraz wybranych elementów stylu życia, które potencjalnie mogłyby zmieniać stężenie witaminy D. W dysertacji nie postawiono hipotezy badawczej, ale w kontekście powszechnego niedoboru witaminy D w społeczeństwie żyjącym w naszej szerokości geograficznej (dotyczy to również sportowców) oraz postawionych pytań badawczych treść hipotezy zdaje się być oczywista. W celu uwzględnienia siły wpływu poszczególnych czynników zawartych w pytaniach badawczych w dysertacji zaplanowano dwa pomiary - w okresie zimowym (łącznie 74 osoby) i letnim (łącznie 49 osób), w których wzięły udział trzy grupy badawcze: piłkarzy nożnych, zawodników trenujących judo oraz grupa kontrolna. Ponadto Autor uwzględnił miejsce podejmowania aktywności fizycznej: warunki zewnętrzne lub trening w pomieszczeniu. W pracy Pan Magister zastosował do oznaczenia stężenia 25(OH)D metodę analizy ilościowej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Ponadto do obliczenia stężenia wolnej 25(OH)D autor wykorzystał dwa równania zaproponowane przez autorów Bikle (1986) i Vermeulena (1999). Ponadto oznaczono

poziom albuminy, białka wiążącego witamin D (VDBP), parathormonu i wapnia. Oceniono również budowę antropometryczną uczestników badań, ich styl życia w oparciu o przeprowadzone kwestionariusze FFLQ i aktywności fizycznej (IPAQ) oraz wykorzystano 24-godzinny dzienniczek żywieniowy z aktualnym jadłospisem. Uzyskane wyniki zostały omówione i porównane z wynikami innych autorów w rozdziałach: Wyniki badań oraz Dyskusja. Praca kończy się podsumowaniem i sformułowaniem 12-tu wnioskach końcowych. Przeglądu piśmiennictwa jak i dyskusji wyników Autor dokonał w oparciu o 179 pozycji piśmiennictwa. Moje uwagi krytyczne będą podawane zgodnie z przyjętą strukturą w pracy.

### **Rozdział: Wstęp**

Wstęp liczy 19 stron i jest to bardzo dobrze napisany rozdział dysertacji. Autor dokonał w nim rzetelnego przeglądu piśmiennictwa dotyczącego zarówno metabolizmu jak i czynników regulujących stężenie witaminy D, konsekwencji jej niedoboru oraz roli w organizmie, z uwzględnieniem grup o różnym poziomie aktywności fizycznej, zróżnicowanych pod względem wieku i rozbieżności wynikających z metod jej oznaczania. Treści ujęte w tym rozdziale są uporządkowane w zależności od omawianego zagadnienia i uzupełnione czytelnymi schematami i tabelami. Autor przedstawił obecny stan wiedzy klarownie, ale z równoczesnym podkreśleniem tych danych z piśmiennictwa, które uzasadniają kontynuowanie badań naukowych w tym temacie. Autor omówił pojęcie „witaminy D”, które to obejmuje rozpuszczalne w tłuszczach związki sterolowe, mające nieaktywną biologicznie formę prohormonów — głównie cholekalcyferol (witamina D3) oraz w mniejszym stopniu ergokalcyferol (witamina D2). Zwrócił uwagę na aktywną i nieaktywną postać witaminy D oraz podjął ważną problematykę oznaczania metabolitów witaminy D w tym statusu formy całkowitej i wolnej.

### **Z obowiązku recenzenta wskazuję kilka uwag krytycznych:**

- a) Autor w tekście odnosi się do ryciny 1 podkreślając zależność między stężeniem witaminy D, a parathoromem – ta rycina tego nie wskazuje
- b) Rycina 1 pochodzi z publikacji z 2016 roku, która omawia zależność wchłaniania witaminy D o mikrobioty jelitowej, więc sądzę, iż autor dysertacji tą tematykę zna, więc szkoda, że ją pominął w opisie
- c) Sformułowanie, iż przeciwzapalne działanie witaminy D przekłada się na lepsze wyniki w sporcie wymagałoby rozwinięcia (str 130). Stan zapalny w treningu sportowym

ma istotną rolę do odegrania w zmianach adaptacyjnych

- d) str 10 autor cytuję pozycję literatury Wang i wsp. z roku 2012, w rozdziale piśmiennictwo jest jedynie pozycja tego autora, ale z 2017 roku
- e) str 11 autor cytuję pozycję literaturową Ceglia i wsp. 2013 wskazującą na obecność receptora witaminy D w jelitach, nerkach i kościach. Wspomniana publikacja dotyczy witaminy D i mięśni szkieletowych, a nie wymienionych tkanek.
- f) Str 12 zacytowano pozycję Garland i wsp. 2014 – nie ma tej pozycji w piśmiennictwie
- g) Autor cytuję pozycję piśmiennictwa Broughton KS, Larson-Meyer DE 2012 (zmienia kolejność autorów), powinno być Willis i wsp. 2012, gdyż zapis publikacji jest następujący Willis KS, Smith DT, Broughton KS, Larson-Meyer DE. Vitamin D status and biomarkers of inflammation in runners. Open Access J Sports Med 2012, 3: 35–42.
- h) Str 13 Autor cytuję publikację Willis i wsp. 2010 w piśmiennictwie brak jest publikacji z tego roku są dwie z 2008 i 2012
- i) W tabeli 1 Autor omawia publikację Koundourakis i wsp., 2014. Zaznaczył, iż w tym eksperymencie nie zastosowano suplementacji -dlatego nasuwa się pytanie z czego wynikało zwiększenie stężenia witaminy D
- j) Str 14 w tekście zacytowana jest Allison R Close powinno być Owens DJ, Allison R, Close GL. Vitamin D and the Athlete: Current Perspectives and New Challenges. Sports Med 2018, 48: 3–16.
- k) Doktorant wiele razy we wstępie używa słowa “aktualne badania i perspektywa badań na przyszłość” w odniesieniu do publikacji, które pochodzą z roku 1999 lub sprzed 7-10 lat (rok publikacji 2013 lub 2017) lub najnowsze badania (str 19) dostarczają informacji ..... i cytowana jest praca sprzed 7 lat Hermanni wsp. 2017. Uważam takie sformułowania za niefortunne
- l) Str 18 Autor cytuję pracę Rozums i wsp 2020- brak jest tej pozycji w spisie piśmiennictwa
- m) Pozycja DeLuca w tekście głównym jest rok publikacji 2004, w piśmiennictwie 2008
- n) Uwagi gramatyczne: Str 14 coraz więcej uwagi „poświęcą się” zamiast „poświęcą się”; Str 19 „ocena tylko całkowitego stężenia 25(OH)D jako wskaźnika niedoboru witaminy D jest prawdopodobnie niewystarczające” powinno być niewystarczająca; Str 19 „dwoma metodami – bezpośrednia i kalkulowana” powinno być bezpośrednią i kalkulowaną

- o) Wątek na str 20 dotyczący „oznaczenia z wykorzystaniem jednego z testów wskazywało deficyt u 52% badanych osób, natomiast z drugiego tylko u 36 % pacjentów” , jest ciekawy i moim zdaniem wymaga wyjaśnienia czytelnikowi interpretacji tych wyników (Barake i wsp., 2012).
- p) Czy dobową zmienność stężenia 25(OH) D ma związek z cukrzycą typu 2, jak sugeruje cytowana praca na str 20 (Masood I wsp. 2015)

### **Rozdział: Cel pracy**

Autor postawił w pracy cztery pytania badawcze. Wszystkie są zasadne, choć małe wątpliwości budzi pytanie pierwsze, na które w oparciu o analizę piśmiennictwa można z pewnością w 99% odpowiedzieć twierdząco. Może warto było postawić choć jedną hipotezę badawczą związaną ze stylem życia. Skoro uczestnikami badań byli profesjonalni sportowcy, a deficyt witaminy D jest powszechnym problemem, można założyć, iż w grupie sportowców autor nie zaobserwuje deficytów witaminy D, gdyż ich świadomość powinna być wyższa niż osób nietreningujących.

### **Rozdział: Materiał i metody badań**

Rozdział jest dobrze opisany, niemniej jednak jest kilka nasuwających się pytań:

- a) Autor w opisie wskazuje, iż „materiał badawczy stanowili zawodnicy ....” należało raczej napisać, iż w badaniach uczestniczyli lub materiał biologiczny pobrano od ....
- b) Sformułowanie, iż zawodnicy mieli podobne obciążenia wysiłkowe w dwóch różnych dyscyplinach raczej jest lakoniczne. Czy Autor rejestrował ilość jednostek treningowych(czasowo)?
- c) Czy zawodnicy biorący udział w dwóch eksperymentach o różnych porach roku to były te same osoby?
- d) Należało wprowadzić oznaczenia grup w tekście i potem w tabelach 2 i 3. Nie jasne jest dla czytelnika grupa „Sport” (suma grup trenujących?)
- e) Zastanawiające jest prawie identyczne spożycie kalorii i brak różnic między grupami trenującymi, a kontrolną.
- f) Wyniki zostały przedstawione równocześnie jako średnia z odchyleniem i mediana, co uważam za prawidłowe, niemniej jednak nie czyni to pracy bardziej przejrzystej

Bardzo dobrze oceniam opis metod laboratoryjnych tj w przypadku analizy materiału biologicznego jakim jest krew, napisany jest z dużą dokładnością i podaniem niezbędnych szczegółów. Stężenie wolnej 25(OH)D w surowicy kalkulowano przy użyciu dwóch metod z uwzględnieniem białka VDBP oraz albumin. Dobór statystyczny metod jest właściwy. Choć warto było wspomnieć w sekcji metod, iż zależności pomiędzy zmienną wyjaśniającą, a zmienną zależną zostały przedstawione za pomocą współczynnika  $\beta$ .

### **Rozdział: Wyniki badań**

Charakterystyka antropometryczna uczestników badań została zawarta w rozdziale Metody. Brak jest wartości  $VO_2\max$  dla grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę fakt, iż zastosowano metodę pośrednią w oznaczaniu tego wskaźnika uważam to za lukę w wynikach. Pozostałe wyniki Autor przedstawił przede wszystkim w formie 36 tabel i 9 wykresów. Surowe dane głównie dotyczą procentowej ilości osób z określonym stężeniem witaminy D. W tabelach znajdują się również wartości stężeń wolnej i całkowitej 25(OH)D oraz ich międzygrupowe porównanie. Dodatkowo autor zaprezentował porównanie zmian stężeń między zimą, a latem wolnej i całkowitej 25(OH)D. Niedostateczne całkowite stężenie 25(OH)D (<30ng/ml) Autor stwierdził u 69% sportowców uprawiających judo, 71% piłkarzy i u aż 87% osób o umiarkowanym i niskim poziomie aktywności fizycznej w okresie zimowym. Odsetek ten wynosił 33% dla sportowców judo i 25% dla piłkarzy w okresie letnim. Nie zaobserwował istotnej różnicy w stężeniach wolnej i całkowitej 25(OH)D w zależności od miejsca treningu. W oparciu o zalecenia dotyczące wolnej 25(OH)D ( $\geq 8,5$  pg/ml), niedobór dotyczył 26% sportowców judo, 23% piłkarzy i 30% osób o umiarkowanym i niskim poziomie aktywności fizycznej w okresie zimowym. Natomiast w okresie letnim wszyscy sportowcy mieli prawidłowy poziom. Tabele, w których porównywane są poszczególne stężenia, zawierają wartości współczynnika p, natomiast nie zawierają dodatkowych danych np. wielkości efektu przy danej liczebności grupy i porównania, co zdecydowanie by wzmocniło wartość statystyczną uzyskanych wyników. Pomimo, iż Autor dysertacji wykorzystał do obliczenia wolnego stężenia 25(OH)D wartości albuminy i białka wiążącego VDBP, nie pokazuje ich surowych danych. Dalsza prezentacja wyników jest pokazana w ten sam, schematyczny sposób, głównie jako wzajemne zależności wyrażone za pomocą niestandardyzowanego współczynnika  $\beta$ . Brak jest w tym przypadku równania oraz znajomości wyrazu wolnego. Czyni to prezentację wyników badań bardzo obszerną i monotonną. Szczególnie w kontekście wykorzystanych kwestionariuszy warto by było zamieścić dane surowe, a nie tylko wartości współczynnika Beta.

## **Gramatyka:**

Str 41 „ W okresie letnim nie odnotowano różnice” powinno być nie odnotowano różnic

## **Rozdział Dyskusja i Wnioski**

1. Uzyskane wyniki zostały porównane do danych z piśmiennictwa. Autor wykazał, iż stężenie wolnej i całkowitej 25(OH)D istotnie zależy od suplementacji i pory roku. Niestety mimo powszechnie wiadomego deficytu witaminy D w naszym społeczeństwie nadal jest on odnotowany zarówno w grupach nietreningujących jak i treningujących. Fakt niedoboru stężenia całkowitej 25(OH)D we wszystkich badanych grupach w zakresie aż 69-87% badanych wskazuje, iż należy nadal prowadzić badania w tej tematyce. Procentowy niedobór na podstawie stężenia wolnej witaminy D poniżej wartości optymalnej (<8,50 pg/ml), wygląda bardziej optymistycznie. Warto było jednak w analizie porównawczej i określaniu istotności statystycznej oprzeć się na jednej formie przeliczania wolnej formy witaminy D. Niemniej jednak Autor podkreślił, iż zalecenie pomiaru stężenia wolnej witaminy 25(OH)D jako wskaźnika statusu witaminy D wymaga dalszych badań na większych grupach osób oraz zastosowania bardziej precyzyjnych metod diagnostycznych, bezpośrednio oceniających jej poziom w surowicy krwi. Wnioski pracy są logiczne i spójne choć mogą się wydawać oczywiste. Niejasny jest wniosek nr 10 dotyczący optymalnego stężenia całkowitego 25(OH)D i rekomendowanych wartości dawek suplementacji wśród sportowców (zima 3000 IU, lato 2000 IU). Autor twierdzi, iż wynika to z modeli statystycznych, ale własnych? Czy dotyczy to wszystkich sportowców czy tych z badanych grup i co z grup kontrolną?

## **Rozdział Piśmiennictwo:**

Praca zawiera 179 pozycji piśmiennictwa. W większości są to pozycje opublikowane w zagranicznych, indeksowanych czasopismach. Piśmiennictwo jest dobrane prawidłowo, jednak przy tak dużej liczbie pozycji pojawiły się błędy. Proszę jednak o upewnienie się czy poniższe pozycje są cytowane w tekście?

1. Al-oanzi ZH, Tuck SP, Raj N, Harrop JS, Summers GD, Cook DB, Francis RM, Datta HK. Assessment of vitamin D status in male osteoporosis. Clin Chem 2006, 52: 248–254.
2. Brown AJ, Coyne DW. Bioavailable vitamin D in chronic kidney disease. Kidney Int 2012, 82: 5–7.
3. Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. Clin Chem 2012, 58: 486–488.
4. Farrell C-JL, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. Clin Chem 2012, 58: 531–542.
5. Hamilton B, Grantham J, Racinais S, Chalabi H. Vitamin D deficiency is endemic in Middle Eastern sportsmen. Public Health Nutr 2010, 13: 1528–1534.

6. Maroon JC, Mathyssek CM, Bost JW, Amos A, Winkelman R, Yates AP, Duca MA, Norwig JA. Vitamin D Profile in National Football League Players. Am J Sports Med 2015, 43: 1241–1245.
7. Myszka M, Klinger M. [The immunomodulatory role of Vitamin D]. Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online 2014, 68: 865–878.
8. Pozycja (Sempos C, Binkley N. 25-Hydroxyvitamin D assay standardisation and vitamin D guidelines paralysis. Public Health Nutr 23: 1153–1164) nie ma roku wydania w rozdziale piśmiennictwo.

### **Podsumowanie**

Mgr Karol Danielik w swojej pracy doktorskiej podjął próbę określenia wpływu oznaczania całkowitej i wolnej formy witaminy D z uwzględnieniem stylu życia uczestników badań oraz stopnia ich aktywności i ekspozycji na nasłonecznienie. W swojej pracy zastosował najbardziej dokładną metodę oznaczania witaminy D, co bez wątpliwości decyduje o wartości pracy. Wykazał się obszerną wiedzą w tym temacie, które może jeszcze wymaga uporządkowania, co z pewnością Doktorant uczyni przygotowując wyniki pracy do publikacji. Uważam, że rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk o kulturze fizycznej. Mimo krytycznych uwag wnoszę do Rady Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu o nadanie toku dalszym etapom przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Ewa Ziemann