



Wydz. Farmacji, Biotechnologii Medycznej i
Medycyny Laboratoryjnej
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Brodzkiej

rodowiskowe i immunogenetyczne uwarunkowania zmian patofizjologicznych w zwyrodnieniu plamki ółtej

Przedło ona do oceny praca doktorska mgr Sylwii Brodzkiej została przygotowana pod kierunkiem Pana dr. hab. Piotra Kamińskiego, prof., nadzw. Doktorantka, ubiegająca się o stopień doktora nauk biologicznych, podjęła starania o jego uzyskanie na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego. Kilkuletnia praca Doktorantki, w dołączonym w zakresie badań rodowiskowo-medycznych zespołu Profesora Piotra Kamińskiego, zaowocowała przygotowaniem bardzo obszernego opracowania stanowiącego podstawę ubiegania się o pierwszy stopień naukowy.

Temat rozprawy doktorskiej wpisuje się w ważny nurt badawczy dotyczący zwyrodnienia plamki ółtej (AMD, ang. Age-related Macular Degeneration), choroby rozwijającej się z wiekiem i najczęściej diagnozowanej u osób po 50. roku życia. Poznawaniu wpływu różnych czynników sprzyjających tej chorobie poświęca się wiele uwagi, w tym oddziaływaniu stresu oksydacyjnego oraz generujących, nasilających lub hamujących go substancji, a także różnych zmiennych osobniczych (wiek, płeć, masa ciała i wyposażenie genetyczne) mogących sprzyjać i/lub mieć udział w patofizjologii zwyrodnienia plamki ółtej. Obecnie AMD uznawane jest za chorobę uwarunkowaną genetycznie, dziedziczną wielogenowo, o którymś początku, na którą wpływ mają dieta i wiele innych czynników rodowiskowych. Przygotowana rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinarny i sytuuje się na obszarze medycyny, biologii i toksykologii rodowiskowej. Doktorantka wykonała setki analiz chemicznych i biochemicznych, a ich wyniki poddała analizie statystycznej. Z pewnością na prace laboratoryjne, przeglądanie piśmiennictwa i napisanie manuskryptu o objętości niemal 400 stron poświęciła bardzo wiele czasu.

1. Układ pracy

Układ pracy jest typowy dla przyrodniczych rozpraw doktorskich. W spisie treści rozprawy doktorskiej uwzględniono następujące główne rozdziały:

1. Wprowadzenie (79 s.: 9-87), 2. Cele pracy (2 s.: 87-88), 3. Teren badań, materiał i metody (30 s.: 89-118), 4. Wyniki badań (158 s.: 119-275), 5. Podsumowanie wyników (9 s.: 276-284), 6. Dyskusja (32 s.: 284-316), 7. Wnioski (5 s.: 317-321), 8. Streszczenie i 9. Summary (łącznie 12 s.: 322-333), 10. Bibliografia (429 pozycji plus 17 źródeł internetowych; 35 s.: 334-363). Manuskrypt uzupełnia dokumentacja w formie 79 tabel, 119 rycin i 20 fotografii. Ponadto w pracy zamieszczono wykaz skrótów, wzór ankiety uczestnika badania naukowego, kopie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

2. Ocena merytoryczna

Zaczynając od spisu treści, wyróżnione w obrębie głównych rozdziałów podpunkty i ich treści, a także ich kolejność w wielu miejscach zostały źle wydzielone, zatytułowane i umieszczone.

Ad 1. Wprowadzenie

Po omówieniu podpunktów od 1.1 do 1.4 dotyczących budowy oka i opisu patogenezы zwyrodnienia plamki żółtej (AMD) wskazane byłoby wymienienie głównych czynników sprzyjających rozwojowi tej choroby (z położeniem nacisku na stres oksydacyjny i powstawanie reaktywnych form tlenu, ROS). Przemawia za tym chociażby nawiązanie w podrozdziale o stresie oksydacyjnym i ROS do budowy oka i patomechanizmu AMD. Później powinny być wymienione pierwiastki (z dobrze uzasadnionym ich podziałem na odpowiednie grupy), gdy przy ich omawianiu wielokrotnie pojawiają się w tle stresu oksydacyjnego (jego nasilenia lub hamowania) oraz ROS. Dlatego uzasadniona jest wcześniejsza podbudowa teoretyczna z tego zakresu. Punkt dotyczący pestycydów (1.5.2) powinien być usunięty, a o tej grupie substancji należy zawrzeć informacje w podrozdziale 1.6.6. Narażenie zawodowe.

Ad. 1.5.1. Wpływ makroelementów, mikroelementów i pierwiastków toksycznych na rozwój AMD - źle podzielono i pogrupowano oznaczane pierwiastki. Analiz objęto łącznie 30 pierwiastków. Niektóre z nich występują w organizmie człowieka w bardzo małych stężeniach i rzadko są oznaczane w próbkach krwi. Jednakże w treści wstępnego manuskryptu zabrakło uzasadnienia dla czego zdecydowano się je objąć analizą (w tym Sb antymon, Li lit, Be beryl, Tl tal i Sr stront). Według WHO (1996) i innych kluczowych opracowań naukowych pierwiastki występujące w organizmie człowieka dzieli się na biogeny (C, H, N, O), makro-, mikroelementy oraz pierwiastki toksyczne lub potencjalnie toksyczne. Ponadto w ciele człowieka zawarta jest pewna liczba pierwiastków obcych, które na ogół występują w ładowych ilościach i nie mają znaczenia dla funkcjonowania organizmu. Uzasadnione zastrzeżenie budzi przypisanie przez Doktorantkę niektórych pierwiastków do wyróżnionych przez Ni grup. Autorka manuskryptu charakteryzując poszczególne pierwiastki chociaż cytuje pracę Ciupik i Zarzycki 2004 (Ciupik L. F., Zarzycki D. 2004. Biotolerancja biomateriałów metalicznych. Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa System DERO. Polska Grupa DERO, Stowarzyszenie studiów i badań kręgosłupa, Zielona Góra, 233 ss.). Według mnie to do przypadkowo wybrana publikacja, która dotyczy biomateriałów metalicznych stosowanych w spondyloimplantologii i stężenia pierwiastków w kościach. Nie jest to opracowanie z zakresu fizjologii człowieka, bromatologii i okulistyki, a to, że jej autorzy zajęli się grupą pierwiastków jest słab

przesłank i najwyraźniej zrobiło duże zamieszanie w podejściu Doktorantki do podejścia tej przez Ni problematyki badawczej i analizowaniu próbek krwi.

Ad 1.5.1.2. Mikroelementy - w tej grupie znalazły się zarówno mikroelementy - wymienione w dokumencie WHO (1996) i klasyfikowane jako "niezbędne dla człowieka", tj. Fe, Zn, Cu, Se, Mo, Co, Cr, jak i uznawane za "prawdopodobnie niezbędne dla człowieka" (Mn, Ni, B, V). Wśród mikroelementów Doktorantka wymieniła jednak również takie, które określone są mianem potencjalnie toksycznych: Ag srebro, Sn cyna, Ti tytan, albo toksycznych (Al glin, Ba bar, Tl tal). W przypadku wszystkich mikroelementów istotnych dla człowieka należało wskazać enzymy i/lub procesy, w których poszczególne pierwiastki występują/uczestniczą! Najwyraźniej Doktorantka nie rozróżniła znaczenia dwóch terminów „mikroelementy” i „pierwiastki śladowe”. Tylko niektóre pierwiastki przez Ni badane występujące w śladowych ilościach zaliczane są do mikroelementów, czyli pierwiastków niezbędnych do życia.

Ad 1.5.13. Metale toksyczne - w tej grupie, oprócz Hg, Cd, Pb, uwzględniała Doktorantka As arsen, który nie jest metalem lecz metaloidem (półmetalem) oraz Be beryl. Podkreślam, że ani we wprowadzeniu, ani w części metodycznej nie zawarto kryteriów podziału badanych pierwiastków, nie odwołano się do adnych istotnych naukowych różnic literaturowych z tego zakresu, w tym WHO (1996). Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization, Geneva.

Ad 1.5.2 Pestycydy - w pracy nie oznaczano pestycydów i ten punkt można pominąć (ewentualnie poruszyć ten aspekt w przy omawianiu narażenia zawodowego i/lub w dyskusji).

Ad 1.6. Czynniki wewnętrzne - ta część pracy wymaga przeredagowania, bo przecież do nich z pewnością nie należy dieta, palenie papierosów, narażenie zawodowe, promieniowanie (jakie?), a wiek, płeć, masa ciała (otyłość) to parametry/cechy biologiczne (osobnicze), podobnie jak wyposażenie genetyczne. Ten podrozdział powinien mieć inny tytuł (np. Parametry biologiczne i środowiskowe czynniki a narażenie na stres oksydacyjny), przy czym odpowiednio należy pogrupować omawiane czynniki. Podrozdziały dotyczące stresu oksydacyjnego i reaktywnych form tlenu należy z tej części wyjąć.

Ad 1.6.5. Palenie papierosów (może ogólniej „Palenie tytoniu”)

Ad 1.6.6. Narażenie zawodowe - cały akapit należy przeredagować. Określenie „na wieym powietrzu” zastąpić „na powietrzu”, „na zewnątrz” lub „na zewnątrz pomieszczenia” (powietrze nie zawsze jest „wieym”). Oprócz rolników warto też wspomnieć o morskich zawodach. Doprecyzować zdanie „Niezależne zespoły badawcze potwierdziły, że rolnicy jak i osoby pracujące przy produkcji czoszciej chorują na AMD...” przy produkcji czego? Skorygować ostatnie zdanie tego akapitu cyt. „Podobnie wczniej wspomniana ekspozycja na pierwiastki chemiczne zwiksza ryzyko rozwoju AMD...”. Wymienić najważniejsze, te które przyczyniają się do wzrostu stresu oksydacyjnego, bo przecież nie wszystkie. Niektóre z nich - Se i Zn - mają działanie antyoksydacyjne.

Ad 1.6.9. Choroby dziedziczne - cały podrozdział wymaga przeredagowania, bowiem jest on niejasny. Oczekuję, że Doktorantka wskaże w nim jakie choroby dziedziczne, na przykład jednogenowe, mają wpływ na rozwój AMD - chorób uwarunkowanych genetycznie, w których uwikłanych jest wiele genów. Co Autorka miała na myśli pisząc „Różnice wskazuje Ryc. 14”? Różnice między czym a czym? Ta rycina w ogóle jest zbędna, bo nie wnosi nic istotnego odnośnie AMD. Ponadto ka dorazowo należy wyjąć ujęte skróty, gdy pojawiają się po raz pierwszy w tekście, a zawsze są stosowane w tabelach i na rycinach (m.in. CFH - brak wyjątnienia).

Ad 1.7. Genetyczne czynniki ryzyka - w tym podrozdziale zabrakło istotnych wprowadzających informacji o inicjowaniu przez druzy procesu zapalnego, roli układu dopełniacza oraz genach z tym

związanych.

Ad 2. Cele pracy

Cele główne - ad pkt 1 (s. 87) Pierwiastki powinny być odpowiednio pogrupowane. Cele szczegółowe - ad pkt 2 (s. 88) „Ocena wpływu środowiskowych czynników wewnętrznych (dieta, nałogi, narażenie zawodowe, obciążenie genetyczne, choroby dziedziczne) na rozwój AMD u ludzi na terenach zmienionych antropogenicznie” - odpowiednio rozdzielić czynniki na zewnętrzne (środowiskowe) oraz wewnętrzne (genetyczne) z uwzględnieniem wieku, płci, masy ciała. Ad pkt 3 (s. 88) - jasno we wcześniejszych częściach pracy zdefiniować metale toksyczne i potencjalnie toksyczne (opierając się na odpowiednich publikacjach, w tym WHO 1996) i przedstawić ten szczegółowy cel.

Ad 3. Teren badań, materiał i metody

Ad 3.2. Dlaczego wyraźnie nie określono przedziału wiekowego i struktury płciowej obu badanych grup w tej części manuskryptu (z AMD i zdrowych osób), np. z AMD badaniami objęto 83 osoby w wieku od ... do ..., w tym 45 K i 38 M, a grupa kontrolna stanowiła 121 osób....W dalszej części pracy - w wynikach badań - zobrazowano strukturę wiekową i płciową, ale nie wyliczono średniego wieku osób zakwalifikowanych do grupy z AMD i zdrowych. Niestety grupa osób badanych pod względem wieku jest niewłaściwie dobrana. O ile wśród osób z AMD dominował przedział wiekowy >50 lat (niemal 98%), to w grupie zdrowych osób ich udział był mniejszy niż 20%. Jak tak zestawione grupy mogą na siebie porównywać? Przecież AMD to choroba związana z wiekiem, najczęściej rozwijająca się u ludzi >50 lat. Porównania mają uzasadnienie wyłącznie w odniesieniu do analogicznych grupami wiekowymi, tzn. >50 lat. Takie analizy różnic dotyczące wskaźnika masy ciała (BMI) między porównywanymi grupami nie specjalnie ma sens, bo w grupie osób zdrowych przeważali młodzi ludzie z przedziału wiekowego od <21 do 40 lat (ponad 53%) zwykle mający szczuplejsze sylwetki niż grupa 50+. Poza tym, w części dotyczącej materiału, należało podać w jakim okresie gromadzono próbki krwi, czy krew była pobrana tylko jeden raz, wymienić nazwę laboratorium, w którym przeprowadzono analizy i wskazać jego lokalizację.

Ad 3.3.1. Stężenie pierwiastków chemicznych we krwi metodą ICP-MS - ten punkt oraz kolejne (a do pozycji 3.3.5. włącznie) powinny być inaczej sformułowane i poprzedzone główniejszym punktem drugiego rzędu 3.3. Metody badań; podpunkty w „Metodach badań” należałyby rozpoczynać od „Oznaczanie...” (np. 3.3.1. Oznaczanie stężenia pierwiastków chemicznych w osoczu metodą ICP-MS; 3.3.2. Oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, itd.).

W manuskrypcie nie podano poziomów wykrywalności (detekcji) aparatu ICP-MS 7500CE, poza tym nie określono, czy i jakie materiały referencyjne wykorzystano, co pozwoliłoby na ocenę poprawności postępowania toku analitycznego. Bez tego rodzaju informacji trudno jest ocenić jako uzyskanych wyników, późniejszych analiz i interpretacji. Czym Doktorantka uzasadni przyjętą skomplikowaną procedurę mineralizacji próbek osocza (suszenie, mineralizacja poprzez spalanie, rozpuszczanie w stężonym kwasie azotowym), a nie skorzystano z czysto stosowanej mineralizacji na mokro poprzez dodanie do rozmrozonego osocza odpowiedniej ilości stężonego kwasu azotowego? Ponadto duży wpływ budzi oznaczanie Hg, gdyż rtęć bardzo łatwo paruje, a jej suszenie w temp. ponad 60 st. C powoduje znaczny jej ubytek z próbki. Kolejne ważne zastrzeżenie metodyczne - krew pobierano do próbek z heparyn litow (firmy Vacuette), tymczasem ich producent zastrzega, aby takich próbek nie stosować, gdy będzie wykonywana analiza litu (patrz https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/IFU_Instructions_for_Use/IFU_Instructions_for_Use_Preanalytics/Polish/980200_IFU_VenousBloodCollection_rev23_PL.pdf). Zatem z badań lit powinien być wyliczony i nie należało podejmować kolejnych kroków analizując korelacje stężenia tego metalu z innymi pierwiastkami, substancjami i

parametrami.

Ad 3.5 Analiza statystyczna (s. 118) cyt. „W pierwszym etapie określono poprawności rozkładu wyników względnie normalnego wykonano to za pomocą testu Shapiro-Wilka.” Nie bada się poprawności rozkładu lecz zgodności rozkładu danych z oczekiwanym rozkładem normalnym!

Ad 4. Wyniki

Składając po zestawieniu wartości stężenia analizowanych pierwiastków (Tabela 21, s. 146) w wielu przypadkach było ono poniżej granicy detekcji ICP-MS, na co wskazuje wartość minimalna wpisana przez Doktorantkę jako 0,000 lub 0,0000 (dotyczy to a 12 pierwiastków oznaczanych u osób z AMD i jednego u osób zdrowych). W takich przypadkach powinno się wpisać NW (nie wykryto) lub ND (not detected) oraz podać w ilu próbkach lub procentach próbek dany pierwiastek został wykryty. Kolejnym krokiem powinno być podanie informacji dla ilu próbek zawierających określony pierwiastek prowadzono dalsze analizy, w tym obliczono średni arytmetyczny i/lub mediany, korelacje z innymi pierwiastkami, czynnikami itp. Często, gdy dany pierwiastek jest wykrywany w mniej niż połowie próbek nie prowadzi się dalszej analizy statystycznej ze względu na zaistniałą sytuację. W konsekwencji wpłynęłoby to na znaczne skrócenie pracy doktorskiej, w tym na analizy porównawcze i na omawianie różnego rodzaju korelacji. Poza tym wszystkie tytuły tabel i rycin powinny zostać uzupełnione o informację, w czym oznaczano stężenia pierwiastków, bo np. tytuł „Stężenie Mn u osób chorych i zdrowych” (s. 147) jest niekompletny.

Ad 5 Podsumowanie wyników (powinno to być cz. rozdz. „Wyniki”) - wymaga gruntownego przeredagowania i usunięcia wielu zdań i całych akapitów. Na przykład s. 276: 1. Stwierdzono, że płeć jest istotnym statystycznie czynnikiem ($P=0,001$). 2. Zaobserwowano, że wiek badanych osób jest czynnikiem istotnym statystycznie ... Doktorantka raczej powinna napisać o odnotowanych statystycznie różnicach między kobietami i mężczyznami w cz. występowania choroby, itd. Dużo w tym miejscu budzą stwierdzenia o istotnych różnicach między grupami osób z AMD a osobami zdrowymi w odniesieniu do analizowanych pierwiastków oraz badanych aktywności enzymów i stężenia antyoksydantów ze względu na znaczne różnice dotyczące wieku porównywanych dwóch grup osób.

Ad 6. Dyskusja

Dyskusja jest chaotyczna, pełna spekulacji i niespójna. Doktorantka nie sięgnęła do odpowiedniego piśmiennictwa, aby porównać stężenia analizowanych przez siebie pierwiastków w osoczu mieszkańców województwa lubuskiego z danymi innych autorów, zwłaszcza w stosunku do wartości określonych jako „norma” dla zdrowych ludzi dorosłych. Formułowanie stwierdzeń i wyciąganie wniosków w bardzo wielu przypadkach nie ma uzasadnienia i ma charakter spekulacji. Przykład (s. 288): cyt. „W grupie osób cierpiących na AMD najwięcej korelacji z innymi pierwiastkami miały Mn i P. Wskazuje to na największy udział tych elementów w rozwoju choroby.” To, że jakie pierwiastki we krwi korelują ze sobą lub nie korelują nie stanowi żadnej przesłanki do tego by formułować takie stwierdzenie! Należy pamiętać, że stężenie pierwiastków we krwi jest zmienne i zależy od wielu czynników takich jak płeć, wiek, stan zdrowia, dieta, przyjmowane leki, bilans wodny. W toksykologii i ekotoksykologii przyjmuje się, że krew jest odzwierciedleniem krótkoterminowej ekspozycji na różne substancje.

Ad 6.2 Ocena stężenia pierwiastków we krwi obwodowej u chorych na AMD i grupie kontrolnej - tytuł tego podpunktu „Dyskusji” pozostaje w sprzeczności z informacją zawartą w cz. dotyczącej materiału i metod, gdzie podano, że stężenia pierwiastków oznaczano w osoczu. Ponadto w pierwszej kolejności należało zająć się wartościami stężenia i porównać je z danymi z piśmiennictwa naukowego (np. w zestawieniu tabelarycznym).

Ad 6.9. Leczenie AMD - Doktorantka nie jest lekarzem i nikt nie oczekuje, e b dzie dyskutowała to zagadnie, zwłaszcza, e ten aspekt nie był sygnalizowany w celach pracy.

Ad 6.10. AMD jako choroba wieloczynnikowa - i w tej cz ci natrafiamy na zaskakuj ce sformułowania i niewła ciw interpretacj uzyskanych wyników (s. 312) cyt. „Zaobserwowano, e im wi ksza jest ilo stosowanych suplementów diety i preparatów leczniczych tym wi ksza szansa zachorowania na AMD (P=0,003).” No có , osoby starsze cz cieiej stosuj preparaty lecznicze i suplementy diety, cz cieiej te choruj na ADM, ale to w aden sposób nie uprawnia do stwierdzenia sformułowanego przez Doktorantk . W du ym stopniu jest to konsekwencja nieodpowiednio dobranej pod wzgl dem wieku grupy kontrolno-porównawczej.

Ad 7. Wnioski - w 90% nie s wnioskami lecz stwierdzeniami, na ogół nieuprawnionymi ze wzgl du na znikom wiarygodno wyników (przynajmniej w odniesieniu do st enia pierwiastków), bł dy metodyczne i merytoryczne.

Ad 8 i 9 Streszczenie i Summary - wymagaj gruntownego przeredagowania i skrócenia.

Ad 10. Bibliografia - w bibliografii brakuje niektórych pozycji cytowanych w tek cie (s. 27 Wyskida i Chudek 2015; s. 33 i 34 Ogórek et al. 2017). Nie wszystkie zestawione prace s uporz dkowane alfabetycznie. Na str. 30 i 341 nie Gac et al. 2009 lecz Ga i in. 2009.

W przypadku opracowa przygotowanych pod redakcj niewła ciwie cytowano rozdziały poszczególnych autorów:

Bartosz G. 2005. Superoxide Dismutases and Catalase. The Handbook of Environmental Chemistry. 20: 109-149. Powinno_by : Bartosz G. 2005. Superoxide Dismutases and Catalase. In: Grune T. (eds) Reactions, Processes. Oxidants and Antioxidant Defense Systems. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 20. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 109-149. <https://doi.org/10.1007/bl01149>

Se czuk W. 2006. Toksykologia współczesna. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 996 ss. Powinno_by : Chmielnicka J. 2006. Toksyczno metali i półmetali (metaloidów). W: Se czuk W. 2006. Toksykologia współczesna. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, s. 360-446 (praca cytowana na wielu stronach, np. 29, 30, 32, 33, 37, 45 ...49, 51, ... 294, ... 305...)

Nriagu J. 2019. Encyclopedia of Environmental Health. 2nd Edition, Elsevier Inc, Amsterdam, ss 4994. Powinno_by : Hóllriegl V. 2019. Other Environmental Health Issues: Strontium in the Environment and Possible Human Health Effects. In: Nriagu J. 2019 (ed.) Encyclopedia of Environmental Health. 2nd Edition, Elsevier, pp 797-802 (patrz s. 43).

Niektóre ró dła maj podane linki stron internetowych, tymczasem nale ało je zacytowa zgodnie z sugestj wydawcy, np. (s. 36) <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/molybdenum/> Powinno_by : U.S. Geological Survey 2019. Mineral commodity summaries 2019: U.S. Geological Survey, 200 p., <https://doi.org/10.3133/70202434>.

Główne zastrze enia redakcyjne

Rozprawa doktorska powinna by znacznie skrócona, dotyczy to tak e liczby cytowanych ródeł, w ród których jest sporo nieistotnych publikacji. Niemal na ka dej stronie i to we wszystkich cz ciach pracy znajduj si niewła ciwie sformułowania i kontrowersyjne zdania. Aby przygotowa szczegółow list wszystkich bł dów i zarzutów praca nad powierzonym do recenzji manuskrytem pochłn łaby mi wiele tygodni. Dlatego ograniczyłam si tylko do najwa niejszych, które starałam si zilustrowa wybranymi przykladami.

1. Praca jest ponad miar obszerna (330 stron tekstu + 35 str. bibl. + 18 str. ró nych wykazów i innych dokumentów).

2. W tek cie jest bardzo du o bł dów gramatycznych, interpunkcyjnych i stylistycznych, a nawet ortograficznych (s. 37 osoby nie nara onej - pisownia ł czna, s. 61 niewła ciwa odmiana - l. mn. druzy, druzów, a nie druz; s. 352 - Bibliografia - poz. 284 - słowo „Polski” powinno by z du ej litery; Ankieta - s. 377 - skrót ty . zamiast tys.), co utrudnia czytanie i rozumienie manuskryptu. Ponadto, je eli mamy porównanie mi dzy czym a czym , to przed liter „a” nie stawia si przecinka, taka jest zasada interpunkcyjna. W bardzo wielu zdaniach, zwłaszcza rozpoczynaj cych akapity, brakuje podmiotu. Szkoda, e Doktorantka nie oddała pracy do j zykowej korekty poloni cie przed jej zło eniem w Dziekanacie.
3. Omawianie poszczególnych pierwiastków (enzymów itd.) powinno by ujednocione. Pierwsze zdanie akapitu zawsze musi zawiera podmiot [np. s. 24, punkt 1.5.1.1.1. Wap (Ca), cyt. „Jest makroelementem, którego ilo szacuje si na 1,5% masy dorosłego człowieka, czyli 1200 g.”]. Po za tym w przypadku makro- i mikroelementów, przy okre laniu dobowego zapotrzebowania dla człowieka, nale ało si posłu y odpowiednimi publikacjami (patrz polskie lub ameryka skie zalecenia, w tym Jarosz 2020. Normy ywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. PolHealth Warszawa; Otten et al. 2006. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Institute of Medicine of the National Academies, Washington 2006). Oprócz tego wskazane jest dodanie informacji o mo liwym kancerogennym działaniu niektórych spo ród analizowanych przez Doktorantk pierwiastków (wg kryteriów IARC, International Agency for Research on Cancer). Ponadto sugeruj , aby zaczynaj c omawianie ka dego pierwiastka poda jego g sto , procentow zawarto w skorupie ziemskiej (i/lub st enie wyra one w mg/kg), szacowan zawarto w ciele człowieka, co czytelnikowi pozwoli zorientowa si , czy dany pierwiastek jest rozpowszechniony w przyrodzie i ile znajduje si go w organizmie dorosłej osoby.

Wybrane inne uwagi

- S. 15. Z czterech najwa niejszych procesów wpływaj cych na rozwój AMD, które konsekwentnie powinny by ponumerowane, numery przypisano tylko dwóm pierwszym.
- S. 16. Ryc. 5. Wpływ czterech najistotniejszych procesów na rozwój AMD (Nowak i Bienias 2007) - zastosowano niewła ciw terminologi , bo „Lipofuscyna” i „Druzy” to substancje, a nie nazwy procesów. Ponadto pod rycin , która jest pewn integralna cało ci , nie obja niono u ytych na niej skrótów (AMD, CFH). Po tytułach prac, ich rozdziałów i podrozdziałów, a tak e tytułach tabel i rycin nie stawia si kropki.
- S. 17. Druzgogeneza (1.2.2.) cyt. „To bardzo skomplikowany i zło ony proces, który mo e trwa wiele lat, jego dokładny mechanizm obrazuje Ryc. 6 (Nowak i Bienias 2007).” Akapit i pierwsze w nim zdanie niewła ciwie rozpocz te - powinno by *Druzgogeneza to bardzo skomplikowany i zło ony proces, który mo e trwa wiele lat.* Mam du e w tpliwo ci, czy przedstawiono „dokładny mechanizm”, dlatego bezpieczniej b dzie napisa , *...a jego schemat przedstawiono na Ryc. 6.*
- S. 17. Cyt. „Twarde charakteryzuj si niewielkim rozmiarem (<63 pm), w niewielkich ilo ciach, wyst puj w 95% u wszystkich starszych osób”. Trzeba si zdecydowa , czy u wszystkich, czy u 95%! Zdanie nale y przeredagowa ! Na przykład *Twarde charakteryzuj si niewielkimi rozmiarami (<63 pm), wyst powaniem w niedu ych ilo ciach i stwierdza si je u 95% starszych osób.*
- S. 21. Cyt. „Wyró nia si cztery typy (Sikorski 2017); Ryc. 9:” ale 4 typy czego? Powinno by : *Wyró nia si cztery typy neowaskularyzacji (Sikorski 2017): Poni ej nale y doda zdanie dot. Ryc. 9 (np. Powy ej wymienione typy neowaskularyzacji w obr bie dna oka przedstawiono graficznie na Ryc. 9.)*

S. 22. Akapit dot. 1.5. - nielogiczny ci g zada . Najpierw poda , e dym tytoniowy zawiera ró ne toksyczne substancje, w tym ... , które przyczyniaj si do wzrostu stresu oksydacyjnego, równie w siatkówce. Pó niej dopiero napisa , e z tych wzgl ów palenie papierosów (szerzej tytoniu) uznaje si za istotny czynnik ryzyka AMD.

S. 29. Wymienione na tej stronie pierwiastki (1.5.1.2. Mikroelementy) mo na okre li mianem „pierwiastków ladowych”, ale nie wszystkie spo ród nich s mikroelementami - pierwiastkami niezb dnymi człowiekowi, dlatego tytuł tego podrozdziału jest niepoprawny i myl cy. Nale ało si gn do odpowiednich ródeł z tego zakresu. Cytowane w tym podrozdziale prace niewła ciwe dobrano! Patrz WHO 1996. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization, Geneva; Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M (eds) Elements and their compounds in the environment, 2nd edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT (2007) Handbook on the toxicology of metals. Elsevier, London. W przypadku

S. 36 cyt. "Molibden jest istotny dla prawidłowego funkcjonowania enzymów bior cych udział w ochronie przed stresem antyoksydacyjnym (Hille et al. 2011, Novotny i Peterson 2018)". Powinno by "przed stresem oksydacyjnym...".

s. 37 cyt. "W rodowisku przewa nie wyst puje chrom sze ciowarto ciowy, który jest skutkiem działalno ci człowieka" - co Autorka miała na my li? To zdanie nie ma sensu, bo Cr i inne pierwiastki w przyrodzie wyst puj na ró nych stopniach utlenienia, co jest ich immanentnymi wła ciwo ciami fizykochemicznymi, a człowiek co najwy ej mo e przyczynia si do cz stszego wyst powania pierwiastka na okre lonego stopniu utlenienia (np. Cr¹⁶).

s. 37 cyt. „St enie Cr w osoczu osoby, nie nara onej na zwi zki chromu, mie ci si w przedziale od 0,04 do 0,35 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Christensen et al. 1993). Niskie poziomy wyst puj u osób zamieszkuj cych obszary wiejskie, z kolei wy sze poziomy s charakterystyczne dla ludzi przebywaj cych w du ych o rodkach miejskich. Dowiedziono te , e st enie Cr spada si waz z wiekiem..." - to jedno z bardzo wielu zda napisanych niepoprawnie stylistycznie i gramatycznie - nie wiadomo st enie Cr w czym i z wiekiem u kogo? Powinno by (np. "Ni szy poziom od podanego notowany jest u ludno ci wiejskiej, a wy szy u mieszkó ców du ych miast. Ponadto wykazano, e st enie Cr w osoczu maleje u ludzi wraz z wiekiem...". Nieuzasadnienie Doktorantka napisała cyt. (s. 37) „Poza tym jest składnikiem wielu enzymów i kwasów nukleinowych. Bierze te udział w metabolizmie wielu białek, lipidów, cholesterolu i w procesie krzepni cia krwi (Ierson 1997, Se czuk 2006)" nie wskazała jednak u jakich organizmów. Dotychczas nie wykazano, aby Cr był u człowieka pierwiastkiem składowym jaki enzymów lub ich kofaktorów. Podrozdział o Cr (1.5.1.2.7.) wymaga gruntownego przerehabilitowania, bo obecnie przyjmuje si , e nie ma jednoznacznych dowodów, na to, e dla człowieka jest to pierwiastek niezb dny do ycia, a Doktorantka wykorzystaa stosunkowo stare publikacje - sprzed roku 2010 (nowsze patrz np. Vincent 2017. New evidence against chromium as an essential trace element. J Nutr 147:2212-19; Piotrowska i in. 2018. Biologiczne znaczenie chromu III dla organizmu człowieka. Med. Pracy 69:211-223; DesMarais and Costa 2019. Mechanisms of chromium-induced toxicity. Curr Opin Toxicol 14:1-7)..

s. 38 (Lit, podrozdział 1.5.1.2.8) Na jakiej podstawie Autorka manuskryptu twierdzi, e lit jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie i jakie kryterium stosuje si do okre lenia „szeroko"? Przecie pod wzgl dem wyst powania w skorupie ziemskiej znajduje si dopiero na 27 miejscu, a jego st enie w niej wynosi ok. 0,006% (wg niektórych ródeł na 33 miejscu; st enie 0,002%). Dalej napisała Ona, e lit do rodowiska przedostaje si ze składowisk odpadów ale to tylko antropogeniczne pochodzenie litu, bo przecie w jego geocyklu uczestnicz równie procesy naturalne (w tym wietrzenie skał, wybuchy wulkanów). Ponadto lit nie jest zaliczany do mikroelementów, wbrew temu co napisała Doktorantka (patrz Aral and Vecchio-Sadus 2008. Toxicity of lithium to humans and the environment—A literature review. Ecotoxicol Environ Saf. 70:349-356).

S. 40. Kobalt (1.5.1.2.10.) - poza korekt j zykow wskazane jest dodanie informacji o mo liwym kancerogennym działaniu tego metalu

s. 41-42. Srebro (1.5.1.2.11.) „Jest rzadkim metalem, który wyst puje w rodowisku naturalnym zarówno w stanie zwi zany i wolnym...” Wła ciwsze byłoby "Srebro jest zaliczane do metali szlachetnych, obok złota i platyny. Okre lenie „Jest rzadkim metalem" mo e nasuwa pytanie, co jest kryterium owej rzadko ci, albo skojarzenie, e to jeden z pierwiastków ziem rzadkich (do nich nale lantanowce i niektóre skandanowce). Cyt. s. 42 „Dzienne zapotrzebowanie człowieka na ten pierwiastek jest w granicach 1,8-80 pg." Zakres podanych warto ci dotyczy dziennego pobrania srebra przez człowieka, jak podaj elazowska i Pasternak (2007) za innymi naukowcami. Nie jest to równoznaczne z „dziennym zapotrzebowaniem" jak napisała Doktorantka, a dokonuj c takiej zmiany jednocze nie sugeruje, e srebro jest człowiekowi niezb dne do ycia (mikroelement), a tak przecie nie jest. Srebro zaliczane jest do grupy pierwiastków prawdopodobnie toksycznych (WHO 1996). W dalszej cz ci akapitu Doktorantka napisała „Z kolei przy długotrwałym nara eniu na opary srebra...” - srebro przechodzi w stan ciekły w tern, ponad 960°C - kto jest w stanie prze y w takiej temperaturze, nie bardzo rozumiem, co Doktorantka miała na my li.

S. 47. Cyna (1.5.1.2.17.) „Cyna w ludzkim organizmie pełni istotn rol , gdy wyst puje we wszystkich tkankach i uczestniczy w procesach redoks” to zdanie jest fałszywe, bo Sn nie pełni u człowieka adnej istotnej funkcji fizjologicznej, to nie jest mikroelement! Według WHO (1996) jest ona zaliczana do pierwiastków prawdopodobnie toksycznych.

S. 50. Bar (1.5.1.2.20.) Cyt. „Jest metalem o du ej g sto ci,...” - co w rozumieniu Doktorantki oznacza „du a g sto ”, bo g sto ci ani w tym przypadku, ani w pozostałych pierwiastków nie podano, nie ma zatem punktu odniesienia. Dalej Doktorantka napisała „Pierwiastek bar nie jest niezb dny do ycia i nie musi wyst powa w diecie.” - dlaczego zatem znalazł si on w ród mikroelementów? Kolejne zdanie budzi kontrowersje „Jest bardzo niewiele publikacji na temat wpływu baru na zdrowie ludzkie” i cytuje tylko jeden artykuł, a przecie wa nych publikacji z tego zakresu jest wi cej (np. ATSDR 2007. Toxicological profile for barium and barium compounds; Poddalgoda et al. 2017. Development of biomonitoring equivalents for barium in urine and plasma for interpreting human biomonitoring data. Reg Toxicol Pharmacol 86:303-311; Ohgami et al. 2013. Exposure to low-dose barium by drinking water causes hearing loss in mice. NeuroToxicology 33:1276-1283; Oskarsson and Reeves 2007. Barium. In: Nordberg GF et al. (Eds.), Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier, pp. 407-414).

S. 53. Rt (1.5.1.3.10.) Doktorantka napisała „Nie tylko z uwagi na produkcj ROS, ale tak e na powinowactwo do tkanek oka i uszkodzanie jego struktur (Pamphlett et al. 2019), dlatego pierwiastek promuje rozwój AMD.” Tymczasem w cytowanej publikacji znajdujemy informacj , e Hg mo e odgrywa cz ciow rol w patogenezie tego schorzenia! [Pamphlett et al. 2019. p. 11. *Mercury is found in retinal pigment epithelial cells [19,29,56,57] and so may play a part in the pathogenesis of macular degeneration. In macular degeneration, free radical formation [58] and epigenetic variations [59], both toxic actions of mercury, have been postulated to underlie retinal damage.*]. W nauce jest du a ró nica mi dzy wyra eniem przypuszczenia (pewn mo liwo ci .) a kategori cznym stwierdzeniem (*pierwiastek promuje rozwój AMD*). Niestety w wielu miejscach manuskryptu, w tym we wprowadzeniu, napotyka si na tego rodzaju nie cisto ci i nieuzasadnione stwierdzenia.

S. 63. 1.6.5. Palenie papierosów - cyt. „Liczne badania z Australii, Europy oraz Ameryki Północnej potwierdziły, e zwi zek pomi dzy paleniem papierosów, a rozwojem AMD jest niezale ny od innych czynników rodowiskowych (Vellila et al. 2013).” To ko czy si zacytowaniem jednej pracy przegl dowej, w zwi zku z tym jakie jest uzasadnienie okre lenia „Liczne badania”? Je eli mamy porównanie mi dzy czym a czym , to przed liter „a” nie stawia si przecinka.

S. 122. „Tab. 8. Podział osób chorych oraz zdrowych wzgl dem poziomu wykształcenia. Czerwon

czcionk oznaczono istotn statystycznie ró nic ." - ró nic mi dzy czym a czym? Czy $p < 0,001$ dotyczy wszystkich pozycji, bo ostatnia kolumna („P testu U”) nie ma podziału na wiersze), czy jakiej jednej. gdy cytowana warto znajduje si na granicy "Zawodowe" i "rednie"? Wiersz „Podstawowe" w kol „Chorzy" $n=10$ i „Zdrowi" $n=1$ - jak i dlaczego statycznie porównano dane, gdy jedna grupa ma $n=1$? W wielu innych tabelach równie nie bardzo wiadomo do jakiego wiersza przypisana jest istotno statystyczna.

Ko cowa konkluzja

Do pracy doktorskiej Mgr Sylwii Brodzkiej mam bardzo wiele zastrze e merytorycznych, metodycznych i redakcyjnych, w tym j zykowych. Niestety Doktorantka cz sto niewła ciwie stosuje terminologi naukowa i myli poj cia. Brak podania granicy oznaczalno ci ICP-MS, wyników analizy odpowiedniego materiału referencyjnego, obj cie oznaczeniem litu, niewła ciwie dobranie osób do grupy kontrolno-porównawczej pod wzgl dem ich wieku wszystko to powoduje, e warto naukowa przedstawionych w manuskrypcie wyników jest niewielka i trudna do zweryfikowania, przynajmniej w odniesieniu do st enia pierwiastków i porówna mi dzy dwoma badanymi grupami osób - z AMD i zdrowymi. Doktorat powstaje pod opiek promotorsk , aie w przypadku pracy Pani Magister najwyra niej nadzór merytoryczny i konsultacje z Promotorem nie były wystarczaj ce. Bior c to wszystko pod uwag , w obecnym kształcie nie mog pracy Mgr Sylwii Brodzkiej pt. „rodowiskowe i immunogenetyczne uwarunkowania zmian patofizjologicznych w zwyrodnieniu plamki óltej" rekomendowa Radzie Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogóskiego jej dopuszczenia do publicznej obrony. Jednak e nie wykluczam mo liwo ci uzupełnienia i poprawy manuskryptu w ramach procedury przewidzianej w § 6 ust. 6 Rozporz dzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wy szego z dn. 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynno ci w przewodzie doktorskim, w post powaniu habilitacyjnym oraz w post powaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz. 261).

Z powa aniem

