

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz  
Instytut Biologii Molekularnej i  
Biotechnologii Wydział Biologii  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 6.04.2022

## RECENZJA

### pracy doktorskiej mgr Katarzyny Rektor pt. „Zmiany polimorficzne oraz wpływ stresorów środowiskowych i mechanizmów antyoksydacyjnych w zaćmie u ludzi”

Zespół dr hab. prof. nadzw. Piotra Kamińskiego Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego wśród wielu tematów zajmuje się analizą odpowiedzi organizmu człowieka na stres oksydacyjny wywołany czynnikami środowiskowymi i genetycznymi a także określeniem wpływu zanieczyszczenia środowiska na aktywność mechanizmów antyoksydacyjnych. Praca doktorska mgr Katarzyny Rektor skupia się na badaniu wpływu szeregu czynników na zaćmę u ludzi: (i) badanych ankietowo wybranych czynników wewnętrznych i zewnętrznych określonych przez WHO (2016), (ii) aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych (aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, SOD, katalazy, CAT, peroksydazy glutationu, GPx, reduktazy glutationu, GR, i poziomu glutationu (GSH), ceruloplazminy, CP, i malonodialdehydu, MDA), (iii) poziomu pierwiastków chemicznych obejmujących makroelementy, mikroelementy i pierwiastki toksyczne, oraz (iv) zmian polimorficznych genów S-transferazy glutationowej (*GST*), krystaliny  $\alpha$ B (*CRYAB*) oraz jednego z białek kompleksu szlaku naprawy DNA (*XRCC1*). Badania prowadzono na grupie 90 pacjentów chorych na zaćmę oraz grupie 60 zdrowych ochotników. W osoczu krwi osób chorych na zaćmę i osób zdrowych badano stężenie pierwiastków chemicznych, aktywność/poziom czynników antyoksydacyjnych i MDA oraz polimorfizm wybranych alleli badanych genów. Ponadto, na podstawie ankiety przeprowadzonej w obu grupach, badano potencjalne czynniki wpływające na rozwój zaćmy m. in. płeć, wiek, miejsce zamieszkania, dietę, styl życia, nałogi, narażenie na czynniki szkodliwe czy choroby współistniejące.

#### Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest ładnym i jasnym językiem. Autorka nie uniknęła jednak literówek i kilku błędów stylistycznych, głównie związanych z niepoprawnym tłumaczeniem z języka angielskiego (np. „aktywność antyoksydantowa”, „analiza koncentracji pierwiastków”). Praca jest obszerna i obejmuje 191 stron, zawiera 101 rycin oraz 34 tabele. Układ pracy jest typowy i obejmuje kolejno: wykaz skrótów, abstrakt, wstęp, cele pracy, rozdziały materiał, metodyka, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, oraz liczącą 233 publikacji bibliografię, w dużym stopniu złożoną z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach. Na końcu rozprawy umieszczono wykaz tabel i rycin oraz 3 aneksy: wzór ankiety uczestnika badania naukowego (9 stron), wzór deklaracji uczestnika badania naukowego ze zgodą na udział w badaniach oraz zgodę komisji bioetycznej.

#### Uwagi:

- Praca mogłaby mieć mniejszą objętość, co ułatwiłoby jej czytanie. Do obszernej, liczącej 25 stron bibliografii można było użyć mniejszej czcionki i mniejszej interlinii. Niektóre rysunki przedstawiające wyniki mogłyby być zmniejszone, zgrupowane i pokazane na jednej czy dwóch stronach, a nie na kilku (np. Ryc. 53-58, 59-63, 64-80, 89-100).

- W pracy występują pewne Wędy redakcyjne, w tym niejednolity zapis pozycji literaturowych (tytułów artykułów czy nazw czasopism) czy brak konsekwencji w stosowaniu wprowadzonych skrótów. Ponadto, część stosowanych skrótów nie jest wyjaśniona w spisie skrótów (np. GST, CRYAB, XRCC1). p-BQ to p-benzochinon a nie "p-benzachinon" (str. 3 i 123).

- W niektórych rycinach pozostawiono określenia w języku angielskim (Ryc. 11 i 16). Tabela 2 nie została przetłumaczona na język polski.

Muszę jednak podkreślić, że wszystkie niedociągnięcia stylistyczne i redakcyjne, o których wspominałem z obowiązku recenzenta, nie są istotne, biorąc pod uwagę dużą wartość merytoryczną ocenianej pracy doktorskiej.

#### Merytoryczna ocena rozprawy

W poprzedzającym część doświadczalną, liczącym 34 strony Wstępie Doktorantka scharakteryzowała narząd wzroku i omówiła najważniejsze zagadnienia **dotyczące zaćmy** czyli postępującego zmętnienia soczewki. Ponadto oceniany rozdział stanowi obszerny, ciekawie napisany przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego roli stresu oksydacyjnego, reaktywnych form tlenu (RFT), mechanizmów antyoksydacyjnych, pierwiastków chemicznych i uwarunkowań genetycznych w patofizjologii soczewki oka. Pisząc Wstęp Autorka sięgnęła do najważniejszego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień.

Uwagi i pytania do Wstępu:

- W tekście nie opisano Ryciny 5, przedstawiającej istotne dla tematu rozprawy zmiany konformacyjne krystaliny prowadzące do zmętnienia soczewki.

- Strony 20, 28. Opisując peroksydazę glutationową błędnie napisano „...to kolejny enzym wykazujący powinowactwo do nadtlenku wodoru, którego redukuje do dwóch cząsteczek tlenu (Ryc. 15).” Co to jest „anionorodnik ponadtlenkowy jonu żelaza na trzecim stopniu tlenienia”?

- Rycina 14. Jako źródło RFT wymieniono „utlenianie białek oddechowych”. Proszę wyjaśnić.

- Strona 33. Proszę omówić ograniczoną rolę mitochondriów jako źródła RFT w soczewce oka, biorąc pod uwagę ich rozmieszczenie w poszczególnych częściach soczewki.

W Celach pracy przedstawiono 6 realizowanych zadań badawczych. Trzeba podkreślić, że oceniana rozprawa doktorska stanowi nowe, szerokie podejście do badania czynników wewnętrznych i zewnętrznych wpływających na rozwój zaćmy u człowieka, głównie związanych z (i) stężeniem pierwiastków chemicznych, **wynikającym** z zanieczyszczenia środowiska i diety, (ii) stresem oksydacyjnym, na który wpływ ma produkcja RFT i aktywność systemów antyoksydacyjnych oraz (iii) zmianami polimorficznymi. Trzeba podkreślić, że badania prowadzono na dużej grupie badawczej złożonej z 90 pacjentów ze zdiagnozowaną zaćmą i 60 zdrowych osób.

Rozdział Materiał opisuje przygotowywanie próbek krwi do badań molekularnych (analiza polimorfizmów w obrębie wybranych genów) i badań biochemicznych (oznaczanie stężenia pierwiastków chemicznych, GPx, CP i MDA oraz aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych).

Rozdział Metodyka (19 stron) zawiera szczegółowe opisy stosowanych metod badawczych. Uwagę zwraca duża różnorodność stosowanych technik, świadcząca o wszechstronności Doktorantki w pracy doświadczalnej. Oznaczano (i) aktywność czterech enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, GPx i GR) oraz poziom GSH i MDA przy użyciu zestawów biochemicznych firmy Cayman Chemicals Co. oraz stężenie CP, (ii) stężenie 5

makroelementów. 18 mikroelementów i 5 metali ciężkich przy użyciu spektrofotometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS), oraz (iii) polimorfizm genów *GSTT1*, *GSTM1*, *CRY AB* i *XRCC1Arg399Gln* przy użyciu technik biologii molekularnej (izolacja DNA, reakcja multiplex PCR lub PCR-RFLP, trawienie enzymami restrykcyjnymi, elektroforeza w żelu agarozowym). W pracy zastosowano wszechstronną, szczegółową analizę statystyczną, przy użyciu różnych testów statystycznych.

Pytanie do rozdziału Metodyka:

- Czy możliwe było wykonanie powtórzeń technicznych przy poszczególnych pomiarach?

W rozdziale Wyniki, który obejmuje 60 stron, Autorka opisuje wyniki kolejno realizowanych zadań badawczych. Na podkreślenie zasługuje sposób prowadzenia czytelnika przez poszczególne etapy analizy danych zebranych z przeprowadzonej ankiety i wyników pracy eksperymentalnej a także prezentowanie uzyskanych wyników w logicznej kolejności. Każdy omawiany punkt otwiera krótkie wprowadzenie, po którym następuje opis wyników i krótkie podsumowanie. Taki układ porządkuje przedstawione wyniki i ułatwia ich zrozumienie. Trzeba podkreślić, że Doktorantka umiejętnie, zachowując krytycyzm, analizowała wyniki.

Na podstawie badań ankietowych, do czynników sprzyjających rozwojowi zaćmy zaliczono wiek, wskaźnik BMI, brak zażywania preparatów witaminowych, narażenie na działanie czynników chemicznych i występowanie chorób współistniejących. Natomiast, przedstawione wyniki badań eksperymentalnych wskazują na różną odpowiedź systemów antyoksydacyjnych. Mianowicie, w surowicy krwi chorych na zaćmę obserwowano zwiększoną aktywność GR i zwiększony poziom GSH, natomiast aktywność SOD, CAT i GPx oraz poziom CP były zmniejszone. Co ciekawe, poziom markera uszkodzeń oksydacyjnych lipidów, MDA, był także obniżony. Obserwowane w surowicy krwi chorych na zaćmę zmiany w stężeniu niektórych pierwiastków chemicznych, w zależności od ich właściwości pro- czy antyoksydacyjnych, sugerują wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej (poprzez zwiększenie poziomu Sn i Mn), zmniejszenie stresu oksydacyjnego (zwiększenie poziomu Zn i Na) ale też zwiększenie stresu oksydacyjnego (zwiększenie poziomu toksycznych metali ciężkich As i Cd oraz zmniejszenie poziomu mikroelementów Cu i Fe). Szczegółowo zanalizowano korelacje między stężeniami badanych pierwiastków chemicznych w grupie osób zdrowych i chorych. Ponadto, znaleziono korelację dodatnią między aktywnością/stężeniem białek antyoksydacyjnych czy poziomem markera uszkodzeń oksydacyjnych a stężeniem niektórych pierwiastków u pacjentów z zaćmą (między Ag-SOD, Se-MDA i Sb-MDA) i osób zdrowych (między Sn-GR). U osób zdrowych znaleziono korelację ujemną między Cd-CAT i Pb-CAT. Ponadto, stwierdzono, że polimorfizmy genu *GSTT* (ale nie *GSTM*) są powiązane z zachorowaniem na zaćmę, co potwierdza rolę S-transferazy glutationowej (GST) w detoksykacji związków cytotoksycznych i zmniejszaniu stresu oksydacyjnego. Nie wykazano natomiast powiązania genów krystaliny  $\alpha B$  (*CRYAB*) oraz jednego z białek kompleksu szlaku naprawy DNA (*XRCC1*) z rozwojem zaćmy w ludzi.

Oto kilka uwag i spostrzeżeń do przedyskutowania:

- Doktorantka wykazała, że ponad 94% badanych chorych na zaćmę stanowią osoby powyżej 50 lat. Czy grupę kontrolną do badania zmian w poziomie/aktywności systemów antyoksydacyjnych i MDA oraz pierwiastków chemicznych nie powinny stanowić przede wszystkim osoby dopasowane wiekowo (powyżej 50 lat)? Badane parametry biochemiczne mogą zmieniać się z wiekiem. Myślę, że taka analiza wniosłaby nowe elementy do dyskusji otrzymanych wyników.

- Rycina 58. Brakuje jednostki stężenia CP.

- Tabela 25. Otrzymane stężenia niektórych badanych metali ciężkich są bardzo małe, stąd powinny być przedstawione w pg/L a nie mg/L.
- Autorka często używa określenia „stężenie” dla enzymów antyoksydacyjnych choć badała ich aktywność oraz określa MDA jako czynnik antyoksydacyjny.
- Punkt 5.7. Analizując frekwencje genotypów i alleli dla badanych genów, Doktorantka stwierdziła zgodność z prawem Hardy-Weinberga i uzyskanie równowagi genetycznej w przypadku genów *XRCC1* i *GSTT1* ale nie w przypadku genów *CRY AB* i *GSTM1*. Proszę przedyskutować wyniki tej analizy.
- W punkcie 8 podrozdziału Podsumowanie wyników Doktorantka pisze o badaniu korelacji GPx i SOD oraz CAT i CP. Nie widzę w rozdziale Wyniki analizy korelacji między czynnikami antyoksydacyjnymi w grupie osób zdrowych i chorych.
- Strona 119. Przedstawione wyniki badań ankietowych nie pokazują, że miejsce zamieszkania w mieście powyżej 10 tyś. mieszkańców i palenie papierosów można powiązać z rozwojem zaćmy o czym pisze Doktorantka.

Liczący 18 stron i podzielony na 4 porządkujące punkty rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje aspekty wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych badaczy. W Dyskusji doktorantka solidnie i krytycznie przedyskutowała otrzymane wyniki, choć ich interpretacja nie zawsze była łatwa i jednoznaczna. Lektura tego rozdziału, podobnie jak Wstępu, świadczy o dużej wiedzy Autorki i swobodnym poruszaniu się w literaturze naukowej związanej z etiologią zaćmy, - powiązaniem jej rozwoju z szeregiem czynników wewnętrznych i zewnętrznych, w tym zanieczyszczeniem środowiska, stylem życia i chorobami współistniejącymi oraz homeostazą pierwiastków chemicznych, działaniem systemów antyoksydacyjnych czy uwarunkowaniami genetycznymi. Bardzo ciekawie Autorka przedyskutowała bezpośrednią/pośrednią aktywność pro- czy antyoksydacyjną poszczególnych badanych pierwiastków chemicznych, szczególnie w kontekście ich powiązania z enzymami antyoksydacyjnymi. Na przykład, obniżone stężenie ważnego kofaktora enzymów antyoksydacyjnych - Cu, obserwowane u chorych na zaćmę, może powodować mniejszą aktywność SOD i CAT

Praca mgr Katarzyny Rektor stanowi ważny wkład w poznawaniu znaczenia stresu oksydacyjnego, udziału systemów antyoksydacyjnych i pierwiastków chemicznych w patogenezie i w rozwoju zaćmy. Badania o tak szerokim spektrum i wielopoziomowości badanych parametrów stanowią pierwsze tego typu opracowanie. W dalszej perspektywie mogą być pomocne przy opracowywaniu leków hamujących rozwój zaćmy. Ważnym wynikiem jest pokazanie po raz pierwszy, że w populacji kaukaskiej polimorfizmy genu *GSTT* są powiązane z zachorowaniem na zaćmę. Część badań opisanych w pracy jest już opublikowana. Jestem przekonana, że badania te wzbudzą duże zainteresowanie w gronie lekarzy, biologów i ekologów.

W czasie lektury Dyskusji nasunęła mi ogólna uwaga:

- W pracy wykazano obniżenie uszkodzeń oksydacyjnych na poziomie lipidów (obniżony poziom markera MDA) w surowicy krwi osób chorujących na zaćmę, co wskazywałoby na mniejszy poziom stresu oksydacyjnego. Czy tak jest istotnie? Może warto byłoby także badać poziom uszkodzeń oksydacyjnych innych makrocząsteczek (białek i DNA) a także poziom produkcji RFT.

#### Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi oraz błędy językowo-redakcyjne nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki eksperymentów przedstawione w rozprawie nie



:viko stanowią dobrą podstawę do dalszych badań ale również są istotne dla zrozumienia etiologii i rozwoju zaćmy, a także w przyszłości dla diagnostyki i leczenia tej choroby. W szerszym aspekcie, badania opisane w ocenianej pracy doktorskiej są także ważne dla zrozumienia znaczenia czynników środowiskowych i genetycznych oraz odpowiedzi antyoksydacyjnej w funkcjonowaniu i rozwoju patologii komórek/organizmu. Biorąc pod uwagę merytoryczną i innowacyjną wartość pracy, znaczenie przeprowadzonych badań, pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, a także umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Katarzyny Rektor do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Wiesława  
Jarmuszkiewicz