

Dr hab. n. med.  
Adrian Smędowski

Katedra i Zakład Fizjologii  
Wydział Nauk Medycznych  
w Katowicach

40-752 Katowice, ul. Medyków 18  
[www.fizjologia.sum.edu.pl](http://www.fizjologia.sum.edu.pl)

[asmedowski@sum.edu.pl](mailto:asmedowski@sum.edu.pl)

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 252 50 87

fax: (+48 32) 252 60 77  
[fzkatopl@sum.edu.pl](mailto:fzkatopl@sum.edu.pl)



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu lek. Ewy Sikorskiej pt. „Rola czynników neuroprotektoryjnych w patogenezie wybranych chorób oczu”, wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Agnieszki Cudnoch-Jędrzejewskiej w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.**

Choroby neurodegeneracyjne siatkówki powodują uszkodzenie i obumieranie neuronów siatkówki oraz wyższych pięter drogi wzrokowej. Spośród neuronów siatkówki, komórki zwojowe, będące bezpośrednim połączeniem siatkówki z pierwszorzędowymi ośrodkami wzrokowymi w mózgu, stanowią newralgiczny punkt drogi wzrokowej. Nielezione choroby obejmujące komórki zwojowe, takie jak neurodegeneracje pierwotne, np. jaskra, czy wtórne, np. choroby naczyniowe/niedokrwienne siatkówki, mogą prowadzić do całkowitej i nieodwracalnej ślepoty. Światowa Organizacja Zdrowia uznała jaskrę za chorobę społeczną, będącą główną przyczyną nieodwracalnej ślepoty na świecie. Jej skryty przebieg powoduje, że w chwili rozpoznania jest już zwykle przyczyną znacznego upośledzenia widzenia. „Podstępność” jaskry związana jest przede wszystkim z faktem, iż we wczesnych stadiach przebiega ona bezobjawowo powodując powolną utratę obwodowych części pola widzenia. Choroba zaczyna być dostrzegalna w chwili, gdy ograniczenie pola widzenia jest na tyle znaczne, że wpływa na codzienne funkcjonowanie chorych. Przyczyną znacznego wzrostu częstości występowania tej choroby jest globalny proces starzenia się społeczeństwa oraz choroby cywilizacyjne – przede wszystkim cukrzyca i choroby sercowo-naczyniowe. Cukrzyca i nadciśnienie tętnicze są najczęstszą przyczyną występowania chorób naczyniowych siatkówki, retinopatii cukrzycowej oraz zakrzepów/zatorów naczyń siatkówki prowadzących w konsekwencji do procesów wtórnej neurodegeneracji neuronów siatkówki, w tym komórek zwojowych.

W przypadku jaskry, w populacji europejskiej, około 70% przypadków związanych jest z podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym – najważniejszym, mierzalnym czynnikiem ryzyka rozwoju i progresji choroby. Pierwotnie sądzono, że jaskra jest wywołana jedynie podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym. Obecnie uważa się, że za rozwój jaskry odpowiedzialne jest nie tylko podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, ale również szereg innych czynników – stres oksydacyjny, starzenie się organizmu, zaburzenia krążenia itd.

Na chwilę obecną brakuje skutecznych terapii neuroprotektoryjnych (czyli chroniących komórki nerwowe, a takimi są komórki zwojowe siatkówki, przed obumieraniem), które można stosować w pierwotnych lub wtórnych chorobach neurodegeneracyjnych siatkówki. W związku z tym, poszukiwanie takich terapii, umożliwiających zahamowanie obumierania komórek zwojowych siatkówki oraz pobudzenia ich regeneracji wciąż jest ważnym i aktualnym problemem. Innowacyjnym kierunkiem w badaniach nad neuroprotekcją są próby zastosowania terapii komórkowych oraz terapii genowych, jednak jak dotąd nie zidentyfikowano konkretnych genów jednoznacznie odpowiedzialnych za rozwój tej choroby. W ostatnich latach, terapie genowe stosowane w okulistyce eksperymentalnej, wydają się być obiecującym kierunkiem badań, który daje nadzieję na opracowanie nowych, skutecznych metod terapeutycznych. Efekty terapii genowej mogą poprawić komfort życia pacjentów, jak również, dzięki prewencji utraty wzroku, wpłynąć na ich czynny udział w życiu społeczno-zawodowym. Spośród wielu różnych nowoczesnych strategii terapeutycznych, techniki inżynierii genetycznej rozwijają się coraz dynamiczniej, umożliwiając nowe sposoby interwencji w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w neuropatii jaskrowej. Pomimo, iż patogeneza samej w sobie neurodegeneracji nie jest w pełni poznana, zaburzenia transportu wstecznego czynników neurotroficznycych w obrębie aksonów komórek zwojowych jest jednym z pewnych i udowodnionych mechanizmów, uczestniczących, lub nasilających kaskadę śmierci komórek. Zgodnie z doniesieniami w literaturze, suplementacja BDNF stosowana we wczesnych badaniach eksperymentalnych wykazuje potencjalne działanie ochronne wobec komórek zwojowych siatkówki, jednak działanie tego czynnika w formie białkowej ma bardzo ograniczony czas z uwagi na obecność enzymów proteolitycznych w obrębie ciała szklistego. Terapie związane z NGF wyglądają mniej obiecująco, gdzie, póki co nie uzyskano jednoznacznego konsensusu odnośnie efektu zastosowania w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

Wobec powyższych rozważań, temat rozprawy doktorskiej Kandydatki uważam za ważny i ciekawy, jednak sam temat nie jest nowatorski. Jakkolwiek, próby oceny działania BDNF i NGF w chorobach siatkówki oraz próby zastosowania terapii genowej z wykorzystaniem tych czynników są znane w literaturze, na uwagę zwraca pomysł połączenia kilku modeli, jaskry z wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym, retinopatii

cukrzycowej oraz nadciśnieniowej, co nosi pewne znamiona nowości w temacie. Godny podkreślenia i pochwały jest fakt zainteresowania tematem eksperymentalnym Kandydatki, która jest lekarzem.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi 164 strony tekstu, z czego 97 stron stanowi właściwy tekst pracy, natomiast na pozostałych stronach umieszczono stronę tytułową, podziękowania, spis treści, spis rycin, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, załączniki stanowiące 13 tabel zawierających obliczenia statystyczne. Manuskrypt ma typowy podział na podrozdziały i składa się z wstępu – 23 strony, założeń, celu i metodyki pracy – 16 stron, wyników – 31 stron, dyskusji – 18 stron, wniosków – 1 strona, podsumowania, dalszych perspektyw i ograniczeń pracy – 3 strony. Praca przedstawiona przez Doktorantkę zawiera dodatkowo 46 rycin oraz 16 tabel. Rozprawa poparta jest 287 pozycjami piśmiennictwa, uporządkowanych w kolejności cytowania. Dane bibliograficzne niektórych pozycji są niekompletne i nie uwzględniają stron opracowań.

Przechodząc do szczegółowej analizy rozprawy, przedstawiam moje uwagi. Wykaz rycin i skrótów został skonstruowany w właściwy sposób, jednak zawiera kilka błędów w tłumaczeniu angielskich nazw oraz kilka błędnych nomenklatur. AMD oznacza zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, nie ma takiej struktury w obecnym nazewnictwie jak plamka żółta, stosuje się nazwę plamka siatkówki. W klasyfikacji nie występuje obecnie również przewlekła jaskra z zamkniętym kątem przesączania, choroba ta dzieli się na pierwotną i wtórną jaskrę zamkniętego kąta przesączania, która w domyśle jest przewlekłą i postępującą chorobą oraz na różnego rodzaju zamknięcie kąta przesączania, które mogą mieć ostry charakter. ILM - warstwa graniczna wewnętrzna tłumaczy się prawidłowo jako błona graniczna wewnętrzna. IOP - ciśnienie śródgałkowe (ang. Intraocular Pressure) tłumaczy się prawidłowo jako ciśnienie wewnątrzgałkowe. RNFL – warstwa włókien nerwowych (ang. Retinal Nerve Fiber Layer), pełne tłumaczenie powinno brzmieć warstwa włókien nerwowych siatkówki. Streszczenie polskie i angielskie, w syntetyczny sposób przedstawiają zarys dysertacji i stanowią dobrze dopracowane wprowadzenie w temat, zawierają jednak pewne nieścisłości. „Ślepotą jest konsekwencją wielu chorób oczu, takich jak zaćma, jaskra, nieskorygowana wada refrakcji, zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem, czy też retinopatia cukrzycowa. Wyniki leczenia są satysfakcjonujące jedynie w przypadku zaćmy i wad refrakcji, natomiast terapie jaskry, zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem oraz retinopatii cukrzycowej stanowią nadal istotne wyzwanie kliniczne” – trudno jest się ustosunkować do tego stwierdzenia, gdyż wysokie wady refrakcji, związane z zmianami zwyrodnieniowymi siatkówki na równi z innymi chorobami mogą prowadzić do nieuleczalnej ślepoty i nie ma obecnie skutecznie metod ich leczenia. „W pracy doktorskiej skupiłam się na badaniach dotyczących patomechanizmów chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, a w szczególności zaangażowaniu w tym procesie białek

neuroprotektoryjnych, odpowiedzialnych za ochronę neuronów przed śmiercią” – należałoby tu rozróżnić choroby pierwotne neurodegeneracyjne (dotyczące pierwotnie neuronów siatkówki, takich jak jaskra, czy AMD) i wtórne neurodegeneracje, sprowadzające się do każdej wtórnej choroby siatkówki czy n. II skutkującej obumieraniem neuronów. Autorka w wielu miejscach przytacza używane myszy szczepu DBA/2, co rodzi pytanie, czy ich nazwa nie jest literówką? W badaniach jaskrowych zwykle wykorzystywane są myszy DBA/2J, myszy DBA/2 wykorzystywane są zwykle w badaniach nad padaczką, należałoby tu uściślić szczegóły dotyczące stosowanego szczepu. „U myszy szczepu DBA/2 potwierdzono rozwój jaskry na podstawie podwyższonych wartości ciśnienia śródgałkowego” – trudno jest wnioskować o rozwoju neuropatii na podstawie pomiaru ciśnienia wewnątrzgałkowego. W przypadku, kiedy włączenie do grupy badanej wymaga potwierdzenia rozwoju jaskry, jedynie przyżyciowe testy, tj. elektroretinografia z PhNR i STR oraz badanie OCT mogą umożliwić takie postępowanie. W innym przypadku należałoby powiedzieć, iż fenotyp zwierząt (czyli tendencja do wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego) został potwierdzony w jego pomiarach.

Wstęp dysertacji stanowi najbardziej rozbudowaną część rozprawy, omawiającą po kolei zagadnienia budowy gałki ocznej, siatkówki, fizjologii widzenia, chorób oczu, jaskry, retinopatii cukrzycowej i nadciśnieniowej, czynników wzrostu oraz modeli zwierzęcych powyższych chorób oczu. W obrębie wstępu istnieje kilka fragmentów wymagających komentarza i uściślenia. Doktorantka stwierdza, iż budowa gałki ocznej nie różni się znacznie pomiędzy poszczególnymi gatunkami ssaków, co nie jest prawdą. Istnieją istotne różnice w budowie siatkówki, np. u gryzoni, które nie posiadają plamki siatkówki. Stosunek wzajemnych struktur przedniego odcinka również wykazuje istotne różnice, głównie dotyczące wielkości soczewki oka u różnych gatunków ssaków. Przedstawiając fizjologię widzenia, a ściślej mówiąc proces fototransdukcji, Doktorantka popełniła kardynalny błąd opisując proces generowania potencjału czynnościowego fotoreceptora na drodze depolaryzacji („Zaburzenie struktury wiązania umożliwia cząstce izomeryzację z formy cis w formę trans (11-trans-retinal – forma aktywna o zmienionej konformacji). Odślonięte miejsca aktywne rozpoczynają kaskadę przekazywania sygnału, aktywując transducynę, która pobudza fosfodiesterazę, a ta z kolei aktywuje hydrolizę cząsteczek cyklicznego guanozyno-3',5'-monofosforanu (cGMP). Następnie otwarte zostają cGMP-zależne kanały błonowe, przez które do cytoplazmy dostają się jony sodowe, powodując depolaryzację błony komórkowej”), gdzie w rzeczywistości komórki te ulegają wzbudzeniu poprzez hiperpolaryzację na drodze zamknięcia kanałów błonowych związanym z niedoborem cGMP. Dodatkowo fakt ten dziwi, ponieważ praca powstała w Katedrze Fizjologii, a Doktorantka jest nauczycielem akademickim nauczającym tego przedmiotu. W kolejnych fragmentach wstępu istnieje kilka błędów merytorycznych, np. Doktorantka stwierdza, że choroby neurodegeneracyjne oka dotyczą siatkówki i/lub nerwu wzrokowego, czyli struktur, które zbudowane są z neuronów, gdzie w obrębie nerwu wzrokowego tak naprawdę część neuronalną reprezentują

jedynie aksony komórek zwojowych siatkówki, a nie neurony same w sobie. Doktoranta opisując pozagałkową drogę wzrokową stwierdza, iż nerw wzrokowy opuszcza gałkę oczną tworząc tarczę nerwu wzrokowego, a następnie przechodzi przez szczelinę górną oczodołu, za którą spleta się z przeciwległym nerwem wzrokowym tworząc skrzyżowanie wzrokowe, gdzie tak naprawdę nerw wzrokowy opuszcza oczodół poprzez kanał nerwu wzrokowego, a nie szczelinę oczodołową górną, natomiast skrzyżowanie nerwów wzrokowych ma bardzo uporządkowaną strukturę, trudno jest powiedzieć, iż nerwy się „splatają”. Doktorantka stwierdza, iż choroby neurodegeneracyjne prowadzą do nieodwracalnej ślepoty, gdyż w ich przebiegu, trwałemu uszkodzeniu ulegają komórki odpowiedzialne za przekazanie informacji z siatkówki do kory wzrokowej mózgu, pytanie jakie komórki ma na myśli, w drodze wzrokowej nie istnieją takie komórki, które łączyłyby siatkówkę z korą potyliczną. Wymieniając istotne choroby, Doktorantka przywołuje „jaskrę, retinopatię cukrzycową, AMD, dystrofię siatkówki i zwyrodnienie barwnikowe siatkówki”, co brzmi nieściśle, ponieważ zwyrodnienie barwnikowe siatkówki jest najczęstszą dystrofią siatkówki, niezrozumiałe jest zatem dlaczego wyosobnione jest jako odrębna jednostka chorobowa. W związku, iż wstęp zawiera dość dużą liczbę pomniejszych nieścisłości i błędów, poniżej wymieniam każdy z nich z jedynie krótkim komentarzem.

„Jaskra stanowi jedną z najczęstszych przyczyn nieodwracalnej ślepoty u dorosłych na całym świecie, choć jej patogeneza do dziś nie została w pełni wyjaśniona” – jaskra stanowi główną przyczynę nieodwracalnej ślepoty na świecie, a jednocześnie najczęstszą neuropatię n. II u dorosłych.

„Najczęstszym typem jaskry jest pierwotna jaskra otwartego kąta (ang. Primary Open-Angle Glaucoma; POAG), stanowiąca nawet 75% przypadków” – należałoby tutaj dodać, że jest to najczęstszy typ u rasy białej.

„POAG spowodowana jest zwiększoną opornością na drenaż cieczy wodnistej przez beleczkowanie w obrębie kąta przesączania, który jest otwarty. Z powodu tej blokady ciśnienie w oku stopniowo wzrasta, powodując uszkodzenie nerwu wzrokowego” – to nie są prawdziwe informacje, powyżej Doktorantka podaje, iż jaskra pierwotna nie ma zidentyfikowanej przyczyny oraz iż IOP jest jedynie czynnikiem ryzyka rozwoju choroby. IOP nie jest przyczyną rozwoju jaskry, jest to fundamentalna wiedza dotycząca patomechanizmu tej choroby.

„...dodatkowo oceniany jest ubytek RNFL, widoczny jako jaśniejsze kliny odchodzące od tarczy nerwu wzrokowego” – jest to widoczne nie zawsze i zwykle w obrazach bezczerwonych, nie jest to rutynowy marker rozpoznania jaskry.

„Pośród metod pomiaru IOP wyróżnić można tonometrię: aplanacyjną, wgłobieniową, odbiciową oraz dynamiczną konturową” – tonometria aplanacyjna to jest tonometria wgłobieniowa, te dwa terminy są tożsame.

„OCT oraz UBM to badania umożliwiające ocenę morfologii struktur gałki ocznej, w tym morfologii przedniego odcinka oka wraz z kątem przesączania. Badania te obecnie nie należą jednak do złotego



standardu diagnostyki jaskry” – to nie jest prawda, obecnie złotym standardem w diagnostyce jaskry jest perymetria statyczna oraz badanie OCT. UBM nie jest standardowym badaniem w diagnostyce jaskry.

„Leczenie jaskry jest ograniczone do modyfikacji najważniejszego czynnika ryzyka – podwyższonego IOP. Zaleca się leczenie farmakologiczne” – zalecenia co do leczenia zależą od wskazań, np. w jaskrze wrodzonej czy młodzieńczej zaleca się leczenie chirurgicznie jako leczenie pierwszego rzutu.

„Analogi prostaglandyn (trawoprost, bimatoprost, tafluprost)” – bimatoprost jest prostamidem, nie analogiem prostaglandyn.

„Retinopatia proliferacyjna to najbardziej zaawansowane stadium retinopatii cukrzycowej” – to nie jest prawda, najbardziej zaawansowanym stadium jest witreoretinopatia proliferacyjna.

„Do podstawowych metod laseroterapii należy fotokoagulacja laserowa, której celem jest zniszczenie nieprawidłowych naczyń krwionośnych w siatkówce, co zmniejsza ryzyko krwotoków i uszkodzeń siatkówki” – celem fotokoagulacji laserowej jest zniszczenie niedokrwiionych obszarów siatkówki, przez co zmniejsza się produkcja VEGF i dochodzi do zahamowania wzrostu patologicznych naczyń. Nie koaguluje się naczyń samych w sobie.

„Organizm może chronić komórki nerwowe przed uszkodzeniem wydzielając czynniki neuroprotektoryjne, których rola jest istotna nie tylko w przebiegu chorób neurologicznych, ale również siatkówki, gdyż gałka oczna stanowi wypustkę ośrodkowego układu nerwowego (OUN)” – gałka oczna nie stanowi wypustki OUN, siatkówka stanowi wypustkę OUN.

„Trwają jedynie nieliczne badania kliniczne, w których stosuje się czynniki neuroprotektoryjne w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych oka. Badania te dotyczą przede wszystkim oceny profilu bezpieczeństwa i skuteczności podawania kropli zawierających ludzki rekombinowany NGF oraz stosowania implantów wydzielających GDNF u pacjentów z jaskrą, zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki, chorobami plamki żółtej i niedokrwienną neuropatią nerwu wzrokowego” – należałoby wymienić/opisać jakie dokładnie badania ma na myśli Doktorantka (numery rejestracyjne badań) oraz przytoczyć więcej z nich, sztanदारowym badaniem jest tutaj badanie z implantem Renexus, które tak naprawdę jako jedyne wydaje się mieć jakikolwiek potencjał. Badania z NGF pokazały brak skuteczności.

„Podanie rekombinowanego białka do ciała szklistego może jednak mieć ograniczony efekt terapeutyczny wynikający z kompensacyjnego zmniejszenia ilości receptorów TrkB dla BDNF w błonach komórkowych (efekt ten został wykazany w neuronach hipokampa i komórkach ziarnistych mózdzku)” – należałoby wspomnieć, iż tak naprawdę podanie czynników białkowych ma ograniczoną skuteczność ze względu na proteazy ciała szklistego, które trawią podane białko.

„Wyniki licznych badań przedklinicznych, badających potencjał terapeutyczny BDNF, przyczyniły się do rozpoczęcia badań klinicznych, dotychczas jednak tylko w chorobach neurologicznych (u pacjentów z chorobą

Alzheimera i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi)” – w bazie badań klinicznych jest zarejestrowanych ponad 900 badań w różnych wskazaniach.

„Drugą metodą wywołania jaskry jest bezpośrednio uszkodzenie aksonów komórek RGC poprzez przecięcie lub zmiżdżenie nerwu wzrokowego” – przecięcie lub zmiżdżenie nerwu wzrokowego nie jest modelem jaskry. Jest to model ostrej neuropatii, który nie ma nic wspólnego z jaskrą.

„...które prowadzą do rozwoju przewlekłej jaskry barwnikowej związanej z wiekiem, będącej podtypem POAG” – nie jest to prawdą, jaskra barwnikowa jest jaskrą wtórną, nie jest podtypem POAG.

„Ze względu na genetyczną postać choroby, szczep DBA/2 stanowi najbardziej odpowiedni i szeroko wykorzystywany model do badań nad patogenezą i rozwojem jaskry z uwzględnieniem szlaków wewnątrzkomórkowych. Należy zaznaczyć, że jaskra typu POAG jest najczęściej rozpoznawanym typem jaskry u ludzi” – szczep DBA/2 (DBA/2J?) nie jest przykładem modelu POAG, a modelem jaskry wtórnej. U osobników tego szczepu nie sama jaskra jest genetyczna, natomiast podłoże genetyczne związane jest z zaburzeniami przedniego odcinka gałki ocznej i rozwojem zespołu rozproszonego barwnika, który powoduje wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego i wtórnie, proces neurodegeneracji. W tym podtypie jaskry, proces neurodegeneracji związany jest ściśle z poziomem IOP.

„Sama retinopatia cukrzycowa u naczelnych wywołana może być bezpośrednio przez laserowe uszkodzenie żył siatkówki prowadzące do niedotlenienia tkanki, co przypomina zmiany obserwowane w przebiegu cukrzycy” – nie jest to prawdą, laserowe uszkodzenie żył siatkówki prowadzi do rozwoju zmian obserwowanych w zakrzepie żyły środkowej (CRVO/BRVO), który również skutkuje niedotlenieniem siatkówki i neowaskularyzacją, nie jest jednak związany z cukrzycą.

„Wśród spontanicznych mysich modeli cukrzycy wyróżnić można szczepy: Ins2Akita, Non-Obese Diabetic, Kimba i Akimba rozwijające cukrzycę typu 1 oraz szczep Leprdb prezentujący objawy cukrzycy typu 2” – pytanie czy modele genetyczne można uznać za spontaniczne, jeśli są zwierzętami GMO.

„W pracy doktorskiej wybrałam model cukrzycy typu 1, ponieważ w Polsce retinopatia u pacjentów stosunkowo częściej pojawia się jako powikłanie właśnie tego typu cukrzycy” – retinopatia cukrzycowa proliferacyjna rozwija się częściej jako powikłanie cukrzycy typu I, jednak biorąc pod uwagę fakt, iż to cukrzyca typu II jest częściej występującym typem tej choroby, odsetek powikłań ocznych związanych z typem II jest znacznie większy i stanowi istotniejszy problem kliniczny.

Założenia i cele dysertacji przedstawione są w jasny i logiczny sposób. Doktorantka stawia 1 główny i 5 szczegółowych celów badawczych. Założone cele częściowo znajdują odzwierciedlenie w przedstawionych wynikach. Odnośnie celu głównego, ocena zmiany poziomu białek neuroprotektoryjnych BDNF i NGF została przedstawiona w pracy, natomiast wyjaśnienie potencjalnej roli tych białek w patogenezie chorób przebiegających z neurodegeneracją siatkówki nie do końca znalazło odzwierciedlenie w wynikach. W

odniesieniu do celów szczegółowych, cele a-e zostały poparte w prezentowanych wynikach, jednak cel a został osiągnięty częściowo, ponieważ nie uzyskano potwierdzenia rozwoju modelu retinopatii związanej z nadciśnieniem tętniczym.

Rozdział „Materiały i Metody” przedstawia w szczegółowy sposób zastosowane metody badawcze. Badania przeprowadzone zostały na następujących grupach zwierząt: jaskra – myszy DBA/2, dla których kontrolą były myszy C57Bl/6, retinopatia związana z nadciśnieniem tętniczym – szczury SHR, dla których kontrolą były szczury WKY, retinopatia cukrzycowa – szczury Lewis, którym podano STZ, dla których kontrolą były szczury Lewis, którym nie podano STZ. Badania przeprowadzone były po uzyskaniu stosownej zgody komisji etycznej. W swojej pracy Doktorantka podzieliła zwierzęta na następujące grupy: jaskra – grupa zwierząt nierozwijających jaskry C57Bl/6\_11t (n=10) i C57Bl/6\_10m (n=12) – odpowiednio w wieku 11 tygodni i 10 miesięcy, grupa zwierząt rozwijających jaskrę DBA/2\_11t (n=10) i DBA/2\_10m\_JAS (n=10) – zasadnym byłoby opisanie tych grup jako zwierzęta z prawidłowymi wartościami IOP i podwyższonym IOP, gdyż wnioskowanie na podstawie wartości IOP o obecności neuropatii jest błędne; retinopatia związana z nadciśnieniem tętniczym – grupa zwierząt nierozwijających nadciśnienia tętniczego WKY\_6t (n=9) i WKY\_12t (n=10) – odpowiednio w wieku 6 i 12 tygodni, grupa zwierząt rozwijająca nadciśnienie tętnicze SHR\_6t (n=10) i SHR\_12t\_NAD (n=12) – odpowiednio w wieku 6 i 12 tygodni – zasadnym byłoby opisanie tych grup jako zwierzęta z prawidłowymi wartościami BP i podwyższonym BP, jako iż zwierzęta miały stanowić model retinopatii, opisywanie ich jako „przed wystąpieniem objawów choroby” sugeruje, iż grupa SHR\_12t\_NAD posiada rozwiniętą retinopatię; cukrzyca – grupa zwierząt bez podwyższonej glikemii Lewis\_KON (n=10) i zwierzęta z podwyższoną glikemią Lewis\_CUK (n=10). W projektowaniu grup przez Doktorantkę istotnym jest podkreślenie, iż zostały one zaprojektowane w przemyślany sposób. Dobór zwierząt kontrolnych został dokonany w oparciu o znajomość tła genetycznego zwierząt, co zasługuje na podkreślenie. Analizując metodologię dysertacji, można zidentyfikować kilka potencjalnych problemów i braków mogących negatywnie wpływać na wyniki badań. Odnośnie obróbki tkanek, podstawowe pytanie brzmi, dlaczego nie izolowano siatkówek? Pomiar stężenia białka w homogenacie całej gałki ocznej jest kontrowersyjny, ponieważ czynniki neurotroficzne, szczególnie BDNF ulega konstytutywnej ekspresji w wielu tkankach, w jaki zatem sposób Doktorantka może udowodnić, iż pomiary poziomu białek pochodzą z siatkówki, a nie z innych tkanek oka. W opisie metody nie wspomina się o perfuzji zwierząt przed pobraniem gałek ocznych, zatem homogenizowane tkanki zawierały również dużą domieszkę krwi, co dodatkowo obniża precyzję pomiaru białka. Wątpliwość budzi również metoda barwienia tkanek i ewaluacji liczby komórek zwojowych siatkówki. Doktorantka zliczała komórki barwione H-E, w jaki sposób przeprowadziła ich identyfikację? Bez należytej identyfikacji komórek, nie można powiedzieć, iż są to komórki zwojowe. RGC stanowią około 50% komórek



warstwy zwojowej siatkówki, pozostałe 50% stanowią zdelokalizowane komórki amakrynowe i komórki glejowe. Zliczane komórki barwione H-E powinny być opisane raczej jako komórki warstwy GCL, niż jako komórki zwojowe. Jest to istotny błąd metodologiczny. Interesującym pomysłem, który zasługuje na podkreślenie jest liczenie komórek siatkówki z podziałem na centralną i obwodową część siatkówki, brakuje jednak szczegółów opisujących w jaki sposób doktorantka zapewniła tożsamość lokalizacji skrawków z różnych oczu, czy np. analizowany był co 10-ty skrawek oraz ile skrawków na oko posłużyło do oceny liczby komórek. Pomiary grubości siatkówki na utrwalonym materiale nie są najdokładniejszą metodą ilościową. Czy pomiary grubości siatkówki były wykonywane zawsze w tym samym miejscu siatkówki? Duży niedosyt budzi znikomy materiał histologiczny oraz brak barwienia immunohistochemicznego, przez co nie został wykorzystany potencjał naukowy związany z uśmierceniem 103 zwierząt. Fakt, iż rozpoznanie jaskry u myszy stawiano na podstawie istotnego statystycznie wzrostu IOP oraz zmian świadczących o procesach degeneracyjnych w analizie histopatologicznej dowodzi, iż randomizacja zwierząt do grupy badanej odbywała się w sposób retrospektywny – potwierdzenie rozwoju neuropatii stawiane było pośmiertnie. Czy u wszystkich zwierząt z grupy DBA/2\_10m\_JAS rozwinęły się cechy neuropatii n. II? W ocenie przyżyciowej oceniano charakterystycznych zmiany naczyniowe widoczne na dnie oka – czy oceniano w czasie zawsze te same tożsame naczynia? W jaki sposób odróżniano żyły od tętnic? Ile naczyń oceniano łącznie uzyskując uśredniony wynik? Opis pozostałych metod badawczych nie budzi zastrzeżeń i wykonane zostały na zadowalającym poziomie. Analiza statystyczna i wybrane testy statystyczne są właściwe i nie budzą wątpliwości. Interpretację wyników ułatwiłoby jednak zawarcie odchyłeń standardowych w tekście dysertacji.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka dokumentuje poszczególne składowe analiz w formie tekstowej, tabel i rycin. W przypadku modelu jaskry, starsze myszy DBA/2 wykazywały wyższe wartości IOP niż myszy kontrolne w tym samym wieku oraz niż młode myszy DBA/2. Starsze myszy DBA/2 posiadały cieńszą siatkówkę niż myszy kontrolne w tym samym wieku oraz niż młode myszy DBA/2. Starsze myszy DBA/2 wykazywały również ścieńczenie warstwy siatkowej zewnętrznej w porównaniu do myszy kontrolnych w tym samym wieku. Liczba komórek warstwy zwojowej u starszych myszy DBA/2 była niższa niż u myszy kontrolnych w tym samym wieku oraz niż u młodych myszy DBA/2. Zwierzęta DBA/2\_10m\_JAS wykazały niższy poziom BDNF i NGF w gałce ocznej niż u 10-miesięcznych myszy kontrolnych, jednak Doktorantka nie przeprowadziła analizy statystycznej z uwagi na małą liczebność grup. Fakt ten czyni wyniki mało przydatnymi do przeprowadzenia wnioskowania. W analizie korelacji uwagę zwraca brak korelacji pomiędzy wartościami IOP, a liczbą komórek warstwy zwojowej w grupie zwierząt DBA/2\_10m\_JAS, co pod wątpliwość stawia model jaskry. Fakt ten może być związany z wykorzystaniem w obliczeniach liczby komórek warstwy zwojowej, a nie samych komórek

zwojowych, które stanowią około połowę populacji GCC. W modelu nadciśnienia tętniczego, wartości ciśnień tętnicznych u szczurów szczepu SHR były istotnie wyższe niż szczurów szczepu WKY, natomiast jedynie szczury z grupy SHR\_12t\_NAD spełniały kryteria rozpoznania nadciśnienia tętniczego. U zwierząt nie obserwowano zmiany parametrów naczyń dna oka (a/v), co jest kryterium rozpoznania powikłań ocznych nadciśnienia tętniczego, a tym samym nie spełniono założeń stworzenia modelu retinopatii. Szczury SHR\_12t\_NAD wykazywały natomiast wyższe wartości IOP w porównaniu do zwierząt z pozostałych grup. W analizie siatkówek nie stwierdzono również zmian w grubości siatkówek i liczbie komórek warstwy GCC w grupie SHR\_12t\_NAD w porównaniu do grupy kontrolnej w tym samym wieku. U zwierząt SHR\_12t\_NAD poziom BDNF był wyższy zarówno w gałce ocznej jak i w surowicy, poziom NGF był wyższy w gałce ocznej. U zwierząt SHR\_12t\_NAD wykazano korelację (na granicy istotności) pomiędzy wartościami SBP a ONL, NGF a INL oraz BDNF i NGF. W modelu cukrzycy, wartość współczynnika a/v u szczurów z cukrzycą była istotnie wyższa niż u szczurów z grupy kontrolnej. U szczurów Lewis\_CUK obserwowano mniejszą grubość IPL, a większą ONL, natomiast liczba komórek warstwy zwojowej była niezmienną. Zwierzęta Lewis\_CUK wykazywały również niższy poziom BDNF w surowicy. W grupie z cukrzycą obserwowano korelację pomiędzy NGF a a/v oraz korelację pomiędzy grubością IPL i ONL. Podsumowując wyniki, pozytywne wrażenie budzi liczba wykonanych analiz statystycznych, brakuje jednak nazw testów stosowanych do obliczenia każdego współczynnika p, co ułatwiałoby interpretację.

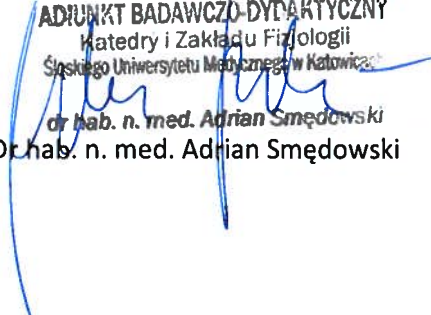
Rozprawa doktorska kończy się zwięzłą dyskusją, podsumowującą wyniki opisane w dysertacji. Prawidłowo prowadzona dyskusja i konfrontacja z danymi literaturowymi udowadnia, iż Doktorantka dogłębnie zna i rozumie temat, którego się podjęła. Dyskusja rozpoczyna się odniesieniem do celu dysertacji „W niniejszej pracy doktorskiej badana była rola BDNF i NGF w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych siatkówki. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej wskazują na potencjalny udział BDNF i NGF w patogenezie badanych chorób oczu”. Wyniki uzyskane w dysertacji nie są jednak kompletne. Brak jest możliwości wnioskowania na temat poziomów BDNF i NGF w modelu jaskry, gdyż niemożliwe było przeprowadzenie analizy statystycznej dla tych zmiennych. Z kolei w aspekcie retinopatii nadciśnieniowej, nie osiągnięto założenia jakim jest rozwój powikłań ocznych. Wnioskowanie na podstawie przeprowadzonych wyników nie jest więc możliwe we wszystkich założonych aspektach, w związku z czym, dyskusja powinna być lepiej dostosowana do uzyskanych wyników. W kolejnych podrozdziałach dyskusji Doktorantka omawia poszczególne wyniki zastosowanych modeli oraz konfrontuje je z dostępną literaturą. W przypadku modelu jaskry stwierdza, iż poza zmniejszeniem liczby RGC, u myszy z jaskrą zaobserwowano atrofię siatkówki (znaczny spadek grubości RT). Tak naprawdę trudno jest nazwać obserwowany proces atrofią, jeśli nie była oceniana komponenta komórkowa warstw siatkówki. Należy również podkreślić, iż ścieńczenie siatkówki nie jest cechą

charakterystyczną jaskry, w której dochodzi do wybiórczego obumierania RGC i ścieńczenia najbardziej wewnętrznych warstw siatkówki, których udział w grubości całej tkanki jest tak naprawdę niewielki. Doktorantka stwierdza, iż u myszy z jaskrą również doszło do spadku udziału warstwy OPL w budowie siatkówki, co prawdopodobnie doprowadziło do rozwoju jaskry. Jest to niezrozumiałe stwierdzenie, które wymaga szerszego wyjaśnienia. Doktorantka poświęca dość dużo miejsca opisowi wyników BDNF i NGF w modelu jaskry, jednak nigdzie nie pada jasne stanowisko, iż uzyskane wyniki tak naprawdę nie mogą służyć wiarygodnej analizie, ponieważ niemożliwa była ocena statystyczna. Doktorantka stwierdza, iż obserwowane przez nią obniżenie poziomu BDNF, prawdopodobnie wynika z obumierania wydzielających ten czynnik komórek zwojowych. Jest to dalece mało prawdopodobne zważywszy, iż analizowany był homogenat z całego oka. W ocenie Doktorantki, znaczne obniżenie poziomu BDNF w tkankach we wczesnych etapach rozwoju jaskry mogłoby stanowić podstawę do wykorzystania oznaczeń poziomu BDNF w surowicy, płynie łzowym lub cieczy wodnistej jako biomarkera u pacjentów. Biomarker powinien być specyficznym wskaźnikiem. Czy poziom BDNF nie zmienia się w innych neuropatiach n. II? Tylko w neuropatii jaskrowej? BDNF nie jest najlepszym kandydatem na biomarker z uwagi na jego konstytutywną ekspresję w wielu tkankach oka i znaczenie wielu patologii. Odnośnie możliwości terapeutycznych, Doktorantka stwierdza, iż egzogenne podanie BDNF w formie zastrzyku doszklistkowego ma ograniczone zastosowanie, ponieważ BDNF nie przekracza bariery krew-mózg oraz charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania. Tak naprawdę podanie leku w formie iniekcji doszklistkowej omija barierę krew-siatkówka oraz nie wymaga przekraczania bariery krew-mózg. W modelu nadciśnienia tętniczego nie obserwowano cech angiopatii oraz retinopatii. Doktorantka stwierdza, że brak zmian wartości współczynnika a/v u szczurów może wynikać z doboru miejsca pomiaru, a wartości ciśnienia tętniczego u szczurów w niniejszej pracy były znacznie niższe niż w innych badaniach, co mogło wpłynąć na wolniejszy rozwój retinopatii nadciśnieniowej. Dlaczego więc nie dokonano pomiaru w innych lokalizacjach naczyń oraz dlaczego nie wydłużony został okres follow-up? Według Doktorantki mechanizm uszkodzenia warstwy ONL w przebiegu wysokiego ciśnienia tętniczego może być tłumaczony faktem, że zewnętrzne warstwy siatkówki, szczególnie fotoreceptory, których jądra znajdują się w obrębie ONL, są zaopatrywane w składniki odżywcze przede wszystkim przez naczynia naczyniówki. W przebiegu nadciśnienia tętniczego dochodzi do wzrostu aktywności współczulnej, co skutkuje zwężeniem tętniczek naczyniówki i niedotlenieniem fotoreceptorów, co może prowadzić do zmniejszenia grubości ONL. Teoria ta wydaje się raczej mało prawdopodobna, biorąc pod uwagę relatywnie niskie wartości ciśnienia tętniczego obserwowanego u zwierząt w doświadczeniu oraz krótki okres trwania eksperymentu. Aczkolwiek jest to trudno uzasadnić nie wykonując analizy komórkowej komponenty warstwy ONL. Analizując rolę NGF w modelu nadciśnienia tętniczego Doktorantka stwierdza, że badania przedstawione w pracy doktorskiej sugerują, że NGF wydzielany przez komórki warstwy mięśni gładkich naczyń nie jest transportowany do

surowicy, lecz do tkanek gałki ocznej, co nie ma żadnego potwierdzenia w przeprowadzonych wynikach. Wyniki uzyskane w modelu cukrzycy wydają się być najbardziej kompletne i wiarygodne. Również dyskusja w tym temacie jest najlepiej dopracowaną częścią tego rozdziału dysertacji.

Dysertacja podsumowana jest czterema wnioskami, które zostały dostosowane pod względem uzyskanych wyników. Doktorantka słusznie wymienia w wnioskach, które cele nie zostały osiągnięte. Poza wnioskami, na końcu dysertacji zawarto podsumowania, które stanowi syntetyczny opis uzyskanych wyników. Podsumowanie rozpoczyna stwierdzenie, iż w zaprezentowanej pracy oceniano rolę białek BDNF oraz NGF w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych siatkówki. Tak naprawdę badane były poziomy tych dwóch białek towarzyszące modelom chorób, nie była badana rola BDNF i NGF w przebiegu neurodegeneracji. Trochę mylące jest stwierdzenie, iż zmiany badano w zwierzęcych modelach jaskry, retinopatii nadciśnieniowej i cukrzycowej, gdzie nie udało się wywołać modelu retinopatii nadciśnieniowej.

Podsumowując, temat pracy został dobrze wybrany, jest ciekawy, a jego wybrane aspekty mają znamiona nowatorskości. Doktorantka wykazała się dobrą wiedzą w ramach poruszanych zagadnień, dobrze dobrała metody badawcze i starannie opracowała wyniki. Kandydatka nie uniknęła pewnych błędów przy prezentacji celów i wyników pracy, które pozwoliłyby uczynić dysertację bardziej przejrzystą i klarowną, a wyniki poparte wiarygodniejszymi dowodami. Doktorantka wykazała się również pewnymi brakami w wiedzy ogólnej, co jednak nie umniejsza wartości naukowej pracy samej w sobie. Przedstawione wnioski poparte są interesującą dyskusją, zawierają też większość odpowiedzi na postawione sobie pytania badawcze. Praca jest wartościowym dorobkiem Doktorantki i jako kierunek badawczy jest warta kontynuowania. Przedstawione przeze mnie uwagi nie dyskwalifikują pracy pod względem merytorycznym. Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Ewy Sikorskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Ewy Sikorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem  
ADIUNKT BADAWCZO-DYDAKTYCZNY  
Katedry i Zakładu Fizjologii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
  
dr hab. n. med. Adrian Smędowski  
Dr. hab. n. med. Adrian Smędowski