

Katowice, 17.02.2021

Dr hab. n. med.
Adrian Smędowski

Katedra i Zakład Fizjologii
Wydział Nauk Medycznych
w Katowicach

40-752 Katowice, ul. Medyków 18
www.biorlogia.sum.edu.pl

asmadowski@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel. (+48 32) 208 80 76
tel. (+48 32) 252 50 87

fax: (+48 32) 252 60 77
hr@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu lek. Anny Wójcik-Gryciuk pt. „Neuroprotekcja komórek zwojowych siatkówki w jaskrze eksperymentalnej oraz regulacja poziomów BDNF i receptora TrkB w siatkówce i korze wzrokowej po transfekcji AAV2-BDNF”, wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Piotra Skopińskiego w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Jaskra jest przewlekłą, neurodegeneracyjną chorobą powodującą uszkodzenie komórek zwojowych siatkówki oraz wyższych pięter drogi wzrokowej. Nieleczona jaskra może 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. Szacuje się, że około 70 milionów osób na świecie cierpi z powodu jaskry, co stanowi około 1-2% światowej populacji. Rocznie przybywa około 7,5 mln nowych zachorowań, a całkowita liczba chorych na jaskrę może osiągnąć 76 milionów w 2020 i nawet 112 milionów w 2040 roku. Przyczyną znacznego wzrostu częstości występowania tej choroby jest globalny proces starzenia się społeczeństwa oraz choroby cywilizacyjne – przede wszystkim cukrzyca i choroby sercowo-naczyniowe. W Polsce problem jaskry szacunkowo dotyczy liczby około 700 000 osób, z czego przypuszcza się, że nawet połowa nie wie o swojej chorobie.

W populacji europejskiej, około 70% przypadków jaskry jest związanych z podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym – najważniejszym, mierzalnym czynnikiem ryzyka. 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. Obecna terapia jaskry oparta jest przede wszystkim na różnych metodach obniżania ciśnienia wewnątrzgałkowego. Jednakże, progresja utraty wzroku postępuje nadal u części pacjentów, pomimo stosowania maksymalnych dla oka dawek leków obniżających ciśnienie. Na chwilę obecną brakuje skutecznych terapii neuroprotekcyjnych (czyli chroniących komórki nerwowe, a takimi są komórki zwojowe siatkówki, przed obumieraniem), które można stosować w jaskrze. W związku z tym, poszukiwanie takich terapii, umożliwiających zahamowanie obumierania komórek zwojowych siatkówki oraz pobudzenia ich regeneracji (czyli odnawiania się) wciąż jest ważnym i aktualnym problemem. Innowacyjnym kierunkiem w badaniach nad neuroprotekcją w jaskrze 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 eksperymentalnej okulistyce, wydają się być obiecującym kierunkiem badań, który daje nadzieję na opracowanie nowych, skutecznych metod terapeutycznych w jaskrze. 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, terapie genowe zyskują coraz większe zainteresowanie w społeczności naukowej, a techniki inżynierii genetycznej rozwijają się coraz dynamiczniej, umożliwiając nowe sposoby interwencji w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w neuropatii jaskrowej. Pomimo, iż patogenezę jaskry nie jest w pełni poznana, zaburzenia transportu wstecznego czynników neurotroficznych w obrębie aksonów komórek zwojowych jest jednym z pewnych i udowodnionych mechanizmów, uczestniczących, lub nasilających kaskadę patomechanizmu molekularnego jaskry. Zgodnie z doniesieniami w literaturze, suplementacja siatkówki 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 szklстого. Iniekcje wektorów wirusowych zawierające konstrukt genowy (AAV-BDNF) są dla odmiany atrakcyjną alternatywą umożliwiającą długoczasowe podwyższenie stężenia BDNF i wsparcie przeżycia komórek zwojowych siatkówki.

Wobec powyższych rozważań, temat rozprawy doktorskiej Kandydatki uważam za ważny i ciekawy, jednak sam temat nie jest nowatorski. Jakkolwiek, efekt działania BDNF oraz próby zastosowania terapii genowej z wykorzystaniem tego czynnika są znane w literaturze, na uwagę zwraca pomysł połączenia modelu jaskry z wysokim ciśnieniem oparty na modelu przedbeleczkowej okluzji trabekulum wraz z iniekcją AAV-BDNF do ciała szklстого szczura, co nosi znamiona nowości w temacie. Godny podkreślenia i pochwały jest również fakt zainteresowania tematem eksperymentalnym Kandydatki, która na co dzień jest praktykującym lekarzem okulistą.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi 121 stron tekstu, z czego 75 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, spis zdjęć oraz tabel. Manuskrypt ma typowy podział na podrozdziały i składa się z wstępu – 28 stron, założeń, celu i metodyki pracy – 26 stron, wyników – 10 stron, dyskusji – 9 stron oraz wniosków – 2 strony. Zwraca uwagę pewna dysproporcja w stosunku do standardowo przyjętych schematów, spowodowana dość zwięzłą dyskusją stanowiącą jedynie 9 stron całej rozprawy. Praca przedstawiona przez Doktorantkę zawiera dodatkowo 9 rycin, 9 zdjęć oraz 3 tabele. Rozprawa poparta jest 179 pozycjami piśmiennictwa, uporządkowanych w kolejności alfabetycznej.

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, CNTF tłumaczy się prawidłowo jako rzęskowy czynnik neurotroficzny, NGF jako czynnik wzrostu nerwu, OCT jako optyczną koherentną tomografię, PACG jako jaskrę pierwotną zamkniętego kąta. Streszczenie polskie i angielskie, w syntetyczny sposób przedstawiają zarys dysertacji i stanowią dobrze dopracowane wprowadzenie w temat, jednak tłumaczenie polsko-angielskie nie jest do końca precyzyjne, np. w wersji polskiej użyty model jaskry nazwany jest beleczkowym, w wersji angielskiej przedbeleczkowym, który to termin jest prawidłowym, ponieważ podawane do komory przedniej polistyrenowe mikrosfery powodują obturację kąta przesączania, nie wpływając na beleczkowanie samo w sobie.

Wstęp dysertacji stanowi najbardziej rozbudowaną część rozprawy, omawiającą po kolei zagadnienia patomechanizmu jaskry, epidemiologii i podziału klinicznego jaskry, czynników ryzyka, obecnych metod leczenia farmakologicznego, chirurgicznego i laserowego, neuroprotekcji z uwzględnieniem citikoliny, neurotrofin oraz metod związanych z terapiami genowymi. Jako podsumowanie wstępu, Doktorantka przybliżyła metodologię stosowania wektorów wirusowych oraz ich użycia w okulistyce. W obrębie wstępu istnieje kilka fragmentów wymagających komentarza i uściślenia. Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe obecnie uznaje się jako główny czynnik ryzyka rozwoju neuropatii jaskrowej, nie jako jej bezpośredni czynnik sprawczy. Przenoszenie uszkodzenia z jednego neuronu na drugi nosi nazwę wtórnej degeneracji i zachodzi z udziałem synaps elektrycznych, zwanych inaczej połączeniami szczelinowatymi. W podsumowaniu części ogólnej wstępu Doktorantka stwierdza, iż w chwili obecnej brak jest skutecznych metod neuroprotekcji, jednak istnieje wiele badań klinicznych w tym zakresie. W tym miejscu, jako iż jest to praca eksperymentalna, dotycząca neuroprotekcji, niejako brakuje opisu tych terapii, choćby z wykorzystaniem CNTF, w formie implantu Renexus, która ma udowodnione działanie neuroprotektoryjne w przebiegu jaskry. Informacjom przedstawionym we wstępie brakuje nieco nowatorskiego podejścia, szczególnie w obliczu dynamicznego

rozwoju dziedziny jaką jest okulistyka eksperymentalna i badania translacyjne. W podrozdziale dotyczącym epidemiologii jaskry użyte piśmiennictwo jest dość nieaktualne i bazuje na pozycjach z końca lat 90-tych ubiegłego wieku. W podrozdziale dotyczącym czynników ryzyka rozwoju jaskry, Doktorantka opisuje zależność pomiędzy neuropatią jaskrową, a chorobą Alzheimera i chorobą Parkinsona. Cytowane pozycje nie wyczerpują tego zagadnienia w sposób satysfakcjonujący, szczególnie biorąc pod uwagę, że modulatory amyloidu beta (np. GAL-101) w chwili obecnej stosowane są już z sukcesem w badaniach klinicznych do neuroprotekcji w jaskrze. W podsumowaniu, Doktorantka stwierdza iż „...ostateczną i bezpośrednią przyczyną utraty wzroku we wszystkich rodzajach jaskry jest śmierć komórek zwojowych i ich aksonów. Dochodzi do niej na drodze mechanicznego uszkodzenia komórek zwojowych pod wpływem wysokiego ciśnienia w gałce ocznej. Alternatywnie, w przebiegu jaskry normalnego ciśnienia, zaburzenia gradientu ciśnień po obu stronach blaszki sitowej mogą również prowadzić do barotraumatycznego uszkodzenia nerwu wzrokowego, zmian niedokrwiennych w obrębie nerwu wzrokowego i zaburzeń w transporcie neurotrofin...”, co niejako przeczy obecnej wiedzy na temat jaskry. Przedstawione przez Doktorantkę stwierdzenie opisuje jedynie teorie patomechanizmu jaskry, natomiast molekularny patomechanizm tak naprawdę jest wciąż nieznanym. Doktorantka nie bierze pod uwagę np. zagadnienia nadciśnienia ocznego, gdzie podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, mimo obecności barotraumy, nie powoduje uszkodzenia komórek zwojowych siatkówki. W podrozdziale „Obecne Metody Leczenia”, Doktorantka w sposób wyczerpujący opisuje zagadnienie terapii jaskry. W opisie leków bimatoprost został przedstawiony jako analog prostaglandyn, gdzie w rzeczywistości jest prostamidem. W kilku miejscach w dysertacji Doktorantka stosuje potoczne określenia typu „ciśnienie w oku”, które powinny zostać zastąpione profesjonalną terminologią, np. ciśnienie wewnątrzgałkowe. Zastosowane przez Autorkę stwierdzenie „leki obniżające ciśnienie wewnątrzgałkowe u pacjentów z jaskrą wywołują swój neuroprotektoryjny efekt poprzez ochronę aksonów komórek zwojowych przed barotraumatycznym uszkodzeniem” jest bardzo dużym uproszczeniem. Jak wiemy, szereg leków p/jaskrowych działa na drodze receptorowej, bezpośrednio oddziałując na szlaki apoptotyczne w komórkach zwojowych, np. brimonidyna, analogi prostaglandyn, co jest efektem niezależnym od wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego. W opisie metod chirurgicznych Doktorantka powołuje się na mikrostent CyPass, który został wycofany z użycia klinicznego ze względów bezpieczeństwa. Metoda TSCP wykorzystuje koagulację, nie ablację ciała rzęskowego. Rozdział dotyczący neuroprotekcji w jaskrze nie przedstawia aktualnych trendów rozwoju tego zagadnienia, rozdział ten powinien przedstawiać zagadnienie w sposób bardziej szczegółowy zważywszy, iż przedstawiona dysertacja dotyczy metod neuroprotekcji w jaskrze. Doktorantka stwierdza, iż żadne z długoterminowych badań nie potwierdza skuteczności żadnego z czynników neuroprotektoryjnych, co jest nieaktualną wiedzą. Co prawda żaden z czynników o potwierdzonej skuteczności nie znajduje się jeszcze w powszechnym użyciu klinicznym w jaskrze, jednak istnieje wiele

testowanych z sukcesem w trialach klinicznych. Podrozdział dotyczący neurotrofin w sposób przejrzysty i wyczerpujący opisuje rolę tej rodziny białek w patogenezie neuropatii i jest niewątpliwie mocną stroną pracy. Podobnie opis technik terapii genowych i ich zastosowania w okulistyce. Pewien niedosyt budzi tu jedynie ograniczenie opisu stosowanych terapii genowych do wrodzonej ślepoty Lebera. Obecnie ta dziedzina okulistyki jest szerzej rozwinięta, a terapia genowa stosowana jest również w leczeniu choroideremii, określonych postaci zwyrodnienia barwnikowego siatkówki i monochromatyzmu czopkowego, a najnowszym osiągnięciem medycyny w tym zakresie jest komercyjnie dostępny produkt o nazwie Luxturna. Podsumowując, wstęp dysertacji w sposób obszerny wprowadza czytelnika w temat dysertacji i pomimo pewnych uchybień i braków należy pozytywnie ocenić szeroki sposób przedstawienia problemu przez Kandydatkę.

Założenia i cele dysertacji przedstawione są w jasny i logiczny sposób. Doktorantka stawia 5 głównych celów badawczych. Założone cele znajdują odzwierciedlenie w przedstawionych wynikach. Doktorantka konkretnie określiła cel swoich badań i przyjęła słuszne hipotezy badawcze.

Rozdział „Materiały i Metodologia Badań” przedstawia w szczegółowy sposób zastosowane metody badawcze. Badania przeprowadzone zostały na szczurach Wistar po uzyskaniu stosownej zgody komisji etycznej. W swojej pracy Doktorantka podzieliła zwierzęta na 3 grupy – grupę zwierząt zdrowych ($n=9$), grupę zwierząt z wywołaną jaskrą ($n=14$) oraz grupę zwierząt z wywołaną jaskrą oraz iniekcją AAV-hBDNF ($n=13$). Analizując metodologię dysertacji, można zidentyfikować dwa podstawowe problemy, brak właściwej grupy kontrolnej oraz zastosowanie konstruktów DNA niezgodnego gatunkowo. Analizując problem grupy kontrolnej, Doktorantka badała zwierzęta zdrowe, zwierzęta z indukcją jaskry oraz zwierzęta z indukcją jaskry i leczeniem AAV-BDNF. Brak jest tu grupy z indukcją jaskry i iniekcją swoistego „placebo” (PBS, inaktywowany wirus, wirus bez genu), które stanowiłyby właściwą grupę kontrolną. Bez posiadania takiej grupy kontrolnej nie można jednoznacznie odpowiedzieć, czy uzyskany efekt jest spowodowany wprowadzeniem genu dla BDNF, czy samą procedurą iniekcji. Wiadomym jest, iż iniekcja wewnątrzgałkowa u szczura może prowadzić do uwalniania krystalin soczewki oka, które same w sobie mogą powodować indukcję BDNF i bezpośrednio działać neuroprotekccyjnie. Brakuje również dowodu na skuteczność transdukcji wirusowej. Zdrowe zwierzę z podanym konstruktem DNA i oznaczeniem zawartości BDNF byłoby wystarczającym dowodem, którego jednak brakuje w dysertacji. Doktorantka nie uzasadnia wyboru ludzkiego genu dla BDNF w swojej pracy. Pomimo, iż gen ludzki i szczurzy dla BDNF cechują się dość dużą homologią, wybór ten powinien być dokładnie uzasadniony w dyskusji. Idąc dalej, zastosowanie ludzkiego genu u szczura rodzi pytanie, czy oznaczany poziom BDNF pochodzi z egzogenego genu, czy z genu własnego, który uległ indukcji na skutek urazu komórki, ponieważ wybrany przez doktorantkę kit ELISA jest specyficzny dla BDNF obu gatunków. Kolejnym pytaniem jest czy ludzki BDNF może wpływać na ekspresję szczurzego receptora TrkB? Przytoczone przeze mnie

aspekty, jeśli nie uwzględnione na etapie planowania pracy, powinny znaleźć omówienie w ramach dyskusji dysertacji. Wybrane przez Doktorantkę metody analizy siatkówek i analizy poziomu białka nie budzą większych zastrzeżeń, poza specyficznością wspomnianego testu ELISA. Interesującym pomysłem, który zasługuje na podkreślenie jest liczenie komórek zwojowych siatkówki z podziałem na centralną i obwodową część, co w obliczu różnic rozmieszczenia komórek uwiarygadnia wyniki. Również zastosowanie perfuzji zwierząt buforem z heparyną przed pobraniem próbek do analizy białka jest ciekawym pomysłem, który dzięki eliminacji białek krwi, daje możliwość precyzyjniejszego oznaczenia stężenia białka związanego z komórkową komponentą siatkówek. Zastosowanie *quenchingu* glicyną uwiarygadnia barwienie immunofluorescencyjne. Wszystko to świadczy o dobrej znajomości metod laboratoryjnych przez Doktorantkę. Niewielki niedosyt budzi znikomy materiał z barwienia immunohistochemicznego, ograniczający się jedynie do markera komórek zwojowych – Brn3a. Opis pozostałych metod badawczych – indukcja jaskry, pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego, iniekcji doszkliskowej, perfuzji transkardialnej oraz przygotowania próbek i liczenia komórek zwojowych siatkówki nie budzi zastrzeżeń i wykonane zostały na wysokim poziomie. W opisie transdukcji brakuje informacji o liczbie kopii wirusa podanej na oko szczura, co byłoby zgodne z przyjętymi zasadami opisu dawki w terapiach genowych. W tekście dysertacji terminy transdukcja i transfekcja używane są zamiennie, mimo iż oznaczają różne techniki dostarczania genu do komórki.

Analiza statystyczna i wybrane testy statystyczne są właściwe i nie budzą wątpliwości. Na pozytywne podkreślenie zasługuje wykorzystanie testów *posthoc*, o których bardzo często zapomina się przy grupach z wielokrotnymi powtórzeniami. W rozdziale „Wyniki” Doktorantka dokumentuje poszczególne składowe analiz w formie tekstowej, tabel i rycin. Zastosowany model eksperymentalny jaskry zapewniał stabilny wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego przez 6 tygodni obserwacji, a wartości ciśnień nie różniły się statystycznie po doszkliskowym podaniu wirusa. W przebiegu wyindukowanego nadciśnienia ocznego Doktorantka zaobserwowała utratę komórek zwojowych siatkówki zarówno w centrum jak i na obwodzie siatkówki, co udokumentowane również zostało w postaci odpowiedniego barwienia immunohistochemicznego. Opisuując wyniki liczenia komórek zwojowych siatkówki Autorka posługuje się terminem liczba komórek, gdzie w rzeczywistości jest to ich gęstość. W przebiegu jaskry, utrata komórek zwojowych siatkówki wynosiła około 31% w centrum i 29% na obwodzie, co jest porównywalne z dostępnymi doniesieniami z literatury. Po zastosowaniu terapii BDNF utrata ta wynosiła 15% w centrum, utrata % na obwodzie nie została podana przez Autorkę. W rozdziale tym brakuje uwzględnienia grupy kontrolnej oraz walidacji transfekcji komórek zwojowych z wykorzystaniem AAV. W przedstawionych wynikach nie ma wystarczających dowodów, iż to transfekcja, a nie iniekcja doszkliskowa sama w sobie jest odpowiedzialna za wzrost BDNF. Postawioną przez Doktorantkę tezę ratuje przedstawienie korelacji pomiędzy poziomem

BDNF a liczbą komórek zwojowych, co jednak dowodzi jedynie efektu terapii, bez udowodnienia jej założonego mechanizmu. Doktorantka podsumowuje rozdział stwierdzeniem, iż nadekspresja BDNF „odwraca efekty jaskry”, co jest daleko idącą nadinterpretacją, ponieważ terapia w swoim założeniu jest neuroprotektoryjna, nie neuroregeneracyjna i zaaplikowana została przed indukcją uszkodzenia. Doktorantka opisuje, iż na obwodzie gęstość komórek zwojowych siatkówki pozostała praktycznie niezmienną, jednak poziom prawdopodobieństwa $p=0,038$ świadczy o istotnej różnicy. W kolejnych podrozdziałach Kandydatka opisuje wpływ podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz transfekcji AAV-BDNF na zawartość BDNF w homogenatach siatkówek i kory wzrokowej. Doktorantka uzyskała następujące wyniki: w przebiegu jaskry poziomy BDNF w obu oczach obniżały się do 70% wyjściowej wartości. Co ciekawe, poziomy BDNF w oku zdrowym pozostawał w silnej korelacji z tymi w oku z jaskrą, co stanowi bardzo interesujący aspekt pracy. Po zastosowaniu terapii genowej, poziomy BDNF wzrastał dwukrotnie w stosunku do zdrowych zwierząt. Podobnie jak w przypadku nieleczzonej jaskry, również i tutaj poziom BDNF w oku zdrowym wzrastał w sposób skorelowany z okiem leczonym. Poziomy BDNF w korze wzrokowej nie ulegał zmianie pod wpływem terapii genowej. Zmiany w poziomie BDNF skutkowały ujemną korelacją z stężeniem receptora TrkB w siatkówce w przypadku zwierząt nieleczonych. U zwierząt po transfekcji BDNF obserwowano pozytywną korelację, co może dowodzić, że zastosowany ludzki BDNF nie wykazuje sprzężenia zwrotnego z szczurzym receptorem, a co nie zostało uwzględnione w uzasadnieniu Doktorantki.

Rozprawa doktorska kończy się zwięzłą, 9-stronicową dyskusją, podsumowującą wyniki opisane w dysertacji, brak jest jednak nieco szerszego odniesienia uzyskanych wyników do danych literaturowych. Dyskusja rozpoczyna się odniesieniem do celu dysertacji „...zbadaniu mechanizmu rozwoju jaskry na drodze zaburzonej podaży czynnika neurotroficznego BDNF dla komórek zwojowych siatkówki...” co jest niezgodne z założonym celem na wstępie pracy. Doktorantka skupia się na zbadaniu efektu terapii AAV-BDNF, nie na badaniu patomechanizmu jaskry. W kolejnych akapitach Autorka opisuje szczegółowo walory szczurzego modelu jaskry przedbeleczkowej i szczegółowo charakteryzuje zmiany jaskrowe w uzyskanym modelu. Prawdłowo prowadzona dyskusja i konfrontacja z danymi literaturowymi udowadnia, iż Doktorantka dogłębnie zna i rozumie temat modeli eksperymentalnych jaskry. W części dyskusji dotyczącej ekspresji BDNF i receptora TrkB, Doktorantka stwierdza, iż podanie AAV-BDNF skutkowało obniżeniem ekspresji TrkB, co jest sprzeczne z przedstawionymi przez nią wynikami, gdzie w wynikach opisuje, iż podanie AAV-BDNF normalizuje obniżony poziom TrkB i wykazuje dodatnią korelację z poziomem BDNF, co znaczy, że wraz z wzrostem BDNF rośnie TrkB. W dyskusji brakuje odniesienia się do słabych stron pracy jakimi są zastosowanie wektora z ludzkim genem dla BDNF i możliwych implikacji dla projektu oraz brak właściwej grupy kontrolnej. Należałoby również umieścić w dyskusji możliwe inne przyczyny podwyższonego stężenia BDNF. Z uwagi na fakt, iż analizowane były homogenaty tkankowe – nie daje to odpowiedzi czy podwyższone BDNF w siatkówkach tożsame było z

podwyższeniem zawartości białka w komórkach zwojowych siatkówki, czy np. związane było z reaktywną glicją. Barwienia siatkówek w kierunku ekspresji BDNF i GFAP mogłoby rozwiązać te wątpliwości. Pomimo zwięzłości dyskusji i mimo pewnych uchybień, porusza ona kluczowe aspekty pracy i podsumowuje wyniki uzyskane przez Doktorantkę. Na podstawie przeprowadzonych badań, Doktorantka wyciągnęła 10 wniosków, które w większości odpowiadają na pytania postawione w założeniach pracy.

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. Niemniej, przedstawione wnioski poparte są interesującą, aczkolwiek zbyt syntetyczną dyskusją, zawierają też odpowiedzi na postawione sobie pytania badawcze. Praca jest wartościowym dorobkiem Doktorantki, a wyniki pracy zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie naukowym. Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Anny Wójcik-Gryciuk 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 Dyscyplin Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Anny Wójcik-Gryciuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
KATEDRA I ZAKŁAD PATOLOGII
40-032 Katowice, ul. Medyków 18
tel. 022 252 50 40 fax 022 252 60 77

Z poważaniem

Dr hab. n. med. Adrian Smęadowski