

Dr hab. n.med. Małgorzata Figurska

Warszawa 01.02.2021r.

Klinika Okulistyki Wojskowego Instytutu Medycznego

Centralny Szpital Kliniczny Ministerstwa Obrony Narodowej

04-141 Warszawa, ul. Szaserów 128

OCENA

rozprawy doktorskiej lekarz 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”**

Promotor: prof. dr hab.n.med. Piotr Skopiński

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Jaskrę – postępującą, przewlekłą chorobę, w świetle dotychczasowej wiedzy należy uznać za interdyscyplinarną patologię, z pogranicza co najmniej dwóch specjalizacji: okulistyki i neurologii. Patogeneza jaskry stanowi interesujące, złożone zagadnienie, podobnie jak terapia, która wciąż się rozwija i ulega modyfikacji. W praktyce najczęściej leczenie jaskry skupia się na obniżeniu ciśnienia śródgałkowego (baroterapia), jednak u wielu chorych jest to postępowanie niewystarczające.

Mechanizm śmierci komórek nerwowych i glejowych w przebiegu jaskry nie jest do końca poznany. Obok baroterapii, neuroprotekcja znajduje uzasadnienie, zwłaszcza w przypadkach przebiegających z ciśnieniem śródgałkowym niewykraczającym poza przyjętą normę.

Prowadzonych jest szereg badań klinicznych nad opracowaniem skutecznej metody neuroprotekcji na poziomie metabolizmu komórkowego, która sprawdziłaby się w praktyce. Od wielu lat badacze zwracają między innymi uwagę na wytwarzaną endogennie molekułę -

czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor). Rozwój nauk podstawowych i badania doświadczalne dają szansę na poznanie tego i innych czynników o działaniu neuroprotekcijnym. Z punktu widzenia poznawczego, ale też epidemiologicznego i terapeutycznego, podjęte w rozprawie zagadnienia są aktualne i mają ogromne znaczenie.

W badaniu doświadczalnym stanowiącym istotę rozprawy, Doktorantka podjęła się oceny mechanizmu rozwoju jaskry w warunkach zaburzonej podaży BDNF do komórek zwojowych siatkówki. Rozprawa zawiera w sobie potencjał pogłębienia wiedzy w zakresie mechanizmów rozwoju jaskry, co w przyszłości może zaowocować na gruncie klinicznym. Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2016/23/N/NZ7/ 02555 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M.Nebeckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest w języku polskim. Liczy 121 stron i składa się z rozdziałów: wstępu, założenia i celu pracy, materiału i metodologii badań, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa, spisu zdjęć, tabel. Doktorantka dokonała prawidłowego, czytelnego uporządkowania treści rozprawy. Wstęp został poprzedzony wykazem używanych skrótów, spisem rycin (9), streszczeniem w języku polskim i angielskim. Praca doktorska ilustrowana jest 9 fotografiami, 3 tabelami. Praca odwołuje się do ponad 170 właściwie dobranego i aktualnego piśmiennictwa.

We wstępie, Doktorantka w sposób syntetyczny wprowadziła w zagadnienie neurodegeneracji, stanowiącej istotę jaskry. Słusznie zaznaczyła, że neuropatia nerwu wzrokowego w przebiegu jaskry jest konsekwencją triady patologicznych składowych: utraty komórek zwojowych siatkówki, zmian w obrębie gleju i zaburzeń w krążeniu krwi w obrębie nerwu wzrokowego. Podkreśliła, że zmiany jaskrowe nie ograniczają się jedynie do gałki ocznej, ale obejmują całą drogę wzrokową i mają charakter transsynaptycznej lub transneuronalnej degeneracji. Omówiła epidemiologię i klasyfikację jaskry, czynniki ryzyka jej rozwoju, metody leczenia, założenia neuroprotekcji, wektory stosowane w terapii genowej.

Doktorantka za cel pracy postawiła zbadanie, czy po jednokrotnej transfekcji doszkliskowej AAV2-BDNF, poprzedzającej o 3 tygodnie indukcję jaskry, można uzyskać: długotrwałą nadprodukcję BDNF, regulację poziomu receptora TrkB i efekt terapeutyczny w postaci

zmniejszenia utraty komórek zwojowych. By odpowiedzieć na to pytanie, Doktorantka wyznaczyła następujące cele cząstkowe: (1) ocena patofizjologicznych zmian w przebiegu jaskry na poziomie siatkówki; (2) ocena modyfikacji mikrośrodowiska oka i jego zasobności w BDNF i receptor TrkB w warunkach podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego; (3) ocena skuteczności transfekcji AAV2-BDNF i wpływu zmienionej zasobności siatkówki w BDNF na receptor TrkB w siatkówkach i korze wzrokowej bez jaskry i po wywołaniu jaskry; (4) zbadanie efektywności wpływu podwyższonego poziomu BDNF na przeżywalność komórek zwojowych; (5) ocena wpływu jednostronnie indukowanej jaskry na stężenie BDNFu i receptora TrkB w siatkówce oka towarzyszącego.

W rozdziale *MATERIAŁ I METODOLOGIA*, Doktorantka omówiła protokół badania doświadczalnego przeprowadzono na 7-8 tygodniowych szczurach szczepu Wistar (3 grupy: natywna kontrola, n= 9; grupa I z jaskrą - jednostronna indukcja jaskry, n=14; oraz grupa II z jaskrą + AAV2 –BDNF - jednostronna indukcja jaskry poprzedzona podaniem doszkliskowym AAV2-BDNF, n=13), procedury eksperymentalne (wywołanie jaskry, monitorowanie ciśnienia wewnątrzgałkowego, transkardialną perfuzję zwierząt, barwienie immunohistochemiczne siatkówek, obliczanie liczby komórek zwojowych, badanie pilotażowe zasięgu transfekcji wybranego wektora AAV, doszkliskowe podanie wektorów z AAV z BDNF, analizę ilościową białka BDNF i receptora TrkB w tkance siatkówki i wzrokowej korze mózgowej – testy ELISA). Rozdział *MATERIAŁ I METODOLOGIA* świadczy, że praca została zaprojektowana przejrzysto i szczegółowo.

Rozdział *Wyniki*, w oparciu o analizę statystyczną, zawiera pozyskane w toku przeprowadzonego badania doświadczalnego dane w zakresie oceny modelu jaskry (model jaskry przedbeleczkowej z użyciem mikrogranulek polistyrenowych powoduje natychmiastowy wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego trwający kilka tygodni), patofizjologicznych zmian w siatkówce w przebiegu jaskry bez nadekspresji BDNF oraz z nadekspresją BDNF (nadekspresja BDNF zmniejsza utratę komórek zwojowych w siatkówce oka w przebiegu jaskry), poziomów białka BDNF i receptora TrkB w korze wzrokowej i siatkówkach (u szczurów z indukowaną jaskrą, nadekspresja BDNF w siatkówce zwiększa poziomy BDNF powyżej normalnych wartości w obrębie siatkówki, ale nie w korze wzrokowej; nadekspresja BDNF normalizuje poziomy receptor TrkB w siatkówce, nie mając wpływu

na poziom receptora TrkB w korze wzrokowej u szczurów z indukowaną jednostronnie jaskrą). Rozdział *Wyniki* zilustrowany jest czytelnymi rycinami i zdjęciami preparatów.

Dyskusja odwołuje się do wszystkich zagadnień podjętych w rozprawie. Doktorantka podzieliła ją na sekwencje dotyczące zwierzęcego modelu jaskry przedbeleczkowej, charakterystyki zmian jaskrowych, wpływu jaskry na poziom BDNF i receptora TrkB w siatkówce, korze wzrokowej, wpływu nadekspresji BDNF na przeżywalność neuronów w jaskrze oraz receptywność komórek siatkówki na neurotrofiny. Doktorantka trafnie zinterpretowała uzyskane w badaniu własnym wyniki i zestawiała je z właściwie dobranym piśmiennictwem. Rozdział *Dyskusja* zasługuje na wyróżnienie i świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie podjętego tematu.

We wnioskach Doktorantka stwierdziła, że model jaskry beleczkowej z użyciem mikrogranulek polistyrenowych powoduje szybki wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego, trwający kilka tygodni. Jednostronna indukcja jaskry powoduje istotną utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i na obwodzie oraz obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach. Jednostronna indukcja jaskry powoduje obustronny wzrost stężenia białka TrkB w siatkówkach wszystkich szczurów (stężenie 4- krotnie wyższe po stronie oka z jaskrą i 2- krotnie wyższe w siatkówkach oka towarzyszącego w porównaniu z grupą zwierząt natywnych). Nadekspresja BDNF po doszkliskowym podaniu wektora AAV2- BDNF u zwierząt z indukowaną jaskrą, powoduje znacznie mniejszą utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i pozwala na zahamowanie utraty komórek zwojowych znajdujących się na obwodzie siatkówki. Nadekspresja BDNF po doszkliskowym podaniu wektora AAV2- BDNF u zwierząt z indukowaną jaskrą, obustronnie zwiększa poziomy BDNF powyżej normalnych wartości w obrębie siatkówki, ale nie w korze wzrokowej. Nadekspresja BDNF po doszkliskowym podaniu wektora AAV2- BDNF normalizuje poziomy receptora TrkB w siatkówce, nie mając wpływu na poziom receptora TrkB w korze wzrokowej u szczurów z indukowaną jednostronnie jaskrą. W warunkach umiarkowanej nadekspresji BDNF w siatkówce, nie dochodzi do obniżenia stężenia receptora TrkB. Dysfunkcja w oku jaskrowym nie jest dysfunkcją izolowaną i wywołuje również zmiany w oku towarzyszącym, w którym nie indukowano jaskry. Jednostronna indukcja jaskry powoduje zmiany w ilości komórek zwojowych oraz stężeniach BDNF i TrkB w oku towarzyszącym, niepoddanym procedurom

zabiegowym. Pojedyncze, doszkliskowe podanie transgenu AAV-BDNF wydaje się być skuteczną metodą neuroprotekcji komórek zwojowych siatkówki.

Przedstawione przez Doktorantkę wnioski są trafne, szczegółowe, odpowiadają postawionym celom pracy. Zostały poparte wynikami analizy statystycznej. Stanowią podstawę do kontynuacji dalszych badań w zakresie podjętego tematu.

Podsumowując, rozprawa doktorska lekarz Anny Wójcik-Gryciuk, podejmuje aktualny temat neuroprotekcji i terapii genowej jaskry w warunkach doświadczalnych, co jest jej wyróżniającą wartością. Praca jest zaprojektowana w sposób przemyślany i ciekawy, a przyjęte cele zostały konsekwentnie zrealizowane. Ciekawe wyniki pracy mogą przyczynić się do rozwoju badań nad skutecznością i znaczeniem terapii genowej jaskry. Zaproponowany model laboratoryjny może zostać w przyszłości wykorzystany w badaniach nad innymi patologiami narządu wzroku. Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza jest bardzo dokładna i rzetelna. W całej pracy na szczególne wyróżnienie zasługują rozdziały *Materiał i Metodologia*, *Wyniki* i *Dyskusja* oraz dokumentacja fotograficzna.

Wysoko oceniam wykonaną przez Doktorantkę pracę badawczą. Wyniki projektu badawczego Doktorantki zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* w 2020 r. (Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells with AAV2-BDNF Pretreatment Restoring Normal TrkB Receptor Protein Levels in Glaucoma. Authors: Anna Wójcik-Gryciuk, Olga Gajewska-Woźniak, Katarzyna Kordecka, Paweł M. Boguszewski, Wioletta Waleszczyk, Małgorzata Skup), Impact Factor 4.556. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018r. poz.1668).

Wobec powyższego, przedstawiam Radzie Naukowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarz Anny Wójcik-Gryciuk, do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, odwołując się do szczególnej wartości pracy, wnoszę o przyznanie jej wyróżnienia.


Dr hab.n.med. Małgorzata Figurska