

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej *na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne***

**lek. med. Anny Wójcik – Gryciuk**

### **NEUROPROTEKCJA KOMÓREK ZWOJOWYCH SIATKÓWKI W JASKRZE EKSPERYMENTALNEJ ORAZ REGULACJA POZIOMÓW BDNF I RECEPTORA TrkB W SIATKÓWCE I KORZE WZROKOWEJ PO TRANSFEKCJI AAV2-BDNF**

Jaskra jest progresywną neuropatią wzrokową, charakteryzującą się postępującą apoptozą komórek zwojowych siatkówki. Jest ona jedną z głównych przyczyn nieodwracalnej ślepoty na świecie. Szacuje się, że w chwili obecnej na świecie choruje na nią ok 70mln ludzi. Nieleczona prowadzi do nieodwracalnej utraty widzenia. Wiek jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju jaskry, a zatem w związku z gwałtownym starzeniem się populacji ludzkiej, częstość zachorowań na jaskrę stale rośnie. Choroba ta to nie tylko osobista tragedia dla indywidualnego chorego, ale również duże obciążenie społeczne dla systemów opieki zdrowotnej wszystkich krajów na świecie.

Śmierć komórek zwojowych w jaskrze jest spowodowana uszkodzeniem neuronu przez niedotlenienie, działanie lokalnych mediatorów tkankowych (np. glutaminianu czy tlenku azotu) lub zaburzenia transportu aksoplazmatycznego. Wszystkie wymienione czynniki sprawcze apoptozy

mogą być prowokowane przez zaburzenia perfuzji ocznej lub na drodze mechanicznej, np. presyjnej (podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe). Do prawidłowego funkcjonowania komórki zwojowej konieczne jest bowiem stałe dostarczanie do nich czynników wzrostu nerwów tzw. neurotrofin. Są to białka i peptydy regulujące rozwój układu nerwowego, zapobiegające apoptozie neuronów. Neurotrofiny są dostarczane do komórek zwojowych siatkówki z mózgu drogą przepływu aksoplazmatycznego wstecznego. Najważniejszy z nich do czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF). Stały transport neurotrofin jest konieczny do różnicowania się i rozwoju komórek zwojowych w okresie płodowym, zaś po urodzeniu warunkuje prawidłowe funkcjonowanie tych komórek. Ich brak prowadzi do apoptozy komórek zwojowych.

Celem rozprawy doktorskiej lek.med. Anny Wójcik-Gryciuk była ocena zmian patofizjologicznych tj. ocena stopnia utraty komórek zwojowych w oku z wywołaną jaskrą oraz weryfikacja hipotezy o zmianie stężenia BDNF i receptora TrkB w siatkówce obu oczu oraz korze wzrokowej tożstronnej i przeciwstronnej do oka z jaskrą. Badania miały również na celu ocenę skuteczności terapii genowej wywołującej nadekspresję BDNF z użyciem podanego doszklistkowo konstruktu genowego AAV2-BDNF. Chciano uzyskać odpowiedź na pytanie, czy nadekspresja BDNF może spowodować ochronę komórek zwojowych siatkówki w zwierzęcym modelu jaskry oraz jak zmiany ekspresji BDNF modyfikują poziom receptora TrkB.

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, które podzielono na 3 grupy: kontrolną, z indukowaną jaskrą oraz z indukowaną jaskrą poprzedzoną podaniem doszklistkowym iniekcji białka BDNF z użyciem wektora wirusowego AAV.

Badania podzielono na dwie części:

W pierwszej części mierzono stopień utraty komórek zwojowych w siatkówce szczurów w oku z wywołaną przez podanie do komory przedniej polistyrenowych granulek jaskrą, porównując ich

liczbę z liczbą komórek w oku kontrolnym tego samego zwierzęcia oraz siatkówkami grupy kontrolnej. Mierzono również poziom BDNF oraz zasobność receptora TrkB w siatkówce oraz korze wzrokowej po stronie z wywołaną jaskrą oraz po przeciwnej.

W drugiej części oceniono neuroprotekcyny wpływ podwyższonego poziomu BDNF w oku z wywołaną jaskrą, badając przeżywalność komórek zwojowych siatkówki po podaniu doszkliskowym iniekcji białka BDNF z użyciem wektora wirusowego AAV. Ponadto zbadano, czy zwiększony poziom BDNF wpływa na ekspresję receptora TrkB w tkance siatkówki i porównano go z ekspresją TrkB w korze mózgowej, aby scharakteryzować potencjalne zmiany adaptacyjne, modyfikujące receptywność komórek na BDNF.

Wyniki analizy statystycznej pokazały, że po sześciu tygodniach od indukcji jaskry w centralnej części siatkówce dochodziło do zmniejszenia liczby komórek zwojowych o 31% w porównaniu do oka towarzyszącego, nie poddanego procedurom zabiegowym tego samego zwierzęcia. U zwierząt, u których w oku z indukowaną jaskrą wywołana została nadekspresja BDNF, również dochodziło do spadku liczby komórek zwojowych w obszarze centralnym siatkówki, był on jednak znacznie mniejszy i kształtował się na poziomie 15%.

W obwodowych częściach siatkówki oka, po sześciu tygodniach od indukcji jaskry następowało zmniejszenie liczby komórek zwojowych o 29% w porównaniu do oka towarzyszącego nie poddanego procedurom zabiegowym tego samego zwierzęcia. Wywołanie nadekspresji BDNF w tym samym oku zwierząt z II grupy doświadczalnej powodowało ochronę komórek zwojowych na obwodzie siatkówki. Liczba komórek zwojowych w obwodowych częściach siatkówek pozostawała niezmienną w porównaniu do oka towarzyszącego, nie poddanego procedurom zabiegowym u tego samego zwierzęcia.

Warto również podkreślić, że liczba komórek zwojowych w siatkówkach oczu towarzyszących nie różniła się u obu grup doświadczalnych zwierząt, ale była ona mniejsza od liczby komórek zwojowych siatkówek zwierząt kontrolnych o ok. 7%.

Przeprowadzone testy ELISA określające stężenia białka BDNF pokazały, że indukcja jednostronnej jaskry, powodowała obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach o około 30% w porównaniu do wartości uzyskanych od zwierząt natywnych. Ponadto, obniżone poziomy BDNFu w siatkówkach OP i OL były silnie skorelowane co wskazuje, że dysfunkcja w oku jaskrowym nie jest dysfunkcją izolowaną i wywołuje również zmiany w oku towarzyszącym.

Iniekcja doszklistkowa BDNF skutkowała znaczącym, obustronnym wzrostem poziomów stężeń BDNF w siatkówkach. Stężenia te były ponad dwukrotnie wyższe niż u zwierząt kontrolnych i trzykrotnie wyższe niż u szczurów z indukowaną jaskrą, którym nie podawano BDNF. Stężenia BDNF w siatkówkach oka prawego i lewego były ze sobą skorelowane, co ponownie sugeruje możliwość transportu czynnika BDNF z oka prawego z indukowaną jaskrą do oka towarzyszącego. Iniekcja BDNF nie miała istotnego statystycznie wpływu na wartości stężeń BDNF w korze mózgowej.

6 tygodni po indukcji jednostronnej jaskry u zwierząt, zaobserwowano obustronny wzrost stężenia białka TrkB w siatkówkach wszystkich szczurów. Stężenie to było 4- krotnie wyższe po stronie oka z jaskrą i 2- krotnie wyższe w siatkówkach oka towarzyszącego w porównaniu z grupą zwierząt natywnych. Poziomy białka TrkB w siatkówkach oka prawego i lewego były słabo skorelowane co wskazuje na możliwość pojawiania się procesów adaptacyjnych zwiększających miejscowo syntezę TrkB.

Doszklistkowa iniekcja BDNF, powodowała obustronną normalizację poziomów TrkB w siatkówkach obu oczu. Stężenia TrkB w siatkówce oka lewego i prawego były silnie skorelowane co wskazuje na silną odpowiedź w warunkach zwiększonej podaży BDNF.

W mózgowej korze wzrokowej nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniach receptora TrkB ani w grupie z jednostronną jaskrą, ani w grupie zwierząt, którym przed indukcją jaskry podano BDNF.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Model jaskry beleczkowej z użyciem mikrogranulek polistyrenowych powoduje szybki wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego trwający kilka tygodni.
2. Jednostronna indukcja jaskry powoduje istotną utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i na obwodzie.
3. Jednostronna indukcja jaskry powoduje obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach.
4. Jednostronna indukcja jaskry powoduje obustronny wzrost stężenia białka TrkB w siatkówkach wszystkich szczurów. Stężenie to było 4- krotnie wyższe po stronie oka z jaskrą i 2- krotnie wyższe w siatkówkach oka towarzyszącego w porównaniu z grupą zwierząt natywnych.
5. Nadekspresja BDNF po doszklistkowym 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.
6. Nadekspresja BDNF po doszklistkowym podaniu wektora AAV2- BDNF u zwierząt z indukowaną jaskrą, obustronnie zwiększa poziomy BDNF powyżej normalnych wartości w obrębie siatkówki, ale nie w korze wzrokowej.

7. 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.
8. W warunkach umiarkowanej nadekspresji BDNF w siatkówce, nie dochodzi do obniżenia stężenia receptora TrkB.
9. 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.
10. Pojedyncze, doszkliskowe podanie transgenu AAV-BDNF wydaje się być skuteczną metodą neuroprotekcji komórek zwojowych siatkówki.

Dr Anna Woźniak-Gryciuk podjęła w swojej pracy doktorskiej bardzo aktualny i ważny problem naukowy. Uważa się, że neurotrofiny, a szczególnie BDNF, odgrywają dużą rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek zwojowych i innych komórek nerwowych, zaś dysregulacja BDNF odgrywa dużą rolę w patogenezie wielu schorzeń neurodegeneracyjnych. Wyniki badań doświadczalnych wykazały, że zastosowanie BDNF może całkowicie zmienić leczenie tych chorób. Problemem jest natomiast krótki czas działania tej neurotrofiny i konieczność częstego jej podawania do miejsca gdzie znajdują się zmienione chorobowo komórki nerwowe, aby osiągnąć długotrwałą neuroprotekcję, co nie jest obecnie możliwe klinicznie.

Praca doktorska lek.med. Anny Woźniak-Gryciuk jest napisana bardzo przejrzysto. We wstępie doktorantka omówiła epidemiologię, patogenezę, leczenie jaskry oraz rolę neuroprotekcji w terapii

tego schorzenia, ze szczególnym uwzględnieniem neuroprotekcynowego działania neurotrofin (w tym BDNF) na komórki zwojowe siatkówki. Doktorantka omówiła również terapie genowe oraz stosowane w nich wektory wirusowe ze szczególnym uwzględnieniem chorób oczu. Wstęp został napisany zwięźle, ale równocześnie wyczerpująco, omawiając całe zagadnienie w oparciu o najnowsze dane z piśmiennictwa światowego. Ta część pracy świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia, któremu poświęcona jest praca doktorska, jak również piśmiennictwa w tym zakresie, także najnowszego.

Praca doktorska oparta jest na badaniach przeprowadzonych na szczurach. W badaniach tych wykorzystano najnowsze metody badawcze, zarówno wywoływania jaskry doświadczalnej jak i terapii genowej oraz oznaczania poziomu BDNF i receptora TrkB w siatkówce i korze mózgowej. Badania te wykonano w Pracowni Neurobiologii Widzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, w Warszawie, jednej z wiodących placówek naukowych w Polsce. Ta część pracy świadczy o świetnie opanowanym przez doktorantkę warsztacie naukowym na tak trudnym polu jak badania doświadczalne. W badaniach tych zastosowano najnowsze, na światowym poziomie, metody badawcze zarówno jeśli chodzi o stosowanie wektorów wirusowych sprzężonych z badanymi czynnikami jak i oznaczania ich poziomu w tkankach oka i mózgu.

Otrzymane wyniki zostały przejrzysto przedstawione i poddane właściwej analizie statystycznej. W pracy zwraca uwagę bardzo obszerna dyskusja, w której bardzo dokładnie i wyczerpująco omówiono uzyskane wyniki. Świadczy ona o głębokiej znajomości zagadnienia przez doktorantkę. Wyniki pracy zostały właściwie sformułowane we wnioskach. Praca zakończona jest obszernym (180 pozycji, głównie z ostatnich 10 lat) spisem piśmiennictwa, który przemawia również za bardzo dobrą znajomością całości zagadnienia przez doktorantkę.

Praca doktorska lek. med. Anny Woźniak-Gryciuk stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).

W związku z tym chciałbym przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. med. Anny Woźniak-Gryciuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnoszę o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej. Doktorantka podjęła bowiem bardzo ważny temat badawczy, którego praktyczne rozwiązanie może przyczynić się do całkowitej zmiany w leczeniu wielu schorzeń neurodegeneracyjnych, w tym jaskry. W piśmiennictwie światowym jest obecnie niewiele doniesień dotyczących tego zagadnienia. W pracy badania przeprowadzono na nowoczesnym modelu doświadczalnym jaskry. W badaniach tych wykorzystano najnowsze metody badawcze dotyczące terapii genowej, oznaczania poziomu BDNF jak i receptora TrkB w siatkówce i korze mózgowej oraz znakowania i obliczania komórek zwojowych siatkówki .

Prof. dr n. med. Marek E. Prost

02901805  
Prof. dr. hab. med.  
**MAREK PROST**  
specjalista chorób oczu

Klinika Okulistyczna

Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie