

Prof. dr hab. n. med. Grażyna Malukiewicz  
Katedra i Klinika Chorób Oczu  
Collegium Medicum w Bydgoszczy  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 24.05.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Agnieszki Skowry pt.:**  
**”Rola układu dopełniacza w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem”**

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD) jest chorobą, której istotą jest postępująca degeneracja i atrofia komórek nabłonka barwnikowego siatkówki prowadząca do nieodwracalnego uszkodzenia fotoreceptorów i w efekcie postępującego pogorszenia widzenia centralnego. Stanowi to nie tylko problem medyczny, ale też socjoekonomiczny, gdyż często dotyczy też osób w średnim wieku, aktywnych zawodowo. Postać wilgotna występuje w 10-15% przypadków, jednak ze względu na progresywny charakter prowadzi w około 80% do szybkiej i nieodwracalnej utraty widzenia centralnego. Patogeneza choroby nie jest w pełni wyjaśniona. Podnosi się znaczenie czynników genetycznych, immunologicznych, a także procesów zapalnych powiązanych z aktywacją układu dopełniacza, stresem oksydacyjnym i reakcjami fotochemicznymi na poziomie siatkówki. Wiadomo już, że to właśnie aktywacja układu dopełniacza powoduje uwolnienie mediatorów reakcji zapalnej i może prowadzić do procesów uszkadzających komórki, doprowadzając do ich śmierci. Układ dopełniacza może być aktywowany na poziomie siatkówki przez reakcje fotochemiczne w niej zachodzące oraz procesy stresu oksydacyjnego. Opisano też różne fotouczulacze, takie jak lipofuscyna, endogenną protoporfirynę IX oraz substancje egzogenne np. niektóre leki.

W dalszym ciągu nie jest do końca jasne, czy mimo potwierdzonego genetycznego podłoża choroby u pacjentów z AMD aktywacja układu dopełniacza ma charakter lokalny czy ogólnoustrojowy. Do chwili obecnej nie było też badań dotyczących interakcji pomiędzy egzogennymi czynnikami ryzyka AMD oraz czynnikami związanymi z występowaniem mutacji genowych i ich wpływem na układ dopełniacza.

Skąpe i rozbieżne wyniki opublikowanych badań oraz brak jednoznacznego stanowiska w tych kwestiach skłoniły lek. med. Agnieszkę Skowyrę nie tylko do zweryfikowania panujących opinii, ale także do poszerzenia wiedzy dotyczącej związku procesu aktywacji układu dopełniacza z AMD oraz określenia wpływu czynników egzogennych na występowanie tej choroby. W tym aspekcie należy przyjąć z uznaniem i zadowoleniem podjęcie się zbadania tak ważnego zagadnienia. Jest to szczególnie uzasadnione gdyż, jak podkreśla Doktorantka,

polimorfizm genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H) dotyczy 34-39% zdrowej populacji rasy kaukaskiej, co świadczy o tym, że same czynniki genetyczne to za mało aby doprowadzić do zachorowania na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem,

Cel pracy został sformułowany jasno i prosto. Była nim analiza roli układu dopełniacza w patogenezie AMD oraz ocena związanych z jego aktywacją endogennych oraz egzogennych czynników ryzyka tej choroby. Doktorantka podjęła próbę zbadania stopnia aktywacji układu dopełniacza u pacjentów z suchą i wysiękową postacią choroby, scharakteryzowania zarówno endogennych czynników ryzyka choroby, w tym występowania wariantów genowych genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H), jak i czynników egzogennych związanych z aktywacją układu dopełniacza. Postanowiła też przeanalizować związek pomiędzy badanymi czynnikami a występowaniem AMD.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa ma układ typowy, liczy 150 stron, 26 rycin i 48 tabel i 7 rozdziałów, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis ilustracji, tabel, wykaz skrótów oraz bibliografia i na końcu 6 załączników, w tym między innymi zgodę Komisji Bioetycznej, wzór informacji dla pacjenta, wykorzystanej ankiety oraz formularz badania przedmiotowego,

W 22. stronicowym wstępie rozprawy Autorka wprowadza nas w szczegóły tematu badań dokonując syntetycznego przeglądu wiedzy zarówno na temat epidemiologii AMD, czynników ryzyka z uwzględnieniem roli promieniowanie słoneczne, stresu oksydacyjnego, fototoksyczności, jak i roli układu dopełniacza w patogenezie tej choroby. Bardzo dokładnie opisane zostały także drogi i markery aktywacji układu dopełniacza, najważniejsze jego funkcje oraz procesy immunologiczne zachodzące w zdrowej gałce ocznej, a także warianty genowe mutacji genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H).

W rozdziale „Materiał i metody” Autorka szczegółowo przedstawiła metody doboru chorych, szczegóły dotyczące przeprowadzonych badań. Do grupy badanej zakwalifikowała łącznie 133 pacjentów, 90 ze zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem postacią suchą i wysiękową oraz 43 pacjentów bez AMD stanowiących grupę kontrolną. Zastosowane kryteria włączające i wyłączające chorych do grupy badanej zostały szczegółowo opisane i nie budzą wątpliwości. Z badania wykluczeni zostali chorzy ze stanami, które mogą wpływać na aktywację układu dopełniacza. Pacjentów podzielono na trzy grupy: z suchą postacią AMD, z wysiękową postacią choroby oraz grupę kontrolną. Dokonano też podziału według stopnia zaawansowania choroby według czterostopniowej skali oceny zaawansowania choroby – AREDS (ang. Age-Related Eye Disease Study). U wszystkich przeprowadzono badanie ankietowe, pełne badanie okulistyczne oraz oznaczenie fragmentów aktywacji układu

dopełniacza: iC3b, Bb, Sc5b-9. w surowicy krwi. Wykonano także genotypowanie polimorfizmu Y402H w genie dla czynnika H dopełniacza i określono warianty genowe występujące w badanej populacji. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej.

Wyniki Doktorantka przedstawiła w liczącym 45 stron rozdziale, zestawiała w 45. przejrzystych tabelach i 19. rycinach oraz szczegółowo opisała w treści. Ten rozdział stanowi z pewnością najbardziej wartościową część pracy. Autorka obszernie i szczegółowo zaprezentowała wyniki swojej analizy we wszystkich możliwych aspektach.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że znaczna część wyników osiągnęła bardzo wysoką istotność statystyczną ( $p < 0,001$ ), co podnosi ich wartość. Okazało się, że:

- u pacjentów z postacią wysiękową oraz suchą zaawansowaną AMD dochodzi do nadmiernej aktywacji układu dopełniacza,
- wariant C mutacji genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H) stanowi endogeny czynnik ryzyka, natomiast wariant T może zmniejszać ryzyko wystąpienia choroby,
- egzogennymi czynnikami ryzyka są palenie papierosów oraz zwiększona ekspozycja na światło słoneczne, głównie pacjentów z wariantem C mutacji genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H).

Uzyskane wyniki potwierdzają znaczącą rolę układu dopełniacza w patogenezie AMD w badanej grupie pacjentów. Autorka wykazała także, iż istnieje związek pomiędzy występowaniem choroby a kolorem tęczówki oraz pomiędzy procesem aktywacji układu dopełniacza, wariantami Y oraz T mutacji genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H) a zwyczajem noszenia przez pacjentów okularów z filtrem UV.

W rozdziale „dyskusja” Doktorantka dogłębnie i w sposób krytyczny omawia własne wyniki badań porównując je z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Poprawnie cytuje 261 prac, w większości anglojęzycznych z ostatnich lat. Podkreślić należy, że interpretację wyników Autorka przeprowadziła logicznie i interesująco, co dowodzi doskonale znajomości tematu i aktualnej literatury. Zwróciła uwagę, że stwierdzone istotnie wyższe stężenia fragmentów układu dopełniacza Bb, iC3b oraz Sc5b-9 występuje nie tylko u wszystkich chorych wysiękową postacią AMD, ale też u pacjentów z zanikiem geograficznym. Jest to bardzo istotne biorąc pod uwagę, że do chwili obecnej nie ma skutecznego leczenia zaniku geograficznego, a w fazie badań klinicznych jest zastosowanie leków hamujących układ dopełniacza.

Podkreślenia wymaga fakt, że Doktorantka podjęła też próbę określenia etapu choroby, w którym dochodzi do nadmiernej aktywacji układu dopełniacza. Stwierdziła występowanie

istotnie wyższego stężenia fragmentu iC3b w grupie z wczesnym stadium AMD. Jak podkreśla Autorka, świadczyć to może o tym, że układ dopełniacza jest aktywowany już na początkowym etapie choroby, a nadmierna jego aktywacja stymuluje przejście choroby w jej bardziej zaawansowane stadia.

Doktorantka bardzo słusznie zauważa też, że aktywacja dopełniacza może być czynnikiem łączącym zwyrodnienie plamki związane wiekiem z nadciśnieniem tętniczym oraz chorobami sercowo-naczyniowymi, z pozoru bardzo różnymi jednostkami chorobowymi. Potwierdzeniem tego faktu jest wykazane w pracy doktorskiej podwyższone stężenie właśnie fragmentu iC3b w surowicy krwi u pacjentów z AMD. Fragment ten pochodzi z rozpadu białka C3, związanego także z wyższym ryzykiem nadciśnienia tętniczego, zawału serca i udaru. Powiązanie tych stanów chorobowych jest kolejnym ważnym argumentem wskazującym, że aktywacja układu dopełniacza u pacjentów z AMD nie jest zjawiskiem o charakterze lokalnym, ale dotyczy całego organizmu. W mechanizmie powstawania AMD może dochodzić do nałożenia się czynników ryzyka związanych z regulacją aktywacji tego układu.

Interpretując wyniki badań Autorka słusznie zwraca uwagę na to, że trudno jest uzyskać precyzyjne dane dotyczące na przykład ekspozycji na światło słoneczne i podkreśla potrzebę rozważania wielu dodatkowych czynników.

Biorąc pod uwagę, że brak jest badań, w których analizowane byłoby narażenie na substancje egzogenne aktywujące układ dopełniacza u pacjentów z AMD lek. Agnieszka Skowryra podjęła próbę oceny, czy u pacjentów z AMD doszło do aktywacji po zażyciu leków fototoksycznych. Niestety, ze względu na zbyt małą liczbę otrzymanych danych, nie uzyskała odpowiedzi na to pytanie.

W rozdziale 6. Doktorantka przedstawia trzy główne i dwa dodatkowe wnioski, które są odpowiedzią na postawione cele badawcze.

Udało się Jej potwierdzić istotną rolę, jaką spełnia układ dopełniacza w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. Wyniki badań wykazały, że AMD najprawdopodobniej jest lokalną manifestacją ogólnoustrojowej patologii powodującej deregulację układu dopełniacza, a konkretne warianty mutacji genu dla czynnika H dopełniacza (Y402H) zwiększają ryzyko zachorowania na AMD często dopiero w połączeniu z dodatkowym czynnikiem zewnętrznym. Jest to niezwykle istotne, gdyż wiedza ta w przyszłości może być wykorzystana w diagnostyce tej choroby, a informacje uzyskane w pracy doktorskiej mogą mieć wkład w lepsze rozumienie jej patogenezy, skuteczniejsze poszukiwanie metod leczenia, jak również prewencji. Właśnie w tym kontekście podjęte badania są bardzo istotne nie tylko z naukowego, ale też z praktycznego punktu widzenia. Fakt, że nie ma wielu

informacji na ten temat dodatkowo podnosi ich znaczenie.

Nowatorski charakter pracy polega na szczegółowej analizie interakcji pomiędzy egzogennymi czynnikami ryzyka AMD a czynnikami związanymi z występowaniem mutacji genowych i ich wpływem na aktywację układu dopełniacza.

Należy pogratulować dobrego wyboru problemu badawczego i błyskotliwej interpretacji wyników. Niezwykle ważne jest, że Doktorantka zwróciła uwagę na konieczną ostrożność w wyciąganiu bezpośrednich wniosków z niektórych uzyskanych wyników. Przy wielu kwestiach Autorka ma wątpliwości, podkreśla wówczas potrzebę dalszych badań. Ta ostrożna postawa świadczy pozytywnie o Jej rzetelności w pracy badawczej.

Reasumując, całość przedstawionej mi do recenzji pracy lek. med. Agnieszki Skowry oceniam bardzo wysoko, a jej skonstruowanie świadczy, że potrafi Ona samodzielnie rozwiązać problem naukowy. Praca wzbogaca dotychczasową wiedzę na temat AMD. Wybór tematu, staranne przeprowadzenie badań, trafność obserwacji i umiejętność formułowania wniosków świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Zwraca też uwagę dobre opracowanie redakcyjne.

W związku z powyższym stwierdzam, iż rozprawa doktorska pt. "Rola układu dopełniacza w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem" spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.).

Mam zaszczyt zatem przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. med. Agnieszki Skowry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres wykonanej pracy, ambitną i przemyślaną metodologię badań oraz nowatorskie wartości poznawcze wnoszę o przyznanie wyróżnienia rozprawy.

  
KIEROWNIK  
Katedry Chorób Oczu  
prof. dr hab. Grażyna Malukiewicz