

Olsztyn, 04-09-2023

Prof. dr hab. Andrzej Pomianowski
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
w Olsztynie



Recenzja pracy doktorskiej
lek. wet. Marleny Wełniak-Kamińskiej nt. „Badania drogi wzrokowej u gryzoni laboratoryjnych metodami rezonansu magnetycznego *in vivo*”

Podstawą do sporządzenia recenzji była uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 4 lipca 2023 r. powołująca recenzentów rozprawy doktorskiej lek. wet. Marleny Wełniak-Kamińskiej nt. „Badania drogi wzrokowej u gryzoni laboratoryjnych metodami rezonansu magnetycznego *in vivo*”.

Utrata wzroku u osób starszych jest ważnym i wciąż narastającym problemem w opiece zdrowotnej. Do najczęstszych przyczyn utraty wzroku w wieku podeszłym należą: zaćma, jaskra, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem i retinopatia cukrzycowa. Choroby te niekiedy współistnieją. Jaskra (*glaucoma*) jest groźną, przewlekłą, postępującą chorobą oczu, prowadzącą do całkowitej destrukcji nerwu wzrokowego i nieodwracalnej utraty widzenia. Stanowi drugą pod względem częstości przyczynę ślepoty na świecie. W jaskrze dochodzi do selektywnej śmierci komórek zwojowych siatkówki (w tzw. mechanizmie apoptozy) oraz zaniku ich aksonów. Mechanizm jaskrowego uszkodzenia nerwu wzrokowego nie jest do końca poznany. W przebiegu choroby dochodzi do zmian zwyrodnieniowych również w dalszych odcinkach drogi wzrokowej. Do oceny tych zmian mogą służyć metody rezonansu magnetycznego zwłaszcza przy użyciu urządzeń wysokopolowych. Doskonałym modelem do przeprowadzenia tych badań są gryzonie laboratoryjne.

W nurt tych badań wpisuje się prezentowana dysertacja lek. wet. Marleny Wełniak-Kamińskiej. Temat pracy uważam za aktualny i uzasadniony zarówno dla nauki jak i praktyki klinicznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje 111 stron wydruku komputerowego, 38 rycin, 8 tabel oraz 294 pozycji piśmiennictwa i ma klasyczny układ na który składają się

wstęp, cele badań, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Dodatkowo dołączono streszczenie w języku polskim i angielski oraz wykaz skrótów.

Doktorantka zamieszcza także informację, że wyniki zaprezentowane w prezentowanej rozprawie zostały w części opublikowane w trzech następujących pracach oryginalnych:

Welniak-Kaminska M, Fiedorowicz M, Orzel J, Bogorodzki P, Modlinska K, Stryjek R, Chrzanowska A, Pisula W, Grieb P. Volumes of brain structures in captive wild-type and laboratory rats: 7T magnetic resonance in vivo automatic atlas-based study. PLoS One. 2019 Apr 11;14(4):e0215348. doi: 10.1371/journal.pone.0215348. PMID: 30973956; PMCID: PMC6459519.

Fiedorowicz M, Welniak-Kamińska M, Świątkiewicz M, Orzel J, Chorągiewicz T, Toro MD, Rejdak R, Bogorodzki P, Grieb P. Changes of Ocular Dimensions as a Marker of Disease Progression in a Murine Model of Pigmentary Glaucoma. Front Pharmacol. 2020 Sep 4;11:573238. doi: 10.3389/fphar.2020.573238. PMID: 33013417; PMCID: PMC7500411.

Fiedorowicz M, Orzel J, Kossowski B, Welniak-Kaminska M, Chorągiewicz T, Swiatkiewicz M, Rejdak R, Bogorodzki P, Grieb P. Anterograde Transport in Axons of the Retinal Ganglion Cells and its Relationship to the Intraocular Pressure during Aging in Mice with Hereditary Pigmentary Glaucoma. Curr Eye Res. 2018 Apr;43(4):539-546. doi: 10.1080/02713683.2017.1416147. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29283693.

W obszernym wstępie Autorka opisuje układ wzrokowy u myszy i szczurów, wpływ sztucznego doboru na zmysł wzroku i struktury mózgu u tych gryzoni, metody obrazowania *in vivo* w badaniach zwierząt laboratoryjnych oraz multiparametryczne techniki rezonansowe w badaniach układu wzrokowego u gryzoni laboratoryjnych. Doktorantka prezentuje aktualny stan wiedzy omawianych zagadnień wykazując się dużą znajomością tematu i piśmiennictwa z tego zakresu. Słusznie zauważa, iż spośród różnych metod obrazowania techniki rezonansowe są obecnie optymalną metodą badania drogi wzrokowej u gryzoni laboratoryjnych, przede wszystkim ze względu na dobry kontrast tkanek miękkich i wysoką rozdzielczość przestrzenną, a także brak konieczności stosowania szkodliwego promieniowania jonizującego. Uzasadnia to dobór metod użytych w prezentowanych badaniach, aby zrealizować założone cele.

Głównym celem było porównanie danych wolumetrycznych, funkcjonalnych i profili metabolicznych, dotyczących struktur drogi wzrokowej pomiędzy zwierzętami ze spontaniczną retinopatią i zwierzętami kontrolnymi, tj.: albinotycznymi laboratoryjnymi szczurami stada Wistar z dwoma grupami szczurów pigmentowanych: laboratoryjnymi szczurami szczepu Brown Norway oraz szczurami linii Warsaw Wild Captive Pisula-Stryjek (WWCPS) jak również rozwijającymi spontaniczną jaskrę myszami szczepu DBA/2J oraz myszami kontrolnymi ze szczepu C57Bl/6J. Celami dodatkowymi było scharakteryzowanie różnic powstałych w mózgu w wyniku udomowienia szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*), ze szczególnym uwzględnieniem struktur odpowiedzialnych za przetwarzanie bodźców zmysłu

wzroku i różnic morfometrycznych gałki ocznej, zachodzących podczas rozwoju jaskry u myszy szczepu DBA/2J.

Rozdział Materiał i metody zawiera informacje zwierząt zakwalifikowanych do badań oraz metodyki tych badań przedstawione w sposób szczegółowy i zrozumiały.

Obrazowaniu zostały poddane samce szczurów w wieku ok. 8.- 9. tygodni pochodzące z trzech linii:

1) Jako model degeneracji siatkówki zostały wykorzystane albinotyczne szczury laboratoryjne stada Wistar (WI nazwa skrócona - Cmd:WI(WU) pochodzące z hodowli prowadzonej z unikaniem pokrewieństwa, utrzymywanej w IMDiK PAN w Warszawie. Cmd:WI(WU) wywodzi się z hodowli WISTAR WU RAT o symbolu CrI:WI(WU) z Charles River Laboratories w Niemczech (n=8, 260-330g).

2) Jako model pigmentowanego szczura laboratoryjnego zostały wykorzystane szczury szczepu Brown Norway. Szczury BN/CrIcmd (BN), które pochodziły z własnej hodowli utrzymywanej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk (IMDiK PAN) w Warszawie. Szczur ten wywodzi się z hodowli o symbolu BN/CrI z Charles River Laboratories w Niemczech (n=8, 150-210g)

3). Jako model dzikiego szczura została wykorzystana laboratoryjna linia dzikiego szczura wędrownego *Rattus norvegicus*: Warsaw Wild Captive Pisula-Stryjek, WWCPs, utrzymywana w Instytucie Psychologii Polskiej Akademii Nauk. Hodowla wywodzi się od 5 par zarodowych odłowionych w okolicach Warszawy, pochodzących z oddzielnych populacji dzikich szczurów. W celu zapobiegania akumulacji cech udomowieniowych kolejne odłowione osobniki były stale wprowadzane do hodowli. Aby uniknąć wpływu stresu zwierząt w badaniu wykorzystano osobniki z pokolenia F2 –F3 (n=9, 110-203 g).

Obrazowaniu i pomiarowi ciśnienia wewnątrzgałkowego zostały również poddane samice myszy w wieku 3., 6., 9., 12. i 15. miesięcy pochodzące z dwóch szczepów:

1) DBA/2J/Cmd (DBA/2J i D2 – nazwy skrócone) stanowiące model przewlekłej jaskry u ludzi

2) C57BL/6J/Cmd (C57BL/6J i B6 – nazwy skrócone) myszy kontrolne nierozwijające spontanicznie jaskry.

Wszystkie myszy wykorzystane w badaniach pochodziły z hodowli i Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk (IMDiK PAN) w Warszawie. Szczepy te, zostały sprowadzone do IMDiK PAN z Jackson Laboratory w 2005 r.

Obrazowanie mózgow i gałki ocznej myszy i szczurów zostało wykonane za pomocą skanera BioSpec 70/30 Avance III (Bruker, Ettlingen, Niemcy), przeznaczonego do badań

przedklinicznych. Jest to aparat MRI/MRS o indukcji pola 7T, posiadający maksymalny gradient pola cewek gradientowych: 300mT/m oraz pasmo toru nadawczo-odbiorczego od 5 do 300,3 MHz, umożliwiające wykonywanie badań obrazowych oraz spektroskopii.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism (wersja 8.3.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.GraphPad.com). Normalność rozkładu analizowanych zmiennych badano testem Shapiro-Wilka. Przy porównywaniu różnic pomiędzy grupami, w przypadku rozkładu normalnego zmiennych zastosowano analizę wariancji ANOVA i test post hoc Sidaka (w przypadku grup myszy). Jeżeli rozkład nie był normalny zastosowano analizę wariancji rang Kruskala-Wallisa i test post hoc U Manna-Whitney'a lub test wielokrotnych porównań Dunna (w przypadku grup szczurów). Dla sprawdzenia, czy spełnione jest kryterium jednorodności wariancji w analizie ANOVA stosowano test Levene'a. Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniem standardowym (SD). Przyjęto poziom istotności statystycznej dla $p < 0,05$.

W pierwszym etapie badań wykonano obrazowanie anatomiczne (MRI) i spektroskopię protonową (H-MRS) u trzech grup szczurów. Modelem retinopatii był albinotyczny szczur stada Wistar (WI), często wykorzystywany w badaniach biomedycznych; brak ochronnego działania pigmentu w gałce ocznej prowadzi do postępującej degeneracji siatkówki. Modelami kontrolnymi były szczury pigmentowane, laboratoryjny szczur Brown Norway (BN), a także laboratoryjny model dzikiego szczura Warsaw Wild Captive Pisula-Stryjek (WWCPS). W badaniach wolumetrycznych wykorzystano cyfrowy atlas mózgu szczura i oprogramowanie umożliwiające zautomatyzowanie wolumetrii struktur. U szczurów WI stwierdzono mniejszą względną objętość kory wzrokowej oraz kompensacyjne powiększenie objętości niektórych ośrodków mózgu związanych z innymi zmysłami. Dodatkowo przeprowadzono ocenę zmian w mózgu powstałych w procesie udomowienia szczura. Okazało się, że w trakcie udomowienia szczura doszło do zmniejszenia objętości pewnych struktur związanych z przetwarzaniem wrażeń zmysłowych.

Mysim modelem dziedzicznej, zależnej od wieku degeneracji siatkówki były myszy szczepu DBA/2J obciążone mutacją powodującą uwalnianie barwnika z tęczówki, co prowadzi do rozwoju jaskry. Kontrolę stanowiły myszy szczepu C57Bl/6J. Nieinwazyjność metod rezonansowych umożliwiła monitorowanie rozwoju zmian patologicznych na różnych etapach jaskry.

Podobnie jak u albinotycznych szczurów WI, analiza wolumetryczna wykazała mniejszą względną objętość kory u myszy DBA/J2. Natomiast zastosowanie obrazowania wzmocnionego kontrastem manganowym (MEMRI) umożliwiło ocenę funkcjonalną struktur

drogi wzrokowej u myszy *in vivo*. U starszych myszy DBA/2J doszło do zmniejszenia aktywnego transportu aksonalnego manganu. Z kolei wyniki morfometrii gałki ocznej pozwoliły wysunąć sugestię, że dynamika zmian wymiarów struktur gałki ocznej może być wykorzystana jako marker rozwoju jaskry u myszy DBA/2J.

Badania metodą lokalizowanej spektroskopii z okolicy kory wzrokowej wykazały różnice w poziomach niektórych metabolitów (mio-inozytol, cholina, glutaminian i tauryna) w mózgu zwierząt z upośledzeniem widzenia co jak stwierdza Doktorantka mogło być konsekwencją zmian degeneracyjnych i reorganizacyjnych w korze wzrokowej, świadczących o dużym zaangażowaniu gleju w tych procesach.

Z obowiązku Recenzenta chciałbym zgłosić pewne zastrzeżenia głównie natury redakcyjnej, dotyczące przedstawionego do recenzji manuskryptu. Doktorantka zamieszcza informację, że wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały już w części opublikowane w trzech pracach oryginalnych. W mojej opinii powinny zostać dołączone stosowne oświadczenia współautorów o udziale i ich roli w przygotowaniu tych publikacji. Można byłoby również uwzględnić wartości bibliometryczne prac tj. współczynnik wpływu (IF) oraz punktację ministerialną. W pracy Autorka zamieszczone rysunki, fotografie, wykresy nazywa zbiorczo rysunkami, których jest w sumie 38. W tego typu opracowaniach lepiej aby ilustracje stanowiące objaśnienie i uzupełnienie tekstu publikacji nazywać rycinami. Podobnie rozdział „literatura” jako kalkę z języka angielskiego można zamienić na polskie „piśmiennictwo”. Ponadto przydałby się spis rycin i tabel, co umożliwiłoby czytelnikowi łatwiejsze poruszanie się w tym obszernym opracowaniu dysertacyjnym.

Niezależnie od tych niewielkich uwag o charakterze redakcyjnym, nie umniejszających wartości merytorycznej rozprawy, chciałbym podkreślić, że praca jest napisana starannie i w dobrym stylu.

Wnioski kończące prace stanowią oryginalne osiągnięcia Autorki. Zostały one sformułowane w sposób zwięzły i w pełni znajdują uzasadnienie merytoryczne w uzyskanych wynikach badań. Pierwsze trzy wnioski mają charakter ogólny i dotyczą zastosowania metod rezonansowych do obrazowania dróg wzrokowych u gryzoni laboratoryjnych. Doktorantka konkluduje, iż badanie metodą rezonansu magnetycznego z zastosowaniem skanera o wysokiej indukcji pola 7T umożliwia zobrazowanie wszystkich odcinków drogi wzrokowej u myszy i szczurów a wysokopolowy skaner 7T MRI/MRS umożliwia zastosowanie multiparametrycznych technik rezonansowych i wykonywanie wieloaspektowych badań neurobiologicznych z wykorzystaniem gryzoni laboratoryjnych. Ponadto zastosowanie metod rezonansowych, ze względu na małą inwazyjność, stanowi udoskonalenie w stosunku do

tradycyjnych metod i procedur badawczych oraz znacznie zmniejsza liczbę zwierząt wykorzystywanych w badaniu, co jest zgodne z zasadą „3R”.

Następna grupa czterech wniosków dotyczy wyników badań drogi wzrokowej u zwierząt doświadczalnych. Lek. wet Marlena Wełniak-Kamińska stwierdza, że:

- Różnice objętości struktur mózgu odpowiedzialnych za przetwarzanie wrażeń zmysłowych pomiędzy szczurami laboratoryjnymi, a szczurami dzikimi związane z albinizmem są większe niż różnice związane z udomowieniem.
- Zwierzęta rozwijające retinopatię wykazują również zmiany w podkorowych i korowych strukturach mózgu związanych ze zmysłem wzroku, co może być skutkiem aktywacji procesów kompensacyjnych w strukturach odpowiedzialnych za inne zmysły, które nie uległy uszkodzeniu.
- Zmiany w poziomach niektórych metabolitów (glutaminian, tauryna, mio-inozytol, cholina) w korze wzrokowej u zwierząt z retinopatią mogą być wskaźnikiem zmian degeneracyjnych i reorganizacyjnych przebiegających na skutek zmniejszenia ilości impulsów nerwowych pochodzących z siatkówki.
- Ze względu na zmiany patologiczne w gałce ocznej uniemożliwiające pomiar ciśnienia gałkowego u starszych myszy DBA/2J, zmiany wymiarów gałki ocznej, takie jak długość osiowa, głębokość komory przedniej i szerokość kąta tęczówkowo-rogowkowego, mogą być alternatywnymi markerami rozwoju jaskry.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona rozprawa została zaplanowana, wykonana i przedstawiona poprawnie. Ma dużą wartość poznawczą i rozszerza wiedzę dotyczącą struktury i funkcji układu wzrokowego.

Oceniana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

W związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki lek. wet. Marleny Wełniak-Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Andrzej Pomianowski



KIEROWNIK KATEDRY
CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ

prof. dr hab. Andrzej Pomianowski