

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu**

**Katedra Okulistyki i Klinika Okulistyczna**

**Robert Wasilewicz**

**OCENA OBECNOŚCI  $\alpha$ -AKTYNINY  
I AKTYNY MIĘŚNIÓWKI GŁADKIEJ  
W KOMÓRKACH BLASZKI SITOWATEJ  
TWARDÓWKI OCZU Z NEUROPATIĄ JASKROWĄ  
ZALEŻNĄ OD PODWYŻSZONEGO CIŚNIENIA  
WEWNĄTRZGAŁKOWEGO**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. med. Krystyna Pecold**

**Poznań 2013**



*Badania wykonano w Katedrze Okulistyki i Klinice Okulistycznej,  
a badania immunohistochemiczne zostały wykonane  
w Zakładzie Patologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.*

### **Autor wyraża gorące podziękowania**

#### **Pani Profesor Krystynie Pecold**

za cenne uwagi i pomoc w wyłonieniu koncepcji badań nad rolą białek kurczliwych komórek mięśniówki gładkiej blaszki sitowatej twardówki w patogenezie neuropatii jaskrowej.

#### **Panu Profesorowi Jarosławowi Kocięckiemu**

za umożliwienie dalszego rozwoju naukowego i zawodowego  
w dziedzinie neuropatii jaskrowej.

#### **Pani Profesor Elżbiecie Kaczmarek**

za pomoc w interpretacji i ocenie ilościowej wyników morfometrycznych.

#### **Panu Profesorowi Janowi Bręborowiczowi**

za umożliwienie przeprowadzenia badań immunohistochemicznych.

#### **Panu Doktorowi Pawłowi Kurzawie**

za pomoc w wykonaniu badań immunohistochemicznych oraz interpretację i ocenę histopatologiczną ich wyników.

## SPIS TREŚCI:

Spis skrótów .....	4
1. Wprowadzenie.....	5
2. Nerw wzrokowy – budowa anatomiczna.....	8
3. Neuropatia jaskrowa.....	12
3.1. Zarys patomechanizmu .....	12
3.2. Fizjologia produkcji i dróg przepływu cieczy wodnistej.....	14
3.3. Szczegółowa morfologia i patofizjologia nerwu wzrokowego w aspekcie patogenezy neuropatii jaskrowej.....	25
3.3.1. Wpływ podwyższonego IOP na tkankę łączną twardówki i jej blaszki sitowatej .....	25
3.3.2. Wpływ podwyższonego IOP na elementy komórkowe nerwu wzrokowego.....	29
3.3.3. Wpływ podwyższonego IOP na perfuzję nerwu wzrokowego .....	32
3.4. Właściwości biomechaniczne nerwu wzrokowego w przebiegu neuropatii jaskrowej.....	34
4. Kurczliwość w komórkach niemięśniowych – rola aktyny mięśniówki gładkiej i alfa-aktyny .....	40
5. Od wiedzy do pytań.....	45
6. Cel pracy .....	46
7. Metodyka badania .....	47
7.1. Grupy badania: kryteria kwalifikacji klinicznej.....	47
7.2. Kryteria kwalifikacji histologicznej .....	47
7.3. Opracowanie histologiczne materiału.....	48
7.4. Metodyka immunohistochemiczna.....	48
7.5. Metodyka oceny ilościowej preparatów .....	49
8. Wyniki .....	51
9. Dyskusja.....	66
9.1. Wstęp .....	66
9.2. Obecny stan wiedzy o patofizjologii neuropatii jaskrowej a wyniki badania.....	67
10. Wnioski.....	74
11. Podsumowanie – aspekty kliniczne .....	75
12. Streszczenie.....	82
13. Summary - Streszczenie w języku angielskim.....	86
14. Spis rycin.....	90
15. Spis tabel.....	95
16. Piśmiennictwo .....	96

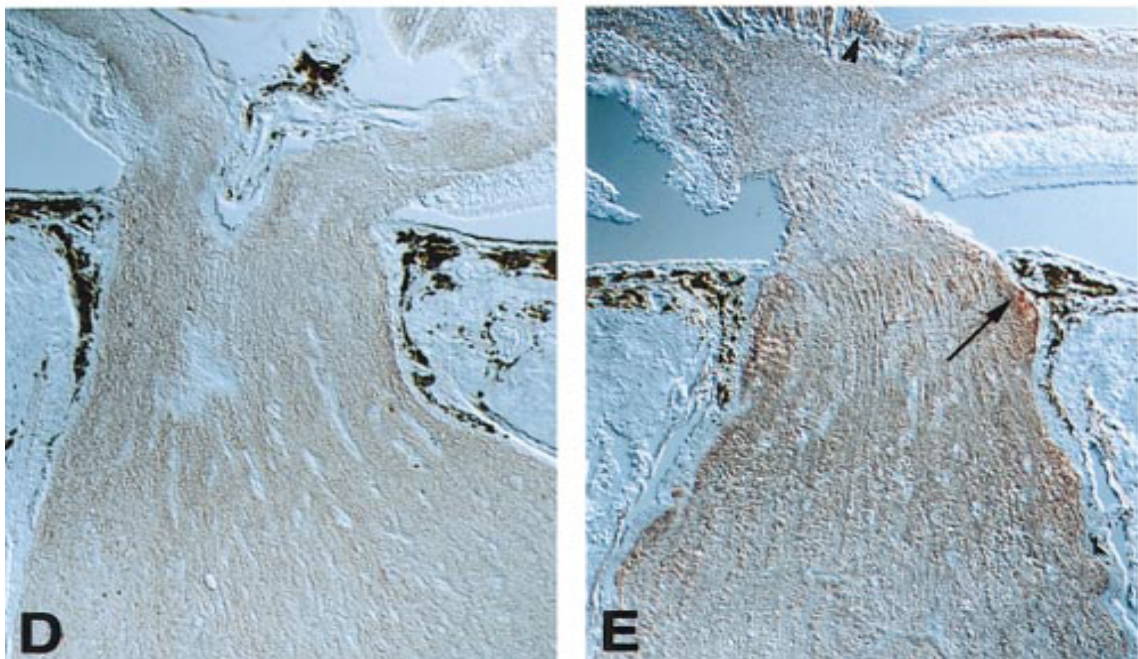
## SKRÓTY UŻYTE W TEKŚCIE:

- AGIS – Studium Interwencji w Zaawansowanej Jaskrze (*Advanced Glaucoma Intervention Study*).
- ADP – adenodwufosforan.
- ATP – adenotrójfosforan.
- AV – średnia (*avarage*).
- cAMP – cykliczne AMP.
- CNTGS – Studium Jaskry Normalnego Ciśnienia (*Collaborative Normal Tension Glaucoma Study*).
- EGPS – Studium Prewencji Wczesnej Jaskry (*Early Glaucoma Prevention Study*).
- EMGTT – Studium Terapii Wczesnych Stadiów Jaskry (*Early Manifest Glaucoma Treatment Trial*).
- GFAP – cząsteczka adhezji komórek glejowych (*glial fibrillary acidic protein*).
- HD – wysoka rozdzielczość (*high definity*).
- IOP – ciśnienie wewnątrzgałkowe (*intraocular pressure*).
- NCAM – cząsteczka adhezji komórek nerwowych (*neural cell adhesion molekule*).
- NTG – jaskra normalnego ciśnienia (*normal tension glaucoma*).
- OCT – optyczna koherentna tomografia (*optical coherent tomography*).
- OHTS – Studium Terapii Nadciśnienia Ocznego (*Ocular Hypertension Treatment Study*).
- OPA – oczna amplituda pulsacyjna (*ocular pulse amplitude*).
- SMA – aktyna mięśniówki gładkiej (*smooth muscle actin*).
- STDEV – odchylenie standardowe (*standard deviation*)

## 1. WPROWADZENIE

Jaskra to postępująca neuropatia nerwu wzrokowego związana z:

- a) przyśpieszonym procesem apoptozy, czyli programowanej śmierci komórek zwojowych siatkówki na skutek deprywacji neurotroficznej (Ryc. 1) [Band L.R., 2009(8); Balaratnasingam C., 2008(6); Fechtner R.D., Weinreb R.N., 1994(30); Garcia-Valenzuela E. i wsp., 1995(32); Quigley H.A., 1995a(76); Quigley H.A. i wsp., 1976(71), 1995(77), 2000(79); Yablonski M., Asamoto A., 1993(104)] oraz
- b) patognomicznymi zmianami fenotypu blaszki sitowatej twardówki [Ernest J.T. i Potts A.M., 1968(29); Quigley H.A. i wsp., 1983(74); Roberts M.D. i wsp., 2009(83)].



Ryc. 1.

Po lewej (D): kontrolna tkanka nerwu wzrokowego – pozytywna reakcja immunohistochemiczna wskazująca na obecność czynnika neurotroficznego obecna w siatkówce, obszarze przedblaszkowym, blaszkowym oraz pozablaszkowym nerwu wzrokowego (kolor brązowy).

Po prawej (E): neuropatia jaskrowa – zahamowanie wstecznego transportu czynnika neurotroficznego na poziomie blaszki sitowatej twardówki, brak obecności czynnika neurotroficznego w części przedblaszkowej nerwu wzrokowego oraz w siatkówce.

Źródło: Quigley H.A. i wsp.. 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3460-3466.

Utrata komórek zwojowych siatkówki prowadzi do przerwania czynnościowej ciągłości drogi wzrokowej, w następstwie czego dochodzi do rozwoju specyficznych, zależnych od architektury siatkówki i nerwu wzrokowego, ubytków w polu widzenia. Pojawiają się one klinicznie w momencie utraty co najmniej 30 do 50% komórek zwojowych danego obszaru siatkówki. W populacji osób zdrowych programowane tempo utraty komórek zwojowych siatkówki wynosi około 5-10 tysięcy komórek na rok [Balazsi A.G., 1984(7); Repka M.X., 1989 (82)].

Wszystkie formy neuropatii jaskrowej klasyfikowane są na pierwotne i wtórne na podstawie:

- gonioskopowego obrazu kąta przesączania
- biomikroskopowego obrazu odcinka przedniego i tylnego gałki ocznej
- obrazu tarczy nerwu wzrokowego
- charakteru ubytków pola widzenia

Podział terminologiczny grup neuropatii jaskrowej według Europejskiego Towarzystwa Jaskrowego przedstawia się w następujący sposób [ EGS, 2008(110)]:

## **1 Jaskra – Formy Pierwotne, Wrodzone**

1.1 Jaskra Pierwotna Wrodzona ( Jaskra Dziecięca)

1.2 Jaskra Wrodzona Związana z Anomaliami Rozwojowymi

## **2 Jaskra Pierwotna Otwartego Kąta**

2.1 Jaskra Pierwotna Młodzieńcza

2.2 Jaskra Pierwotna Otwartego Kąta/ Jaskra Wysokiego Ciśnienia

2.3 Jaskra Pierwotna Otwartego Kąta/ Jaskra Normalnego Ciśnienia

2.4 Nadciśnienie Oczne

## **3 Jaskra Wtórna Otwartego Kąta**

3.1 Jaskra Wtórna Otwartego Kąta Powodowana Chorobami Oka

3.1.1 *Jaskra w Zespole Rzekomego Złuszczenia Torebki Soczewki*

3.1.2 *Jaskra Barwnikowa*

3.1.3 *Jaskra Wywołana przez Soczewkę*

3.1.4 *Jaskra Związana z Krwawieniem Wewnętrzzałkowym*

3.1.5 *Jaskra Wywołana Zapaleniem Błony Naczyniowej*

3.1.6 *Jaskra Związana z Guzem Wewnętrzzałkowym*

3.1.7 *Jaskra Związana z Odwarstwieniem Siatkówki*

3.1.8 *Jaskra Otwartego Kąta Wywołana Urazem Oka*

3.2 Jatrogena Jaskra Wtórna Otwartego Kąta

3.2.1 *Jaskra Wywołana Terapią Kortykosteroidami*

3.2.2 *Jaskra Wywołana Zabiegami Chirurgicznymi i Laseroterapią Gałki Ocznej*

3.3 Jaskra Wtórna Otwartego Kąta Wywołana Przyczynami Zewnętrzzałkowymi

3.3.1 *Jaskra Wywołana Podwyższonym Ciśnieniem w Żyłach Nadtwardówkowych*

## **4 Pierwotne Zamykanie się Kąta Przesączenia**

### 4.1 Pierwotne Zamykanie się Kąta Przesączenia

- 4.1.1 *Ostre Zamknięcie Kąta Przesączenia*
- 4.1.2 *Przejściowe Zamknięcie Kąta Przesączenia*
- 4.1.3 *Przewlekłe Zamknięcie Kąta Przesączenia*
- 4.1.4 *Stan Po Ostрым Zamknięciu Kąta Przesączenia*

### 4.2 Zamykający się Kąt Przesączenia

## **5 Wtórne Zamykanie się Kąta Przesączenia**

- 5.1 Wtórne Zamykanie się Kąta Przesączenia w Mechanizmie Bloku Żreniczego
- 5.2 Wtórne Zamykanie się Kąta Przesączenia w Mechanizmie Pociągania ku Przodowi  
Bez Bloku Żreniczego
- 5.3 Wtórne Zamykanie się Kąta Przesączenia w Mechanizmie Popychania ku Przodowi  
Bez Bloku Żreniczego
  - 5.3.1 *Zespół Nieprawidłowego Przepływu Ciecży Wodnistej*
  - 5.3.2 *Torbiele Tęczówki i Ciała Rzęskowego, Guzy Wewnętrzne*
  - 5.3.3 *Tamponada wewnętrzna Olejem Silikonowym lub Gazem*
  - 5.3.4 *Zespół Wysiękowy Naczyniówki ( Uveal Effusion Syndrome)*
  - 5.3.5 *Retinopatia Wczesniacza (Stadium V)*
  - 5.3.6 *Inne Wrodzone Anomalie*

## 2. NERW WZROKOWY – BUDOWA ANATOMICZNA

*Anatomia strukturalna* [Bochenek, A., Reichert, M., 1993(14)]:

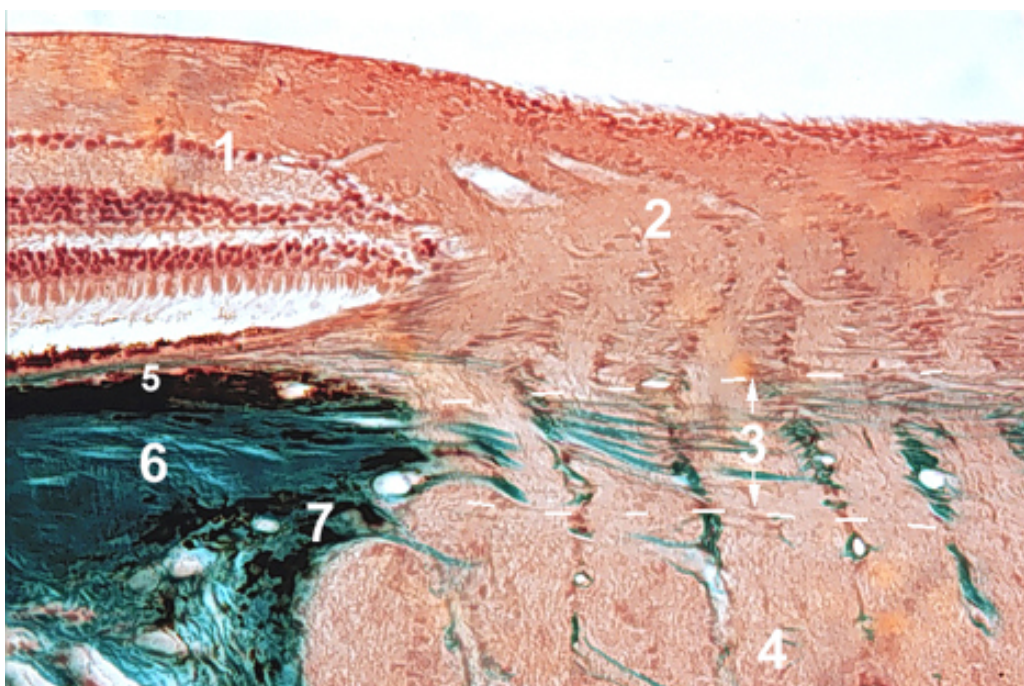
Nerw wzrokowy jest strukturą mózgowia, mającą swój początek w komórkach zwojowych siatkówki oka, a zakończenie – w obrębie podkorowych ośrodków wzroku: ciałach kolankowatych bocznych oraz wzgórkach górnych blaszki pokrywy.

Siatkówka jest strukturą oka, w której znajdują się trzy pierwsze neurony drogi wzrokowej:

- a) komórki zmysłowe, tj. pręciki i czopki (receptory),
- b) komórki dwubiegunowe oraz
- c) komórki zwojowe.

Aksony wielobiegunowych komórek trzeciego neuronu drogi wzrokowej, dążąc w kierunku blaszki sitowatej twardówki – struktury twardówki położonej nieco poniżej (1 mm) i przyśrodkowo (3 mm) od tylnego bieguna gałki ocznej – tworzą w siatkówce warstwę włókien nerwowych.

W obrębie blaszki sitowatej twardówki aksony komórek zwojowych siatkówki łączą się w pojedynczy powróżek – nerw wzrokowy (Ryc 2).



Ryc. 2. Przekrój podłużny przez okolice tarczy nerwu wzrokowego i około tarczowy obszar naczyńówki, twardówki i siatkówki gałki ocznej. Barwienie H+E.

1 – komórki zwojowe siatkówki/warstwa włókien nerwowych siatkówki, 2-część przedblaszkowa nerwu wzrokowego, 3- blaszka sitowata twardówki, 4-część pozablaszkowa nerwu wzrokowego, 5- naczyńówka, 6-twardówka, 7-opona miękka

Jego początkową część, położoną ku przodowi od blaszki siwatej twardówki, nazywamy tarczą nerwu wzrokowego (Ryc. 3).



Ryc. 3. Tarcza nerwu wzrokowego – obraz fizjologiczny. Strzałki wskazują pierścień nerwowo-siatkówkowy.

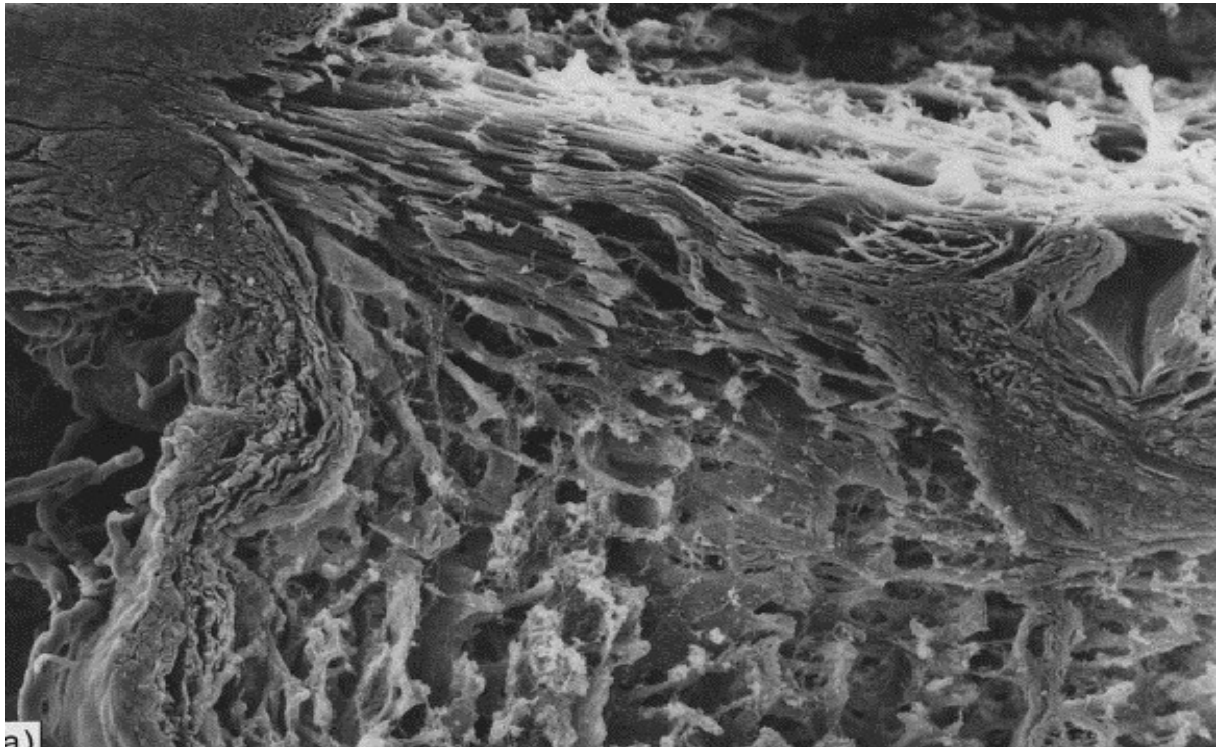
Źródło: Jonas, J.B, 1997. Optic disk. J. Glaucoma. 1997 Dec 6(6), 436-437.

Wyróżniamy w niej:

- a) pierścień nerwowo-siatkówkowy – strukturę złożoną z neurytów komórek zwojowych, przed ich wejściem w struktury blaszki siwatej, oraz
- b) zagłębienie (ang. *cup*) – strukturę utworzoną przez przednie, powierzchniowe lamelle blaszki siwatej twardówki, nieprzesłonięte elementami pierścienia neuroretinalnego.

Nerw wzrokowy zbudowany jest z około 1,2 – 2 milionów aksonów komórek zwojowych siatkówki, tworzących pęczki. Jako część ośrodkowego układu nerwowego, nerw ten otoczony jest pochawkami, odpowiadającymi oponom mózgowia: oponie twardej, pajęczynówce i oponie miękkiej. Przestrzenie leżące pomiędzy wspomnianymi pochawkami łączą się z odpowiednimi przestrzeniami opon mózgowia. Opona miękka, która przylega bezpośrednio do nerwu, oraz tylne lamelle blaszki siwatej twardówki wysyłają w jego głąb przegrody łącznotkankowe, dzielące włókna nerwu wzrokowego na oddzielne pęczki. Liczba ich wynosi od 800 do 1000 (Ryc. 4).





Ryc. 4.

Tylna blaszka sitowata oraz początkowy obszar pozablaszkowej części nerwu wzrokowego – widoczne przegrody łącznotkankowe dzielące włókna nerwu wzrokowego na pęczki.

Źródło: Nishida S., 1993. The three-dimensional architecture of collagen fibrils in the lamina cribrosa and the anterior part of the optic nerve, *Med. Electron Microsc.* 26(3-4), 199-205.

Przy wejściu do kostnego kanału nerwu wzrokowego nerw ten traci pochewkę zewnętrzną, która zrasta się z okostną kanału.

W przebiegu nerwu wzrokowego można wyróżnić cztery odcinki:

- odcinek wewnątrzgałkowy, długości około 0,7 mm, który przechodzi przez ścianę gałki ocznej. Aksony komórek zwojowych siatkówki ku tyłowi od blaszki sitowatej twardówki ulegają mielinizacji;
- odcinek wewnątrzoczodołowy, długości około 30 mm, przebiega mniej więcej w osi oczodołu i przyjmuje kształt okrągłego powrózka grubości ok. 4 mm. Na tym odcinku nerw wzrokowy jest nieco załamany w płaszczyźnie pionowej i esowato wygięty w płaszczyźnie poziomej (z przodu wypukły przyśrodkowo, z tyłu wypukły w kierunku bocznym). Budowa ta umożliwia ruchomość gałki ocznej;
- odcinek przebiegający przez kanał wzrokowy, długości 5 mm;
- odcinek wewnątrzczaszkowy, długości około 10 mm – po przejściu przez kanał wzrokowy do jamy czaszki nerw kieruje się ku tyłowi i przyśrodkowo, po czym na siodle tureckim, do przodu od przysadki, łączy się z nerwem drugostronnym,

wytwarzając skrzyżowanie wzrokowe. W jego obszarze dochodzi do częściowego skrzyżowania przyśrodkowych włókien nerwów wzrokowych, zawierających aksony pochodzące z nosowych części siatkówki obu oczu.

W przedłużeniu skrzyżowania wzrokowego aksony komórek zwojowych siatkówki tworzą pasma wzrokowe. Obejmują one konary mózgu, kończąc się w ośrodkach podkorowych wzroku, ciałach kolankowatych bocznych i wzgórkach górnych blaszki pokrywy, gdzie ulegają przełączeniu na IV neuron odpowiednio drogi wzrokowej lub przywspółczulnej drogi odruchu źrenicznego na światło.

Włókna wzrokowe posiadają specyficzną organizację w przebiegu nerwu wzrokowego.

W odcinku dystalnym, zlokalizowanym pomiędzy blaszką sitowatą a ok. 1/3 obwodową częścią odcinka wewnątrzczodołowego:

- włókna pochodzące z okolicy plamki (65% wszystkich włókien) zajmują skroniowy obszar nerwu o kształcie trójkąta zwróconego wierzchołkiem do osi nerwu, lecz jej nieobejmującego,
- włókna pochodzące z części nosowej siatkówki zajmują analogiczny obszar nerwu po stronie nosowej,
- włókna pochodzące ze skroniowej części siatkówki zajmują pozostały obszar przekroju nerwu wzrokowego.

Na pozostałym, proksymalnym odcinku nerwu wzrokowego dochodzi do reorganizacji w lokalizacji wyżej wymienionych grup włókien:

- włókna pochodzące z okolicy plamki zajmują osiowy obszar nerwu wzrokowego (stanowiąc 1/4 – 1/3 jego średnicy),
- włókna pochodzące z nosowych kwadrantów siatkówki zajmują nosowe kwadranty pola przekroju nerwu,
- włókna pochodzące ze skroniowej części siatkówki zajmują skroniowe kwadranty pola przekroju nerwu.

Oprócz włókien wzrokowych nerw wzrokowy zawiera także:

- biegnące na obwodzie nerwu bezmielinowe, dośrodkowe włókna dla odruchu źrenicznego oraz
- włókna odśrodkowe odgrywające prawdopodobną rolę w unerwieniu naczyń krwionośnych.

### 3. NEUROPATIA JASKROWA

#### 3.1. ZARYS PATOMECHANIZMU

Patomechanizm neuropatii jaskrowej związany jest ze zmianami architektury blaszki sitowatej twardówki (Ryc. 4), zachodzącymi pod wpływem działania sił mechanicznych, przekraczających oporność strukturalną jej tkanki łącznej [Bellezza A.J. i wsp. 2003b(11); Burgoyne C.F. i wsp., 2004(19); Gaasterland D. i wsp., 1978(31); Quigley H.A. i wsp., 1981(73); Quigley H.A., Green W.R., 1979(72)].

Głównym źródłem ich powstawania są znaczne zmiany amplitudy

- ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz
- ciśnienia tkanki pozablaszkowej (tj. sumy sił tworzonych przez tkanki części pozablaszkowej nerwu wzrokowego, ciśnienie wewnątrzocodołowe oraz ciśnienie płynu mózgowo-rdzeniowego) [Berdahl J.P., 2008a,b(12, 13); Jonas J.B. i wsp. 2003(51), 2004(52), 2007(53); Morgan W.H. i wsp., 1995(62), 1998(63), 2002(64), 2008(65); Ren R. i wsp., 2010(81)].

Wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego jest w głównej mierze następstwem wzrostu oporu w drogach przepływu cieczy wodnistej.

#### ***Ciśnienie wewnątrzgałkowe:***

Pojęcie „prawidłowe ciśnienie wewnątrzgałkowe” jest statystycznym opisem występujących populacyjnie wartości IOP. Wzrasta ono o ok. 1 mmHg na 2 lata życia pomiędzy narodzinami a 12. rokiem życia, z poziomu 6-8 mmHg do  $12 \pm 3$  mmHg. U zdrowych dorosłych osób wartości jego zawierają się w przedziale 10-21 mmHg ( $16 \pm 2,5$  mmHg), a po 40. roku życia prawdopodobnie wykazują tendencję do wzrostu o około 1mmHg na 10 lat. [Terminology and guidelines for glaucoma 3th edition, EGS 2008(111)].

#### ***Wpływ ciśnienia wewnątrzgałkowego na rozwój i progresję neuropatii jaskrowej:***

Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe jest najważniejszym znanym czynnikiem ryzyka rozwoju neuropatii jaskrowej [Sommer A, 1991(92)] (Tabela 1), a jego obniżenie – jedynym potwierdzonym klinicznie sposobem zmniejszenia ryzyka jej progresji. Fakt ten potwierdzony został wynikami Early Manifest Glaucoma Treatment Trial i Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS) [Boland M.V., Quigley H.A., 2007(15)].

Wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego związany jest głównie ze wzrostem oporu w drogach przepływu cieczy wodnistej.

IOP, mm Hg	Total No. of Eyes†	n	Eyes With POAG		
			Cumulative %	Prevalence ( $\pm$ SE), %	Relative Risk
$\leq 15$	3807	25	13	0.65 ( $\pm 0.13$ )	1.0
16-18	3571	47	37	1.31 ( $\pm 0.19$ )	2.0
19-21	2291	42	59	1.82 ( $\pm 0.28$ )	2.8
22-24	445	37	78	8.30 ( $\pm 1.31$ )	12.8
25-29	240	20	88	8.33 ( $\pm 1.78$ )	12.8
30-34	67	17	97	25.37 ( $\pm 5.32$ )	39.0
$\geq 35$	23	6	100	26.09 ( $\pm 9.16$ )	40.1
<b>Total</b>	<b>10 444</b>	<b>194</b>	---	---	---

\* POAG indicates primary open angle glaucoma; IOP, intraocular pressure. Excludes 159 nonglaucomatous eyes, four eyes with POAG, and nine eyes with other forms of glaucomatous optic nerve damage for which IOP was unavailable. Excluding "other" glaucomatous optic nerve damage for which IOP was available would drastically reduce the denominator at the highest IOP ( $\geq 35$  mm Hg), dramatically increasing POAG prevalence to 40.0% and the relative risk to 61.5.

Tabela 1. Częstość występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta w zależności od wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego.

Źródło: Sommer A. i wsp., 1991. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. *The Baltimore Eye Survey Arch Ophthalmol.* Aug, 109(8), 1090-1095.

Obniżenie ciśnienia wewnątrzgałkowego zmniejsza ryzyko rozwoju jaskry w grupie pacjentów z nadciśnieniem ocznym (*The Ocular Hypertension Treatment Study – OHTS*) oraz jej progresji w grupie osób z jaskrą normalnego ciśnienia (*Collaborative Normal Tension Glaucoma Study – CNTGS*).

OHTS wykazało, że redukcja ciśnienia wewnątrzgałkowego o 20% zmniejsza ryzyko konwersji nadciśnienia ocznego do jaskry w okresie 5 lat z 9,4 do 4,4%. *Early Glaucoma Prevention Study (EGPS)* wykazało, że wyższe ciśnienie wewnątrzgałkowe związane jest z większym ryzykiem rozwoju jaskry na poziomie 9% w ciągu 5 lat, na każdy 1 mmHg powyżej 21 mmHg. Według wyników CNTGS przy redukcji ciśnienia wewnątrzgałkowego o 30% ryzyko progresji NTG zmniejszało się o 1/3 w okresie 5 lat. Brak zgodności co do roli długoterminowych wahań ciśnienia wewnątrzgałkowego (miesiące do lat) jako czynnika ryzyka rozwoju i progresji neuropatii jaskrowej. Rezultaty EGPS i *Early Manifest Glaucoma Treatment Trial* nie wykazały takiej zależności, podczas gdy wyniki AGIS potwierdziły tę zależność jako szczególnie silną w grupie pacjentów z niskim ciśnieniem wewnątrzgałkowym.

### 3.2. FIZJOLOGIA PRODUKCJI I DRÓG PRZEPLYWU CIECZY WODNISTEJ [Murray A., 2004(66)].

#### ***Przepływ komora tylna – komora przednia***

Przepływ cieczy wodnistej w obrębie gałki ocznej jest procesem czynnym. Siła generująca przepływ cieczy wodnistej z tylnego do przedniego kompartmentu gałki ocznej (tj. komora tylna > tunel tęczówkowo-soczewkowy > źrenica > komora przednia) wywołana jest przez zwiększenie objętości naczyniówki (wypełniającej się krwią) w trakcie fazy skurczu mięśnia sercowego. Z uwagi na stosunkowo dużą sztywność ścian gałki ocznej (twardówki) zwiększenie objętości naczyniówki wywołuje kompresję objętości komory ciała szklistego i komory tylnej gałki ocznej.

Tworzy się wektor siły hydrodynamicznej skierowany ku komorze przedniej oka, który warunkuje kierunek i wielkość przepływu cieczy wodnistej z komory tylnej do komory przedniej.

Przeciwnie skierowane wektory siły tworzą:

- ciśnienie cieczy wodnistej w komorze przedniej,
- opór tunelu tęczówkowo-soczewkowego (im pole powierzchni potencjalnej przestrzeni pomiędzy soczewką i tęczówką jest większe, a odległość między tymi strukturami mniejsza, tym większa jest wartość tego oporu) oraz
- właściwości fizyczne cieczy wodnistej – głównie jej lepkość i gęstość.

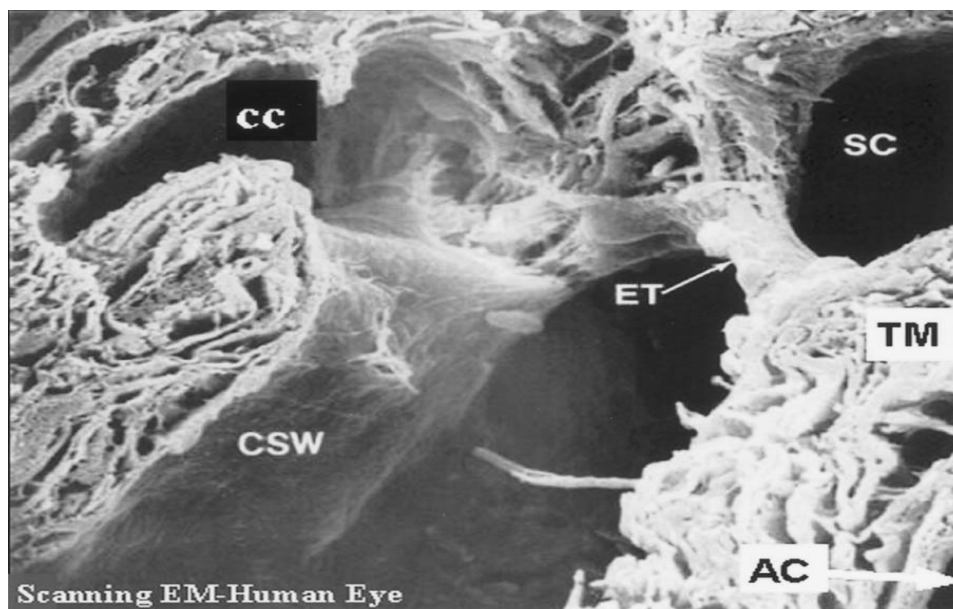
#### ***Przepływ komora przednia – kanał Schlemma***

Ciecz wodnista po osiągnięciu komory przedniej kieruje się do jednej z dwóch głównych dróg odpływu:

- klasycznej – zależnej od ciśnienia wewnątrzgałkowego – prowadzącej poprzez beleczkowanie i kanał Schlemma do żył nadtwardówkowych lub
- naczyniówko-twardówkowej – niezależnej od ciśnienia wewnątrzgałkowego – prowadzącej przez podstawę ciała rzęskowego i przestrzeń nadnaczyniówkową do ciała rzęskowego i naczyniówki lub przez przestrzeń nadnaczyniówkową i twardówkę do tkanek oczodołu. Droga ta odgrywa szczególnie ważną rolę w odpływie cieczy wodnistej z oka przy poziomym położeniu ciała (pozycja leżąca, okres snu). Rola jej maleje wraz z wiekiem z uwagi na proces włóknienia ciała rzęskowego.

### ***Klasyczna droga odpływu cieczy wodnistej***

Z obszaru komory przedniej ciecz wodnista kieruje się do struktur kąta tęczówkowo-rogowkowego, inaczej nazywanego kątem przesączania. Obraz tych struktur w mikroskopie skaningowym przedstawia Ryc. 5. Wyróżniamy w nim następujące elementy: beleczkowanie, komórki okołokanalikowe, kanał Schlemma oraz zastawki kanału Schlemma.



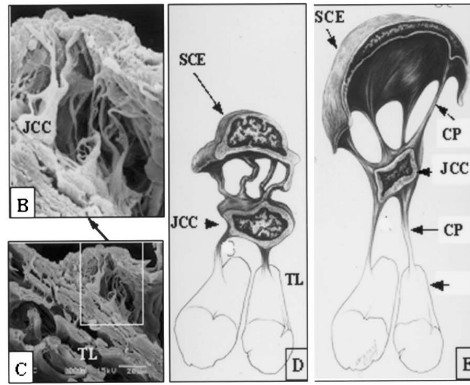
Ryc. 5. Struktury kąta przesączania w obrazie mikroskopu skaningowego

AC – komora przednia, TM – beleczkowanie (sieć beleczek), SC – kanał Schlemma, ET – zastawka kanału Schlemma, CC – kanały zbiorcze, SCW – ściana kanału Schlemma.

Źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump, J. Glaucoma, 13, 421-438.

***Beleczkowanie (sieć beleczek)*** – to przestrzenna, mogąca aktywnie zmieniać swoją sztywność sieć łącznotkankowych beleczek, pokrytych komórkami beleczkowania (pseudonabłonkowymi). W jego strukturze możemy wyróżnić część powierzchniową – naczyńiówkową, zwróconą w kierunku komory przedniej, o stosunkowo luźnym utkaniu beleczek, oraz głęboką – twardówkową, położoną w sąsiedztwie kanału Schlemma, charakteryzującą się gęstą strukturą sieci beleczek.

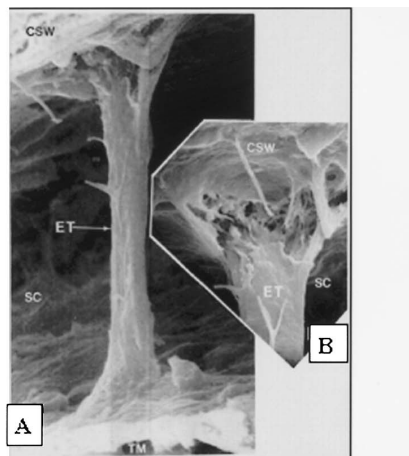
***Komórki okołokanalikowe*** (Ryc. 6) – to struktury wiążące komórki nabłonka kanału Schlemma z elementami sieci beleczkowania twardówkowego.



Ryc .6. Komórki około kanalikowe (JCC- Juxtacanalicular Cell).

Źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump, J. Glaucoma, 13, 421-438.

**Zastawki kanału Schlemma** (Ryc. 7) – to położone w jego świetle, rozpięte pomiędzy jego ścianą wewnętrzną a zewnętrzną struktury w formie kolumn. Swoim jednym zakończeniem komunikują się z komorą przednią, a drugim – ze światłem kanału Schlemma. Obecne są w liczbie 1 do 2 na 1 mm obwodu kanału. Stanowią one jedyne, fizjologicznie występujące miejsca kontaktu, pomiędzy światłem komory przedniej a światłem kanału Schlemma. Przepływ cieczy wodnistej w zastawkach kanału Schlemma dzięki specyficznej ich budowie możliwy jest tylko w kierunku od komory przedniej do kanału Schlemma.



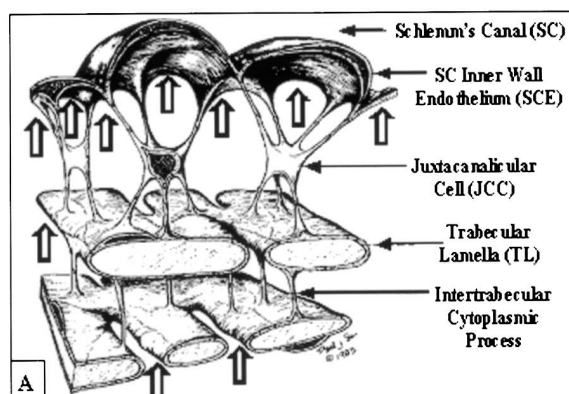
Ryc. 7. Zastawka kanału Schlemma.

Źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump, J. Glaucoma, 13, 421-438.

Proces przepływu cieczy wodnistej pomiędzy komorą przednią a kanałem Schlemma jest procesem czynnym, warunkowanym siłami hydrodynamicznymi generowanymi w obrębie komór tylnej i ciała szklanego zmianą objętości naczyniówki.

Możemy wyróżnić w nim dwie fazy.

Podczas pierwszej z nich, która rozpoczyna się wraz z fazą skurczu mięśnia sercowego, w następstwie napływu cieczy wodnistej do komory przedniej (wywołanego mechanizmami opisanymi powyżej), wektor siły hydrodynamicznej wywołuje kompresję wewnętrznej ściany kanału Schlemma. Siła ta umożliwia przemieszczenie w kierunku naczyń zbiorczych i łoża naczyń żylnych oczodołu objętości cieczy wodnistej w nim obecnej. Dzięki obecności struktur spajających czynnościowo i mechanicznie ścianę kanału Schlemma i elementy beleczkowania, tj. komórek okołokanalikowych, siła odkształcająca ścianę kanału Schlemma, równoległe wywołuje także proces rozciągnięcia struktur beleczkowania. W ten sposób w elementach elastycznych i sprężystych beleczek zmagazynowana zostaje energia pochodząca bezpośrednio z pracy układu krążenia (Ryc. 8). Jest ona źródłem powstania sił warunkujących procesy zachodzące w drugiej fazie cyklu. Równoległe z powyższymi procesami do części proksymalnej (zwróconej w kierunku komory przedniej) zastawek kanału Schlemma wprowadzona zostaje objętość cieczy wodnistej.



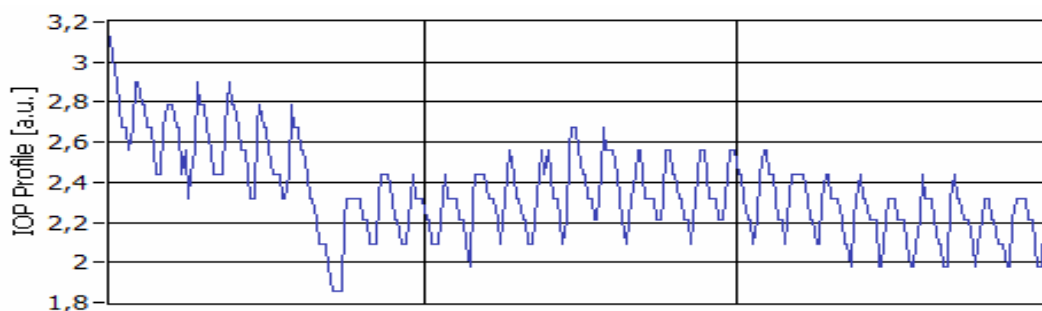
Ryc. 8. Schemat działania mechanizmu pompy cieczy wodnistej kąta przesączania gałki ocznej.

Źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump, J. Glaucoma, 13, 421-438.

Faza druga cyklu rozpoczyna się wraz z fazą rozkurczu mięśnia sercowego. Na skutek odpływu krwi z naczyniówki do żył wirowatych i łoża naczyń żylnych oczodołu zmniejsza się jej objętość. Proces ten wywołuje względne zwiększenie się objętości komory ciała szklonego i zmniejszenie siły hydrodynamicznej, wywołującej ruch cieczy wodnistej z komory tylnej w kierunku kanału Schlemma, stan wywołujący m.in. rozciąganie elementów beleczkowania. Energia potencjalna, zmagazynowana w elementach sprężystych beleczkowania, zaczyna przewyższać wartości działające siły rozciągające. Rozciągnięte struktury beleczkowania zaczynają więc powracać do pozycji wyjściowej, uwalniając jednocześnie zmagazynowaną wewnątrz energię. Komórki okołokanalikowe przenoszą ją na wewnętrzną ścianę kanału



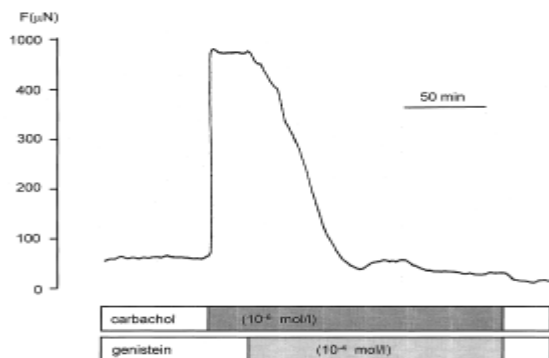
Schlemma, wywołując jej ruch w kierunku komory przedniej. Wektor siły skierowany w kierunku komory przedniej gałki ocznej wywołuje w kanale Schlemma podciśnienie, umożliwiając przemieszczenie (zassanie) cieczy wodnistej, zawartej w proksymalnej części zastawek kanału Schlemma do światła kanału Schlemma. W tym miejscu cykl pompy ssąco-tłoczącej kąta przesączania może rozpocząć się od nowa. Klinicznie procesy opisane powyżej manifestują się jako pulsacja oczna i są możliwe do prześledzenia w czasie badań ciągłej tonografii ocznej Triggerfish lub dynamicznej tonometrii konturowej Pascal jako oczna amplituda pulsacyjna (OPA). Jej obraz prezentuje Ryc. 9.



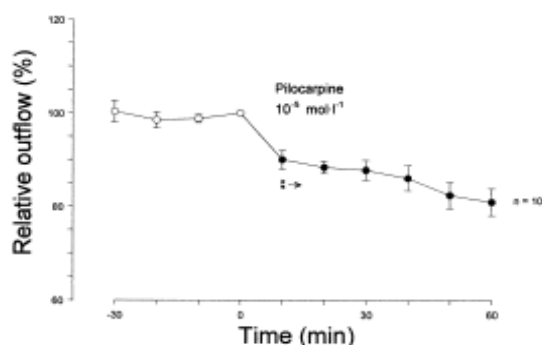
Ryc. 9. Oczna Amplituda Pulsacyjna w badaniu Ciągłej Tonografii Ocznej Triggerfish.

Komórki beleczkowania wykazują cechy komórek mięśni gładkich; mogą reagować skurczem bądź rozkurczem w odpowiedzi na dany rodzaj pobudzenia. Dzięki tym specyficznym właściwościom, układ nerwowy może regulować właściwości biomechaniczne elementów beleczkowania [Stumpff F., 2000(94)].

W ten sposób zmianie ulegać może wartość oporu hydrostatycznego beleczkowania oraz ilość energii magazynowanej w jego strukturze, a przez to siła i efektywność pompy cieczy wodnistej kąta przesączania. W ten sposób regulacji podlega tempo odpływu cieczy wodnistej, a więc i wysokość ciśnienia wewnątrzgałkowego. Zmianę napięcia tkanki beleczkowania pod wpływem czynników wywołujących skurcz i relaksację przedstawia Ryc. 10.



Ryc. a



Ryc. b

Ryc. 10. Właściwości kurczliwe struktur beleczkowania ( a. i b.).

Ryc. a. : Aktywny skurcz beleczkowania pod wpływem carbacholu i jego relaksacja pod wpływem genisteiny.

Ryc. b. : Redukcja współczynnika odpływu cieczy wodnistej pod wpływem skurczu beleczkowania wywołanego podaniem pilocarpiny (model przepływowy odcinka przedniego oka, pozbawionego ciała rzęskowego).

Źródło: Wiederholt M. i wsp. (2000). Regulation of Trabecular Meshwork and Ciliary Muscle Contractility, Progress in Retinal and Eye Research Vol. 19, No. 3, 271-295.

### ***Patomechanizmy wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego***

Czynnikami determinującymi wysokość ciśnienia wewnątrzgałkowego są:

A. Poziom produkcji cieczy wodnistej:

Ciecz wodnista produkowana jest przez wyrostki i nabłonek bezbarwnikowy ciała rzęskowego w procesie ultrafiltracji (układ sercowo-naczyniowy) oraz czynnego wydzielania (cAMP). Poziom produkcji wynosi około 2,5 µl/min (~3,6 ml/dzień) i jest niezależny od wysokości ciśnienia wewnątrzgałkowego do poziomu utraty perfuzji.

B. Poziom odpływu cieczy wodnistej:

Poziom ten możemy opisać równaniem:  $F = C(P_o - P_e)$ , gdzie

$F$  – przepływ cieczy wodnistej (fizj. 2,5 µl/min),

$C$  – współczynnik łatwości odpływu (fizj. 0,2 µl/min na mmHg),

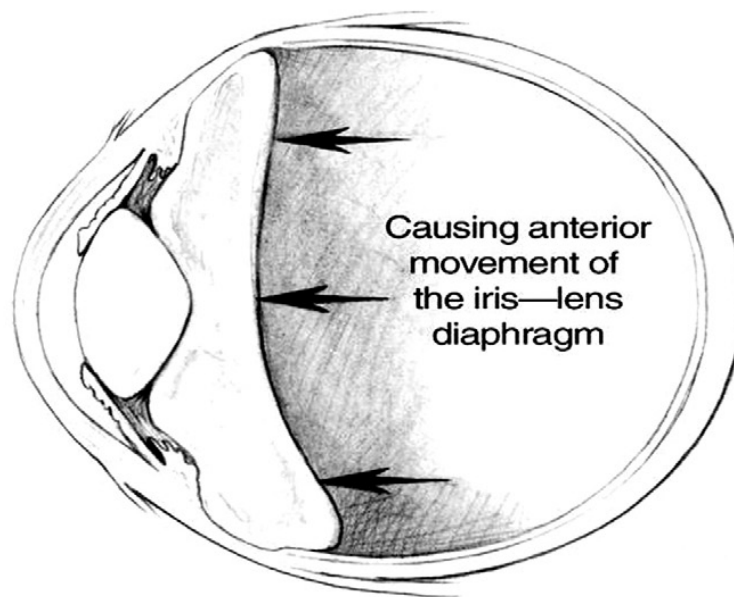
$P_o$  – ciśnienie wewnątrzgałkowe (mmHg),

$P_e$  – ciśnienie żyłne nadtwardówkowe (fizj. 10 mmHg).

Jest on proporcjonalny do różnicy pomiędzy ciśnieniem wewnątrzgałkowym a ciśnieniem panującym w łożu naczyń żylnych nadtwardówki i wynosi około 2,5 µl/min [Thygesen J., 2009(100)].

Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe jest następstwem zwiększenia oporów w drogach przepływu cieczy wodnistej. Mogą one pojawić się na każdym jej etapie.

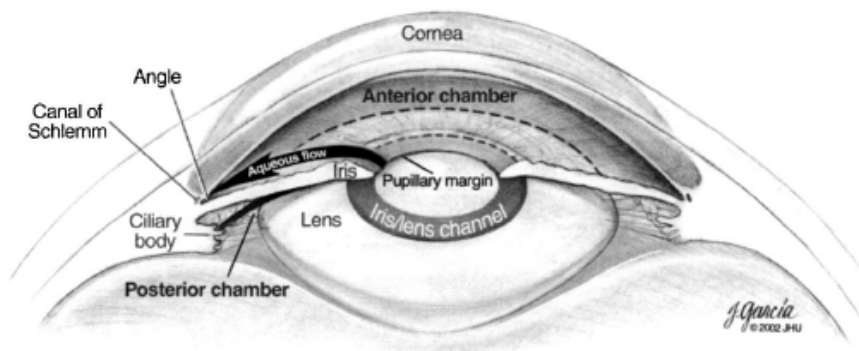
- Pierwszym potencjalnym miejscem takiego bloku jest okolica komory tylnej oka. Nieprawidłowe stosunki anatomiczne pomiędzy ciałem rzęskowym, soczewką i jej aparatem więzadłowym oraz powierzchnią przednią ciała szklanego mogą wywoływać wzrost oporu przepływu cieczy wodnistej w kierunku tunelu tęczówkowo-soczewkowego. Wsteczny jej przepływ, ku komorze ciała szklanego, skutkuje retencją cieczy wodnistej w gałce ocznej i wzrostem ciśnienia wewnątrzgałkowego. Obraz bloku źrenicznego prezentuje Ryc. 11.



Ryc.11. Blok rzęskowy.

Źródło: Quigley H.A., 2009. Angle-Closure Glaucoma-Simpler Answers to Complex Mechanisms: LXVI Edward Jackson Memorial Lecture Am J. Ophthalmol. 48, 657-669.

- Kolejnym miejscem, mogącym potencjalnie warunkować wzrost oporu w drogach przepływu cieczy wodnistej, jest obszar tunelu tęczówkowo-soczewkowego [Silver D.M., Quigley H.A., 2004(92)]. Im mniejszy dystans i większy potencjalny obszar kontaktu pomiędzy tęczówką a soczewką, tym bardziej wzrasta opór przepływu cieczy wodnistej pomiędzy tymi strukturami. Schemat lokalizacji kanału tęczówkowo-soczewkowego oraz różnicy wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego pomiędzy komorą przednią i tylną w funkcji parametrów biometrycznych gałki ocznej przedstawia Ryc. 12 i 13.

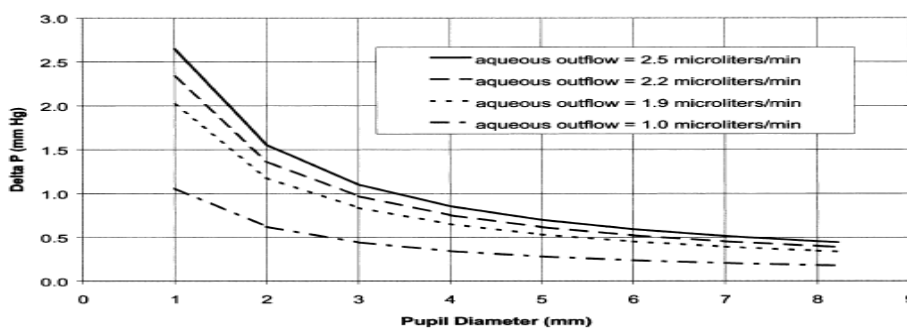


Ryc. 12. 3-wymiarowy obraz odcinka przedniego oka ze schematycznym opisem lokalizacji tunelu tęczówkowo-soczewkowego (Iris/lens channel)

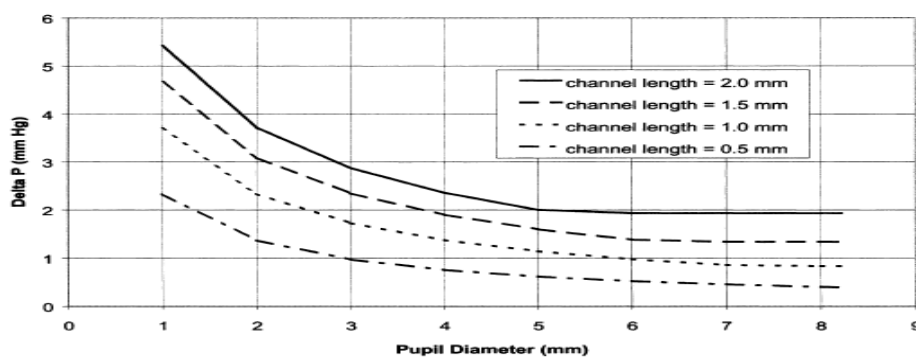
Źródło: Silver D.M., Quigley H.A., 2004. Flow through the iris-lens channel: estimates of differential pressure between the anterior and posterior chambers, *J. Glaucoma*, Apr, 13(2),100-107.

Ryc. 13

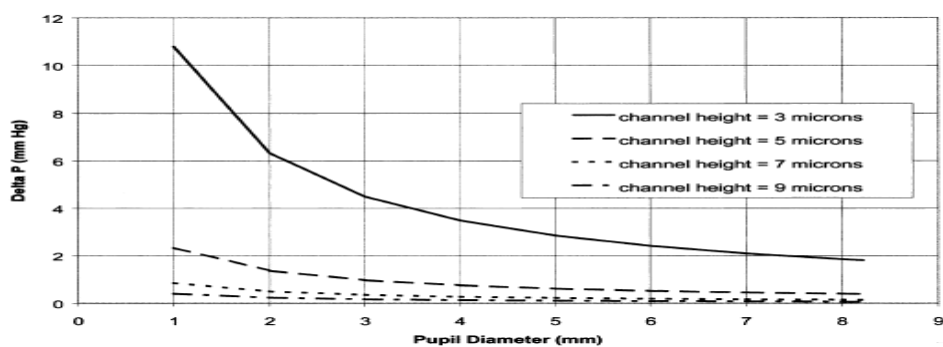
a.



b.



C.



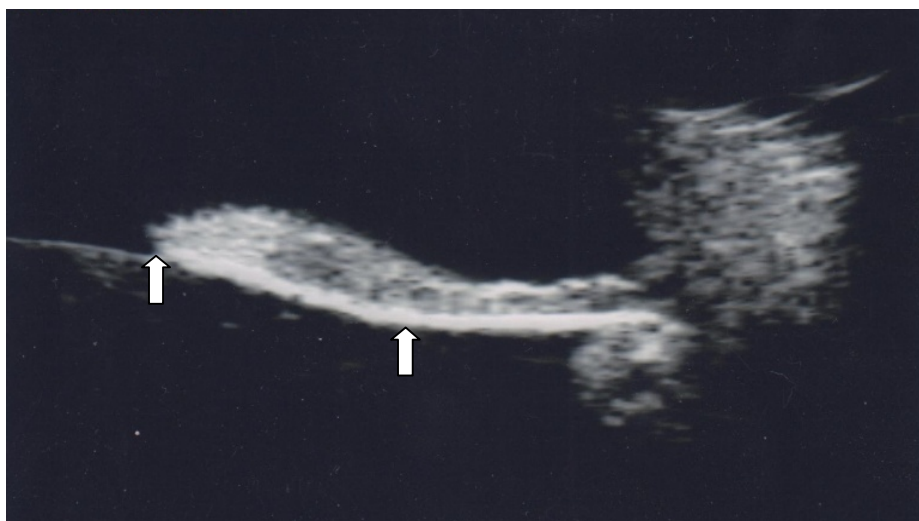
Ryc. 13 a,b,c. Kanał tęczówkowo-soczewkowy – schemat wpływu:

a. wartości przepływu cieczy wodnistej, b. długości oraz c. wysokości kanału na różnicę ciśnienia wewnątrzgałkowego pomiędzy komorą przednią i tylną gałki ocznej w zależności od średnicy źrenicy.

Źródło: Silver D.M., Quigley H.A., 2004. Flow through the iris-lens channel: estimates of differential pressure between the anterior and posterior chambers, J. Glaucoma, Apr, 13(2), 100-107.

Klinicznie stan ten dotyczy szczególnie oczu nadwzrocznych, z zespołem względnego przedniego małowocza (nadwzroczność osiowa). Oczy takie charakteryzują się dużą powierzchnią i małą wysokością tunelu tęczówkowo-soczewkowego, warunkującą wzrost oporów przepływu cieczy wodnistej, a wynikającą ze względnie dużej objętości soczewki oraz małej objętości komory przedniej. Stan ten nasilany jest często nieprawidłową aktywnością akomodacyjną soczewki, wynikającą z braku korekcji wady refrakcji.

Podobny charakter bloku występuje także w oczach z zespołem rozproszenia barwnika w warunkach dobrego oświetlenia (Ryc. 14).



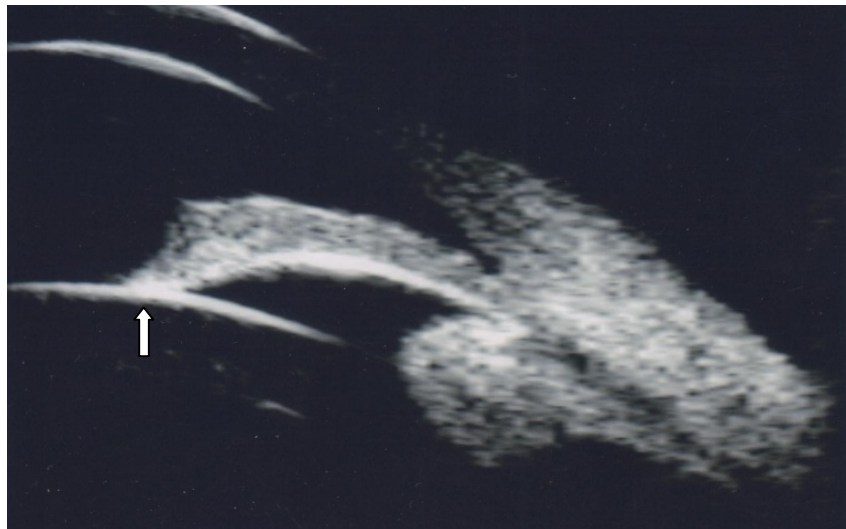
Ryc. 14. Tęczówka w zespole rozproszenia barwnika w warunkach fotonowych. Zwiększona długość oraz zmniejszona wysokość kanału tęczówkowo-soczewkowego.

Wskutek patologicznej wiotkości struktur tęczówki i odwróconego bloku źrenicznego pole powierzchni tunelu tęczówkowo-soczewkowego ulega zwiększeniu, a jego wysokość zmniejsza się.

Do podobnego zjawiska dochodzi w oczach o patologicznej wiotkości aparatu wiązadłowego soczewki (np. zespół pseudoeksfoliacji, elastopatie układowe etc.).

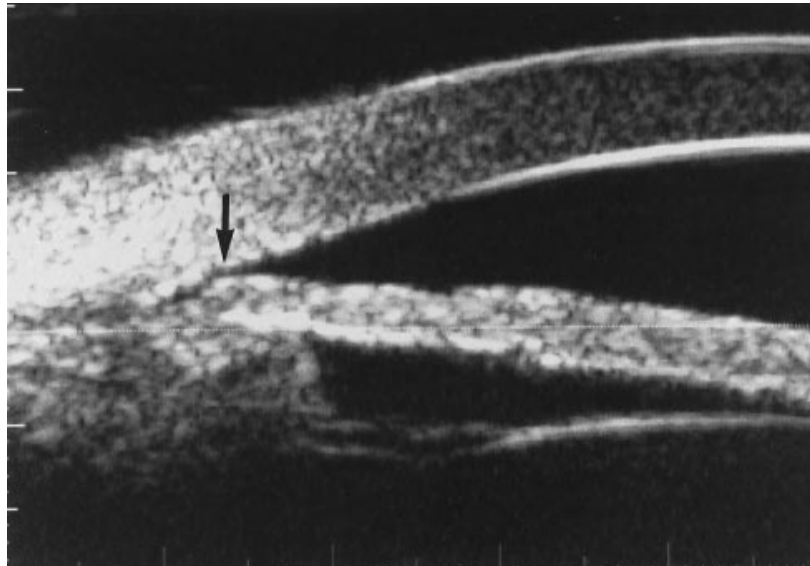
- Jeszcze innym potencjalnym miejscem bloku jest okolica źrenicy. Nadmierna reaktywność mięśnia rozwieracza źrenicy prowadzić może do okresowego, bardzo silnego i zlokalizowanego na małym obszarze kontaktu między tęczówką a soczewką. Uniemożliwia on przepływ cieczy wodnistej z komory tylnej do komory przedniej, wywołując jej wsteczny przepływ.

Nadciśnienie w komorze tylnej gałki ocznej wywołuje wtórne przesunięcie się ku przodowi przepony tęczówkowo-soczewkowej i prowadzi do objawów ostrego zamknięcia kąta przesączania. Obraz ultrabiomikroskopowy bloku źrenicznego w przebiegu ostrego zamknięcia kąta przesączania przedstawia Ryc.15.



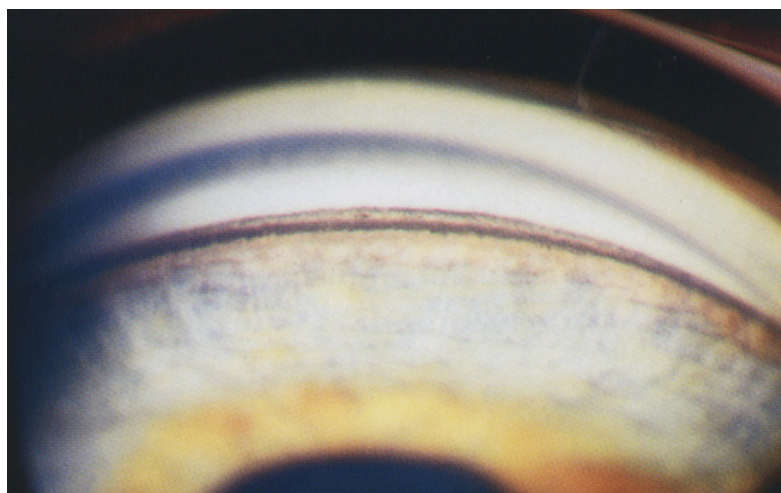
Ryc. 15. Blok źreniczny, wywołany nadreaktywnością mięśnia rozwieracza źrenicy

- Kolejny typ bloku (przedbeleczkowy) może być następstwem okresowego (apozycja) lub utrwalonego (zrost) przylegania tęczówki i rogówki w następstwie zespołu *iris platau*, wynikającego z dysgenezy ciała rzęskowego (patrz obraz ultrabiomikroskopowy kąta przesączania Ryc. 16).



Ryc. 16. Zespół *iris platau*, patologiczna dysgeneza ciała rzęskowego, wywołująca okresowe apozycyjne zamykanie się kąta przesączania.

- Obszarem, w którym może dojść do wzrostu oporu w drogach przepływu cieczy wodnistej, jest także przestrzeń beleczkowania. Czynnikiem sprawczym tego bloku jest zwykle nadmierna akumulacja elementów morfotycznych w obrębie siateczki beleczkowania, przewyższająca jej zdolności fagocytarne (patrz Ryc. 17).



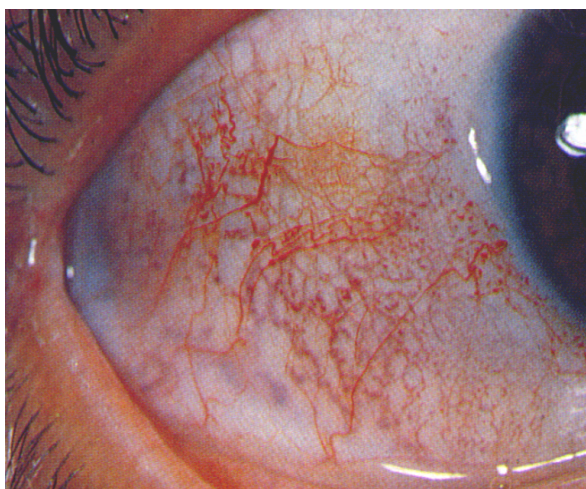
Ryc. 17. Blok beleczkowania wywołany nadmiernym uwalnianiem nabłonka barwnikowego tęczówki w przebiegu zespołu pseudoeksfoliacji.



Mechanizm ten pojawia się m.in. we wtórnych jaskrach związanych z nadmiernym uwalnianiem komórek nabłonka barwnikowej tęczówki (typu jaskry barwnikowej) lub przewlekłymi odczynami zapalnymi, co ma miejsce np. w nawrotowych zapaleniach odcinka przedniego błony naczyniowej w przebiegu sarkoidozy. Nasilony odczyn zapalny, towarzyszący gwałtownym wzrostom ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz nasilonym procesom fagocytozy może wtórnie prowadzić do nasilenia destrukcji tkanki beleczkowania, a przez to dalszego wzrostu oporów przepływu cieczy wodnistej. Wzrost oporów może być też efektem obliteracji dróg przepływu przez nadmierną produkcję niefizjologicznych elementów macierzy pozakomórkowej, co ma miejsce np. w zespole pseudoeksfoliacji. Tkanka beleczkowania może wreszcie zostać uszkodzona przez proces zapalny, toczący się w jej obrębie; ma to miejsce np. w przebiegu metaherpetycznego zapalenia odcinka przedniego błony naczyniowej.

- Dysfunkcja mechanizmów pompy cieczy wodnistej kąta tęczówkowo-rogowkowego, spowodowana uszkodzeniem zastawek kanału Schlemma, atrofią kanału lub dysfunkcją beleczkowania jest kolejnym potencjalnym źródłem powstania zwiększonego oporu w drogach przepływu cieczy wodnistej (jaskra pierwotna otwartego kąta).

- Wreszcie tak zwany blok pozabeleczkowy – związany ze wzrostem ciśnienia w pozagałkowych drogach odpływu cieczy wodnistej, tj. w łożu żylnym – od żył nadtwardówkowych po naczynia żyłne zatoki jamistej i żyłę główną górną. Mogą one być wywołane czynnikami mechanicznymi typu ucisku / obliteracji (oftalmopatia tarczycowa / zakrzepica naczyń) lub zaburzeniami czynnościowymi układu krążenia, typu zaburzeń rytmu, niewydolności prawokomorowej lub patologią anatomiczną, jak w przypadku naczynek nadtwardówki (patrz Ryc. 18).



Ryc. 18. Naczyniak nadtwardówki w przebiegu zespołu Sturge-Webbera.



Wszystkie wymienione wyżej mechanizmy skutkują spowolnieniem tempa odpływu cieczy wodnistej, czego następstwem są siły wywołujące wzrost napięć wewnętrznych elementów strukturalnych ściany gałki ocznej. Reakcją tkanki na nadmierne obciążenie jest jej przebudowa, mająca na celu minimalizację efektu działania tych sił [Burgoyne C.F., 2005(20)].

### 3.3. SZCZEGÓŁOWA MORFOLOGIA I PATOFIZJOLOGIA NERWU WZROKOWEGO W ASPEKTCIE PATOGENEZY NEUROPATII JASKROWEJ

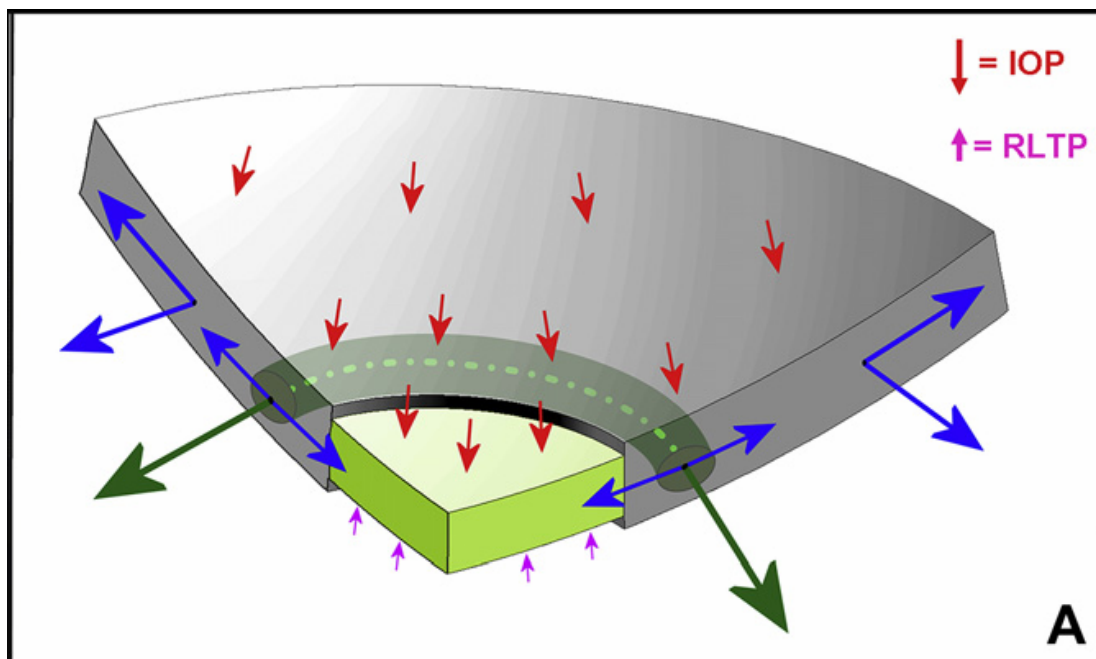
#### **3.3.1. Wpływ podwyższonego IOP na tkankę łączną twardówki i jej blaszki sitowatej**

Tylko siła wywołująca fizyczne odkształcenie struktury tkanki może wywołać reakcję ze strony jej elementów komórkowych. Wartość tej siły zależy od biomechanicznych właściwości danej tkanki.

Tkankami przyjmującymi ten typ obciążeń mechanicznych w gałce ocznej są: około tarczowy obszar twardówki i ściany kanału nerwu wzrokowego oraz blaszki sitowatej twardówki.

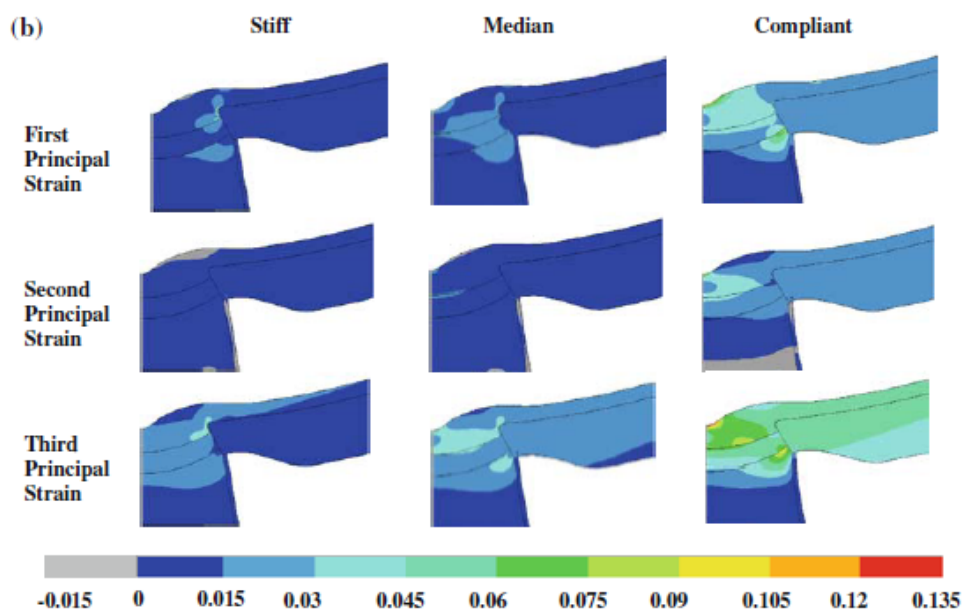
Przy działającej sile o wartości 1 x IOP, siły działające na około tarczowy obszar twardówki wynoszą 30 x IOP, na ściany kanału nerwowego 30 – 100 x IOP, a na elementy blaszki sitowatej działa siła 50 – 180 x IOP. Jest to typowa specyfika rozkładu sił działających w obszarze i otoczeniu miejsca zmniejszonego oporu (kanał nerwu wzrokowego), leżącego w obszarze struktury sferycznej (otaczająca go twardówka) [Burgoyne C.F., 2011(22); Downs J.C. i wsp. 2005(25), 2007(26); Sigal I.A. i wsp., 2005(85)].

Rozkład sił działających na blaszkę sitowatą twardówki, ściany kanału nerwu wzrokowego oraz twardówkę okolicy okołotarczowej przedstawia Ryc. 19, a wpływ parametrów biomechanicznych twardówki okołotarczowej na napięcia wewnętrzne tkanki blaszki sitowatej – Ryc. 20.



Ryc. 19. Rozkład sił działających na blaszkę sitowatą twardówki ( kolor jasno zielony), ściany kanału nerwu wzrokowego ( kolor ciemno zielony) oraz około tarczowy obszar twardówki (kolor szary).

Źródło: Burgoyne C.F., 2011. A biomechanical paradigm for axonal insult within the optic nerve head in aging and glaucoma. *Experimental Eye Research* 93, 120-132.



Ryc. 20. Wpływ sztywności twardówki okołotarczowej na napięcia wewnętrzne tkanki blaszki sitowatej. Stiff – twardówka niepodatna, Compliant – twardówka nadpodatna, Medium – twardówka pośrednia First principal strain – siły rozciągające, Third principal strain – siły kompresujące.

Źródło: Eilaghi i wsp., 2010. *Annals of biomedical engineering*, Vol. 38, No. 4, Apr, 1586-1592.

### ***Błaszka sitowata twardówki***

Błaszka sitowata twardówki to trójwymiarowa siatka pokrytych astrocytami i zawierających naczynia włosowate, łącznotkankowych beleczek.

W strukturze beleczek blaszki sitowatej twardówki występuje kolagen typu I i III oraz elastyna. Ich włókna, zatopione w gęstej macierzy proteoglikanów, ułożone są równolegle względem osi beleczek blaszki sitowatej twardówki. W punktach przyczepu blaszki sitowatej do ściany kanału nerwu wzrokowego twardówki włókna elastyny beleczek blaszki sitowatej wnikają pomiędzy włókna pierścienia elastyny, otaczające kanał twardówkowy nerwu wzrokowego.

Kolagen i elastyna są elementami cytoszkieletu odpowiadającymi za elastyczność tkanki i jej odpowiedź mechaniczną na obciążenia wywołane siłami rozciągającymi, np. na powrót tkanki do jej pierwotnej postaci po ustaniu działania siły deformującej. Elastyczność tkanki jest następstwem obecności w jej strukturze wiązań pomiędzy włóknami kolagenowymi a glikozaminoglikanami macierzy pozakomórkowej. Za odpowiedź tkanki na siły ściskające odpowiada natomiast macierz proteoglikanów.

Proces przebudowy blaszki sitowatej twardówki (ang. *cupping*), polegający na zapadnięciu, pogrubieniu i deformacji jej struktury, stanowi kliniczną manifestację neuropatii jaskrowej i jest dla niej patognomoniczny [Klein i wsp., 2006(54)].

Proces *cuppingu* związany jest z odpowiedzią tkanek: twardówki, blaszki sitowatej i nerwu wzrokowego na działające na nie naprężenia, tj. z ich właściwościami biomechanicznymi [Agoumi Y.S. i wsp. 2010(1); Burgoyne C.F., Downs J.C., 2008(21); Burgoyne C.F. i wsp., 2005(19); Burgoyne C.F., Morrison J.C., 2001(19); Downs J.C. i wsp., 2009(26); Sigal I.A., Ethier C.R., 2009b(88); Sigal I.A. i wsp., 2009a,c(87,89), 2010a,b(90, 91); Morgan J.E. 2000(60), 2004(61); Pena J.D., 2001(70); Yang H i wsp., 2007(105), 2009a,b(106, 107), 2010(108)]. Związany jest więc z fizjologią i patofizjologią tkanek:

- łącznej ( twardówki okołotarczowej, ściany kanału nerwowego twardówki oraz blaszki sitowatej),
- nerwowej (aksony komórek zwojowych siatkówki) oraz
- astrocytów, komórek glejowych, pericytów i ich błon podstawnych.

### ***Przebieg mechanicznego uszkodzenia blaszki sitowatej twardówki***

Gdy siły działające na tkankę łączną blaszki sitowatej wywołują jej odkształcenie, nie doprowadzając jednocześnie do przekroczenia granicy elastyczności tkanki (tj. zerwania wiązań pomiędzy włóknami kolagenowymi), po ustaniu działania siły odkształcającej tkanka

powraca do pierwotnej postaci. Fizyczne odkształcenie tkanki może wywołać reakcję ze strony elementów komórkowych w obszarze *lamina cribrosa*, jednak jej niewielkie nasilenie nie doprowadza zwykle do przebudowy struktury łącznej beleczek blaszki sitowatej twardówki.

Przekroczenie limitów elastyczności danej struktury prowadzi do patofizjologicznego efektu uszkodzenia tkanki łącznej oraz aktywacji jej układu komórkowego. W obrębie tkanki nerwowej w modelach *in vitro* efekt ten pojawia się już przy wzroście napięć wewnątrztkankowych o 5-8% [Margulies S.S. i wsp., 1992(56)].

Astrocyty poddane stresowi, związanemu z podwyższonym ciśnieniem hydrostatycznym, zmieniają swój metabolizm i aktywują liczne nieczynne do tej pory geny. Następstwem tej aktywacji jest wzrost sztywności tkanki i zmniejszenie jej elastyczności, które są następstwami zmiany typu produkowanego kolagenu oraz stopnia hydratacji glikozaminoglikanów macierzy oraz pogrubienia błon podstawnych astrocytów i komórek śródbłonka naczyń, co wtórnie upośledza dyfuzję substancji odżywczych z naczyń włosowatych do aksonów komórek zwojowych siatkówki.

Na skutek reorganizacji i zwiększenia ilości filamentów aktynowych cytoszkieletu aktywowanych astrocytów dochodzi do zmiany ich kształtu z podłużnego na okrągły oraz ich migracji w kierunku obszarów o wyższym ciśnieniu hydrostatycznym. Zmiany te mogą prowadzić do aktywnego zmniejszenia długości elementów strukturalnych tkanki, czyli skurczu.

Powyżej opisane procesy wraz z innymi zaburzeniami, wywołanymi przez siły działające na beleczki blaszki sitowatej twardówki, prowadzą do przebudowy architektury tkanki, w następstwie czego dochodzi do zaburzeń unaczynienia oraz kompresji aksonów komórek zwojowych siatkówki prowadzących do ich dysfunkcji [Burgoyne C.F. i wsp., 2001(18)].

### **3.3.2. Wpływ podwyższonego IOP na elementy komórkowe nerwu wzrokowego**

#### ***Komórki zwojowe siatkówki***

Aksony komórek zwojowych siatkówki, poza przewodzeniem potencjałów, transportują także molekuly i organelle z ciał komórkowych w kierunku mózgu i w stronę przeciwną (odpowiednio: transport antero- i retrogradowy). Transport aksonalny jest procesem aktywnym i wymaga energii.

W obrębie beleczek blaszki sitowatej twardówki obecne są naczynia włosowate, odpowiedzialne za dostarczenie produktów odżywczych i tlen do aksonów komórek zwojowych siatkówki. W związku z jej specyficzną architekturą, aby substancja odżywcza mogła dotrzeć z naczynia do aksonu komórki zwojowej musi ona przedostać się przez:

- błonę podstawną i pericyty współtworzące ścianę naczyń włosowatych, dalej przez
- *matrix* pozakomórkowy lamelli, następnie poprzez
- błonę podstawną astrocyta i jego ciało, aby wreszcie osiągnąć akson komórki zwojowej siatkówki.

Transport aksonalny ulega spowolnieniu wraz z wiekiem, prowadząc do zwiększenia częstości występowania obrzęku aksonów komórek zwojowych siatkówki. Zjawisko to jest następstwem zmian zachodzących wraz z wiekiem w komórkach astrocytów, naczyniach włosowatych i blaszce sitowatej twardówki. Charakteryzuje się ono spadkiem liczebności populacji astrocytów oraz zwiększeniem grubości ich błon podstawnych, angiopatią naczyń (pogrubienie ściany) oraz wzrostem grubości i sztywności beleczek blaszki sitowatej twardówki. Zmiany te prowadzą do utrudnienia dyfuzji substancji odżywczych pomiędzy naczyniem a aksonem komórki zwojowej.

Uszkodzenie aksonów komórek zwojowych siatkówki w następstwie działania podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego może pojawić się przed uszkodzeniem tkanki łącznej beleczek *lamina cribrosa* ( przed przekroczeniem ich limitu elastyczności). Objawem tego stanu jest zblednięcie pierścienia nerwowo-siatkówkowego tarczy n. II. Spowodowane jest ono utratą aksonów komórek zwojowych siatkówki, któremu nie towarzyszy objaw ekskawacji blaszki sitowatej twardówki. Mechanizmy prowadzące do tego stanu obejmują:

- procesy niedokrwienia aksonów będące następstwem gwałtownego, silnego wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego, wywołującego obliterację naczyń n. II w jego części przedblaszkowej oraz zaburzenia hemodynamiki nerwu wzrokowego w następstwie zaburzeń perfuzji gałęzek naczyń rzęskowych tylnych krótkich, które wywołane są zmianami napięcia i lokalizacji twardówki,
- mechaniczną kompresję aksonów przez elementy zdeformowanej blaszki sitowatej o prawidłowych parametrach elastyczności lub samoistną kompresję aksonów komórek zwojowych siatkówki w następstwie obecności dużego gradientu przezblaszkowego.

### ***Astrocyty***

Stanowią główną populację komórek glejowych w obszarze niezmielinizowanych włókien nerwu wzrokowego. W obszarze blaszki sitowatej twardówki oraz obszarze przedblaszkowym nerwu wzrokowego astrocyty wspierają funkcję aksonów komórek zwojowych siatkówki, tworząc barierę pomiędzy nimi a tkanką łączną beleczek blaszki

sitowatej i naczyniami krwionośnymi [Hernandez M.R., 2000(39); Hernandez M.R. i wsp., 2008(40); Ye H., Hernandez M.R., 1995(109)].

W obrębie tarczy nerwu wzrokowego możemy znaleźć dwie subpopulacje astrocytów Typu 1:

- Typ 1A charakteryzuje się ekspresją GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) – cytoszkieletarnego markera astrocytów. Nie posiadają jednak NCAM (*neural cell adhesion molecule*). Ten typ astrocytów rozproszony jest w obrębie kolumn glejowych nerwu wzrokowego oraz na brzegach blaszki sitowatej twardówki.
- Typ 1B będący główną populacją astrocytów tarczy n II wykazuje ekspresję GFAP i NCAM, stanowi główne źródło produkcji macierzy pozakomórkowej w tarczy nerwu wzrokowego w czasie rozwoju płodowego oraz podczas życia. Ten typ komórek wyściela powierzchnie tarczy nerwu wzrokowego skierowaną ku ciału szklistemu, tworzy kolumny glejowe, otacza naczynia krwionośne w obszarze przedblaszkowym, tworzy elementy blaszki sitowatej twardówki i separuje nerw wzrokowy od twardówki w obszarze kontaktu.

W obrębie blaszki sitowatej astrocyty ułożone są prostopadle do aksonów. Dobrze zdefiniowana błona podstawna izoluje je od kolagenu i elastycznej macierzy beleczek blaszki sitowatej. Wypustki astrocytów rozciągają się do rdzenia macierzy pozakomórkowej oraz pozostają w kontakcie z wypustkami innych astrocytów i komórek blaszki sitowatej.

#### ***Komórki blaszki sitowatej twardówki***

To gwiaździste komórki zlokalizowane wewnątrz beleczek blaszki sitowatej. W przeciwieństwie do astrocytów nie wykazują ekspresji GFAP. Stanowią unikalny typ komórek o nieznanym embriogenezie.

#### ***Mikroglej***

To podtyp komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego, które ulegają aktywacji w odpowiedzi na uszkodzenie neuronalne. W zdrowej tkance regularnie rozmieszczone w ścianie naczyń i przestrzeniach okołonaczyniowych, kolumnach glejowych i beleczkach blaszki sitowatej pozostają one nieaktywne. W przypadku neuropatii jaskrowej jako aktywne mikroglej pojawiają się w okolicy uszkodzonych beleczek blaszki sitowatej, przede wszystkim w powiązaniu z naczyniami i barierą krew-siatkówka. Typowo występują w okołotarczowym obszarze naczyńkowo-siatkówkowym w okolicy zakończenia błony Brucha. Izolują twardówkę oraz obszary chorokapilar, w których może dochodzić do nieszczelności bariery krew – siatkówka od tkanki nerwowej.

W zdrowych oczach astrocyty blaszki sitowatej poddawane są gradientowi, pomiędzy ciśnieniem wewnątrzgałkowym a ciśnieniem tkanki pozablaszkowej. Fluktuacje tego ciśnienia w warunkach fizjologicznych są niewielkie i powodowane głównie pulsacją oczną oraz dobowymi wahaniami ciśnienia wewnątrzgałkowego.

W przebiegu neuropatii jaskrowej wysokie i zmienne wartości IOP prowadzą do znamiennej deformacji tkanki blaszki sitowatej, wywołującej biomechaniczny stres w macierzy pozakomórkowej. Astrocyty, dzięki obecności molekuł adhezyjnych, poprzez przezłonowe domeny, powiązane są z cytoszkieletem innych komórek blaszki sitowatej i macierzą pozakomórkową. Z uwagi na te powiązania siły działające na macierz pozakomórkową wywołują kaskadę wewnątrzkomórkowych zmian, modyfikujących zachowanie i fenotyp komórek. Na wskutek zwiększenia się liczby molekuł adhezyjnych, zwiększa się także szybkość interakcji pomiędzy komórką a macierzą oraz pomiędzy komórkami.

### **3.3.3. Wpływ podwyższonego IOP na perfuzję nerwu wzrokowego**

Zmiana ciśnienia hydrostatycznego w tkankach tarczy nerwu wzrokowego może prowadzić do zmniejszenia perfuzji w naczyniach włosowatych i/lub zmiany właściwości dyfuzyjnych tej tkanki [Haefliger I.O., Anderson, D.R., 1996(33); Harris A. i wsp. 2000(34); Hayreh S.S. i wsp. 1970(36), 1994(37)]. Proces ten mogą nasilać zmiany, zachodzące w tkankach z wiekiem, a opisane powyżej.

Przepływ krwi w naczyniach rzęskowych może ulegać zaburzeniom na skutek zmian wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz w związku z procesami skurczu naczyniowego.

Przepływ w drobnych, twardówkowych odgałęzieniach naczyń rzęskowych tylnych krótkich może zostać zaburzony poprzez mechanizmy związane ze wzrostem sił działających na okołotarczową tkankę twardówki. Siły te generowane są poprzez wzrost i wahania ciśnienia wewnątrzgałkowego. Oddziaływania takie, poprzez zmianę struktury i lokalizacji tkanki twardówki, przenoszą się na ścianę naczynia, prowadząc do zmniejszenia objętości przepływającej nim krwi.

Zjawisko to prowadzi do zaburzeń perfuzji w obrębie: pierścienia Zinna-Hallera, drobnych naczyń penetrujących do części przedblaszkowej nerwu wzrokowego, naczyń odżywiających okolice przyczepu blaszki sitowatej do ściany kanału nerwowego twardówki oraz gałęzi oponowych, odżywiających pozablaszkową część nerwu wzrokowego. W podobnym mechanizmie może dochodzić do zaburzeń perfuzji w okolicy okołotarczowej naczyniówki, klinicznie prowadzących do pojawienia się stref alfa i beta zaniku okołotarczowego.

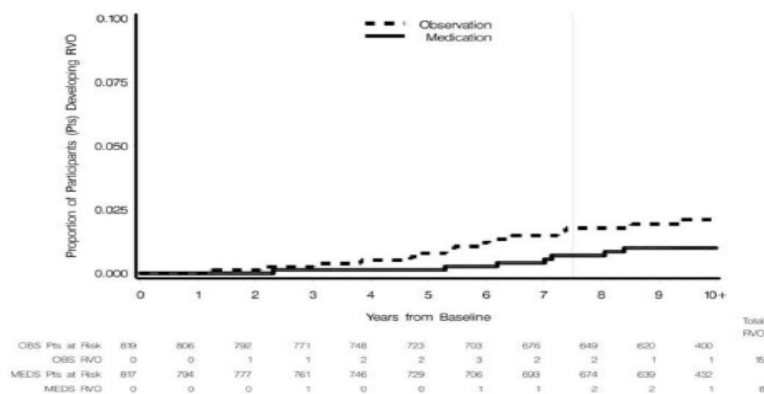
Zaburzenia perfuzji części blaszkowej *lamina cribrosa* mogą pojawić się także na skutek zamknięcia światła naczyń włosowatych przez rozciągnięte lub uciśnięte przez podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe beleczki blaszki sitowatej twardówki. Efekt ten nasila obniżenie ciśnienia perfuzji w tych naczyniach, mogące być następstwem hipotensji tętniczej, wazospazmu lub angiopatii czy zespołu obturacyjnego bezdechu sennego [Misiuk-Hojło M., 2006(59); Harris A., Misiuk-Hojło M., 2010(35)]. W obturacyjnym zespole bezdechu sennego obniżenie ciśnienia perfuzji może także być następstwem hiperkapnii prowadzącej do rozszerzenia żył oraz podwyższonego ciśnienia żylnego wynikającego z natężonego wydechu przy zamkniętej głośni. Gwałtowne wzrosty ciśnienia wewnątrzgałkowego prowadzą do silnych zaburzeń perfuzji naczyń włosowatych w części przedblaszkowej nerwu wzrokowego.

Krwotoczki płomykowate pierścienia neuroretinalnego, będące jednym z najsilniejszych czynników ryzyka rozwoju neuropatii jaskrowej, są objawem zaburzenia perfuzji drobnych naczyń żylnych przedblaszkowej części nerwu wzrokowego. W następstwie nadmiernej ruchomości (*hypercompliance*) blaszki sitowatej twardówki oraz kompresji okolicy przedblaszkowej nerwu wzrokowego, spowodowanej gwałtownymi wahaniami gradientu przezblaszkowego, dochodzi do wtórnego zastoju żylnego z następczą zakrzepicą oraz przedarciem ściany naczynia. Obecność patomechanizmu zakrzepowego potwierdza obecność towarzyszącego krwotoczkom subtelnego obrzęku aksonów pierścienia nerwowo-siatkówkowego.

W przypadku progresji neuropatii jaskrowej, na skutek przerostu beleczek, zmniejsza się średnica przestrzeni międzybeleczkowych blaszki sitowatej. Stan ten prowadzi do objawów względnej ciasnoty w obrębie tunelu nerwowego twardówki, kompresji aksonów komórek zwojowych i ich degeneracji. Efekt ciasnoty dotyczy także środkowego pnia naczyniowego siatkówki. Naczynia jego ulegają kompresji związanej z przebudową blaszki sitowatej twardówki, którą nasila położenie we wspólnej łącznotkankowej przydince. Stan ten prowadzi do zmniejszenia i zwolnienia przepływu krwi przez tętnicę i żyłę środkową siatkówki, co klinicznie manifestuje się zmniejszeniem ich średnicy. Brak tkanki mięśniowej w ścianie oraz ciasnota kanału nerwowego twardówki doprowadza do zastoju w żyłę środkowej siatkówki i jej względnego rozdęcia w okolicy przedblaszkowej tarczy nerwu wzrokowego. Mechanizm ten prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi panującego w tym naczyniu i – przy IOP < 30 mmHg – do zahamowania jej fizjologicznej pulsacji zwanej pulsacją żylną. Gdy ciśnienie w oku znacznie przekracza 30 mmHg, powyższa pulsacja pojawia się ponownie. Jest ona wtedy następstwem zamykania się światła żyły środkowej



siatkówki przez ciśnienie panujące w obrębie komory ciała szklistego w czasie fazy rozkurczu serca. Oba opisane powyżej zjawiska znamienne zwiększają ryzyko powikłań zakrzepowych ze strony naczyń siatkówki [Barnett E., 2010(9)] (patrz Ryc. 21).



Cumulative proportion of participants in the observation (OBS) group and medication (MEDS) group who developed retinal vein occlusion (RVO). The vertical line indicates the mean follow-up (yrs) completed when hypotensive medication was offered to the observation group.

Ryc. 21. Ryzyko wystąpienia zakrzepu żył siatkówki wśród pacjentów z nadciśnieniem ocznym. Linia ciągła – grupa na farmakoterapii, linia przerywana – grupa bez farmakoterapii.

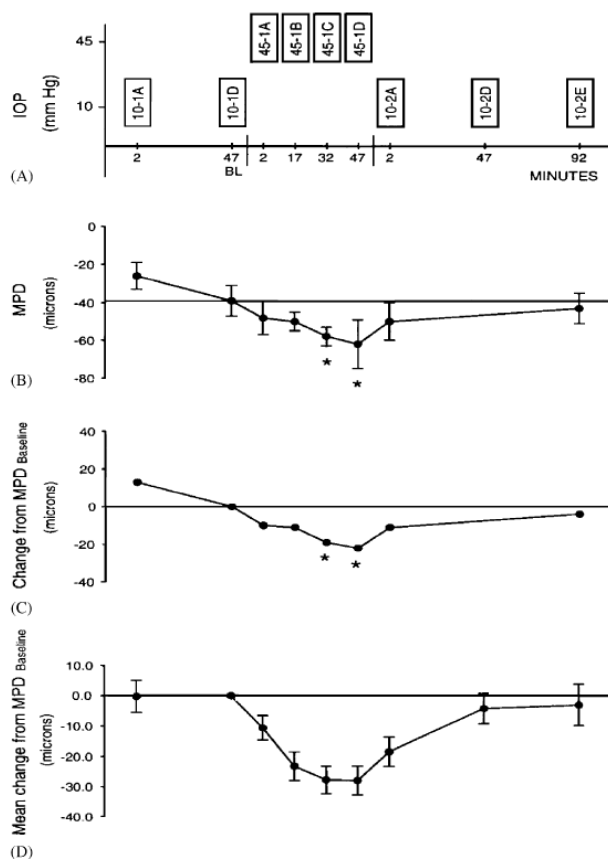
Źródło: Barnett E., 2010. The Incidence of Retinal Vein Occlusion in the Ocular Hypertension Treatment Study *Ophthalmology*, March, 117(3), 484-488.

### 3.4. WŁAŚCIWOŚCI BIOMECHANICZNE NERWU WZROKOWEGO W PRZEBIEGU NEUROPATII JASKROWEJ

Elementy blaszki sitowatej twardówki w początkowym okresie działania na nią zwiększonych sił naprężających wykazuje specyficzne fizjologiczne właściwości biomechaniczne zwane podatnością (ang. *compliance*) i nadpodatnością (ang. *hypercompliance*) [Burgoyne C.F. i wsp., 1995(17)].

Zjawisko podatności polega na zdolności tkanek blaszki sitowatej twardówki do w pełni odwracalnego, nieznacznego (do  $-30 \mu\text{m}$ ), ograniczonego odkształcenia swojej struktury pod wpływem wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego (patrz Ryc. 22).

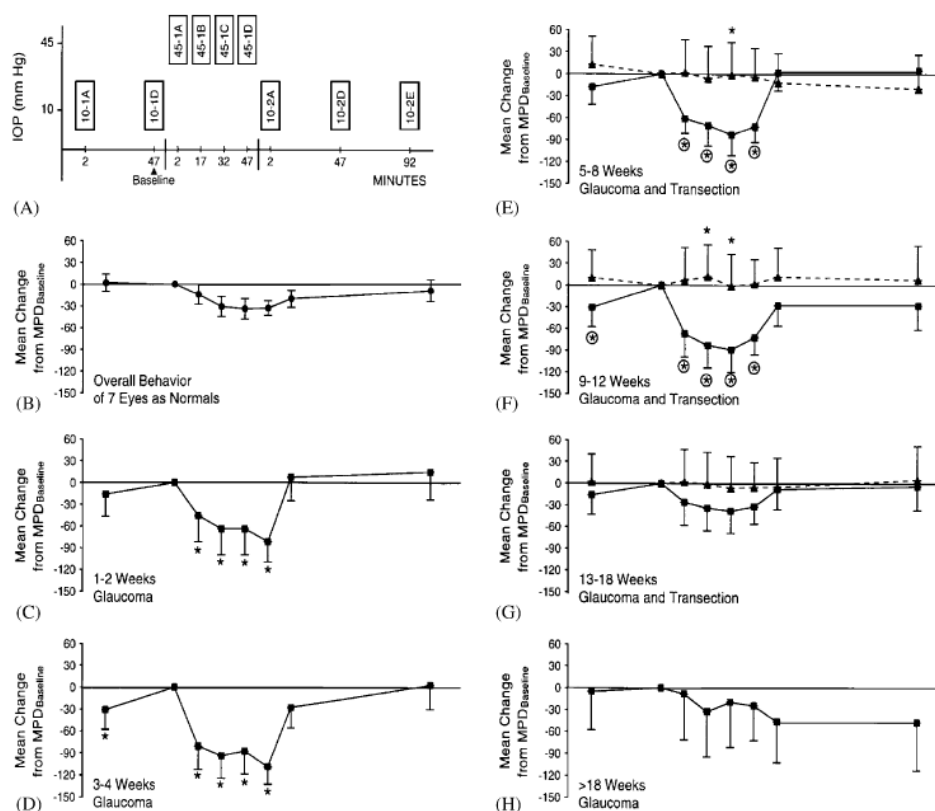
Główną rolę w przywróceniu pierwotnego stanu struktur blaszki sitowatej twardówki odgrywają jej strukturalne elementy elastyczne (głównie kolagen).



Ryc. 22. Podatność blaszki sitowatej twardówki (opis w tekście).

Źródło: Burgoyne C.F. i wsp., 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. Prog. Retin. Eye Res. 24, 39-73.

Z kolei zjawisko nadpodatności (*hypercompliance*) polega na nadmiernym (do 120  $\mu\text{m}$ ) w stosunku do działającej siły, odkształceniu struktury blaszki sitowatej twardówki. Związane jest z utratą prawidłowych właściwości elastycznych tkanki na skutek uszkodzenia jej strukturalnych włókien elastycznych. Obecność powyższego zjawiska w znaczącym stopniu zwiększa podatność tkanki danego nerwu wzrokowego na rozwój neuropatii jaskrowej (Ryc. 23, schemat C i D).



Ryc. 23. Nadpodatność blaszki sitowatej twardówki, schemat C i D (opis w tekście).

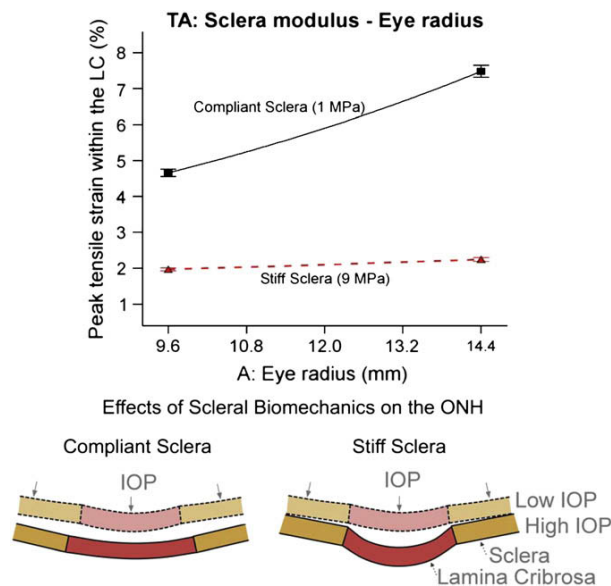
Źródło: Burgoyne C.F. i wsp., 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. Prog. Retin. Eye Res. 24, 39-73.

Zmiana fenotypu tkanki blaszki sitowatej twardówki prowadzi wtórnie do zaburzeń aksonalnego transportu neurotrofin oraz do zaburzenia dyfuzji tlenu i substancji odżywczych z naczyń włosowatych do tkanki nerwu wzrokowego [Bellezza A.J. i wsp., 2003b(11); Burgoyne C.F. i wsp., 2004(19); Gaasterland D. i wsp., 1978(31); Minckler D.S. i wsp., 1977(58); Quigley H.A. i wsp., 1981(73); Quigley H.A., Green W.R., 1979(72)].

Procesy te są czynnikiem sprawczym przyspieszenia procesu programowanej śmierci komórek zwojowych siatkówki, istoty patogenezy neuropatii jaskrowej.

Gwałtowny wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego wywołuje pierwotnie deformację części przedblaszkowej nerwu wzrokowego, na wskutek kompresji aksonów komórek zwojowych.

Podczas przedłużającego się działania sił związanych z podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym dochodzi do skierowanego ku tyłowi odkształcenia się blaszki sitowatej. Maksimum deformacji na poziomie rzędu –30 mikrometrów pojawia się podczas działania siły rzędu 45 mmHg przez okres około 50 minut. Powrót tkanki blaszki sitowatej do pierwotnej pozycji trwa około 90 minut. Duży wpływ na kompensację sił działających na blaszkę sitowatą mają właściwości biomechaniczne twardówki okolicy okołotarczowej oraz długość osiowa gałki ocznej (Ryc. 24).



Ryc. 24. Wpływ długości osiowej gałki ocznej oraz sztywności twardówki okołotarczowej na napięcia wewnętrzne w obrębie blaszki sitowatej twardówki – siły rozciągające i ściskające.

Źródło: Sigal I.A., Ethier C.R., 2009b. Biomechanics of the optic nerve head. *Exp. Eye Res.* 88. 799-807.

Natężenie deformacji tkanki związane jest z jej elastycznością [Albon J., 1995(2), 2000(3), 2007(4); Brown C.T. i wsp. 1994(16); Dolman C.L., 1980(24); Hernandez M.R. i wsp., 1989(38); Kotecha A. i wsp., 2006(55)] i zależne jest od obecności w strukturze lamelli i twardówki kolagenu i elastyny. Gdy siły działające na blaszkę sitowatą przekroczą granicę elastyczności tkanki, dochodzi do mechanicznego uszkodzenia jej mikrostruktury.

Stała deformacja i nadpodatność blaszki sitowatej twardówki są najwcześniejszymi wykładnikami uszkodzenia tkanki łącznej blaszki sitowatej, w następstwie których dojdzie do zespołu zjawisk prowadzących do procesu uszkodzenia komórek zwojowych siatkówki.

Wczesne jaskrowe uszkodzenie blaszki sitowatej twardówki objawia się uszkodzeniem włókien kolagenowych i elastynowych blaszki sitowatej twardówki w miejscach ich przyczepu do ściany kanału nerwowego twardówki. To specyficzne położenie uszkodzenia jest następstwem lokalizacji miejsca, w którym doszło do największego lokalnego natężenia sił wywołanych podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym oraz najgorszych właściwości biomechanicznych lokalnej tkanki. Blaszka sitowata twardówki w górno- i dolnoskroniowych kwadrantach posiada najcieńsze lamelle o najmniejszej gęstości ułożenia, jednocześnie w części peryferyjnej jest ona znamienne grubsza, kanały dla pęczków aksonów komórek zwojowych siatkówki są dłuższe, a stosunek długości kanałów dla aksonów komórek zwojowych do grubości *lamina cribrosa* jest największy. Ta specyficzna przestrzenna struktura tkanki, której następstwem jest lokalizacja największego gradientu przezblaszowego w obwodowych górno- i dolnoskroniowych obszarach blaszki sitowatej, warunkuje także położenie miejsc pierwotnych zmian neuropatycznych tarczy nerwu wzrokowego.

Potwierdzeniem roli braku stabilności mechanicznej blaszki sitowatej twardówki w patogenezie rozwoju neuropatii jaskrowej są dane morfometryczne, wskazujące, że największe ryzyko lokalnych zmian neuropatycznych występuje w obszarach blaszki sitowatej położonych najdalej od centralnego pnia naczyniowego siatkówki.

Uszkodzona mechanicznie tkanka blaszki sitowatej nie może powrócić do swojej pierwotnej pozycji, a poziom przetrwałej deformacji zależy bezpośrednio od stopnia uszkodzenia elementów jej tkanki łącznej. Pojawia się zjawisko nadpodatności tkanki, tj. znamienne większego poziomu odkształceń tkanki uszkodzonej względem poziomu odkształceń tkanki kontrolnej przy tej samej sile deformującej.

Zadziałanie na tak pierwotnie uszkodzoną tkankę łączną blaszki sitowatej twardówki stałym nieznacznie podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym wywołuje aktywną przebudowę jej struktury warunkowaną mechanizmami komórkowymi. Po okresie 1-2 tygodni takiego remodelingu tkanka poddana krótkotrwałemu działaniu sił o wysokich wartościach (IOP 45 mmHg/45 min) reaguje pojawieniem się odkształcenia rzędu ok. –60 mikrometrów. Nieuszkodzona tkanka blaszki sitowatej twardówki reaguje na te same warunki odkształceniem rzędu ok. –30 mikrometrów. Gdy proces przebudowy trwa 3 do 12 tygodni, odkształcenie osiągnięte z zastosowaniem analogicznej siły i czasu wynosi już ok. –90 mikrometrów. Po tym okresie najprawdopodobniej na skutek znacznej przebudowy mikrostruktury blaszki sitowatej twardówki jej pogrubienia oraz zmiany właściwości biomechanicznych (zmniejszenie elastyczności, zwiększenie sztywności) odkształcenie tkanki

*lamina cribrosa*, generowane przez dane podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, ulega zmniejszeniu i pozostaje na podobnym stałym poziomie powyżej 18. tygodnia działania stałych sił rozciągających.

Bardzo ciekawym okresem w zjawisku nadpodatności jest czas pomiędzy 1. a 8. tygodniem działania podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego na uszkodzoną tkankę łączną blaszki sitowatej. W tym okresie pomimo znacznego uszkodzenia struktur odpowiedzialnych za właściwości elastyczne tkanki (włókna kolagenowe) po zaprzestaniu działania siły deformującej *lamina cribrosa* powraca do pozycji wyjściowej w podobnym czasie, jak blaszka sitowata zdrowego oka podana działaniu tej samej siły. Efekt ten jest szczególnie widoczny w okresach 1-2 tygodni i 5-8 tygodni od czasu zadziałania podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego, gdy powrót do położenia wyjściowego zajmuje tkance blaszki sitowatej czas poniżej 2 minut (oko zdrowe potrzebuje na ten powrót około 90 minut) [Burgoyne C.F. i wsp., 2005(20)].

#### 4. KURCZLIWOŚĆ W KOMÓRKACH NIEMIĘŚNIOWYCH – ROLA AKTYNY MIĘŚNIÓWKI GŁADKIEJ I ALFA-AKTYNINY

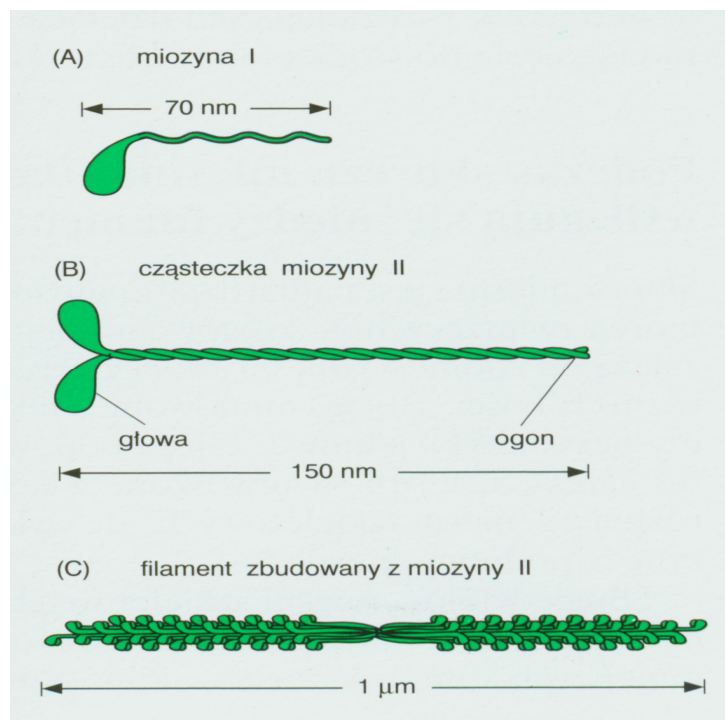
Wspólną cechą wszystkich typów komórek zawierających białka kurczliwe jest ich zdolność do odpowiadania skurczem na docierające do nich sygnały pobudzające

[ prof. dr hab. inż. Jan Mazerski, b. r. w. *Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów (57)* ] .

Podstawowy mechanizm przetwarzania energii wiązań chemicznych w mechaniczną energię skurczu jest we wszystkich komórkach kurczliwych podobny. Jest on następstwem oddziaływań pomiędzy znajdującymi się w komórkach wyspecjalizowanymi białkami kurczliwymi: aktyną i miozyną.

##### **Miozyna**

Wszystkie aktynozależne białka motoryczne należą do rodziny miozyn. Wiążą one i hydrolizują ATP, co dostarcza energii do ich ruchu wzdłuż filamentu od końca minus do końca plus. Znamy obecnie wiele typów miozyny. Najbardziej popularne z nich to miozyna I i miozyna II (Ryc. 25).



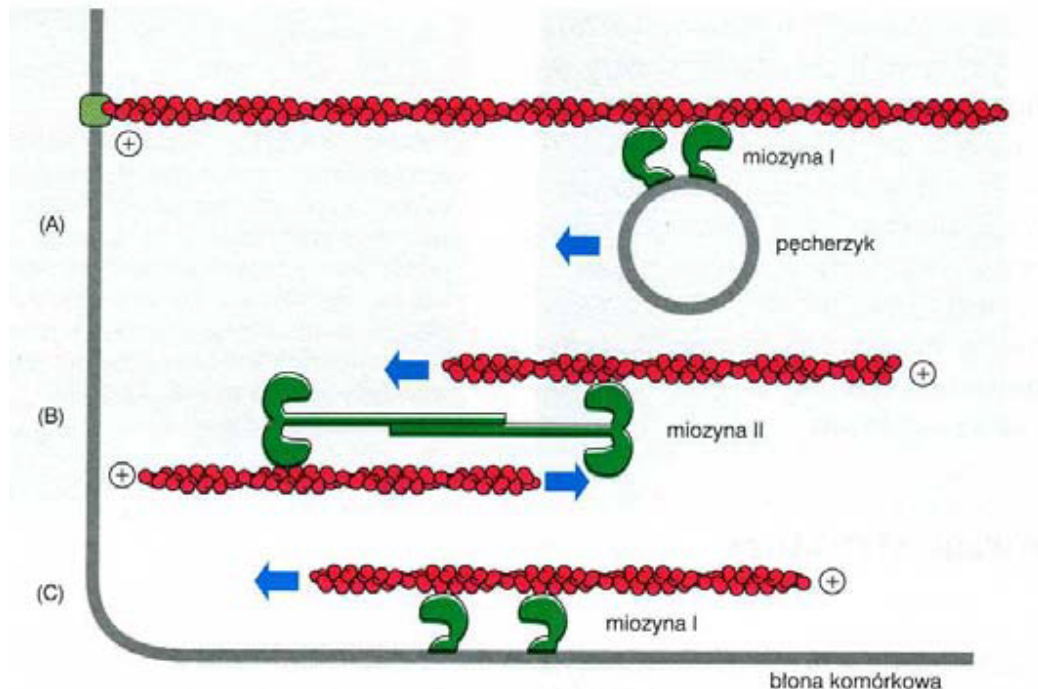
Ryc. 25. Budowa miozyny I, cząsteczki miozyny II i filamentu miozyny II.

Źródło: Mazerski J., b. r. w. *Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów.*

- Miozyna I występuje we wszystkich typach komórek. Jej cząsteczka ma pojedynczą główkę i helikoidalny ogon. Domena głowy wchodzi w interakcję z filamentami aktynowymi i dzięki hydrolizie ATP wykazuje aktywność motoryczną. Dzięki naprzemiennemu wiązaniu i odłączaniu się od filamentu przemieszcza się wzdłuż niego. Ogon różni się w różnych klasach miozyny I i określa, jakie składniki komórki są transportowane przez daną klasę białek.

- Miozyna II jest zbudowana z pary identycznych cząsteczek utrzymywanych razem dzięki tworzeniu przez ich ogony struktury typu superhelisy. Taki dimer zawiera więc dwie głowy o aktywności ATP-azy. Ogony cząsteczek miozyny II nie wiążą się z innymi strukturami komórkowymi, wykazują za to dużą skłonność do łączenia się z innymi dimerami, tworząc filamety miozynowe.

Końcowy fragment ogona miozyny I ma charakter lipofilowy i chętnie oddziałuje z błonami lipidowymi (Ryc. 26). Dlatego też miozyna I może transportować pęcherzyki lipidowe (A). Może również zakotwiczać się w błonie komórkowej, przemieszczając filament względem reszty komórki (C). Filamety zbudowane z miozyny II mogą przesuwac filamety aktynowe względem siebie, co umożliwia funkcjonowanie takiego kompleksu jako pęczka lub pierścienia kurczliwego (B).



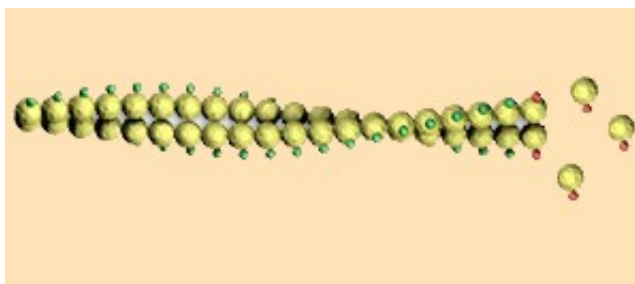
Ryc. 26. Funkcje kompleksów aktyna-miozyna.

Źródło: Mazerski J., b. r. w. Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów.



## ***Aktyna***

Aktyna to białko kurczliwe mięśni, o masie cząsteczkowej 42 300, zbudowane z 375 reszt aminokwasowych. Występuje w formie globularnej, jako aktyna G, i w formie fibrylarnej (włókienkowej), jako aktyna F. Aktyna G jest ATP-azą i składa się z dwóch części, między którymi znajduje się szczelina wiążąca ATP (lub ADP). Aktyna F tworzy nici o średnicy 6-7 nm i jest głównym składnikiem filamentów cienkich (Ryc. 27).



Ryc. 27. Monomery oraz cząsteczka aktyny.

Źródło: Mazerski J., b. r. w. Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów.

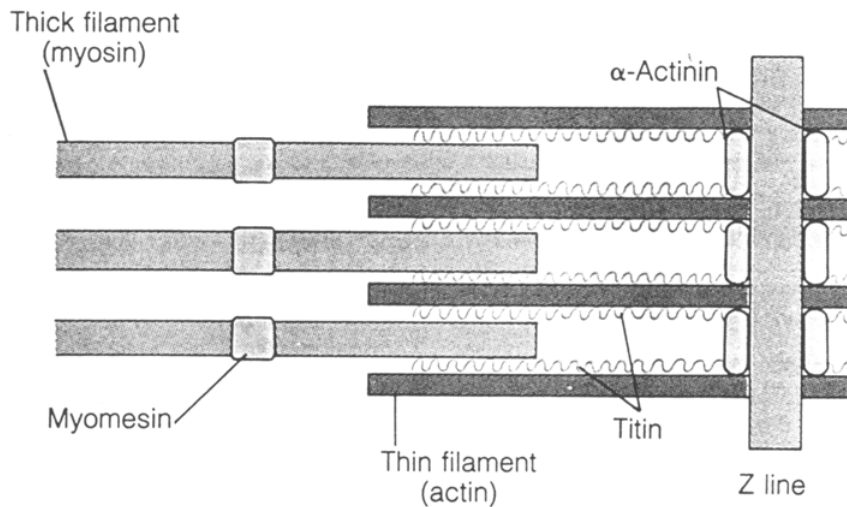
Wolny monomer aktynowy związany jest trwale (kowalencyjnie) z ATP. Wkrótce po przyłączeniu do filamentu dochodzi do hydrolizy ATP do ADP. Zmniejsza to powinowactwo monomerów do siebie i ułatwia późniejszy demontaż filamentu. Nagi filament aktynowy, bez białek towarzyszących, jest stosunkowo niestabilny i może depolimeryzować z obu końców. Cząsteczki ADP pozostają uwięzione w obrębie filamentu i nie mogą być ponownie przeprowadzone w ATP. Jest to możliwe dopiero w cytozolu po oddysocjowaniu aktyny od filamentu.

Aktyna mięśniówki gładkiej jest strukturalną proteiną, tworzącą aparat kurczliwy komórki miofibroblastów, kodowaną genem ACTA2 (lokalizacja 10q22-q24). Jest ona ich głównym markerem [Nagamoto T. i wsp., 2000(67)].

### ***Białka wiążące się z aktyną***

W komórkach znajduje się ogromna różnorodność białek zdolnych do wiązania się z filamentami aktynowymi. Takim białkiem cytoszkieletu, wiążącym aktynę, jest np. alfa-aktynina. Należy ona do superrodziny spektryn. Ma formę dimeru posiadającego na swoich końcach domeny wiążące aktynę. W komórkach mięśniówki gładkiej pełniąc funkcję stabilizacyjną względem aparatu kurczliwego. W innych typach komórek alfa-aktynina położona jest wzdłuż filamentów aktynowych oraz w punktach adhezji komórkowej. Poprzez powiązanie z licznymi molekułami sygnałowymi, receptorowymi oraz kanałami jonowymi,

alfa-aktynina pełni bardzo ważną rolę w organizacji cytoszkieletu oraz aparatu kurczliwego komórek (Ryc. 28).



Ryc. 28. Rola alfa-aktyniny w stabilizacji filamentów aktynowych

Źródło: Becker i wsp., Rozdział 23. Cellular movement and contractility. Course 1, Vinona State University. E-course.

Czynnikiem inicjującym skurcz aktynomiozyny jest fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny przez zależną od kalmoduliny i wapnia kinazę lekkich łańcuchów miozyny.

Wiele komórek posiada zdolność spontanicznego wytwarzania potencjałów czynnościowych, przenoszonych z komórki na komórkę dzięki niskooporowym połączeniom międzykomórkowym.

Pobudzenie komórki może powstać albo na skutek zdepolaryzowania błony komórkowej przez impuls elektryczny przekazany z innej komórki lub w wyniku oddziaływania substancji chemicznej, powodującej pobudzenie receptorów błonowych.

Zdepolaryzowanie błony prowadzi do skurczu poprzez sprzężenie elektromechaniczne. Depolaryzacja błony komórkowej powoduje otwarcie kanałów wapniowych, zależnych od napięcia, co wywołuje napływ wapnia z przestrzeni pozakomórkowej do cytoplazmy. Napływający wapń może uwalniać wapń zmagazynowany w strukturach wewnątrzkomórkowych, co wzmacnia wzrost stężenia wapnia w myoplazmie. W tych warunkach kalmodulina wiąże się z jonami wapnia i aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny. Fosforylacja miozyny rozpoczyna proces przemieszczania się miofilamentów, co prowadzi do skurczu.

W przypadku pobudzenia skurczu w wyniku działania na receptor błonowy ciąg zdarzeń prowadzących od pobudzenia receptora do reakcji w postaci skurczu nosi nazwę sprzężenia farmakomechanicznego. Agonista pobudza skurcz przez oddziaływanie na receptor błonowy.

Także komórki niebędące komórkami mięśniowymi zawierają włókna stresowe (*stress fibres*) – pęczki aktynomiozyny będące głównymi mediatorami kurczliwości komórkowej. Można je porównać z wysoko zorganizowanymi strukturami aktynomiozynowymi w komórkach mięśniowych.

Nazwa „włókna stresowe” – wynikała z pierwotnych przypuszczeń, według których były strukturami powstałymi na skutek napięć działających na protoplazmę komórki. Dalsze badania wykazały, że są one strukturami zdolnymi do skurczu, zbudowanymi z 10-30 filamentów aktynowych, stabilizowanych periodycznymi wiązaniami z  $\alpha$ -aktyniną [Pellegrin S., 2007(69)].

Potwierdzenie obecności aktyny mięśniówki gładkiej oraz białka, które ją wiąże –  $\alpha$ -aktyniny – w danej komórce/tkance wskazywać będzie na potencjał danej komórki/tkanki do aktywnej zmiany swojego kształtu, a więc na jej kurczliwość.

## 5. OD WIEDZY DO PYTAŃ

W okresie pierwszych 3 miesięcy działania na blaszkę sitowatą twardówki podwyższonych sił rozciągających zachowuje się ona jednak w sposób, który nie do końca można wyjaśnić zjawiskiem nadpodatności wynikającym z uszkodzenia jej elementów elastycznych.

Zastanawiający jest fakt, że pomimo potwierdzonej doświadczalnie obecności uszkodzenia strukturalnego tkanki łącznej blaszka sitowata twardówki po zakończeniu działania sił odkształcających powraca do swojej pierwotnej lokalizacji, co nie powinno mieć miejsca. Co więcej, wraca do pierwotnego stanu w czasie krótszym niż tkanka zdrowej blaszki sitowatej. Co powoduje takie zachowanie blaszki sitowatej, skoro nie właściwości jej tkanki podporowej? Czy za ten fenomen mogą odpowiadać kurczliwe elementy komórkowe tej tkanki?

Blaszka sitowata twardówki – poprzez swoją rolę w homeostazie tkanki nerwu wzrokowego – oraz beleczkowanie na skutek bezpośredniego wpływu na wartość ciśnienia wewnątrzgałkowego, są przyczynowo bezpośrednio związane z procesami warunkującymi rozwój neuropatii jaskrowej [Varela H.J., Hernandez M.R., 1997(103)].

Czy poza powyższym powiązaniem patofizjologicznym tych tkanek w patogenezie neuropatii jaskrowej obecne są jeszcze jakieś inne ich zależności czy podobieństwa?

W strukturze gałki ocznej blaszka sitowata twardówki oraz beleczkowanie są strukturami o najbardziej zbliżonym do siebie fenotypie i genotypie. Ich zgodność genotypowa sięga ponad 97% [Steely T.H., 2000(94)]. Podobieństwa tych tkanek dotyczą także procesu ich embriogenezy (pochodzenie – grzebień nerwowy oraz początek kształtowania się w okresie płodowym – 12. tydzień), a ich praktyczna jednorodność morfologii jest znana prawdopodobnie każdemu okuliście (podobieństwo jest szczególnie uderzające w obrazach pochodzących z mikroskopu skaningowego).

Powstaje zatem pytanie, czy struktury blaszki sitowatej twardówki, poza podobieństwem genotypowym, wykazują także ze strukturami beleczkowania podobieństwo fenotypu czynnościowego? Pytając wprost: Czy czynnikiem warunkującym powrót blaszki sitowatej twardówki do pierwotnej lokalizacji pomimo uszkodzenia jej elementów łącznotkankowych w oczach wykazujących nadpodatność, jest obecność w jej strukturze elementów mających zdolność do aktywnego skurczu?

## 6. CEL PRACY

### **Podstawowy:**

Immunohistochemiczna ocena obecności alfa-aktyniny i aktyny mięśniówki gładkiej w blaszce sitowatej twardówki oczu z neuropatią jaskrową, zależną od podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego.

Aktywny skurcz elementów komórkowych organizmów, warunkowany jest obecnością w ich strukturze białek kurczliwych, takich jak aktyna mięśniówki gładkiej oraz ich elementów podporowych, jak na przykład  $\alpha$ -aktynina. Celem podstawowym powyższej pracy jest więc odpowiedź na pytanie: Czy w obrębie blaszki sitowatej twardówki oczu z neuropatią jaskrową, zależną od podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego, występują elementy komórkowe, zawierające w swojej strukturze powyższe białka kurczliwe? Pośrednio jest to odpowiedź na pytanie: Czy blaszka sitowata twardówki oczu z neuropatią jaskrową może prezentować cechy tkanki kurczliwej?

Odpowiedź na to pytanie stanowi istotę niniejszego badania.

### **Cele wtórne (własne):**

Zrozumienie mechanizmów nadpodatności blaszki sitowatej twardówki w oczach z początkową neuropatią jaskrową może znaleźć potencjalne zastosowanie w analizie danych obrazowania tarczy nerwu wzrokowego i blaszki sitowatej twardówki z zastosowaniem HD OCT w ocenie ryzyka konwersji nadciśnienia ocznego do neuropatii jaskrowej oraz ocenie efektywności terapii neuropatii jaskrowej.

## 7. METODYKA BADANIA

### 7.1. GRUPY BADANIA: KRYTERIA KWALIFIKACJI KLINICZNEJ

#### A. Grupa badana:

- brak poczucia światła,
- kwalifikacja do enukleacji z powodu nie reagującej na terapię, bolesnej neuropatii jaskrowej,
- wysokie ciśnienie wewnątrzgałkowe ( $> 30$  mmHg) w momencie enukleacji.

#### B. Grupa kontrolna:

- oko zakwalifikowane do enukleacji z powodu obecności wewnątrzgałkowego procesu rozrostowego, niekwalifikującego się do innej metody terapii z powodu stopnia zaawansowania,
- tarcza nerwu wzrokowego nie objęta przez proces rozrostowy,
- brak cech neuropatii jaskrowej oraz IOP  $< 21$  mmHg w okresie obserwacji/historii medycznej.

Grupę pierwotną badania, spełniającą powyższe kryteria, stanowiło trzydzieści oczu enukleowanych z powodu dokonanej neuropatii jaskrowej oraz trzydzieści gałek ocznych enukleowanych z powodu guza wewnątrzgałkowego. Przeprowadzono następnie opracowanie histologiczne enukleowanych gałek ocznych oraz kwalifikację histologiczną preparatów.

### 7.2. KRYTERIA KWALIFIKACJI HISTOLOGICZNEJ (po procesie preparatyki histologicznej):

#### A. Grupa badana:

- dokładna wizualizacja blaszki sitowatej twardówki w przekroju osiowym, bez cech jej mechanicznego uszkodzenia/sfałdowania,
- możliwość oceny czterech pól o powiększeniu 200x, w obrębie jednej blaszki sitowatej,
- wykładniki histologiczne neuropatii jaskrowej.

#### B. Grupa kontrolna:

- dokładna wizualizacja blaszki sitowatej twardówki w przekroju osiowym, bez cech jej mechanicznego uszkodzenia/sfałdowania,
- możliwość oceny czterech pól o powiększeniu 200x, w obrębie jednej blaszki sitowatej,
- brak wykładników histologicznych nacieku blaszki sitowatej przez wewnątrzgałkowy proces rozrostowy,
- brak wykładników histologicznych neuropatii jaskrowej.

Z pierwotnej grupy gałek ocznych kryteria kwalifikacji do dalszej obróbki immunohistochemicznej spełniło:

A. Grupa badana: 8 oczu 8 pacjentów.

B. Grupa kontrolna: 7 oczu 7 pacjentów.

Głównymi obecnymi kryteriami dyskwalifikującymi były:

- brak prawidłowej wizualizacji struktur lub nieprawidłowy przekrój blaszki sitowatej twardówki z jej mechanicznym uszkodzeniem oraz brak możliwości uzyskania prawidłowych osiowych przekrojów tkanki tarczy nerwu wzrokowego w kolejnych jej sekcjach (grupa badana: 14 oczu / grupa kontrolna: 16 oczu),
- naciek struktur nerwu wzrokowego poprzez proces rozrostowy (grupa badana: 0 oczu / grupa kontrolna: 1 oko),
- pęknięte szkiełko nakrywkowe uniemożliwiające wiarygodną ocenę preparatu (grupa badana: 3 oczu / grupa kontrolna: 2 oczu),
- zbyt mały obszar blaszki sitowatej preparatu uniemożliwiający jej ocenę w czterech polach o powiększeniu 200x (grupa badana 5 oczu/ grupa kontrolna 4 oczu).

Do ostatecznej analizy immunohistologicznej zakwalifikowano:

A. Grupa badana: 8 oczu 8 pacjentów.

B. Grupa kontrolna: 7 oczu 7 pacjentów.

### 7.3. OPRACOWANIE HISTOLOGICZNE MATERIAŁU

Materiał tkankowy utrwalono w 10% buforowanej formalinie i umieszczono w procesorze tkankowym. Następnie zatopiono w parafinie w temperaturze 58° C według klasycznych metod histologicznych. Z bloczków parafinowych skrojono skrawki o grubości 4-5 µm, a następnie nałożono je na szkiełka adhezyjne. Skrawki trzymano w ciepłarni przez 2 godziny w temperaturze 58° C.

### 7.4. METODYKA IMMUNOHISTOCHEMICZNA

Zastosowano metody immunoperoksydazowe, dwustopniowe, z kompleksem EnVision/HPR.

Odczynniki:

1. TBS – sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris/HCL o pH 7,6 (Tris-Buffered Saline; firmy DAKO; Code: S 1968).

Przygotowanie: substancję rozpuszczono w wodzie destylowanej do objętości 5 litrów.

2. 10 mM bufor cytrynianowy o pH 2.

Skład:

A. 0,1 M roztwór kwasu cytrynowego przygotowano przez rozpuszczenie 21,01 g  $C_6H_8O_7$  w 1000 ml wody destylowanej.

B. 0,1 M roztwór cytrynianu sodowego przygotowano przez rozpuszczenie 29,41 g  $C_6H_8O_7$  w 1000 ml wody destylowanej,

C. Roztwór roboczy przygotowano przez dodanie 9 ml roztworu A do 41 ml roztworu B i uzupełniono do 500 ml wodą destylowaną.

3. Bufor EDTA o pH 9,0 (*Target Retrieval Solution 10x Concetrate* (ang.); firmy DAKO; Code: S2367).

4. Bufor Epitope Retrieval Solution 10x Concentrate o pH 6,0 (firmy DAKO; Code: K5204).

5. DAB (3'3-diaminobenzzydina; firmy DAKO; Code: K3466).

Roztwór DAB przygotowano bezpośrednio przed użyciem.

6. 1 % roztwór albuminy, otrzymany przez rozpuszczenie 1 g albuminy w 100 ml buforu TBS

7. Hematoksylina Mayer'a.

8. Pertex Mounting Medium; (Nr 00811; firma HistoLab) – medium do zatapiania szkiełek nakrywkowych.

Immunoreagenty:

1. Monoklonalne przeciwciało mysie przeciw aktynie mięśniówki gładkiej; Klon 1A4, DAKO.

2. Monoklonalne przeciwciało mysie przeciw alfa-aktynie; Klon 4D10, Merck Millipore

#### 7.5. METODYKA OCENY ILOŚCIOWEJ PREPARATÓW

Badania immunohistochemiczne przeprowadzone zostały przez dr. n. med. Pawła Kurzawę.

Ilościowa (procentowa) ocena komórek zawierających białka kurczliwe dokonywana była na podstawie stosunku sumy komórek blaszki sitowatej, wykazujących pozytywną reakcję przeciwko alfa-aktynie lub aktynie mięśniówki gładkiej, względem liczby wszystkich komórek blaszki sitowatej obecnych w czterech polach widzenia jednego preparatu przy powiększeniu 200x. Oceniano procentowy udział komórek SMA+ lub alfa-aktynina+ w poszczególnych blaszkach sitowatych oraz sumaryczny procentowy udział w danej grupie badawczej.



Cyframi od 1 do 4 oznaczono dla danego preparatu cztery pola obserwacji mikroskopu świetlnego o powiększeniu 200x. W każdym z powyższych pól danego preparatu oznaczono liczbę wszystkich widocznych komórek blaszki sitowatej oraz liczbę komórek wykazujących pozytywną reakcję immunohistochemiczną na aktyne mięśniówki gładkiej lub na alfa-aktynę.

Dla każdego preparatu oceniano następnie sumaryczną liczbę wszystkich komórek blaszki sitowatej oraz sumaryczną liczbę wszystkich komórek blaszki sitowatej, pozytywnych względem aktyny mięśniówki gładkiej lub  $\alpha$ -aktyny. Liczbę komórek pozytywnych względem antygeny SMA stanowiła dla danego preparatu suma wszystkich pozytywnych immunohistochemicznie względem aktyny mięśniówki gładkiej komórek blaszki sitowatej w obszarach obserwacji od 1 do 4, analogicznie dla  $\alpha$ -aktyny – suma wszystkich pozytywnych immunohistochemicznie względem alfa-aktyny komórek blaszki sitowatej w obszarach obserwacji od 1 do 4 danego preparatu.

Następnie po uzyskaniu powyższych danych oceniano bezwzględny odsetek SMA pozytywnych i  $\alpha$ -aktyna pozytywnych komórek blaszki sitowatej w danym preparacie. Oznaczono go jako stosunek SMA+ lub alfa-aktyna+ komórek do całkowitej liczby komórek blaszki sitowatej danego preparatu. Wartości liczbowe tych ilorazów stanowiły pierwotny wynik analizy, nazwany w tabelach stosunkiem liczby komórek pozytywnych do liczby komórek.

Jako końcowy wynik badania przyjęto bezwzględny odsetek komórek immunohistochemicznie pozytywnych względem aktyny mięśniówki gładkiej lub  $\alpha$ -aktyny w całych grupach badawczych.

#### *Metodyka statystyczna*

Do opracowania wyników badań użyto arkuszy kalkulacyjnych programu Excel, pakietu MS Office 2003.

Wyniki badań zweryfikowano najpierw pod kątem zgodności z rozkładem normalnym przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Dane wykazały zgodność z rozkładem normalnym. Z tego powodu możliwe było zastosowanie testów parametrycznych do porównania wyników ekspresji przeciwciał w badanych podgrupach.

Wariancje wyników (kwadrat odchylenia standardowego) w badanych grupach weryfikowano testem F-Snedecora-Fishera, a następnie wartości średnie weryfikowano testem t-Studenta dla grup niezależnych. Wyniki uznano jako istotne statystycznie przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 10 (StatSoft, Inc.).

## 8. WYNIKI

W grupie neuropatii jaskrowej analizie immunohistochemicznej poddano 16 preparatów spełniających kryteria badawcze, pochodzące z 8 gałek ocznych, a w grupie kontrolnej 14 preparatów z 7 gałek ocznych – po jednym preparacie dla oceny SMA i jednym dla oceny obecności alfa-aktyniny w komórkach blaszki sitowatej dla każdej gałki ocznej.

Pierwotna analiza dotyczyła bezwzględnej zawartości SMA lub  $\alpha$ -aktynina pozytywnych komórek w poszczególnych preparatach.

## Grupa badana (z neuropatią jaskrową)

Tabela 2.

PREPARAT PRZECIWIĄŁO	JASKRA TYP CZAS TRWANIA- LATA	PIEĆ	WIEK	POLE OBSERWACJI NR 1		POLE OBSERWACJI NR 2		POLE OBSERWACJI NR 3		POLE OBSERWACJI NR 4		ŁĄCZNIE POLA OBSERWACJI NR1,2,3,4		STOSUNEK LICZBY KOMÓREK POZYTYWNYCH DO LICZBY KOMÓREK
				LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	
A-21102 SMA	PACG 5	K	81	26	16	32	16	48	14	26	3	132	49	0,37
A-21102 AKTYNINA				26	12	34	11	32	10	25	26	117	59	0,50
A-35776 SMA	SACG 45	M	73	26	9	36	12	32	12	28	9	122	42	0,34
A-35776 AKTYNINA				32	21	34	25	31	19	31	17	128	82	0,64
A-35778 SMA	PACG 4	M	49	58	2	72	5	56	4	64	1	250	12	0,05
A-35778 AKTYNINA				41	29	44	32	52	32	36	28	173	121	0,7
A-36486 SMA	SACG 2	M	7	24	4	28	2	26	2	25	5	103	13	0,13
A-36486 AKTYNINA				28	5	26	8	32	9	38	8	124	30	0,24
A-39622 SMA	SACG 6	M	8	26	2	31	2	26	1	28	2	111	7	0,06
A-39622 AKTYNINA				34	14	44	19	32	14	36	14	146	61	0,42
A-32424 SMA	SACG 18	K	18	62	21	44	11	52	14	64	18	222	64	0,29
A-32424 AKTYNINA				42	1	52	2	45	1	48	2	187	6	0,03
32737 SMA	POAG NA	NA	NA	72	5	104	7	49	3	56	7	281	22	0,08
32737 AKTYNINA				76	9	46	9	44	12	53	10	219	40	0,18
40191 SMA	POAG NA	NA	NA	56	3	49	2	48	2	48	2	201	9	0,04
40191 AKTYNINA				52	3	49	4	66	6	56	5	223	18	0,08

Tabela 2. Dane biometryczne i liczbowe dotyczące oceny immunohistochemicznej komórek blaszki sitowatej twardówki oczu z neuropatią jaskrową.

Tabela 3.

	CAŁKOWITA LICZBA KOMOREK Grupa 1 i 2	KOMORKI Z POZYTYWNA REAKCJA IMMUNOHISTOCHEMICZNA Grupa 1 i 2	PROCENTOWY UDZIAŁ KOMOREK WYKAZUJACYCH POZYTYWNA REAKCJE IMMUNOHISTOCHEMICZNA W ZALEJ POPULACJI KOMOREK BLASZKI SITOWATEJ
AV	171,19	39,89	23%
STDEV	55,89	32,06	

Tabela 3. Wartości średnie i ich odchylenia standardowe dla całkowitej populacji komórek blaszki sitowatej twardówki oraz procentowego udziału komórek alfa-aktynina+ i SMA+, w grupie oczu z neuropatią jaskrową.

Tabela 4.

GRUPA 1 vs. GRUPA 2	ŚREDNIA		ODCH. STD.		TEST F JEDNORO- DNOŚCI WARIANCJI	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU F	TEST T DLA ŚREDNICH	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU T
	GRUPA 1	GRUPA 2	GRUPA 1	GRUPA 2				
CAŁK. AKTYNINA+ vs. CAŁK. SMA+	52,13	27,25	37,21	21,54	2,98	0,17	-1,64	0,12
CAŁK. AKTYNINA vs. CAŁK. SMA	164,63	177,75	42,33	69,31	2,68	0,22	-0,46	0,65
%AKTYNINA+ vs. %SMA+	34,99	17,05	25,30	14,00	3,27	0,14	-1,75	0,10

Tabela 4. Wartości średnie, ich odchylenie standardowe oraz wyniki testów statystycznych dla poszczególnych grup danych wśród oczu z neuropatią jaskrową.

Grupa 1 – Tkanki oceniana pod kątem ekspresji antygenu alfa-aktyniny.

Grupa 2 – Tkanki oceniane pod kątem ekspresji antygenu SMA.

Całk. AKTYNINA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej AKTYNINA + w Grupie 1.

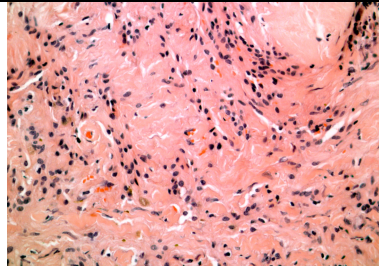
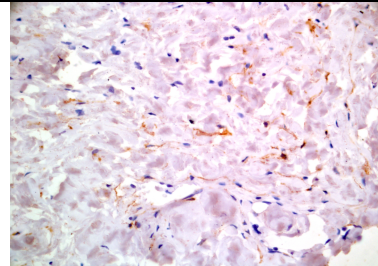
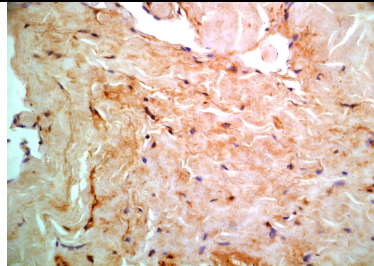
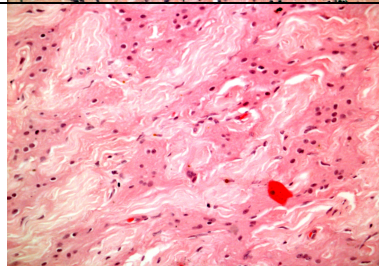
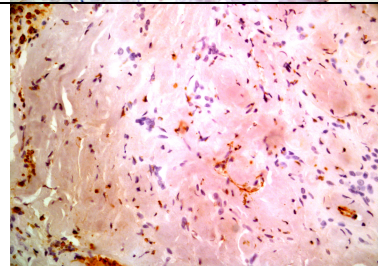
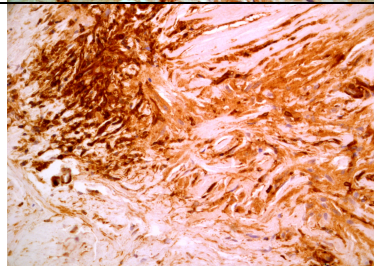
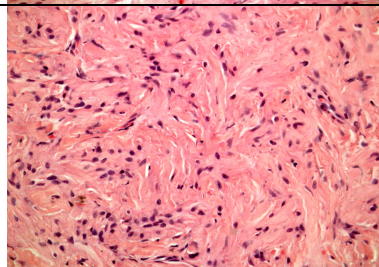
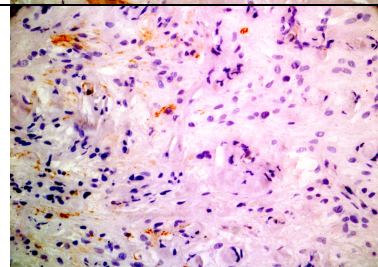
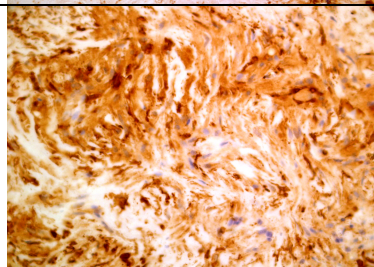
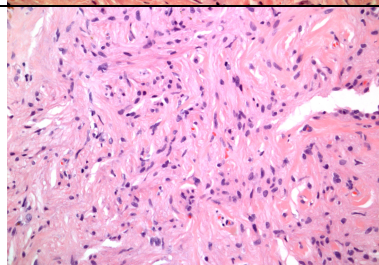
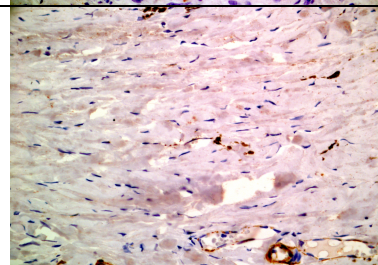
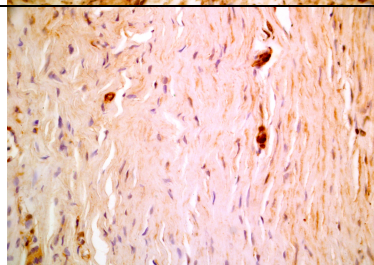
Całk. AKTYNINA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w Grupie 1.

Całk. SMA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej SMA + w Grupie 2.

Całk. SMA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w Grupie 2.

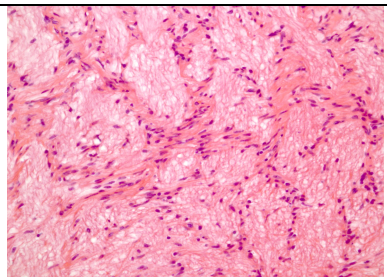
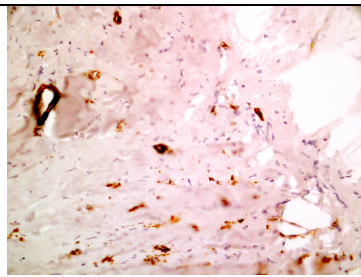
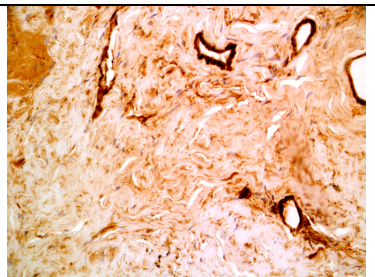
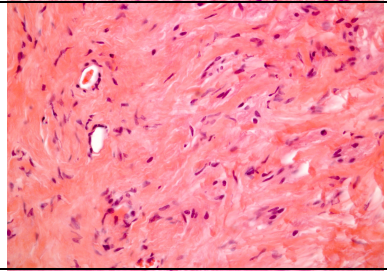
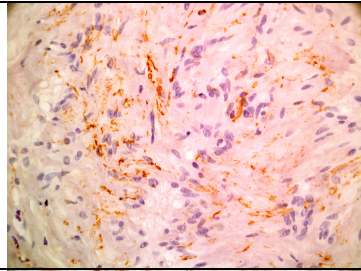
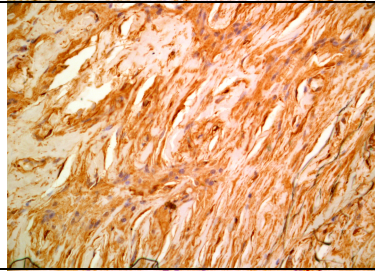
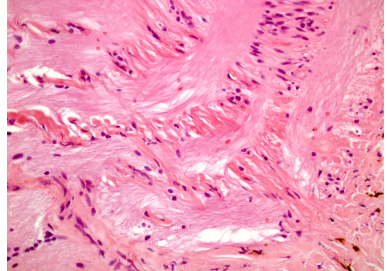
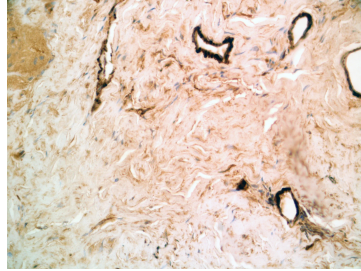
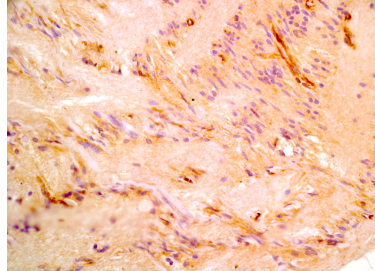
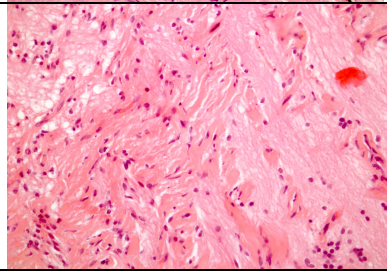
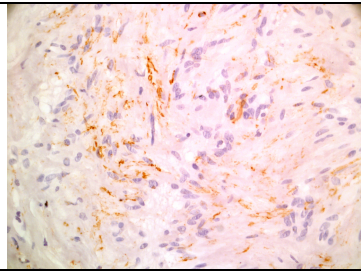
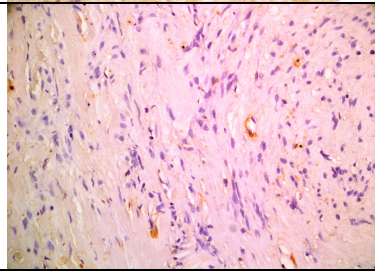
%AKTYNINA+ i %SMA+ – procentowy udział odpowiednio komórek AKTYNINA+ i SMA+ w odpowiednio Grupie 1 i 2.

Dokumentację fotograficzną preparatów z grupy neuropatii jaskrowej uwzględnionych w Tabeli 2 przedstawia rycina 29.

P R E P A R A T	H+E	SMA	$\alpha$ AKTYNINA
A 2 1 1 0 2			
A 3 5 7 7 6			
A 3 5 7 7 8			
A 3 6 4 8 6			



c.d.

P R E P A R A T	H+E	SMA	$\alpha$ AKTYNINA
A 3 9 6 2 2			
3 2 4 2 4			
3 9 7 3 7			
4 0 1 9 1			

Ryc. 29. Dokumentacja fotograficzna preparatów z grupy neuropatii jaskrowej uwzględniająca numer preparatu oraz typ reakcji immunohistochemicznej.

## Grupa kontrolna

Tabela 5.

PREPARAT PRZECIWOŁO	JASKRA TYP  CZAS TRWANIA- LATA	PLEĆ	WIEK	POLE OBSERWACJI NR 1		POLE OBSERWACJI NR 2		POLE OBSERWACJI NR 3		POLE OBSERWACJI NR 4		ŁĄCZNIE POLA OBSERWACJI NR1,2,3,4		STOSUNEK LICZBY KOMÓREK POZYTYWNYCH DO LICZBY KOMÓREK
				LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	LICZBA KOMÓREK	LICZBA KOMÓREK POZYTYWNYCH	
A-7860 SMA	LD	K		16	2	25	2	18	0	22	3	81	7	0,09
A-7860 AKTYNINA				52	10	31	6	24	3	51	8	158	27	0,17
A-18032 SMA	KJ	K		44	2	38	1	26	1	29	1	137	5	0,04
A-18032 AKTYNINA				30	8	30	4	28	5	24	5	112	22	0,2
A-35777 SMA	RR	M	59	42	1	52	1	56	1	62	2	212	5	0,02
A-35777 AKTYNINA				62	5	68	7	62	5	32	5	224	22	0,1
A-39273 SMA	ZJ	K	54	42	5	44	2	48	3	32	1	166	11	0,07
A-39273 AKTYNINA				28	18	32	14	29	20	42	28	131	80	0,61
A-40209 SMA	SI	K		29	2	26	1	31	1	36	1	122	5	0,04
A-40209 AKTYNINA				32	8	31	6	44	14	39	12	146	40	0,27
L-160358 SMA	KJ	K		36	2	34	2	41	3	42	2	153	9	0,06
L-160358 AKTYNINA				33	4	31	2	34	5	44	6	142	17	0,12
32423 SMA	BR	M		34	5	46	4	52	4	49	4	181	17	0,09
32423 AKTYNINA				52	9	82	3	56	4	48	4	238	20	0,08

Tabela 5. Dane biometryczne i liczbowe dotyczące oceny immunohistochemicznej komórek blaszki sitowatej twardówki oczu bez cech neuropatii jaskrowej.

Tabela 6.

	CAŁKOWITA LICZBA KOMÓREK Grupa 1 i 2	KOMÓRKI Z POZYTYWNA REAKCJA IMMUNOHISTOCHEMICZNA Grupa 1 i 2	PROCENTOWY UDZIAŁ KOMÓREK WYKAZUJĄCYCH POZYTYWNA REAKCJE IMMUNOHISTOCHEMICZNA W CAŁEJ POPULACJI KOMÓREK BLASZKI SITOWATEJ
AV	157,36	20,52	13%
STDEV	44,02	19,84	

Tabela 6. Wartości średnie i ich odchylenia standardowe dla całkowitej populacji komórek blaszki sitowatej twardówki oraz procentowego udziału komórek alfa-aktywnina+ i SMA+, w grupie oczu bez cech neuropatii jaskrowej.

Tabela 7.

GRUPA 1 vs. GRUPA 2	ŚREDNIA		ODCH. STD.		TEST F JEDNORO- DNOŚCI WARIANCJI	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU F	TEST T DLA ŚREDNICH	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU T
	GRUPA 1	GRUPA 2	GRUPA 1	GRUPA 2				
CAŁK. AKTYNINA+ vs. CAŁK. SMA+	32,57	8,43	22,21	4,43	25,14	0,00	-2,34	0,04
CAŁK. AKTYNINA vs. CAŁK. SMA	164,43	150,29	47,80	42,39	1,27	0,78	0,59	0,57
%AKTYNINA+ vs. %SMA+	22,20	5,81	18,34	2,62	49,19	0,00	-2,34	0,04

Tabela 7. Wartości średnie, ich odchylenie standardowe oraz wyniki testów statystycznych dla poszczególnych grup danych w oczach bez cech neuropatii jaskrowej.

Grupa 1 – Tkanki oceniana pod kątem ekspresji antygenu alfa-aktywniny.

Grupa 2 – Tkanki oceniane pod kątem ekspresji antygenu SMA.

Całk. AKTYNINA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej AKTYNINA+ w Grupie 1.

Całk. AKTYNINA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w Grupie 1.

Całk. SMA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej SMA+ w Grupie 2.

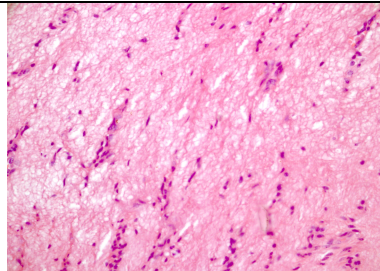
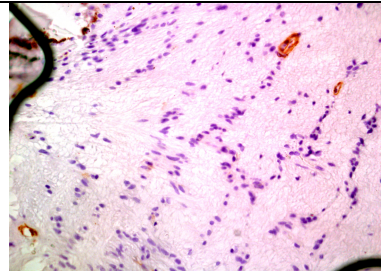
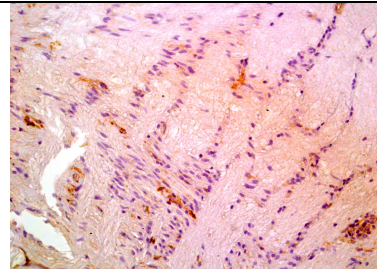
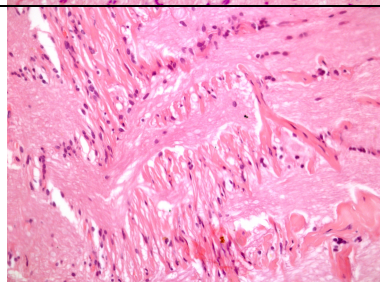
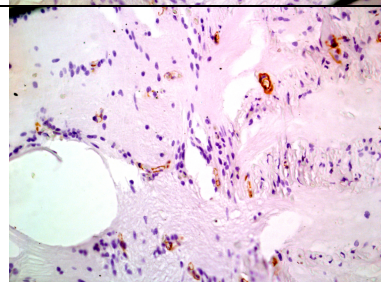
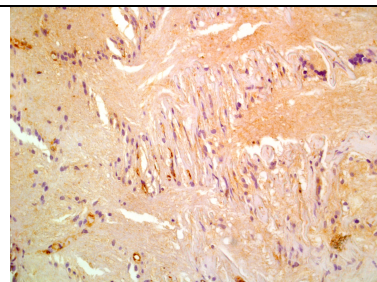
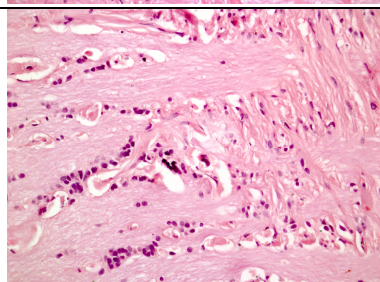
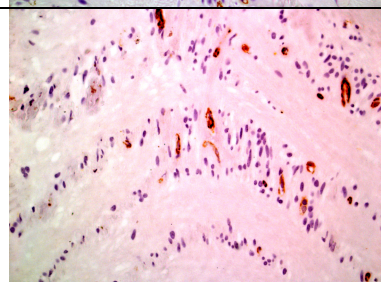
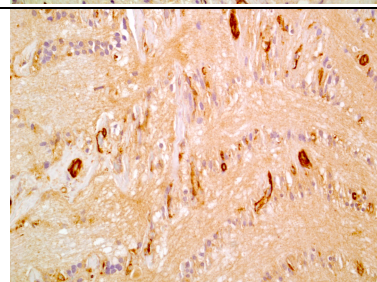
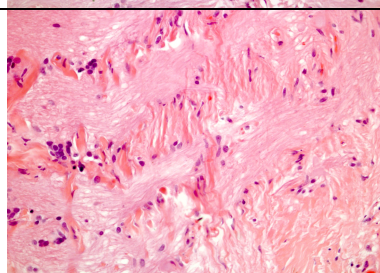
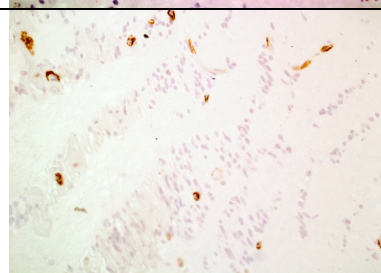
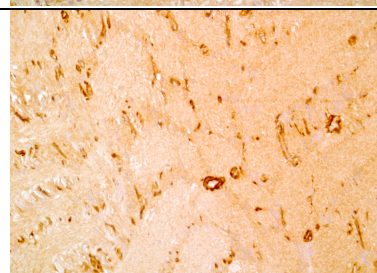
Całk. SMA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w Grupie 2.

%AKTYNINA+ i %SMA+ – procentowy udział odpowiednio komórek AKTYNINA+ i SMA+ w odpowiednio Grupie 1 i 2.

Wyniki istotne statystycznie przedstawione są w kolorze czerwonym.

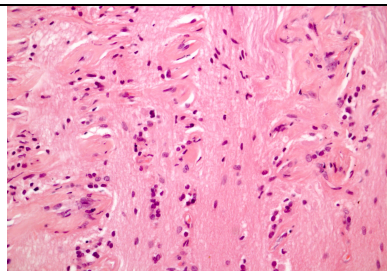
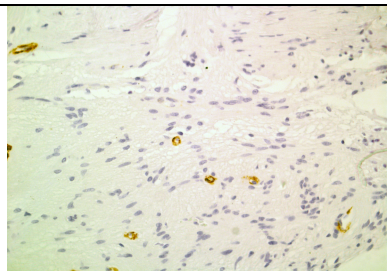
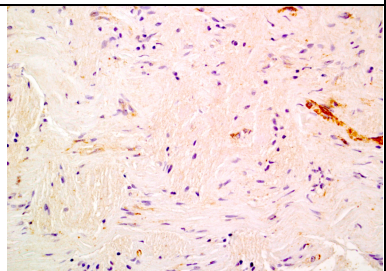
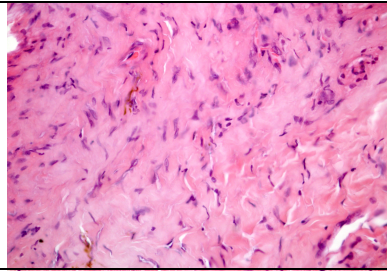
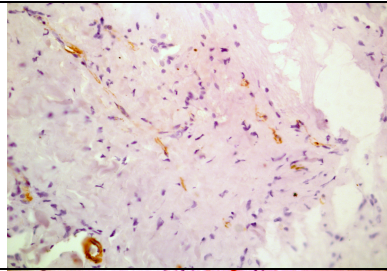
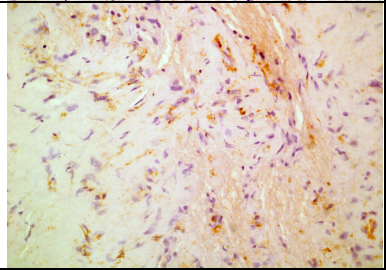
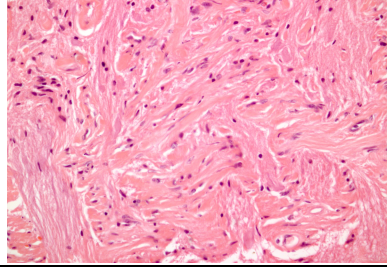
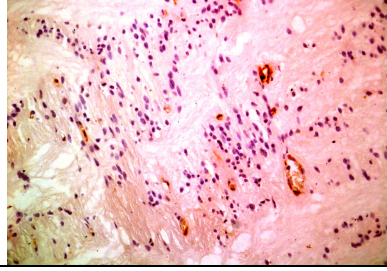
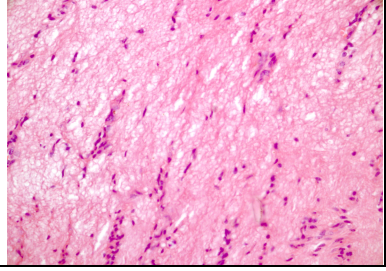


Dokumentację fotograficzną preparatów z grupy kontrolnej uwzględnionych w Tabeli 5 przedstawia Ryc. 30.

P R E P A R A T	H+E	SMA	$\alpha$ AKTYNINA
A 7 8 6 0			
A 1 8 0 3 2			
A 3 5 7 7 7			
A 3 9 2 7 3			



c.d.

P R E P A R A T	H+E	SMA	$\alpha$ AKTYNINA
A 4 0 2 0 9			
L 1 6 0 3 5 8			
3 2 4 2 3			

Ryc. 30. Dokumentacja fotograficzna preparatów z grupy kontrolnej, uwzględniająca numer preparatu oraz typ reakcji immunohistochemicznej.

**Podsumowanie statystycznej analizy danych grupy badanej i kontrolnej**

Tabela 8.

	ŚREDNIA		ODCH. STD.		LICZEBNOŚĆ N		TEST F JEDNORODNO SCI WARIANCJI	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU F	TEST T DLA ŚREDNICH	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU T
	NEUROPATIA JASKROWA	BEZ NEUROPATII JASKROWEJ	NEUROPATIA JASKROWA	BEZ NEUROPATII JASKROWEJ	NEUROPATIA JASKROWA	BEZ NEUROPATII JASKROWEJ				
<b>CAŁKOWITA AKTYNINA</b>	164,63	164,43	42,33	47,80	8	7	1,28	0,750	0,01	0,993
<b>CAŁKOWITA AKTYNINA+</b>	52,13	32,57	37,21	22,21	8	7	2,81	0,230	1,21	0,247
<b>CAŁKOWITA SMA</b>	177,75	150,29	69,31	42,39	8	7	2,67	0,252	0,91	0,380
<b>CAŁKOWITA SMA+</b>	27,25	8,43	21,54	4,43	8	7	23,65	0,001	2,26	0,042
<b>%AKTYNINA+</b>	34,99	22,20	25,30	18,34	8	7	1,90	0,451	1,11	0,289
<b>%SMA+</b>	17,05	5,81	14,00	2,62	8	7	28,65	0,001	2,08	0,049

**Tabela 8.** Podsumowanie statystycznej analizy danych grupy badanej i kontrolnej.

Całk. AKTYNINA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w preparatach Grup 1.

Całk. AKTYNINA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej AKTYNINA+ w preparatach Grup 1.

Całk. SMA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w preparatach Grup 2.

Całk. SMA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej SMA + w preparatach Grup 2.

%AKTYNINA+ i %SMA+ – procentowy udział odpowiednio komórek AKTYNINA+ i SMA+ w preparatach Grup 1 i 2.

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą z neuropatią jaskrową a grupą bez neuropatii jaskrowej (Tabela 8) dla całkowitej liczby komórek wykazujących ekspresję antygeny SMA i procentowego udziału tych komórek w populacji badanych tkanek.

Porównanie ekspresji dwóch antygenów SMA i alfa-aktyniny u pacjentów z neuropatią jaskrową i bez jej cech (Tabela 4 i 7) wykazało istotną statystycznie różnicę między prezentacją antygeny SMA oraz procentowym udziałem komórek SMA pozytywnych, tylko w podgrupie tkanek blaszki sitowatej bez cech neuropatii jaskrowej. W grupie z neuropatią jaskrową nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy z powodu dużego odchylenia standardowego dla pozytywnej ekspresji antygeny.

### ***Szczegółowa analiza danych grupy z cechami neuropatii jaskrowej***

Opis danych zawartych w Tabeli 2 i 3.

W grupie oczu z neuropatią jaskrową średnia liczba komórek blaszki sitowatej w preparacie wynosiła 171,19 komórki na preparat, odchylenie standardowe 55,89 komórki na preparat.

Komórki zawierające kurczliwe białka – aktynę mięśniówki gładkiej oraz  $\alpha$ -aktyninę stanowiły średnio 23% wszystkich komórek blaszki sitowatej w średniej liczbie 39,69 komórki/preparat, odchylenie standardowe 32,06 komórki/preparat.

W grupie preparatów oceniających zawartość  $\alpha$ -aktyniny w komórkach blaszki sitowatej oczu z neuropatią jaskrową (Grupa 1), średnia liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej wynosiła 164,63 komórki na preparat i wahała się w granicach od 117 do 223, odchylenie standardowe 42,33 komórki na preparat.

Odsetek komórek blaszki sitowatej pozytywnych immunohistochemicznie względem  $\alpha$ -aktyniny w tej grupie wyniósł średnio 32%. Średnia liczba komórek blaszki sitowatej zawierających  $\alpha$ -aktyninę wynosiła 52,13 komórki na preparat i wahała się w granicach od 6 do 121 (odchylenie standardowe 37,31 komórki/ preparat) co stanowiło 3 – 70% całkowitej populacji komórek.

W powyższej grupie zaobserwowano analogiczną odwrotną zależność odsetka komórek pozytywnych immunohistochemicznie do całkowitej liczby komórek blaszki sitowatej, podobnie jak w grupie SMA. W preparatach, w których liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki była poniżej wartości średniej (tj. poniżej 165 komórek/ preparat), odsetek komórek pozytywnych względem SMA był wyraźnie wyższy od średniej i wynosił 45%. Ten sam odsetek komórek w preparatach o liczbie wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki powyżej średniej zniżył się i wynosił średnio 24,75%.

W grupie preparatów oceniających zawartość aktywny mięśniówki gładkiej w komórkach blaszki sitowatej oczu z neuropatią jaskrową (Grupa 2), średnia liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej wynosiła 177,75 komórki na preparat i wahała się w granicach od 103 do 280, odchylenie standardowe 69,31 komórki/preparat.

Odsetek komórek blaszki sitowatej pozytywnych immunohistochemicznie względem aktywny mięśniówki gładkiej w tej grupie wyniósł średnio 15%. Średnia liczba komórek blaszki sitowatej zawierających SMA wynosiła 27,25 komórki na preparat i wahała się w granicach od 9 do 49 (odchylenie standardowe 21,54 komórki/preparat), co stanowiło od 4 do 37% całkowitej populacji komórek.

W preparatach, w których liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki była poniżej wartości średniej (tj. poniżej 178 komórek/ preparat), odsetek komórek pozytywnych względem SMA był wyraźnie wyższy od średniej i wynosił 22,5%. Ten sam odsetek komórek w preparatach o liczbie wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki powyżej średniej znamienne malal i wynosił średnio 11,5%.

#### ***Szczegółowa analiza danych grupy bez cech neuropatii jaskrowej***

Opis danych zawartych w Tabeli 5 i 6.

W grupie oczu bez cech neuropatii jaskrowej średnia liczba komórek blaszki sitowatej w preparacie wynosiła 157,36 komórki na preparat, odchylenie standardowe 44,02 komórki na preparat. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w liczebności komórek na preparat w porównaniu z grupą oczu z cechami neuropatii jaskrowej.

Komórki zawierające kurczliwe białka – aktywny mięśniówki gładkiej oraz  $\alpha$ -aktyninę – stanowiły średnio 13% wszystkich komórek blaszki sitowatej, tj. średnio 20,52 komórki na preparat, odchylenie standardowe 19,84 komórki/preparat. Wartość ta była statystycznie znamienne niższa w porównaniu z analogicznym odsetkiem w grupie oczu z cechami neuropatii jaskrowej.

W grupie preparatów oceniającej zawartość  $\alpha$ -aktyniny w komórkach blaszki sitowatej oczu z neuropatią jaskrową (Grupa 1), średnia liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej wynosiła 164,43 komórki na preparat i wahała się w granicach od 112 do 238, odchylenie standardowe 47,8 komórki/ preparat.

Odsetek komórek blaszki sitowatej pozytywnych immunohistochemicznie względem aktywny mięśniówki gładkiej w tej grupie wyniósł średnio 20%. Średnia liczba komórek blaszki sitowatej zawierających  $\alpha$ -aktyninę wynosiła 32,57 komórki na preparat i wahała się

w granicach od 17 do 80 (odchylenie standardowe 22,21 komórki/ preparat), stanowiąc od 8 do 61% całkowitej populacji komórek blaszki sitowatej.

W powyższej grupie zaobserwowano odwrotną zależność odsetka komórek pozytywnych immunohistochemicznie do całkowitej ilości komórek blaszki sitowatej (w przeciwieństwie do analogicznej grupy SMA). W preparatach, w których liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki była poniżej wartości średniej (tj. poniżej 165 komórek/preparat), odsetek komórek pozytywnych względem SMA był wyraźnie wyższy od średniej i wynosił 27,4%. Ten sam odsetek komórek w preparatach o liczbie wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki powyżej średniej znikomo mały i wynosił średnio 9%.

W grupie preparatów oceniających zawartość aktywności mięśniówki gładkiej w komórkach blaszki sitowatej oczu z neuropatią jaskrową (Grupa 2) średnia liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej wynosiła 150,29 komórki na preparat i wahała się w granicach od 81 do 212, odchylenie standardowe 42,39 komórki/preparat.

Odsetek komórek blaszki sitowatej pozytywnych immunohistochemicznie względem aktywności mięśniówki gładkiej w tej grupie wyniósł średnio 6% i był statystycznie znikomo niższy w porównaniu z analogicznym odsetkiem w grupie oczu z cechami neuropatii jaskrowej.

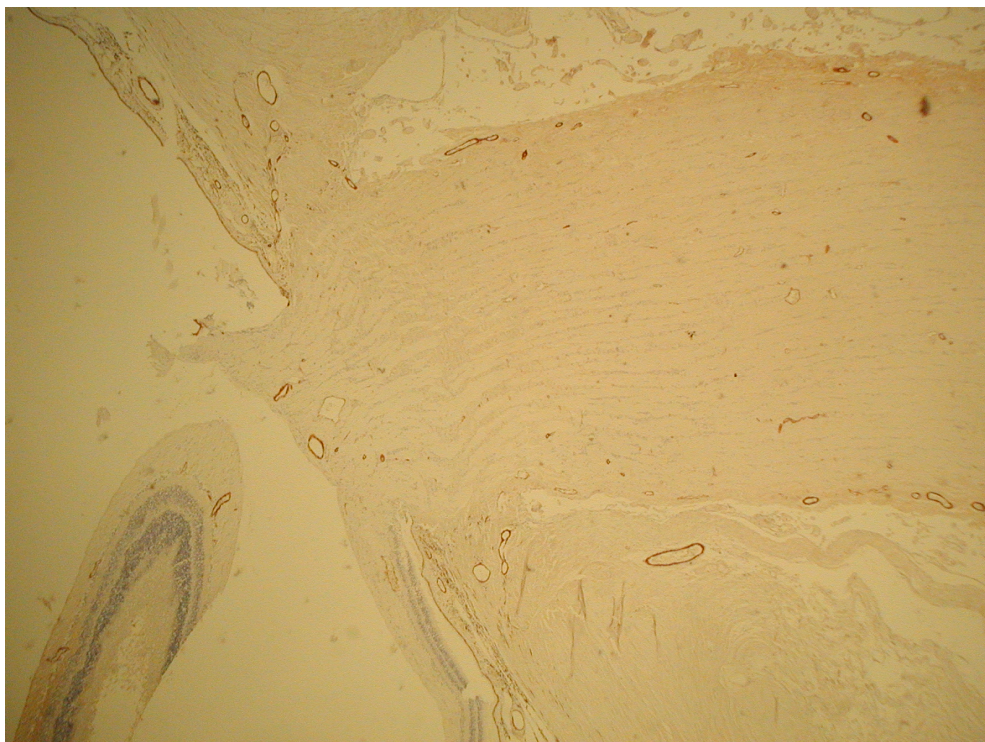
Średnia liczba komórek blaszki sitowatej zawierających SMA wynosiła 8,43 komórki na preparat i wahała się w granicach 5 do 17 (odchylenie standardowe 4,43 komórki/preparat), co stanowiło od 2 do 9% całkowitej populacji komórek.

W preparatach, w których liczba wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki była poniżej wartości średniej (tj. poniżej 150 komórek/ preparat), odsetek komórek pozytywnych względem SMA wynosił 5,7%. Ten sam odsetek komórek w preparatach o liczbie wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki powyżej średniej wynosił średnio 6% i nie różnił się od powyższego w sposób znikomy statystycznie.

W obu grupach – kontrolnej i badanej – nie stwierdzono zależności pomiędzy wiekiem, pacjenta a ilością komórek w obrębie blaszki sitowatej twardówki. Nie stwierdzono także zależności pomiędzy typem jaskry oraz czasem jej trwania a ilością komórek w obrębie blaszki sitowatej twardówki.

Ryciny 31, 32, 33 i 34 przedstawiają dokumentację fotograficzną przykładowych preparatów z grupy kontrolnej i badanej.



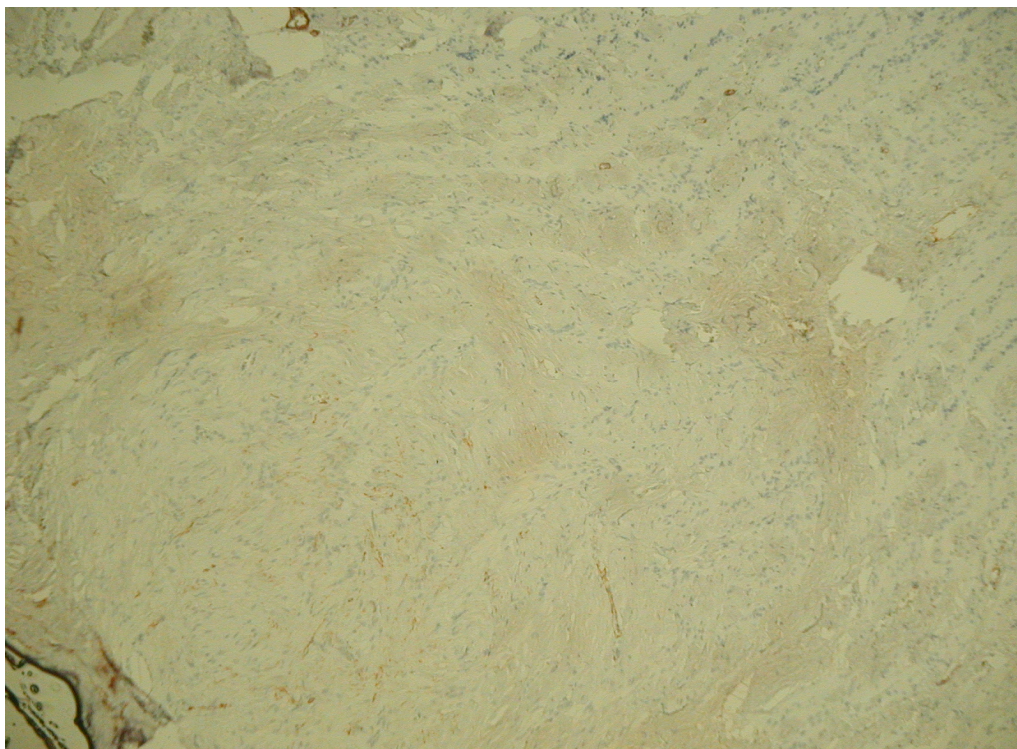


Ryc. 31. Fotografia preparatu: Grupa kontrolna, barwienie w kierunku SMA, powiększenie 50x.

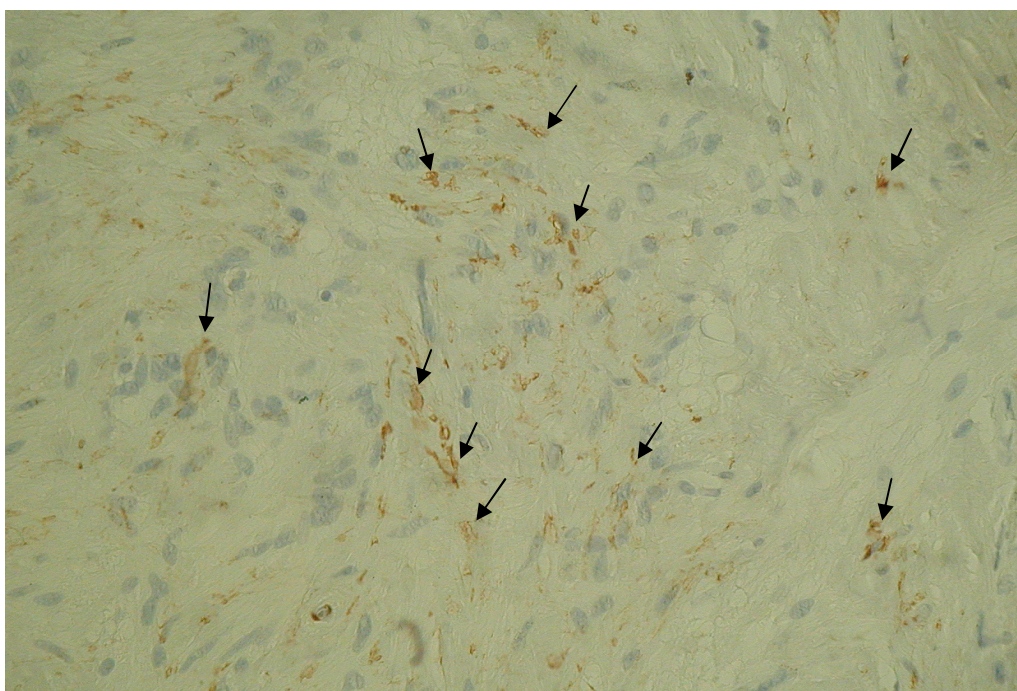


Ryc. 32. Fotografia preparatu z Ryc. 31, obszar blaszki sitowatej twardówki: powiększenie 200x, pojedyncze komórki o pozytywnej reakcji w kierunku SMA (oznaczono strzałkami).





Ryc. 33. Fotografia preparatu: Grupa badana, barwienie w kierunku SMA, powiększenie 50x.



Ryc. 34. Fotografia preparatu z Ryc. 33, obszar blaszki sitowatej twardówki: powiększenie 200x, liczne komórki o pozytywnej reakcji w kierunku SMA (oznaczono strzałkami).



## 9. DYSKUSJA

### 9.1. WSTĘP

Idea powyższej rozprawy powstała pod wpływem lektury:

- prac opisujących aktywne właściwości kurczliwe struktur beleczkowania oraz
- badań nad blaszką sitowatą twardówki w aspekcie jej morfologii, właściwości biomechanicznych, odpowiedzi *in vitro* jej składowych komórkowych na zmiany ciśnienia barycznego oraz podobieństw molekularnych względem innych tkanek oka.

Prace Murray'a [2004(66)], Johnsona [1996(46), 2000(47), 2007(48), 2009(49)] oraz Stumpff'a [2000(94)] uzmysłowiły autorowi niniejszej rozprawy potencjał aktywnej modyfikacji parametrów przepływu cieczy wodnistej, jaki jest możliwy dzięki moderacji napięcia beleczkowania.

Badania Hernandez [2000(39), 2008(40)] przybliżyły aspekty morfologii i patomorfologii blaszki sitowatej twardówki, związane z neuropatią jaskrową. Pozwoliły zwrócić uwagę autora na komórki astrogleju, ich specyficzne zachowanie się i szczególną rolę w patogenezie przebudowy blaszki sitowatej twardówki w przebiegu neuropatii jaskrowej.

Badania Bourgoyne'a [2001(18),2005(20),2008(21),2011(22)] w niesamowity i obrazowy sposób zbudowały podwaliny pod opis właściwości biomechanicznych i zachowania się twardówki i jej blaszki sitowatej w przebiegu jaskry.

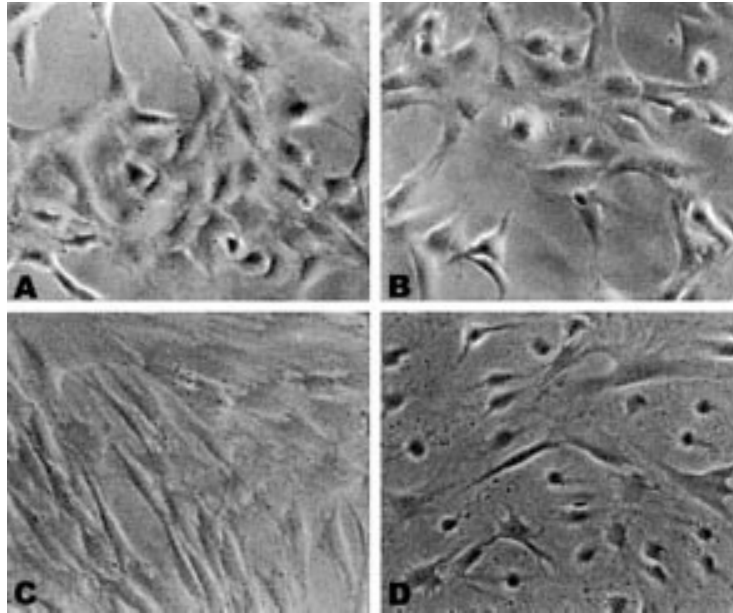
Prace Waxa [2000(101)] i Tezela [1997(95), 2001(96)] udokumentowały zmiany w morfologii oraz czynnościowy potencjał komórek astrogleju obecnych w blaszce sitowatej do zmiany kształtu w odpowiedzi na działające na nie siły (Ryc. 35).

Wreszcie pojawił się bezpośredni impuls do powstania tej pracy – artykuł Stelly'ego [2007(95)] dokumentujący najwyższe wśród tkanek oka, niewiarygodne wręcz, ponad 97-procentowe podobieństwo molekularne pomiędzy strukturami beleczkowania i blaszki sitowatej.

Dzięki wiedzy na temat:

- faktu aktywnej kurczliwości beleczkowania,
- specyfiki zachowania się blaszki sitowatej twardówki w przebiegu nadciśnienia ocznego/jaskry oraz
- znamiennej zgodności genetycznej beleczkowania i blaszki sitowatej twardówki

uzmysłowiono sobie potencjalną możliwość występowania aktywnej regulacji napięcia tkanki blaszki sitowatej twardówki.



*Morphological changes of cells exposed to sustained elevated hydrostatic pressure. Phase contrast micrographs of living trabecular meshwork cells (A, B) and lamina cribrosa astrocytes (C, D). Note in (B) and (D) that cells exposed to elevated hydrostatic pressure to 50 mm Hg for 6 hours adopt a rounder shape when compared with control cells shown in (A) and (C) (original magnification  $\times 20$ ).*

Ryc. 35. Zmiany morfologii komórek poddanych działaniu podwyższonego ciśnienia hydrostatycznego.

A i C – komórki beleczkowania, B i D – astrocyty blaszki sitowatej.

A i B – komórki kontrolne, C i D – komórki poddane działaniu ciśnienia.

Źródło: Wax M.B. i wsp., 2000. Responses of different cell lines from ocular tissues to elevated hydrostatic pressure, Br. J. Ophthalmol. 84, 423-428.

Aby w pośredni sposób potwierdzić powyższą hipotezę, za podstawowy cel badawczy postawiono immunohistochemiczną ocenę obecności w komórkach blaszki sitowatej twardówki subkomórkowych elementów kurczliwych – aktyny mięśniówki gładkiej oraz  $\alpha$ -aktyniny.

Przyjęta przeze mnie **hipoteza** zakładała potwierdzenie obecności komórek zawierających białka kurczliwe w blaszkach sitowatych twardówki oczu z cechami neuropatii jaskrowej.

Potwierdzenie tej hipotezy tłumaczyłoby specyfikę biomechaniczną zachowania się struktur blaszki sitowatej w przebiegu nadciśnienia ocznego, potwierdzało podobieństwo molekularne ze strukturami beleczkowania oraz otwierało drogę ku potencjalnym nowym możliwościom diagnostyczno-terapeutycznym.

## 9.2. OBECNY STAN WIEDZY O PATOFIZJOLOGII NEUROPATII JASKROWEJ A WYNIKI BADANIA

Beleczkowanie, element konwencjonalnej drogi odpływu cieczy wodnistej oraz blaszka sitowata twardówki, stanowiąca strukturalną podporę tarczy nerwu wzrokowego, włączone są bezpośrednio w patomechanizm rozwoju neuropatii jaskrowej.

Typowe uszkodzenie struktur beleczkowania w przebiegu neuropatii jaskrowej pod postacią kompresji i pogrubienia jego beleczek, wzrostu ilości macierzy pozakomórkowej oraz utraty komórek beleczkowania bardzo przypomina zmiany patologiczne zachodzące w obrębie blaszki sitowatej twardówki w przebiegu tej samej jednostki (opisano uprzednio).

W przebiegu neuropatii jaskrowej dochodzi więc do postępującego uszkodzenia dwóch kolagenowych sieci występujących w oku, sieci jednoimiennych embriologicznie względem czasu i listka zarodkowego, zbudowanych z prawie identycznych komponentów oraz pozostających pod biochemicznym i biomechanicznym wpływem twardówki, do której są umocowane [Hernandez M.R.,2000(39), Quigley H.A., 1983(74), Stumpff F., 2000(94)].

Komórki blaszki sitowatej i beleczkowania posiadają podobny metabolizm, potwierdzony analizą ekspresji protein. Reagują w podobny sposób na terapię steroidami, co szczególnie widoczne jest w oczach osób z jaskrą pierwotną otwartego kąta.

Komórki beleczkowania pokrywają łącznotkankowe struktury beleczkowania analogicznie do astrocytów położonych na beleczkach blaszki sitowatej twardówki. Komórki blaszki sitowatej twardówki pozostają wewnątrz struktury beleczki lamina cribrosa, posiadając ciągły kontakt z komórkami astrocytarnymi poprzez wypustki cytoplazmatyczne.

Obydwa typy komórek wpływają znamienne na architekturę oraz właściwości czynnościowe tkanek, w których występują. Komórki beleczkowania zawierają alfa-aktyninę oraz aktynę mięśniówki gładkiej oraz potwierdzoną *in vitro* i *in vivo* zdolność do skurczu.

Z uwagi na powyższe podobieństwa genotypowe i fenotypowe potwierdzona w moim badaniu obecność białek kurczliwych w komórkach blaszki sitowatej twardówki oczu kontrolnych oraz oczu z neuropatią jaskrową może wskazywać pośrednio na potencjalną zdolność do kurczenia się tkanek blaszki sitowatej twardówki.

W oczach zdrowych stwierdzono obecność komórek zawierających białka kurczliwe.

- Komórki zawierające alfa-aktyninę stanowiły 20 % populacji komórek blaszki sitowatej twardówki.
- Komórki zawierające aktynę mięśniówki gładkiej stanowiły 6 % całkowitej liczby komórek blaszki sitowatej tych oczu.

Tak więc, komórki zawierające białka kurczliwe stanowiły w badanej grupie oczu bez cech neuropatii jaskrowej średnio 13% wszystkich komórek, obecnych w ocenianych obszarach blaszki sitowatej.

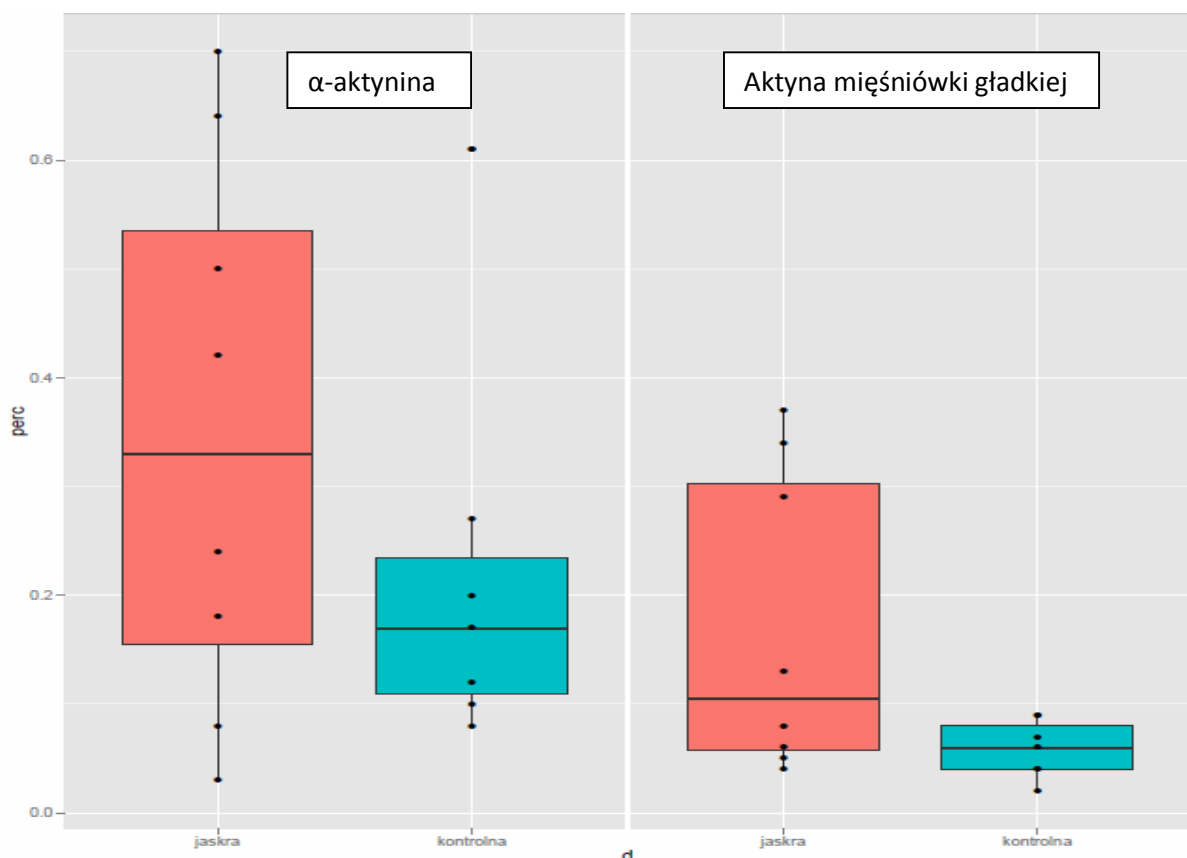
W oczach prezentujących cechy neuropatii jaskrowej także stwierdzono obecność komórek zawierających białka kurczliwe.

- Komórki zawierające alfa-aktyninę stanowiły 32 % populacji komórek blaszki sitowatej twardówki.
- Komórki zawierające aktynę mięśniówki gładkiej stanowiły 15 % całkowitej liczby komórek blaszki sitowatej tych oczu.

Tak więc, komórki zawierające białka kurczliwe stanowiły w badanej grupie oczu z cechami neuropatii jaskrowej średnio 23% wszystkich komórek obecnych w ocenianych obszarach blaszki sitowatej.

Dane te potwierdziły znamienne wyższą liczebność komórkowych elementów strukturalnych blaszki sitowatej twardówki wykazujących potencjał do aktywnej zmiany swojego kształtu (Ryc. 36).

Komórki posiadające aktywną zdolność do zmiany swojej formy, a nie będące komórkami układu mięśniowego zostały opisane w literaturze prezentującej zdolności kurczliwe struktur beleczkowania i nazwane *smooth-muscle-like cells* – komórkami „podobnymi-do-komórek mięśni gładkich”.



Ryc. 36. Ocena immunohistochemiczna antygenów α-aktyniny i aktyny mięśniówki gładkiej blaszki sitowatej twardówki gałek ocznych grupy kontrolnej i badanej – analiza statystyczna

W obu powyższych grupach przeważała populacja komórek wykazujących pozytywną reakcję na przeciwciała przeciwko alfa-aktynie. Stanowiły one 20% i 32% populacji komórek blaszki sitowatej twardówki oczu odpowiednio dla grupy kontrolnej i badanej.

Znamiennie ciekawszym jednak był fakt stwierdzenia komórek wykazujących pozytywną reakcję immunohistochemiczną na obecność aktyny mięśniówki gładkiej.

Komórki zawierające aktyne mięśniówki gładkiej stanowiły odpowiednio 6% i 15 % wszystkich komórek blaszki sitowatej twardówki oczu odpowiednio dla grup bez i z cechami neuropatii jaskrowej.

SMA jest markerem biologicznym populacji miofibroblastów. Komórki te, posiadające aktywną zdolność do zmiany swojej formy, nie są jednak komórkami układu mięśniowego. Należą one do grupy *smooth-muscle-like cells*, czyli komórek „podobnych-do-komórek mięśni gładkich” [Hinz B. i wsp., 2007(42)].

Miofibroblasty wywodzą się od fibroblastów tkanki łącznej lub krążących progenitorów fibrocytów [Hinz B. i wsp., 2007(42)]. Fibroblasty nie posiadają włókien stresowych (*stress fibres*), jednak poddane działaniom sił rozciągających zaczynają je tworzyć, stając się protomiofibroblastami [Hinz B. i wsp., 2001(41); Tomasek J.J. i wsp., 2002(98)]. Dalsze działanie sił rozciągających przy współudziale TGF-1 oraz zmian w budowie macierzy pozakomórkowej prowadzą do dalszego ich zróżnicowania w miofibroblasty [Tomasek J.J. i wsp., 2002(98)]. Procesowi temu towarzyszy ekspresja aktyny mięśniówki gładkiej, która zostaje wbudowana do włókien stresowych miofibroblastów [Darby I. i wsp., 1990(23)]. Te włókna, zawierające SMA, wykazują znacznie wyższy potencjał do skurczu w porównaniu ze zwykłymi włóknami stresu, które zawierają wyłącznie aktyne [Hinz B. i wsp., 2001(41)]. Miofibroblasty zazwyczaj znajdują się w tkankach, które wymagają znamiennej przebudowy macierzy [Sappino A.P. i wsp., 1990(84)]. Rolą skurczu generowanego przez włókna stresu miofibroblastów nie jest zjawisko ruchu komórek, ale tworzenie izometrycznych napięć tkanki z następczą przebudową macierzy pozakomórkowej. Podobne cechy, jak w przypadku miofibroblastów, mogą prezentować transformowane komórki nabłonka – komórki mioepitelialne.

Wyniki badania wskazują na obecność w blaszce sitowatej twardówki oczu z cechami neuropatii jaskrowej znamienne większego odsetka komórek, zawierających białka kurczliwe – zarówno aktyne mięśniówki gładkiej, jak i alfa-aktyninę.

Obecność znamiennej większej liczby tych komórek w oczach z cechami neuropatii jaskrowej wskazuje na bardzo prawdopodobną aktywację tych linii komórkowych poprzez czynniki mechaniczne, działające na ścianę gałki ocznej, a więc poprzez jeden z głównych czynników ryzyka tej jednostki – podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe.

Aktywowana w powyższy sposób populacja komórek blaszki sitowatej twardówki, poza mechanizmami biernymi związanymi z obecnością włókien kolagenowych i elastynowych w tkance blaszki sitowatej, może odgrywać kluczową rolę w mechanizmach zmniejszających odkształcenie tkanki blaszki sitowatej twardówki pod wpływem podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego i być endogennym mechanizmem homeostazy tkanki.

Hipotetyczna obecność potencjału do aktywnej zmiany kształtu elementów strukturalnych blaszki sitowatej twardówki może wyjaśniać zjawisko znamiennej szybszego powrotu do pozycji wyjściowej nadpodatnej blaszki sitowatej twardówki w oczach z indukowanym nadciśnieniem ocznym, trwającymi od 2 do 8 tygodni, względem zdrowych oczu poddanych temu samemu stresowi.

Kiedy przyrzemy się wykresowi zmiany odkształcenia blaszki sitowatej w 1-8-tygodniowym nadciśnieniu ocznym (C i D) i porównamy je z zachowaniem się tkanki kontrolnej (A), nasuwają się bezpośrednie skojarzenia z zachowaniem tkanki mięśniówki gładkiej (patrz Ryc 23).

Mięśniówka gładka pod wpływem działania na nią sił rozciągających ulega aktywacji dzięki procesowi sprężenia elektromechanicznego.

Na skutek przekroczenia granicznej wartości napięcia błony komórkowej mięśnia gładkiego dochodzi do jej depolaryzacji. Zjawisko to prowadzi do otwarcia się kanałów wapniowych, co powoduje napływanie wapnia z przestrzeni pozakomórkowej do cytoplazmy. Napływający wapń może uwalniać wapń zmagazynowany w strukturach wewnątrzkomórkowych, co wzmacnia wzrost stężenia wapnia w myoplazmie. W tych warunkach kalmodulina wiąże się z jonami wapnia i aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny. Fosforylacja miozyny rozpoczyna proces przemieszczania się miofilamentów, co prowadzi do skurczu. Siła tego skurczu zależna jest od stopnia zachodzenia na siebie cienkiego i grubego filamentu, a więc od długości mięśnia. Liniowy wzrost tej siły wraz z rozciąganiem się mięśnia związany jest ze wzrostem ilości połączeń. W okolicy optymalnej długości mięśnia, siła jest stała ze względu na brak główek miozyny w środkowej części filamentu. Oprócz aktywnych właściwości kurczliwych mięśnie gładkie posiadają także pasywne siły kurczliwe, związane ze sprężystymi własnościami grubego filamentu.

Opisywany przez Burgoyne'a [2005(20)] czas niwelacji odkształcenia blaszki sitowatej twardówki w zdrowym oku naczelnym wynosił średnio 100 minut, a w nadpodatnym oku z 1- do 2-tygodniowym nadciśnieniem tylko około 5 minut.

Ze względu na krótki okres działania czynnika patologicznego nie mogło jeszcze dojść do przebudowy tkanki blaszki sitowatej twardówki tłumaczących zmianę jej właściwości biomechanicznych i krótszy czas powrotu tkanki z obszaru większego odkształcenia.

W oczach zdrowych deformacja blaszki sitowatej twardówki wywołana daną siłą (45 mmHg/50 min) wynosiła maksymalnie około  $-30\ \mu\text{m}$ . Odkształcenie generowane analogiczną siłą osiągało w oczach nadpodatnych od  $-90\ \mu\text{m}$  (1-2-tygodniowe nadciśnienie ocze) do nawet  $-120\ \mu\text{m}$  (3-4-tygodniowe nadciśnienie oczne). Niwelacja odkształcenia przebiegała więc w przypadku oczu z nadciśnieniem ocznym nie tylko szybciej, ale i ze znamienne większego poziomu. W tym specyficznym zachowaniu się tkanki blaszki sitowatej możemy zauważyć analogię do opisanego powyżej zachowania się mięśni gładkich pod postacią ich skurczu, wywołanego nadmiernym rozciąganiem, oraz wzrostu siły tego skurczu w odpowiedzi na większe odkształcenie tkanki.

Uszkodzone mechanicznie, nadpodatne elementy tkanki łącznej blaszki sitowatej w nadciśnieniu ocznym, ze względu na utratę swoich właściwości sprężystych, po prostu nie mogą zachować się w wyżej opisany sposób. Specyficzne dla sprężystych właściwości nieuszkodzonej tkanki łącznej jest zachowanie blaszki sitowatej twardówki oka zdrowego.

Jeśli przypatrzmy się powyższymi wykresom, zauważymy wyraźnie, że zmiany właściwości biomechanicznych tkanki blaszki sitowatej, związane z przebudową, pojawiają się dopiero około 5.-8. tygodnia trwania nadciśnienia ocznego i objawiają się zwiększeniem jej sztywności, co uwidacznia się brakiem progresji jej odkształcenia powyżej  $-120\ \mu\text{m}$ . Progresja tego zjawiska jest jeszcze bardziej widoczna od około 13. tygodnia trwania nadciśnienia ocznego. Od tego czasu dochodzi do znamiennej redukcji poziomu odkształcenia się tkanki blaszki sitowatej. Osiąga ono maksymalnie około  $-40\ \mu\text{m}$  i jest znamienne mniejsze w porównaniu z odkształceniami w 9.-12. tygodniu nadciśnienia ocznego, kiedy osiąga około  $-90\ \mu\text{m}$ .

W trakcie analizy danych stwierdzono ponadto znamienne, odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy całkowitą liczbą komórek, obecnych w blaszce sitowatej twardówki, a ilością SMA lub  $\alpha$ -aktynina pozytywnych immunohistochemicznie komórek w oczach z neuropatią jaskrową oraz  $\alpha$ -aktynina pozytywnych immunohistochemicznie komórek w oczach bez cech neuropatii jaskrowej. W tych grupach im mniej komórek znajdowało się w blaszce sitowatej, tym proporcjonalnie większą populację stanowiły komórki zawierające

białka kurczliwe. Nie znaleziono takiej zależności dla SMA pozytywnych immunohistochemicznie komórek grupy kontrolnej.

Symetria tego fenomenu dla dwóch grup badania pod względem komórek blaszki sitowatej, zawierających podporową molekułę  $\alpha$ -aktyniny, oraz brak takiej symetrii względem komórek, zawierających SMA, może wskazywać na fakt obecności w zdrowej tkance blaszki sitowatej stałego odsetka komórek zawierających aktywną mięśniówkę gładką.

Zwiększenie się tego odsetka może więc wskazywać na tkankę poddawaną nadmiernym obciążeniom fizycznym, które skutkować będą jej przebudową.



## 10. WNIOSKI

1. Badania immunohistochemicznie potwierdziły obecność w utkaniu blaszki sitowatej twardówki komórek, zawierających aktyne mięśniówki gładkiej oraz alfa-aktyninę – markerów komórek mięśniówki gładkiej i komórek o cechach podobnych do komórek mięśniówki gładkiej tj. miofibroblastów lub komórek mioepitelialnych.

2. Badanie udowodniło również fakt wzrostu liczebności tych komórek w tkankach poddanych działaniu nadmiernych sił fizycznych. W przypadku przeprowadzonego badania siłą tą było podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, warunkujące rozwój cech neuropatii jaskrowej.

3. Znajomość faktów, wynikających z analizy danych przeprowadzonego badania, wraz z dostępnymi danymi literaturowymi i obecnymi możliwościami diagnostycznymi mogą warunkować powstanie metod wczesnej detekcji populacji osób, narażonych na rozwój neuropatii jaskrowej oraz stworzenie skuteczniejszych metod hamowania jej rozwoju.

## 11. PODSUMOWANIE – ASPEKTY KLINICZNE

Błaszka sitowata twardówki jest miejscem pierwotnego uszkodzenia aksonów komórek zwojowych w przebiegu neuropatii jaskrowej, zależnej od podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego. Pod wpływem działających na nią subiektywnie definiowanych czynników wywołujących dochodzi do aktywacji komórek astrocytarnych blaszki sitowatej. Aktywność tych komórek warunkuje proces przebudowy *lamina cribrosa*, prowadząc do wtórnego zaburzenia mechanizmów wstecznego transportu neurotrofin z ciał kolankowatych bocznych do ciał komórek zwojowych siatkówki. Ta deprywacja neurotroficzna prowadzi do przyspieszonego procesu programowanej śmierci komórek zwojowych siatkówki, będącego istotą neuropatii jaskrowej [Quigley H.A. 1976(71), 1995a(76), 1995(77)].

Biomechanika nerwu wzrokowego umożliwia opisanie i powiązanie wpływu czynników niezwiązanych z ciśnieniem wewnątrzgałkowym, takich jak niedokrwienie, stan zapalny, autoimmunogenność czy biologia astrocytów i komórek glejowych z rolą czynnika ciśnienia wewnątrzgałkowego w patogenezie neuropatii jaskrowej.

W literaturze obecna jest koncepcja dynamiki blaszkowo-twardówkowej, w której właściwości biomechaniczne twardówki znamienne wpływają na poziom deformacji blaszki sitowatej twardówki, a przez to na prawdopodobieństwo jej przebudowy w procesie neuropatii. Zaburzenia transportu aksonalnego komórek zwojowych pojawiają się najprawdopodobniej nie w miejscach, w których działa na nie największa siła, zależna od ciśnienia wewnątrzgałkowego, ale w miejscach, w których gradient przezblaszkowy sił, czyli gradient ciśnienia hydrostatycznego w tkance łącznej i nerwowej (pomiędzy przedblaszkową i blaszkową częścią nerwu wzrokowego) jest największy. Gradient ten warunkowany jest przezblaszkową różnicą ciśnień, tj. różnicą pomiędzy ciśnieniem wewnątrzgałkowym a ciśnieniem pozablaszkowym [Burgoyne C.F., 2011(22), Jonas J., 2007(53)].

Siły i napięcia w obrębie tkanki łącznej nerwu wzrokowego, wywołane zmianami ciśnienia wewnątrzgałkowego, są bardzo złożone i nie zawsze prowadzą do deformacji blaszki sitowatej sięgającej poza płaszczyznę zewnętrznego otworu kanału nerwowego twardówki.

Deformacja blaszki sitowatej nie jest warunkiem niezbędnym do zaburzenia transportu aksonalnego komórek zwojowych siatkówki. Obecność sił działających na struktury łącznotkankowe nerwu wzrokowego i twardówki może w niezależny sposób wpływać na zmniejszenie dostępności substancji odżywczych dla aksonów komórek zwojowych niezależnie od *cuppingu* blaszki sitowatej. Na przykład zwiększenie objętości kanału

twardówkowego, powodujące ścieńczenie blaszki sitowatej, wywołuje dalszy wzrost napięć w jej obszarze pomimo braku cech *cuppingu*.

W latach 90. ubiegłego wieku pojawiły się pierwsze dane, wykazujące zdolność struktur beleczkowania do kurczenia się i relaksacji, analogiczną do zachowań komórek mięśniówki gładkiej [Stumpff F., 2000(94)]. Zdolności te wskazywały na aktywną rolę tych komórek w regulacji oporu w drogach odpływu cieczy wodnistej, a przez to – na zmiany ciśnienia wewnątrzgałkowego. W tym czasie pojawiły się także doniesienia o możliwości farmakologicznego zahamowania skurczu tych komórek za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej. Rho GTPaza reguluje przebudowę cytoszkieletu komórek poprzez fosforylację łańcuchów lekkich miozyny i białek ERM. Fosforylacja łańcuchów lekkich miozyny odgrywa kluczową rolę w interakcjach miozyna – aktyna, modulujących tworzenie reaktywnych włókien aktyny, adhezji komórkowej i skurczu komórkowego. Zahamowanie aktywności Rho kinazy powodowało odwracalne zmiany kształtu komórek beleczkowania (ich relaksację), zmniejszenie ilości reaktywnych włókien aktyny, obniżenie miejscowej adhezji komórek, a w konsekwencji zmniejszenie oporu w drogach odpływu cieczy wodnistej i spadek IOP. W podobny sposób na inhibitory kinazy tyrozynowej reaguje cytoszkielet astrocytów. Czynność skurczowa mięśni gładkich zależy przede wszystkim od stanu fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny. Zmiany w regulacji procesów utrzymywania wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  i fosforylacji MLC zostały zaproponowane jako możliwe mechanizmy wywołujące patologiczną kurczliwość komórek mięśni gładkich różnych narządów i tkanek. Zmiany w powinowactwie  $\alpha$ -adrenergicznych receptorów, prowadzące do zwiększenia skurczu naczyń, zostały opisane w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych w niektórych typach nadciśnienia. Zwiększona aktywność RhoA / kinaza Rho szlaku sygnalizacyjnego może również przyczyniać się do nadmiernego skurczu lub spastycznego zachowania mięśni gładkich w stanach chorobowych, takich jak astma czy miażdżyca [Hinz B. 2007(42)]. Być może podobne patologiczne mechanizmy – analogiczne do skurczu ściany naczynia tętniczego w odpowiedzi na wzrost sił na nie działających – obecne są w blaszce sitowatej twardówki we wczesnych stadiach rozwoju neuropatii jaskrowej i stanowią potencjalne punkty działań terapeutycznych – prawdziwej neuroprotekcji.

Jeśli więc przyjmiemy hipotezę, że astrocyty „to władcy tkanki nerwowej”, a:

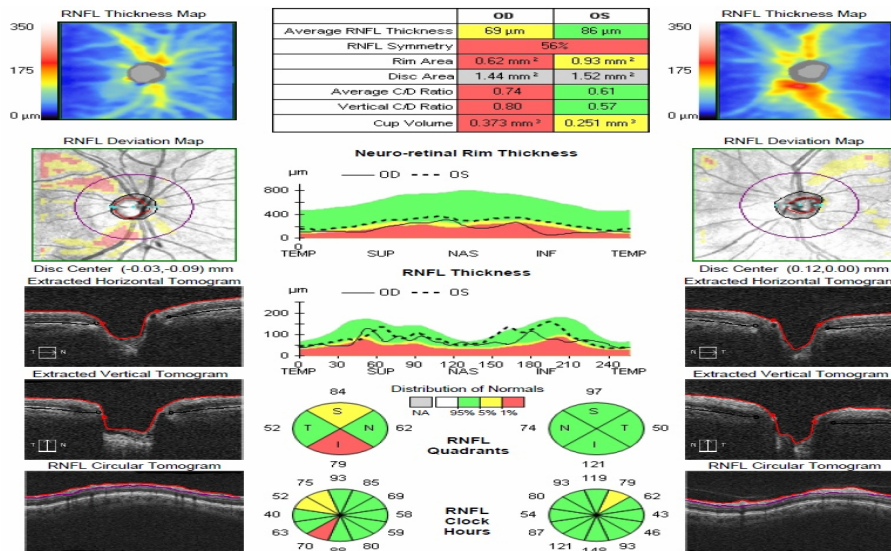
- proces przebudowy blaszki sitowatej twardówki, wywołany został ich aktywacją, w odpowiedzi na nadmierne odkształcenia tkanki, spowodowane pogorszeniem jej właściwości biomechanicznych (nadpodatność),

- przebudowa blaszki sitowatej ma na celu maksymalne zmniejszenie sił działających na astrocyty, innymi słowy, poprawę jej parametrów biomechanicznych,
- kosztem tego procesu jest pogrubienie blaszki sitowatej i będące jej następstwem pogorszenie warunków dyfuzji substancji odżywczych i tlenu oraz kompresja aksonów komórek zwojowych siatkówki, prowadzące do zaburzeń aktywnego transportu neurotrofin i przyspieszonego procesu apoptozy komórek zwojowych siatkówki,

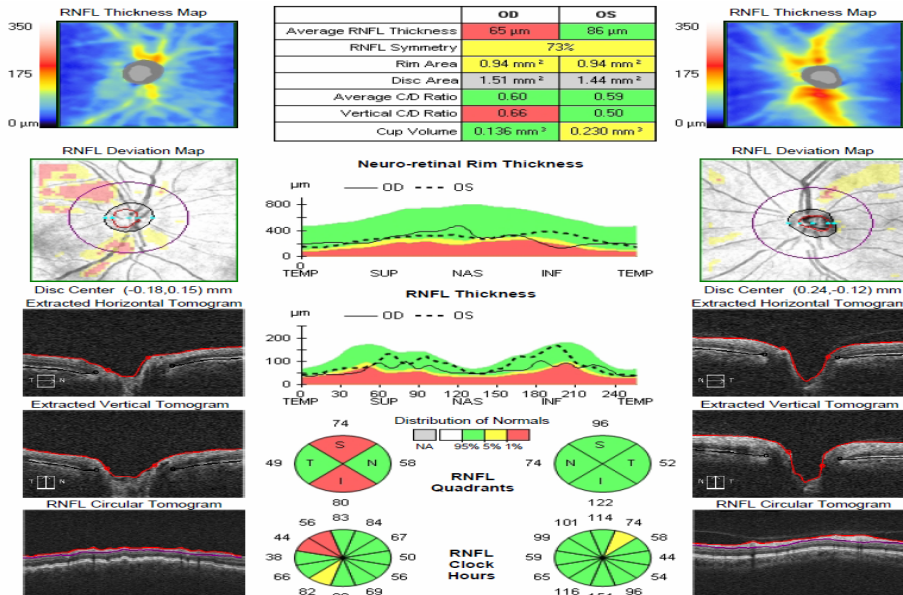
powstaje pytanie: Czy poprzez odpowiednio wczesną zindywidualizowaną terapię baroprotekcyjną, obniżającą nadmierne napięcia strukturalne wewnątrz blaszki sitowatej twardówki oraz zahamowanie patologicznej aktywacji astrocytów i komórek blaszki sitowatej twardówki (np. poprzez zastosowaniem inhibitorów aktywacji reaktywnych włókien aktyny), możliwe będzie zahamowanie procesu przebudowy blaszki sitowatej i całkowite zahamowanie rozwoju neuropatii jaskrowej, zależnej od podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego?

Obecne techniki obrazowania, takie jak HD OCT, umożliwiają przyżyciową ocenę położenia i grubości blaszki sitowatej oraz średnicy tunelu nerwu wzrokowego twardówki (patrz Ryc. 37 i 38). Być może ocena dynamiki zachowania się tych struktur w zależności od wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego pozwoli ocenić ryzyko wystąpienia neuropatii w grupie oczu z nadciśnieniem ocznym i w odpowiednim momencie włączyć terapię?

A.

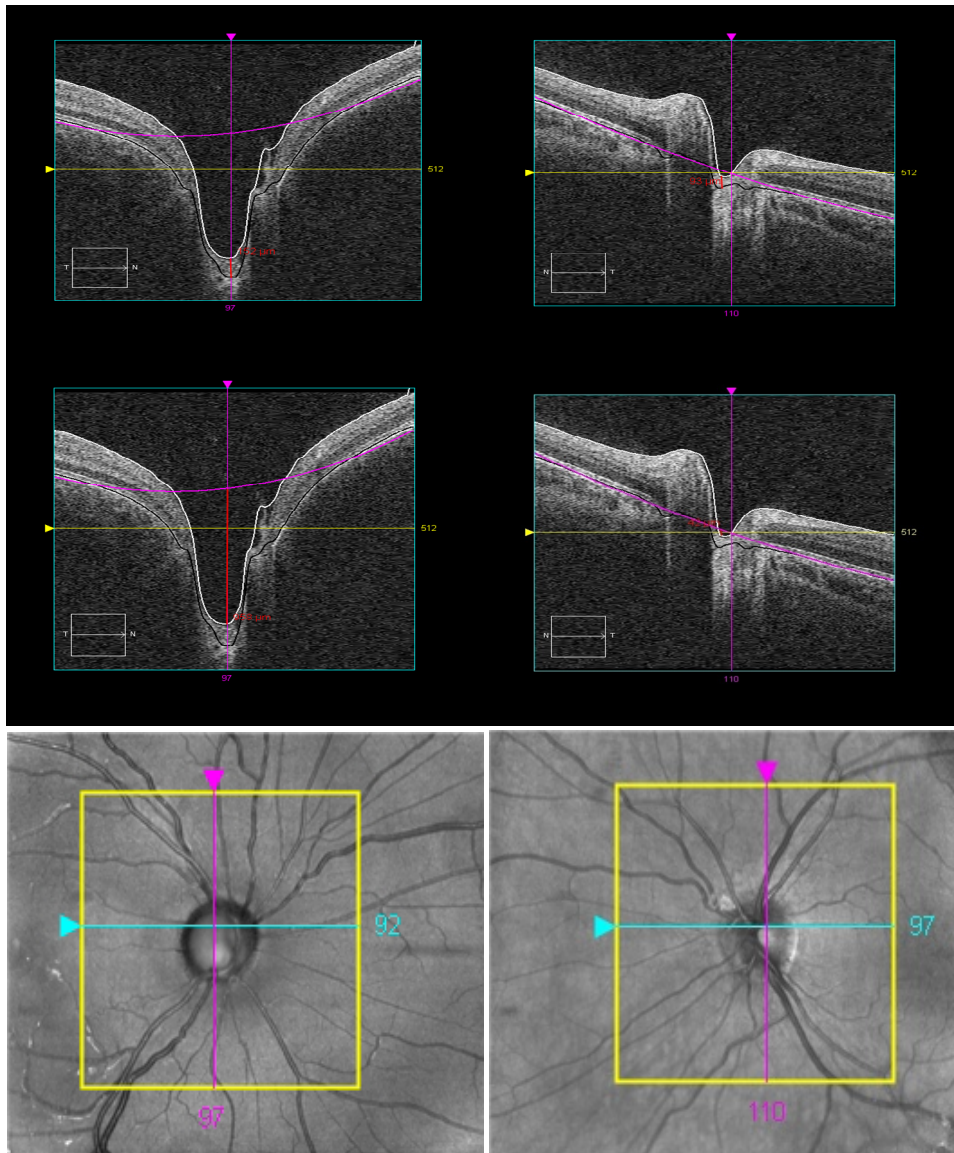


B.



Ryc. 37. Zmiana parametrów morfometrycznych tarczy nerwu wzrokowego oka z jaskrą pierwotną otwartego kąta w zależności od wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego. Analiza morfometryczna z zastosowaniem HD-OCT Cirrus (Zeiss).

- A. IOP oka prawego (OD) 34mmHg oka lewego (OS) 25 mmHg.
- B. IOP oka prawego (OD) 10 mmHg (Trabeculectomia) oka lewego (OS) 15 mmHg (farmakoterapia baroprotekcyjna).  
Zmiana parametrów obszaru tarczy nerwu wzrokowego (*disc area*) oraz powierzchni zagłębienia (*cup volume*).



Ryc. 38. Ocena morfometryczna głębokość zagłębienia i grubość blaszki sitowatej twardówki tarczy nerwu wzrokowego z zastosowaniem HD OCT Cirrus.

Po lewej: tarcza prawego nerwu wzrokowego oka z jaskrą wtórną otwartego kąta w przebiegu zespołu Sturge – Webbera.

Po prawej: tarcza lewego nerwu wzrokowego oka bez cech nadciśnienia ocznego.

(Należy zwrócić uwagę na asymetrię wielkości zagłębienia oraz grubości tkanki blaszki sitowatej twardówki pomiędzy oczami).

Dostępne technologie telemetryczne umożliwiają obecnie stałą, całodobową, ilościową ocenę sił działających na ściany gałki ocznej. Dostępne dane wskazują na występowanie specyficznych dla danej osoby dobowych biorytmów zmian napięcia ściany gałki ocznej. Sumaryczne siły, działające na ścianę gałek ocznych z cechami neuropatii jaskrowej, wydają się być znamienne większe w porównaniu z siłami działającymi na oczy, które nie wykazują cech neuropatii. Być może ocena specyfiki profilu dobowego napięcia ściany gałki ocznej umożliwi wyodrębnienie grupy osób narażonych na rozwój nadciśnienia ocznego lub umożliwi wykrycie grupy zwiększonego ryzyka konwersji nadciśnienia ocznego do jaskry?

Jak wpłynie na decyzje terapeutyczne znajomość profilu dobowego ciśnień perfuzji, możliwa dzięki połączeniu krzywej dobowej IOP oraz profili dobowych ciśnienia tętniczego i EKG? Czy przyżyciowa ocena parametrów biomechanicznych rogówki, takich jak jej chystereza i jej zmienność w zależności od IOP oraz czasu trwania nadciśnienia ocznego, będzie korelowała z biomechanicznymi właściwościami blaszki sitowatej twardówki, co pomoże w różnicowaniu ryzyka rozwoju i progresji neuropatii jaskrowej?

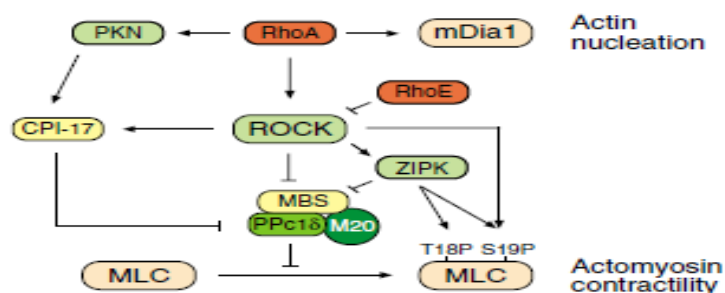
Obecny stan wiedzy na temat neuropatii jaskrowej pozwala nam jedynie na bezwzględne potwierdzenie roli terapii baroprotekcyjnej w zmniejszeniu ryzyka jej progresji. Efektem tego działania jest na pewno zmniejszenie gradientu przezblaszkowego ciśnień i większa stabilizacja pozycji blaszki sitowatej twardówki oraz zmniejszenie napięć w okołotarczowej twardówce.

Zmniejszenie gradientu przezblaszkowego zmniejsza natężenie sił działających aktywująco na tkankę astrogleju nerwu wzrokowego, co skutkuje spowolnieniem / zatrzymaniem procesu jej przebudowy, polegającego na przeroście beleczek blaszki sitowatej, skutkującym zmniejszeniem się światła jej przestrzeni międzylamellarnych oraz pogorszeniem się parametrów perfuzji naczyń, biegnących w lamellach blaszki sitowatej. Fakt ten prowadzi do zmniejszenia się patologicznych czynników, działających na aksony komórek zwojowych siatkówki w obrębie blaszki sitowatej i poprawę ich funkcji. Wywołane obniżeniem IOP zmniejszenie napięć i stabilizacja okołotarczowej tkanki twardówki, prowadzi do zmniejszenia się natężenia sił ścinających, działających na biegnące śródtwardówkowo naczynia, co przekłada się na poprawę hemodynamiki naczyń rzęskowych tylnych krótkich, a przez to – na lepsze unaczynienie części przed- i blaszkowej nerwu wzrokowego.

Czy poza baroprotekcją możemy jeszcze inaczej wpłynąć na mechanizmy, prowadzące do rozwoju neuropatii jaskrowej? Być może zastosowanie układowe preparatów, wykazujących wpływ inhibujący na szlak ROCK i właściwości relaksacyjnych względem tkanek kurczliwych, spowoduje zmniejszenie aktywacji komórek astrogleju (patrz Ryc. 39).

Na chwilę obecną dostępnym fitohormonem o potwierdzonej względem tkanek kurczliwych aktywności relaksacyjnej jest wyciąg z miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba*).

Działa on, hamując aktywność kinazy tyrozynowej (RhoA). W literaturze pojawiły się już pierwsze doniesienia mogące potwierdzić korzystny wpływ tego inhibitora RhoA na funkcję nerwu wzrokowego – co może potwierdzać rolę niemięśniowych komórek kurczliwych w patogenezie neuropatii jaskrowej [Jeongmin L. 2012(44)], patrz Tabela 9



Ryc. 39. Uproszczony schemat dróg sygnałowych kontrolujących tworzenie się włókien stresowych. Ekstrakt Ginkgo biloba działa, hamując aktywność RhoA (fosfatazy tyrozynowej).

Źródło: Jeongmin L., 2012. Effect of Ginkgo biloba Extract on Visual Field Progression in Normal Tension Glaucoma, 2012 May 16 (E-pub ahead of print).

Tabela 9.

Visual Field	Before GBE Administration	After GBE Administration	P*
MD	- 0.619 ± 0.050	- 0.379 ± 0.051	0.0008
PSD	0.626 ± 0.056	0.342 ± 0.053	0.0003
VFI	- 2.153 ± 0.142	- 1.212 ± 0.166	< 0.0001

All data presented are mean ± 2 SD.  
 \*P value for the differences between regression coefficients before and after GBE treatment.  
 GBE indicates *Ginkgo biloba* extract; MD, mean deviation; PSD, pattern standard deviation; VFI, visual field index.

Tabela 9. Zmniejszenie tempa progresji uszkodzeń pola widzenia u pacjentów z jaskrą normalnego ciśnienia po zastosowaniu wyciągu z Ginkgo biloba.

Źródło: Jeongmin L., 2012. Effect of Ginkgo biloba Extract on Visual Field Progression in Normal Tension Glaucoma, J. Glaucoma. 2012 May 16 (E-pub ahead of print).

Obecne techniki obrazowania, takie jak HD OCT, umożliwiają przyżyciową ocenę zachowań blaszki sitowatej w czasie działania podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego i po jego obniżeniu. Technologie telemetryczne (System Triggerfish) umożliwiają poza tym stałą, całodobową, ilościową ocenę sił działających na ściany gałki ocznej. Możliwa jest także przyżyciowa nieinwazyjna ocena właściwości biomechanicznych tkanek oka (Analizator Odpowiedzi Ocznej). Znajomość powyższych faktów, oraz wnioski wynikające z analizy danych przeprowadzonego badania, wraz z obecnymi możliwościami diagnostycznymi mogą warunkować powstanie metod wczesnej detekcji populacji osób, narażonych na rozwój neuropatii jaskrowej oraz stworzenie skuteczniejszych metod hamowania jej rozwoju.



## 12. STRESZCZENIE

Jaskra to postępująca neuropatia nerwu wzrokowego związana z przyspieszonym procesem programowanej śmierci komórek zwojowych siatkówki na skutek deprivacji neurotroficznego oraz patognomicznymi zmianami fenotypu blaszki sitowatej twardówki. Utrata komórek zwojowych siatkówki prowadzi do przerwania czynnościowej ciągłości drogi wzrokowej, w następstwie czego dochodzi do rozwoju specyficznych, zależnych od architektury siatkówki i nerwu wzrokowego, ubytków w polu widzenia. Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe jest najważniejszym znanym czynnikiem ryzyka rozwoju neuropatii jaskrowej.

Tylko siła wywołująca fizyczne odkształcenie struktury tkanki może wywołać reakcję ze strony jej elementów komórkowych. Wartość tej siły zależy od biomechanicznych właściwości danej tkanki. Tkankami przyjmującymi ten typ obciążeń mechanicznych w gałce ocznej są: twardówka okolicy około tarczowej i ściany kanału nerwu wzrokowego oraz blaszki sitowatej twardówki.

Wspólną cechą wszystkich typów komórek zawierających białka kurczliwe jest ich zdolność do odpowiadania skurczem na docierające do nich sygnały pobudzające. Aktywny skurcz elementów komórkowych organizmów, warunkowany jest obecnością w ich strukturze białek kurczliwych, takich jak aktyna mięśniówki gładkiej oraz ich elementów podporowych, jak na przykład  $\alpha$ -aktynina.

### CEL PRACY

Immunohistochemiczna ocena obecności  $\alpha$ -aktyniny i aktyny mięśniówki gładkiej w blaszce sitowatej twardówki oczu z neuropatią jaskrową, zależną od podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego.

Analiza powyższych danych ma na celu odpowiedź na pytanie: Czy w obrębie blaszki sitowatej twardówki oczu z neuropatią jaskrową, zależną od podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego, występują elementy komórkowe, zawierające w swojej strukturze powyższe białka kurczliwe a więc czy blaszka sitowata twardówki oczu z neuropatią jaskrową może prezentować cechy tkanki kurczliwej?

## METODYKA BADANIA

### GRUPY BADANIA: KRYTERIA KWALIFIKACJI KLINICZNEJ

#### A. Grupa badana:

- brak poczucia światła,
- kwalifikacja do enukleacji z powodu nie reagującej na terapię, bolesnej neuropatii jaskrowej,
- wysokie ciśnienie wewnątrzgałkowe ( $> 30$  mmHg) w momencie enukleacji.

#### B. Grupa kontrolna:

- oko zakwalifikowane do enukleacji z powodu obecności wewnątrzgałkowego procesu rozrostowego, niekwalifikującego się do innej metody terapii z powodu stopnia zaawansowania,
- tarcza nerwu wzrokowego nie objęta przez proces rozrostowy,
- brak cech neuropatii jaskrowej oraz IOP  $< 21$  mmHg w okresie obserwacji/historii medycznej.

Grupę pierwotną badania, spełniającą powyższe kryteria, stanowiło trzydzieści oczu enukleowanych z powodu dokonanej neuropatii jaskrowej oraz trzydzieści gałek ocznych enukleowanych z powodu guza wewnątrzgałkowego. Przeprowadzono następnie opracowanie histologiczne enukleowanych gałek ocznych oraz kwalifikację histologiczną preparatów.

### KRYTERIA KWALIFIKACJI HISTOLOGICZNEJ (po procesie preparatyki histologicznej):

#### A. Grupa badana:

- dokładna wizualizacja blaszki sitowatej twardówki w przekroju osiowym, bez cech jej mechanicznego uszkodzenia/sfałdowania,
- możliwość oceny czterech pól o powiększeniu 200x, w obrębie jednej blaszki sitowatej,
- wykładniki histologiczne neuropatii jaskrowej.

#### B. Grupa kontrolna:

- dokładna wizualizacja blaszki sitowatej twardówki w przekroju osiowym, bez cech jej mechanicznego uszkodzenia/sfałdowania,
- możliwość oceny czterech pól o powiększeniu 200x, w obrębie jednej blaszki sitowatej,
- brak wykładników histologicznych nacieku blaszki sitowatej przez wewnątrzgałkowy proces rozrostowy,

- brak wykładników histologicznych neuropatii jaskrowej.

Z pierwotnej grupy gałek ocznych kryteria kwalifikacji do dalszej obróbki immunohistochemicznej spełniło:

- A. Grupa badana: 8 oczu 8 pacjentów.
- B. Grupa kontrolna: 7 oczu 7 pacjentów.

Głównymi obecnymi kryteriami dyskwalifikującymi były:

- brak prawidłowej wizualizacji struktur lub nieprawidłowy przekrój blaszki sitowatej twardówki z jej mechanicznym uszkodzeniem oraz brak możliwości uzyskania prawidłowych osiowych przekrojów tkanki tarczy nerwu wzrokowego w kolejnych jej sekcjach (grupa badana: 14 oczu / grupa kontrolna: 16 oczu),
- naciek struktur nerwu wzrokowego poprzez proces rozrostowy (grupa badana: 0 oczu / grupa kontrolna: 1 oko),
- pęknięte szkiełko nakrywkowe uniemożliwiające wiarygodną ocenę preparatu (grupa badana: 3 oczu / grupa kontrolna: 2 oczu),
- zbyt mały obszar blaszki sitowatej preparatu uniemożliwiający jej ocenę w czterech polach o powiększeniu 200x (grupa badana 5 oczu/ grupa kontrolna 4 oczu).

Do ostatecznej analizy immunohistologicznej zakwalifikowano:

- A. Grupa badana: 8 oczu 8 pacjentów.
- B. Grupa kontrolna: 7 oczu 7 pacjentów.

## WYNIKI

W grupie neuropatii jaskrowej analizie immunohistochemicznej poddano 16 preparatów spełniających kryteria badawcze, pochodzące z 8 gałek ocznych, a w grupie kontrolnej 14 preparatów z 7 gałek ocznych – po jednym preparacie dla oceny SMA i jednym dla oceny obecności alfa-aktyniny w komórkach blaszki sitowatej dla każdej gałki ocznej.

Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą z neuropatią jaskrową a grupą bez neuropatii jaskrowej dla całkowitej liczby komórek wykazujących ekspresję antygeny SMA i procentowego udziału tych komórek w populacji badanych tkanek.

Porównanie ekspresji dwóch antygenów SMA i alfa-aktyniny u pacjentów z neuropatią jaskrową i bez jej cech wykazało istotną statystycznie różnicę między prezentacją antygeny SMA oraz procentowym udziałem komórek SMA pozytywnych, tylko w podgrupie tkanek blaszki sitowatej bez cech neuropatii jaskrowej. W grupie z neuropatią jaskrową nie

stwierdzono istotnej statystycznie różnicy z powodu dużego odchylenia standardowego dla pozytywnej ekspresji antygeny przeciwiaciał.

### **Podsumowanie statystycznej analizy danych grupy badanej i kontrolnej**

	ŚREDNIA		ODCH. STD.		LICZEBNOŚĆ N		TEST F JEDNORODNO SCI WARIANCJI	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU F	TEST T DLA ŚREDNICH	POZIOM ISTOTNOŚCI P DLA TESTU T
	NEUROPATIA JASKROWA	BEZ NEUROPATII JASKROWEJ	NEUROPATIA JASKROWA	BEZ NEUROPATII JASKROWEJ	NEUROPATIA JASKROWA	BEZ NEUROPATII JASKROWEJ				
<b>CAŁKOWITA AKTYNINA</b>	164,63	164,43	42,33	47,80	8	7	1,28	0,750	0,01	0,993
<b>CAŁKOWITA AKTYNINA+</b>	52,13	32,57	37,21	22,21	8	7	2,81	0,230	1,21	0,247
<b>CAŁKOWITA SMA</b>	177,75	150,29	69,31	42,39	8	7	2,67	0,252	0,91	0,380
<b>CAŁKOWITA SMA+</b>	27,25	8,43	21,54	4,43	8	7	23,65	0,001	2,26	0,042
<b>%AKTYNINA+</b>	34,99	22,20	25,30	18,34	8	7	1,90	0,451	1,11	0,289
<b>%SMA+</b>	17,05	5,81	14,00	2,62	8	7	28,65	0,001	2,08	0,049

Całk. AKTYNINA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w preparatach Grup 1.

Całk. AKTYNINA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej AKTYNINA+ w preparatach Grup 1.

Całk. SMA – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej w preparatach Grup 2.

Całk. SMA+ – całkowita liczba komórek blaszki sitowatej SMA + w preparatach Grup 2.

%AKTYNINA+ i %SMA+ – procentowy udział odpowiednio komórek AKTYNINA+ i SMA+ w preparatach Grup 1 i 2.

### **WNIOSKI**

1. Badania immunohistochemiczne potwierdziły obecność w utkaniu blaszki sitowatej twardej komórek, zawierających aktynę mięśniówki gładkiej oraz alfa-aktyninę – markerów komórek mięśniówki gładkiej i komórek o cechach podobnych do komórek mięśniówki gładkiej tj. miofibroblastów lub komórek mioepitelialnych.

2. Badanie udowodniło również fakt wzrostu populacji tych komórek w tkankach poddanych działaniu nadmiernych sił fizycznych. W przypadku przeprowadzonego badania siłą tą było podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, warunkujące rozwój cech neuropatii jaskrowej.

3. Znajomość faktów, wynikających z analizy danych przeprowadzonego badania, wraz z dostępnymi danymi literaturowymi i obecnymi możliwościami diagnostycznymi mogą warunkować powstanie metod wczesnej detekcji populacji osób, narażonych na rozwój neuropatii jaskrowej oraz stworzenie skuteczniejszych metod hamowania jej rozwoju.

### 13. SUMMARY

Glaucoma is a progressive optic neuropathy associated with: accelerated programmed cell death due to retinal ganglion neurotrophic deprivation and changes in lamina cribrosa phenotype. The loss of retinal ganglion cells, leads to disruption of the functional visual pathway continuity, and development of specific, depending on the architecture of the retina and optic nerve defects in the visual field. Elevated intraocular pressure is the most important known risk factor for the development of glaucomatous optic neuropathy

Only force that causes the tissue deformation can cause a reaction on the part of the cellular elements. The value of this force depends on the biomechanical properties of the tissue. Tissues receiving this type of mechanical stress in the eye are: peripapillary scleral tissue and the duct wall of the optic nerve and scleral lamina cribrosa.

A common feature of all types of cells containing the contractile proteins is their ability to respond to shrinkage on reaching their stimulating signals. Active shrinkage cell elements organisms is conditioned by the presence in their structure of contractile proteins, such as smooth muscle actin and their supporting elements, such as  $\alpha$ -actinin.

#### PURPOSE

Immunohistochemical assessment of the presence of  $\alpha$ -actinin and smooth muscle actin in the scleral lamina cribrosa of eyes with glaucomatous neuropathy, depending on the elevated intraocular pressure.

Analysis of these data is to answer the question: Are there structural contractile proteins in lamina cribrosa cellular elements, causing present tissue features shrink?

#### RESEARCH METHODOLOGY

##### RESEARCH GROUP: CRITERIA FOR CLINICAL QUALIFICATION

###### A. Participants:

- lack of light perception,
- Qualification for enucleation because of not responding to therapy, painful glaucomatous neuropathy,
- high intraocular pressure (> 30 mmHg) at the time of enucleation.

###### B. Control Group:

- qualified for the enucleation because of the presence of intraocular proliferative process, which is not eligible for another method of therapy due to its the severity,

- the optic disc is clinically not infiltrated with proliferative process,
- no signs of glaucomatous optic neuropathy and IOP < 21 mmHg in the period of observation / medical history.

The original research group which meets the above criteria, was thirty eyes enucleated because of glaucomatous optic neuropathy and made thirty eyes enucleated because of intraocular tumor presence. After enucleation histological study and histological classification of preparations were carried out .

#### HISTOLOGICAL ELIGIBILITY CRITERIA (post- histological preparation):

##### A. Participants:

- accurate visualization of scleral lamina cribrosa in eyeball axial section, no signs of mechanical damage to her / corrugation,
- the four fields with a magnification of 200x evaluation possibility, within a single lamina cribrosa preparation,
- histological markers of glaucomatous optic neuropathy.

##### B. Control Group:

- accurate visualization of scleral lamina cribrosa in eyeball axial section, no signs of mechanical damage to her / corrugation,
- the four fields with a magnification of 200x evaluation possibility, within a single lamina cribrosa preparation,
- lack of histological markers of lamina cribrosa infiltration by intraocular proliferative process,
- lack of histological markers of glaucomatous optic neuropathy.

The original group of eyeballs fulfilling criteria for further immunohistochemical processing met:

A. Study Group 8 eyes of 8 patients.

B. Control Group 7 Eye 7 patients.

The main disqualifying rules were:

- Lack of lamina cribrosa proper visualization, its mechanical damage or abnormal structural cross-section and the inability to obtain the correct axial sections of optic nerve tissue in the subsequent sections (study group: 14 Eye / control group of 16 eyes),
- infiltration of the optic nerve structures through a hyperplastic process (study group: 0 eye / control group: 1 eye)

- broken glass cover slip preventing a reliable assessment of the preparation (study group 3 eyes / control group 2 eyes),
- Too small lamina cribrosa area in preparation preventing the evaluation of the four fields with a magnification of 200x (study group 5 eyes / eye control group 4).

The final immunohistological analysis qualified:

A. Study Group 8 eyes of 8 patients

B. Control Group 7 Eye 7 patients

## RESULTS

In the group of glaucomatous optic neuropathy immunohistochemical analysis were: 16 preparations meeting the criteria for research, coming from eight eyes, and in the control group, 14 preparations of seven eyeballs - one preparation for the assessment of SMA and one to assess the presence of alpha-actinin in scleral lamina cribrosa cells knob eyes.

Statistically significant differences between the group of glaucomatous neuropathy and those without glaucomatous optic neuropathy for the total number of cells expressing the SMA antigen and the percentage of these cells in the population studied tissues were detected.

Comparison of two SMA and alpha-actinin antigen expressions in patients with and without glaucomatous neuropathy showed statistically significant difference between the SMA antigen presentation and the percentage share of SMA positive cells, only in subset of lamina cribrosa tissue without glaucomatous neuropathy. In the group of glaucomatous neuropathy, there was no statistically significant difference due to the large standard deviation for the positive expression of the antigen antibody.

### *Summary of statistical data analysis test and control groups*

	AVERAGE		ST. DEV.		SIZE N		TEST F UNIFORMITY variance	The significance level p of TEST F	T TEST FOR AVERAGE	The significance level p of T TEST
	GLAUCOMA	CONTROL	GLAUCOMA	CONTROL	GLAUCOMA	CONTROL				
<b>TOTAL ACTININ</b>	164,63	164,43	42,33	47,80	8	7	1,28	0,750	0,01	0,993
<b>TOTAL ACTININ +</b>	52,13	32,57	37,21	22,21	8	7	2,81	0,230	1,21	0,247
<b>TOTAL SMA</b>	177,75	150,29	69,31	42,39	8	7	2,67	0,252	0,91	0,380
<b>TOTAL SMA+</b>	27,25	8,43	21,54	4,43	8	7	23,65	0,001	2,26	0,042
<b>%ACTININ +</b>	34,99	22,20	25,30	18,34	8	7	1,90	0,451	1,11	0,289
<b>%SMA +</b>	17,05	5,81	14,00	2,62	8	7	28,65	0,001	2,08	0,049

## CONCLUSIONS

1. Immunohistochemical study confirmed the presence in scleral lamina cribrosa cellular elements containing smooth muscle actin and alpha-actinin - markers of smooth muscle cells and smooth muscle cells –like cells such as myofibroblasts and mioepitelial cells.
2. The study showed also growth of these cells population in tissues subjected to excessive physical force. In the case of the study the force was the elevated intraocular pressure, acting against lamina cribrosa and determining the development of glaucomatous optic neuropathy.
3. The data resulting from the analysis of the study, together with the available literature data and current diagnostic capabilities may condition the emergence of methods of early detection of population exposed to the development of glaucomatous optic neuropathy and the creation of more effective methods of inhibiting its development.



## 14. SPIS RYCIN

### **Ryc. 1, s. 5.**

Po lewej: kontrolna tkanka nerwu wzrokowego – pozytywna reakcja immunohistochemiczna wskazująca na obecność czynnika neurotroficznego, obecna w siatkówce, obszarze przedblaszkowym, blaszkowym oraz pozablaszkowym nerwu wzrokowego ( barwa brązowa)

Po prawej: neuropatia jaskrowa- zahamowanie wstecznego transportu czynnika neurotroficznego na poziomie blaszki sitowatej twardówki, brak obecności czynnika neurotroficznego w części przedblaszkowej nerwu wzrokowego oraz w siatkówce (źródło: Quigley, HA, i wsp.. 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 3460-3466).

### **Ryc. 2, s. 8.**

Przekrój podłużny przez okolicę tarczy nerwu wzrokowego i okołotarczowej siatkówki gałki ocznej (źródło: materiały własne autora).

### **Ryc. 3, s. 9.**

Tarcza nerwu wzrokowego – obraz fizjologiczny (Źródło: Jonas, J.B., 1997. Optic disk. J Glaucoma, Dec 6(6), 436-437).

### **Ryc. 4, s. 10.**

Tylna blaszka sitowata oraz początkowy obszar pozablaszkowej części nerwu wzrokowego – przegrody łącznotkankowe dzielące włókna nerwu wzrokowego na pęczki (źródło: Nishida S., 1993. The three-dimensional architecture of collagen fibrils in the lamina cribrosa and the anterior part of the optic nerve, Med. Electron Microsc., 26(3-4), 199-205).

### **Ryc. 5, s. 15.**

Struktury kąta przesączania w obrazie mikroskopu skaningowego (źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump J Glaucoma,13, 421-438).

### **Ryc. 6, s. 16.**

Komórki okołokanalikowe (źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump J Glaucoma,13, 421-438).

### **Ryc. 7, s. 16.**

Zastawka kanału Schlemma (źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump J Glaucoma, 13, 421-438).

**Ryc. 8, s. 17.**

Schemat działania mechanizmu pompy cieczy wodnistej kąta przesączania gałki ocznej (źródło: Murray A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump J Glaucoma, 13, 421-438).

**Ryc. 9, s. 18.**

Oczna Amplituda Pulsacyjna w badaniu Ciągłej Tonografii Ocznej Triggerfish (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 10, s. 19.**

Właściwości kurczliwe tkanki beleczkowania

Po lewej: Aktywny skurcz beleczkowania pod wpływem carbacholu i jego relaksacja pod wpływem genisteiny.

Po prawej: Redukcja współczynnika odpływu cieczy wodnistej pod wpływem skurczu beleczkowania wywołanego podaniem pilocarpiny (model przepływowy odcinka przedniego oka, pozbawionego ciała rzęskowego) (źródło: Wiederholt M i wsp., 2000. Regulation of Trabecular Meshwork and Ciliary Muscle Contractility. Progress in Retinal and Eye Research Vol. 19, No. 3, 271-295).

**Ryc. 11, s. 20.**

Blok rzęskowy (źródło: Quigley H.A., 2009. Angle-Closure Glaucoma-Simpler Answers to Complex Mechanisms: LXVI Edward Jackson Memorial Lecture Am J Ophthalmol., 148, 657-669).

**Ryc. 12, s. 21.**

3-wymiarowy obraz odcinka przedniego oka ze schematycznym opisem lokalizacji tunelu tęczówkowo-soczewkowego (źródło: Silver D.M, Quigley H.A., 2004. Flow through the iris-lens channel: estimates of differential pressure between the anterior and posterior chambers. J Glaucoma, 2004, Apr,13(2),100-107).

**Ryc. 13a, b, c, s. 22.**

Kanał tęczówkowo-soczewkowy – schemat wpływu: a. wartości przepływu cieczy wodnistej, b. długości oraz c. wysokości kanału na różnicę ciśnienia wewnątrzgałkowego pomiędzy komorą przednią i tylną gałki ocznej w zależności od średnicy źrenicy (źródło: Silver D.M., Quigley H.A., 2004. Flow through the iris-lens channel: estimates of differential pressure between the anterior and posterior chambers. J Glaucoma, Apr,13(2),100-107).

**Ryc. 14, s. 22.**

Tęczówka w zespole rozproszenia barwnika w warunkach fotopowych. Zwiększona długość oraz zmniejszona wysokość kanału tęczówkowo-soczewkowego (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 15, s. 23.**

Blok źreniczny wywołany, nadreaktywnością mięśnia rozwieracza źrenicy (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 16, s. 24.**

Zespół *iris platau*, patologiczna dysgeneza ciała rzęskowego, wywołująca okresowe apozycyjne zamykanie się kąta przesączania (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 17, s. 24.**

Blok beleczkowania wywołany nadmiernym uwalnianiem nabłonka barwnikowego tęczówki w przebiegu zespołu pseudoeksfoliacji (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 18, s. 25.**

Naczyniak nadtwardówki w przebiegu zespołu Sturge-Webber (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 19, s. 27.**

Rozkład sił działających na blaszkę sitowatą twardówki, ściany kanału nerwu wzrokowego oraz twardówkę okolicy okołotarczowej (źródło: Burgoyne C.F., 2011. A biomechanical paradigm for axonal insult within the optic nerve head in aging and glaucoma. *Experimental Eye Research* 93, 120-132).

**Ryc. 20, s. 27.**

Wpływ sztywności twardówki okołotarczowej na napięcia wewnętrzne tkanki blaszki sitowatej (źródło: Eilaghi i wsp., 2010. *Annals of biomedical engineering*, Vol. 38, No. 4, Apr, 1586-1592).

**Ryc. 21, s. 34.**

Ryzyko wystąpienia zakrzepu żył siatkówki wśród pacjentów z nadciśnieniem ocznym (źródło: Barnett E., 2010. *The Incidence of Retinal Vein Occlusion in the Ocular Hypertension Treatment Study Ophthalmology*, March, 117(3), 484-488).

**Ryc. 22, s. 35.**

Podatność blaszki sitowatej twardówki (opis w tekście) (źródło: Burgoyne C.F. i wsp., 2005. *The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. Prog. Retin. Eye Res.* 24, 39-73).

**Ryc. 23, s. 36.**

Nadpodatność blaszki sitowatej twardówki, schemat C i D (opis w tekście) (źródło: Burgoyne C.F. i wsp., 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. Prog. Retin. Eye Res. 24, 39-73).

**Ryc. 24, s. 37.**

Wpływ długości osiowej gałki ocznej oraz sztywności twardówki okołotarczowej na napięcia wewnętrzne w obrębie blaszki sitowatej twardówki – siły rozciągające i ściskające (źródło: Sigal I.A., Ethier C.R., 2009b. Biomechanics of the optic nerve head. Exp. Eye Res. 88. 799-807).

**Ryc. 25, s. 40.**

Budowa miozyny I, cząsteczki miozyny II i filamentu miozyny II (źródło: Mazerski J., Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów).

**Ryc. 26, s. 41.**

Funkcje kompleksów aktyna-miozyna (źródło: Mazerski J., Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów).

**Ryc. 27, s. 42.**

Monomery oraz cząsteczka aktyny (źródło: Mazerski J., Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów).

**Ryc. 28, s. 43.**

Rola alfa-aktyny w stabilizacji filamentów aktynowych (źródło: Becker i wsp., Rozdział 23. Cellular movement and contractility, Course 1, Vinona State University. E-course).

**Ryc. 29, s. 54-55.**

Dokumentacja fotograficzna preparatów z grupy neuropatii jaskrowej uwzględniająca numer preparatu oraz typ reakcji immunohistochemicznej (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 30, s. 58-59.**

Dokumentacja fotograficzna preparatów z grupy kontrolnej, uwzględniająca numer preparatu oraz typ reakcji immunohistochemicznej (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 31, s. 64.**

Fotografia preparatu: Grupa kontrolna, barwienie w kierunku SMA, powiększenie 50x (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 32, s. 64.**

Fotografia preparatu z Ryc. 31, obszar blaszki sitowatej twardówki: powiększenie 200x, pojedyncze komórki o pozytywnej reakcji w kierunku SMA (oznaczono strzałkami) (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 33, s. 65.**

Fotografia preparatu: Grupa badana, barwienie w kierunku SMA, powiększenie 50x (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 34, s. 65.**

Fotografia preparatu z Ryc 33, obszar blaszki sitowatej twardówki: powiększenie 200x, liczne komórki o pozytywnej reakcji w kierunku SMA (oznaczono strzałkami) (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 35, s. 67.**

Zmiany morfologii komórek poddanych działaniu podwyższonego ciśnienia hydrostatycznego (źródło: Wax M.B. i wsp., 2000. Responses of different cell lines from ocular tissues to elevated hydrostatic pressure, Br. J. Ophthalmol. 84, 423-428).

**Ryc. 36, s. 69.**

Ocena immunohistochemiczna blaszki sitowatej twardówki gałek ocznych grupy kontrolnej i badanej wykazywała w tej tkance oka obecność znamiennej populacji komórek posiadających w swojej strukturze białka kurczliwe (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 37, s. 78.**

Zmiana parametrów morfometrycznych tarczy nerwu wzrokowego oczu z jaskrą pierwotną otwartego kąta w zależności od wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 38, s. 79.**

Ocena morfometryczna głębokość zagłębienia i grubość blaszki sitowatej twardówki tarczy nerwu wzrokowego z zastosowaniem HD-OCT Cirrus (źródło: materiały własne autora).

**Ryc. 39, s. 81.**

Uproszczony schemat dróg sygnałów, kontrolujących tworzenie się włókien stresowych (źródło: Jeongmin L., 2012. Effect of Ginkgo biloba Extract on Visual Field Progression in Normal Tension Glaucoma, J. Glaucoma 2012 May 16 [Epub ahead of print]).

## 15. SPIS TABEL

### **Tabela 1, s. 13.**

Częstość występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta w zależności od wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego (źródło: Sommer A. i wsp., 1991. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey Arch Ophthalmol., Aug 109(8), 1090-1095).

### **Tabela 2, s. 52.**

Dane biometryczne i liczbowe, dotyczące oceny immunohistochemicznej komórek blaszki sitowatej twardówki oczu z neuropatią jaskrową (źródło: materiały własne autora).

### **Tabela 3, s. 53.**

Wartości średnie i ich odchylenia standardowe dla całkowitej populacji komórek blaszki sitowatej twardówki oraz procentowego udziału komórek alfa-aktyna+ i SMA+ w grupie oczu z neuropatią jaskrową

Źródło: materiały własne autora.

### **Tabela 4, s. 53.**

Wartości średnie, ich odchylenie standardowe oraz parametry statystyczne dla poszczególnych grup danych wśród oczu z neuropatią jaskrową (źródło: materiały własne autora).

### **Tabela 5, s. 56.**

Dane biometryczne i liczbowe dotyczące oceny immunohistochemicznej komórek blaszki sitowatej twardówki oczu bez cech neuropatii jaskrowej (źródło: materiały własne autora).

### **Tabela 6, s. 57.**

Wartości średnie i ich odchylenia standardowe dla całkowitej populacji komórek blaszki sitowatej twardówki oraz procentowego udziału komórek alfa-aktyna+ i SMA+ , w grupie oczu bez cech neuropatii jaskrowej (źródło: materiały własne autora).

### **Tabela 7, s. 57.**

Wartości średnie, ich odchylenie standardowe oraz parametry statystyczne dla poszczególnych grup danych w oczach bez cech neuropatii jaskrowej (źródło: materiały własne autora).

### **Tabela 8, s. 60.**

Podsumowanie statystycznej analizy danych grupy badanej i kontrolnej (źródło: materiały własne autora).

### **Tabela 9, s. 81.**

Zmniejszenie tempa progresji uszkodzeń pola widzenia u pacjentów z jaskrą normalnego ciśnienia po zastosowaniu wyciągu z Gingko biloba (źródło: Jeongmin L., 2012, Effect of Ginkgo biloba Extract on Visual Field Progression in Normal Tension Glaucoma, J. Glaucoma. 2012 May 16 [Epub ahead of print]).

## 16. PIŚMIENNICTWO

1. Agoumi, Y.S. i wsp. 2010. Lamina and prelaminar tissue displacement during intraocular pressure elevation in glaucoma patients and healthy controls. *Ophthalmology*, in press, doi: 10.1016/j.ophtha.2010.05.016.
2. Albon, J. i wsp., 1995. Changes in the collagenous matrix of the aging human lamina cribrosa. *Br. J. Ophthalmol.* 79, 366-375.
3. Albon, J. i wsp., 2000. Age related changes in the non-collagenous components of the extracellular matrix of the human lamina cribrosa. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 311-317.
4. Albon, J. i wsp., 2007. Connective tissue structure of the tree shrew optic nerve and associated ageing changes. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2134-2144.
5. Anderson, D.R., Hendrickson, A., 1974. Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 771-783.
6. Balaratnasingam, C. i wsp., 2008. Time-dependent effects of elevated intraocular pressure on optic nerve head axonal transport and cytoskeleton proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 986-999.
7. Balazsi, A.G. i wsp., 1984. The effect of age on the nerve fiber population of the human optic nerve. *Am. J. Ophthalmol.* 97, 760-766.
8. Band, L.R., i wsp., 2009. Intracellular flow in optic nerve axons: a mechanism for cell death in glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3750-3758.
9. Barnett E., 2010. The Incidence of Retinal Vein Occlusion in the Ocular Hypertension Treatment Study *Ophthalmology*, March, 117(3), 484-488.
10. Becker i wsp., b. r. w. Rozdział 23. Cellular movement and contractility. Course 1, Vinona State University. E-course.
11. Bellezza, A.J. i wsp., 2003b. Deformation of the lamina cribrosa and anterior scleral canal wall in early experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 623-637.
12. Berdahl, J.P. i wsp., 2008a. Cerebrospinal fluid pressure is decreased in primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 115, 763-768.
13. Berdahl, J.P. i wsp., 2008b. Intracranial pressure in primary open angle glaucoma, normal tension glaucoma, and ocular hypertension: a case-control study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5412-5418.
14. Bochenek, A., Reichert, M., 1993. *Anatomia człowieka, Tom IV, Układ Nerwowy Ośrodkowy*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 384-389.
15. Boland, M.V., Quigley, H.A., 2007. Risk factors and open angle glaucoma: classification and application. *J. Glaucoma* 16:406-418.
16. Brown, C.T. i wsp., 1994. Age-related changes of scleral hydration and sulfated glycosaminoglycans. *Mech. Ageing Dev.* 77, 97-107.

17. Burgoyne, C.F., Quigley, H.A., Thompson, H.W., Vitale, S., Varma, R., 1995. Early changes in optic disc compliance and surface position in experimental glaucoma. *Ophthalmology* 102, 1800-1809.
18. Burgoyne, C.F., Morrison, J.C., 2001. The anatomy and pathophysiology of the optic nerve head in glaucoma. *J. Glaucoma* 10, S16-S18.
19. Burgoyne, C.F. i wsp., 2004. Three-dimensional reconstruction of normal and early glaucoma monkey optic nerve head connective tissues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4388-4399.
20. Burgoyne, C.F. i wsp., 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 39-73.
21. Burgoyne, C.F., Downs, J.C., 2008. Premise and prediction – how optic nerve head biomechanics underlies the susceptibility and clinical behavior of the aged optic nerve head, *J. Glaucoma* 17, 318-328.
22. Burgoyne, C.F., 2011. A biomechanical paradigm for axonal insult within the optic nerve head in aging and glaucoma. *Experimental Eye Research* 93, 120-132
23. Darby, I., 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest.* 63, 21-29.
24. Dolman, C.L. i wsp., 1980. Aging of the optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* 98, 2053-2058.
25. Downs, J.C. i wsp., 2005. Viscoelastic material properties of the peripapillary sclera in normal and early-glaucoma monkey eyes. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 540-546.
26. Downs, J.C. i wsp., 2007. 3-D histomorphometry of the normal and early glaucomatous monkey optic nerve head: neural canal and subarachnoid space architecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3195-3208.
27. Downs, J.C. i wsp., 2009. Mechanical strain and restructuring of the optic nerve head. In: Shaarawy, T., Sherwood, M., Hitchings, RA, Crowston, J.G. (Eds.), *Glaucoma*, first ed., W.B. Saunders, London.
28. Eilaghi i wsp., 2010. *Annals of biomedical engineering*. Vol. 38, No. 4, 1586-1592.
29. Ernest J.T., Potts A.M., 1968. Pathophysiology of the distal portion of the optic nerve. I. Tissue pressure relationships. *Am J Ophthalmol.* Sep, 66(3), 373-380.
30. Fechtner, R.D., Weinreb R.N., 1994. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 39, 23-42.
31. Gaasterland. D. i wsp., 1978. Axoplasmic flow during chronic experimental glaucoma. 1. Light and electron microscopic studies of the monkey optic nervehead during development of glaucomatous cupping. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 838-846.
32. Garcia-Valenzuela, E. i wsp., 1995. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp. Eye Res.* 61, 33-44.
33. Haefliger, I.O., Anderson, D.R., 1996. Blood flow regulation in the optic nerve head. In: Ritch, R., Shields. M.B., Krupin, T. (Eds.), *The Glaucomas*, second ed. Mosby, St Louis.



34. Harris, A. i wsp., 2000. Aging affects the retrobulbar circulation differently in women and men. *Arch. Ophthalmol.* 118, 1076-1080.
35. Harris A., Misiuk-Hojło M. 2010. Aktualne poglądy na jaskrę: naczyniowe czynniki ryzyka, rozdział 4. Naczyniowe czynniki ryzyka. Górnicki Wydawnictwo Medyczne, ISBN 978-83-61257-88-2, 33-83.
36. Hayreh, S.S. i wsp., 1970. Vasogenic origin of visual field defects and optic nerve changes in glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 54, 461-472.
37. Hayreh, S.S. i wsp., 1994. Nocturnal arterial hypotension and its role in optic nerve head and ocular ischemic disorders. *Am. J. Ophthalmol.* 117, 603-624.
38. Hernandez, M.R. i wsp., 1989. Age-related changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am. J. Ophthalmol.* 107, 476-484.
39. Hernandez, M.R., 2000. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling, *Prog. Retin. Eye Res.* 19, 297-321.
40. Hernandez, M.R. i wsp., 2008. Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Prog. Brain Res.* 173, 353-373.
41. Hinz, B. i wsp., 2001. Alpha smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* 12, 2730-2741.
42. Hinz, B. i wsp., 2007. The Myofibroblast. One function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* 170, 1807-1816.
43. Hollander, H. i wsp., 1995. Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Res.* 27, 296-309.
44. Jeongmin L., 2012, Effect of Ginkgo biloba Extract on Visual Field Progression in Normal Tension Glaucoma *J. Glaucoma.* 2012 May 16 [Epub ahead of print].
45. Johansson, J.O., 1983. Inhibition of retrograde axoplasmic transport in rat optic nerve by increased IOP in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 1552-1558.
46. Johnson. E.C. i wsp., 1996. The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve head extracellular matrix. *Exp. Eye Res.* 62, 663-674.
47. Johnson, E.C. i wsp., 2000. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 431-442.
48. Johnson, E.C. i wsp., 2007. Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3161-3177.
49. Johnson, E.C., Morrison, J.C., 2009. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J. Glaucoma* 18, 341-353.
50. Jonas, J.B, 1997. Optic disk. *J Glaucoma.* 1997, Dec 6(6), 436-437.
51. Jonas, J.B. i wsp., 2003. Anatomic relationship between lamina cribrosa, intraocular space, and cerebrospinal fluid space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5189-5195.

- 52.** Jonas, J.B. i wsp., 2004. Lamina cribrosa thickness and spatial relationships between intraocular space and cerebrospinal fluid space in highly myopic eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2660-2665.
- 53.** Jonas, J.B., 2007. Trans-lamina cribrosa pressure difference. *Arch. Ophthalmol.* 125, 431. author reply 431.
- 54.** Klein, B.E. i wsp., 2006. Does the intraocular pressure effect on optic disc cupping differ by age? *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 104, 143-148.
- 55.** Kotecha, A. i wsp., 2006. Age related changes in the thickness of the human lamina cribrosa. *Br. J. Ophthalmol.* 90,1531-1534.
- 56.** Margulies, S.S., 1992. A proposed tolerance criterion for diffuse axonal injury in man. *J. Biomech.* 25, 917-923
- 57.** Mazerski J., b. r. w. Ruch w układach biologicznych. Materiały pomocnicze do wykładów.
- 58.** Minckler, D.S. i wsp., 1977. Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 426-441.
- 59.** Misiuk-Hojło, M. i wsp., 2006. Zespół obturacyjnego bezdechu sennego jako czynnik ryzyka rozwoju neuropatii jaskrowej, *Klinika Oczna*, 106 (1-2 Suppl.):245-246.
- 60.** Morgan, J.E., 2000. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye* 14 (Pt 3B), 437-444.
- 61.** Morgan, J.E., 2004. Circulation and axonal transport in the optic nerve. *Eye* 18, 1089-1095.
- 62.** Morgan, W.H. i wsp., 1995. The influence of cerebrospinal fluid pressure on the lamina cribrosa tissue pressure gradient. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1163-1172.
- 63.** Morgan, W.H. i wsp., 1998. The correlation between cerebrospinal fluid pressure and retrolaminar tissue pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39,1419-1428.
- 64.** Morgan, W.H. i wsp., 2002. Optic disc movement with variations in intraocular and cerebrospinal fluid pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3236-3242.
- 65.** Morgan, W.H. i wsp., 2008. The role of cerebrospinal fluid pressure in glaucoma pathophysiology: the dark side of the optic disc. *J. Glaucoma* 17, 408-413.
- 66.** Murray, A., 2004. The Aqueous Outflow System as a Mechanical Pump, *J. Glaucoma* 13, 421-438.
- 67.** Nagamoto T. i wsp., 2000. Alpha-smooth muscle actin expression in cultures lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:1122-1129.
- 68.** Nishida S., 1993. The three-dimensional architecture of collagen fibrills in the lamina cribrosa and the anterior part of the optic nerve. *Med. Electron Microsc.* 26(3-4), 199-205.
- 69.** Pellegrin S., 2007. Actin stress fibres *Journal of Cell Science* 120, 3491-3499.
- 70.** Pena, J.D. i wsp., 2001. Increased elastin expression in astrocytes of the lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2303-2314.

71. Quigley, H.A., Anderson, D.R., 1976. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 15, 606-616.
72. Quigley, HA, Green, W.R., 1979. The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 86,1803-1830.
73. Quigley, H.A. i wsp., 1981. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* 99, 635-649.
74. Quigley, H.A. i wsp., 1983. Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 95, 673-691.
75. Quigley, H.A. i wsp. 1990. The size and shape of the optic disc in normal human eyes. *Arch. Ophthalmol.* 108, 51-57.
76. Quigley, H.A., 1995a. Ganglion cell death in glaucoma: pathology recapitulates ontogeny. *Aust N.Z. J. Ophthalmol.* 23, 85-91.
77. Quigley, H.A. i wsp., 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 774-786.
78. Quigley, H.A., 1999. Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 39-57.
79. Quigley, H.A. i wsp.. 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3460-3466.
80. Quigley H.A., 2009; Angle-Closure Glaucoma—Simpler Answers to Complex Mechanisms: LXVI Edward Jackson Memorial Lecture *Am J Ophthalmol.* 148, 657-669.
81. Ren, R., Jonas, J.B., Tian, G., Zhen, Y., Ma, K., Li, S., Wang, H., Li, B., Zhang, X., Wang, N., 2010. Cerebrospinal fluid pressure in glaucoma. A prospective study. *Ophthalmology* 117, 259-266.
82. Repka, M.X., Quigley. H.A., 1989. The effect of age on normal human optic nerve fiber number and diameter. *Ophthalmology* 96, 26-32.
83. Roberts, M.D. i wsp., 2009. Remodeling of the connective tissue microarchitecture of the lamina cribrosa in early experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 681-690.
84. Sappino, A. P., 1990. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.* 63, 144-161.
85. Sigal I.A. i wsp., 2005. Factors influencing optic nerve head biomechanics. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 4189-4199.
86. Sigal, I.A., 2009. Interactions between geometry and mechanical properties on the optic nerve head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2785-2795.
87. Sigal, I.A. i wsp., 2009a. Modeling individual-specific human optic nerve head biomechanics. Part I: IOP-induced deformations and influence of geometry. *Biomech. Model Mechanobiol.* 8, 85-98.
88. Sigal, I.A., Ethier, C.R., 2009b. Biomechanics of the optic nerve head. *Exp. Eye Res.* 88, 799-807.

- 89.** Sigal, I.A. i wsp., 2009c. Modeling individual-specific human optic nerve head biomechanics. Part II: influence of material properties. *Biomech. Model Mechanobiol.* 8, 99-109.
- 90.** Sigal, I.A. i wsp., 2010a. 3D morphometry of the human optic nerve head. *Exp. Eye Res.* 90, 70-80.
- 91.** Sigal, I.A. i wsp., 2010b. Chapter 20: biomechanical changes of the optic disc. In: Levin, L.A., Albert, D.M. (Eds.), *Ocular Disease: Mechanisms and Management*. Elsevier/Saunders, New York.
- 92.** Silver D.M, Quigley H.A., 2004. Flow through the iris-lens channel: estimates of differential pressure between the anterior and posterior chambers. *J Glaucoma.* Apr. 13(2),100-107.
- 93.** Sommer A. i wsp., 1991. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. *The Baltimore Eye Survey Arch Ophthalmol.* Aug.109(8), 1090-1095.
- 94.** Stumpff, F., 2000. Regulation of Trabecular Meshwork Contractility. *Ophthalmologica*, 214, 33-53.
- 95.** Steely, T.H., 2007. The Similarity of Protein Expression in Trabecular Meshwork and Lamina Cribrosa: Implications for Glaucoma, *Exp. Eye Res.* 2000(70), 17-30.
- 96.** Tezel, G. i wsp., 1997. Parapapillary chorioretinal atrophy in patients with ocular hypertension. II. An evaluation of progressive changes. *Arch. Ophthalmol.* 115, 1509-1514.
- 97.** Tezel, G. i wsp., 2001. In vitro evaluation of reactive astrocyte migration, a component of tissue remodeling in glaucomatous optic nerve head. *Glia* 34, 178-189.
- 98.** Tomasek, J.J, 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349-363.
- 99.** Trobe, J.D. i wsp., 1980. Nonglaucomatous excavation of the optic disc. *Arch. Ophthalmol.* 98,1046-1050.
- 100.** Thygesen J., 2009. 3th EGS European Residents Glaucoma Course, Geneva.
- 101.** Wax M.B. i wsp. 2000. Responses of different cell lines from ocular tissues to elevated hydrostatic pressure *Br J Ophthalmol.* 84:423-428.
- 102.** Wiederholt M. i wsp., 2000. *Progress in Retinal and Eye Research* Vol. 19, No. 3, 271-295.
- 103.** Varela, H.J., Hernandez, M.R., 1997. Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J. Glaucoma* 6, 303-313.
- 104.** Yablonski, M., Asamoto, A., 1993. Basic sciences in clinical glaucoma: hypothesis concerning the pathophysiology of optic nerve damage in open angle glaucoma. *J. Glaucoma* 2, 119-127.
- 105.** Yang, H. i wsp., 2007. 3-D histomorphometry of the normal and early glaucomatous monkey optic nerve head: lamina cribrosa and peripapillary scleral position and thickness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4597-4607.

- 106.** Yang, H. i wsp., 2009a. Physiologic intereye differences in monkey optic nerve head architecture and their relation to changes in early experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 224-234.
- 107.** Yang, H. i wsp., 2009b. Deformation of the normal monkey optic nerve head connective tissue after acute IOP elevation within 3-D histomorphometric reconstructions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5785-5799.
- 108.** Yang, H. i wsp., 2010. Optic nerve head lamina cribrosa insertion migration and pialization in early non-human primate experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, ARVO, Abstract, 1631.
- 109.** Ye, H., Hernandez, M.R., 1995. Heterogeneity of astrocytes in human optic nerve head. *J. Comp. Neurol.* 362, 441-452.
- 110.** Terminology and Guidelines For Glaucoma 3th Edition, European Glaucoma Society. 2008, Chapter 2, 93-109
- 111.** Terminology and Guidelines For Glaucoma 3th Edition, European Glaucoma Society. 2008, Chapter 1, 61