

STRESZCZENIE (POLSKI)

Niniejsza praca doktorska została wykonana zgodnie z założeniami projektu EDEN (European Dry Eye Network), finansowanego z programu Horyzont2020, w grantcie Marii Skłodowskiej-Curie o numerze 6462760. Praca opisuje szeroko zakrojone badania mające na celu zidentyfikowanie lub wynalezienie nowych makro-biomarkerów, które zmierzone w sposób obiektywny i nieinwazyjny posłużą jako wskaźniki zespołu suchego oka (ZSO), w szczególności, w jego początkowej fazie.

W tym celu, niniejsza praca proponuje nowe miary dynamiki filmu łzowego w serii eksperymentów oraz dogłębnie śledzi jaką rolę odgrywają te nowe i inne, ustandaryzowane, miary w patofizjologii ZSO, poprzez śledzenie trendów tych markerów przez okres jednego roku u pacjentów z początkowymi lub umiarkowanymi objawami ZSO.

Główną hipotezą kierującą niniejszymi badaniami, jest stwierdzenie, że *spadek homeostazy filmu łzowego*, który to jest w literaturze opisany jako kluczowy patologiczny mechanizm u podstaw ZSO, może być wyrażony nie tylko jako zaburzenie proporcji poszczególnych składników, czy też objętości poszczególnych komponentów filmu łzowego, lecz także jako brak równowagi pomiędzy hydrodynamicznymi procesami zachodzącymi w filmie łzowym lub meniskach łzowych.

Wspomniane hydrodynamiczne procesy w zdrowym oku zachodzą w równowadze odpowiedniej dla zachowania homeostazy filmu łzowego i adekwatnie do warunków środowiskowych, zdrowotnych i psychofizycznych, zaś regulowane są przez funkcjonalną jednostkę łzową (ang. lacrimal functional unit, LFU). Zaburzenie któregośkolwiek z tych procesów może trwale upośledzić tę równowagę i zapoczątkować rozwój ZSO.

Na podstawie powyższego założenia, współczynnik wymiany filmu łzowego (ang. tear clearance rate, TCR lub tear turnover rate, TTR) został wybrany jako potencjalny makro-biomarker ZSO. TCR i TTR tak jak i ZSO cechuje wieloczynnikowa natura. Wskaźniki te są proporcjonalne do wszystkich hydrodynamicznych procesów zachodzących w filmie łzowym i meniskach oraz wykazują potencjalne zastosowanie w diagnostyce różnicowej ZSO.

W niniejszej pracy badawczej zostało opracowanych kilka miar i protokołów pomiarowych, które mogą zostać zinterpretowane i użyte jako kwantyfikatory wymiany łez. Co więcej, kilka istniejących już miar zostało zidentyfikowanych jako potencjalne biomarkery ZSO. Te kwantyfikatory mogą być nieinwazyjnie zmierzone, obiektywnie przeanalizowane i mogą być stosowane w warunkach klinicznych. Tymi markerami są, w szczególności, osmolarność łez, parametry geometryczne menisku łzowego mierzone dynamicznie, stabilność filmu łzowego określona obiektywnie oraz TCR.

Niniejsza praca została podzielona na dwie główne części: ***Eksperymentalną*** i ***Studium trendów biomarkerów***. W części eksperymentalnej (***Rozdział II***) zaproponowano nowe metody ilościowej analizy dynamiki filmu łzowego. Część druga (***Rozdział III***), opisuje proces przygotowania, przebieg oraz wyniki rocznej obserwacji trendów biomarkerów u osób noszących soczewki kontaktowe.

Ważnym jest, by opracować prostsze, przez co także, łatwiejsze w zastosowaniu klinicznym, metody ilościowej oceny dynamiki filmu łzowego, takie jak czynnik TCR. Techniki opisane w rozdziale eksperymentalnym mogą zostać użyte do śledzenia, analizy i ilościowego opisu różnego rodzaju aspektów dynamiki łez. TCR i TTR w literaturze zostały opisane jako miary integralności LFU oraz wymiany łez na powierzchni oka. Te parametry mogą stać się potencjalnymi makro-biomarkerami ZSO. Kładąc nacisk na kliniczną przydatność metod

opisanych powyżej, niniejsza praca proponuje nowe, alternatywne metody pomiaru dynamiki łez w formie trzech niezależnych eksperymentów. Opisuje ona dwie alternatywy dla tradycyjnych skomplikowanych i laboratoryjnych pomiarów TCR i TTR. Pierwsza z proponowanych metod polega na śledzeniu spadku intensywności fluorescencji fluoresceiny w filmie łzowym przy pomocy profilometrii rogówkowo-skleralnej (***Eksperyment 1***), druga zaś umożliwia estymację wczesnofazowej wymiany łez przy użyciu spektralnej optycznej koherentnej tomografii (ang. Optical coherence tomography, OCT) (***Eksperyment 3***), w oparciu o algorytm meniskometrii dynamicznej zaproponowany w ***Eksperyment 2***. ***Eksperyment 2*** porównuje trzy różne metody pomiaru geometrycznych parametrów menisku łzowego: metodę standardową *en face*, metodę opartą na statycznym, pojedynczym B-skanie OCT oraz nową metodę opartą na serii takich B-skanów (meniskometria dynamiczna).

Aby zaobserwować widoczne zmiany na powierzchni oka i w filmie łzowym w czasie, uczestnikom ***badania trendów biomarkerów*** zostały dobrane jednodniowe soczewki kontaktowe wykonane z materiału silikonowo-hydrożelowego (Delefilcon A) lub hydrożelowego (Omafilcon A), które uczestnicy nosili przez okres 12 miesięcy. Protokół badań podłużnych został przygotowany z uwzględnieniem ram czasowych i finansowych projektu EDEN. Darmowy zapas soczewek kontaktowych, który został przydzielony każdemu z uczestników, wpłynął na niezwykle mały współczynnik ich rezygnacji z udziału w badaniach, zaś stała kontrola przez specjalistę pozytywnie przyczyniła się do przestrzegania przez uczestników zaleceń względem pielęgnacji soczewek oraz czasu i częstotliwości ich noszenia. W związku z powyższymi czynnikami, u większości uczestników zaobserwowano pozytywne zmiany w fizjologii powierzchni oka oraz filmu łzowego. Główną hipotezą leżącą u podstaw powyższej metodologii, było założenie, że noszenie soczewek kontaktowych zaburzy w choćby minimalnym stopniu fizjologię powierzchni oka i filmu

łzowego na przestrzeni jednego roku, dzięki czemu możliwe będzie zaobserwowanie trendów zaproponowanych biomarkerów.

Na protokół rocznych badań składało się 7 wizyt: wizyta bazowa wykonana na oczach bez soczewek, wizyta z dopasowaniem soczewek następnego dnia, wizyta kontrolna po dwóch tygodniach noszenia soczewek oraz właściwe wizyty pomiarowe po trzech, sześciu i 12 miesiącach noszenia soczewek kontaktowych, po których wykonano kolejne pomiary, po 3-dniowej przerwie w noszeniu soczewek. Temperatura i wilgotność powietrza w laboratorium pomiarowym była notowana osobno dla każdego uczestnika. Na pomiary składał się zestaw metod, które pozwalają na ilościowe i obiektywne określenie wszystkich procesów fizjologicznych wymienionych jako objawy ZSO, a które można zmierzyć w klinice i przy pomocy ogólnodostępnych urządzeń. Protokół zawierał zatem pomiary takie jak: kwestionariusz oceny chorób powierzchni oka (ang. Ocular Surface Disease Index, OSDI), skrócony kwestionariusz oceny zespołu suchego oka (5-item Dry Eye Questionnaire, DEQ-5), pomiar menisku łzowego w obserwacji *en face* przy pomocy Keratografu Oculus 5M® (K5M), pomiar osmolarności łez przy pomocy osmometru TearLab Osmolarity System®, nieinwazyjny pomiar czasu przzerwiania filmu łzowego przy pomocy K5M i ocena przedniego odcinka oka pod biomikroskopem z lampą szczelinową oraz pomiar grubości rogówki przy pomocy OCT. Kolejno wykonane zostały pomiary niestandardowe, zaproponowane w części eksperymentalnej niniejszej pracy, takie jak dynamiczna meniskometria z użyciem OCT i estymacja TCR w oparciu o dynamiczną meniskometrię, by następnie ocenić uszkodzenie powierzchni oka na bazie pomiarów barwienia spojówki i rogówki zielenią lizaminową i fluoresceiną, oraz na bazie barwienia wycieraczki powiekowej i meibografii wykonanej w podczerwieni przy pomocy K5M.

Nacisk kładziono na to, aby, gdy to tylko możliwe, powyższe pomiary wykonać metodami gwarantującymi maksymalne zautomatyzowanie, powtarzalność, minimalną inwazyjność i obiektywność oceny oraz łatwość zastosowania w warunkach klinicznych.

Roczne pomiary trendów biomarkerów ukończyło 55 uczestników. Grupa składała się z młodych, zdrowych osób, których średni wiek to (średnia \pm odchylenie standardowe) 26 ± 4 lata, w przedziale od 20 do 37 lat. Na podstawie procedury dopasowania soczewek, 38 osobom (w tym 25 kobietom i 13 mężczyznom) dopasowano jednodniowe, miękkie soczewki silikonowo-hydrożelowe, a pozostałym 17 osobom (w tym 11 kobietom i 6 mężczyznom) soczewki hydrożelowe.

Ponieważ nie było statystycznie znaczącej różnicy w żadnym z mierzonych parametrów pomiędzy grupami noszącymi różne soczewki lub też grupami różnej płci, grupę badawczą ujednolicono i rozpatrywano całościowo w funkcji czasu. Nieparametryczna dwuczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie znaczące trendy czasowe w OSDI, DEQ-5, osmolarności łez, nieinwazyjnych czasach przerwania filmu łzowego, dynamicznie mierzonej wysokości menisku łzowego, TCR oraz barwieniu powierzchni oka i tarczki powiekowej, a także w grubości centralnej rogówki i w meibografii. Brak zaobserwowanych statystycznie znaczących różnic pomiędzy pierwszą i ostatnią wizytą (które to zostały wykonane po przerwie w noszeniu soczewek) wskazuje na to, iż część zaobserwowanych zmian ma charakter przejściowy. Brak różnicy w stopniu przekrwienia rąbka rogówki i spojówki gałkowej może sugerować, iż obserwowane zmiany nie mają charakteru zapalnego.

W trakcie trwania badań widoczny był stopniowy spadek TCR. Pole powierzchni przekroju menisku łzowego było negatywnie skorelowane z osmolarnością. Dodatkowo, dynamiczna

meniskometria okazała się być metodą na tyle dokładną, by wykazać potencjalne zmiany w kształcie powierzchni oka i wpływ tych zmian na kształt menisku łzowego.

Metody pomiaru wymiany łez proponowane w niniejszej pracy są łatwe w wykonaniu, niezasochłonne i obiektywne, przez co potencjalnie mogą być stosowane w środowisku klinicznym. Profilometr fluoresceinowy może zostać użyty do śledzenia subtelnych, dynamicznych zmian w filmie łzowym na całej powierzchni oka w granicy szpary powiekowej. Metoda ta nie jest ograniczona przez przepuszczalność rogówki dla fluoresceiny i cechuje ją relatywnie duża powtarzalność.

Algorytm postępowania i program komputerowy napisany w celu dynamicznego pomiaru menisku łzowego przyczyniły się do zwiększenia precyzji pomiaru parametrów geometrycznych menisku i dokładniejszej ich estymacji, odpornej na dynamiczne zmiany tych parametrów po każdym mrugnięciu. OCT może zostać użyte jako szybka i dokładna, jakościowa oraz ilościowa metoda oceny menisku łzowego oraz TCR. Dzięki zastosowanemu algorytmowi, parametry menisku obliczane są dokładniej, szybciej i automatycznie. W niniejszej pracy zaobserwowano także, że dynamiczna meniskometria dostarcza nowych informacji na temat subtelnych zmian zachodzących w menisku łzowym, które są poza zasięgiem standardowej metody pomiaru statycznego lub pomiaru *en face*. Ocena TCR przy pomocy OCT jest nieinwazyjna, relatywnie szybka i dużo łatwiejsza w wykonaniu niż tradycyjnie metody używane do oceny wymiany i dynamiki filmu łzowego. OCT umożliwia bardziej wnikliwą wizualizację menisku oraz wymiany łez.

Niniejsza praca proponuje nowe miary homeostazy i dynamiki filmu łzowego oraz za ich pomocą eksploruje patofizjologiczny mechanizm ZSO. Śledząc trendy kilku potencjalnych biomarkerów na przestrzeni jednego roku wykazuje, że osmolarność łez może być używana

jako wskaźnik subtelnych zmian w fizjologii filmu łzowego. Zmiany osmolarności łez korelują z wyindukowanym u pacjentów pozytywnym efektem zmiany soczewek kontaktowych na jednodniowe i bardziej nowoczesne. Pozytywne zmiany zostały zaobserwowane zarówno u osób symptomatycznych, jak i u tych bez objawów ZSO. Wszystkie zmiany w osmolarności na przestrzeni roku były statystycznie znaczące. Dodatkowo, meniskometria oparta na zaproponowanym algorytmie na bazie dynamicznych pomiarów zdaje się być dobrym wyznacznikiem subtelnych zmian parametrów menisku łzowego w czasie. Obserwowalne zmiany wyrażały się także jako spowolniony czas wypłukiwania łez, czyli obniżony TCR.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska proponuje nowe metody pomiaru filmu łzowego oraz wykazuje, że osmolarność, TCR oraz dynamiczna meniskometria mogą być użyte jako potencjalne biomarkery wspierające diagnozę ZSO. Markery te są wrażliwe na subtelne zmiany fizjologii powierzchni oka u młodych, zdrowych osób, zatem z pewnością pozwolą na analizę owych zmian u osób z bardziej zaawansowaną manifestacją ZSO.