

lek. Anna Wójcik - Gryciuk

**NEUROPROTEKCJA KOMÓREK ZWOJOWYCH
SIATKÓWKI W JASKRZE EKSPERYMENTALNEJ ORAZ
REGULACJA POZIOMÓW BDNF**

**I RECEPTORA TrkB
W SIATKÓWCE I KORZE WZROKOWEJ PO TRANSFEKCJI
AAV2-BDNF**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Piotr Skopiński

Praca wykonana w Instytucie Biologii Doświadczalnej

im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Jaskra to przewlekła choroba nerwu wzrokowego i siatkówki, która prowadzi do ślepoty milionów ludzi na całym świecie. Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe w połączeniu z nie do końca jeszcze poznanymi zmianami molekularnymi i komórkowymi, prowadzi do uszkodzenia nerwu wzrokowego oraz struktur na wyższych piętrach drogi wzrokowej. Wszystkie dostępne obecnie metody leczenia jaskry, farmakologiczne, laserowe czy chirurgiczne mają na celu obniżenie ciśnienia wewnątrzgałkowego (baroprotekcję). Jednak u części pacjentów nadal dochodzi do progresji uszkodzeń jaskrowych pomimo utrzymywania wartości ciśnień wewnątrzgałkowych w granicach normy. A zatem sama tylko baroprotekcja nie jest ani optymalną, ani wystarczającą metodą leczenia jaskry. Mechanizmy zmian patofizjologicznych towarzyszących jaskrze są poznane w niewielkim stopniu, dlatego uznano, że podjęcie badań, które mogą rozszerzyć istniejący stan wiedzy oraz wpłynąć na

projektowanie i skuteczność metod terapeutycznych, wspomagających dotychczasowe postępowanie lecznicze jest gorącą potrzebą.

Prezentowana praca poświęcona jest zbadaniu mechanizmu rozwoju jaskry w warunkach zaburzonej podaży czynnika neurotroficznego BDNF do komórek zwojowych siatkówki. Czynniki neurotroficzne takie jak NGF, BDNF, neurotrofina 3 (NT-3) oraz neurotrofina 4/5 (NT-4/5) odgrywają kluczową rolę w rozwoju, przeżyciu i plastyczności neuronów. W świetle dostępnych danych wskazujących, że szczególnie BDNF ma wpływ na przeżycie komórek zwojowych, ten właśnie czynnik został wybrany do niniejszego badania.

CEL:

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

MATERIAŁ I METODOLOGIA BADAŃ

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar. Zwierzęta zostały podzielone na 3 grupy: natywna kontrola (n= 9), grupa I z jaskrą (jednostronna indukcja jaskry, n=14) oraz grupa II z jaskrą + AAV2-BDNF (jednostronna indukcja jaskry poprzedzona podaniem doszkliskowym AAV2-BDNF, n=13)

Schemat doświadczeń:

Badania podzielono na dwie części:

1. Pierwsza część obejmowała ocenę patofizjologicznych zmian w przebiegu jaskry. W celu określenia stopnia utraty komórek, w siatkówce liczono komórki zwojowe w oku z wywołaną jaskrą, porównując ich liczbę z liczbą komórek w oku kontrolnym tego samego zwierzęcia oraz natywną kontrolą. W celu (1) zweryfikowania hipotezy o zmniejszeniu zasobności siatkówki w czynnik neurotroficzny BDNF oraz receptor

TrkB i (2) odpowiedzi na pytanie, czy zmienia się również zasobność kory wzrokowej w powyższe czynniki, mierzono ich stężenie w obu strukturach, po stronie z wywołaną jaskrą i przeciwstronnie.

2. Druga część miała na celu oszacowanie efektywności terapii genowej z użyciem wektora wirusowego AAV, będącego nośnikiem sekwencji kodującej białko BDNF (wektor AAV2-BDNF). Aby ten cel uzyskać, przeprowadzono ocenę neuroprotekcyjnego wpływu podwyższonego poziomu BDNF w oku z wywołaną jaskrą, badając przeżywalność komórek zwojowych siatkówki. Ponadto zbadano, czy zwiększony poziom BDNF wpływa na ekspresję receptora TrkB w tkance siatkówki i porównano go z ekspresją TrkB w korze mózgowej, aby scharakteryzować potencjalne zmiany adaptacyjne, modyfikujące receptywność komórek na BDNF.

WYNIKI:

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

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

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

Przeprowadzone testy ELISA określające stężenia białka BDNF pokazały, że indukcja jednostronnej jaskry, powodowała obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach o około

30% w porównaniu do wartości uzyskanych od zwierząt natiwnych. Ponadto, obniżone poziomy BDNFu w siatkówkach OP i OL były silnie skorelowane co wskazuje, że dysfunkcja w oku jaskrowym nie jest dysfunkcją izolowaną i wywołuje również zmiany w oku towarzyszącym.

Iniekcja doszklistkowa wektora AAV2-BDNF skutkowała znaczącym, obustronnym wzrostem poziomów stężeń BDNF w siatkówkach. Stężenia te były ponad dwukrotnie wyższe niż u zwierząt natiwnych stanowiących kontrolę i trzykrotnie wyższe niż u szczurów z indukowaną jaskrą, którym nie podawano wektorów wirusowych z BDNF. Stężenia BDNF w siatkówkach oka prawego i lewego były ze sobą skorelowane, co ponownie sugeruje możliwość transportu czynnika BDNF z oka prawego z indukowaną jaskrą do oka towarzyszącego. Iniekcja wektora AAV2-BDNF nie miała istotnego statystycznie wpływu na wartości stężeń BDNF w korze mózgowej.

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

Doszklistkowa iniekcja AAV2-BDNF, skutkowała obustronną normalizacją poziomów TrkB w siatkówkach obu oczu. Stężenia TrkB w siatkówce oka lewego i prawego były silnie skorelowane co wskazuje na silną odpowiedź w warunkach zwiększonej podaży BDNF.

W mózgowej korze wzrokowej nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniach receptora TrkB ani w grupie z jednostronną jaskrą, ani w grupie zwierząt, którym przed indukcją jaskry podano AAV2- BDNF.

WNIOSKI:

1. Model jaskry beleczkowej z użyciem mikrogranulek polistyrenowych powoduje szybki wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego trwający kilka tygodni.
2. Jednostronna indukcja jaskry powoduje istotną utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i na obwodzie.

3. Jednostronna indukcja jaskry powoduje obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach.
4. Jednostronna indukcja jaskry powoduje obustronny wzrost stężenia białka TrkB w siatkówkach wszystkich szczurów. Stężenie to było 4- krotnie wyższe po stronie oka z jaskrą i 2- krotnie wyższe w siatkówkach oka towarzyszącego w porównaniu z grupą zwierząt natiwnych.
5. Nadekspresja BDNF po doszklistkowym podaniu wektora AAV2- BDNF u zwierząt z indukowaną jaskrą, powoduje znacznie mniejszą utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i pozwala na zahamowanie utraty komórek zwojowych znajdujących się na obwodzie siatkówki.
6. Nadekspresja BDNF po doszklistkowym podaniu wektora AAV2- BDNF u zwierząt z indukowaną jaskrą, obustronnie zwiększa poziomy BDNF powyżej normalnych wartości w obrębie siatkówki, ale nie w korze wzrokowej.
7. Nadekspresja BDNF po doszklistkowym podaniu wektora AAV2- BDNF normalizuje poziomy receptora TrkB w siatkówce, nie mając wpływu na poziom receptora TrkB w korze wzrokowej u szczurów z indukowaną jednostronnie jaskrą.
8. W warunkach umiarkowanej nadekspresji BDNF w siatkówce, nie dochodzi do obniżenia stężenia receptora TrkB.
9. Dysfunkcja w oku jaskrowym nie jest dysfunkcją izolowaną i wywołuje również zmiany w oku towarzyszącym, w którym nie indukowano jaskry. Jednostronna indukcja jaskry powoduje zmiany w ilości komórek zwojowych oraz stężeniach BDNF i TrkB w oku towarzyszącym, niepoddanym procedurom zabiegowym.
10. Pojedyncze, doszklistkowe podanie transgenu AAV-BDNF wydaje się być skuteczną metodą neuroprotekcji komórek zwojowych siatkówki.

Dalszy rozwój strategii związanych z terapiami genowymi oraz neurotrofinami może stanowić nową, skuteczną opcję leczenia uzupełniającego dla pacjentów z jaskrą. Mam nadzieję, że niniejsze badanie przyczyni się do lepszego zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych występujących u pacjentów z jaskrą. Poznanie i zrozumienie tych mechanizmów może okazać się kluczowe w prewencji nieodwracalnej utraty widzenia z powodu jaskry.