

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



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Słowa kluczowe

Jaskra, komórki zwojowe siatkówki, neuroprotekcja, BDNF, receptor TrkB, wektory AAV, terapia genowa

Glaucoma, retinal ganglion cells, neuroprotection, BDNF, TrkB receptor, AAV vectors, gene therapy

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2016/23/N/NZ7/ 02555 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z obowiązującą dyrektywą Rady Wspólnoty Europejskiej (European Community Council Directive - 2010/63/UE) po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej nr 1 w Warszawie (nr zgody 625/2018).

This work was supported by the National Science Center, Poland (PRELUDIUM Grant no 2016/23/N/NZ7/ 02555), and by the statutory grant for the Nencki Institute.

Experimental protocols involving animals were approved by the First Local Ethics Committee in Warsaw (no 625/2018), in compliance with the guidelines of the Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Wyniki niniejszego projektu badawczego zostały opublikowane w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences w 2020 roku:

Article: Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells with AAV2-BDNF Pretreatment Restoring Normal TrkB Receptor Protein Levels in Glaucoma

Authors: Anna Wójcik-Gryciuk, Olga Gajewska-Woźniak, Katarzyna Kordecka, Paweł M. Boguszewski, Wioletta Waleszczyk, Małgorzata Skup

Link: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6262>

Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Piotrowi Skopińskiemu
Promotorowi pracy,
za wsparcie merytoryczne, życzliwość i pomoc.

Składam serdeczne podziękowania przedwcześnie zmarłej

Pani Profesor Wioletcie Waleszczyk,

która była pomysłodawczynią projektu,

za ciągłą inspirację, kierownictwo i życzliwość.

Niech spoczywa w pokoju

Serdecznie dziękuję zespołowi Pracowni Neurobiologii
Widzenia oraz Pracowni Neurobiologii Naprawczej Instytutu
Biologii Doświadczalnej, PAN, w Warszawie,
a w szczególności Profesor Małgorzacie Skup za wspaniałą
współpracę w przyjaznej atmosferze, pomoc,
wsparcie w trudnych chwilach i uśmiech.

mojemu Mężowi Markowi
oraz Dzieciom: Idze i Michałowi
za nieustające wsparcie, wyrozumiałość i miłość

Spis treści

SPIS RYCIN	10
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	12
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	14
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	19
1. WSTĘP	23
1.1. EPIDEMIOLOGIA I RODZAJE JASKRY	26
1.2. CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU JASKRY	29
1.3. OBECNE METODY LECZENIA	33
1.3.1. FARMAKOLOGIA	33
1.3.2. CHIRURGIA JASKRY	36
1.3.3. LECZENIE LASEROWE	37
1.4. NEUROPROTEKCJA	38
1.4.1. CYTYKOLINA.....	40
1.4.2. NEUROTROFINY	41
1.4.3. TERAPIE GENOWE	43
1.5. WEKTORY WIRUSOWE STOSOWANE W TERAPIACH GENOWYCH	44
1.5.1. PODSTAWY BIOLOGII WEKTORÓW NA BAZIE WIRUSÓW ZWIĄZANYCH Z ADENOWIRUSAMI .	45
1.5.2. WEKTORY WIRUSOWE AAV W OKULISTYCE	46
1.5.3. BARIERY I OGRANICZENIA TERAPII GENOWYCH	48
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	51
3. MATERIAŁ I METODOLOGIA BADAŃ	53
3.1. PROTOKÓŁ BADANIA	55
3.2. PROCEDURY EKSPERYMENTALNE.....	59
3.2.1. WYWOŁANIE JASKRY	59
3.2.2. MONITOROWANIE CIŚNIENIA WEWNĄTRZGAŁKOWEGO	61
3.2.3. TRANSKARDIALNA PERFUZJA ZWIERZĄT	62
3.2.4. BARWIENIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE SIATKÓWEK	62
3.2.5. OBLICZANIE LICZBY KOMÓREK ZWOJOWYCH SIATKÓWKI	64
3.2.6. BADANIA PILOTAŻOWE ZASIĘGU TRANSFEKCJI WYBRANEGO WEKTORA AAV.....	65
3.2.7. DOSZKLISTKOWE PODANIE WEKTORÓW AAV Z BDNF	66

3.2.8. ANALIZA ILOŚCIOWA BIAŁKA BDNF I RECEPTORA TrkB W TKANCE SIATKÓWKI I WZROKOWEJ KORZE MÓZGOWEJ – TESTY ELISA.....	69
4. WYNIKI.....	76
5. DYSKUSJA.....	85
6. WNIOSKI	93
7. PIŚMIENICTWO	95
8. SPIS ZDJĘĆ.....	120
9. SPIS TABEL	121

SPIS RYCIN

RYCINA 1. Najważniejsze czynniki biorące udział w patogenezie rozwoju jaskry wywołanej wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym oraz skutki strukturalne i funkcjonalne. Rycina pochodzi z pracy przeglądowej Wójcik-Gryciuk A et al., 2016.

RYCINA 2. Schemat podania iniekcji doszkliskowej (intravitreal) i podsiatkówkowej (subretinal) (A). Warstwy siatkówki: nabłonek barwnikowy (*ang. retinal pigment epithelium-RPE*), fotoreceptory (*ang. photoreceptors*), warstwa jądrzasta wewnętrzna (*ang. inner nuclear layer*), komórki zwojowe siatkówki (*ang. retinal ganglion cells*) oraz powierzchnia ciała szklistego (*ang. vitreous side*) (B).

Rycina pochodzi z pracy Trapani I i wsp. Gene Therapy of Inherited Retinal Degenerations: Prospects and Challenges. HUMAN GENE THERAPY 26:193–200 (April 2015)

RYCINA 3. Schematyczny protokół badania

RYCINA 4. Budowa konstruktu wektora pAAV2 [Exp] CMV> hBDNF [NM_001143810.1]:WPRE

RYCINA 5. ELISA- test podwójnego wiązania „kanapkowy”. Rycina pochodzi ze strony e-biotechnologia.pl

RYCINA 6. Zestaw ChemiKine™ BDNF Sandwich ELISA

RYCINA 7. Wykres przedstawia wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego (IOP) w czasie. Pomiary IOP przeprowadzono od 1-go do 42-dnia po jednoocznej indukcji jaskry. W oku prawym dochodziło do istotnego wzrostu IOP natychmiast po podaniu mikrogranulek do komory przedniej oka. IOP w oku lewym pozostało niezmienione, utrzymując wartości IOP w zakresie podobnym do wartości sprzed indukcji jaskry. Zaprezentowane dane zostały uśrednione $\pm$ SD z 8 szczurów (I grupa doświadczalna z jaskrą) i 7 szczurów (II grupa doświadczalna AAV2-BDNF + jaskra) * $p < 0.01$, t-test dla zmiennych zależnych

Rycina pochodzi z pracy Wójcik-Gryciuk A et al., 2020.

RYCINA 8. Wpływ jaskry i nadekspresji BDNF na liczbę komórek zwojowych w centralnej i obwodowej części siatkówek po 6 tygodniach od indukcji jaskry. Słupki w jasnych barwach oznaczają lewe oko kontrolne; słupki w ciemnych barwach odnoszą się do prawego oka z jaskrą. Słupki białe oznaczają zwierzęta natywne. Zaprezentowane dane zostały uśrednione $\pm$ SD z 8

szczurów (I grupa doświadczalna z jaskrą) i 7 szczurów (II grupa doświadczalna AAV2-BDNF + jaskra) Dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka; *** $p < 0.001$, ** $p = 0.01$, * $p = 0.05$.

Rycina pochodzi z pracy Wójcik-Gryciuk A et al., 2020.

RYCINA 9. Poziomy stężenie białek BDNF (A) i TrkB (B) w siatkówce i korze wzrokowej szczurów: natywna kontrola (Naïve), z jednostronną jaskrą (Glaucoma) oraz po doszkliskowej iniekcji AAV2-BDNF 3 tygodnie przed indukcją jaskry (AAV2-BDNF + Glaucoma). Słupki w jasnych barwach oznaczają lewe oko kontrolne; słupki w ciemnych barwach odnoszą się do prawego oka z jaskrą. Słupki białe oznaczają zwierzęta natywne.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, # $p = 0.056$.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AAV - zmodyfikowane wirusy związane z adenowirusami (*ang. adeno-associated virus*)

ALT - trabekuloplastyka laserem argonowym (*ang. argon laser trabeculoplasty*)

AMD - wysiękowe zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (*ang. neovascular age-related macular degeneration*)

BDNF - czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (*ang. brain-derived neurotrophic factor*)

CNTF - rzęskowy czynnik wzrostu (*ang. ciliary neurotrophic factor*)

CSF - płyn mózgowo- rdzeniowy (*ang. cerebrospinal fluid*)

ECM - macierz pozakomórkowa (*ang. extracellular matrix*)

ECP - endocyklofotokoagulacja (*ang. endocyclophotocoagulation*)

FGF-2 - czynnik wzrostu fibroblastów (*ang. fibroblast growth factor*)

GCC - kompleks komórek zwojowych (*ang. ganglion-cell-complex*)

GDNF - czynnik neurotroficzny z linii komórek glejowych (*ang. glial cell line-derived neurotrophic factor*)

IOP – ciśnienie wewnątrzgałkowe (*ang. intraocular pressure*)

LCA2 - wrodzona ślepota Lebera 2 (*ang. Leber's congenital amaurosis 2*)

LGN - jądro kolankowate boczne (*ang. lateral geniculate nucleus*)

LHON - dziedziczna neuropatia wzrokowa Lebera (*ang. Leber hereditary optic neuropathy*)

MIGS - techniki chirurgii mikroinwazyjnej w jaskrze (*ang. microinvasive glaucoma surgery*)

MLT - mikropulsowa trabekuloplastyka (*ang. micropulse laser trabeculoplasty*)

NGF - czynnik wzrostu nerwów (*ang. nerve growth factor*)

NTG - jaskra normalnego ciśnienia (*ang. normal tension glaucoma*)

NT-3 - neurotrofina 3 (*ang. neurotrophin-3*)

OCT - optyczna koherentna tomografia siatkówki (*ang. optical coherence tomography*)

OHT - nadciśnienie oczne (*ang. ocular hypertension*)

ON - nerw wzrokowy (*ang. optic nerve*)

ONI - uszkodzenie nerwu wzrokowego (*ang. optic nerve injury*)

POAG – jaskra pierwotna otwartego kąta (*ang. primary open angle glaucoma*)

PACG - jaskra zamykającego się kąta (*ang. primary angle-closure glaucoma*)

Ret - siatkówka (*ang. retina*)

RGC – komórka zwojowa siatkówki (*ang. retinal ganglion cell*)

RP - zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (*ang. retinitis pigmentosa*)

SLT - selektywna laserowa trabekuloplastyka (*ang. selective laser trabeculoplasty*)

SC - wzgórek górny blaszki czworaczej (*ang. superior colliculus*)

TLPD - translaminarna różnica ciśnień (*ang. trans-lamina cribrosa pressure difference*)

TrkB – receptor kinazy tropomiozyny B (*ang. tropomyosin-related kinase receptor-B*)

Vctx - kora wzrokowa (*ang. visual cortex*)

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 toższonej i przeciwstonnej 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 neuroprotektynowego 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 siatkówki 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 natywnych. 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 doszkliskowa wektora AAV2-BDNF skutkowała znaczącym, obustronnym wzrostem poziomów stężeń BDNF w siatkówkach. Stężenia te były ponad dwukrotnie wyższe niż u zwierząt natywnych 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 natywnych. 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 natywnych.
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.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Neuroprotection of retinal ganglion cells in experimental glaucoma and regulation of BDNF and TrkB receptor on the level of retina and primary visual cortex after AAV2-BDNF transfection

Glaucoma is a chronic optic neuropathy characterized by progressive, painless damage to the optic nerve and death of retinal ganglion cells (RGCs). RGCs transmit the information processed by the retina to higher visual centers, loss of RGCs inevitably leads to impairment of visual function and ultimately visual field loss. It is one of the leading causes of irreversible loss of vision worldwide.

The most important trigger of the glaucomatous damage is an elevated eye pressure and current standard approach in glaucoma therapy is reduction of the intraocular pressure. Untreated glaucoma ultimately leads to irreversible loss of vision. However, despite of effective medications or surgical treatment leading to lowering of the intraocular pressure, progression of glaucomatous changes and loss of vision among glaucoma patients is common. Therefore it is critical to prevent vision loss through appropriate, additional treatment. To implement such treatment(s), elucidation of pathophysiological changes in glaucoma and development of therapeutic methods which take into account neuroprotection is an imperative.

Neurotrophins are a family of growth factors crucial for the regulation of neuronal maintenance, differentiation and survival of specific neuronal populations in the adult brain. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is an important survival factor for RGC, both during development and in adult life. The neurotrophin family consists of four major types of proteins with similar function: nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). BDNF has emerged as a major regulator for several types of neurons, including sensory neurons, retinal ganglion cells, spinal motor neurons, certain cholinergic neurons, and some dopaminergic neurons. Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor has been implicated in enhanced vulnerability to neurodegenerative diseases. The deficiency of BDNF, though not necessarily the initial trigger for the disease process, may result in accelerated cell damage and other associated symptoms. Intraocular

injections of viral vectors carrying BDNF gene construct (AAV-BDNF) are an attractive alternative to cause a long-term increase of BDNF concentration in the retina and support survival of RGCs. This approach has been also shown to be superior to BDNF treatment at the level of neurotrophin-releasing superior colliculus, targeted by the RGC.

To secure therapeutic action, the effective intraocular concentration of BDNF needs that the expression of BDNF high-affinity TrkB receptor in retinal cells is maintained. Increased IOP was reported to change BDNF and TrkB availability owing to impairment of retrograde transport in the optic nerve. Also, in several in vitro and in vivo systems high BDNF concentration was shown to down-regulate its TrkB receptors, possibly affecting BDNF signaling. However, whether intraocular BDNF overexpression leads to TrkB downregulation, impairing BDNF signaling in retina, is far from clear. Numerous studies show that after optic nerve injury and ocular hypertension, when increased BDNF mRNA and protein in retina are detected, concomitant increase, no change or a decrease of TrkB occurs, both early and long-term post-injury.

AIM OF THE STUDY

Answering the question on dependence of TrkB expression on BDNF changes in glaucoma pathology and after treatment is crucial for designing efficient clinical trials. Therefore, this study was undertaken to validate the neuroprotective efficacy of classical AAV2-BDNF transgene, measuring the concentrations of BDNF and TrkB proteins in the retina of AAV2- BDNF treated and untreated rats and comparing them to naive controls. To investigate the impact of pathology and treatment on higher visual centers we examined both proteins also in the visual cortex.

MATERIAL AND METHODS

All experiments were carried out on Wistar rats. Animals were divided into groups: Naive Control (CN, n = 9), Glaucoma (unilaterally induced glaucoma, n = 14), and Glaucoma + AAV2-BDNF (unilaterally induced glaucoma preceded by BDNF overexpression from AAV2-BDNF transgene, n = 13).

A microbead pretrabecular occlusion model of glaucoma was chosen, with rapid elevation of IOP, which serves as the equivalent of a severe glaucoma attack. Contralateral fellow eyes served as untreated controls, a common approach used to eliminate the factor of individual

variability. A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure (IOP) has been reproduced successfully.

RESULTS

After 6 weeks, the rats with glaucoma induction showed a 31% loss of RGC in central retina of glaucomatous eye, as compared to the contralateral, fellow eye. In rats which received BDNF transgene the loss of RGC in the Right Ret was markedly reduced (to approx. 15%) as compared to rats with no BDNF gene transfer. An importance of BDNF overexpression for protection of RGC from degeneration in the central part of the glaucomatous Ret has been confirmed by the significant interaction of glaucoma x BDNF overexpression.

In that study, unilateral glaucoma leads to bilateral decrease of BDNF concentration accompanied by up to 4-fold TrkB upregulation in glaucomatous eye and 2-fold TrkB unregulation in fellow eye. Increased TrkB did not compensate reduced BDNF signals sufficiently to promote signaling towards protection of retina from significant cell loss after six weeks of pathology. Long-term, moderate BDNF overexpression in glaucomatous eye normalizes TrkB levels, driving signaling towards long-term RGC neuroprotection both in the central and peripheral regions of the retina. Neither glaucoma nor BDNF treatment affected BDNF and TrkB levels in the visual cortex. Presented results suggest that in severe glaucoma attack single administration of AAV2-BDNF may be sufficient for significant RGC neuroprotection and for glaucoma therapy careful selection of appropriate BDNF concentration is the main factor securing long-term responsiveness of RGC and maintenance of TrkB normal levels.

CONCLUSIONS

1. Microbead pretrabecular occlusion model of glaucoma causes an immediate and a few-weeks lasting increase of IOP.
2. Elevated IOP in microbead pretrabecular occlusion model of glaucoma leads to significant RGC loss in central and peripheral retina.
3. Unilateral glaucoma leads to bilateral decrease of BDNF concentration in both retinas.
4. Unilateral glaucoma leads to 4-fold TrkB upregulation in glaucomatous eye and 2-fold TrkB upregulation in fellow eye.

5. Retinal BDNF overexpression alleviates retinal ganglion cell loss in center and periphery of retina.
6. Retinal BDNF overexpression raises BDNF beyond normal concentration.
7. Retinal BDNF overexpression normalizes upregulated TrkB in the retina not affecting BDNF and TrkB in the visual cortex in rats with induced glaucoma.
8. In conditions of moderate BDNF overexpression in the retina TrkB does not undergo downregulation but follows BDNF levels, what may be of significant functional importance.
9. Dysfunction of glaucomatous eye is not isolated and draws the line of changes in the contralateral eye in which no glaucoma was induced.
10. Single administration of AAV2-BDNF seems to be sufficient for significant RGC neuroprotection.

We hope that our studies will help to understand pathological mechanisms present in glaucoma patients within the higher level of visual system. Understanding of these mechanisms is crucial for prevention of irreversible loss of vision in glaucoma patients.

1. WSTĘP

Jaskra to przewlekła neuropatia nerwu wzrokowego charakteryzująca się postępującym, bezbolesnym uszkodzeniem nerwu wzrokowego i śmiercią komórek zwojowych siatkówki (*ang. retinal ganglion cells- RGCs*) oraz ich aksonów tworzących nerw wzrokowy (Gupta N et al., 2007; Quigley H et al., 2011). Komórki zwojowe siatkówki przekazują informacje z siatkówki do wyższych pięter układu wzrokowego, a zatem ich utrata nieuchronnie prowadzi do zaburzeń funkcji widzenia, a ostatecznie do utraty widzenia. Jaskra jest jedną z głównych przyczyn nieodwracalnej utraty wzroku na świecie.

Uważa się, że najważniejszym czynnikiem wywołującym uszkodzenia jaskrowe jest podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, dlatego obowiązującym obecnie standardem klinicznym jest jego redukcja (Nickells RW, 2007; Gugleta K et al., 2013). Nieleczona jaskra nieuchronnie prowadzi do nieodwracalnej ślepoty. Pomimo dostępnych leków oraz technik chirurgicznych skutecznie obniżających ciśnienie wewnątrzgałkowe, u niektórych pacjentów jaskrowe zmiany w polu widzenia często postępują nadal (Lestak J et al., 2014). Dlatego tak istotne jest zastosowanie odpowiedniego, dodatkowego leczenia, które zahamuje postęp uszkodzeń jaskrowych poprzez wykorzystanie metabolicznych mechanizmów neuroprotekcyjnych, powstrzymujących utratę komórek zwojowych. Aby taka terapia mogła się pojawić, konieczne jest pełne zrozumienie i wyjaśnienie występujących w przebiegu jaskry zmian patofizjologicznych na poziomie komórkowym i sygnałów metabolicznych, jakie docierają do komórek zwojowych uruchamiając procesy ich programowej śmierci (Vasudevan SK et al., 2011).

Neuropatia nerwu wzrokowego jest konsekwencją triady patologicznych składowych: (1) degeneracji nerwu wzrokowego będącego wynikiem postępującej utraty komórek zwojowych siatkówki, (2) aktywacji i reorganizacji komórek gleju, oraz (3) zaburzeń w krążeniu krwi w obrębie tarczy nerwu wzrokowego. A zatem jaskrę należy rozumieć nie tylko jako neuropatię nerwu wzrokowego, ale również jako gliopatię i waskulopatię (Coorey NJ et al., 2010). Morfologicznymi konsekwencjami uszkodzeń jaskrowych jest wygląd tarczy nerwu wzrokowego w badaniu klinicznym, tj. zwiększenie zagłębienia w tarczy z jednoczasowym ścięciem warstwy włókien nerwowych, jak również utrata komórek gleju i naczyń krwionośnych. Dotychczas nie rozstrzygnięto w jakim stopniu zmiany te są wynikiem zmienionego mechanizmu regulacji ciśnienia, zaburzonego transportu neuronalnego i przekazywania sygnału przez komórki siatkówki, oraz jakie znaczenie dla postępu choroby ma

zmiana aktywności enzymów proteolitycznych wpływających na strukturę macierzy pozakomórkowej (*ang. extracellular matrix- ECM*). Zmiany jaskrowe nie ograniczają się jedynie do gałki ocznej (Gupta N et al., 2007). Uszkodzenia jaskrowe sięgają poza komórki zwojowe siatkówki i obejmują całą drogę wzrokową: nerw wzrokowy, wzrokowe ośrodki podkorowe tj jądro kolankowate boczne (*ang. lateral geniculate nucleus - LGN*) oraz wzgórek górny blaszki czworaczej (*ang. superior colliculus -SC*); oraz korę wzrokową (*ang. visual cortex*) (Yucel YH et al., 2000).

W wielu badaniach udowodniono, że w przebiegu jaskry dochodzi do atrofii i utraty komórek zwojowych siatkówki. Procesy neurodegeneracyjne w jaskrze sięgają poza gałkę oczną. Aksony 90% komórek zwojowych siatkówki tworzą nerw wzrokowy, którego zakończenia znajdują się w ciele kolankowatym bocznym (*ang. lateral geniculate nucleus - LGN*) - pierwszym, dużym ośrodku drogi wzrokowej w mózgu. Badania neuropatologiczne pokazały, że podobnie jak w siatkówce, do obkurczania się i utraty neuronów dochodzi w obrębie wszystkich sześciu warstw LGN (Weber AJ et al., 2000, Yucel YH. et al., 2000). Przenoszenie dysfunkcji z uszkodzonych neuronów na zdrowe za pośrednictwem połączeń synaptycznych nosi nazwę transsynaptycznej lub transneuronalnej degeneracji (Yucel YH et al., 2003). Proces rozprzestrzeniania się zmian patologicznych pomiędzy komunikującymi się neuronami dobrze poznano i opisano w chorobie Alzheimera (Su JH et al., 1997). W badaniach na zwierzętach zaobserwowano występowanie transsynaptycznej degeneracji neuronów w postaci zmniejszania ich rozmiarów oraz zubożenia drzewa dendrytycznego w obrębie LGN i kory wzrokowej po jednoocznej enukleacji (Haseltine EC et al., 1979). Podobne procesy obserwuje się w modelach jaskry eksperymentalnej (Gupta N et al., 2001). Uszkodzenie komórki zwojowej siatkówki wywiera więc głęboki wpływ na odległe, zależne neurony w obrębie struktur mózgowych drogi wzrokowej.

Istnieją badania dowodzące, że zaburzenia w obrębie drogi wzrokowej do jakich dochodzi w przebiegu jaskry są relatywnie wczesnym, szybko występującym procesem. Zauważono, że w przebiegu jaskry u naczelnych, podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe jeszcze bez istotnych, wykrywalnych uszkodzeń w obrębie nerwu wzrokowego indukuje obkurczanie się neuronów w obrębie LGN. W efekcie dochodzi do zmian w aktywności metabolicznej odpowiednich warstw kory wzrokowej. Nie wyjaśniono, czy zmiany w aktywności metabolicznej kory wzrokowej u zwierząt z wywołaną jaskrą są wynikiem utraty, obkurczania się czy też osłabienia aktywności neuronów (Yucel YH et al., 2003).

Metaanaliza ponad 1900 badań wykonanych z użyciem nieinwazyjnych technik neuroobrazowania u ponad 2300 osób chorujących na jaskrę pokazała, że u tych chorych dochodzi do zmian neurodegeneracyjnych w obrębie całego układu wzrokowego (Nuzzi R et al., 2018). Zmiany te przede wszystkim polegały na zmniejszeniu grubości i objętości kory mózgowej. A zatem jaskrę należy rozpatrywać jako chorobę nie tylko oka, ale całej drogi wzrokowej biegnącej od nerwu wzrokowego, poprzez ciało kolankowate boczne i kończącej się w korze wzrokowej.

W obecnej chwili nie ma skutecznej, potwierdzonej badaniami klinicznymi metody neuroprotekcji na poziomie metabolizmu komórkowego, która sprawdziłaby się w wieloletnim leczeniu, choć prowadzi się w tym zakresie szereg badań klinicznych. Wiele nadziei wiąże się z wytwarzaną endogennie molekułą, tj. czynnikiem neurotroficznym pochodzenia mózgowego BDNF (*ang. brain-derived neurotrophic factor*), który w badaniach na zwierzętach zwiększał przeżywalność komórek zwojowych siatkówki w stanach podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego (Martin K et al., 2003; Fu QL et al., 2009). Stworzenie bezpiecznej, nieinwazyjnej i skutecznej metody długotrwałego podwyższania wewnątrzgałkowego poziomu BDNF może okazać się przełomową terapią u pacjentów chorujących na jaskrę.

Postuluje się istnienie wielu mechanizmów patogenetycznych w jaskrze. Żaden z tych mechanizmów nie charakteryzuje jednak w pełni jaskry i nie jest uniwersalny. Brak pełnej wiedzy na temat patogenezы jaskry stanowi fundamentalne wyzwanie w tworzeniu terapii neuroprotekcyjnej. A zatem przeprowadzenie badań, które poszerzyłyby wiedzę w tym zakresie oraz stworzenie nowych metod leczenia, wspomagających obecnie stosowane terapie to pilna potrzeba.

1.1. EPIDEMIOLOGIA I RODZAJE JASKRY

Jaskra to przewlekła neuropatia nerwu wzrokowego. Nieleczona jaskra nieuchronnie prowadzi do nieodwracalnej utraty widzenia. Wiek jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju jaskry, a zatem w związku z gwałtownym starzeniem się populacji ludzkiej, częstość zachorowań na jaskrę stale rośnie. Wyniki badań populacyjnych wskazują, że prawie 17% ludzi powyżej 85 roku życia i jedna na 40 osób powyżej 40 roku życia choruje na jaskrę. To daje liczbę 60 milionów ludzi chorych na jaskrę na całym świecie i 8,4 miliona ludzi, którzy z powodu tej choroby są obuocznie ślepi (praca przeglądowa Quigley HA et al., 2011). Szacuje się, że w 2040 r populacja chorych na jaskrę zwiększy się o ok. 75% do ponad 110 milionów ludzi (Barkana Y et al., 2015). Utrata widzenia, niezależnie od jej przyczyny w poważny sposób zaburza życie człowieka i wpływa niekorzystnie na jego niezależne funkcjonowanie. Choroby prowadzące do ślepoty stanowią istotne, odczuwalne obciążenie społeczne.

Szacuje się, że w USA, liczba osób cierpiących z powodu jaskry wynosi 2,47 miliona (Quigley HA et al., 1997), 2,7 miliona (wg National Eye Institute, 2015) lub nawet 4 miliona (źródło: Prevent Blindness America, The Eye Diseases Prevalence Research Group). Blisko 130,000 Amerykanów cierpi z powodu ślepoty w przebiegu jaskry (Quigley HA et al., 1997) co stanowi 12% wszystkich przyczyn ślepoty w USA (źródło: National Eye Health Program/National Institutes of Health). Według Światowej Organizacji Zdrowia, jaskra jest drugą po zaćmie, wiodącą przyczyną ślepoty na świecie.

Wśród czynników epidemiologicznych ryzyka rozwoju jaskry, poza wiekiem, należy również wymienić rasę, a nawet przynależność etniczną oraz płeć. Okazuje się, że wszystkie te czynniki korelują z populacyjną zmiennością fizjologii gałki ocznej (czasem na podłożu budowy anatomicznej) lub zakresu ciśnienia wewnątrzgałkowego. Jednocześnie, również stany chorobowe (hipercholesterolemia, cukrzyca, otyłość), czy palenie papierosów, prowadząc do patologii naczyniowych, predestynują do rozwoju jaskry.

Obowiązująca klasyfikacja jaskry opiera się na mechanizmach prowadzących do uszkodzenia nerwu wzrokowego. Jaskrę można podzielić na pierwotną i wtórną oraz otwartego i zamkniętego kąta.

Jaskra pierwotna otwartego kąta (*ang. primary open angle glaucoma – POAG*) to najczęstszy rodzaj jaskry. Ta wieloczynnikowa choroba charakteryzuje się przewlekłym, powoli postępującym przebiegiem, spowodowanym zmniejszonym przepływem cieczy

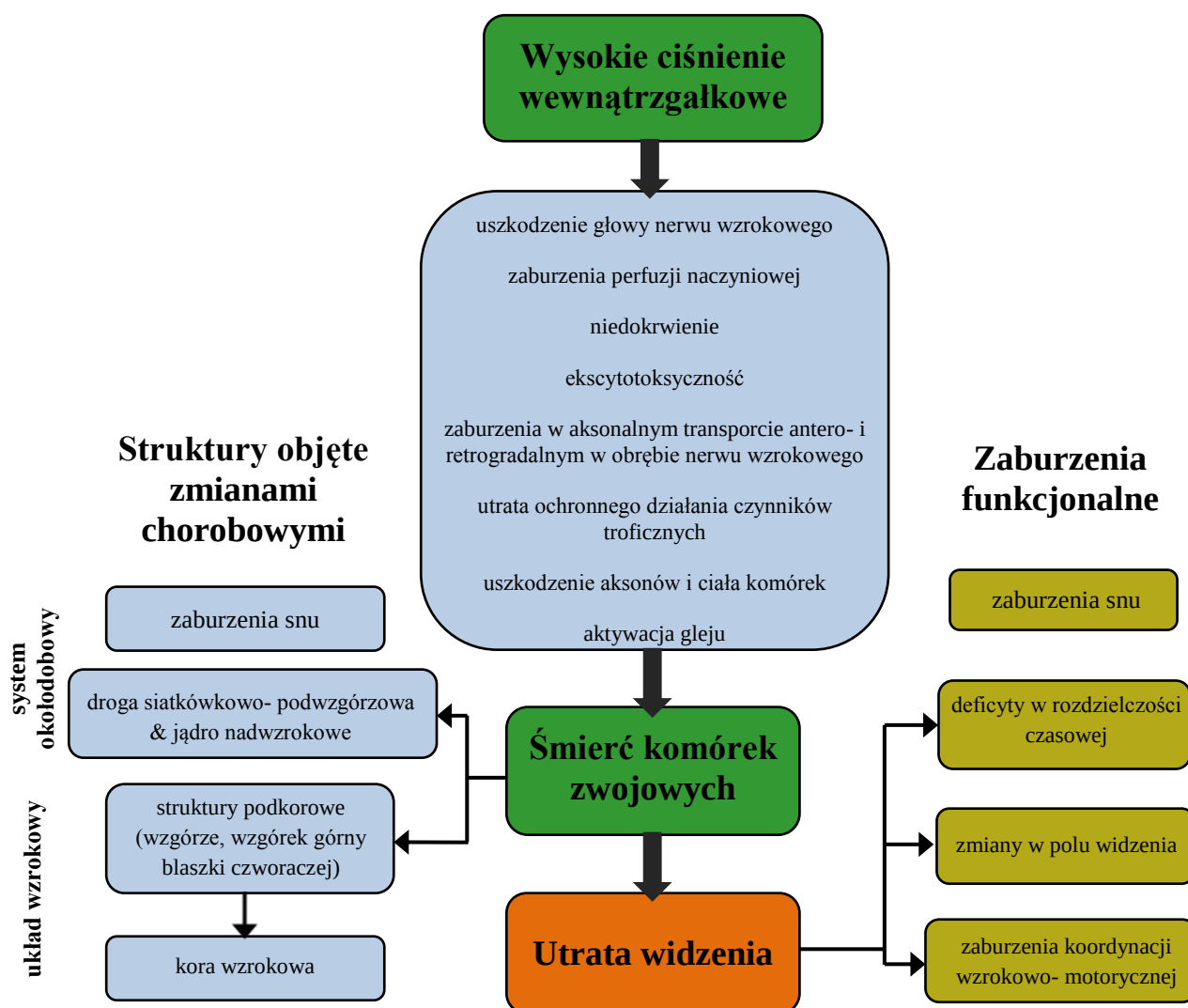
wodnistej i związanym z nim uszkodzeniem nerwu wzrokowego. Ryzyko rozwoju jaskry pierwotnej otwartego kąta rośnie z wiekiem, w krótkowzroczności, u osób z obniżonym rozkurczowym ocznym ciśnieniem perfuzyjnym, u osób z cienką rogówką, jest częsta u Afro-Amerykanów. Jaskra pierwotna otwartego kąta, w przeciwieństwie do większości innych typów jaskry, może przebiegać z normalnym lub podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym. Najważniejsze czynniki ryzyka jej rozwoju to: wiek, rasa i etniczność. Ryzyko rozwoju POAG wzrasta 5-krotnie w 5ej i 10-krotnie w 8ej dekadzie życia. Około 2% populacji świata w wieku 40-50 lat i 8% powyżej 70 roku życia ma podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe stanowiące jeden z głównych czynników ryzyka rozwoju zmian jaskrowych. Uważa się, że jaskra jest główną przyczyną ślepoty w niektórych populacjach. Dane i wyniki meta-analiz 14 badań azjatyckich, 10 badań z udziałem osób rasy czarnej i 24 badań z udziałem osób rasy białej pokazały, że częstość występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta jest wyższa wśród populacji rasy czarnej (4,23% vs. 2,09% w populacji rasy białej i 1,41% w populacji azjatyckiej); (Rudnicka AR et al., 2006). Częstość występowania POAG w populacji rasy czarnej w wieku powyżej 40 roku życia jest nawet czterokrotnie wyższa, występuje we wcześniejszym wieku, ma gorsze rokowanie i bardziej gwałtowny przebieg niż POAG u ludzi rasy kaukaskiej (Quigley HA et al., 1997). Amerykanie pochodzenia afrykańskiego częściej tracą wzrok z powodu jaskry (26%) niż w populacji kaukaskiej w tym samym wieku (6,4%); (Stein JD et al., 2008). Częstość występowania POAG wśród Amerykanów pochodzenia latynoskiego w wieku 40 i więcej lat, również jest bardzo wysoka (4,7%) i uważa się, że jest to główna przyczyna ślepoty w tej grupie wiekowej, odpowiada ona za 28,6% wszystkich przyczyn ślepoty (Stein JD et al., 2008). Zależność pomiędzy częstością występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta a płcią jest nadal kontrowersyjna. W badaniach the Baltimore Eye Survey (Tielsch JM et al., 1991), Beaver Dam Eye Study (Klein B et al., 1992) oraz Blue Mountains Eye Study (Mitchell P et al., 1996), nie znaleziono istotnych statystycznie różnic pomiędzy płcią męską i żeńską w przypadku jaskry pierwotnej otwartego kąta. Jednakże w badaniach Framingham Eye Study (Kahn HA et al., 1977), Barbados Eye Study (Leske MC, et al., 1994) oraz Rotterdam Study (Wolfs RC et al., 2000), wykazano dwukrotnie większą częstotliwość zachorowań na jaskrę wśród mężczyzn. Dane pochodzące z badania Rotterdam Study zostały niedawno ponownie poddane analizie. Wykazano, że kobiety, które przeszły menopauzę przed 45 rokiem życia są bardziej narażone na rozwój jaskry niż kobiety przechodzące menopauzę w późniejszym wieku (Hulsman CA et al., 2001). Wyniki te sugerują, że żeńskie hormony płciowe pełnią prawdopodobnie rolę ochronną w kontekście rozwoju jaskry.

Jaskra normalnego ciśnienia (*ang. normal tension glaucoma* - NTG) zwana również jaskrą niskiego ciśnienia, jest uważana za rodzaj jaskry otwartego kąta, choć zagadnienie to do tej pory nie zostało wyjaśnione i nadal pozostaje kontrowersyjne (Lestak J et al., 2013). Szacuje się, że jaskra normalnego ciśnienia stanowi aż 30-40% przypadków jaskry otwartego kąta (Grabska-Liberek I, 2015; Klein B et al., 1992). Większą zachorowalność obserwuje się w populacji Japończyków i Koreańczyków niż w populacjach rasy kaukaskiej (Suzuki Y et al., 2006). A zatem rasa stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju NTG. Do innych ważnych czynników należą: wiek i choroby sercowo- naczyniowe (Orgül S et al., 1995; Emre M et al., 2004). Pacjenci z NTG podobnie jak pacjenci z POAG mają szeroki, otwarty kąt przesączania w gonioskopii, poszerzone zagłębienie w tarczy nerwu wzrokowego, często również krwotoczki na tarczy i charakterystyczne zmiany w polu widzenia (Konieczka K et al., 2014). Jednakże jaskra normalnego ciśnienia ma kilka cech wyróżniających. Pacjenci z jaskrą normalnego ciśnienia są bardziej narażeni na uszkodzenia w obrębie nerwu wzrokowego przy relatywnie niskich wartościach ciśnienia wewnątrzgałkowego. Zmiany w polu widzenia są głębsze, bardziej strome i umiejscowione bliżej punktu fiksacji niż w przypadku pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta. Dodatkowo, mroczki w polu widzenia u pacjentów z NTG są zwykle większe niż można się tego spodziewać po samym tylko wyglądzie tarczy nerwu wzrokowego.

Chociaż jaskra zamykającego się kąta (*ang. primary angle-closure glaucoma* - PACG) występuje rzadziej niż jaskra pierwotna otwartego kąta, częściej powoduje utratę widzenia wśród pacjentów chorych na jaskrę (Foster PJ et al., 2000). PACG występuje u około 0,5% populacji rasy białej i czarnej w wieku powyżej 40 roku życia (Buhrmann RR et al., 2000; Day AC et al., 2012; Mitchell P et al., 1996; Rotchfor AP et al., 2003; Tielsch JM et al., 1991) i w 0,5-1,5% populacji chińskiej i hinduskiej w tym samym wieku (He M et al., 2006; Liang Y et al., 2011; Dandona R et al., 2000). Spośród wszystkich pacjentów chorujących na jaskrę w Chinach, aż 35% cierpi z powodu jaskry zamykającego się kąta (Foster PJ et al., 2001). Podobne wyniki przedstawiono dla populacji hinduskiej, gdzie ponad 40% pacjentów z PACG jest z powodu tej choroby ślepa na jedno oko lub obuocznie (Dandona R et al., 2000). Częstość występowania jaskry zamykającego się kąta jest wyższa wśród kobiet niż mężczyzn. Dzieje się tak z przyczyn anatomicznych predyspozycji.

1.2. CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU JASKRY

Spośród wielu czynników ryzyka rozwoju jaskry, głównym i na razie jedynym modyfikowalnym czynnikiem pozostaje ciśnienie wewnątrzgałkowe (IOP). Poniższy diagram prezentuje najważniejsze czynniki biorące udział w patogenezie rozwoju jaskry wywołanej wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym oraz skutki strukturalne i funkcjonalne (RYCINA 1).



RYCINA 1. Najważniejsze czynniki biorące udział w patogenezie rozwoju jaskry wywołanej wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym oraz skutki strukturalne i funkcjonalne. Rycina pochodzi z pracy przeglądowej Wójcik-Gryciuk A et al., 2016.

Redukcja ciśnienia wewnątrzgałkowego (farmakologiczna lub chirurgiczna) zwykle hamuje postęp zmian jaskrowych. Dlatego ciśnienie wewnątrzgałkowe jest pierwszym czynnikiem podlegającym modyfikacji na początku długoczasowej terapii.

Przyjmuje się, że prawidłowe wartości IOP wahają się w zakresie 11- 21 mmHg, a ryzyko rozwoju neuropatii jaskrowej rośnie przy wartościach ciśnienia wewnątrzgałkowego powyżej 21 mmHg. Uważa się mechanizm szkodliwego wpływu podwyższonego IOP jest co najmniej trojaki. Po pierwsze, wysokie IOP powoduje mechaniczne uszkodzenie prowadzące do śmierci komórek zwojowych i ich aksonów, co z kolei staje się przyczyną astrocytozy związanej z nadmierną produkcją tlenku azotu (NO), poprzez aktywację syntazy tlenku azotu- (*ang. nitric oxide synthase –NOS*) (Neufeld AH et al., 2003). W konsekwencji, reaktywne formy tlenu wchodzi w reakcję z tlenkiem azotu, produkując nadtlenoazotyn, uszkadzający szereg molekuł komórkowych, w tym DNA i białka, prowadząc tym samym do śmierci komórki. Po drugie, podwyższone ciśnienie na poziomie blaszki sitowej twardówki prowadzi do uszkodzenia aksonalnego transportu wstecznego neurotrofin z mózgu do komórek zwojowych siatkówki. Zaburzenie tego transportu może prowadzić do utraty czynników zapewniających homeostazę w obrębie komórek siatkówki. Zaburzenia w transporcie neurotrofin zostało opisane w modelu jaskry eksperymentalnej u szczurów i potwierdzone w samoistnej jaskrze u psów (Iwabe S et al., 2007). Po trzecie, podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe ma negatywny wpływ na krążenie w małych naczyniach tarczy nerwu wzrokowego (He Z et al., 2011).

Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe pozostaje głównym, choć nie jedynym czynnikiem ryzyka rozwoju zmian jaskrowych. U pacjentów, u których rozwija się jaskra typu NTG, pomimo utrzymywania się prawidłowych parametrów IOP, zmiany jaskrowe w obrębie nerwu wzrokowego i stopniowa utrata pola widzenia nadal postępują. Przyczyna uszkodzenia nerwu wzrokowego u pacjentów z jaskrą normalnego ciśnienia nadal pozostaje nieznana, a zakresy ciśnień wewnątrzgałkowych u takich pacjentów zawsze są prawidłowe. Charakterystyczne dla pacjentów z rozwijającą się NTG są inne objawy na poziomie systemowym. Mianowicie, chodzi o dysfunkcje krążeniowo-naczyniowe. Wydaje się, że mogą one stanowić główną przyczynę rozwoju jaskry NTG. Można również przypuszczać, że w progresji tego typu jaskry biorą udział czynniki związane z niedokrwieniem nerwu wzrokowego. Wśród wspomnianych dysfunkcji krążeniowo-naczyniowych, u pacjentów z NTG występują epizody kurczu naczyń, hipoperfuzja, nocne spadki ciśnienia tętniczego, zwiększona lepkość krwi i nadmierna krzepliwość krwi, migreny. Dysregulacja naczyniowa jest cechą charakteryzującą pacjentów z jaskrą normalnego ciśnienia, którzy często skarżą się zimne ręce i

stopy, niskie ciśnienie tętnicze krwi oraz przedłużony czas normalizacji krążenia po prowokacji zimnem. Prawdopodobnym czynnikiem sprawczym jest endotelina-1, silnie obkurczająca naczynia krwionośne, a której udział w patogenezie jaskry normalnego ciśnienia opisano w wielu pracach (Grieshaber MC et al., 2007; Mi XS et al., 2012, 2014). Dodatkowo, chorzy z dysregulacją naczyniową podają w wywiadzie: zaburzenia rytmu dobowego, trudności z zasypianiem, zmniejszone uczucie pragnienia, niższy próg bólowy (Konieczka K et al., 2014).

W ostatnim czasie badacze skupili się również na ocenie zależności pomiędzy rozwojem jaskry, a zaburzeniami kognitywnymi, ze szczególnym uwzględnieniem choroby Alzheimera i choroby Parkinsona (Lin IC et al., 2014; Maurano STP et al., 2018). W jednym z badań opisano wysoki odsetek zmian strukturalnych w korze białej mózgu japońskich pacjentów z NTG, co może świadczyć o tym, że jaskra normalnego ciśnienia należy do szerokiego spektrum chorób o charakterze neurodegeneracyjnym (Boucard CC et al., 2016). Co więcej, zarówno u pacjentów z jaskrą normalnego ciśnienia jak i osób z chorobą Alzheimera zaobserwowano obecność podobnych zmian w siatkówkach, np. ścięczenie grubości warstwy włókien nerwowych oraz zmniejszenie grubości kompleksu komórek zwojowych (*ang. ganglion-cell-complex - GCC*), co sugeruje, że patogeneza NTG może być podobna do patogenezy chorób neurodegeneracyjnych (Eraslan M et al., 2015).

Choroba Parkinsona, podobnie jak choroba Alzheimera należą do chorób neurodegeneracyjnych o charakterze progresywnym, związanych z selektywną degeneracją neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej mózgu. Istnieją badania wskazujące na większe prawdopodobieństwo wystąpienia zmian w polu widzenia podobnych do zmian jaskrowych u pacjentów z chorobą Parkinsona (Garcia-Martin E et al., 2012). Coraz więcej badaczy sugeruje, że jaskrę NTG należy klasyfikować jako chorobę mózgu, nie tylko oka. Nie wiadomo tylko czy zmiany pojawiające się z mózgu poprzedzają rozwój jaskry, czy też są jej następstwem (Prins D et al., 2016).

Pacjenci z NTG często cierpią również z powodu różnych chorób autoimmunologicznych oraz migrenowych bólów głowy przebiegających z aurą wzrokową (Anderson DR, 2011). Dla dokładniejszego wyjaśnienia tej kwestii należy zwrócić uwagę na sposób kształtowania się gradientu ciśnień między częścią gałkową i pozagałkową nerwu wzrokowego. Anatomia nerwu wzrokowego jest wyjątkowa w porównaniu z pozostałymi nerwami czaszkowymi. Nerw wzrokowy będący częścią centralnego układu nerwowego jest otoczony trzema oponami i płynem mózgowo-rdzeniowym (*ang. cerebrospinal fluid- CSF*). Błazka sitowa twardówki

stanowi anatomiczną granicę pomiędzy przestrzenią wewnątrzgałkową o wyższym ciśnieniu i przestrzenią zagałkową o niższym ciśnieniu. Gradient tych ciśnień tworzący się wzdłuż blaszki sitowej można wyrazić jako różnicę pomiędzy ciśnieniem wewnątrzgałkowym a ciśnieniem płynu mózgowo-rdzeniowego w przestrzeni zagałkowej i tkankach otaczających pozagałkową część nerwu wzrokowego, czyli ciśnienie translaminarne (*ang. trans-lamina cribrosa pressure difference* – TLPD) (Jonas JB, 2011). Nieprawidłowo wysokie i/ lub niskie TLPD może mieć niekorzystny wpływ na fizjologię tarczy nerwu wzrokowego. Podwyższone TLPD może być prowokowane przez wzrosty IOP lub zbyt niskie ciśnienie płynu mózgowo-rdzeniowego w przestrzeni pozagałkowej. Zbyt niskie ciśnienie płynu mózgowo-rdzeniowego otaczającego nerw wzrokowy może stać za mechanizmem barotraumatycznego uszkodzenia nerwu wzrokowego u pacjentów z jaskrą niskiego ciśnienia (Zhang Z et al., 2014). Niskie ciśnienie tętnicze, szczególnie w nocy jest fizjologicznie związane z niskim ciśnieniem płynu mózgowo-rdzeniowego, co prowadzi do nieprawidłowo wysokiego TLPD. Stan taki może być porównany do sytuacji, w której to ciśnienie wewnątrzgałkowe jest podwyższone, a ciśnienie płynu mózgowo-rdzeniowego pozostaje w granicach normy. Ten model tłumaczyłby, dlaczego pacjenci z jaskrą normalnego ciśnienia mają zwykle niskie ciśnienie tętnicze, a w oczach z prawidłowym ciśnieniem wewnątrzgałkowym jak i jaskrą przebiegającą z wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym dochodzi do bardzo podobnych zmian w obrębie tarczy nerwu wzrokowego. Zarówno badania kliniczne jak i eksperymentalne sugerują, że niskie ciśnienie płynu mózgowo-rdzeniowego może wiązać się z neuropatią nerwu wzrokowego u pacjentów z jaskrą normalnego ciśnienia (Jonas JB et al., 2015).

Niedawno opisano zmiany we krwi pacjentów chorujących na jaskrę normalnego ciśnienia. Istnieją bowiem różnice w ekspresji genów w limfocytach krwi pomiędzy pacjentami z jaskrą a grupą kontrolną, a także pomiędzy podgrupami pacjentów z różnymi typami jaskry (Fraenkl SA et al., 2013). Badanie to, choć ograniczone do analizy 22 preselekcjonowanych genów u pacjentów rasy kaukaskiej, dowiodło, że we wszystkich grupach chorych z jaskrą dochodzi do nadekspresji genów w porównaniu z grupą kontrolną (9 genów w POAG/PEX; 7 genów w NTG). Badanie to pokazało również, że w NTG dochodzi do specyficznego wzorca nadekspresji, tj. geny ulegają nadmiernej ekspresji u pacjentów z NTG różniącej się od nadekspresji genów u pacjentów z POAG/ PEX. Sugeruje się, że gen RAR (*ang. RAR-related orphan receptor C*), najbardziej istotnie statystycznie ulegający nadekspresji w NTG, może również odgrywać istotną rolę w patofizjologii tej choroby. Koduje on bowiem receptor jądrowy

regulujący transkrypcję genu biorącego udział w modulację odpowiedzi immunologicznej i procesów apoptozy, opisywanych w jaskrze (Quigley HA et al., 1995; Tezel G et al., 2004).

Podsumowując, ostateczną i bezpośrednią przyczyną utraty wzroku we wszystkich rodzajach jaskry jest śmierć komórek zwojowych i ich aksonów (Tamm ER et al., 2013). Dochodzi do niej na drodze mechanicznego uszkodzenia komórek zwojowych pod wpływem wysokiego ciśnienia w gałce ocznej. Alternatywnie, w przebiegu jaskry normalnego ciśnienia, zaburzenia gradientu ciśnień po obu stronach blaszki sitowej mogą również prowadzić do barotraumatycznego uszkodzenia nerwu wzrokowego, zmian niedokrwiennych w obrębie nerwu wzrokowego i zaburzeń w transporcie neurotrofin.

Zmiany niedokrwienne nerwu wzrokowego powstają pod wpływem zaburzonego krążenia w małych naczyniach tarczy nerwu wzrokowego na skutek ucisku wywoływanego przez podwyższone IOP. Z kolei u pacjentów z jaskrą typu NTG niedokrwienie w obrębie gałki ocznej może być pochodną systemowej dysregulacji naczyniowej. Zmieniona fizjologia okolicy blaszki sitowej występująca zarówno w przebiegu jaskry wywołanej wysokim ciśnieniem, jak również jaskry niskiego ciśnienia upośledza transport neurotrofin do komórek zwojowych. Odcięcie komórek od neurotrofin zwiększa ich umieralność.

1.3. OBECNE METODY LECZENIA

Celem współczesnych metod leczenia jaskry jest zapobieganie rozwojowi uszkodzeń jaskrowych nerwu wzrokowego i zmianom w polu widzenia przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości życia pacjenta, poprzez ograniczenie działań niepożądanych samego leczenia (Parikh RS et al., 2008). Chociaż ciśnienie wewnątrzgałkowe jest tylko jednym z czynników ryzyka rozwoju jaskry, jego farmakologiczne, chirurgiczne lub laserowe obniżanie jest obecnie podstawową metodą leczenia tej choroby.

1.3.1. FARMAKOLOGIA

Ciśnienie wewnątrzgałkowe można obniżać stosując krople okulistyczne o różnym mechanizmie działania. Główny mechanizm działania większości leków polega na hamowaniu produkcji cieczy wodnistej przez nabłonek ciała rzęskowego.

Analogi prostaglandyn i prostamidy to obecnie leki pierwszego rzutu w terapii jaskry. Mają one unikalny mechanizm działania, albowiem ułatwiają odpływ cieczy wodnistej drogą naczyniówkowo- twardówkową. Obserwowany efekt powstaje prawdopodobnie dzięki zwiększeniu przestrzeni pomiędzy włóknami mięśnia rzęskowego poprzez zmniejszenie znajdującej się tam macierzy zewnątrzkomórkowej (Marquis RE et al., 2005). Analogi prostaglandyn (np. latanoprost, trawoprost, bimatoprost) odkryto w latach 90-tych i od tego momentu zaczęły one stopniowo zastępować beta-blokery, będące wcześniej lekami pierwszego rzutu. Analogi prostaglandyn skutecznie obniżają ciśnienie wewnątrzgałkowe, rzadko wywołują objawy niepożądane, a możliwość stosowania ich raz dziennie znacznie zwiększa szanse na przestrzeganie przez pacjentów zaleceń lekarskich. Do typowych działań niepożądanych tej grupy leków należą: łagodne przekrwienie spojówki gałkowej, hipertrychozę - nadmierny wzrost rzęs, zwiększona pigmentacja tęczówki, spojówki i skóry powiek. Hiperpigmentację spojówek i skóry tłumaczy się prawdopodobnym wzrostem produkcji melaniny wywołanym przez prostaglandyny. U pacjentów z herpetycznym zapaleniem rogówki w wywiadzie, należy zachować ostrożność, ponieważ miejscowe stosowanie prostaglandyn może spowodować nawrót tej choroby.

Beta-adrenolityki (beta-blokery) to grupa leków, która przez wiele dekad była stosowana jako terapia pierwszego rzutu w leczeniu jaskry. Obecnie częstość stosowania beta-blokerów została znacznie ograniczona, jednak o istotnym znaczeniu tej grupy leków świadczy fakt, że większość nowoczesnych preparatów łączonych zawiera w swoim składzie beta- bloker, a w badaniach klinicznych oceniających skuteczność nowo wprowadzanych leków przeciwjaskrowych, punktem odniesienia jest nadal timolol (*Timololum*), który blokuje receptory β_1 - i β_2 -adrenergiczne. Beta-blokery ograniczają produkcję cieczy wodnistej poprzez hamowanie zależnej od katecholamin syntezy cAMP w nabłonku ciała rzęskowego. Beta-adrenolityki to leki skuteczne i dobrze tolerowane, jednak często występujące zjawisko tachyfilaksji powoduje stopniowy spadek wrażliwości na ich stosowanie. Połowa pacjentów po około 2 latach leczenia może wymagać zmiany leku lub zastosowania politerapii.

Powszechnie znane działania niepożądane beta-blokerów obejmują bradykardię, obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, arytmie, skurcz oskrzeli i zaostrzenie zastoinowej niewydolności serca. Stosowanie beta-blokerów jest zatem przeciwwskazane u pacjentów z ciężkimi chorobami serca, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc, astmą i miastenią.

Agoniści receptora alfa-2- adrenergicznego obniżają ciśnienie zarówno poprzez ograniczenie produkcji cieczy wodnistej jak i zwiększenie odpływu drogą niekonwencjonalną tj. drogą naczyniówkowo- twardówkową. Brimonidyna (*Brimonidinum*) będąca głównym lekiem z tej grupy (epinefryna i adrenalina - nioselektywni agoniści pobudzający receptory alfa i beta adrenergiczne nie są obecnie stosowane w codziennej praktyce klinicznej) poprzez swoje oddziaływanie na receptory alfa-2 w siatkówce może osłabiać procesy immunologiczne w obrębie gleju oraz ograniczać gromadzenie glutaminianu zewnątrzkomórkowo, przez co poprawia metabolizm komórek zwojowych działając tym samym neuroprotekcynie na modelach zwierzęcych jaskry (Arthur S et al., 2011). Możliwości zastosowania brimonidyny ograniczają wywoływane przez nią reakcje alergiczne np. przekrwienie i zapalenie spojówek, suchość w jamie ustnej, zawroty głowy, spadki ciśnienia tętniczego, uczucie zmęczenia.

Inhibitory anhidrazy węglanowej to sulfonamidy, które stosowane doustnie lub miejscowo hamują produkcję cieczy wodnistej. Preparatem doustnym jest acetazolamid (*Acetazolamidum*) znany pod nazwą handlową jako Diuramid. Jego przejściowe działanie moczopędne, które wiąże się z nadmiernym wypłukiwaniem potasu, może powodować parestezje dłoni i stóp. Do często zgłaszanych działań niepożądanych należą również nudności, utrata masy ciała, rzadziej- supresja szpiku kostnego i zespół Stevensa-Johnsona. Ze względu na możliwe reakcje niepożądane, doustnego preparatu acetazolamidu nie stosuje się w przewlekłym leczeniu czy też w stałym schemacie. W praktyce okulistycznej lek ten zaleca się do leczenia pooperacyjnych wzrostów ciśnienia wewnątrzgałkowego, wysokiego ciśnienia w oku, którego nie udaje się obniżyć lekami miejscowymi, lub przygotowując pacjenta do operacji przeciwwąskrowej.

Inhibitory anhidrazy węglanowej stosowane miejscowo mogą powodować ból oka i zamglone widzenie. Szczególną ostrożność należy zachować u pacjentów z dysfunkcją śródbłonna rogówki ze względu na możliwość rozwoju dekompensacji rogówki.

Agoniści receptora acetylocholinowego (miotyki/ parasympatykomimetyki) to najstarsza, obecnie rzadko stosowana grupa leków. Działanie tej grupy leków polega na zwiększeniu odpływu cieczy wodnistej przez beleczkowanie. Jedynym nadal obecnym na rynku preparatem z tej grupy jest pilokarpina. Pilokarpina, pobudzając receptory muskarynowe ciała rzęskowego, poszerza kąt przesączania i tym samym zwiększa odpływ cieczy wodnistej. Pilokarpina równocześnie zmniejsza odpływ drogą niekonwencjonalną, co ostatecznie ogranicza jej działanie hipotensyjne. Do ocznych objawów niepożądanych pilokarpiny należy zwężenie źrenicy, skurcz

akomodacyjny i przejściowa krótkowzroczność, a ogólnoustrojowe objawy typu ślinotok, nadmierna potliwość i tachykardia czynią z niej lek o ograniczonym zastosowaniu.

Leki obniżające ciśnienie wewnątrzgałkowe u pacjentów z jaskrą wywołują swój neuroprotektoryjny efekt poprzez ochronę aksonów komórek zwojowych przed barotraumatycznym uszkodzeniem. Wiadomo, że taka terapia skutecznie spowalnia uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne zmiany w obrębie komórek zwojowych i ich aksonów.

Problemem pozostaje jednak efektywna współpraca ze strony pacjenta i jego skrupulatne stosowanie się do zaleceń, które w praktyce często okazują się być zbyt uciążliwe. Pacjent z rozpoznaną jaskrą powinien codziennie, przez wiele lat, regularnie stosować jeden lub więcej preparatów, aby osiągnąć docelowe ciśnienie wewnątrzgałkowe, przy którym nie postępują uszkodzenia jaskrowe, a to jak pokazują badania- stanowi ogromny problem (Reardon G et al., 2011, Sleath B et al., 2011). Chociaż terapia farmakologiczna pozostaje pierwszą linią leczenia większości pacjentów z jaskrą, to jednak brak współpracy, działania niepożądane terapii lub w niektórych przypadkach jej nieskuteczność, mogą skłonić lekarza do podjęcia decyzji o przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego. Obecnie dostępnych jest szereg zabiegów chirurgicznych zapewniających spadek ciśnienia wewnątrzgałkowego przy jednocześnie minimalnych działaniach niepożądanych.

1.3.2. CHIRURGIA JASKRY

Konwencjonalna chirurgia jaskry ma na celu stworzenie nowej drogi w beczkowaniu, ułatwiającej odpływ cieczy wodnistej. Jeszcze kilka lat temu najczęstszą procedurą operacyjną w chirurgii jaskry była trabekulektomia, która polega na usunięciu części beczkowania i tym samym zwiększeniu odpływu cieczy wodnistej. Niestety metoda ta może generować szereg powikłań w postaci zapalenia pęcherzyka filtracyjnego, nadmiernego odpływu cieczy wodnistej i związanej z tym hipotonii, zapalenia wnętrza gałki ocznej, odwarstwienia siatkówki a nawet zaniku gałki ocznej. Jako alternatywę dla tak inwazyjnego zabiegu jakim jest trabekulektomia, opracowano techniki o wysokim profilu bezpieczeństwa i skuteczności oraz minimalnym wpływie na jakość życia pacjentów- techniki chirurgii mikroinwazyjnej (*ang. microinvasive glaucoma surgery- MIGS*). Zabiegi te są wykonywane ab interno czyli od komory przedniej, co ogranicza powstawanie blizn na rogówce, oszczędza tkankę spojówki i umożliwia ich wykonanie jednocześnie z chirurgią zaćmy bez konieczności robienia dodatkowych nacięć w

rażki rogówki. Zabiegi MIGS wykonywane są (1) w obrębie kanału Schlemma (stenty iStent, Hydrus, kanaloptyka), (2) w przestrzeni nadnaczyniówkowej (stenty Cypass, iStentsupra) lub (3) mają na celu ominięcie fizjologicznej drogi odpływu cieczy wodnistej (XEN GelStent) (Saheb H. et al., 2012).

1.3.3. LECZENIE LASEROWE

Czasami alternatywą dla leczenia technikami chirurgicznymi, są zabiegi laserowe, np. trabekuloplastyka. Ma ona na celu poszerzenie przestrzeni w siateczce beleczkowania w jaskrze otwartego kąta i ułatwienie odpływu cieczy wodnistej. Trabekuloplastyka wykonywana laserem argonowym (*ang. argon laser trabeculoplasty- ALT*), rzadko obecnie wykonywana, polega na ogniskowaniu wiązki światła laserowego na pigmentowanej części beleczkowania i wywoływaniu uszkodzeń termicznych i nekrozy na skutek koagulacji w obrębie leczonej struktury kąta. Miejscowe uszkodzenia powodują obkurczanie się tkanki i poszerzenie sąsiadującej przestrzeni w siateczce beleczkowania, a tym samym zwiększenie odpływu cieczy wodnistej. Wielkość uszkodzeń spowodowanych przez laser argonowy nie ogranicza się do miejsca ogniska, lecz rozszerza się na komórki trabekulum posiadające melaninę. Procedurę SLT (*ang. selective laser trabeculoplasty*) przeprowadza się laserem Nd:YAG Q-switched. Z założenia procedura SLT jest bardzo podobna do ALT, z tą różnicą, że laser Nd:YAG działa selektywnie na komórki w obrębie pigmentowanej części beleczkowania minimalizując tym samym rozległość termalnych i strukturalnych uszkodzeń sąsiadujących struktur (Wang W et al., 2013). Mikropulsowa trabekuloplastyka (MLT), rzadko obecnie wykonywana, wymaga zastosowania lasera diodowego o długości fali 810 nm. Ta długość fali nie jest skutecznie absorbowana przez melaninę, a zatem penetruje głęboko w tkanki beleczkowania. Różnice pomiędzy ALT, SLT i MLT polegają na częstotliwości występowania działań niepożądanych wywołanych nadmiernymi uszkodzeniami w obrębie siateczki beleczkowania. Poziomy energii laserów stosowanych w SLT i MLT stanowią mniej niż 1% energii wykorzystywanej przez laser argonowy w ALT, dlatego są to procedury bezpieczniejsze.

Obwodowa irydotomia wykonywana laserem ND:YAG polega na wycięciu otworów w obwodowej części tęczówki. Ma to na celu ułatwienie odpływu cieczy wodnistej i zmniejszenie ryzyka ostrego ataku jaskry w jaskrze z wąskim, zamykającym się kątem przesączenia.

Endocyklofotokoagulacja (*ang. endocyclophotocoagulation- ECP*) to endoskopowa metoda leczenia jaskry otwartego i zamykającego się kąta, polegająca na zniszczeniu wyrostków rzęskowych laserem diodowym od strony komory przedniej. Zabieg ten można łączyć z operacją zaćmy. Dotychczas, zabiegi cyklodestrukcyjne zarezerwowane były do leczenia ciężkich postaci jaskry, jednak coraz więcej badań wskazuje, że endocyklofotokoagulacja może być wykonywana jako pierwszy zabieg przeciwjaskrowy u chorych w różnym stadium zaawansowania neuropatii jaskrowej i z dobrą ostrością wzroku (Leonard K et al., 2015).

Zabieg transskleralnej cykloablacji laserem diodowym polega na zniszczeniu części wydzielniczej nabłonka barwnikowego ciała rzęskowego i w tym mechanizmie obniżeniu ciśnienia wewnątrzgałkowego. Zabieg ten jednak zarezerwowany jest dla ciężkich, niereagujących na inne terapie rodzajów jaskry.

1.4. NEUROPROTEKCJA

Neuroprotekcja to każde działanie, leczenie czy procedura, której celem jest spowolnienie lub ochrona przed degeneracją komórek neuronalnych.

Celem trwających obecnie badań jest opracowanie metod spowalniających progresję neuropatii jaskrowej na drodze regulacji metabolicznych szlaków sygnałowych wpływających na przeżywalność komórek siatkówki. Strategie neuroprotekcji opartej na neurobiologii zapowiadają nowe rozwiązania terapeutyczne dla neuropatii jaskrowej. Nawet, jeśli leczenie nadal wymagałoby redukcji ciśnienia wewnątrzgałkowego, połączenie obu ścieżek terapii mogłoby znacząco poprawić efektywność leczenia jaskry. Skuteczność technik molekularnych zależy od dogłębnego, szczegółowego zrozumienia mechanizmów prowadzących do dysfunkcji i śmierci komórek zwojowych siatkówki. Dzięki wynikom szeregu badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych jaskry oraz ostrych i przewlekłych uszkodzeniach nerwu wzrokowego u zwierząt uzyskano sporo informacji na temat molekularnych podstaw śmierci komórek zwojowych. Obraz wyłaniający się z tych badań jest złożony i wskazuje na istnienie szeregu sygnałów molekularnych, działających osobno lub w powiązaniu z innymi sygnałami, które promują śmierć komórki zwojowej siatkówki. Należą do nich: zaburzony transport aksonalny i w konsekwencji deprywacja czynników neurotroficznych, aktywacja toksycznych pro- neurotrofin, aktywacja wewnątrzpochodnych i zewnątrzpochodnych sygnałów apoptotycznych np.

dysfunkcja mitochondrialna, uszkodzenia ekscytotoksyczne, stres oksydacyjny, deprywacja glukozy, aktywacja mikrogleju i utrata łączności synaptycznej.

Celem terapii opartych na neuroprotekcji na poziomie molekularnym (neuroprotekcja bezpośrednia) jest zahamowanie lub niedopuszczenie do progresji choroby poprzez wpływ na szlaki metaboliczne kontrolujące przeżycie komórek w ramach których, w warunkach normalnych, ścieżka apoptozy komórek zwojowych siatkówki jest stale hamowana, lecz pod wpływem określonych, wymienionych powyżej sygnałów zostaje uruchomiona. Stosowaną powszechnie w terapii jaskry baroprotekcję, czyli obniżanie ciśnienia wewnątrzgałkowego można nazwać pośrednią neuroprotekcją. Są jednak autorzy, którzy prezentują inny pogląd, twierdząc, że neuroprotekcja to postępowanie mające na celu funkcjonalną ochronę wzroku niezależnie od redukcji ciśnienia wewnątrzgałkowego (Levin LA, 2018).

Neuroprotekcja może zahamować utratę komórek zwojowych siatkówki w co najmniej trzech poznanych dotychczas mechanizmach. Pierwszy z nich jest zależny od receptora i prowadzi do aktywacji kaskady związanej z kinazą PI3K (*ang. phosphoinositide-3 kinase*) hamującej wewnątrzpochodną mitochondrialną drogę. Drugi mechanizm polega na zahamowaniu działania neuroprzekaźników takich jak glutaminian, który poprzez nadmierną aktywację receptorów NMDA, prowadzi do przedłużonego otwarcia kanałów jonowych, nadmiernego napływu jonów wapnia do komórki, produkcji wolnych rodników i ostatecznie dezintegracji i rozpadu całej komórki. W trzecim mechanizmie, neuroprotekcja polega na regulacji zaburzonego transportu aksonalnego, który odpowiada za dostarczenie do ciała komórek zwojowych neurotrofin takich jak BDNF lub dostarczenie ich bezpośrednio do siatkówki. Istnieje cały szereg molekuł, zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego, które pomagają przeciwdziałać tym niekorzystnym efektom: antyoksydanty, antagoniści receptorów NMDA, blokery kanałów wapniowych, galantamina (inhibitor acetylocholinesterazy), neurotrofiny, kwas acetylosalicylowy, Ginkgo Biloba, resveratrol, oleje ryb oraz kwasy omega-3 (Dahlmann-Noor AH et al., 2010).

1.4.1. CYTYKOLINA

Cytykolina (cytydino- 5'-difosfocholina, *CDP-cholina*) występuje naturalnie jako produkt pośredni w zachodzącym powszechnie w komórkach zwierzęcych procesie przemiany choline w fosfatydylocholinę, jeden z fosfolipidów błon komórkowych (Kennedy EP, 1956). Syntetyczna forma cytykoliny dostępna jest w postaci szeregu preparatów.

Istnieje sporo badań wskazujących, że suplementacja cytykoliny (*ang. citicoline*) może znacząco opóźnić progresję zmian jaskrowych (Ottobelli L et al., 2013). Neuroprotektoryjne właściwości cytykoliny zostały odkryte w 1981 roku (Horrocks LA et al., 1981). Horrocks i współpracownicy dowiedli wtedy, że związek ten hamuje uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych z fosfolipidów błon komórek nerwowych podczas niedokrwienia mózgu. Neuroprotektoryjne działanie cytykoliny, w postaci zmniejszenia ogniska udarowego zostało dowiedzione w badaniach nad zmianami niedokrwinnymi i pourazowymi mózgu na modelach zwierzęcych (Bustamante A et al., 2012). Wieloośrodkowe badania kliniczne nie potwierdziły jednak korzystnego działania cytykoliny u pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu. Prawdopodobnie związane jest to z ogromną różnorodnością postaci tego schorzenia. Niemniej jednak, cytykolina wydaje się mieć korzystne działanie w hamowaniu postępujących chorób neurodegeneracyjnych takich jak jaskra lub łagodne zaburzenia kognitywne (Grieb P, 2014). Jej zastosowanie może mieć charakter wspomagający, niejako dodatkowy do podstawowej metody terapii.

A zatem, w chwili obecnej brakuje skutecznego we wszystkich rodzajach jaskry czynnika biochemicznego o działaniu neuroprotektoryjnym. Pomimo szeregu badań na modelach zwierzęcych i krótkich badań klinicznych wskazujących na neuroprotektoryjne działanie różnych czynników, żadne z długoczasowych, randomizowanych badań klinicznych nie potwierdziło ich ochronnego wpływu na komórki zwojowe siatkówki (Sena DF et al., 2010). Na przykład, badanie kliniczne trzeciej fazy nad skutecznością i bezpieczeństwem memantyny, inhibitora nadmiernej aktywności receptora NMDA, której neuroprotektoryjne działanie zostało udowodnione na modelach zwierzęcych ostrego uszkodzenia nerwu wzrokowego (Kim TW et al., 2002), nie zostało pozytywnie ukończone z udziałem ludzi (Osborne NN, 2009).

1.4.2. NEUROTROFINY

Istnieje szereg dowodów na neuroprotektoryjne działanie neurotrofin względem komórek zwojowych siatkówki (Martin K et al., 2003, Wilson AM et al., 2012).

Neurotrofiny należą do rodziny czynników wzrostu, które w tkance nerwowej odgrywają kluczową rolę w regulacji środowiska, stwarzając warunki dla przeżycia, różnicowania, wzrostu, funkcjonowania i plastyczności populacji komórek nerwowych. Główna podaż neurotrofin dla neuronów siatkówki pochodzi z mózgu, skąd przedostają się drogą aksonalnego transportu wstecznego, w znacznie mniejszym stopniu produkowane są również w samej siatkówce.

Rodzina neurotrofin składa się z czterech głównych typów białek o podobnych funkcjach: czynnik wzrostu nerwów (NGF), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) i neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Shen T et al., 2018). Poszczególne neurotrofiny działają na specyficzne populacje komórek nerwowych. BDNF jest głównym regulatorem dla różnego rodzaju neuronów, w tym neuronów czuciowych, komórek zwojowych siatkówki, neuronów motorycznych rdzenia, neuronów cholinergiczych i niektórych neuronów dopaminergiczych (Allen SJ et al., 2013). Niezwykle ważne znaczenie BDNF odgrywa również w siatkówce, decydując o przeżyciu komórek zwojowych zarówno w okresie rozwoju (Ma YT et al., 1998) jak i w życiu dorosłym (Takano M et al., 2002).

Uważa się, że dysregulacja BDNFu stanowi podłoże chorób neurodegeneracyjnych. Deficyt w zakresie BDNF, choć niekoniecznie stanowi czynnik wyzwalający sam proces chorobowy, może jednak przyspieszać uszkodzenie komórek. BDNF ulega ekspresji w układzie nerwowym, a jego ekspresja spada w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych, jak zademonstrowano w badaniach post-mortem, również w chorobie Alzheimer (Hock C et al., 2000), w chorobie Parkinsona (Mogi M et al., 1999) i chorobie Huntingtona (Ferrer I et al., 2000). Wykazano, że w warunkach wysokiego ciśnienia wewnątrzgałkowego, dochodzi do zablokowania transportu BDNF i wzrostu stężenia jego receptora TrkB (*ang. tropomyosin-related kinase receptor-B*), co ostatecznie prowadzi do deficytu tej neurotrofiny w obrębie komórek zwojowych i może prowadzić do aktywacji procesów apoptotycznych (Pease ME et al., 2000).

Jak wspomniano powyżej, jaskra jest złożoną chorobą neurodegeneracyjną charakteryzującą się postępującą degeneracją komórek zwojowych siatkówki, poszerzonym zagłębieniem w tarczy nerwu wzrokowego i ścięciem włókien nerwowych, co skutkuje

spadkiem czułości siatkówki i nieodwracalną utratą widzenia. Istnieje szereg danych sugerujących, że czynniki neurotroficzne takie jak BDNF wpływają na rozwój i przeżycie komórek zwojowych. W obrębie siatkówki, BDNF jest produkowany przez komórki warstwy jądrzastej wewnętrznej (*ang. inner nuclear layer - INL*) i warstwę komórek zwojowych (*ang. ganglion cell layer- GCL*) (Perez MT, et al., 1995). Receptor TrkB produkowany przez komórki zwojowe i amakrynowe stanowi cel dla BDNF (Cellerino A, et al., 1997). Niektórzy badacze wykazali, że BDNF może być użytecznym markerem biochemicznym do wczesnego rozpoznawania jaskry pierwotnej otwartego kąta. Poziom BDNF w surowicy krwi oraz w filmie łzowym jest znacząco niższy u pacjentów z jaskrą w porównaniu z osobami zdrowymi, co potwierdza neuroprotekcyjną rolę neurotrofin w rozwoju jaskry (Ghaffariyeh A. et al., 2011).

Suplementacja siatkówki egzogennym BDNF stosowana we wczesnych badaniach eksperymentalnych dawała bardzo obiecujące wyniki, jednocześnie wskazując na ograniczony czas działania tej neurotrofiny i konieczność ponownych jej podań, aby osiągnąć długotrwałą neuroprotekcję komórek zwojowych siatkówki (Ko M et al., 2001; Chen H et al., 2001). Doszkliskowe iniekcje wektorów wirusowych zawierające konstrukt genowy (AAV-BDNF) okazały się być atrakcyjną alternatywą umożliwiającą długoczasowe podwyższenie stężenia BDNF i wsparcie przeżycia komórek zwojowych siatkówki (Martin K et al., 2003; Garafalo A et al., 2019).

Aby osiągnąć efekt terapeutyczny, stężenie wewnątrzgałkowego BDNF wymaga odpowiedniej ekspresji receptora TrkB. Wyniki kilku badań pokazały, że podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe wywołuje zmiany w poziomie BDNF i receptora TrkB z powodu zaburzeń w transporcie wstecznym w nerwie wzrokowym (Pease M et al., 2000; Quigley HA et al., 2000). Również w kilku badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że wysokie stężenie BDNF powoduje obniżenie ekspresji receptora TrkB, co prawdopodobnie ma negatywny wpływ na działanie BDNF (Di Polo A et al., 1998; Sommerfeld M et al., 2000; Osborne A et al., 2018). Jednak na podstawie danych dostępnych w literaturze, trudno jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie czy wewnątrzgałkowa nadekspresja BDNF prowadzi do obniżenia ekspresji receptora TrkB (Chen H et al., 2004; Dekeyster E et al., 2015). Wyniki licznych badań pokazały, że po mechanicznym uszkodzeniu nerwu wzrokowego lub przy wzroście ciśnienia wewnątrzgałkowego, gdy rośnie poziom BDNF może jednocześnie dojść do wzrostu (Pease M et al., 2000; Quigley HA et al., 2000), braku zmiany (Rudzinski M et al., 2004) lub spadku (Cheng L et al., 2002) poziomu receptora TrkB, zarówno we wczesnym jak i późnym okresie od uszkodzenia. A zatem odpowiedź na pytanie o zależność pomiędzy ekspresją receptora TrkB a

zmianami w stężeniu BDNF w jaskrze oraz podczas leczenia jest kluczowym elementem tworzenia skutecznych badań klinicznych i przyszłych terapii.

1.4.3. TERAPIE GENOWE

Terapie genowe zostały opracowane w celu wprowadzenia materiału genetycznego do komórek pacjenta w celu regulacji, naprawy, dodania lub usunięcia sekwencji genetycznej. Wszystkie te działania mają na celu uzyskanie terapeutycznego lub profilaktycznego efektu. Korzyści terapeutyczne mogą się utrzymywać przez dłuższy czas bez konieczności ich powtarzania.

Oko posiada kilka kluczowych zalet, które sprawiają, że jest to atrakcyjny cel dla terapii genowej. W porównaniu z innymi narządami, oko jest małe i dzięki temu nie wymaga podaży dużej dawki wektorów wirusowych, aby osiągnąć efekt terapeutyczny. Dostęp do różnych tkanek oka nie jest skomplikowany bez względu na wybraną drogę podania terapii. Oko należy do narządów uprzywilejowanych immunologicznie, wykazuje słabą reakcję immunologiczną na wektory wirusowe. W oku występuje bariera krew-siatkówka, dzięki której siatkówka jest oddzielona od reszty ciała i praktycznie nie ma możliwości przechodzenia molekuł terapeutycznych poza obszar gałki ocznej (Runkle EA et al., 2001), co istotnie ogranicza ryzyko występowania ogólnych działań niepożądanych. Dodatkowo, kilka nieinwazyjnych testów stosowanych w praktyce klinicznej takie jak: oftalmoskopia bezpośrednia, elektroretinografia i optyczna koherentna tomografia siatkówki (OCT) pozwalają na nieinwazyjne i obiektywne monitorowanie wyników zastosowanego leczenia. Co więcej, jeśli tylko jedno oko jest leczone, oko towarzyszące może służyć jako kontrola. Jest to dość powszechne podejście, stosowane przez wielu badaczy, ponieważ eliminuje czynnik zmienności osobniczej (Morrison JC et al., 2008; Urcola JH et al., 2006, Dekeyser E et al., 2015)

Do chwili obecnej terapie genowe w jaskrze miały na celu rekonstrukcję w obrębie beleczkowania, aby poprawić odpływ cieczy wodnistej oraz w nabłonku barwnikowym ciała rzęskowego, aby zmieniając jego aktywność neuroendokrynną, zmniejszyć produkcję cieczy wodnistej i poprawić jej odpływ (Wilson AM et al., 2012).

W ramach terapii genowej, skuteczne wprowadzenie kodu genetycznego do komórek wymaga zastosowania nośników, które są w stanie przeniknąć przez błonę komórkową wraz z

niesioną kasetą genową, która zawiera pożądaną sekwencję genów i sekwencje regulatorowe umożliwiające ich ekspresję. Nośnik musi być dobrany w taki sposób, aby pomieścić całą sekwencję genową. Rolę nośnika genów z bardzo dobrym skutkiem spełniają wektory wirusowe.

1.5. WEKTORY WIRUSOWE STOSOWANE W TERAPIACH GENOWYCH

Wektory stosowane obecnie w badaniach klinicznych nad wrodzonymi dystrofiami siatkówki to wektory zmodyfikowanych wirusów związanych z adenowirusami (*ang. adeno-associated virus, AAV*), będące małymi wirusami o jednonicowym DNA oraz lentiwirusy, należące do rodziny retrowirusów. Oba typy wektorów mogą ulegać transdukcji w komórkach dzielących się, ale AAV są wirusami nieintegrującymi się z genomem gospodarza, w przeciwieństwie do lentiwirusów. Pojawiły się już doniesienia o wektorach lentiwirusowych nieintegrujących się z genomem (Non-Integrating Lentiviral Vectors, NILV), ale nie mają one jeszcze zastosowania klinicznego.

Lentiwirusy są wektorami, które ulegają integracji z genomem gospodarza, nie wymagając do tego procesu podziałów komórkowych (Sakuma T, et al., 2012). Ich zaletą jest duża pojemność klonowania, do 10 kb (Kumar M, et al., 2004). Ryzyko związane z zastosowaniem wektorów lentiwirusowych ulegających integracji polega na tym, że integrują się one w aktywnych miejscach regulatorowych lub transkrypcyjnych, co może skutkować procesami onkogenezy, jeśli insercja powoduje nadekspresję endogennych proto-onkogenów (Lee JH et al., 2019).

Potencjał jaki niesie ze sobą dostarczanie genów za pomocą wektorów AAV został dostrzeżony i zyskał w ostatnich latach ogromne zainteresowanie. Wektory AAV umożliwiają długotrwałą ekspresję genów w obrębie siatkówki, nie wywołując przy tym istotnych reakcji zapalnych i immunologicznych. Wektory AAV cechują się niską patogenicznością, dobrym profilem ekspresji i zdolnością do transdukcji w wielu typach komórek. Dzięki tym wszystkim cechom stały się wiodącymi, najczęściej wybieranymi wektorami w różnych terapiach genowych. W przeszłości, wektory AAV nie znajdowały zbyt dużego zainteresowania w świecie medycznym z powodu braku szerokiej wiedzy na ich temat (Daya S et al., 2008). Adenowirusy to jedne z najmniejszych wirusów (~22 nm) należące do rodziny Parvoviridae. Znanych jest 12 ludzkich serotypów (od AAV1 do AAV12). Dotychczas poznano i opisano ponad 100 serotypów innych niż ludzkie (Daya S et al., 2008). Wirusy te posiadają szereg zalet, które sprawiają, że są

to doskonałe narzędzia do zastosowania w terapiach genowych u ludzi: brak patogenności, wysoka zdolność przetrwania, niski potencjał prozapalny, niska immunogenność, niska toksyczność dla siatkówki, zdolność do transdukcji w komórkach niedzielących się oraz szeroka dostępność różnych serotypów. Wszystkie te cechy sprawiły, że zainteresowanie tymi wirusami jako potencjalnymi wektorami mogącymi znaleźć zastosowanie w terapiach genowych, znacząco wzrosło.

1.5.1. PODSTAWY BIOLOGII WEKTORÓW NA BAZIE WIRUSÓW ZWIĄZANYCH Z ADENOWIRUSAMI

Większość wektorów wirusowych stosowanych w prowadzonych obecnie badaniach klinicznych ma serotyp AAV2. Jest to najlepiej przebadany serotyp tego wirusa, ma zdolność do transdukcji o różnym nasileniu w różnych rodzajach komórek oka, np. komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki, komórkach zwojowych, fotoreceptorach i komórkach Müllera (Ramlogan-Steel CA et al. 2018). Istnieje jednak kilka problemów związanych z wyborem AAV2 jako wektora wirusowego. Jedną z nich jest ich ograniczona pojemność w przypadku próby przeniesienia większych genów oraz opóźniona ekspresja transgenów (Day TP et al., 2014).

Infekcja AAV jest dynamicznym, wieloetapowym procesem. Obejmuje on przyłączenie się wirusa do receptora na powierzchni komórki, jego internalizację, transport endosomalny, import do jądra oraz ekspresję/ replikację genu (Balakrishnan B et al., 2014). Pierwszym etapem jest przyłączenie się kapsydu wirusowego do swojego pierwotnego receptora na powierzchni komórki gospodarza. Połączenie się kapsydu wirusowego z receptorem indukuje zmiany w strukturze kapsydu, które prawdopodobnie ułatwiają dalsze przemieszczanie się wirusa wewnątrzkomórkowo (O'Donnell J et al., 2009). Endocytoza komórkowa jest procesem, podczas którego komórki pobierają makromolekuły z otaczającego środowiska. Internalizacja AAV jest prawdopodobnie formą endocytozy regulowanej przez receptor. Błona komórkowa komórki gospodarza ulega wgłobieniu tworząc formę pęcherzyka wokół wirusa (Duan D et al., 1999). Dokładny proces łączenia się wirusa z jądrem komórkowym nie został dotychczas poznany i opisany, nadal pozostaje przedmiotem aktywnie prowadzonych badań.

1.5.2. WEKTORY WIRUSOWE AAV W OKULISTYCE

Istnieją dwa główne podejścia w terapeutycznym zastosowaniu wektorów AAV do transferu genów w kontekście chorób okulistycznych. Po pierwsze, terapia genowa z zastosowaniem wektorów AAV ma potencjał do korygowania określonych defektów genetycznych - jeśli defekt ten jest dobrze poznany i określony (Keith RG et al., 2002). Naprawa okulistycznych defektów genetycznych wymaga podania genu bezpośrednio do uszkodzonej komórki. Udało się to osiągnąć w przypadku powolnej utraty fotoreceptorów na kilku modelach zwierzęcych pierwotnych chorób pręcikowo- czopkowych (Liang FQ et al., 2001). Wymiana genów z udziałem wektorów AAV została również niedawno opracowana dla ludzi do przywrócenia funkcji widzenia we wrodzonej ślepotcie Lebera 2 (*ang. Leber's congenital amaurosis – LCA2*), spowodowanej przez wadliwe funkcjonowanie genu RPE 65 i prowadzącej do ciężkiej utraty widzenia we wczesnym dzieciństwie (Lloyd A et al., 2019).

Jednak w przypadku wielu chorób okulistycznych nie określono jeszcze genów odpowiedzialnych za ich rozwój. Podłoże patologiczne wielu chorób okulistycznych jest bardziej złożone niż mutacja pojedynczego genu. Jaskra jest przykładem choroby okulistycznej, u podstaw której leży interakcja wielu czynników genetycznych i środowiskowych (Liu Y et al., 2017). Jaskra to właściwe zespół chorób, o zróżnicowanym podłożu, które łączy wywołany przez nie skutek - uszkodzenie nerwu wzrokowego. A zatem jako choroba wieloczynnikowa, jaskra nie może zostać definitywnie wyleczona poprzez wymianę pojedynczego genu. Wobec takich okoliczności, przydatna okazuje się być druga z możliwych strategii, jaką oferuje terapia genowa. Polega ona nie na wymianie uszkodzonego, wadliwego genu, ale na transferze genu ograniczającego utratę funkcji. Przykładem takiego podejścia jest transfekcja komórek siatkówki za pomocą wektora AAV przenoszącego gen dla podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (*ang. fibroblast growth factor - FGF-2*), czynnika neurotroficznego pochodzącego z linii komórek glejowych (*ang. glial cell line-derived neurotrophic factor - GDNF*) oraz rzęskowego czynnika wzrostu (*ang. ciliary neurotrophic factor - CNTF*), które spowalniają utratę fotoreceptorów w szczurzym modelu zwyrodnienia barwnikowego siatkówki (*ang. retinitis pigmentosa - RP*) (Liang FQ et al., 2001).

Obecnie na świecie prowadzonych jest ponad 120 badań klinicznych zarejestrowanych na stronie clinicaltrials.gov (dane z września 2020), które wykorzystują terapię genową w leczeniu chorób okulistycznych u ludzi. Niestety, żadne z tych badań nie dotyczy terapii genowej w jaskrze.

Wiemy już, że dostarczanie genów do siatkówki za pomocą wektorów wirusowych jest skuteczną metodą ograniczania strukturalnych i funkcjonalnych uszkodzeń w kilku modelach chorób okulistycznych. Terapie genowe obecnie stosuje się w kilku badaniach klinicznych nad wrodzoną ślepotą Lebera (*LCA2*) (Lee JH et al. 2019), zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (*ang. retinitis pigmentosa* - RP) (Dalkara D et al., 2013, Dias MF et al., 2018), choroideremią (Edwards TL et al., 2016), dziedziczną neuropatią wzrokową Lebera (*ang. Leber hereditary optic neuropathy* - LHON), achromatopsją oraz wrodzonym rozwarstwieniem siatkówki sprzężonym z chromosomem X (*ang. X-linked retinoschisis*) (Lee JH et al. 2019).

Wiele badań klinicznych z zastosowaniem terapii genowej z wirusami AAV w terapii wrodzonej ślepoty Lebera potwierdziło skuteczność i bezpieczeństwo tej metody leczenia (Russel S et al., 2017). Potencjał jaki niosą ze sobą terapie genowe wykorzystujące wektory adenowirusowe zyskał w ostatnich latach ogromne zainteresowanie głównie dzięki wprowadzeniu na rynek pierwszej w okulistyce terapii genowej, leku znanego pod nazwą marketingową Luxturna (*voretigene neparvovec-rzyl- AAV2-hRPE65v2*), firmy Spark Therapeutics, do leczenia wrodzonej ślepoty Lebera 2 (Russel S et al., 2017). Wektory wirusowe można wykorzystać do transfekowania różnych typów komórek oka, w tym fotoreceptorów (Lee JH et al., 2019), komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (Balakrishnan B et al., 2014), komórek zwojowych siatkówki (Daya S et al., 2008), komórek siateczki beleczkowania oraz komórek śródbłonka rógówki (Liu MM et al., 2011). Te pozytywne wyniki silnie przemawiają za możliwością stworzenia podobnej terapii genowej dla pacjentów z jaskrą.

Wyniki badań klinicznych związanych z zastosowaniem terapii genowych w dziedzicznych chorobach okulistycznych zachęciły badaczy do zastosowania jej w leczeniu i kontroli niedziedzicznych chorób okulistycznych, szczególnie tych, których obecne metody leczenia mają krótkotrwałą skuteczność. Do takich chorób należą: jaskra, wysiękowe zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (*ang. neovascular age-related macular degeneration - AMD*) oraz retinopatia cukrzycowa. Chociaż etiologia tych chorób jest wieloczynnikowa, złożona, heterogenna i często wielogenowa, cały czas widać postęp w tworzeniu skutecznych metod leczenia u ludzi (clinicaltrials.gov).

1.5.3. BARIERY I OGRANICZENIA TERAPII GENOWYCH

W ciągu ostatnich kilku dekad dokonał się ogromny postęp w dziedzinie terapii genowych, szczególnie w zakresie chorób okulistycznych. Nadal jeszcze istnieje kilka istotnych barier do pokonania. Zasadniczym warunkiem stworzenia skutecznej terapii genowej jest dokładna identyfikacja mutacji genowych, które wiążą się z daną jednostką chorobową (Broadgate S et al., 2017). Chociaż terapie genowe są obiecującą i ekscytującą formą leczenia wielu chorób, główną barierą dla dalszego rozwoju badań nad nimi są kwestie związane z ich bezpieczeństwem.

Jednym z podstawowych zagrożeń wiążących się z transferem genów jest insercyjna mutagenaza. Polega ona na niepożądanym transpozycji materiału genetycznego, która zakłóca strukturę chromatyny lub struktury genu, a w konsekwencji zmienia procesy transkrypcji, regulacji lub kodowania genu. Obserwuje się bowiem zjawiska proto-onkogenne, wtórne do transferu genów za pomocą wektorów AAV do hepatocytów (Logan GJ et al., 2017). W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych do chwili obecnej, nie zaobserwowano żadnego nowotworzenia w obrębie gałki ocznej po podaniu podsiatkówkowym, doszkliskowym lub dokomorowym wektorów AAV lub lentiwirusów.

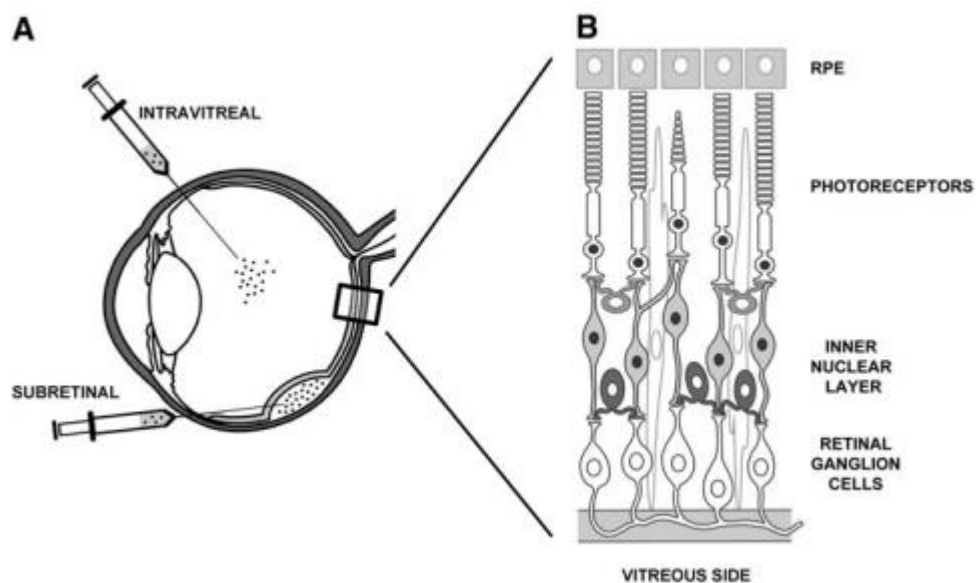
Wektory AAV mają swoje ograniczenia. Jednym z nich jest ich niewielka pojemność (4,5 - 5,0 kb) oraz ryzyko szybkiej eliminacji na drodze odpowiedzi humoralnej pacjentów, szczególnie jeśli byli oni wcześniej eksponowani na ten rodzaj wirusa (Surace EM, 2008). Uważa się jednak, że ryzyko rozwinięcia odpowiedzi immunologicznej na obecność wektora AAV jest niezwykle niska w przypadku tak uprzywilejowanej immunologicznie tkanki jaką jest siatkówka (Moore NA et al., 2018).

Kolejnym zagadnieniem związanym z bezpieczeństwem okulistycznych terapii genowych jest genotoksyczność długoczasowej nadekspresji transgenów i wektorów wirusowych w oku. W kilku badaniach zaobserwowano rozwój opóźnionych odpowiedzi zapalnych po podaniu wektorów wirusowych (Bainbridge JW et al., 2008). W badaniu określającym bezpieczeństwo i skuteczność wektora AAV2/2 przenoszącego gen RPE65 do leczenia LCA, u 5 na 8 pacjentów wystąpił łagodny stan zapalny oka (Bainbridge JW et al., 2015). Istotne jest również określenie stadium zaawansowania choroby, w którym należałoby rozpocząć terapię genową. W zaawansowanych stadiach choroby, stopień zniszczeń strukturalnych może być już nieodwracalny, czyniąc wybraną terapię bezużyteczną. A zatem określenie optymalnego czasu rozpoczęcia leczenia jest kluczowe dla osiągnięcia sukcesu

terapeutycznego. Skuteczność i czas trwania efektu terapeutycznego to kolejne kluczowe kwestie związane z terapią genową w chorobach okulistycznych. Aby opracować realną, trwałą i bezpieczną metodę leczenia chorób okulistycznych, musi być osiągnięta skuteczna, stabilna, długoczasowa ekspresja określonego genu.

Droga podania wirusów również stanowi ważne zagadnienie (RYCINA 2). Podsiatkówkowa iniekcja, która pozwala na uwolnienie wektora do przestrzeni sąsiadującej bezpośrednio z fotoreceptorami i komórkami nabłonka siatkówki, wymaga wykonania witrektomii, niewielkiej retinotomii i miejscowego, krótkotrwałego odwarstwienia siatkówki w rejonie okołodołeczkowym, co może skutkować trwałym uszkodzeniem tkanki siatkówki (Bainbridge JW et al., 2008). Wirus skutecznie transfekuje fotoreceptory lub komórki nabłonka siatkówki, prowadząc do szybkiego uruchomienia procesów translacji i ekspresji pożądaných białek. Jednak iniekcja podsiatkówkowa to technicznie trudna i inwazyjna procedura. Budzi szczególne obawy w przypadku pacjentów z wrodzonymi dystrofiami siatkówki. U pacjentów z LCA2, włączonych do badań klinicznych, opisywano przypadki ścięczenia warstw siatkówki w dołeczku, otwory w plamce, odłączenie naczyniówki oraz hipotonię i wysokie IOP w gałce ocznej (Maguire AM et al., 2008).

Alternatywą dla inwazyjnej iniekcji podsiatkówkowej jest łatwa technicznie iniekcja doszklistkowa. Umożliwia ona szeroką dystrybucję wektora wirusowego na powierzchni siatkówki bez konieczności jej odwarstwiania. Uważa się jednak, że penetracja wirusa w strukturę siatkówki przy takim podaniu jest gorsza niż w przypadku iniekcji podsiatkówkowej (Yu-Wai-Man P, 2016). Większość serotypów AAV nie ulega też wystarczająco dobrej transdukcji. Wyjątek stanowią wektory AAV 2/2, AAV2/6 i AAV 2/8, których transdukcja jest ograniczona do komórek zwojowych, komórek Müllera i wewnętrznych warstw siatkówki (Trapani I et al., 2014).



RYCINA 2. Schemat podania iniekcji doszklistkowej (intravitreal) i podsiatkówkowej (subretinal) (A). Warstwy siatkówki: nabłonek barwnikowy (*ang. retinal pigment epithelium-RPE*), fotoreceptory (*ang. photoreceptors*), warstwa jądrzasta wewnętrzna (*ang. inner nuclear layer*), komórki zwojowe siatkówki (*ang. retinal ganglion cells*) oraz powierzchnia ciała szklanego (*ang. vitreous side*) (B).

Rycina pochodzi z pracy Trapani I i wsp. Gene Therapy of Inherited Retinal Degenerations: Prospects and Challenges. HUMAN GENE THERAPY 26:193–200 (April 2015)

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe pozostaje głównym, choć nie jedynym czynnikiem ryzyka rozwoju zmian jaskrowych. Dostępne terapie polegające na obniżaniu IOP nie zawsze zapobiegają postępującej śmierci komórek zwojowych i rozwojowi zmian jaskrowych prowadzących do ślepoty. Istnieje więc pilna potrzeba opracowania skutecznej metody neuroprotekcji, mogącej oddziaływać bezpośrednio na komórkowe szlaki metaboliczne decydujące o przeżyciu komórek zwojowych.

Stosowana we wczesnych próbach doświadczalnych suplementacja siatkówki egzogennym BDNF przyniosła obiecujące wyniki, wskazując jednocześnie, że czas działania egzogennej BDNF jest ograniczony i wymaga ponownych podań do uzyskania dłuższej niż tygodniowa neuroprotekcja (LaVail MM et al., 1992; Unoki K et al., 1994). Dlatego suplementacja czynnikami neurotroficznymi z użyciem transferu genów jest obiecującą strategią wspomagania przeżycia komórek zwojowych siatkówki, ponieważ przedłuża czas ich działania (Martin K et al., 2003). Wektory AAV2 są wykorzystywane już z powodzeniem w okulistyce (Garafalo AV et al., 2019). Wewnątrzgałkowe iniekcje wektorów z konstruktem genowym BDNF (AAV-BDNF) wydają się być atrakcyjną metodą długoterminowego podwyższania stężenia BDNF w siatkówce (Zhou XF et al., 2005).

Zakładając, że wzrost poziomu tego czynnika neurotroficznego będzie utrzymywał się przez kilka tygodni od momentu indukcji jaskry, postawiono hipotezę, że zaproponowane podejście może stanowić skuteczną metodę długotrwałej neuroprotekcji komórek zwojowych u chorych z jaskrą. Postanowiono również zweryfikować doniesienia o regulacji poziomu receptora TrkB w zależności od stężenia BDNF i blokadzie transportu wstecznego tego receptora przy podwyższonym ciśnieniu wewnątrzgałkowym (Pease ME et al., 2000, Quigley HA et al., 2000). Aktywny kompleks neurotrofyny i receptora jest transportowany aksonami komórek zwojowych w kierunku jej ciała (DiStefano PS et al. 1992, Huang EJ et al. 2001). Gdy ciśnienie wewnątrzgałkowe istotnie rośnie, transport ten ulega zahamowaniu. Ograniczony czasowo efekt terapeutyczny suplementacji samego BDNF może wynikać z istnienia mechanizmu sprzężenia zwrotnego pomiędzy BDNF a receptorem dla tej neurotrofyny. Suplementacja BDNF powoduje obniżenie ekspresji receptora TrkB (Di Polo A et al., 1998; Frank L et al., 1996), co potencjalnie może osłabiać działanie neuroprotekcjne omawianej neurotrofyny lub wymagać ponownych jej podań. Dzieje się tak w wielu chorobach neurologicznych, prawdopodobnie również w jaskrze, co może znacznie ograniczać efekt terapeutyczny nadekspresji BDNF (Sommerfeld M et al.,

2000, Osborne A et al., 2018). Wyniki licznych badań pokazały, że doszklistkowe iniekcje BDNF w postaci rekombinowanego białka (Domenici L et al., 2014) lub na drodze terapii genowej (Igarashi T et al., 2016) zmniejszają utratę komórek zwojowych siatkówki.

W niniejszej pracy postanowiono zbadać neuroprotektoryjny wpływ neurotrofiny BDNF na komórki zwojowe siatkówki. Wykorzystano do tego celu zwierzęcy model jaskry. Wzrost stężenia BDNFu w komórkach zwojowych siatkówki udało się osiągnąć dzięki wykorzystaniu wektorów wirusowych związanych z adenowirusami - AAV2 wykorzystywanych już z sukcesem w okulistyce – zapewniających długotrwały efekt terapeutyczny po jednokrotnym podaniu doszklistkowym.

Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy po jednokrotnej transfekcji doszklistkowej AAV2-BDNF, poprzedzającej o 3 tygodnie indukcję jaskry, można uzyskać: długotrwałą nadprodukcję BDNF, regulację poziomu receptora TrkB i efekt terapeutyczny w postaci zmniejszenia utraty komórek zwojowych. By odpowiedzieć na to pytanie, wyznaczono następujące cele cząstkowe:

- (1) ocena patofizjologicznych zmian w przebiegu jaskry na poziomie siatkówki
- (2) ocena modyfikacji mikrośrodowiska oka i jego zasobności w BDNF i receptor TrkB w warunkach podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego
- (3) ocena skuteczności transfekcji AAV2-BDNF i wpływu zmienionej zasobności siatkówki w BDNF na receptor TrkB w siatkówkach i korze wzrokowej bez jaskry i po wywołaniu jaskry
- (4) zbadanie efektywności wpływu podwyższonego poziomu BDNF na przeżywalność komórek zwojowych
- (5) ocena wpływu jednostronnie indukowanej jaskry na stężenie BDNFu i receptora TrkB w siatkówce oka towarzyszącego

3. MATERIAŁ I METODOLOGIA BADAŃ

Badania przeprowadzono w Pracowni Neurobiologii Widzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN, w Warszawie kierowanej przez prof. Wiolettę Waleszczyk. Laboratorium to jest wyposażone w niezbędny sprzęt potrzebny do wykonania barwień histologicznych, immunohistochemicznych oraz doświadczeń elektrofizjologicznych.

Zwierzęta

Doświadczenia przeprowadzono na 7-8 tygodniowych szczurach szczepu Wistar, o początkowej masie ciała 250-300g. Szczury utrzymywano w pomieszczeniu z kontrolowanym cyklem dobowym 12:12 godz. światło/ciemność, w temperaturze 21 - 23°C i wilgotności 50 – 60%. w autoklawowanych klatkach z materiałem gniazdowym. Pomieszczenie było wentylowane z szybkością 10-15 wymian powietrza na godzinę. Podłoga klatki była wypełniona ściółką firmy Lignocel ¾-S (Premium hygienic Animal Bedding).

Zwierzęta miały dostęp do wody i pożywienia *ad libitum*. Liczba zwierząt w klatce nie przekraczała 6 sztuk. Przed każdą procedurą zwierzęta umieszczano we wspólnej klatce (o rozmiarze 800 cm²), w której znajdowały się drewniane gryzaki, papierowe tunele oraz trociny. Po zabiegach zwierzęta były przenoszone ponownie do wspólnej klatki, żeby nie wprowadzać stresu związanego z oddzieleniem ich od stada. Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z obowiązującą dyrektywą Rady Wspólnoty Europejskiej (European Community Council Directive - 2010/63/UE) po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej nr 1 w Warszawie (nr zgody 625/2018). Podjęto wszelkie działania, aby ograniczyć cierpienie zwierząt.

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 doszklistkowym AAV2-BDNF n=13)

Schemat doświadczeń:

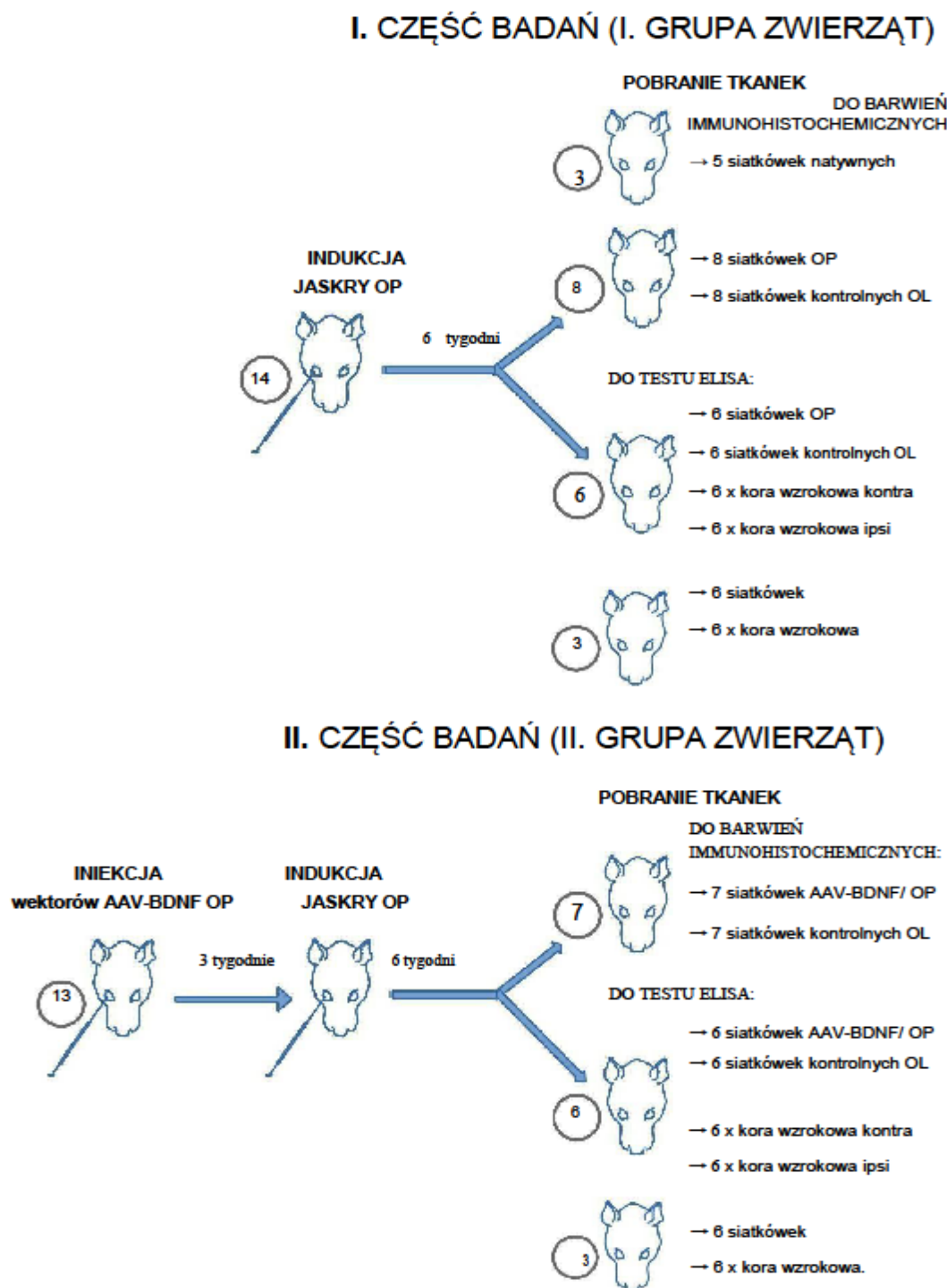
Badania podzielono na dwie części:

I. 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 zweryfikowania hipotezy o zmniejszeniu zasobności siatkówki w czynnik neurotroficzny BDNF oraz receptor TrkB i 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.

II. Druga część miała na celu oszacowanie efektywności terapii genowej z użyciem wektora wirusowego AAV, będącego nośnikiem sekwencji kodującej białko BDNF (wektor AAV2-BDNF). By ten cel uzyskać, przeprowadzono ocenę neuroprotekcyjnego wpływu podwyższonego poziomu BDNF w oku z wywołaną jaskrą, badając przeżywalność komórek zwojowych siatkówki. Ponadto zbadano, jak 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.

3.1. PROTOKÓŁ BADANIA

Schematyczny protokół badania został zaprezentowany na RYCINIE 3.



RYCINA 3. Schematyczny protokół badania

I. OCENA SKUTKÓW PODWYŻSZONEGO CIŚNIENIA
WEWNĄTRZGAŁKOWEGO (IOP) W WYNIKU INDUKCJI JASKRY NA
LICZBĘ KOMÓREK ZWOJOWYCH SIATKÓWKI ORAZ NA ZASOBNOŚĆ
SIATKÓWKI I KORY WZROKOWEJ W BDNF I RECEPTOR TrkB.

U 14 szczurów przeprowadzono procedurę indukcji jaskry. 6 dodatkowych szczurów stanowiło grupę kontrolną, która nie była poddawana żadnej procedurze doświadczalnej. 3 z tych zwierząt została przeznaczona do barwień immunohistochemicznych (n=5), a 3 pozostałe szczury zostały przeznaczone do badań ELISA (n=6)

Po 6 tygodniach od indukcji jaskry zwierzęta uśmiercano przez perfuzję transkardialną. Pozyskane od zwierząt tkanki wykorzystano do analiz dwojakiego rodzaju: (1) barwień immunohistochemicznych oraz (2) testów ELISA.

I GRUPA DOŚWIADCZALNA zwierząt (20 szczurów)

1. BARWIENIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE W CELU OSZACOWANIA LICZBY
KOMÓREK ZWOJOWYCH

○ przeprowadzone na siatkówkach z obu oczu pozyskanych od 8 zwierząt, u których wcześniej indukowano jednostronnie jaskrę (IOP)

→ siatkówki z oka prawego z indukowaną jaskrą (siatkówki OP, n = 8)

→ siatkówki z oka lewego tych samych zwierząt (siatkówki OL, n = 8)

○ oraz na siatkówkach z obu oczu pozyskanych od 3 zwierząt niepoddanych procedurom doświadczalnym (zwierzęta natywne)

→ kontrola natywna: siatkówki zwierząt natywnych (n = 5)

2. ELISA W CELU ILOŚCIOWEGO OSZACOWANIA BIAŁKA BDNF

- przeprowadzone na siatkówkach z obu oczu i z kory wzrokowej obu półkul pozyskanych od 6 zwierząt z jednostronnie indukowaną jaskrą

- siatkówki z oka prawego z indukowaną jaskrą (siatkówki OP, n = 6)

- siatkówki z oka lewego tych samych zwierząt (siatkówki OL, n = 6)

- kora wzrokowa ipsilateralna do siatkówki OP (kora ipsi, n = 6)

- kora wzrokowa kontralateralna do siatkówki OP (kora kontra, n = 6)

- oraz na siatkówkach z obu oczu i z kory wzrokowej obu półkul pozyskanych od 3 zwierząt niepoddanych procedurom doświadczalnym (zwierzęta natywne)

- siatkówki z obu oczu (siatkówki kontrolne, n = 6)

- kora wzrokowa z obu półkul (kora kontrolna, n = 6)

II. OCENA EFEKTU PODANIA WEKTORÓW AAV NIOSĄCYCH SEKWENCJĘ KODUJĄCĄ BIAŁKO BDNF (AAV2- BDNF) DO OKA Z INDUKOWANĄ JASKRĄ.

II GRUPA DOŚWIADCZALNA zwierząt (16 szczurów)

U 13 szczurów wykonano doszklistkową iniekcję wektorów AAV2-BDNF do jednego oka. Po trzech tygodniach od doszklistkowej iniekcji jednostronnie, w tym samym oku indukowano jaskrę. Po 6 tygodniach od wywołania jaskry od szczurów pozyskiwane były tkanki do analiz analogicznych do wykonanych w ramach I. części badań.

1. BARWIENIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE W CELU OSZACOWANIA LICZBY KOMÓREK ZWOJOWYCH (7 szczurów)

- przeprowadzone na siatkówkach z obu oczu pozyskanych od 7 zwierząt z jednostronnie indukowaną jaskrą po podaniu do tego samego oka wektora AAV-BDNF

→ siatkówki z oka prawego z indukowaną jaskrą, po wcześniejszej iniekcji doszklistkowej wektorów AAV-BDNF (siatkówki OP/ AAV-BDNF, n = 7)

→ siatkówki z oka lewego tych samych zwierząt (siatkówki OL, n = 7)

2. ELISA W CELU ILOŚCIOWEGO OSZACOWANIA BIAŁKA BDNF

Materiał stanowiły siatkówki oraz kora wzrokowa, z których przygotowano homogenaty do pozyskania frakcji S1 użytych do ELISA

- przeprowadzone na siatkówkach z obu oczu i z kory wzrokowej obu półkul pozyskanych od 6 zwierząt z jednostronnie indukowaną jaskrą, po wcześniejszym podaniu do tego samego oka wektorów AAV-BDNF

→ siatkówki z oka prawego z indukowaną jaskrą, po doszklistkowej iniekcji wektora AAV-BDNF (siatkówki OP/ AAV-BDNF, n = 6)

→ siatkówki z oka lewego tych samych zwierząt (siatkówki OL, n = 6)

→ kora wzrokowa ipsilateralna do siatkówki prawego z indukowaną jaskrą w OP/ AAV-BDNF (kora ipsi, n = 6)

→ kora wzrokowa kontralateralna do siatkówki prawego z indukowaną jaskrą/ AAV-BDNF

(kora kontra, n = 6)

- oraz na siatkówkach z obu oczu i z kory wzrokowej obu półkul pozyskanych od 3 zwierząt niepoddanych procedurom doświadczalnym (zwierzęta natywne)

→ siatkówki z obu oczu (siatkówki kontrolne, n = 6)

→ kora wzrokowa z obu półkul (kora kontrolna, n = 6)

3.2. PROCEDURY EKSPERYMENTALNE

3.2.1. WYWOŁANIE JASKRY

Jednostronny model jaskry, wykorzystany w niniejszej pracy, został zmodyfikowany i opisany przez zespół badaczy z Uniwersytetu Medycznego w Katowicach pod kierownictwem profesor Joanny Lewin- Kowalik (Smęadowski A et al., 2014). Niniejszy model jaskry z wykorzystaniem polistyrenowych mikrogranulek po raz pierwszy został opisany przez Urcola i wsp. w 2006 roku (Urcola JH et al., 2006).

Wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego uzyskiwano przez szybkie podanie do komory przedniej oka szczura polistyrenowych granulek o średnicy 10,0 μm i 6,0 μm (Polybead Microspheres, Polysciences, Warrington, PA, US), (ZDJĘCIE 1) oraz wiskoelastyku przez szklaną kapilarę. Granulki podawano w celu mechanicznego blokowania beleczkowania w kącie przesączania, co miało ograniczać swobodny przepływ cieczy wodnistej i wywołać wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego, a w jego następstwie rozwój zmian jaskrowych. Mniejsze granulki, podawane w pierwszej kolejności, zapewniały skuteczną blokadę beleczkowania w kącie przesączania oka. Obecność większych granulek zapewniała utrzymywanie się podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego w dłuższym okresie czasu. Z kolei wiskoelastyk (1,6% hialuronian sodu, Amvisc PLUS, Bausch& Lomb, US) stosowano w celu ograniczenia wypływu wstecznego granulek po wyjęciu z komory przedniej kapilary, używanej do ich wprowadzenia.



ZDJĘCIE 1. Polistyrenowe granulki o średnicy 10,0 i 6,0 μm , w kolorze niebieskim i białym.

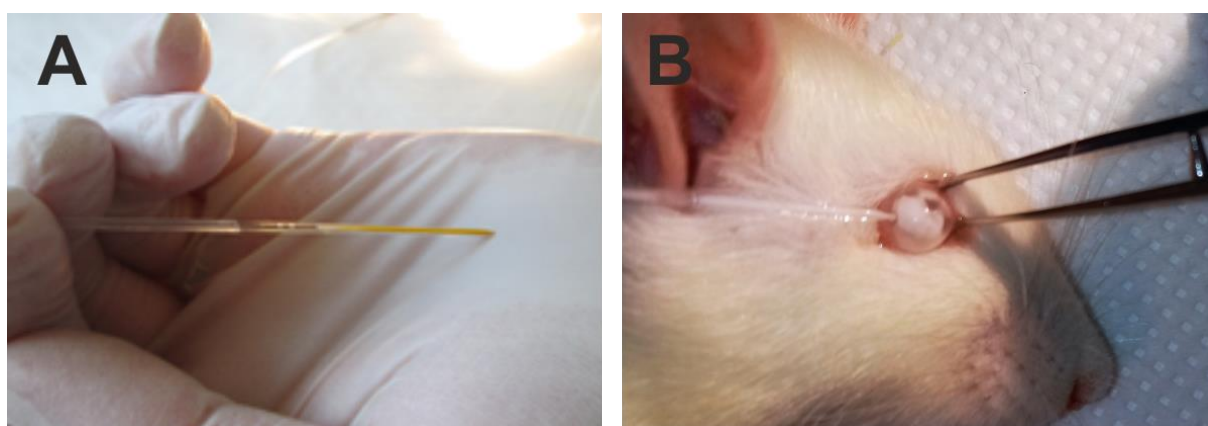
Każdorazowo, granulki polistyrenowe przygotowywano i sterylizowano przed podaniem do komory przedniej oka. Granulki obu średnic były umieszczane w oddzielnych probówkach Eppendorfa (obj. 0,5 ml), a następnie wirowano do opadnięcia na dno zawiesiny granulek. Płyn znajdujący się powyżej granulek odciągano i wymieniano na 100% etanol, w celu uzyskania sterylności. Zawartość probówek ponownie worteksowano i wirowano. Etanol odciągano, wymieniano na roztwór PBS + 0,5% Triton i ponownie worteksowano. Probówki następnie umieszczano w kąpeli wodnej o temperaturze 65° C na 2 godziny i od czasu do czasu wstrząsano w celu uniknięcia tworzenia się osadu ze zbitych granulek. Po dwóch godzinach, zawartość probówek ponownie wirowano. Po wymianie na PBS zawartość probówek trzykrotnie worteksowano i wirowano. Po zwirowaniu, osadzone granulki były gotowe do iniekcji u szczurów. Do wykonania iniekcji granulki aspirowano z dna probówki do szklanej kapilary o średnicy około 0,8 mm. Kapilarę napełniano kolejno: 5 μl wiskoelastyku, 5 μl granulek o średnicy 10,0 μm oraz 5 μl granulek o średnicy 6,0 μm . Szklana kapilara była łączona z gumową rurką wypełnioną olejkim immersyjnym o niskiej lepkości (Cargille Laboratories, Cedar Grove, NJ, US), co zapobiegało dostawianiu się pęcherzyków powietrza i ułatwiało prawidłowe podanie całej zawiesiny do oka.

W celu przeprowadzenia iniekcji granulek do komory przedniej szczurzego oka, zwierzęta były usypiane poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy (75 mg/kg m.c.) wraz z medetomidyną (0,5 mg/kg m.c.) Do worka spojówkowego podawane były krople miejscowo znieczulające- preparat Alcainy (Alcon, Fort Worth, TX, US) (*ang. proxymetacaine hydrochloride*).

Procedura indukcji jaskry wymagała pewnej wprawy. Szczególnie istotne było szybkie podanie zawiesiny granulek polistyrenowych wraz z wiskoelastykiem. Szybkie podanie zapewnia

bowiem lepszą dystrybucję granulek w obręb beleczkowania i skuteczniejszą blokadę kąta przesączania, niż ma to miejsce przy powolnym podaniu, gdy zawiesina granulek gromadzi się w centrum komory przedniej oka. Szklana kapilara powinna być wprowadzona do komory przedniej pod kątem ok. 45 stopni. Wprowadzanie szklanej kapilary do komory przedniej pod zbyt małym kątem (zbyt płasko) zwiększa ryzyko śród-rogówkowego podania zawiesiny. Z kolei przy zbyt stromym podaniu rośnie ryzyko uszkodzenia soczewki.

Przykład tej procedury przedstawiono na ZDJĘCIU 2.



ZDJĘCIE 2. Ilustracja etapów zabiegu dogławkowego wprowadzania granulek. Szklana kapilara wypełniona zawiesiną wiskoelastyku i polistyrenowych granulek o żółtym zabarwieniu (A). Przednia komora oka szczura w całości wypełniona polistyrenowymi granulami (B)

3.2.2. *MONITOROWANIE CIŚNIENIA WEWNĄTRZGAŁKOWEGO*

Pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego był zasadniczym elementem monitorowania jaskry. Pomiar wykonywano raz w tygodniu, obuocznie, tonometrem przeznaczonym dla gryzoni (Icare, TonoLab Wet; Colonial Medical Supply, Espoo, Finland). Oprogramowanie tonometru obejmuje eliminację wartości najwyższych i najniższych oraz prezentację wartości uśrednionej z pięciu pomiarów.

3.2.3. *TRANSKARDIALNA PERFUZJA ZWIERZĄT*

Perfuzja transkardialna była wykonywana po 6 tygodniach od indukcji podwyższonego ciśnienia. Zwierzęta otrzymywały letalną dawkę morbitalu (pentobarbital 80 mg/kd m.c). Zanik odruchu rogówkowego wyznaczał czas przystąpienia do perfuzji. W celu usunięcia krwi perfuzja prowadzona była schłodzonym (temperatura ok 5-6 °C) roztworem soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (*ang. phosphate buffered saline*, PBS) z dodatkiem heparyny. Wskaźnikiem odpowiedniego oczyszczenia tkanek z krwi była zmiana zabarwienia wątroby. Na tym etapie następował koniec perfuzji u zwierząt, od których pozyskiwane tkanki były wykorzystane do testu ELISA. Wyizolowane gałki oczne oraz mózgi umieszczano w zimnym PBS. Po ich schłodzeniu, natychmiast wypreparowano siatkówki i korę wzrokową, a po ich przeniesieniu do probówek, zamrażano je w -80°C. U zwierząt, od których pozyskiwano materiał do barwień immunohistochemicznych, w celu utrwalenia tkanki siatkówek perfuzję kontynuowano z użyciem schłodzonego (temp. ok 5-6 °C) paraformaldehydu (PFA, 4% w PBS, ok. 150 ml na zwierzę). Po perfuzji, wyizolowane gałki oczne przetrzymywano przez kilka godzin w probówkach wypełnionych paraformaldehydem, umieszczonych w lodzie. Następnie całe gałki oczne były kilkakrotnie przepłukiwane w PBS i tego samego dnia preparowane w celu wyizolowania siatkówek. Wypreparowane siatkówki były nacinane w 4 miejscach, aby ułatwić ich późniejsze płaskie rozłożenie na szkiełku podstawowym. Nacięcia wykonywane były w taki sposób, aby uzyskać cztery segmenty siatkówki: górny, dolny, skroniowy i nosowy. Po wykonaniu nacięć siatkówki były umieszczane w dołkach na płytce pleksiglasowej wypełnionych PBS i przetrzymywane w lodówce przez 24 h. W tym czasie PBS, w którym zanurzone były siatkówki był 3-krotnie wymieniany.

3.2.4. *BARWIENIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE SIATKÓWEK*

Po 24 godzinach przechowywania w lodówce siatkówek wypreparowanych po perfuzji zwierząt, rozpoczynano proces pozbywania się autofluorescencji (*ang. quenching*) tkanki poprzez płukanie siatkówek w roztworze 100mM glicyny (na wytrząsarce, temp. pokojowa, 45 minut). W celu późniejszego usunięcia glicyny, siatkówki 3-krotnie przepłukiwano roztworem PBS.

Następnie, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, inkubowano preparaty siatkówki w 20 % roztworze normalnej surowicy koziej (*ang. normal goat serum- NGS*) z dodatkiem 0,5% Tritonu X-100 (45 minut bez wytrząsania).

Kolejnym etapem była 24 godzinna inkubacja z przeciwciałem I rzędowym skierowanym przeciwko białku BRN3a, które występuje specyficznie w komórkach zwojowych siatkówki. Mysie przeciwciało monoklonalne IgG anty- BRN3a (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) stosowano w rozcieńczeniu 1:200 w roztworze składającym się z 1 części roztworu blokującego i 4 części PBS).

Do znakowania komórek zwojowych wybrano czynnik BRN3a, który jest wiarygodnym markerem dla tych komórek siatkówki (Johnson T et al., 2008, Ficarrota KR et al., 2020).

Po 24 godzinnej inkubacji z przeciwciałem I- rzędowym, siatkówki 3-krotnie przepłukano w PBS i rozpoczęto 2-godziną inkubację z przeciwciałem II-rzędowym, połączonym ze znacznikiem fluorescencyjnym, skierowanym przeciwko antygenom mysim. Po przyłączeniu się przeciwciała II-rzędowego do antygenów mysich niesionych przez przeciwciało I-rzędowe, które połączyło się z białkiem BRN3a w komórkach zwojowych siatkówki, możliwa staje się detekcja tych komórek pod mikroskopem fluorescencyjnym. Jako II-rzędowe przeciwciało zastosowane zostały kozie przeciwciała IgG anty-mysie (*ang. IgG goat anti-mouse Alexa fluor 555*, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) w rozcieńczeniu 1:300 w roztworze składającym się z 1 części roztworu blokującego i 4 części PBS w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce. Po inkubacji z II-rzędowym przeciwciałem, siatkówki ponownie jednorazowo przepłukano PBS. Wykonane zostało również znakowanie jąder komórkowych. W tym celu siatkówki zanurzane były w roztworze 4', 6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI, 5mg/ 250 ml) na czas 15 minut. Ostatnim etapem barwień było 6-godzinne płukanie wszystkich siatkówek w PBS w lodówce, na wytrząsarce.

Siatkówki, po przełożeniu na szkiełka podstawowe, pokrywane były medium utrzymującym fluorescencję tkanki (Vectashield antifade, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA). Preparaty zabezpieczano szkiełkami nakrywkowymi.

3.2.5. OBLICZANIE LICZBY KOMÓREK ZWOJOWYCH SIATKÓWKI

Preparaty siatkówek oglądano i fotografowano korzystając ze spinningowego mikroskopu konfokalnego Zeiss Spinning Disc (Carl Zeiss, Jena, Germany), w powiększeniu 10-krotnym (fotografowano całą siatkówkę) i 20-krotnym (fotografowano poszczególne fragmenty siatkówek).

Aby przeprowadzić ilościową ocenę immunopozytywnych komórek zwojowych siatkówki w różnych kwadrantach tkanki, siatkówkę podzielono na część obwodową (część siatkówki znajdująca się około 2,5-3 mm od tarczy nerwu wzrokowego) oraz część centralną (w okolicy 1 mm od tarczy nerwu wzrokowego). Komórki zwojowe siatkówki znakowane BRN3a zostały policzone w algorytmie użytym w oprogramowaniu ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD). Zdjęcia wykonywano w formie zdjęć warstwowych (tj. Z – stacków) składający się z 4-10 optycznych warstw, a podczas liczenia komórek zdjęcia te były nakładane tworząc projekcję i montaż pojedynczego zdjęcia o maksymalnej intensywności (*ang. maximum-intensity Z-projection*). Program liczył komórki o określonej wielkości pól 20-200 μm^2 co pozwalało na policzenie wszystkich komórek zwojowych o różnych wielkościach ciała komórki (Fukuda Y, 1977) we wszystkich 4 kwadrantach w części centralnej i obwodowej. Komórki liczono w obrębie kwadratów o powierzchni 300 μm^2 x 300 μm^2 (16-64 pól na siatkówkę, całkowita powierzchnia 1,44 - 5,76 mm^2) a ich gęstość przeliczono na obszar 1 mm^2 .

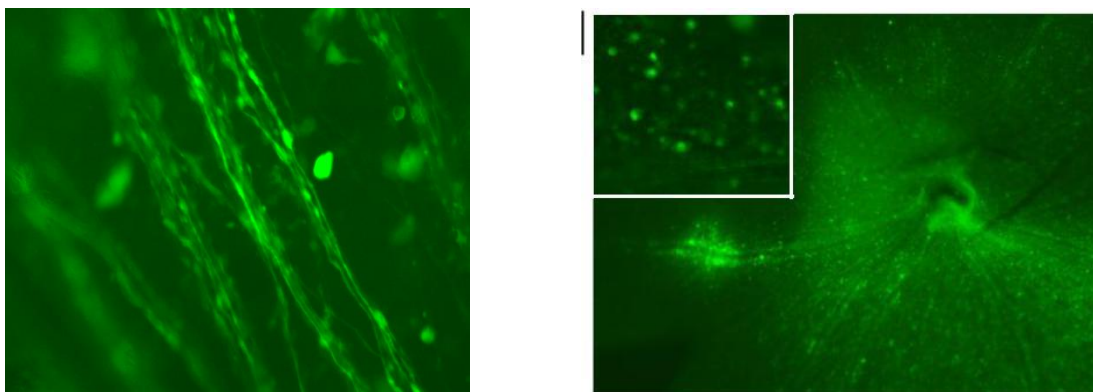
Konfokalny mikroskop wielowiązkowy (ZDJĘCIE 3), dzięki zastosowaniu systemu dwóch wirujących dysków umożliwia szybką (do 60 klatek na sekundę) obserwację fluorescencji obiektów biologicznych. System posiada dwie czułe kamery EMCCD, co zapewnia znacznie niższą inwazyjność obrazowania w stosunku do klasycznych mikroskopów fluorescencyjnych. Jest wyposażony w cztery lasery diodowe, o długościach fal 405 nm, 488 nm, 561 nm i 639 nm. Mikroskop ten idealnie nadaje się do długotrwałego obrazowania delikatnego materiału biologicznego.



ZDJĘCIE 3. Mikroskop konfokalny z wirującym dyskiem- Zeiss Spinning Disc

3.2.6. *BADANIA PILOTAŻOWE ZASIĘGU TRANSFEKCJI WYBRANEGO WEKTORA AAV*

Zanim podjęta została decyzja o budowie wektora, upewniono się o możliwości uzyskania ekspresji białka eGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein* - białko wzmocnionej zielonej fluorescencji) znakując komórki neuronalne siatkówki. Ocenę przeprowadzono po 21 dniach od pojedynczej iniekcji doszkliskowej wektora transdukcyjnego pAAV2-CMV-eGFP o objętości 2 μ l (miano 10^{13} GC/ml). Wynik tego pilotażowego testu przedstawiono na poniższych zdjęciach (ZDJĘCIE 4).



ZDJĘCIE 4. Ekspresja eGFP w siatkówce po 21 dniach od pojedynczej iniekcji doszkliskowej wektora pAAV2-CMV-eGFP. Wyniki badania pilotażowego z zastosowaniem 2 μ l wektora transdukcyjnego (miano 10^{13} GC/ml). Fotografia po lewej: ogólny rozkład transfekowanych komórek i włókien (zielona fluorescencja) w wypreparowanej siatkówce. Podłużne profile ułożone promieniście oznaczają naczynia krwionośne (nieoznaczone). Zdjęcie po prawej z wstawką: pole z wyznakowanymi komórkami i włóknami w powiększeniu.

3.2.7. DOSZKLISTKOWE PODANIE WEKTORÓW AAV Z BDNF

Iniekcję doszkliskową wektorów AAV-BDNF wykonywano w czasie 3 tygodni przed indukcją jaskry. Taki czas podawania wektorów wybrano na podstawie danych z piśmiennictwa na temat dynamiki ekspresji egzogennych genów niesionych przez wektory AAV, wskazujących, że stabilna ekspresja uzyskiwana jest po około 2 tygodniowym czasie od iniekcji wektora do tkanki (Fisher KJ, et al., 1996).

Do niniejszych badań, użyto konstruktu AAV-BDNF (pAAV2 [Exp] CMV> hBDNF [NM_001143810.1]: WPRE) firmy VectorBuilder (VectorBuilder Inc., Chicago, IL, USA), specjalizującej się w tworzeniu konstruktów wektorów wirusowych (ZDJĘCIE 5).



ZDJĘCIE 5. Wektory wirusowe zamrożone w temp -80°C

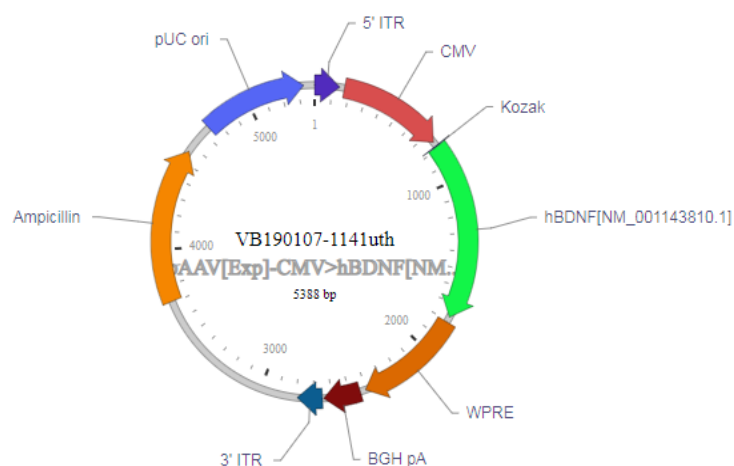
Konstrukt wektora zastosowanego do niniejszych badań zawierał gen ludzkiego BDNF (NM_001143810.1) oraz post-transkrypcyjny element regulacyjny (*ang. woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element* - WPRE). Obecność WPRE zwiększa liczbę jednostek infekcyjnych przypadających na wszystkie jednostki wektora AAV (dzieje się to w trakcie produkcji wektorów, a nie w trakcie samej infekcji). W ten sposób WPRE przyczynia się do zwiększenia poziomu ekspresji niesionej sekwencji, zwiększa translację białka wirusa i stabilność wirusa (Patricio M et.al, 2017). Do opisywanych doświadczeń wybrano również promotor CMV (*ang. Human cytomegalovirus*), który jest silnym promotorem, istotnie zwiększającym ekspresję transgenów. Promotor CMV wspomaga wczesną transkrypcję wirusa. Uznaje się, że jest to jeden z najsilniejszych przeanalizowanych dotychczas promotorów, co czyni z niego bardzo użyteczny element wektorów wirusowych (Boshart M et al., 1985). W trakcie procedury podań doszkliskowych zwierzęta należące do II. GRUPY DOŚWIADCZALNEJ były usypiane poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy (75 mg/kg m.c.) wraz z medetomidyną (0,5 mg/kg m.c.). Do worka spojówkowego podawane były krople miejscowo znieczulające - preparat Alcainy (*ang. proxymetacaine hydrochloride*). Iniekcje wektora AAV-BDNF do komory ciała szklanego w miejscu pars plana oka wykonywane były manualnie za pomocą igły 22G i 10 µl strzykawki Hamiltonówki pod kontrolą wzroku przez binokular (ZDJĘCIE 6). Wektor AAV-BDNF o mianie 10^{13} GC/ml i objętości 2 µl podawany był przez *pars plana* przez tego samego chirurga. W TABELI 1 przedstawiono opis poszczególnych składowych konstruktu AAV2-BDNF wraz z ich funkcją.



ZDJĘCIE 6. Strzykawka i igła Hamiltonówka o objętości 10 µl.

<https://en.vectorbuilder.com/vector/VB190107-1141uth.html>

(budowa konstruktu - RYCINA 4)



RYCINA 4. Budowa konstruktu wektora pAAV2 [Exp] CMV> hBDNF [NM_001143810.1]:WPRE

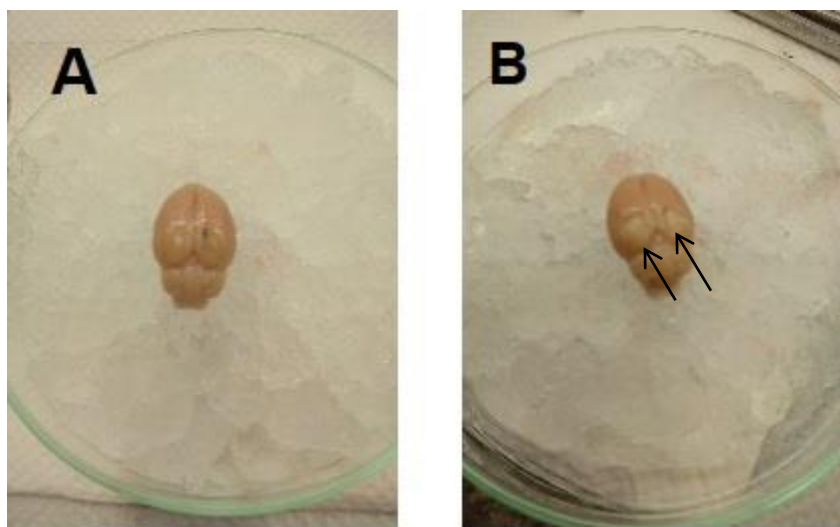
TABELA.1 Opis poszczególnych składowych konstruktu AAV2-BDNF wraz z ich funkcją.

Vector Components					
Name	Position	Size (bp)	Type	Description	Application notes
5' ITR	■ 1-141	141	ITR	AAV 5' inverted terminal repeat (functional equivalent of wild-type 5' ITR)	Allows replication of the viral genome and its packaging into virus.
CMV	■ 169-757	589	Promoter	Human cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter	Strong promoter; may have variable strength in some cell types.
Kozak	■ 782-787	6	Miscellaneous	Kozak translation initiation sequence	Facilitates translation initiation of ATG start codon downstream of the Kozak sequence.
hBDNF[NM_001143810.1]	■ 788-1777	990	ORF	None	None
WPRE	■ 1808-2405	598	Miscellaneous	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element	Enhances virus stability in packaging cells, leading to higher titer of packaged virus; enhances higher expression of transgenes.
BGH pA	■ 2436-2643	208	PolyA_signal	Bovine growth hormone polyadenylation signal	Allows transcription termination and polyadenylation of mRNA transcribed by Pol II RNA polymerase.
3' ITR	■ 2651-2791	141	ITR	AAV 3' inverted terminal repeat	Allows replication of the viral genome and its packaging into virus.
Ampicillin	■ 3708-4568	861	ORF	Ampicillin resistance gene	Allows E. coli to be resistant to ampicillin.
pUC ori	■ 4739-5327	589	Rep_origin	pUC origin of replication	Facilitates plasmid replication in E. coli; regulates high-copy plasmid number (500-700).

3.2.8. ANALIZA ILOŚCIOWA BIAŁKA BDNF I RECEPTORA TrkB W TKANCE SIATKÓWKI I WZROKOWEJ KORZE MÓZGOWEJ – TESTY ELISA

Oznaczenia stężeń BDNF i receptora TrkB oraz analizę danych wykonano w Zespole Neurobiologii Naprawczej IBD PAN ¹.

Po upływie sześciu tygodni od indukcji jaskry w obu grupach (w II GRUPIE DOŚWIADCZALNEJ - trzy tygodnie przed indukcją jaskry podawano doszkliskowo wektor AAV2-BDNF) szczury zostały uśpione letalną dawką morbitalu dootrzewnowo (pentobarbital 80 mg/kg). Przeprowadzono perfuzję transkardialną zimnym PBS. Obie gałki oczne każdego zwierzęcia i mózg zostały usunięte i umieszczone na lodzie. Siatkówki prawego i lewego oka oraz prawa i lewa kora wzrokowa zostały wypreparowane na suchym lodzie (ZDJĘCIE 7). Wypreparowane tkanki zostały umieszone w probówkach i zamrożone w -80°C, a następnie zostały poddane testom ELISA.



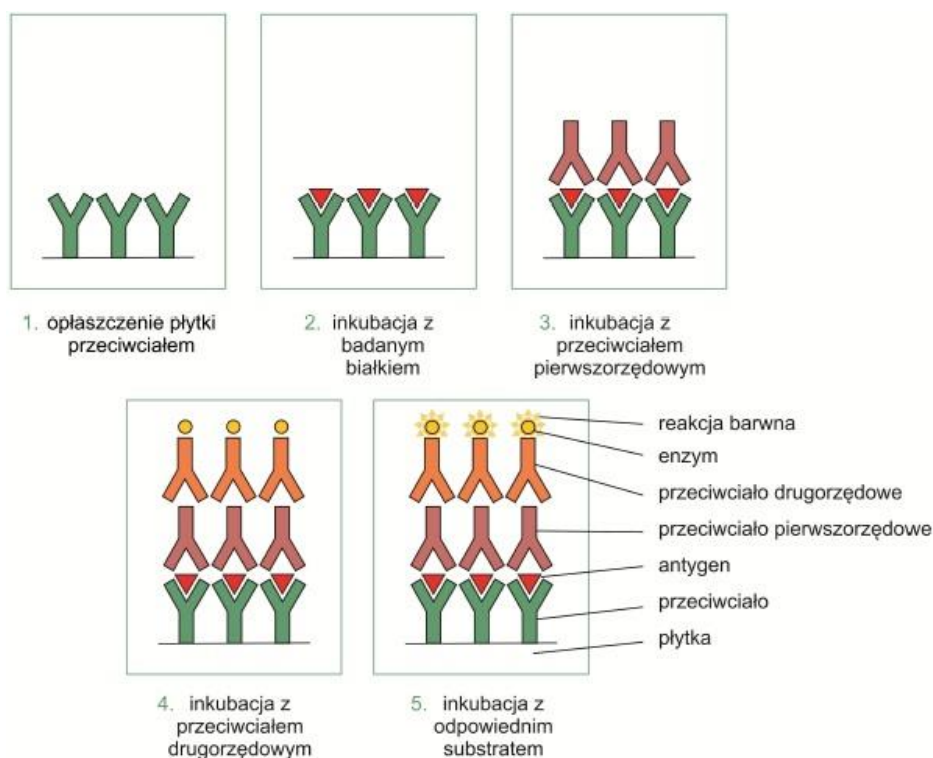
ZDJĘCIE 7. Szczurzy mózg przed usunięciem kory wzrokowej (A) i po usunięciu prawej i lewej kory wzrokowej (strzałki) (B).

Przygotowanie homogenatów do testów ELISA na BDNF i TrkB

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny to jeden z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach biomedycznych, zarówno naukowych, jak i

¹ Dr. Olga Gajewska- Woźniak i Prof. Małgorzata Skup

diagnostycznych. Służy on do wykrycia określonych białek i określenia ich stężeń w badanym materiale z użyciem przeciwciał skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Testy Sandwich ELISA zastosowane do tej części badania, to testy podwójnego wiązania. Ten rodzaj testu immunoenzymatycznego służy do określania stężenia danego białka w badanej próbce. Angielska nazwa tej metody – *sandwich ELISA*, czyli „kanapkowa ELISA” – bierze się stąd, że antygen wiązany jest pomiędzy dwiema warstwami przeciwciał. Test ELISA jest także metodą kolorymetryczną. Stosując spektrofotometr, można precyzyjnie określić natężenie barwy po określonym czasie trwania reakcji, dzięki czemu można również określić stężenie białka w materiale użytym do badań. Cały proces reakcji zobrazowano na RYCINIE 5.



RYCINA 5. ELISA- test podwójnego wiązania „kanapkowy”. Rycina pochodzi ze strony e-biotechnologia.pl

Aby określić poziom białka BDNF w teście *ChemiKineTM BDNF Sandwich ELISA Kit* (Millipore, Billerica, MA, USA) (RYCINA 6) postępowano zgodnie w instrukcją producenta. Tkanki zostały poddane homogenizacji na lodzie w 20 objętościach buforu do homogenizacji za pomocą mechanicznego homogenizatora IKA. Bufor do homogenizacji składał się z 100 mM Tris buffer pH 7.0, 2% BSA, 1M NaCl, 2% Triton X-100 oraz Complete Protease Inhibitor Cocktail, 200 μ M phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich) i 157 μ g/mL

benzamidine hydrochloride (Serva, Heidelberg, Germany). Do homogenizacji tkanek został użyty rozdrabniacz tkanek IKA Ultraturrax. Homogenaty inkubowano przez 30-60 minut a następnie wirowano wirówką $15\,000 \times g$ przez 30 min w temp. 4°C . Testy ELISA wykonano na supernatantach rozcieńczonych 50-krotnie, zgodnie z instrukcją producenta. Wszystkie próbki badano w dwóch powtórzeniach. Te same supernatanty użyto również do testów TrkB ELISA. Całkowity poziom białka zmierzono metodą Bradforda.

Do testów TrkB ELISA użyto płytek *Rat NTRK2/TRKB Sandwich ELISA Kit* (LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA) i homogenatów tkanek użytych do wcześniejszych testów BDNF ELISA, przechowywanych w temperaturze -18°C . Próbki zostały rozmrożone, ponownie zhomogenizowane i zwirowane $2\,000 \times g$ przez 10 min w temp. 4°C . Testy ELISA przeprowadzono na supernatantach rozcieńczonych 10- krotnie, zgodnie z instrukcją producenta. Wszystkie próbki badano w dwóch powtórzeniach.



RYCINA 6. Zestaw ChemiKine™ BDNF Sandwich ELISA służący do detekcji ludzkiego i szczurzego BDNF

Analiza białka

Stężenie białka w badanych próbkach oceniono za pomocą zmodyfikowanej metody Bradforda z wykorzystaniem albumin surowicy bydlęcej i Biospectrometru Eppendorf, Hamburg, Germany). W TABELI 2 przedstawiono gotowe zestawy odczynników do reakcji ELISA, zaś w TABELI 3 przedstawiono roztwory wykorzystane do technik do ELISA.

Wykaz odczynników użytych do reakcji ELISA

TABELA 2. Gotowe zestawy odczynników do reakcji ELISA

Zestaw odczynników	Zastosowanie	Producent
ChemiKine™ BDNF Sandwich ELISA Kit	Pomiar stężenia BDNF	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
TrkB ELISA użyto płytek Rat NTRK2/TRKB Sandwich ELISA Kit	Pomiar stężenia receptora TrkB	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Składnik buforów	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Complete ULTRA	Zestaw inhibitorów proteaz	Roche Applied Science, Penzberg, Niemcy
PhosSTOP	Zestaw inhibitorów fosfataz	Roche Applied Science, Penzberg, Niemcy

TABELA 3. Roztwory wykorzystane do technik do ELISA

Roztwór	Skład
Roztwór do homogenizowania próbek tkankowych przeznaczonych do oznaczenia BDNF i TrkB (ELISA)	100 mM Tris-HCl, pH 7,0 2% BSA 1 M NaCl 2% Triton X-100 Inhibitory: Complete™ Protease Inhibitor Cocktail 200 µM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich) 157 µg/mL benzamidine hydrochloride (Serva, Heidelberg, Germany)
Odczynnik Bradforda A (oznaczanie stężenia białek)	100 ml 95% etanolu 200 ml 88% kwasu ortofosforowego 350 mg Serva Blue G
Roztwór roboczy Bradforda B (oznaczanie stężenia białek)	425 ml dH ₂ O 15 ml 95% etanolu 30 ml 88% kwasu ortofosforowego 30 ml Odczynnika Bradforda A

Homogenizacja i frakcjonowanie materiału do oznaczeń białkowych

Próbki tkankowe homogenizowano z użyciem mechanicznego homogenizatora (IKA-Werke GmbH, Staufen, Niemcy) (ZDJĘCIE 8) w 20 objętościach buforu do ekstrakcji przez ok. minutę. Po około 30 minutach inkubacji probówek w lodzie, homogenaty wirowano (15 min, 4°C, 15 000 x g). Supernatant posłużył do oznaczenia zawartości BDNF, TrkB i całkowitego białka.



ZDJĘCIE 8. Mechaniczny homogenizator IKA-Werke GmbH, Staufen, Niemcy

Pomiar stężenia BDNF metodą ELISA

Stężenie BDNF w siatkówkach i w korze wzrokowej oznaczano z wykorzystaniem dostępnego komercyjnie zestawu ELISA, zgodnie z zaleceniami producenta. Oznaczenia przeprowadzano w supernatantach, uzyskanych w dniu ekstrakcji. Przygotowano krzywą standardową w zakresie stężeń BDNF 500 – 7,81 pg/ml. W celu dobrania właściwego rozcieńczenia prób wykonano pomiar w dwóch powtórzeniach każdego z trzech rozcieńczeń próbek. W doświadczeniu głównym pomiaru stężenia BDNF dokonywano przy rozcieńczeniu 50x w dwóch powtórzeniach.

Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie z użyciem czytnika płytek Sunrise (Tecan Trading AG, Mannedorf, Szwajcaria) przy długości fali 450 nm. Na każdej płytce wykorzystanej w eksperymencie znajdował się zestaw rozcieńczeń białka standardowego do wyznaczenia krzywych standardowych. Pomiar korygowany był o wartość absorbancji próby ślepej oraz o wartość absorbancji uzyskanej dla fali o długości 570 nm, której źródłem jest materiał, z którego wykonana jest płytka. Wyniki pomiarów krzywej standardowej dla BDNF zostały poddane analizie regresji. Wartość współczynnika determinacji R^2 – jednej z miar jakości dopasowania

modelu do danych wynosiła $\geq 0,99$. Uzyskany podczas analizy regresji współczynnik x posłużył do odczytu zawartości BDNF w próbkach doświadczalnych.

Pomiar stężenia TrkB metodą ELISA

Stężenie TrkB w siatkówkach i w korze wzrokowej oznaczano z wykorzystaniem dostępnego komercyjnie zestawu ELISA, zgodnie z zaleceniami producenta. Oznaczenia przeprowadzano w supernatantach, uzyskanych do oznaczenia BDNF w dniu ekstrakcji lub w kilka dni później. Przygotowano krzywą standardową w zakresie stężeń TrkB 6000 – 94 pg/ml. W celu dobrania właściwego rozcieńczenia prób wykonano pomiar w dwóch powtórzeniach każdego z trzech rozcieńczeń próbki. W doświadczeniu głównym pomiaru stężenia TrkB dokonywano przy rozcieńczeniu 10x w dwóch powtórzeniach.

Absorbancję mierzono analogicznie jak w oznaczeniu BDNF. Wyniki pomiarów krzywej standardowej dla TrkB zostały poddane zalecanej przez producenta analizie: Non-linear Curve Models: 4-Parameter Logistic (4PL) przez program on line (<https://www.mycurvefit.com/>). Wartość współczynnika determinacji R^2 wynosiła $\geq 0,99$. Uzyskane podczas analizy regresji współczynnik x posłużył do odczytu zawartości TrkB w próbkach doświadczalnych.

Oznaczanie stężenia całkowitego białka metodą Bradford

Stężenie całkowitego białka w supernatantach homogenatów tkankowych oznaczano metodą Bradford. Oznaczenie przeprowadzano w kuwetach. Pomiar białka wykonano postępując według protokołu:

Przygotowano wodne roztwory BSA (w stężeniach: 1,25; 2,5; 5; 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$) do wyznaczenia krzywej standardowej.

Przygotowano dwa rozcieńczenia próbek doświadczalnych w wodzie (50x i 200x).

Do dwóch próbek pobierano po 100 μl rozcieńczonych prób.

Do każdej próbki dodawano po 1 ml roztworu roboczego Bradforda.

Po upływie 5 minut, spektrofotometrycznie mierzono absorbancję prób, przy długości fali 595 nm, z użyciem czytnika Spektrofotometr BioPhotometer Typ 6131 (cat no 6135000009; Eppendorf, Hamburg, Niemcy)

Przygotowano krzywe standardowe i obliczono współczynnik regresji w celu określenia liniowości krzywej. Wyniki pomiarów próbek doświadczalnych porównywano z wartościami z krzywej standardowej i uwzględniając rozcieńczenie prób obliczano całkowitą zawartość białka.

4. WYNIKI

Analiza statystyczna

Wyniki poziomu białek BDNF i TrkB przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej z pomiarów uzyskanych dla poszczególnych zwierząt w grupie. Poziom BDNF u zwierząt kontrolnych był wykrywany osobno dla lewej i prawej siatkówki oraz kory wzrokowej a następnie uśredniany, poziom TrkB był oceniany jednostronnie.

Zbadano czy dane spełniają założenia testu ANOVA. Wykorzystano test Shapiro-Wilka do zweryfikowania normalności dystrybucji danych we wszystkich grupach i test Levena oraz Bartletta w celu zbadania jednorodności wariancji grup.

Ponieważ jednorodność wariancji nie była równa w niektórych grupach eksperymentalnych, do porównania poziomów białka BDNF i TrkB w siatkówce i korze wzrokowej zastosowano jednoczynnikową analizę ANOVA Welch'a, a następnie test post-hoc Games-Howell'a. Do analizy danych użyto oprogramowania STATISTICA 13.1 (StatSoft. Inc. Tulsa, OK, USA) i oprogramowania R.

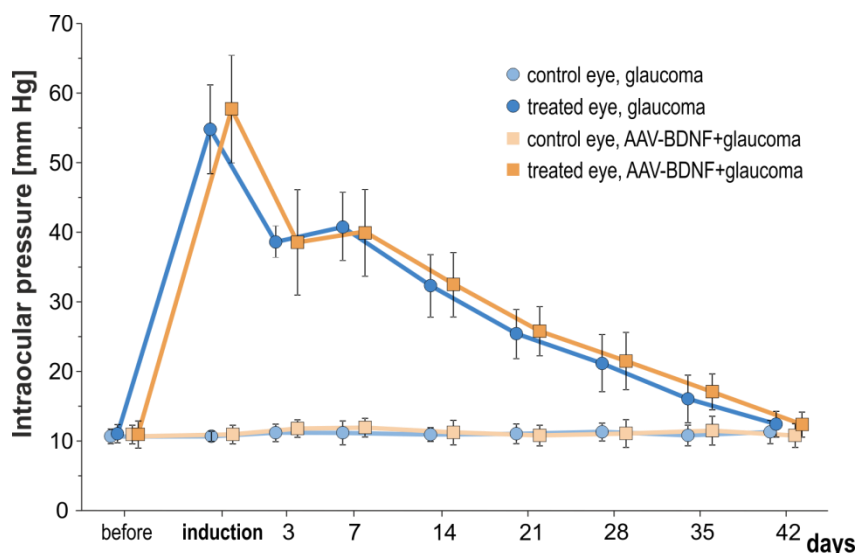
Do porównania liczby komórek zwojowych w siatkówkach zastosowano dwuczynnikową ANOVA z powtarzanymi pomiarami, a następnie test wielokrotnych porównań Sidaka.

W celu porównania wartości IOP zmieniających się w czasie, zastosowano t-test dla zmiennych zależnych.

Ocena modelu jaskry

Model jaskry przedbeleczkowej z użyciem mikrogranulek polistyrenowych powoduje natychmiastowy wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego trwający kilka tygodni

Model jaskry eksperymentalnej u szczura opisany przez Smęadowskiego i wsp. został z sukcesem zastosowany w niniejszej pracy. Wartości IOP w lewym oku kontrolnym oraz prawym oku, w którym indukowano jaskrę zostały przedstawione na RYCINIE 7.



RYCINA 7. Wykres przedstawia wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego (IOP) w czasie. Pomiary IOP przeprowadzono od 1-go do 42-dnia po jednoocnej indukcji jaskry. W oku prawym dochodziło do istotnego wzrostu IOP natychmiast po podaniu mikrogranulek do komory przedniej oka. IOP w oku lewym pozostało niezmienione, utrzymując wartości IOP w zakresie podobnym do wartości sprzed indukcji jaskry. Zaprezentowane dane zostały uśrednione $\pm$ SD z 8 szczurów (I grupa doświadczalna z jaskrą) i 7 szczurów (II grupa doświadczalna AAV2-BDNF + jaskra) * $p < 0.01$, t-test dla zmiennych zależnych

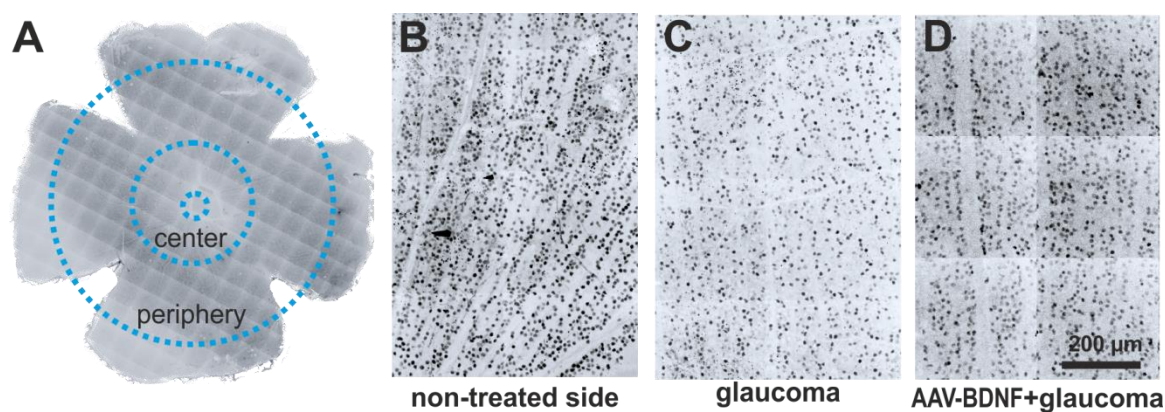
Rycina pochodzi z pracy Wójcik-Gryciuk A et al., 2020.

Wartości IOP znacząco rosły w chwili podawania mikrogranulek polistyrenowych do oka. Gwałtowny, ponad 5-krotny wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego potwierdza, że model ten może być stosowany do badań naśladujących model ostrego ataku jaskry (Smęadowski A et al., 2014). W trzecim dniu od indukcji jaskry obserwowano spadek IOP spowodowany gojeniem rogówki po jej wcześniejszym nakłuciu szklaną kapilarą. Po pierwszym tygodniu od indukcji jaskry IOP ponownie wzrastało i pozostawało wysokie, ponad 4-krotnie wyższe niż w oku kontrolnym i stopniowo obniżało się pomiędzy drugim a piątym tygodniem eksperymentu, by powrócić do wartości prawidłowych w 6-tym tygodniu badania. Wartości IOP były porównywalne zarówno w I jak i II grupie doświadczalnej (odpowiednio: grupa zwierząt z jaskrą i grupa zwierząt z podanym BDNF i wywołaną 3 tygodnie później jaskrą). Wynik ten wskazuje, że podanie doszkliskowe wektorów wirusowych nie zaburza mechanizmów związanych z przepływem cieczy wodnistej w oku.

Ocena patofizjologicznych zmian w siatkówce w przebiegu jaskry bez nadekspresji BDNF oraz z nadekspresją BDNF.

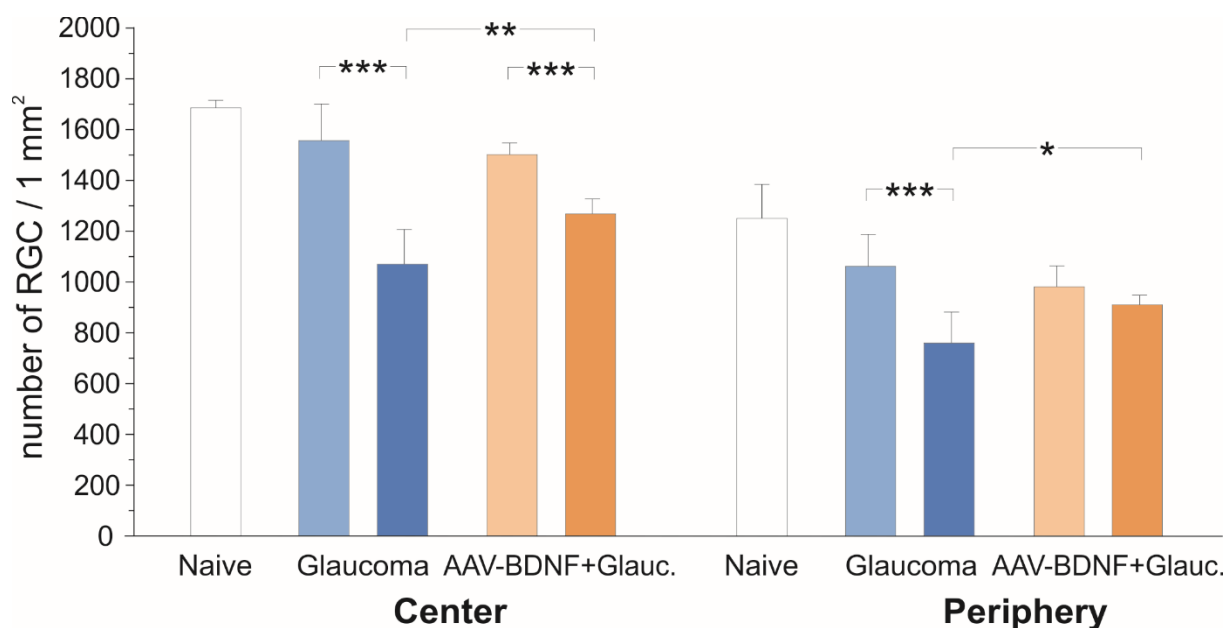
Tkanki siatkówki były prawidłowo przygotowane do preparatyki, każdą z nich udało się w całości wypreparować. Analizie poddano centralne i peryferyjne części siatkówek (ZDJĘCIE 9).

Jaskra powodowała utratę liczby komórek zwojowych siatkówki zarówno w części centralnej jak i obwodowej siatkówki.



ZDJĘCIE 9. Wpływ jaskry na liczbę RGC w centralnej części siatkówki. (A) cała siatkówka z podziałem na część centralną i obwodową, (B) RGCs lewej siatkówki oka (C) RGCs prawej siatkówki po indukcji jaskry, (D) RGCs prawej siatkówki po podaniu AAV-BDNF i późniejszej indukcji jaskry. RGCs były znakowane przeciwciałem anti-BRN3a.

Zdjęcie pochodzi z pracy Wójcik-Gryciuk A et al., 2020.



RYCINA 8. Wpływ jaskry i nadekspresji BDNF na liczbę komórek zwojowych w centralnej i obwodowej części siatkówek po 6 tygodniach od indukcji jaskry. Słupki w jasnych barwach oznaczają lewe oko kontrolne; słupki w ciemnych barwach odnoszą się do prawego oka z jaskrą. Słupki białe oznaczają zwierzęta natywne. Zaprezentowane dane zostały uśrednione $\pm$ SD z 8 szczurów (I grupa doświadczalna z jaskrą) i 7 szczurów (II grupa doświadczalna AAV2-BDNF + jaskra) Dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka; *** p < 0.001, ** p = 0.01, * p = 0.05.

Rycina pochodzi z pracy Wójcik-Gryciuk A et al., 2020.

Nadekspresja BDNF zmniejsza utratę komórek zwojowych w siatkówce oka w przebiegu jaskry

W siatkówkach zwierząt natywnych liczba komórek zwojowych wyniosła 1686 ± 30 w centrum siatkówek i 1250 ± 133 w częściach obwodowych (średnia $\pm$ SD z 3 zwierząt; 5 siatkówek).

Po sześciu tygodniach od indukcji jaskry u zwierząt z I GRUPY DOŚWIADCZALNEJ, w siatkówce oka prawego w obszarze centrum dochodziło do utraty komórek zwojowych na poziomie 31% w porównaniu do drugiego, nie poddanego procedurom oka u tego samego zwierzęcia (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka, $F(1,13) = 172.6$, $p < 0,001$). Gęstość komórek zwojowych w mm^2 w oku prawym z indukowaną jaskrą wyniosła $1071 \pm 137 / \text{mm}^2$, a w lewym oku towarzyszącym u tego samego zwierzęcia gęstość komórek zwojowych wyniosła $1556 \pm 145 / \text{mm}^2$ (średnia $\pm$ SD).

U zwierząt, u których w oku z indukowaną jaskrą wywołana została nadekspresja BDNF (II GRUPA DOŚWIADCZALNA), również dochodziło do spadku liczby komórek zwojowych w obszarze centralnym siatkówki. Spadek ten był jednak istotnie statystycznie niższy niż w grupie zwierząt bez nadekspresji BDNF i kształtował się na poziomie ok. 15% (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka, $p=0,001$). Gęstość komórek zwojowych w centrum siatkówki oka prawego z indukowaną jaskrą i nadekspresją BDNF wyniosła $1267 \pm 60 / \text{mm}^2$, zaś w oku lewym (towarzyszącym) gęstość ta wyniosła $1500 \pm 49 / \text{mm}^2$ (średnia $\pm$ SD). Utrata komórek zwojowych w siatkówkach z indukowaną jaskrą, w których wywoływano również nadekspresję BDNF, była jednak znacząco niższa niż w siatkówkach zwierząt z grupy z indukowaną jaskrą, lecz bez wzmocnienia ekspresji BDNF (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka, $p=0,0038$). Znaczenie nadekspresji BDNF w oku z indukowaną jaskrą dla częściowej ochrony komórek zwojowych przed zanikiem w obszarze centrum siatkówki oka ujawniło się również w istotnej interakcji między czynnikami, indukcja jaskry vs nadekspresja BDNF, w kształtowaniu liczby komórek zwojowych (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, interakcja $p=0,0005$).

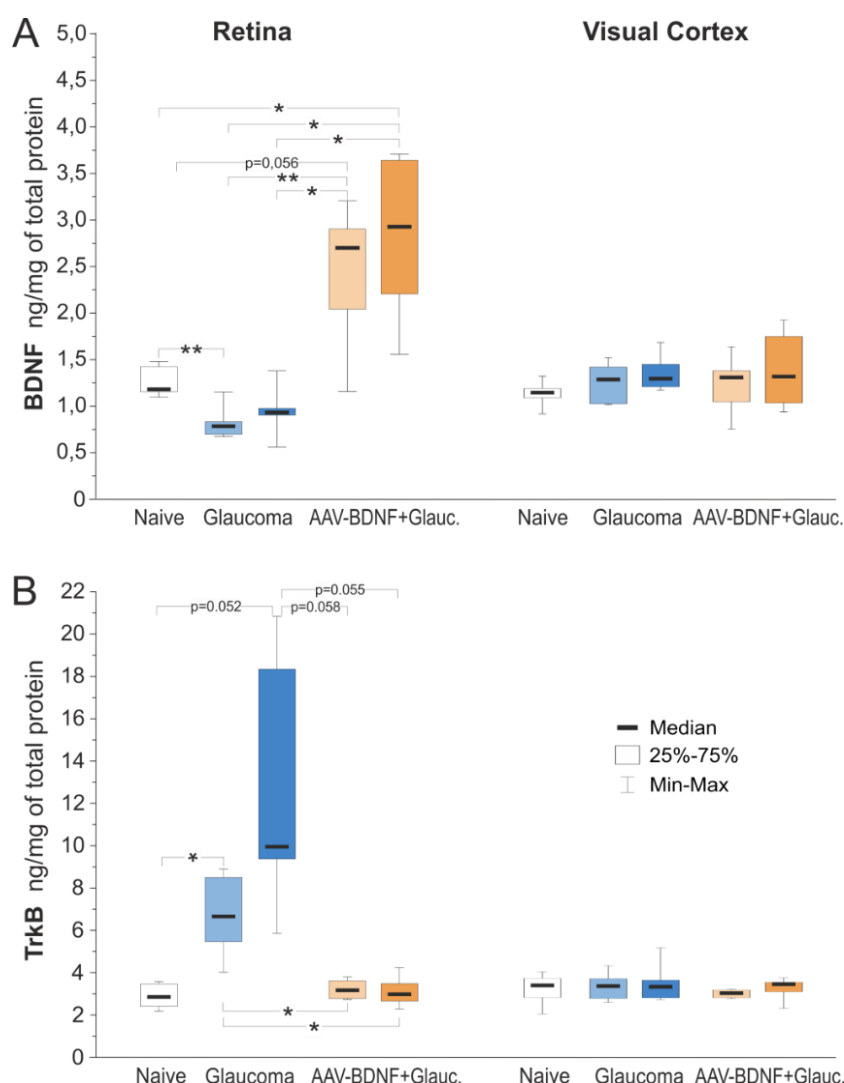
W obszarze obwodowej części siatkówki oka po sześciu tygodniach od indukcji jaskry następowało zmniejszenie liczby komórek zwojowych o 29% w porównaniu do drugiego, nie poddanego procedurom oka u tego samego zwierzęcia (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka, $F(1,12) = 67.9$, $p < 0,0001$). Gęstość komórek zwojowych mm^2 w prawym oku po indukcji jaskry wyniosła 758 ± 124 , zaś w lewym oku towarzyszącym 1060 ± 124 (średnia $\pm$ SD).

Wywołanie nadekspresji BDNF w oku, w którym indukowano jaskrę (II GRUPA DOŚWIADCZALNA), odwracało efekty jaskry i chroniło przed utratą komórek zwojowych; liczba komórek zwojowych w obszarze peryferii siatkówki pozostawała praktycznie niezmienną w porównaniu do drugiego, nie poddanego procedurom oka u tego samego zwierzęcia (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka, $p=0,038$; liczba komórek zwojowych w oku nie podanym procedurom wyniosła 912 ± 37 , średnia $\pm$ SD, vs liczba komórek zwojowych w oku z indukcją jaskry i nadekspresją BDNF wyniosła 968 ± 77 , średnia $\pm$ SD).

W tym kontekście warto również podkreślić, że liczba komórek zwojowych w siatkówkach oczu nie poddanych procedurom nie różniła się pomiędzy obiema grupami

doświadczalnymi zwierząt. Różnica między liczbą komórek zwojowych w siatkówkach z indukowaną jaskrą vs. w siatkówkach z indukowaną jaskrą i nadekspresją BDNF od drugiej grupy zwierząt była istotna statystycznie (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, test post-hoc Sidaka, $p=0,0337$). Analiza wykazała również istotną interakcję między dwoma czynnikami, indukcja jaskry vs. nadekspresja BDNF, w kształtowaniu liczby komórek zwojowych w obszarze peryferii (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniem pomiarów, interakcja $p=0,0003$).

Poziomy białka BDNF i receptora TrkB w korze wzrokowej i siatkówkach



RYCINA 9. Poziomy stężenie białek BDNF (A) i TrkB (B) w siatkówce i korze wzrokowej szczurów: natywna kontrola (Naïve), z jednostronną jaskrą (Glaucoma) oraz po doszkliskowej iniekcji AAV2-BDNF 3 tygodnie przed indukcją jaskry (AAV2-BDNF + Glaucoma). Słupki w jasnych barwach oznaczają lewe oko kontrolne; słupki w ciemnych barwach odnoszą się do prawego oka z jaskrą. Słupki białe oznaczają zwierzęta natywne. ** $p<0.01$, * $p<0.05$, # $p=0.056$.

U szczurów z indukowaną jaskrą, nadekspresja BDNF w siatkówce zwiększa poziomy BDNF powyżej normalnych wartości w obrębie siatkówki, ale nie w korze wzrokowej.

Po 6 tygodniach od indukcji jednostronnej jaskry przeprowadzono test ELISA celem pomiaru poziomów białka BDNF w siatkówkach (Ret) oraz korze wzrokowej (VCtx). Testy ELISA przeprowadzono zarówno w I grupie zwierząt, którym nie podawano wektorów wirusowych z BDNF, jak i w II grupie zwierząt- po wcześniejszym doszkliskowym podaniu transgenów.

W szczurów natywnych, zarówno w siatkówkach jak i korze wzrokowej stężenia BDNF miały wysokie wartości w zakresie femtomolarnym i wynosiły w próbkach 1.11-1.50 ng/mg białka w siatkówkach [siatkówka lewa (L) + siatkówka prawa (R) średnia=1,29 +/- 0,1; n=9] oraz 0,93-1,34 ng/mg białka w korze mózgowej [L+R średnia=1,16 +/- 0,1; n=9] w próbkach.

6 tygodni po indukcji jaskry w oku prawym, zaobserwowano obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach u wszystkich poza jednym szczurem (n=6). Stężenie BDNF wyniosło średnio 70% w stosunku do wartości uzyskanych od zwierząt natywnych (ANOVA, ANOVA z korekcją Welsha $F(4,28)=14.71$, $p=0.0001$; Games-Howell post-hoc test; L-Ret $p=0.003$, R-Ret $p=0.138$, vs szczury natywne) (RYCINA 9A). Poziomy BDNFu w siatkówkach oka prawego i lewego były silnie skorelowane (współczynnik korelacji Pearsona $R=0.86$, $p=0.029$) wskazując, że dysfunkcja w oku jaskrowym nie jest dysfunkcją izolowaną i wywołuje również zmiany w oku towarzyszącym.

Iniekcja doszlistkowa AAV2-BDNF skutkowała znaczącym, obustronnym wzrostem poziomów stężeń BDNF w siatkówkach (n=6). Stężenia te były ponad dwukrotnie wyższe niż u zwierząt natywnych stanowiących kontrolę (Games-Howell post-hoc test: L-Ret, $p=0.056$; R-Ret, $p=0.046$) i trzykrotnie wyższe niż u szczurów z indukowaną jaskrą, którym nie podawano wektorów wirusowych z BDNF (I GRUPA DOŚWIADCZALNA) (Games-Howell post-hoc test; L-Ret, $p=0.016$; R-Ret, $p=0.019$ (RYCINA 9A). Ponownie, stężenia BDNF w siatkówkach oka prawego i lewego były ze sobą skorelowane (współczynnik korelacji Pearsona $R=0.76$, $p=0.081$), co sugeruje możliwość transportu czynnika BDNF z oka prawego do lewego oka towarzyszącego.

Jednostronna jaskra prowadziła do niewielkiego obustronnego wzrostu BDNF w korze mózgowej (o 15%, jednoczynnikowa ANOVA Welsch'a $p=0.205$). Iniekcja wektora AAV2-BDNF nie miała istotnego statystycznie wpływu na wartości stężeń BDNF w korze mózgowej.

Nadekspresja BDNF normalizuje poziomy receptora TrkB w siatkówce, nie mając wpływu na poziom receptora TrkB w korze wzrokowej u szczurów z indukowaną jednostronnie jaskrą

Aby sprawdzić czy zmiana wartości stężeń BDNF w siatkówce prowadzi do zmian w dostępności receptora TrkB w siatkówkach oraz w korze wzrokowej, przeprowadzono testy ELISA na TrkB u tych samych szczurów.

W szczurów natywnych, zarówno w siatkówkach jak i w korze wzrokowej stężenia białka TrkB zostały określone w wartościach pikomolarnych i wynosiły w próbkach: 2.17-3.58 ng/mg białka w siatkówkach [siatkówka lewa (L) + siatkówka prawa (R) średnia = 2.92 ± 0.56 ; $n=9$] oraz 2.05-4.05 ng/mg białka w korze mózgowej [L+R średnia = 3.26 ± 0.66 ; $n=8$] w próbkach.

RYCINA 9B pokazuje, że 6 tygodni po indukcji jednostronnej jaskry, zaobserwowano obustronny wzrost stężenia białka TrkB w siatkówkach wszystkich szczurów ($n=6$). Stężenie to było ponad 4- krotnie wyższe (12.38 ± 5.84 ng/mg białka) po stronie oka z jaskrą i 2- krotnie wyższe (6.70 ± 1.87 ng/mg białka) w siatkówkach oka towarzyszącego w porównaniu z grupą zwierząt natywnych (jednoczynnikowa ANOVA Welch'a, $F(4,28) = 8.19$, $p=0.0018$; Games-Howell post-hoc test: R-Ret, $p=0.052$; L-Ret, $p=0.019$; L/R Ret $p=0.272$).

Poziomy białka TrkB w siatkówkach oka prawego i lewego były słabo skorelowane (współczynnik korelacji Pearsona $R = 0.30$, $p = 0.564$) co wskazuje na możliwość pojawiania się procesów adaptacyjnych zwiększających syntezę/ utrzymanie TrkB w oku jaskrowym i kontrolnym nierównolegle.

Doszklistkowa iniekcja AAV2-BDNF skutkowała obustronną normalizacją poziomów TrkB w siatkówkach obu oczu (L: 3.21 ± 0.47 ng/mg białka, R: 3.11 ± 0.69 ng/mg białka; Games-Howell posthoc test: N.S. vs szczury natywne, R-Ret, $p=0.055$, L-Ret, $p=0.028$ vs jaskra bez AAV2-BDNF). Stężenia TrkB w siatkówce oka lewego (L) i prawego (R) są silnie skorelowane (współczynnik korelacji Pearsona $R=0.86$, $p=0.028$) co wskazuje na silną odpowiedź w warunkach zwiększonej podaży BDNF.

Aby określić zależność pomiędzy ekspresją TrkB a stężeniem BDNF, przeprowadzono dalszą analizę korelacji poziomów BDNF i TrkB w obu grupach doświadczalnych. Analiza pokazała, że istnieje negatywna korelacja pomiędzy zmiennymi R-Ret: $r=-0.59$, $p=0.046$; L-Ret: $r=-0.62$, $p=0.037$, Spearman test), podczas gdy w grupie z podawanym AAV2-BDNF, gdzie doszło do wzrostu stężenia BDNF powyżej wartości kontrolnych, korelacja ta jest pozytywna (Right Ret: $r=0.94$, $p=0.017$; Left Ret: $r=0.66$, $p=0.175$).

Wynik ten pokazuje, że w warunkach umiarkowanej nadekspresji BDNF w siatkówce, nie dochodzi do obniżenia ekspresji receptora TrkB, co może mieć istotne znaczenie funkcjonalne.

W mózgowej korze wzrokowej nie zaobserwowano zmian w stężeniach receptora TrkB ani w grupie z jednostronną jaskrą (I GRUPA DOŚWIADCZALNA), ani w grupie zwierząt, którym przed indukcją jaskry podano AAV2- BDNF (II GRUPA DOŚWIADCZALNA) (RYCINA 9B).

5. DYSKUSJA

Prezentowana praca została poświęcona zbadaniu mechanizmu rozwoju jaskry na drodze zaburzonej podaży czynnika neurotroficznego BDNF dla komórek zwojowych siatkówki. Głównym celem pracy była ocena zmian patofizjologicznych tj. ocena stopnia utraty komórek zwojowych w oku z wywołaną jaskrą oraz weryfikacja hipotezy o spadku stężenia BDNF w siatkówce obu oczu oraz korze wzrokowej toższonej i przeciwstonnej. Niniejsze badania miały na celu również przetestowanie efektu terapii genowej wywołującej nadekspresję BDNF z użyciem podanego doszkliskowo konstruktu genowego AAV-BDNF. Chciano uzyskać odpowiedź na pytanie czy nadekspresja BDNF może spowodować skuteczną ochronę komórek zwojowych siatkówki w zwierzęcym modelu jaskry oraz mieć wpływ na zasobność siatkówek i kory wzrokowej w ten czynnik neurotroficzny oraz regulację poziomu receptora TrkB.

Walory szczurzego modelu jaskry przedbeleczkowej

Szczurzy model jaskry jest często wykorzystywany w badaniach eksperymentalnych. Istnieją jednak istotne różnice pomiędzy budową oka szczurzego i ludzkiego, a widzenie nie odgrywa istotnej roli w życiu gryzoni. Jedną z tych różnic polega na braku blaszki sitowej nerwu wzrokowego u szczura (Vecino E et al., 2011). Kolejną różnicą dotyczy zakresu mielinizacji nerwu wzrokowego. U naczelników osłonka mielinowa zaczyna się zaraz za blaszką sitową, zaś u szczurów nerw wzrokowy pozostaje nieosłonięty na odcinku 1-2 mm za twardówką. Z drugiej jednak strony, pomiędzy okiem gryzoni a okiem ludzkim występuje również cały szereg podobieństw w anatomii przedniego odcinka oka. Ponadto, podobny jest mechanizm cyrkulacji cieczy wodnistej. Z tego powodu szczurzy model jaskry dobrze naśladuje mechanizm wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego u ludzi i powstawanie zmian jaskrowych, dlatego jest szeroko wykorzystywany w pracach badawczych.

Istnieje kilka różnych modeli jaskry u zwierząt. Można je podzielić na trzy podgrupy w zależności od mechanizmu prowadzącego do wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego na (1) przedbeleczkowe, (2) beleczkowe i (3) pozabeleczkowe (Vecino E et al., 2011). W modelach jaskry przedbeleczkowej wykorzystuje się iniekcje mikrogranulek (polistyrenowych lub magnetycznych) do komory przedniej oka w celu zablokowania swobodnego przepływu cieczy wodnistej i wywołania wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego. Modele jaskry beleczkowej wykorzystują zabiegi laserowej trabekuloplastyki, trudnej do wykonania u gryzoni z powodu

małych rozmiarów ich oczu. W modelach jaskry pozabeleczkowej wykonuje się laserową koagulację lub kauteryzację żył nadtwardówkowych lub iniekcje hipertonicznego roztworu soli fizjologicznej do żył nadtwardówkowych. W modelach pozabeleczkowej jaskry uzyskuje się szybki, ale krótkotrwały wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego. Model ten, choć skuteczny, ma sporo wad (Goldblum D et al., 2002). Uszkodzenia żył indukowane laserem mogą również obejmować uszkodzenia nerwów rzęskowych, a zamknięcie żył nadtwardówkowych często prowadzi do miejscowych zmian niedokrwiennych w obrębie rąbka rogówki oraz naczyniówki, zwiększając tym samym ryzyko rozwoju wtórnej neowaskularyzacji. Zwierzęce modele jaskry przedbeleczkowej i beleczkowej generują mniejsze uszkodzenia tkanek oka i wierniej odwzorowują kliniczny przebieg jaskry. Biorąc pod uwagę zalety i wady wszystkich opracowanych modeli jaskry eksperymentalnej, w niniejszej pracy zdecydowano się na wybór modelu jaskry przedbeleczkowej w użyciu mikrogranulek polistyrenowych.

Jednostronny model jaskry, wykorzystany w niniejszej pracy, został zmodyfikowany i opublikowany przez zespół badaczy z Uniwersytetu Medycznego w Katowicach pod kierunkiem profesor Joanny Lewin- Kowalik (Smędowski A. et al., 2014). Model jaskry z wykorzystaniem polistyrenowych mikrogranulek po raz pierwszy został opisany przez Urcola i wsp. w 2006 roku (Urcola JH et al., 2006).

Procedura indukcji jaskry tą metodą wymaga szybkiego podania zawiesiny granulek polistyrenowych wraz z wiskoelastykiem. Szybkie podanie zapewnia lepszą dystrybucję granulek w obręb beleczkowania i skuteczniejszą blokadę kąta przesączania, niż ma to miejsce przy powolnym podaniu, gdy zawiesina granulek gromadzi się w centrum komory przedniej oka. Szklana kapilara powinna być wprowadzona do komory przedniej pod kątem ok. 45 stopni; zbyt mały kąt jej wprowadzenia zwiększa ryzyko śródrogówkowego podania zawiesiny. Z kolei przy zbyt stromym podaniu rośnie ryzyko uszkodzenia soczewki. Spośród 35 zwierząt, u których wykonywane były doszklistkowe podania granulek z wiskoelastykiem, poprawną iniekcję udało się osiągnąć u 27 zwierząt i tylko te zwierzęta włączono do dalszych procedur doświadczalnych.

Charakterystyka zmian jaskrowych

Założony na podstawie dostępnych danych (Urcola JH et al., 2006, Smędowski A et al., 2014) czas 6 tygodni od wywołania podwyższonego IOP za pomocą granulek polistyrenowych okazał się być wystarczającym okresem dla wykształcenia zmian charakteryzujących jaskrę.

W grupie zwierząt, u których jednoocznie wywoływany był wzrost IOP, w dniu indukcji jaskry (tj. podania do komory przedniej oka granulek polistyrenowych) następował nagły wzrost jego wartości. Ten właśnie poziom IOP stanowił jego wartość szczytową - w kolejnych dniach stopniowo spadał aż do osiągnięcia po około 5-6 tygodniach wartości na poziomie kontrolnym. Ten szybki, choć przejściowy, wzrost IOP skutkował zmianami występującymi w siatkówce na poziomie komórkowym (ubytek komórek zwojowych) i molekularnym (obniżenie poziomu neurotrofiny BDNF). Zmiany jakie zaobserwowano u badanych zwierząt należy sklasyfikować raczej jako ostrą neuropatię nerwu wzrokowego i ostrą retinopatię niż przewlekłe uszkodzenie jaskrowe, które zwykle rozwija się powoli, niepostrzeżenie przez wiele lat trwania choroby. Niezależnie jednak od dynamiki zmian ciśnienia wewnątrzgałkowego, to właśnie jego wzrost jest podstawowym mechanizmem prowadzącym do zmian w obrębie komórek zwojowych i nerwu wzrokowego.

Przewlekły wzrost IOP w jaskrze u ludzi prowokuje do rozwoju istotnych, nieodwracalnych uszkodzeń nerwu wzrokowego. Średni czas jaki musi upłynąć, aby nieleczona jaskra przeszła z fazy wczesnej do zaawansowanej, zależy od wartości ciśnień wewnątrzgałkowych. Dla wartości w zakresie 21-25 mmHg to około 14 lat, dla wartości w zakresie 25- 30 mmHg- 6,5 roku, a powyżej 30 mmHg- jedynie 3 lata (Jay JL et al., 1993, Hyman L et al., 2010). Krótki czas życia gryzoni, wykorzystywanych do badań eksperymentalnych nad jaskrą nie daje możliwości tak długiego okresu obserwacji. Dlatego tak istotne jest wywołanie wstępnie wysokiego ciśnienia wewnątrzgałkowego, które - pomimo późniejszego spadku, jest wystarczające, aby wywołać degenerację nerwu wzrokowego (Smędowski A et al., 2014).

Jaskra wpływa na poziom BDNF i receptora TrkB w siatkówce, ale nie w korze wzrokowej

Jak pokazały wyniki niniejszej pracy, spadek stężenia BDNF prowadził do istotnego wzrostu stężenia receptora TrkB prawdopodobnie w mechanizmie sprzężenia zwrotnego. Natomiast nadekspresja BDNF skutkowała obniżeniem ekspresji receptora TrkB. Wyniki te są tożsame z wynikami innych autorów (Pease et al. 2000; Quigley et al. 2000), gdzie wykazano zaburzenia w transporcie wstecznym mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF) i akumulację receptora TrkB u szczurów z wywołaną jaskrą. A zatem neuroprotekcyjny wpływ BDNF może być limitowany poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego pomiędzy liczbą syntetyzowanych receptorów a dostępnością BDNF.

Uszkodzenie komórki zwojowej siatkówki wywołuje głęboki wpływ na odległe, zależne komórki neuronalne w obrębie całej drogi wzrokowej w ośrodkowym układzie nerwowym. Liczne badania neuropatologiczne pokazały również, że do podobnych zmian w postaci obkurczania się i utraty komórek neuronalnych dochodzi w obrębie wzgórka czworacznego górnego, wszystkich warstw ciała kolankowatego bocznego oraz kory wzrokowej (Gupta N et al., 2007). W badaniach z wykorzystaniem jednostronnej jaskry u zwierząt przeprowadzonych przez Gupta i wsp. zaobserwowano zmiany degeneracyjne w warstwach olbrzymiokomórkowych (*ang. magnocellular layer*), drobnokomórkowych (*ang. parvocellular layer*) i szlaku komórek K (*ang. koniocellular layer*) LGN. Rozległość tych zmian korelowała z ciężkością jaskrowych uszkodzeń nerwu wzrokowego, ale szlak olbrzymiokomórkowy był najbardziej podatny na uszkodzenia w przebiegu zmian jaskrowych. Rozwój procesów degeneracyjnych opisywano również w obrębie kory wzrokowej zwierząt naczelnych w jaskrą (Yücel YH et al., 2003). W niniejszej pracy analizie została również poddana mózgowa kora wzrokowa. Nie znalaziono w literaturze publikacji, w których omówione zostałyby zagadnienia związane ze stężeniem BDNF oraz receptora TrkB w korze mózgowej zwierząt z indukowaną jaskrą. Wyniki testów ELISA wykazały, że w grupie zwierząt z jednostronnie indukowaną jaskrą dochodzi do bardzo niewielkiego, ok. 15% obustronnego wzrostu BDNF w korze mózgowej, zaś nadekspresja BDNF po doszkliskowym podaniu wektora AAV2- BDNF normalizowała poziomy receptora TrkB w siatkówce, nie mając wpływu na poziom receptora TrkB w korze wzrokowej u szczurów z indukowaną jednostronnie jaskrą. Jak pokazały wyniki niniejszego badania, degeneracja komórek zwojowych nie stanowiła wystarczającego bodźca do spowodowania wykrywalnych testami zmian w stężeniu BDNF i receptora TrkB w korze wzrokowej. Nie można jednak wykluczyć, że analiza poszczególnych pól kory wzrokowej mogłaby potwierdzić wystąpienie bardziej lokalnych zmian.

Należy zwrócić szczególną uwagę na zaskakujący wynik obustronnego spadku BDNF w siatkówkach po jednostronnej indukcji jaskry oraz na obustronny jego wzrost przy jednostronnej podaży doszkliskowej wektora wirusowego z transgenem. Poziomy BDNFu w siatkówkach oka prawego i lewego są silnie skorelowane, co może sugerować, że dysfunkcja w oku jaskrowym nie jest dysfunkcją izolowaną i wywołuje również zmiany w oku towarzyszącym, w którym nie indukowano jaskry. Jak można tłumaczyć ten fenomen? W opublikowanej w 2019 r przez Lucas-Ruiz F i wsp. pracy, badacze opisują, że jednostronna axotomia nerwu wzrokowego u myszy powodowała obustronny spadek ekspresji specyficznych genów dla RGCs co wywoływało utratę komórek zwojowych siatkówki również w oku towarzyszącym. Próbuąc wyjaśnić ten fenomen,

badacze wzięli pod uwagę możliwość wystąpienia odpowiedzi bezpośredniej na śmierć komórek zwojowych, aktywację neurotoksycznej odpowiedzi zapalnej oraz propagowanie aktywacji mikrogleju w siatkówce po stronie uszkodzenia poprzez skrzyżowanie części aksonów komórek zwojowych wzrokowych, w kierunku oka towarzyszącego. Okazuje się, że jednostronne uszkodzenie nerwu wzrokowego może indukować odpowiedź zapalną i aktywację mikrogleju w siatkówce oka towarzyszącego (praca przeglądowa Ramirez JM et al., 2015). Siatkówka jest odżywiana przez fenestrowane naczynia naczyniówki, posiada również sieć własnego unaczynienia wewnętrznego. Komórki endotelialne naczyń krwionośnych siatkówki zapewniają ścisłą barierę krew-siatkówka, będącą kluczowym czynnikiem pozwalającym na utrzymanie prawidłowej funkcji i struktury siatkówki. Przerwanie bariery krew-siatkówka jest patologicznym objawem wielu naczyniowych chorób okulistycznych, których rozwój grozi utratą widzenia, np. w retinopatii cukrzycowej, wysiękowym zwyrodnieniu plamki związanym z wiekiem i retinopatii wcześniaczej (Runkle E et al., 2011). Być może przerwanie tej bariery w mechanizmie nagłego wzrostu ciśnienie wewnątrzgałkowego lub urazu chirurgicznego indukowanego podczas procedury wywołania jaskry, może również modyfikować mikrośrodowisko komórek zwojowych, co może mieć wpływ na transfer nadprodukowanego czynnika BDNF do oka towarzyszącego.

Nadekspresja BDNF wpływa na przeżywalność neuronów w przebiegu jaskry.

W celu sprawdzenia czy zwiększenie podaży BDNF dla komórek zwojowych siatkówki może mieć znaczenie dla przetrwania tych komórek w warunkach patofizjologii jaskry, do gałki ocznej wprowadzona została sekwencja genów kodujących białko BDNF. Nośnikiem tej sekwencji do komórek były wektory stworzone na bazie wirusów związanych z adenowirusem. Najpoważniejszym ograniczeniem związanym ze stosowaniem wektorów AAV jest długi czas do osiągnięcia stabilnej ekspresji egzogennej sekwencji (Fisher KJ, et al., 1996, Ziemińska E, et al., 2014). Z tego powodu podjęto decyzję o iniekcji doszklistkowej AAV-BDNF na 3 tygodnie przed indukcją jaskry, aby przed indukcją jaskry zapewnić nadekspresję BDNF w obrębie siatkówki. Taka strategia postępowania wynika z braku szczegółowych danych na temat dynamiki śmiertelności komórek zwojowych siatkówki w wyniku nagłego, radykalnego wzrostu IOP. W razie, gdyby śmierć większości komórek następowała krótko po wywołaniu podwyższonego IOP (wtedy, gdy IOP osiąga największą wartość), podanie AAV-BDNF w tym lub późniejszym czasie mogłoby udaremnić zaobserwowanie pozytywnego wpływu nadekspresji

BDNF na przeżywalność tych komórek. Podanie wektorów wirusowych z sekwencją kodującą BDNF przed wywołaniem jaskry jest oczywiście swoistym działaniem o typie „pretreatment”, które w leczeniu klinicznym nie znajdzie swojego zastosowania. Jednak należy wziąć pod uwagę fakt, że praca ta ma charakter pracy badawczej, a nie aplikacyjnej przygotowującej do badania klinicznego z udziałem chorych na jaskrę.

Jak pokazują wyniki niniejszego badania, jednostronna indukcja jaskry spowodowała utratę ok. 30% komórek zwojowych siatkówki w centrum i 29% utratę komórek zwojowych siatkówki na obwodzie. Wynik ten jest zbliżony z obserwacjami innych badaczy. Smędowski (Smędowski A et al., 2014) pisze o 28% utracie liczby aksonów nerwu wzrokowego po 6 tyg od indukcji jaskry, a Facarotta (Facarotta K et al., 2020) o utracie $38 \pm 4\%$ komórek zwojowych całej siatkówki, znakowanych przeciwciałem anti- BRN3a po 9 tygodniach indukcji wysokiego IOP.

Zaobserwowany w niniejszym badaniu pozytywny wpływ nadekspresji BDNF na przeżycie komórek zwojowych siatkówki w warunkach indukowanej jaskry koresponduje z wynikami pracy Martina K i wsp. opublikowanej w 2003 roku, w której pokazano, że nadekspresja BDNF pozwala ograniczyć następujący w wyniku podwyższonego IOP zanik aksonów komórek zwojowych, które tworzą nerw wzrokowy.

Chciałabym przybliżyć wyniki tego niezwykle ciekawego badania Martina K i wsp. z 2003 roku. Badacze podzielili 93 zwierzęta doświadczalne na 3 grupy. W pierwszej grupie ($n=30$) zwierzętom podawano jednoocześnie sól fizjologiczną. W drugiej grupie ($n=30$) podawano konstrukt AAV-BDNF-WPRE, zaś trzeciej grupie zwierząt ($n=33$) podawano doszkliskowo AAV-GFP-WPRE. Dwa tygodnie później, w tym samym oku wywoływano jaskrę za pomocą lasera aplikowanego na beleczkowanie w kącie przesączania (model jaskry beleczkowej). Po upływie kolejnych 4 tygodni zwierzęta były uśmiercane, preparowano siatkówki i barwiono RGCs celem oceny ich przeżycia. Ekspresję transgenów oceniano za pomocą badań immunohistochemicznych, analizy Western blot oraz bezpośredniej wizualizacji ekspresji białka GFP w mikroskopie. Utrata aksonów w grupie pierwszej (podanie soli fizjologicznej) wyniosła $52,3\% \pm 27,1\%$; $52,3\% \pm 24,2\%$ w grupie zwierząt, którym podano AAV-GFP-WPRE i tylko $32,2\% \pm 23,0\%$ w grupie zwierząt, które otrzymały doszkliskowo AAV-BDNF-WPRE. Również analiza Western blot dla BDNF wskazała na istotny wzrost ekspresji BDNF w grupie zwierząt, które otrzymały AAV-BDNF-WPRE w porównaniu do dwu pozostałych grup zwierząt doświadczalnych. Na podstawie otrzymanych przez badaczy wyników należy uznać,

że nadekspresja genu dla BDNF zadziałała ochronnie na komórki zwojowe siatkówki w zwierzęcym modelu jaskry, choć działanie to może być ograniczone przez mechanizm spadku ekspresji receptora TrkB.

Wynik ten jest zbieżny z wynikami niniejszego badania. Nadekspresja BDNF po doszkliskowym podaniu wektora AAV-BDNF u zwierząt z indukowaną jaskrą, spowodowała obustronny, ponad dwukrotny wzrost stężenia BDNF w siatkówce, co przełożyło się na znacznie mniejszą, bo jedynie 15% utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i pozwoliło na zahamowanie procesów utraty komórek zwojowych znajdujących się na obwodzie siatkówki.

Nadekspresja BDNF wpływa na receptywność komórek siatkówki na neurotrofiny.

Efekt terapeutyczny suplementacji samego BDNF może być ograniczony czasowo. Wynika to z istnienia mechanizmu sprzężenia zwrotnego pomiędzy BDNF a receptorem dla tej neurotrofiny. Suplementacja BDNF powoduje spadek ekspresji receptora TrkB. Dzieje się tak w wielu chorobach neurologicznych, również w jaskrze, co może znacznie ograniczyć efekt terapeutyczny nadekspresji BDNF (Sommerfeld M et al., 2000, Osborne A et al., 2018).

Zapewne wyniki badań, wskazujące na ograniczenie neuroprotektoryjnego działania BDNF z powodu spadku ekspresji receptora TrkB, miały wpływ na konstrukcję projektu badawczego przeprowadzonego przez Osborne A i wsp. Badacze w 2018 r opublikowali niezwykle ciekawe doświadczenia, do przeprowadzenia których użyli nowatorskiego konstruktu wirusowego AAV2-TrkB-2A-mBDNF. Zwiększał on nie tylko ekspresję BDNF, ale również stężenie receptora TrkB. Badacze uważali, że taka koncepcja konstruktu genowego, pozwoli na uniknięcie obniżenia stężenia receptora TrkB, obserwowanego podczas nadekspresji BDNF we wcześniej przeprowadzonych badaniach. Badacze oceniali neuroprotektoryjną skuteczność AAV2-TrkB-2A-mBDNF na mysim modelu ostrej neuropatii nerwu wzrokowego, polegającym na jego zmiążdżeniu (n=165), a następnie sprawdzali koncepcję neuroprotekcji na szczurzym modelu jaskry beleczkowej z użyciem lasera aplikowanego na trabekulum (n=30). 3 tygodnie przed uszkodzeniem nerwu wzrokowego lub indukacją jaskry, zwierzęta otrzymywały doszkliskowo do jednego oka konstrukt AAV2 TrkB-2A-mBDNF. Oko towarzyszące nie było poddawane żadnym procedurom. Kontrole stanowiły oczy nieleczone oraz te, którym doszkliskowo podawano wektor AAV2-CAG-GFP. Działanie nowatorskiego konstruktu wirusowego oceniano w różnych punktach czasowych (po 1, 3, 6, 12 i 24 tygodniach) od

doszklistkowej iniekcji, oceniając ekspresję transgenu zarówno dla TrkB jak i BDNF. 3 tygodnie po iniekcji wektora uzyskano wysoką ekspresję zarówno TrkB jak i BDNF w warstwie komórek zwojowych siatkówki. Testy Western blot z użyciem homogenatów mysich siatkówek wskazały na 3-krotnie wyższą immunoreaktywność receptora TrkB u myszy z podanym wektorem AAV2-TrkB-2A-mBDNF niż w kontroli. Doszklistkowa iniekcja AAV2-TrkB-2A-mBDNF również spowodowała sprawniejszy transport BDNF wzdłuż aksonów nerwu wzrokowego, podczas gdy receptor TrkB lokalizował się na powierzchni siatkówki. Ekspresja transgenów dla TrkB i BDNF była oceniana w regularnych odstępach czasowych do końca 6 miesiąca od doszklistkowej iniekcji konstruktu. Okazało się, że ekspresja TrkB pozostaje cały czas na wysokim poziomie, tj 3-4 krotnie wyższym niż w grupie kontrolnej, co jest wysoce zbieżne z wynikami niniejszego doświadczenia. Wysoki poziom ekspresji transgenu dla BDNF uzyskano już po pierwszym tygodniu od iniekcji AAV2-TrkB-2A-mBDNF i pozostawał on wysoki aż do 24 tygodnia. Na podstawie uzyskanych wyników, badacze wysnuli wniosek, że stabilna, długoczasowa ekspresja obu transgenów, skutkuje lepszą ochroną komórek zwojowych zarówno u myszy jak i szczurów. Przeprowadzone badania immunohistochemiczne oraz elektrofizjologiczne wykluczyły wystąpienie działań niepożądanych nowatorskiego konstruktu wirusowego. A zatem wnioski badaczy są spójne z hipotezą innych naukowców (Pease ME et al., 2000; Quigley HA et al., 2000) oraz wynikami niniejszego badania, która zakłada, że nadekspresja BDNF w obrębie siatkówki może kompensować zaburzenia we wstecznym transporcie BDNF z mózgu do oka, który występuje w modelu jaskry eksperymentalnej.

6. WNIOSKI

Celem niniejszej pracy była ocena neuroprotektoryjnej skuteczności klasycznego transgenu AAV-BDNF, pomiar stężenia BDNF i TrkB w siatkówkach zwierząt poddanych procedurom zabiegowym i porównanie tych wyników do danych uzyskanych w oku towarzyszącym oraz oczach zwierząt natywnych. Aby ocenić wpływ jaskry i zastosowanego leczenia na wyższych piętrach układu wzrokowego, pomiaru stężenia obu białek dokonywano również w korze wzrokowej.

Wyniki tej pracy potwierdziły wcześniejszą tezę propagowaną przez innych autorów, że nadekspresja BDNF stanowi skuteczną ochronę komórek zwojowych siatkówki w zwierzęcym modelu jaskry. Zastosowanie wektorów wirusowych kodujących białko BDNF pozwoliło na zwiększenie zasobności siatkówek w ten czynnik neurotroficzny oraz regulację poziomu receptora TrkB, który odgrywa kluczową rolę w ekspresji efektu neuroprotektoryjnego BDNF. W niniejszym badaniu wykazano, że jednostronna jaskra prowadzi do obustronnego spadku stężenia BDNF w siatkówkach i 4- krotnego wzrostu poziomu receptora TrkB. Podwyższony poziom TrkB nie kompensował spadku BDNF, co skutkowało istotnym spadkiem ilości komórek zwojowych siatkówki po 6 tygodniach jaskry.

Wykazano również, że długotrwała, umiarkowana nadekspresja BDNF w oczach z jaskrą normalizuje poziom TrkB i działa neuroprotektoryjnie zarówno na centralne jak i obwodowe komórki zwojowe siatkówki. W żadnej z grup zwierząt doświadczalnych nie zauważono istotnych statystycznie zmian w stężeniu BDNF i TrkB w korze wzrokowej.

Wnioski z przeprowadzonych doświadczeń:

1. Model jaskry beleczkowej z użyciem mikrogranulek polistyrenowych powoduje natychmiastowy wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego trwający kilka tygodni.
2. Jednostronna indukcja jaskry powoduje utratę komórek zwojowych siatkówki w centrum i na obwodzie.
3. Jednostronna indukcja jaskry powoduje obustronny spadek stężenia BDNF w siatkówkach i niewielki obustronny wzrost BDNF w korze mózgowej.
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 natywnych.

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, nie poddanym procedurom zabiegowym.
10. Pojedyncze, doszklistkowe podanie transgenu AAV-BDNF wydaje się być skuteczną metodą neuroprotekcji komórek zwojowych siatkówki.

W ciągu ostatniej dekady, dokonał się ogromny postęp w zakresie terapii genowych i terapii bazujących na komórkach macierzystych, dając nadzieję na stworzenie skutecznych metod leczenia różnych chorób okulistycznych, w tym wrodzonych degeneracji siatkówki, AMD, cukrzycy. Wektory zmodyfikowanych wirusów związanych z adenowirusami (AAV) okazały się być bezpiecznym i skutecznym narzędziem służącym do dostarczania genów do wybranych komórek siatkówki. Nie istnieją proste rozwiązania pozwalające przezwyciężyć wyzwania związane z tworzeniem skutecznej terapii neuroprotektoryjnej w jaskrze. Im większa będzie nasza wiedza dotycząca patomechanizmów tej choroby, im bardziej innowacyjne będą badania kliniczne oraz niestandardowe projekty badawcze, tym większa szansa na stworzenie nowoczesnej i skutecznej terapii jaskry.

Dalszy rozwój strategii związanych z terapiami genowymi oraz neurotrofinami może stanowić nową, skuteczną opcję leczenia uzupełniającą 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.

7. PIŚMIENNICTWO

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*, 138: 155-175

Anderson, DR. (2011). Normal-tension glaucoma (Low-tension glaucoma). *Indian Journal of Ophthalmology*, 59, 97-101.

Anderson DR, Hendrickson A. (1974) Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol*. 13:771–783.

Arthur S, Cantor LB. (2011) Update on the role of alpha-agonists in glaucoma management. *Exp Eye Res*. 2011 Sep;93(3):271-83.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR, (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med*. 358, 2231–2239

Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, Robbie SJ, Barker SE, Ripamonti C, Georgiadis A, Mowat FM, Beattie SG, Gardner PJ, Feathers KL, Luong VA, Yzer S, Balaggan K, Viswanathan A, de Ravel TJ, Casteels I, Holder GE, Tyler N, Fitzke FW, Weleber RG, Nardini M, Moore AT, Thompson DA, Petersen-Jones SM, Michaelides M, Stockman A, Smith AJ, Rubin G, Ali RR (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med*. 372, 1887–1897.

Balakrishnan B, Jayandharan GR. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther.*;14:86-100.

Barkana Y, Dorairaj S (2015) Re: Tham et al.: Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis (*Ophthalmology* 2014;121:2081-90). *Ophthalmology*. 122(7):e40-1.

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, Vol. 41, 521-530,

Boucard CC, Hanekamp S, Ćurčić-Blake B, Ida M, Yoshida M, Cornelissen FW (2016). Neurodegeneration beyond the primary visual pathways in a population with a high incidence of normal-pressure glaucoma. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2016;36:344–353.

Bradford M.M. (1976), Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*,72:248-54.

Broadgate S, Yu J, Downes SM, Halford S, (2017). Unravelling the genetics of inherited retinal dystrophies: past, present and future. *Prog. Retin. Eye Res.* 59, 53–96.

Buhrmann RR, Quigley HA, Barron Y, West SK, Oliva MS, & Mmbaga BB. (2000). Prevalence of glaucoma in a rural East African population. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 41, 40-48.

Bustamante A, Giralt D, Garcia-Bonilla L, Campos M, Rosell A, Montaner J. (2012). Citicoline in pre-clinical animal models of stroke: a meta-analysis shows the optimal

neuroprotective profile and the missing steps for jumping into a stroke clinical trial. J Neurochem. 2012 Oct;123(2):217-25.

Cellerino A, Kohler K (1997). Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. J Comp Neurol, 386: 149-160

Chen H. & Weber A. J. (2004) Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. Brain Res 1011, 99-106

Cheng L., Sapieha P., Kittlerova P., Hauswirth WW, Di Polo A. (2002) TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. J Neurosci 22, 3977-3986

Coorey NJ, Shen W, Chung SH, Zhu L, Gillies MC (2012). The role of glia in retinal vascular disease. Clinical and Experimental Optometry, 95, 266-281.

Dahlmann-Noor AH, Vijay S, Limb GA, Khaw PT (2010). Strategies for optic nerve rescue and regeneration in glaucoma and other optic neuropathies. Drug Discovery Today, 15, 287-299.

Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, L.Yin, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV. (2013) In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous, Sci. Transl. Med., 5, 189ra176

Dandona L, Dandona R, Mandal P, Srinivas M, John RK, McCarty CA, & Rao GN. (2000). Angle-closure glaucoma in an urban population in southern India. The Andhra Pradesh eye disease study. Ophthalmology, 107, 1710-1716.

Day AC, Baio G, Gazzard G, Bunce C, Azuara-Blanco A, Munoz B, Friedman DS, Foster PJ. (2012). The prevalence of primary angle closure glaucoma in European derived populations: A systematic review. *British Journal of Ophthalmology*, 96, 1162-1167.

Day TP, Byrne LC, Schaffer DV, Flannery JG. (2014) Advances in AAV vector development for gene therapy in the retina. *Adv Exp Med Biol.*;801: 687-693.

Daya S, Berns KI. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.*;21:583-593

Dekeyster E, Geeraerts E, Buyens T, Van den Haute C, Baekelandt V, De Groef L, Salinas-Navarro M, Moons L (2015) Tackling Glaucoma from within the Brain: An Unfortunate Interplay of BDNF and TrkB. *PLoS One*. 2015 Nov 11;10(11):e0142067.

Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, da Silva Cunha Jr, A, Woo SJ, Kwon YJ, (2018). Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa, *Prog Retin Eye Res.*;63:107-131.

Di Polo, A., Aigner, L., Dunn, R., Bray, G. & Aguayo, A. (1998). Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3978–3983

DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, et al. (1992) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*. 1992;8:983– 993

Domenici L, Origlia N, Falsini B, Cerri E, Barloscio D, Fabiani C, et al. (2014). Rescue of retinal function by BDNF in a mouse model of glaucoma. PLoS One, 9: e115579.

Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. J Virol 1999; 73(12):10371-6.

Edwards TL, Jolly JK, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Black GC, Webster AR, Lotery AJ, Holder GE, Xue K, Downes SM, Simunovic MP, Seabra MC, MacLaren RE (2016), Visual acuity after retinal gene therapy for choroideremia, N. Engl. J. Med., 374, pp. 1996-1998.

Emre M, Orgül S, Gugleta K, Flammer, J.(2004). Ocular blood flow alteration in glaucoma is related to systemic vascular dysregulation. British Journal of Ophthalmology, 88, 662-666.

Eraslan M, Çerman E, Çekiç O, Balci S, Dericioğlu V, Sahin Ö, Süer D, Chabou B, Tuncer Elmaci EN (2015). Neurodegeneration in ocular and central nervous systems: optical coherence tomography study in normal-tension glaucoma and Alzheimer disease. Turk J Med Sci. 2015;45:1106–1114.

Ferrer I, Goutan E, Marin C, Rey MJ, Ribalta T (2000). Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. Brain Res, 866: 257-261

Ficarrotta KR, Mohamed YH, Passaglia CL (2020). Experimental glaucoma model with controllable intraocular pressure history. Sci Rep. 2020 Jan 10;10(1):126

Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol.*; 70:520–532.

Flammer J, Konieczka K, Flammer AJ. (2013). The primary vascular dysregulation syndrome: Implications for eye diseases. *EPMA Journal*, 4, 14.

Foik AT, Kublik E, Sergeeva EG, Tatlisumak T, Rossini PM, Sabel BA, Waleszczyk WJ (2015). Retinal origin of electrically evoked potentials in response to transcorneal alternating current stimulation in the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 3;56 (3):1711-8.

Foster PJ, Johnson GJ. (2001). Glaucoma in China: How big is the problem? *British Journal of Ophthalmology*, 85, 1277-1282.

Foster PJ, Oen FT, Machin D, Ng TP, Devereux JG, Johnson GJ, Khaw PT, Seah SK. (2000). The prevalence of glaucoma in Chinese residents of Singapore: Across-sectional population survey of the Tanjong Pagar district. *Archives Ophthalmology*, 118, 1105-1111.

Fraenkl SA, Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Org˘ul S, Flammer J. (2013). Differences in gene expression in lymphocytes of patients with high-tension, PEX, and normal-tension glaucoma and in healthy subjects. *European Journal of Ophthalmology*, 23, 841-849.

Frank, L., Ventimiglia, R., Anderson, K., Lindsay, R. & Rudge, J. (1996). BDNF downregulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1220–1230.

Fu QL, Li X, Yip HK, Shao Z, Wu W, Mi S, So KF (2009). Combined effect of brain-derived neurotrophic factor and LINGO-1 fusion protein on long-term survival of retinal ganglion cells in chronic glaucoma. *Neuroscience*, 162:375-382.

Fukuda, Y. (1977) A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. *Brain Res* 119, 327-334

Garafalo AV, Cideciyan AV, Héon E, Sheplock R, Pearson A, WeiYang Yu C, Sumaroka A, Aguirre GD, Jacobson SG (2019) Progress in treating inherited retinal diseases: Early subretinal gene therapy clinical trials and candidates for future initiatives. *Prog Retin Eye Res*. 2019 Dec 30:100827

Garcia-Martin E, Satue M, Fuertes I, Otin S, Alarcia R, Herrero R, Bambo MP, Fernandez J, Pablo LE (2012) Ability and reproducibility of Fourier-domain optical coherence tomography to detect retinal nerve fiber layer atrophy in Parkinson's disease. *Ophthalmology* 2012;119:2161–2167.

Ghaffariyeh A, Honarpisheh N, Heidari MH, Puyan S, Abasov F. (2011) Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker in primary open-angle glaucoma. *Optom Vis Sci*. 2011;88:80–5

Goldblum D, Mittag T. (2002). Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vision Res*. 42, 471–478.

Grabska-Liberek I, Skonieczna K, Olesińska M, Terelak-Borys B, Kocięcki J, Sikora M, Jamroz-Witkowska A, Tesla P, Czarnocka B. (2015). Levels of antibodies against human heat shock protein (HSP) 60 in patients with glaucoma in Poland. *Medical Science Monitor*, 21, 828-832.

Grieb P. Neuroprotective properties of citicoline: facts, doubts and unresolved issues. *CNS Drugs* 2014, 28: 185-193

Grieshaber MC, Mozaffarieh M, Flammer J (2007). What is the link between vascular dysregulation and glaucoma? *Surv Ophthalmol.* 2007;52(Suppl 2):S144–154.

Gugleta K, Polunina A, Kochkorov A, Waldmann N, Portmann N, Katamay R, Flammer J, Orgul S. (2013). Association between risk factors and glaucomatous damage in untreated primary open-angle glaucoma. *J.Glaucoma.* 2013 Aug;22(6):501-5.

Gupta N, Yücel YH (2001): Glaucoma and the brain. *J Glaucoma* 10: S28--9

Gupta N, Ang L, de Tilly LN, Bidaisee L, Yücel YH (2006). Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(6):674–678

Gupta N, Yücel YH (2007). Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 18, 110-114.

Haseltine EC, DeBruyn EJ, Casagrande VA. (1979). Demonstration of ocular dominance columns in Nissl—stained sections of monkey visual cortex following enucleation. *Brain Res.* 176,153– 158.

He Z, Vingrys AJ, Armitage JA, Bui BV (2011). The role of blood pressure in glaucoma. *Clinical and Experimental Optometry*, 94,133-149.

He M, Foster PJ, Ge J, Huang W, Zheng Y, Friedman DS, Lee PS, Khaw PT. (2006). Prevalence and clinical characteristics of glaucoma in adult Chinese: A population based study in Liwan District, Guangzhou. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 2782-2788.

Heijl A, Bengtsson B, Hyman L, Leske M. (2009). Early Manifest Glaucoma Trial Group. Natural history of open-angle glaucoma. *Ophthalmology*. 116, 2271–2276.

Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (2000). Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol*, 57: 846-851

Horrocks LA, Dorman RV, Dabrowiecki Z, Goracci G, Porcellati G. (1981) CDPcholine and CDPethanolamine prevent the release of free fatty acids during brain ischemia. *Prog Lipid Res*. 1981;20:531-4.

Huang EJ, Reichardt LF. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.

Hulsman CA, Westendorp IC, Ramrattan RS, Wolfs RC, Witteman JCM, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PTVM. (2001). Is open-angle glaucoma associated with early menopause? The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology*, 154, 138-144.

Hyman L, Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Yang Z. (2010). Early Manifest Glaucoma Trial Group. Natural history of intraocular pressure in the early manifest glaucoma trial: A 6-year follow-up. *Arch. Ophthalmol*. 128, 601–607.

Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, Kameya S, Fujimoto C, Nakamoto K, Takahashi H, Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Hirai Y, Shimada T, Okada T, Takahashi H (2016) Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Mol. Vis.* 22, 816–826

Iwabe S, Moreno-Mendoza NA, Trigo-Tavera F, Crowder C, García-Sánchez GA. (2007). Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma. *Veterinary Ophthalmology*, 10, Suppl 1:12-9.

Jackman SL, Beneduce BM, Drew IR, Regehr WG (2014). Achieving High-Frequency Optical Control of Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience*, 34: 7704-7714.

Jay JL, Murdoch JR. (1993). The rate of visual field loss in untreated primary open angle glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 77, 176–178.

Johnson TV, Martin KR. (2008) Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3503–3512.

Jonas JB. (2011). Role of cerebrospinal fluid pressure in the pathogenesis of glaucoma. *Acta Ophthalmologica*, 89, 505-514.

Jonas JB, Wang N, Yang D, Ritch R, Panda-Jonas S. (2015). Facts and myths of cerebrospinal fluid pressure for the physiology of the eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, 46, 67-83.

Kahn HA, Leibowitz HM, Ganley JP, Kini MM, Colton T, Nickerson RS, Dawber TR. (1977). The Framingham Eye Study: I. Outline and major prevalence findings. *American Journal of Epidemiology*, 106, 17-32.

Kaplan E, Lee BB, Shapley RM. New views of primate retinal function. Osborne N Chader G eds. *Progress in Retinal Research*. 1990;273–336. Pergamon Oxford, UK.

Keith RG. Martin, Ronald L. Klein, Harry A. Quigley (2002), Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors, *Methods* 28 (2002) 267–275

Kennedy EP (1956). The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine, and related compounds. *J Biol Chem*.1956 Sep; 222 (1):185-91.

Kim TW, Kim DM, Park KH, Kim H (2002). Neuroprotective effect of memantine in a rabbit model of optic nerve ischemia. *Korean Journal of Ophthalmology*, 16, 1-7.

Klein BEK, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, Menage MJ. (1992). Prevalence of glaucoma: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*, 99, 1499-1504.

Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. (2001). Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett*. 2001;305:139–142

Konieczka K, Ritch R, Traverso CE, Kim DM, Kook MS, Gallino A, Golubnitschaja O, Erb C, Reitsamer HA, Kida T, Kurysheva N, Yao K. (2014). Flammer syndrome. *EPMA Journal*, 5, 11.

Kumar M, Keller B, Makalou N (2004). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2004;12 (15):1893–1905.

Latina MA, Tumbocon JA. (2002). Selective laser trabeculoplasty: A new treatment option for open angle glaucoma. *Current Opinion in Ophthalmology*, 13, 94-96.

LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH. (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 1;89(23):11249-53.

Lee JH, Wang JH, Chen J (2019) Gene therapy for visual loss: opportunities and concerns. *Prog Retin Eye Res.* *Progress in Retinal and Eye Research* 68 (2019) 31–53

Leonard K. Seibold, Jeffrey R. SooHoo, Malik Y. Kahook (2015). Endoscopic Cyclophotocoagulation Middle East Afr J Ophthalmol. 2015 Jan-Mar; 22(1): 18–24.

Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. (1994). The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 112, 821-829.

Lestak J, Tintera J, Svata Z, Ettler L, Rozsival P. (2014). Glaucoma and CNS. Comparison of fMRI results in high tension and normal tension glaucoma. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(1), 144-153.

Lewis RA, von Wolff K, Tetz M, Korber N, Kearney JR., Shingleton B, Samuelson TW. (2007). Canaloplasty: Circumferential viscodilation and tensioning of Schlemm's canal using a flexible

microcatheter for the treatment of open-angle glaucoma in adults: interim clinical study analysis. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 33, 1217-1226.

Levin LA. (2018), Neuroprotection in Optic Neuropathy. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2018 Jul-Aug;7(4):246-250. doi: 10.22608/APO.2018299. Epub 2018 Aug 1. Review.

Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, Dudas L, Fisher KJ, Maguire AM, Jacobson SG, Bennett J. (2001). Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 2001 Nov;4(5):461-72.

Liang Y, Friedman DS, Zhou Q, Yang XH, Sun LP, Guo L, Chang DS, Lian L, Wang NL. Handan Eye Study Group. (2011). Prevalence and characteristics of primary angle-closure diseases in a rural adult Chinese population: The Handan Eye Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 8672-8679.

Lin IC, Wang YH, Wang TJ, Wang IJ, Shen YD, Chi NF, Chien LN (2014). Glaucoma, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease: an 8-year population-based follow-up study. *PLoS One*. 2014;9:e108938.

Liu MM, Tuo J, Chan CC. (2011). Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol*.; 95:604-612.

Liu Y, Pang IH (2013). Challenges in the development of glaucoma neuroprotection therapy. *Cell Tissue Res*. 2013 Aug;353(2):253-60.

Liu Y, Allingham R.R (2017) Major review: Molecular genetics of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res*. 2017 Jul;160:62-84

Lloyd A, Piglowska N, Ciulla T, Pitluck S, Johnson S, Buessing M, O'Connell T (2019). Estimation of impact of RPE65-mediated inherited retinal disease on quality of life and the potential benefits of gene therapy. *Br J Ophthalmol*. 2019 Jan 18. pii: bjophthalmol-2018-313089

Logan GJ, Dane AP, Hallwirth CV, Smyth CM, Wilkie EE, Amaya AK, Zhu E, Khandekar N, Ginn SL, Liao SHY, Cunningham SC, Sasaki N, Cabanes-Creus M, Tam PPL, Russell DW, Lisowski L, Alexander IE, (2017). Identification of liver-specific enhancer-promoter activity in the 3' untranslated region of the wildtype AAV2 genome. *Nat. Genet*. 49, 1267–1273.

Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Rodriguez-Ramirez KT, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. (2019) Neuronal Death in the Contralateral Un-Injured Retina after Unilateral Axotomy: Role of Microglial Cells. *Int J Mol Sci* 20

Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, et al. (1998). BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci*.18:2097–2107.

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2240–2248.

Marquis RE, Whitson JT. (2005). Management of glaucoma: focus on pharmacological therapy. *Drugs Aging*. 2005;22(1):1-21.

Martin K, Quigley H, Zack D, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumring L, Pease M, Klein R, Hauswirth W (2003). Gene Therapy with Brain-Derived Neurotrophic Factor As a Protection: Retinal Ganglion Cells in a Rat Glaucoma Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(10):4357-65.

Martin K, Quigley H (2004). Gene therapy for optic nerve disease. *Eye*, 18:1049–1055.

Maurano STP, da Silva DJ, Avila MP, Magacho L (2018). Cognitive evaluation of patients with glaucoma and its comparison with individuals with Alzheimer's disease. *Int Ophthalmol*. 2018;38:1839–1844

Mi XS, Zhang X, Feng Q, Lo AC, Chung SK, So KF (2012). Progressive retinal degeneration in transgenic mice with overexpression of endothelin-1 in vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:4842–4851

Mi XS, Yuan TF, So KF (2014). The current research status of normal tension glaucoma. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1563–1571

Mitchell P, Smith W, Attebo K, Healey PR. (1996). Prevalence of open-angle glaucoma in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, 103, 1661-1669.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. (1999). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 270: 45-48

Moore NA, Morral N, Ciulla TA, Bracha P.(2018) Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations. *Expert Opin Biol Ther*. 2018 Jan;18(1):37-49.

Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO (2008) Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res*. 2008;173:285-301

Neufeld AH, Liu B (2003). Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave. *Neuroscientist*, 9, 485-495.

Nickells RW (2007) From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can J Ophthalmol*. 2007 Apr;42(2):278-87.

Noecker RJ. (2006). The management of glaucoma and intraocular hypertension: Current approaches and recent advances. *Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2, 193-206.

Nuzzi R, Dallorto L, Rolle T. Changes of Visual Pathway and Brain Connectivity in Glaucoma: A Systematic Review. *Front Neurosci*. 2018 May 29;12:363. doi: 10.3389/fnins.2018.00363. eCollection 2018

O'Donnell J, Taylor KA, Chapman MS. (2009). Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor--Cryo-EM structure of a heparin complex. *Virology*; 385(2):434-43.

Orgül S, Kaiser HJ, Flammer J, Gasser P. (1995). Systemic blood pressure and capillary blood-cell velocity in glaucoma patients: A preliminary study. *European Journal of Ophthalmology*, 5, 88-91.

Ortinski P, Dong J, Mungenast A, Yue C, Takano H, Watson D, Haydon P, Coulter D (2010). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience*, 13(5): 584–591.

Osborne NN (2009). Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmologica*, 87, 450-454.

Osborne A, Khatib TZ, Songra L, Barber AC, Hall K, Kong GYX, Widdowson PS, Martin K (2018) Neuroprotection of retinal ganglion cells by a novel gene therapy construct that achieves sustained enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor-B signaling *Cell Death Dis.* 2018 (10):1007.

Ottobelli L, Manni GL, Centofanti M, (2013) Citicoline oral solution in glaucoma: is there a role in slowing disease progression? *Ophthalmologica* 2013; 229 (4):219 -226.

Parikh, R.S., Parikh, S.R., Navin, S., Arun E., & Thomas, R. (2008). Practical approach to medical management of glaucoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, 56, 223-230.

Patrício M, Barnard AR, Orlans H, McClements M, MacLaren R (2017) Inclusion of the Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances AAV2-Driven Transduction of Mouse and Human Retina *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017 Mar 17; 6: 198–208.

Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ (2000). Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 764-774

Perez MT, Caminos E (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett*, 183: 96-99

Pietrucha-Dutczak M, Smędowski A, Wylegala E, Lewin-Kowalik J (2013). Decrease of RGS number in glaucoma mode vs. optic nerve transaction in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis* 73; 56-57.

Prins D, Hanekamp S, Cornelissen FW (2016). Structural brain MRI studies in eye diseases: are they clinically relevant? A review of current findings. *Acta Ophthalmol.* 2016;94:113–121.

Quigley HA, Anderson DR. (1976). The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol.* 1976;15:606–616.

Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Baginski TA. (1987). Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28, 913-920.

Quigley HA, Vitale S. (1997). Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 83-91.

Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan- Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS. (2000). Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3460-3466.

Quigley HA, Broman AT. (2006). Number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*, 90, 262-267.

Quigley HA (2011). Glaucoma. *Lancet*.377, 1367-1377

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salobrar-García E, Valiente-Soriano FJ, Triviño A, Ramirez JM (2015) Macro- and microglial responses in the fellow eyes contralateral to glaucomatous eyes. *Prog Brain Res*. 2015;220:155-72.

Ramlogan-Steel CA, Murali A, Andrzejewski S, Dhungel B, Steel JC, Layton CJ. (2018) Gene therapy and the adeno-associated virus in the treatment of genetic and acquired ophthalmic diseases in humans: Trials, future directions and safety considerations *Clin Exp Ophthalmol*.

Reardon G, Kotak S, Schwartz GF (2011) Objective assessment of compliance and persistence among patients treated for glaucoma and ocular hypertension: a systematic review. *Patient Prefer Adherence* 5:441–463

Ren R, Li Y, Liu Z, Liu K, He S (2012). Long-Term Rescue of Rat Retinal Ganglion Cells and Visual Function by AAV-Mediated BDNF Expression after Acute Elevation of Intraocular Pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(2):1003-11.

Rotchford AP, Kirwan JF, Muller MA, Johnson GJ, Roux P. (2003). Temba glaucoma study: A population-based crosssectional survey in urban South Africa. *Ophthalmology*, 110, 376-382.

Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. (2006). Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: A Bayesian meta-analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 4254-4261.

Rudzinski, M., Wong, T. P. & Saragovi, H. U. (2004) Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol* **58**, 341-354

Runkle EA, Antonetti DA. (2011). The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol.* 686:133-148.

Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, Wittes J, Pappas J, Elci O, McCague S, Cross D, Marshall KA, Walshire J, Kehoe TL, Reichert H, Davis M, Raffini L, George LA, Hudson FP, Dingfield L, Zhu X, Haller JA, Sohn EH, Mahajan VB, Pfeifer W, Weckmann M, Johnson C, Gewaily D, Drack A, Stone E, Wachtel K, Simonelli F, Leroy BP, Wright JF, High KA, Maguire AM. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390, 849–860.

Saheb H, Ahmed II (2012) Micro-invasive glaucoma surgery: current perspectives and future directions. *Curr Opin Ophthalmol.* 2012 Mar;23(2):96-104.

Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.* 2012;443(3):603–618

Sena DF, Ramchand K, Lindsley K (2010). Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev*: CD006539.

Shi JM, Jia SB. (2012). Selective laser trabeculoplasty. *International Journal of Ophthalmology*, 5, 742-749.

Sleath B, Blalock S, Covert D, Stone JL, Skinner AC, Muir K, Robin AL (2011) The relationship between glaucoma medication adherence, eye drop technique, and visual field defect severity. *Ophthalmology* 118:2398–2402

Smędowski A, Pietrucha- Dutczak M, Kaarniranta K, Lewin-Kowalik J (2014). A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. *Scientific Reports*, 4:5910.

Sommerfeld, M., Schweigreiter, R., Barde, Y., Hoppe, E (2000). Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *J. Biol. Chem.* 275, 8982–8990

Stein JD, Lee PP. (2008). Age and racial variation in the prevalence of open-angle glaucoma the USA. In J. Tombran-Tink, C.J. Barnstable & M.B. Shields (Eds.), *Ophthalmology research: Mechanisms of the Glaucoma* (pp. 3-17). Tatowa, NJ, Humana Press.

Su JH, Deng G, Cotman CW (1997). Transneuronal degeneration in the spread of Alzheimer's disease pathology: immunohistochemical evidence for the transmission of tau hyperphosphorylation. *Neurobiol Dis* 4:365--75, 1997

Summerford C, Samulski RJ (1998). Membrane-associated heparin sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72:1438–1445.

Surace EM, Auricchio A (2008) Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *J Vis.* 2008;48(3):353–359.

Suzuki Y, Iwase A, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, Kuwayama Y, Mishima HK, Shimizu H, Tomita G, Inoue Y, Kitazawa Y, Tajimi Study Group. (2006). Risk factors for open-angle glaucoma in a Japanese population: The Tajimi Study. *Ophthalmology*, 113, 1613-1617.

Takano M, Horie H, Iijima Y, et al. (2002). Brain-derived neurotrophic factor enhances neurite regeneration from retinal ganglion cells in aged human retina in vitro. *Exp Eye Res.* 2002;74:319–323.

Tamm ER, Grehn F, Pfeiffer N (2013). Neuroprotection in glaucoma. *Cell Tissue Res.* 2013 Aug;353(2): 201-3. doi: 10.1007/s00441-013-1672-0. Epub 2013 Jun 28.

Tezel G, Wax MB (2004). The immune system and glaucoma. *Current Opinion on Ophthalmology*, 15(2), 80-84.

Tielsch JM, Katz J, Singh K, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, Sommer A (1991). A population-based evaluation of glaucoma screening: The Baltimore Eye Survey. *American Journal of Epidemiology*, 134, 1102-1110.

Ting Shen, Yuyi You, Chitra Joseph, Mehdi Mirzaei, Alexander Klistorner, Stuart L. Graham, Vivek Gupta (2018). BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders. *Aging and Disease*, 9(3): 523–536.

Tobias P, Philipp SI, Stylianos M, Martin B, Barbara W, Felix R, Alexander OG, Eberhart Z, Marius U, Birgit K, Sven K, Ulrich BK, Dominik FM; RD-Cure Consortium. (2019). Safety and Toxicology of Ocular Gene Therapy with Recombinant AAV Vector rAAV.hCNGA3 in Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2019 Jun;30(2):50-56.

Trapani I, Puppo A, Auricchio A. (2014). Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 2014;43:108–128

Trapani I, Banfi S, Simonelli F, Surace EM, Auricchio A.(2015) Gene therapy of inherited retinal degenerations: prospects and challenges. Hum Gene Ther. 2015 Apr;26(4):193-200.

Unoki K, LaVail MM (1994). Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:907–915.

Urcola JH, Hernández M, Vecino E. (2006). Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. Exp Eye Res. 2006 Aug;83(2):429-37

Vasudevan SK, Gupta V, Crowston JG (2011). Neuroprotection in glaucoma. Indian Journal of Ophthalmology, 59 Suppl:S102-113.

Vecino E, Sansar CS (2011). Glaucoma Animal Models, in: Rumelt, S. (Eds.), Glaucoma - Basic and Clinical Concepts. InTech, Rijeka, 319–334.

Waleszczyk WJ, Wang C, Benedek G, Burke W, Dreher B (2004). Motion sensitivity in cat's superior colliculus: contribution of different visual processing channels to response properties of collicular neurons. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 64: 209-228.

Wang C, Waleszczyk WJ, Benedek G, Burke W, Dreher B (2001). Convergence of Y and non-Y channels onto single neurons in the superior colliculi of the cat. NeuroReport, 12: 2927-2933.

Wang SW, Mu X, Bowers WJ, et al. Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. Development. 2002;129:467–477.

Wang W, He M, Zhou M, Zhang X. (2013). Selective laser trabeculoplasty versus argon laser trabeculoplasty in patients with open-angle glaucoma: A systematic review and meta-analysis. PLoS One, 8, e84270.

Weber AJ, Chen H, Hubbard WC, Kaufman PL. (2000). Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(6):1370–1379.

Wilson AM, Di Polo A (2012). Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. Gene Therapy, 19, 127-136.

Wolfs RC, Borger PH, Ramrattan RS, Klaver CC, Hulsman CA, Hofman A, Vingerling JR, Hitchings RA, de Jong PT. (2000). Changing views on open-angle glaucoma: Definitions and prevalence: The Rotterdam Study. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 41, 3309-3321.

Wójcik-Gryciuk A, Skup M, Waleszczyk WJ (2016). Glaucoma - state of the art and perspectives on treatment. Restorative Neurology and Neuroscience, 34(1): 107-123.

Wójcik-Gryciuk A, Gajewska-Woźniak O, Kordecka K, Boguszewski PM, Waleszczyk W, Skup (2020) Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells with AAV2-BDNF Pretreatment Restoring Normal TrkB Receptor Protein Levels in Glaucoma. M.Int J Mol Sci. 2020 Aug 29;21(17):E6262.

Yu-Wai-Man P (2016). Genetic manipulation for inherited neurodegenerative diseases: myth or reality? Br J Ophthalmol. 2016;100(10):1322– 1331

Yucel YH, Zhang Q, Gupta N. , Kaufman PL, Weinreb RN. (2000). Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. Arch. Ophthalmol. 118, 378–384

Yucel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta (2003). Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma. Prog Retin Eye Res. 2003;22(4):465–481.

Zhang Z, Wang X, Jonas JB, Wang H, Zhang X, Peng X, Ritch R, Tian G, Yang D, Li L, Li J, Wang N. (2014). Valsalva manoeuvre, intra-ocular pressure, cerebrospinal fluid pressure, optic disc topography: Beijing intracranial and intraocular pressure study. Acta Ophthalmologica, 92, e475-80.

Zhou XF, Li WP, Zhou FH, Zhong JH, Mi JX, Wu LL, Xian CJ (2005). Differential effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor on the survival of axotomized sensory neurons in dorsal root ganglia: a possible role for the p75 neurotrophin receptor. Neuroscience. 2005;132(3):591-603.

Ziemlińska E, Kügler S, Schachner M, Wewiór I, Czarkowska-Bauch J, Skup M. (2014) Overexpression of BDNF increases excitability of the lumbar spinal network and leads to robust early locomotor recovery in completely spinalized rats. PLoS One. 2014 Feb 14;9(2):e88833

8. SPIS ZDJĘĆ

ZDJĘCIE 1. Polistyrenowe granulki o średnicy 10,0 i 6,0 μm , w kolorze niebieskim i białym.

ZDJĘCIE 2. Ilustracja etapów zabiegu dogąłkowego wprowadzania granulek. Szklana kapilara wypełniona zawiesiną wiskoelastyku i polistyrenowych granulek o żółtym zabarwieniu (A). Przednia komora oka szczura w całości wypełniona polistyrenowymi granulkami (B)

ZDJĘCIE 3. Mikroskop konfokalny z wirującym dyskiem- Zeiss Spinning Disc

ZDJĘCIE 4. Ekspresja eGFP w siatkówce po 21 dniach od pojedynczej iniekcji doszkliskowej wektora pAAV2-CMV-eGFP. Wyniki badania pilotażowego z zastosowaniem 2 μl wektora transdukcyjnego (miano 10^{13} GC/ml). Fotografia po lewej: ogólny rozkład transfekowanych komórek i włókien (zielona fluorescencja) w wypreparowanej siatkówce. Podłużne profile ułożone promieniście oznaczają naczynia krwionośne (nieoznaczone). Zdjęcie po prawej z wstawką: pole z wyznakowanymi komórkami i włóknami w powiększeniu.

ZDJĘCIE 5. Wektory wirusowe zamrożone w temp -80°C

ZDJĘCIE 6. Strzykawka i igła Hamiltonówka o objętości 10 μl

ZDJĘCIE 7. Szczurzy mózg przed usunięciem kory wzrokowej (A) i po usunięciu prawej i lewej kory wzrokowej (strzałki) (B)

ZDJĘCIE 8. Mechaniczny homogenizator IKA-Werke GmbH, Staufen, Niemcy

ZDJĘCIE 9. Wpływ jaskry na liczbę RGC w centralnej części siatkówki. (A) cała siatkówka z podziałem na część centralną i obwodową, (B) RGCs lewej siatkówki oka (C) RGCs prawej siatkówki po indukcji jaskry, (D) RGCs prawej siatkówki po podaniu AAV-BDNF i indukcji jaskry. RGCs były znakowane przeciwciałem anty-BRN3a.

Zdjęcie pochodzi z pracy Wójcik-Gryciuk A et al., 2020.

9. SPIS TABEL

TABELA 1. Opis poszczególnych składowych konstruktów AAV2-BDNF wraz z ich funkcją.

TABELA 2. Gotowe zestawy odczynników do reakcji ELISA

TABELA 3. Roztwory wykorzystane do technik do ELISA