Michał Fiedorowicz

Rozprawa doktorska

Tempol i jego estry acylowe: aktywność w modelach neurodegeneracji siatkówki

Promotor:
prof. dr hab. n. med. Paweł Grieb

Zakład Farmakologii Doświadczalnej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mossakowskiego PAN

Warszawa 2011

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi
Panu prof. dr. hab. Pawłowi Griebowi
za opiekę naukową, przekazaną wiedzę i życzliwość,
dzięki której mogła powstać niniejsza rozprawa.

Dziękuję także moim nauczycielom i kolegom:
dr. hab. Robertowi Rejdakowi,
dr. Sebastianowi Thalerowi
i dr. Frankowi Schüttaufowi.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie zostały w części opublikowane w następujących pracach oryginalnych:

- Thaler S., **Fiedorowicz M.**, Rejdak R., Choragiewicz T.J., Sulejczak D., Zarnowski T., Zrenner E., Grieb P., Schuettauf F., 2010. *Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load*. Exp Eye Res 29, 1257-65.

- Thaler S., **Fiedorowicz M.**, Grieb P., Wypych Z., Knap N., Borowik T., Zawada K., Kaminski J., Wozniak M., Rejdak R., Zrenner E., Schuettauf F., 2011. *Neuroprotective effects of tempol acyl esters against retinal ganglion cell death in a rat partial optic nerve crush model*. Acta Ophthalmol. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02180.x. (w druku).

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

Spis treści

STRESZCZENIE 6

1. WSTĘP 8

1.1. SIATKÓWKA OKA KRĘGOWCÓW 9

1.1.1. Budowa siatkówki 9

1.1.2. Recepcja i przetwarzanie bodźców wzrokowych w siatkówce 12

1.1.3. Ukrwienie i metabolizm siatkówki 16

1.2. METABOLIZM WOLNYCH RODNIKÓW I ICH ROLA W SCHORZENIACH SIATKÓWKI ..17

1.3. JASKRA 22

1.3.1. Rola podwyższonego ciśnienia śródgałkowego w jaskrze 23

1.3.2. Zwierzęce modele jaskry 24

1.3.2.1. Jaskra wywoływana podwyższeniem ciśnienia śródgałkowego 25

1.3.2.2. Jaskra wywoływana aksotomią lub zmiażdżeniem nerwu wzrokowego 25

1.3.2.3. Jaskra wywołana ekscytotoksycznością 26

1.3.3. Mechanizmy wybiórczej śmierci komórek zwojowych w jaskrze ..27

1.3.3.1. Rola stresu oksydacyjnego 28

1.3.3.2. Rola żelaza 30

1.3.3.3. Rola ekscytotoksyczności 31

1.3.3.4. Rola tlenku azotu 32

1.3.4. Koncepcje leczenia jaskry; leczenie neuroprotekcyjne 33

1.4. STARCZE ZWYRODNIENIE PLAMKI 35

1.4.1. Modele zwierzęce starczego zwyrodnienia plamki 36

1.4.2. Patogeneza starczego zwyrodnienia plamki 38

1.4.2.1. Rola wolnych rodników i ekspozycji na światło 39

1.4.2.2. Rola układu odpornościowego 40

1.4.3. Perspektywy leczenia starczego zwyrodnienia plamki 41

1.5. TEMPOL I JEGO POCHODNE JAKO POTENCJALNE LEKI RETINOPROTEKCYJNE 43

1.5.1. Właściwości fizykochemiczne tempolu 43

1.5.2. Aktywność chemiczna i potencjalny mechanizm działania farmakologicznego tempolu 43

1.5.3. Aktywność farmakologiczna tempolu i hydroksylaminy tempolu46

http://rcin.org.pl

1.5.4. Biodystrybucja 48
1.6. PODSUMOWANIE 50
2. CELE PRACY 51
3. MATERIAŁ I METODY 52
3.1. SUBSTANCJE I ODCZYNNIKI WYKORZYSTANE W BADANIACH 52
3.2. BADANIE WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNYCH TEMPOLU I JEGO POCHODNYCH . 53
3.2.1. Wyznaczanie współczynnika rozdziału woda-oktanol 53
3.2.2. Elektronowy rezonans paramagnetyczny 54
3.2.3. Badanie interakcji analizowanych związków z modelową błoną lipidową 54
3.3. DOŚWIADCZENIA NA ZWIERZĘTACH 55
3.3.1. Model częściowego zmiażdżenia nerwu wzrokowego 56
3.3.2. Modyfikacja modelu częściowego zmiażdżenia nerwu wzrokowego przez obciążenie ustroju żelazem 56
3.3.3. Model ekscytotoksyczności NMDA 57
3.3.4. Model uszkodzenia światłem 57
3.4. PODAWANIE TEMPOLU I JEGO POCHODNYCH 57
3.5. OCENA DEGENERACJI SIATKÓWKI 58
3.5.1. Ocena ilościowa komórek zwojowych siatkówki 58
3.5.2. Elektroretinografia 59
3.5.3. Analiza histologiczna siatkówki 60
3.5.4. Barwienia immunohistochemiczne 60
3.5.4.1. Przygotowanie skrawków mrożeniowych 60
3.5.4.2. Barwienie na obecność nitrotyrozyny 61
3.5.4.3. Barwienie na obecność żelaza 61
3.6. ANALIZA STATYSTYCZNA 62
4. WYNIKI 63
4.1. WŁASNOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE TEMPOLU I JEGO ESTRÓW ACYLOWYCH ORAZ ICH ODDZIAŁYWANIE Z BŁONAMI BIOLOGICZNYMI 63
4.1.1. Własności fizyko-chemiczne tempolu 63
4.1.2. Oddziaływanie tempolu i jego pochodnych z modelową błoną lipidową 64

http://rcin.org.pl

4.2. DZIAŁANIE TEMPOLU I JEGO ESTRÓW ACYLOWYCH U ZWIERZĄT PODDANYCH CZĘŚCIOWEMU ZMIAŻDŻENIU NERWU WZROKOWEGO 72

4.3. DZIAŁANIE TEMPOLU U ZWIERZĄT PODDANYCH CZĘŚCIOWEMU ZMIAŻDŻENIU NERWU WZROKOWEGO I OBCIĄŻONYCH ŻELAZEM 75

4.4. DZIAŁANIE TEMPOLU I JEGO ESTRÓW -C4 I -C8 W MODELU EKSCYTOTOKSYCZNOŚCI NMDA 78

4.5. DZIAŁANIE TEMPOLU W MODELU USZKODZENIA SILNYM ŚWIATŁEM 81

5. DYSKUSJA 85

5.1. WPŁYW MODYFIKACJI CZĄSTECZKI TEMPOLU NA WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I FARMAKOLOGICZNE POWSTAŁYCH ZWIĄZKÓW 85

5.1.1. Znaczenie lipofilności dla własności farmakologicznych potencjalnego leku 85

5.1.2. Lipofilność badanych substancji i ich oddziaływanie z błonami biologicznymi 88

5.1.3. Wpływ dołączenia łańcuchów acylowych do cząsteczki tempolu na otoczenie chemiczne rodnika nitroksydowego w powstałych związkach. 90

5.1.4. Estry tempolu – substancje działające w niezmienionej postaci czy „proleki" tempolu? 90

5.2. WPŁYW PODAWANIA TEMPOLU I JEGO ESTRÓW NA USZKODZENIA SIATKÓWKI W MODELACH JASKRY I STARCZEGO ZWYRODNIENIA PLAMKI 90

5.2.1.Neuroprotekcyjna aktywność tempolu i jego estrów w modelach jaskry normotensyjnej 91

5.2.2.Neuroprotekcyjna aktywność tempolu w modelu starczego zwyrodnienia plamki 97

5.3. POTENCJALNE UBOCZNE SKUTKI WZMOCNIENIA OBRONY PRZED WOLNYMI RODNIKAMI 99

5.4. PERSPEKTYWY PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA ESTRÓW TEMPOLU 101

6. WNIOSKI 103

7. BIBLIOGRAFIA 104

http://rcin.org.pl

Skróty:

AMD (*age-related macular degeneration*) – starczezwyrodnienieplamki
BDNF (*brainderivedneurotrophicfactor*) – czynnik wzrostowy pochodzenia mózgowego
bFGF (*basic fibroblast growthfactor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) – cyklicznyguanozynomonofosforan
CNTF (*ciliaryneurotrophicfactor*) – rzęskowy czynnik neurotroficzny
CRP (*C-reactive protein*) – białko C-reaktywne
ELM (*externallimitingmembrane*) – błona graniczna zewnętrzna
EPR (*electronparamagneticresonance*) – elektronowy rezonans paramagnetyczny
ERG – elektroretinografia
GCL (*ganglion celllayer*) – warstwa komórek zwojowych
HRP (*horseradishperoxidase*) – peroksydaza chrzanowa
ICP (*intracranialpressure*) – ciśnienie wewnątrzczaszkowe
ILM (*innerlimitingmembrane*) – błona graniczna wewnętrzna
INL (*innernuclearlayer*) – warstwa jądrzasta wewnętrzna
IOP (*intraocularpressure*) – ciśnienie śródgałkowe
IPL (*innerplexiformlayer*) – warstwa splotowa wewnętrzna
ISI (*inter-stimulus interval*) – przerwa między bodźcami
L-NAME – ester metylowy NG-nitro-L-argininy
MDA (*malondialdehyde*) – dialdehyd malonowy
NFL (*nervefiberlayer*) –warstwa włókien nerwowych
NMDA – N-metylo-D-asparaginian
NMR (*nuclearmagneticresonance*) – jądrowy rezonans magnetyczny
NOS (*nitricoxidesynthase*) – syntaza tlenku azotu
ONL (*outernuclearlayer*) – warstwa jądrzasta zewnętrzna
OPL (*outerplexiformlayer*) – warstwa splotowa zewnętrzna
OUN – ośrodkowy układ nerwowy
PB (*phosphatebuffer*) – bufor fosforanowy
PBS (*phosphatebufferedsaline*) –sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PE (*pigment epithelium*) – nabłonek barwnikowy
PL (*photoreceptor layer*) – warstwa fotoreceptorowa

http://rcin.org.pl

PMOR (*plasmamembraneoxidoreductase*) – błonowa oksydoreduktaza NADH

PONC (*partialopticnervecrush*) – częściowe zmiażdżenie nerwu wzrokowego

PUFA (*polyunsaturatedfattyacids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

QSAR (*quantitativestructure-activityrelationship*) – analiza zależności między strukturą związku a jego aktywnością biologiczną

RGC (*retinal ganglion cells*) – komórki zwojowe siatkówki

RNS (*reactive nitrogen species*) – reaktywneformyazotu

ROS (*reactive oxygen species*) – reaktywneformytlenu

TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) – substancjereagujące z kwasemtiobarbiturowym

Tempol-H – hydroksylamina tempolu

http://rcin.org.pl

Streszczenie

Jaskra i starcze zwyrodnienie plamki (AMD) to powszechnie występujące choroby wzroku i najczęstsze przyczyny nieodwracalnej ślepoty. W chorobach tych dochodzi do degeneracji i śmierci neuronów wchodzących w skład siatkówki. Proces jaskrowy prowadzi do wybiórczej śmierci komórek zwojowych siatkówki i ich aksonów tworzących nerw wzrokowy. W przebiegu AMD dochodzi do postępującego uszkodzenia fotoreceptorów, przede wszystkim w obrębie plamki żółtej. Wiele obserwacji przemawia za tym, że w patogenezie obu tych retinopatii istotną rolę odgrywają endogenne wolne rodniki tlenowe. Kaskadę reakcji wolnorodnikowych rozpoczyna anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$), który charakteryzuje się wyjątkowo dużą toksycznością. Pierwszym krokiem w jego fizjologicznej detoksykacji jest dysmutacja katalizowana przez enzymy dysmutazy ponadtlenkowe, a jedną z potencjalnie korzystnych strategii terapeutycznych w chorobach powodowanych przez wolne rodniki - podawanie mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej, takich jak tempol, związek piperydynowy o charakterze stabilnego wolnego rodnika. Główne enzymy generujące $O_2^{\bullet -}$ związane są z błonami, a rodnik ten jest szczególnie szkodliwy dla składników fazy lipidowej w komórkach. Na tej podstawie wysunięte zostało przypuszczenie, że zwiększenie lipofilności tempolu poprzez estryfikację krótkołańcuchowymi nasyconymi kwasami tłuszczowymi spotęguje jego własności neuroprotekcyjne.

Acylowe pochodne tempolu zostały zsyntetyzowane przez zespół prof. Michała Woźniaka (Gdański Uniwersytet Medyczny). Pierwszym celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie tych nowych substancji pod względem fizykochemicznym – wyznaczenie ich lipofilności, zbadanie oddziaływań z modelowymi błonami lipidowymi, oraz wyznaczenie widm elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) dla potwierdzenia ich charakteru wolnorodnikowego decydującego o własnościach katalitycznych.

Drugim celem pracy było zbadanie aktywności retinoprotekcyjnej tempolu i jego estrów (-C4, -C8, -C12, -C16) w szczurzych modelach jaskry, a tempolu także w AMD. Zastosowano: (1) częściowe zmiażdżenie nerwu wzrokowego, (2) modyfikację tego modelu polegającą na dodatkowym obciążeniu ustroju żelazem, oraz (3) doszklistkowe podanie ekscytotoksyny NMDA.

http://rcin.org.pl

Modelem AMD było uszkodzenie fotoreceptorów światłem. W celu określenia stopnia uszkodzenia siatkówki badano gęstość komórek zwojowych, które zachowały połączenia z mózgiem, wykonywano barwienia histologiczne i immunohistochemiczne, a także badania elektroretinograficzne.

Badane związki wykazywały różne własności fizykochemiczne. Wraz z długością łańcucha wzrastała ich hydrofobowość i zmieniały się oddziaływania z modelową błoną lipidową. Natomiast ich widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego nie różniły się znacząco, co świadczy o tym, że są - podobnie jak substancja macierzysta - stabilnymi wolnymi rodnikami.

Tempol wykazywał działanie protekcyjne w trzech modelach jaskry (model częściowego zmiażdżenia nerwu wzrokowego i jego modyfikacja z obciążeniem ustroju żelazem) i w modelu AMD (model uszkodzenia siatkówki intensywnym światłem). Porównanie serii estrów tempolu w modelu zmiażdżenia nerwu wzrokowego wskazało na większą od macierzystej substancji aktywność neuroprotekcyjną tempolu-C8. W czwartym modelu jaskry (model ekscytotoksyczności NMDA) tempol-C8 był także aktywny, działając protekcyjnie w dawce molowo równoważnej 1 mg tempolu/kg masy ciała, ale jedynie w grupie zwierząt młodych.

Uzyskane wyniki wskazują, że wzmacnianie obrony przed wolnymi rodnikami przy pomocy mimetyku dysmutazy ponadtlenkowej może być skuteczną strategią terapeutyczną w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych siatkówki. Największe nadzieje jako potencjalny lek budzi tempol-C8, który wykazał się większą niż tempol aktywnością neuroprotekcyjną. Wydaje się, że charakter jego oddziaływania z błonami biologicznymi bardziej sprzyja penetrowaniu do przedziałów komórkowych, w których dochodzi do intensywnej produkcji wolnych rodników i gdzie rodniki te dokonują największych zniszczeń.

http://rcin.org.pl

1. Wstęp

Choroby neurodegeneracyjne to schorzenia układu nerwowego, w których podstawowym procesem patologicznym jest degeneracja i śmierć komórek nerwowych. Są to m.in. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona i stwardnienie zanikowe boczne. Ponieważ siatkówka oka jest częścią ośrodkowego układu nerwowego, do chorób neurodegeneracyjnych zalicza się także choroby siatkówki, w których dochodzi do degeneracji neuronów, takie jak jaskra i starcze zwyrodnienie plamki (Schmidt i wsp. 2008).

Jaskra (*glaucoma*) jest jedną z najczęściej występujących chorób oczu i drugą najczęstszą przyczyną ślepoty. W roku 2002 liczbę ludzi z zaburzeniami wzroku oceniano na ponad 160 milionów. Spośród nich 37 milionów było niewidome, w tym 4,5 miliona z powodu jaskry (Resnikoff i wsp. 2004). Zarazem, inaczej niż w przypadku zaćmy (która jest najczęstszą przyczyną ślepoty), utrata wzroku spowodowana jaskrą jest nieodwracalna – choroba ta prowadzi bowiem do nieodwracalnego uszkodzenia komórek zwojowych siatkówki (*retinal ganglion cells*, RGC) i nerwu wzrokowego.

Starcze zwyrodnienie plamki (*age-relatedmaculardegeneration*, AMD) jest trzecią najważniejszą przyczyną ślepoty (Resnikoff i wsp. 2004), występującą głównie u ludzi w wieku powyżej 50 lat (Klein i wsp. 1992). W przebiegu AMD dochodzi do postępującego, nieodwracalnego uszkodzenia części centralnej siatkówki – plamki żółtej.

Dla większości ludzi wzrok jest najważniejszym zmysłem, gdyż dostarcza najwięcej informacji o otaczającym świecie. Nic więc dziwnego, że dwie wyżej wspomniane najczęściej występujące choroby prowadzące do nieodwracalnej utraty wzroku są przedmiotem intensywnych badań mających na celu wyjaśnienie ich patomechanizmów i opracowanie skutecznych terapii. Większość badań przeprowadzana jest na modelach zwierzęcych. Problematyka ta zostanie omówiona w pierwszej części wstępu, po krótkim wprowadzeniu dotyczącym struktury i fizjologii siatkówki.

W drugiej części wstępu omówiona zostanie struktura, własności i potencjalne zastosowania lecznicze tempolu – mimetyku enzymu dysmutazy ponadtlenkowej typu 2 (SOD-2). Badania retinoprotekcyjnych własności tem-

http://rcin.org.pl

polu oraz jego pochodnych acylowych w szczurzych modelach jaskry, a także ocena skuteczności tempolu w zapobieganiu uszkodzeniu fotoreceptorów siatkówki przy pomocy światła (tj. w szczurzym modelu AMD) były przedmiotem badań stanowiących podstawę niniejszej rozprawy.

1.1. Siatkówka oka kręgowców

1.1.1. Budowa siatkówki

Siatkówka u kręgowców jest wielowarstwową strukturą wyścielającą wnętrze gałki ocznej, połączoną przez nerw wzrokowy z mózgiem. Jest częścią ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Podobnie jak inne rejony OUN powstaje z cewy nerwowej. Jest najłatwiej dostępną częścią mózgu, a badania siatkówki kręgowców dostarczyły wielu ważnych odkryć dotyczących fizjologii i patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego. Spektakularnym przykładem jest zjawisko toksyczności glutaminianu, zwane ekscytotoksycznością (gdyż glutaminian jest głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w OUN), wykryte po raz pierwszy w siatkówce (Lucas i Newhouse 1957).

Grubość siatkówki i jej budowa jest różna w zależności od rejonu. Centralny rejon siatkówki jest zbudowany z następujących warstw (rys. 1.; Forrester i wsp. 2008; Regillo i wsp. 2007):

1. **Nabłonka barwnikowego** (*pigment epithelium*, PE), który jest pojedynczą warstwą komórek rozciągającą się od tarczy nerwu wzrokowego do rąbka zębatego (*ora serrata*). PE jest pojedynczą warstwą nieneuronalnych, pigmentowanych, sześciennych komórek dostarczających wsparcia fotoreceptorom.
2. **Warstwy fotoreceptorowej** (*photoreceptor layer*, PL) leżącej zewnętrznie (bliżej obwodu oka) w stosunku do błony granicznej zewnętrznej i zbudowanej z wewnętrznych i zewnętrznych segmentów pręcików i czopków.
3. **Błony granicznej zewnętrznej** (*externallimitingmembrane*, ELM; niepokazana na rys. 1), która nie jest prawdziwą błoną, a raczej membrano-podobną strukturą zbudowaną z serii połączeń międzykomórkowych,

http://rcin.org.pl

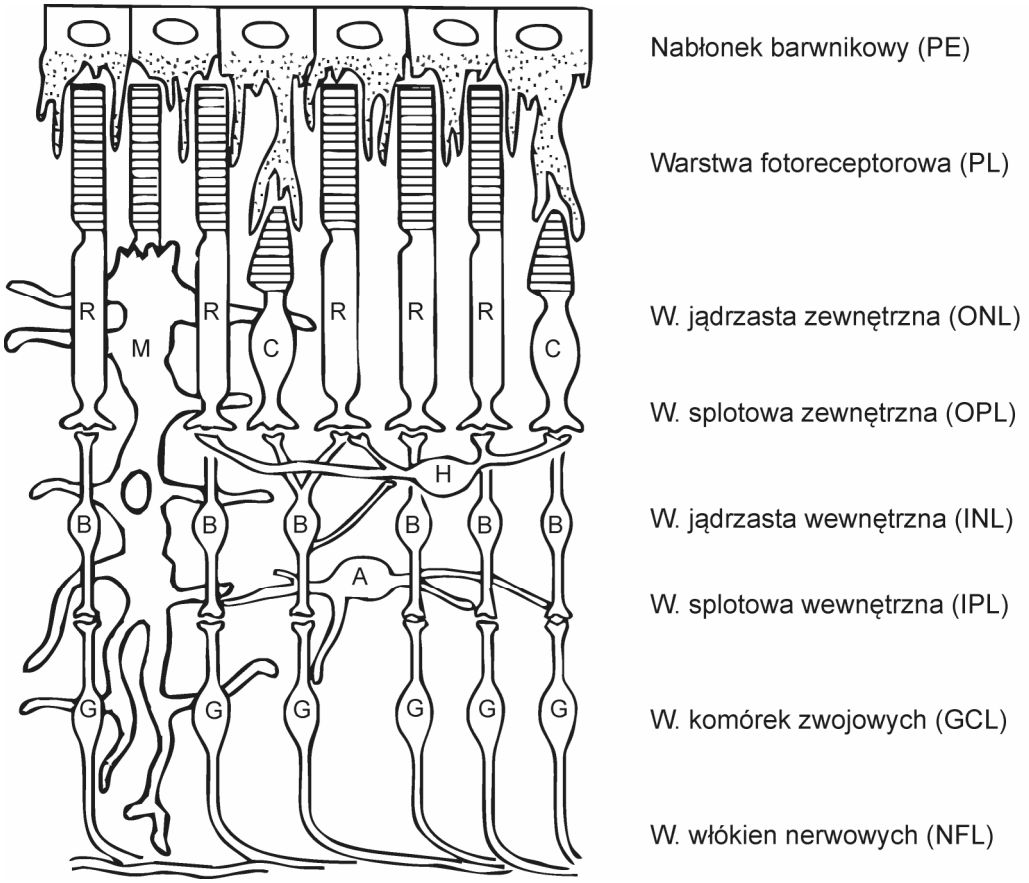
które łączą sąsiadujące fotoreceptory i komórki gleju Müllera. Oddziela PL od warstwy jądrzastej zewnętrznej.

4. **Warstwy jądrzastej zewnętrznej**(*outernuclear*layer, ONL) leżącej wewnętrznie (bliżej wnętrza oka) w stosunku do ELM i złożonej z ciał komórkowych fotoreceptorów, z jądrami komórkowymi i cytoplazmą. Ciała komórkowe czopków są większe niż pręcików i leżą zazwyczaj bardziej zewnętrznie w ONL, tj. bliżej ELM.
5. **Warstwy splotowej zewnętrznej**(*outerplexiformlayer*, OPL) – strefy połączeń między fotoreceptorami (pręcikami i czopkami) i neuronami pierwszego rzędu (komórkami dwubiegunowymi). Jest ona najgrubsza w okolicy dołka i cieńsza na obwodzie – staje się cieńsza z malejącą ku obwodowi liczbą fotoreceptorów.
6. **Warstwy jądrzastej wewnętrznej**(*innernuclearlayer*, INL) składającej się z czterech warstw ciał komórkowych. Od wewnątrz ku zewnątrz są to kolejno komórki amakrynowe (odpowiedzialne razem z komórkami horyzontalnymi za integrację sygnału pochodzącego z fotoreceptorów), komórki gleju Müllera, komórki dwubiegunowe i horyzontalne.
7. **Warstwy splotowej wewnętrznej**(*innerplexiformlayer*, IPL), która znajduje się między INL i warstwą komórek zwojowych. Jest to strefa, w której znajdują się synapsy między neuronami pierwszorzędowymi (komórki dwubiegunowe) i drugorzędowymi (komórki zwojowe). Pojedyncze komórki zwojowe lub ciała komórek amakrynowych mogą być przesunięte do IPL.
8. **Warstwy komórek zwojowych** (*ganglion celllayer*, GCL), która zawiera ciała komórkowe neuronów drugorzędowych, czyli komórek RGC.
9. **Warstwy włókien nerwowych** (*nuclearfiberlayer*, NFL) zbudowanej z aksonów RGC otoczonych wypustkami komórek glejowych. Aksony mogą różnić się wielkością zależnie od rozmiaru ciała RGC. Są zgrupowane w pęczki, ale czasami włókna z jednego pęczka mogą przechodzić do sąsiadującego. Włókna NFL są niezmielinizowane.
10. **Błony granicznej wewnętrznej**(*internallimitingmembrane*, ILM; niepokazana na rys. 1) – nitkowata „błona", która zbudowana jest głównie z komórek Müllera. ILM stanowi granicę między siatkówką nerwową a

http://rcin.org.pl

ciałem szklistym – galaretowatą substancją wypełniającą komorę tylną gałki ocznej.

Nerw wzrokowystrukturalnie różni się od innych nerwów czaszkowych. Osłonki jego aksonów wytwarzane są przez oligodendrocyty, podobnie jak w szlakach nerwowych w obrębie istoty białej OUN, podczas gdy w obwodowym układzie nerwowym aksony są mielinizowane przez komórki Schwanna. Nerw wzrokowy jest ponadto otoczony osłoną z trzech opon mózgowych – okołonerwową z opony miękkiej, środkową z pajęczynówki i zewnętrzną z opony twardej, która jest połączona z okostną w kanale nerwu wzrokowego. Jest on więc w pewnym sensie przedłużeniem istoty białej mózgu.

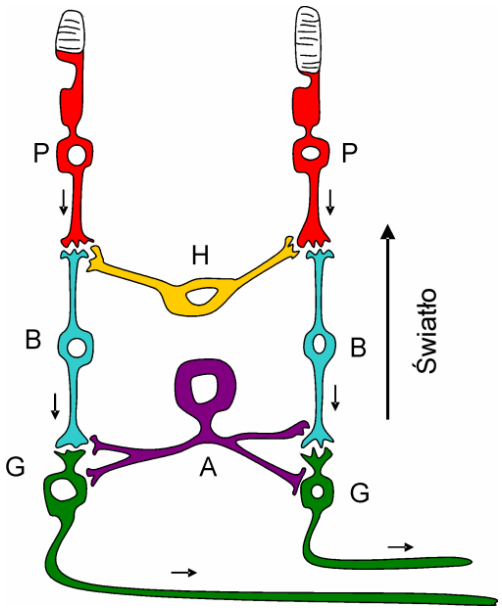


Rys. 1. Schemat budowy histologicznej siatkówki. R – pręcik, C – czopek, H – komórka horyzontalna, B – komórka dwubiegunowa, A – komórka amakrynowa, G – komórka zwojowa, M – komórka Müllera. Według Bloodgood (2003).

http://rcin.org.pl

1.1.2. Recepcja i przetwarzanie bodźców wzrokowych w siatkówce

Sygnały elektryczne w odpowiedzi na światło są generowane w **fotoreceptorach** – pręcikach i czopkach (Forrester i wsp. 2008, str. 43-48). Pręciki są odpowiedzialne za widzenie czarno-białe – recepcję kontrastu, jasności i ruchu. Czopki są natomiast odpowiedzialne za widzenie o dużej rozdzielczości, przestrzenne i widzenie kolorowe. Fotoreceptory to długie komórki składające się z zewnętrznego i wewnętrznego segmentu połączonego zmodyfikowaną rzęską. Zewnętrzne segmenty zawierają barwniki wzrokowe, które absorbują światło i inicjują sygnał elektryczny. Fotoreceptory przekazują sygnał komórkom dwubiegunowym i horyzontalnym (rys. 2).



Rys. 2. Uproszczony schemat połączeń nerwowych w obrębie siatkówki. Małymi strzałkami zaznaczono kierunek przekazywania impulsu nerwowego. P – fotoreceptory (pręciki i czopki), H – komórki horyzontalne, B – komórki dwubiegunowe, A – komórki amakrynowe, G – komórki zwojowe. Według: Bloodgood (2003).

Pręciki to długie (100-120 µm), smukłe komórki, których zewnętrzne segmenty zawierają barwnik rodopsynę, wrażliwą na niebiesko-zielone światło (maksimum absorbcji 496 nm). Pręciki cechuje wysoka wrażliwość na światło i dzięki temu mogą one służyć do widzenia w warunkach małej intensywności światła. Rodopsyna jest zawarta w licznych (do 1000 w komórce)

http://rcin.org.pl

dyskach otoczonych błoną komórkową. Dyski są produkowane u podstawy zewnętrznego segmentu pręcika i podlegają dość szybkiej wymianie – w ciągu 10 dni wędrują do szczytu pręcika, gdzie są fagocytowane przez komórki barwnikowe siatkówki (Forrester i wsp. 2008, str. 47).

Segmenty zewnętrzne czopków mają kształt stożkowaty (szersze u podstawy, węższe u szczytu) i są krótsze niż segmenty zewnętrzne pręcików. Cała komórka jest też krótsza od pręcika (60-75 μm). Dyski zewnętrznych segmentów czopków nie są otoczone błoną komórkową, mają też większy czas przeżycia niż dyski pręcików i są tworzone w inny sposób. Dyski czopków zawierają opsyny, bliskie analogi rodopsyny (Forrester i wsp. 2008, str. 47) o różnych maksimach absorbcji – u człowieka w zakresie światła niebieskiego, zielonego i czerwonego. Większość zwierząt o dziennym trybie życia posiada dwa rodzaje czopków (jeden czuły na fale o krótkiej długości, a drugi na fale długie). Małpy człekokształtne oraz człowiek mają trzy rodzaje czopków – wrażliwe na światło niebieskie, zielone i czerwone. Szczury posiadają dwa rodzaje czopków – wrażliwe na ultrafiolet i światło niebieskie (maksimum 359 nm) i światło zielone (510 nm; Hanson 2004b).

Fototransdukcja inicjowana jest przez białka światłoczułe – rodopsynę i opsyny czopków. Mechanizm ich aktywacji jest podobny i zostanie on opisany na przykładzie rodopsyny. Do aktywacji rodopsyny dochodzi w wyniku izomeryzacji związanego z rodopsyną retinalu. Światło powoduje zmianę izomeryczną retinalu z formy cis w postać trans i dysocjację rodopsyny do retinalu oraz białka opsyny. W wyniku zmiany konformacji opsyna może współdziałać z transducyną. W ciemności trans-retinol jest izomeryzowany z powrotem do 11-cis retinalu w komórkach barwnikowych (Forrester i wsp. 2008, str. .250-256).

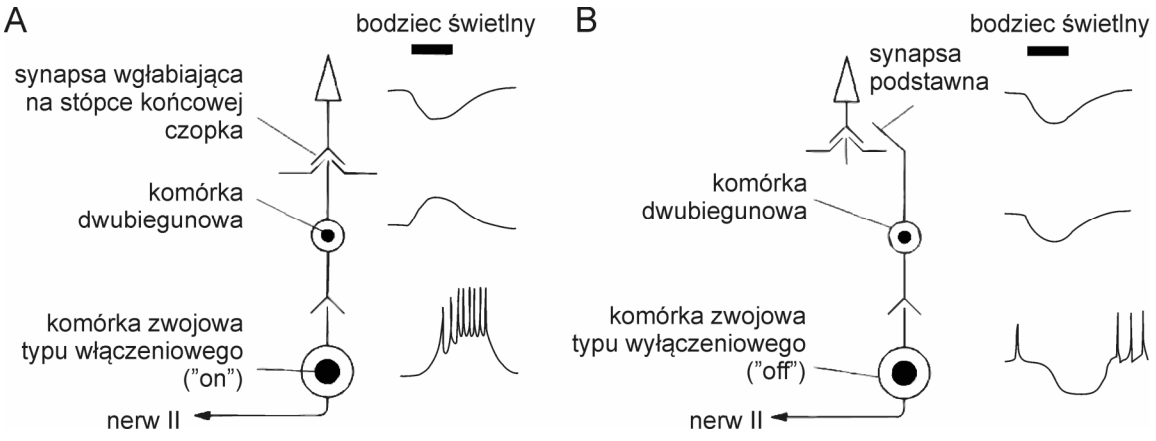
W ciemności kanały sodowe zewnętrznych segmentów pręcików są otwarte dzięki cyklicznemu guanozynomonofosforanowi (cGMP) syntetyzowanemu przez cyklazę guanylanową, co skutkuje utrzymywaniem relatywnej depolaryzacji komórki fotoreceptorowej w porównaniu do innych komórek (-57 vs. -78mV). W wyniku fotostymulacji rodopsyny dochodzi do aktywowania innych białek śródbłonowych – transducyny i fosfodiesterazy, co prowadzi do obniżenia stężenia cGMP w cytozolu. Następuje zamknięcie kanałów sodo-

http://rcin.org.pl

wych i hiperpolaryzacja komórki (-87 mV) – wygenerowany został sygnał elektryczny.

W ciemności kanały jonowe fotoreceptorów są otwarte, co skutkuje tzw. prądem ciemnościowym i intensywnym uwalnianiem neuroprzekaźnika glutaminianu w połączeniach synaptycznych między fotoreceptorami a komórkami dwubiegunowymi. Błysk światła powoduje zależną od intensywności światła hiperpolaryzację komórki fotoreceptorowej.

Czopki mają dwie drogi przekazywania sygnału składające się z czopków, komórek dwubiegunowych i zwojowych – kanały włączeniowe i wyłączeniowe (rys. 3). Reakcja na światło kolejnej komórki – komórki dwubiegunowej zależy od jej typu – włączeniowego („ON") bądź wyłączeniowego („OFF"; Longstaff 2002, str. 189-196). Komórki typu włączeniowego reagują na bodziec świetlny (powodujący spadek ilości glutaminianu wydzielanego przez czopki) depolaryzacją (bowiem glutaminian działając poprzez specyficzne dla siatkówki receptory metabotropowe utrzymuje zamknięte kanały sodowe i wywołuje hiperpolaryzację) przekazując sygnał komórce zwojowej. Tak więc komórki zwojowe typu włączeniowego zwiększają częstość generowania potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na zwiększanie intensywności światła.



Rys. 3. Kanał włączeniowy (A) i wyłączeniowy (B) w siatkówce. Odpowiedź (rejestrowana wewnątrzkomórkowo) na stymulację świetlną każdej grupy komórek przedstawiona jest z prawej strony. Według Longstaffa (2002), str. 191.

http://rcin.org.pl

Inaczej działają komórki dwubiegunowe typu wyłączeniowego, które reagują na glutaminian depolaryzacją, dzięki działaniu innego typu receptora dla glutaminianu (receptora jonotropowego). Bodziec świetlny wywołuje ich hiperpolaryzację. Tak więc bodziec świetlny powoduje zmniejszenie częstości generowania potencjałów czynnościowych wyłączeniowych komórek zwojowych.

Inaczej przebiega przekazywanie sygnału przez pręciki (Longstaff 2002, str. 189-196). Zależy ono od intensywności światła. W jasnym świetle (tzw. warunki fotopowe) pręciki nie przekazują sygnału, działają jedynie czopki. Przy świetle o mniejszej intensywności pręciki przesyłają sygnały poprzez synapsy do sąsiadujących z nimi czopków. Przy świetle o bardzo małej intensywności (tzw. warunki skotopowe, czyli nocne) przestają funkcjonować czopki – pręciki zaczynają funkcjonować samodzielnie. W ciemności zwiększony jest napływ jonów wapnia do pręcików („prąd ciemnościowy"), a jednym ze skutków zwiększonego stężenia wapnia jest zamknięcie złącz szczelinowych synaps elektrycznych między pręcikami a czopkami. Pręciki przesyłają wówczas sygnał do pręcikowych komórek dwubiegunowych.

Komórki horyzontalne (poziome) odpowiadają za mechanizm zwany hamowaniem obocznym. Pola recepcyjne komórek dwubiegunowych i zwojowych mają organizację współśrodkowych kół i składają się z centrum i otoczki. Stymulacja światłem ma inny charakter, gdy światło pada na centrum czy na otoczkę pola recepcyjnego – częstość potencjałów czynnościowych jest większa przy oświetleniu centrum. Za zjawisko to odpowiadają GABA-ergiczne komórki horyzontalne, które modyfikują wydzielanie glutaminianu przez fotoreceptory. Rolę modyfikującą sygnał mają również **komórki amakrynowe**, które są włączone w przekazywanie sygnału przez pręciki, a także mają udział w hamowaniu obocznym (Longstaff 2002, str. 189-196).Komórki amakrynowe i horyzontalne bezpośrednio modyfikują przekazywanie sygnału przez komórki dwubiegunowe poprzez uwalnianie neuroprzekaźników pobudzających (komórki horyzontalne) i hamujących (komórki horyzontalne i amakrynowe). Glutaminian to główny neuroprzekaźnik pobudzający komórek horyzontalnych, a GABA (kwas γ-aminomasłowy) jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym komórek horyzontalnych i amakrynowych. Transdukcję sygnałów wzrokowych mogą modyfikować komórki **gleju**

http://rcin.org.pl

Müllera (Newman i Reichenbach 1996), które modulują siatkówkowe przewodnictwo synaptyczne działając podobnie jak astrocyty w mózgu (Casson 2006; Newman 2003).

Komórki zwojowe odprowadzają informację z siatkówki poprzez nerw wzrokowy. Ich aksony są zmielinizowane po przejściu przez blaszkę sitową. Nerw wzrokowy, który tworzą aksony komórek zwojowych, wychodzi z siatkówki i gałki ocznej i dociera do skrzyżowania wzrokowego, usytuowanego tuż przed i poniżej przysadki mózgowej. W skrzyżowaniu wzrokowym włókna nerwowe wychodzące z nosowej części siatkówki przechodzą, a włókna nerwowe z bocznej części siatkówki nie przechodzą na drugą stronę. Włókna te docierają do czterech miejsc w mózgu: do ciała kolankowatego bocznego, do jądra przedpokrywowego, jądra nadskrzyżowaniowego i do wzgórka czworaczego górnego.

1.1.3. Ukrwienie i metabolizm siatkówki

Siatkówka jest tkanką o wysokiej (najwyższej spośród ludzkich tkanek) intensywności metabolizmu energetycznego (Forrester i wsp. 2008, str. 54-57). Odżywiana jest przez dwa odrębne układy naczyń krwionośnych, odległe o zaledwie kilkaset mikrometrów – naczynia krwionośne siatkówki i naczyniówkę. Naczynia siatkówki odżywiają wewnętrzną (położoną bliżej ciała szklistego) część siatkówki (ok. dwie trzecie jej przekroju), podczas gdy zewnętrzna (fotoreceptorowa) część siatkówki odżywiana jest przez naczyniówkę. Przepływ krwi przez naczyniówkę jest zdecydowanie większy niż przez naczynia siatkówki – przez naczyniówkę przepływa aż 85% krwi docierającej do całego oka, a przez naczynia siatkówki jedynie 4% (Forrester i wsp. 2008, str. 57-59).

Wewnętrzna część siatkówki jest zaopatrywana przez **tętnicę środkową siatkówki**, która jest odgałęzieniem tętnicy ocznej. W obrębie siatkówki tętnica środkowa dzieli się na gałęzie – duże rozgałęzienia tętnicy środkowej biegną przez NFL. W siatkówce istnieją dwa poziomy naczyń włosowatych (kapilar), które rozgałęziają się jak pajęczyna – splot wewnętrzny znajduje się na poziomie GCL, a splot zewnętrzny na poziomie INL. Kapilary są najgęściej utkane w obrębie plamki, a nieobecne w obrębie dołka. W obrę-

http://rcin.org.pl

bie zewnętrznej części siatkówki w warunkach fizjologicznych nie ma naczyń włosowatych pochodzących od tętnicy środkowej siatkówki.

Naczyniówka jest błoną leżącą między siatkówką a twardówką, homologiczną do opony pajęczynowej mózgu (Forrester i wsp. 2008, str. 57-61). Najbardziej wewnętrzna warstwa naczyniówki zwana jest błoną Brucha. Przepływ krwi przez kapilary naczyniówki jest jednym z najszybszych w organizmie. Pierwotną funkcją naczyniówki jest odżywianie siatkówki zewnętrznej. Otacza ona też naczynia biegnące do pozostałych części oka i może mieć funkcję termoregulacyjną. Przepływ krwi przez naczyniówkę ma wpływ na ciśnienie śródgałkowe (Forrester i wsp. 2008, str. 57-61).

1.2. Metabolizm wolnych rodników i ich rola w schorzeniach siatkówki

Z metabolizmem komórkowym wiąże się powstawanie tzw. reaktywnych form tlenu i azotu (*reactiveoxygen and nitrogenspecies*, ROS i RNS), w większości będących wolnymi rodnikami (tj. cząsteczkami mającymi niesparowany elektron). ROS i RNS są silnymi utleniaczami, ale w warunkach fizjologicznych nie stanowią zagrożenia dla komórek, gdyż ich poziom jest precyzyjnie regulowany – utrzymywana jest komórkowa „homeostaza redoks", czyli równowaga pomiędzy tworzeniem i usuwaniem substancji będących utleniaczami. Zaburzenia tej równowagi, zwykle prowadzące do zwiększenia stężeń ROS i/lub RNS i zwane stresem oksydacyjnym, powodują uszkodzenia kluczowych dla funkcjonowania komórek molekuł – białek, nienasyconych lipidów, a także kwasów nukleinowych (McCord 2000).

Uważa się, że komórki siatkówki są szczególnie narażone na uszkodzenia powodowane przez reaktywne formy tlenu i azotu. Po pierwsze, siatkówka jest organem o intensywnym metabolizmie tlenowym i – co za tym idzie – produkcja wolnych rodników przez metabolizm komórek siatkówki jest bardziej intensywna niż w innych narządach. Po drugie, zawiera ona dużą ilość substancji o własnościach fotouczulających i jest często eksponowana na światło, co także skutkuje powstawaniem wolnych rodników tlenowych; szkodliwe jest zwłaszcza promieniowanie świetlne o wysokiej energii, a więc o krótkiej długości fali (Algvere i wsp. 2006).Po trzecie, komórki siatkówki,

http://rcin.org.pl

a w szczególności zewnętrzne segmenty fotoreceptorów zawierają wyjątkowo dużo wielonienasyconych kwasów tłuszczowych podatnych na uszkodzenia wolnorodnikowe w mechanizmie tzw. peroksydacji łańcuchowych (opisanym w dalszej części rozdziału). W związku z powyższym stres oksydacyjny i wolnorodnikowe uszkodzenia ważnych biologicznie cząsteczek odgrywać mają rolę istotnego czynnika patogenetycznego w wielu chorobach siatkówki, a przede wszystkim w jaskrze (Kumar i Agarwal 2007; Tezel 2006) i w AMD (Winkler i wsp. 1999). Przedstawienie hipotez dotyczących kluczowej roli wolnych rodników w patogenezie tych dwóch chorób (rozdz. 1.3.3.1 i 1.4.2.1) poprzedzone jest krótkim wprowadzeniem dotyczącym przemian wolnych rodników w komórce.

Komórkowe reakcje wolnorodnikowe są nieodwracalne i tworzą kaskadę (rys. 4), której początkiem jest **anionorodnik ponadtlenkowy** ($O_2^{\bullet-}$). Ten wolny rodnik jest generowany w mitochondriach (Turrens 2003a) – szacuje się, że 2-4% tlenu metabolizowanego przez mitochondrialny łańcuch oddechowy jest przekształcane w ROS (Morre i wsp. 2000). $O_2^{\bullet-}$ jest także produktem pewnych reakcji enzymatycznych przebiegających poza mitochondriami, w szczególności reakcji utleniania NADH prowadzonej przez niemitochondrialne oksydazy NADH zwane NOX (Sorce i Krause 2009). Niektóre izoenzymy NOX są końcowym składnikiem „błonowych łańcuchów oddechowych" zwanych PMOR (*plasmamembraneoxidoreductase*), których obecność stwierdzano w różnych rodzajach komórek, w tym w komórkach neuronalnych (Wright i Kuhn 2002). Błonowe NOX znajdujące się na powierzchni komórek, nazywane ECTO-NOX (Morre i Morre 2003), wytwarzają anionorodnik ponadtlenkowy do płynu pozakomórkowego. Inne izoformy NOX produkują $O_2^{\bullet-}$ wewnątrzkomórkowo.

Anionorodnik ponadtlenkowy jest chemicznie stosunkowo mało reaktywny. Wskazywano, że – paradoksalnie – cecha ta może potęgować jego toksyczność, gdyż dzięki niej $O_2^{\bullet-}$ może działać niszcząco na biologicznie istotne cząsteczki zlokalizowane daleko od miejsca jego powstania (Halliwell i Gutteridge 1984). Czynnikami bezpośrednio uszkadzającymi komórki mogą być zarówno metabolity $O_2^{\bullet-}$ takie jak rodnik hydroksylowy i nadtlenoazotyn, jak i $O_2^{\bullet-}$ jako taki (Benov 2001).

http://rcin.org.pl

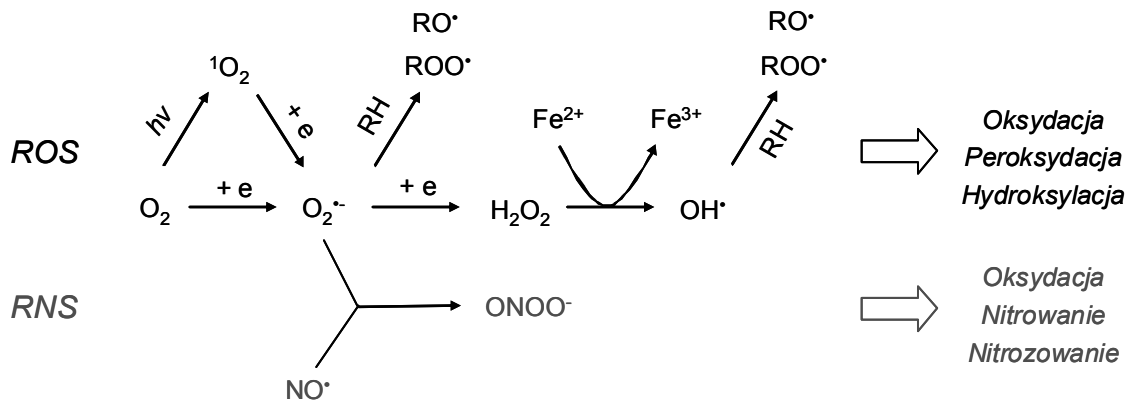
Dodatkowym źródłem anionorodników ponadtlenkowych, powstającym w reakcjach fotosensytyzacji przebiegających *in vivo* w siatkówce, jest **tlen singletowy** ($^1O_2$). Nie jest on wolnym rodnikiem, ale jest zaliczany do ROS, gdyż jest cząsteczką wysoce reaktywną; niektórzy autorzy uważają, że może jako taki uszkadzać błony i inne składniki komórki (Winkler i wsp. 1999). Tlen singletowy ulega szybkiej redukcji do $O_2^{\bullet-}$.

Z anionorodnika ponadtlenkowego w wyniku reakcji dysmutacji powstaje **nadtlenek wodoru**(H_2O_2), który jest nierodnikową reaktywną formą tlenu o najdłuższym okresie półtrwania. Może on przenikać przez błony biologiczne. W wyniku reakcji Fentona z udziałem jonów żelaza (II) z nadtlenku wodoru powstaje rodnik hydroksylowy ($OH^{\bullet}$, Buonocore i wsp. 2010).

Rodnik hydroksylowy jest uważany za utleniacz najbardziej szkodliwy dla komórek (Cheng i wsp. 2002). Ma on bardzo krótki okres półtrwania idziała lokalnie, bardzo blisko miejsca powstania. Reaguje głównie z grupami alkilowymi – odrywając atom wodoru, lub z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi - w wyniku reakcji przyłączenia (addycji) do wiązań podwójnych inicjując tzw. łańcuchowe peroksydacje.

Nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), powstający w wyniku reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu, nie jest wolnym rodnikiem, jest jednak silnym utleniaczem i związkiem o silnych właściwościach nitrujących. Nitruje reszty tyrozynowe białek (tworząc nitrotyrozynę) modyfikując w ten sposób aktywność enzymów i zwiększając podatność białek na proteolizę (Abello i wsp. 2009). Wchodzi również w reakcje z lipidami powodując oksydację kwasów tłuszczowych, oraz indukuje pęknięcia nici DNA (Ascenzi i wsp. 2010).

http://rcin.org.pl



Rys. 4. Kaskada reakcji wolnorodnikowych i najważniejsze reaktywne formy tlenu i azotu (ROS i RNS). W wyniku wzbudzenia światłem z tlenu cząsteczkowego powstaje wzbudzony tlen singletowy ($^1O_2$), który ulega przekształceniu do anionorodnika ponadtlenkowego. Z tlenu cząsteczkowego powstaje też, w wyniku redukcji jednoelektronowej, anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$). $O_2^{\bullet-}$ jako taki prawdopodobnie inicjuje łańcuchową peroksydację lipidów, a także reagując z tlenkiem azotu ($NO^{\bullet}$) tworzy nadtlenoazotyn ($ONOO^-$). W wyniku dysmutacji $O_2^{\bullet-}$ powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2), z którego w obecności jonów żelaza (II) powstaje rodnik hydroksylowy ($OH^{\bullet}$). $OH^{\bullet}$ inicjuje łańcuchową peroksydację lipidów. Rysunek na podstawie Amatore i Arbault (2007), zmieniony.

ROS i RNS wchodzą w reakcje z różnymi biologicznie ważnymi molekułami. Szczególnie szkodliwym procesem jest tzw. **łańcuchowa peroksydacja lipidów**, która prowadzi do upośledzenia funkcjonowania błon biologicznych: wpływa na ich płynność, przepuszczalność, transport jonów i hamuje procesy metaboliczne. Peroksydacja lipidów błony mitochondrialnej (np. kardiolipiny) może indukować apoptozę (Kagan i wsp. 2009). Szczególnie podatne na peroksydację są lipidy zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe (*polyunsaturatedfattyacids*, PUFA). Łańcuchowa peroksydacja lipidów przebiega w trzech fazach: inicjacji, propagacji i terminacji. W fazie inicjacji dochodzi do odszczepienia atomu wodoru od cząsteczki lipidu w wyniku reakcji z różnymi rodnikami (np. $OH^{\bullet}$) i powstaje rodnik alkilowy ($R^{\bullet}$). $R^{\bullet}$ w reakcjach propagacji reaguje z tlenem, tworząc rodniki peroksylowe ($ROO^{\bullet}$), które mogą odrywać atomy wodoru od kolejnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (RH). W wyniku reakcji powstają nadtlenki kwasów tłuszczowych ROOH. Cykl może się powtarzać wielokrotnie, dzięki czemu pojedynczy rodnik hydroksylowy może uszkodzić kilkaset łańcuchów PUFA. Łańcuchowa reakcja

http://rcin.org.pl

ulega zakończeniu (terminacji) w wyniku rekombinacji wolnych rodników – powstaje produkt, który nie jest już wolnym rodnikiem (Catala 2010). Niektórzy autorzy uważają, że anionorodnik ponadtlenkowy odgrywa podwójną rolę, będąc zarazem inicjatorem i terminatorem łańcucha peroksydacji lipidów (McCord 2008).

Komórki posiadają szereg mechanizmów chroniących je przed szkodliwym oddziaływaniem wolnych rodników – zawierają enzymy antyoksydacyjne i antyoksydanty niskocząsteczkowe. Za „pierwszą linię obrony" przed szkodliwością ROS uważa się **dysmutazy ponadtlenkowe**, które katalizują reakcję dysmutacji $O_2^{\bullet-}$ (przekształcenie $O_2^{\bullet-}$ do H_2O_2). Reakcja ta, co prawda, zachodzi samorzutnie – ale brak katalizatora skutkowałby zwiększeniem stężenia $O_2^{\bullet-}$ prowadzącym do zwiększenia intensywności łańcuchowej peroksydacji lipidów, oraz wytwarzania szczególnie niebezpiecznych dla komórek RNS. U ssaków znane są trzy dysmutazy ponadtlenkowe: izoforma „cytoplazmatyczna" (CuZn-SOD, SOD-1), występująca w macierzy mitochondrialnej izoforma „mitochondrialna" (Mn-SOD, SOD-2) oraz izoforma „zewnątrzkomórkowa" (EC-SOD, SOD-3). Za większość (50-80%) tkankowej aktywności SOD odpowiada SOD-1 (Faraci i Didion 2004). Szczególnie istotna dla funkcjonowania organizmu jest jednak SOD-2: u myszy *knockout* genu dla tego enzymu był letalny (Huang i wsp. 2001), a obniżenie jego aktywności (*Sod2*$^{+/-}$) prowadziło do śmierci neuronów i progresji nowotworów (Van Remmen i wsp. 2003).

Wielu autorów uważa, że niedobór SOD odgrywa znaczącą rolę w patogenezie licznych chorób, w tym schorzeń neurodegeneracyjnych (Noor i wsp. 2002; Johnson i Giulivio, 2005). Podejmowano próby opracowania terapii polegających na zwiększaniu aktywności SOD poprzez podawanie egzogennego enzymu. Testowano m.in. preparat wołowego SOD-1 (Marberger i wsp. 1974), pegylowany (zmodyfikowany poprzez kowalencyjne przyłączenie glikolu polietylenowego) SOD (Veronese i wsp. 2002), połączenia SOD z lecytyną (Broeyer i wsp. 2008) oraz rekombinowany SOD zamknięty w kapsułach liposomalnych (Riedl i wsp. 2005). Jednak w ten sposób można zwiększyć aktywność SOD co najwyżej w płynie pozakomórkowym, ale nie we wnętrzu komórek. Podejściem alternatywnym jest stosowanie niskocząsteczkowych

http://rcin.org.pl

związków o aktywności SOD – mimetyków SOD. Jednym z takich związków jest tempol.

1.3. Jaskra

Jaskra to postępująca przewlekła choroba oczu prowadząca do stopniowej utraty widzenia. Zmiany przebiegają bardzo powoli i często niezauważalnie, i dlatego jaskrę nazywa się „podstępnym złodziejem wzroku".

Zmiany chorobowe w jaskrze dotyczą przede wszystkim RGC, których wybiórczą śmierć uważa się obecnie za wyróżnik jaskry (Kaushik i wsp. 2003; Wein i Levin 2002). W konsekwencji dochodzi do degeneracji aksonów RGC i uszkodzenia nerwu wzrokowego, które jest widoczne jako zmiany w jego tarczy. Nowsze badania wskazują, że zmiany w jaskrze występują także wzdłuż całej drogi wzrokowej, oraz w korze wzrokowej (Gupta i Yucel 2007). W eksperymentalnej jaskrze wywołanej zablokowaniem odpływu cieczy wodnistej u małp obserwowano zanik neuronów ciała kolankowatego bocznego (Yucel i wsp. 2000), a przy pomocy obrazowania rezonansem magnetycznym obserwowano zanik istoty białej w obrębie promienistości wzrokowej u pacjentów z jaskrą przebiegającą z normalnym ciśnieniem śródgałkowym (*intraocularpressure*, IOP; Stroman i wsp. 1995). Obserwowano także zmniejszenie wysokości skrzyżowania nerwu wzrokowego (Iwata i wsp. 1997) i zmniejszenie grubości kory wzrokowej (Boucard i wsp. 2009) u pacjentów z różnymi postaciami jaskry.

Wyróżnia się kilka typów jaskry (Whitmore i wsp. 2005). Najczęstsza jest pierwotna jaskra otwartego kąta przesączania, w której dochodzi do utrudnienia w odpływie cieczy wodnistej (płynu wypełniającego komory oka) powodowanego nieprawidłową strukturą tzw. kąta przesączania, siateczkowato utkanej przestrzeni pomiędzy tylną obwodową powierzchnią rogówki a przednią nasadą tęczówki. Inny typ jaskry, pierwotna jaskra zamkniętego kąta, charakteryzuje się ostrymi objawami powodowanymi zamknięciem kąta przesączania. Wyróżnia się także jaskry wtórne, wywołane m. in. depigmentacją, zapaleniem, neowaskularyzacją (nowotworzeniem naczyń krwionośnych) czy urazem. Jaskra może też być wrodzona - jest wówczas często wynikiem wad komory przedniej oka.

http://rcin.org.pl

1.3.1. Rola podwyższonego ciśnienia śródgałkowego w jaskrze

Historycznie jaskra definiowana była jako schorzenie polegające na podwyższeniu IOP powyżej 21 mm Hg. Uważano zarazem, że przyczyną stopniowej utraty wzroku w tej chorobie jest właśnie nadciśnienie śródgałkowe. Późniejsze badania wykazały jednak, że wiele osób z IOP powyżej 21 mm Hg nie rozwija jaskry (stan taki obecnie określa się jako „nadciśnienie oczne"). Wg Kass i wsp. (2002) co najmniej połowa pacjentów z nieleczonym podwyższonym IOP nigdy nie rozwinie jaskry. Zarazem u niektórych chorych na jaskrę IOP nigdy nie przekracza 21 mm Hg (ten typ choroby określa się terminem „jaskra normalnociśnieniowa"); ocenia się, że nawet do jednej trzeciej wszystkich pacjentów z jaskrą ma normalne IOP (Douglas 1998). Tak więc podwyższone IOP nie jest ani wystarczające, ani konieczne do zdiagnozowania i rozwoju jaskry. Podwyższone IOP jest jednak nadal uważane za główny czynnik ryzyka tej choroby.

W niektórych przypadkach jaskry przebiegającej z podwyższeniem IOP proces chorobowy nie zatrzymuje się mimo farmakologicznego obniżenia IOP. W związku z tym wysunięto hipotezę, że proces wybiórczej eliminacji RGC w jaskrze może być dwufazowy: po pierwotnym uszkodzeniu powodującym śmierć niektórych komórek zwojowych następuje wtórny, powolny proces degeneracji powodowanej „toksycznym środowiskiem" generowanym przez umierające komórki (Schwartz 2001; Schwartz i Yoles 2000). Przebieg tych procesów przypomina przebieg uszkodzenia aksonów w wyniku urazu: pierwotne uszkodzenie spowodowane bezpośrednio przez uraz może mieć ograniczony zasięg, a dalsze uszkodzenia wtórne powodowane są przez niedobór czynników wzrostowych i toksyczne czynniki uwalniane z uszkodzonych komórek (Buki i Povlishock 2006).

Podwyższone IOP może zaburzać transport aksonalny w nerwie wzrokowym (Anderson i Hendrickson 1974; Quigley i Anderson 1976). Dotyczyć to ma m. in. wstecznego transportu czynników neurotroficznych z mózgu do siatkówki, który jest niezbędny dla utrzymania RGC przy życiu. W modelach doświadczalnych wykazano, że podwyższone IOP hamuje transport wsteczny czynnika wzrostu pochodzenia mózgowego (*brainderivedneurotrophicfactor*, BDNF) i jego receptora, TrκB (Pease i wsp. 2000; Quigley i wsp. 2000).

http://rcin.org.pl

Według innej hipotezy uszkodzenie mechaniczne nerwu wzrokowego następować może nie tyle w wyniku podwyższenia ciśnienia śródgałkowego, co w wyniku zwiększenia różnicy pomiędzy IOP a ciśnieniem wewnątrzczaszkowym (*intracranialpressure*, ICP; Berdahl i Allingham 2010). Nerw wzrokowy jest bowiem szczególnie narażony na siły działające w poprzek blaszki sitowej (*lamina cribrosa*). U zdrowego człowieka na blaszkę sitową o grubości 450 µm działa ciśnienie średnio 4 mm Hg (różnica między IOP a ICP), co oznacza, że gradient ciśnienia dochodzi do 1 mm Hg/100 µm. Jest to prawdopodobnie jedna z największych różnic ciśnień, na jaką narażony jest stale jakikolwiek nerw w organizmie (Berdahl i Allingham 2010). U chorych na jaskrę ten gradient jest większy także dlatego, że mają oni cieńszą blaszkę sitową (Jonas i wsp. 2004). Hipoteza ta wyjaśniać może mechanizm uszkadzania nerwu wzrokowego w jaskrze normotensyjnej, w której normalnemu IOP towarzyszy obniżone ICP (Ren i wsp. 2010). Możliwość uszkodzenia komórek zwojowych siatkówki w wyniku zwiększenia różnicy pomiędzy IOP i ICP została potwierdzona eksperymentalnie. Yablonski i wsp. (1979) stwierdzili, że obniżenie ciśnienia wewnątrzczaszkowego u kotów prowadziło do jaskrowego uszkodzenia nerwu wzrokowego, a równoczesne obniżenie ciśnienia śródgałkowego zapobiegało temu uszkodzeniu.

1.3.2. Zwierzęce modele jaskry

Badania nad etiologią jaskry prowadzone na ludziach mogą mieć charakter jedynie obserwacyjny. Więcej informacji można uzyskać badając zwierzęce modele tej choroby.

Trafny zwierzęcy model choroby ludzkiej powinien dostarczać informacji na temat jej patogenezy. W tym celu powinien być analogiem choroby ludzkiej nie tylko pod względem objawów klinicznych, ale przede wszystkim pod względem podobieństwa zmian chorobowych na różnych poziomach – od makroskopowego po ultrastrukturalny. Powinien odtwarzać charakterystyczne cechy choroby. W przypadku jaskry taką charakterystyczną cechą jest wybiórcza śmierć RGC.

Dobry model powinien także być przydatny do testowania nowych strategii terapeutycznych. Trafne przewidywanie klinicznej skuteczności nowych

http://rcin.org.pl

terapii (tzw. zdolność predykcyjna modelu) jest warunkiem jego wykorzystywania w badaniach typu *proof of concept*(dowodzących trafności koncepcji).

1.3.2.1. Jaskra wywoływana podwyższeniem ciśnienia śródgałkowego

Najczęściej używanym doświadczalnym modelem jaskry jest eksperymentalnie wywołane nadciśnienie śródgałkowe. Podwyższone IOP u naczelnych jest najczęściej indukowane laserową fotokoagulacją siateczki beleczkowej (tkanki w kącie przesączania), co powoduje utrudnienie odpływu cieczy wodnistej. Inne metody wywołania doświadczalnej jaskry u małp polegały na wstrzykiwaniu do przedniej komory oka mikrosfer lateksowych, żelu poliakrylamidowego, chymotrypsyny – enzymu rozkładającego składniki macierzy pozakomórkowej lub podawaniu sterydów w postaci kropli. Metody te dawały jednak wyniki mniej powtarzalne niż fotokoagulacja (Rasmussen i Kaufman 2005).

Ze względu na koszty i dostępność zwierząt częściej używane są modele eksperymentalnej jaskry u gryzoni. Również i w tym przypadku podwyższone IOP jest wywoływane najczęściej przez laserową fotokoagulację tkanek w kącie przesączania. Stosuje się także fotokoagulację naczyń nadtwardówkowych i rąbkowych. Uszkodzenie odpływu cieczy wodnistej przez kąt przesączania można wywołać wstrzykując do żył nadtwardówkowych hipertoniczny roztwór soli. Chroniczne podwyższenie IOP osiągano poprzez przyżeganie dwóch lub więcej żył nadtwardówkowych, wstrzykiwano także inne substancje wywołujące podwyższenie IOP (np. adjuwant Freunda; Johnson i Tomarev 2010). Poszczególne modele różniły się między sobą relacją podwyższeniaciśnienia do stopnia uszkodzenia nerwu wzrokowego, a więc zapewne także mechanizmem, poprzez który podwyższone ciśnienie uszkadza siatkówkę (Morrison 2005).

1.3.2.2. Jaskra wywoływana aksotomią lub zmiażdżeniem nerwu wzrokowego

Inna „rodzina” modeli używanych w badaniach nad mechanizmami jaskrowej degeneracji komórek zwojowych siatkówki wykorzystuje przecięcie (aksotomię) bądź zmiażdżenie nerwu wzrokowego.

http://rcin.org.pl

Przecięcie nerwu wzrokowego jest uznawane za wartościowy model dla badania mechanizmów, które przyczyniają się do wybiórczej śmierci RGC (Kermer i wsp. 2001). Do śmierci tej dochodzi pomiędzy 5. a 14. dniem po aksotomii; zjawisko to ma charakter masowy i w 14. dniu pozostaje już tylko ok. 15 % żywych komórek (Peinado-Ramon i wsp. 1996; Villegas-Perez i wsp. 1993). Wykazano, że szereg substancji hamuje śmierć RGC po aksotomii, a wśród nich na szczególną uwagę zasługuje BDNF. W wielu badaniach stwierdzono, że podanie tego czynnika wzrostu opóźnia śmierć RGC po aksotomii, chociaż gdy ta substancja jest podawana chronicznie, ochrona jest krótkotrwała (Isenmann i wsp. 1998; Mey i Thanos 1993).

W częściowym zmiażdżeniu nerwu wzrokowego (*partialopticnerve-crush*, PONC) nerw ten jest w odcinku pozaczaszkowym częściowo miażdżony w wystandaryzowany sposób. Uważa się, że PONC powoduje wsteczną degenerację aksonów RGC i prowadzi do stosunkowo szybkiej (postępującej w ciągu kilku dni do kilku tygodni) wybiórczej eliminacji RGC (Kreutz i wsp. 1999; Levkovitch-Verbin i wsp. 2006; Naskar i wsp. 2002).

Zgodnie z jedną z hipotez dotyczących patomechanizmu jaskry, zarówno przebiegającej z wysokim IOP jak i normotensyjnej, w chorobie tej dochodzi do mechanicznego uszkodzenia nerwu wzrokowego w blaszce sitowej w wyniku różnicy ciśnień śródgałkowego i wewnątrzczaszkowego (por. rozdz. 1.2.2). W modelu PONC mechanizmy prowadzące do wybiórczej śmierci RGC mogą więc być podobne, jak w jaskrze – może on więc być szczególnie wartościowy zarówno dla badań patomechanizmów tego schorzenia, jak i dla przedklinicznych ocen leków mających hamować proces jaskrowej degeneracji siatkówki.

1.3.2.3. Jaskra wywołana ekscytotoksycznością

Jednym z ważnych mechanizmów biorących udział w jaskrowym uszkodzeniu RGC może być nadmierne pobudzenie receptorów glutaminianergicznych wywołujące zjawisko ekscytotoksyczności (tj. toksyczności wywołanej neurotransmiterem pobudzającym). Ekscytotoksyczność w siatkówce zwierząt doświadczalnych można wywołać poprzez podanie agonistów jonotropowych receptorów glutaminianergicznych. Skutkiem jest wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia prowadzący do upośledzenia funkcji

http://rcin.org.pl

i śmierci meuronów (Johnson i Tomarev 2010). Śmierć komórkowa wywołana podaniem tych substancji jest – co prawda – ograniczona do wewnętrznej części siatkówki, ale nie dotyczy tylko RGC – uszkodzone są też komórki w obrębie INL (Sun i wsp. 2001). Nie obserwuje się jednak znaczącej degeneracji komórek w warstwie ONL – prawdopodobnie ekspresja receptorów dla glutaminianu jest na komórkach fotoreceptorowych na zbyt niskim poziomie (Yang 2004).

Stosowano różne schematy podawania i rózne dawki ekscytotoksycznych substancji. Wielokrotne podawanie niskich dawek glutaminianu do ciała szklistego (2,5 nmola dziennie przez pięć dni) powodowało śmierć 42% RGC w przeciągu następnych trzech miesięcy (Vorwerk i wsp. 1996). Częściej stosowane były modele polegające na doszklistkowym podaniu pojedyńczej większej dawki (20-200 nmol) glutaminianu, NMDA lub kwasu kainowego. Neurodegenerację obserwowano wówczas już po godzinie od wstrzyknięcia (Li i wsp. 2002). Manabe i Lipton (2003) pokazali, że optymalne jest jednorazowe doszklistkowe podanie 20 nmoli NMDA – gdyż prowadzi to do powtarzalnej i znacznej (po jednym dniu wymierało ok. 80% komórek) utraty RGC. Podawanie większych dawek NMDA nie powodowało znacząco większej utraty RGC.

1.3.3. Mechanizmy wybiórczej śmierci komórek zwojowych w jaskrze

Jaskrowa neuropatia wzrokowa jest często procesem trwającym wiele lat, a mechanizmy śmierci RGC wydają się być wieloczynnikowe. Do czynników ryzyka jaskry należą wysokie IOP, podeszły wiek i zachorowania na jaskrę u krewnych I-go stopnia (Farkas i Grosskreutz 2001; Leske i wsp. 1995).

Historycznie dwie hipotezy dotyczące patogenezy jaskry to mechaniczna i naczyniowa (Flammer i wsp. 2002). Zgodnie z hipotezą mechaniczną przyczyną jaskry jest uszkodzenie nerwu wzrokowego i/lub tarczy nerwu wzrokowego powodowane przez wysokie IOP (lub, być może, przez podwyższony gradient IOP-ICP). Zgodnie z hipotezą naczyniową uszkodzenie RGC i/lub tarczy nerwu wzrokowego następuje w wyniku niedokrwienia siatkówki i/lub nerwu wzrokowego spowodowanego zmniejszeniem przepływu krwi przez siatkówkę. Żadna z tych hipotez nie precyzuje jednak mechanizmów

http://rcin.org.pl

prowadzących do wybiórczej śmierci RGC będącej istotą procesu neurodegeneracji jaskrowej. Obecnie, przede wszystkim na podstawie wyników badań wykonanych na zwierzęcych modelach jaskry, wskazuje się na możliwy udział wielu mechanizmów, z których najważniejsze są omówione poniżej.

Odrębnym pytaniem jest kwestia sposobu umierania RGC w jaskrze. Dwa główne rodzaje śmierci komórkowej to śmierć nekrotyczna – chaotyczny rozpad komórki o szybkim przebiegu, następujący w wyniku znacznego jej uszkodzenia – i apoptotyczna – umieranie przebiegające wolniej, wymagające uruchomienia specyficznych mechanizmów komórkowych (aktywacji endonukleaz, i in.), uporządkowane i podlegające regulacji[1]. Odpowiedź na pytanie, jaką śmiercią umierają RGC w przebiegu jaskry, może być istotna - bowiem jeśli umierają one na drodze apoptozy, to – jak się wydaje – można podejmować próby farmakologicznego zatrzymania tego procesu.

Oznaki śmierci apoptotycznej zaobserwowano w niektórych modelach zwierzęcych jaskry – np. po przecięciu nerwu wzrokowego u szczurów, królików i małp (Garcia-Valenzuela i wsp. 1994). W modelu jaskry dziedzicznej przebiegającej spontanicznie (u myszy DBA/2J) apoptozę komórek zwojowych obserwowano od początku procesu, a obrazy nekrozy RGC pojawiały się dopiero w późnym stadium choroby (Schuettauf i wsp. 2004). Ustalenie, czy procesy apoptotycznej śmierci RGC zachodzą też w oczach pacjentów dotkniętych jaskrą jest znacznie trudniejszym zadaniem, ale pewne obserwacje wskazują, że apoptoza odgrywa istotną rolę w wybiórczej śmierci komórek zwojowych u ludzi (Kerrigan i wsp. 1997; Okisaka i wsp. 1997; Tatton i wsp. 2001).

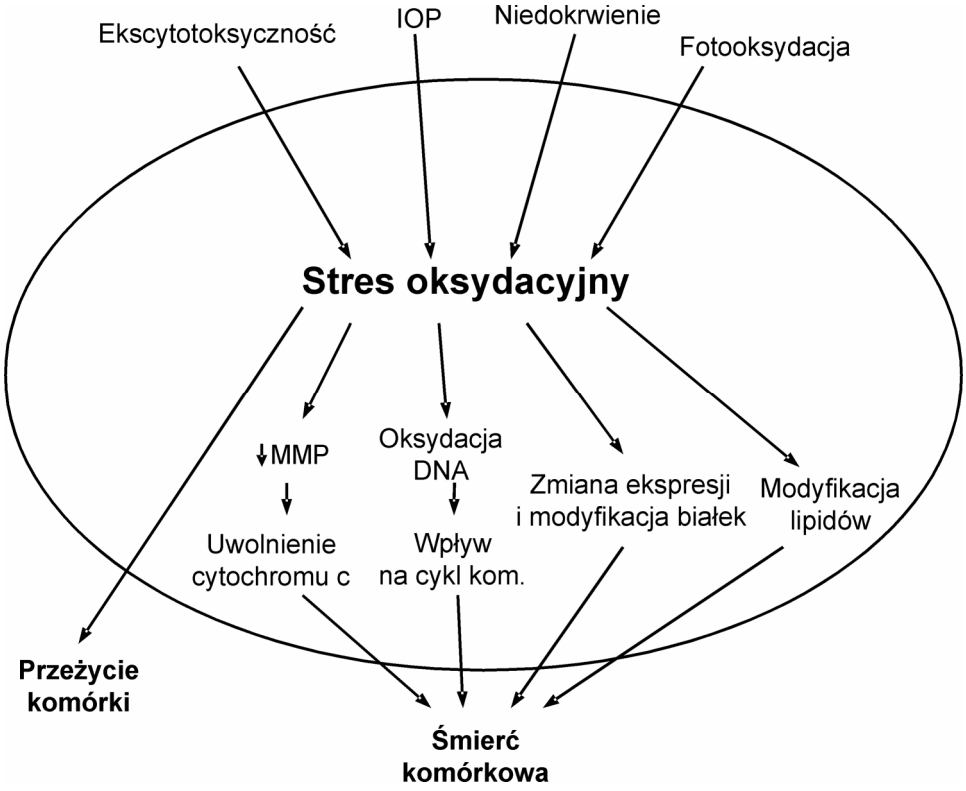
1.3.3.1. Rola stresu oksydacyjnego

Uważa się, że jednym z głównych mechanizmów prowadzących do uszkodzenia RGC w jaskrze jest stres oksydacyjny (Kumar i Agarwal 2007). Stres oksydacyjny w tkankach jest wynikiem nadmiernej produkcji (głównie w mitochondriach, ale też w błonach komórkowych, por. rozdz. 1.2) i/lub

[1] Obecnie wielu autorów opowiada się jednak za koncepcją tzw. kontinuum nekrotyczno-apoptotycznego. Według niej w śmierć komórek zaangażowane są zarówno mechanizmy nekrotyczne, jak i apoptotyczne, a to, który z mechanizmów przeważa, zależy od nasilenia i rodzaju uszkadzającego bodźca, a także od stanu fizjologicznego i stopnia dojrzałości komórki (Formigli i wsp. 2004).

http://rcin.org.pl

niewystarczającego usuwania wolnych rodników tlenowych i/lub azotowych. Rodniki te są produktem ubocznym normalnych procesów komórkowych, a także mogą pojawiać się w większych ilościach w wyniku nadmiernego pobudzenia receptorów glutaminianergicznych. Nadmierny stres wolnorodnikowy może zaś powodować apoptozę. Mechanizmy, w wyniku których może dochodzić do nadmiernego stresu oksydacyjnego i za pośrednictwem których może on przyczyniać się do śmierci komórkowej zostały zilustrowane na rys. 5.



Rys. 5. Możliwe mechanizmy indukcji i konsekwencje zwiększonego stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny może być zwiększony w wyniku zadziałania wielu czynników, które w konsekwencji mogą doprowadzić do śmierci komórki. Według Kumar i Agarwal (2007).

W wielu modelach zwierzęcych jaskry zaobserwowano zwiększony poziom wskaźników stresu oksydacyjnego. Dla przykładu, poziom dialdehydów malonowych (MDA, mierzonych najczęściej jako *thiobarbituricacid-reactivesubstances*,TBARS) które są wskaźnikiem peroksydacji lipidów, był zwiększony w siatkówkach oczu z doświadczalnie podwyższonym IOP (Moreno i wsp. 2004). Stwierdzono też zwiększony poziom grup karbonylowych

http://rcin.org.pl

w białkach z siatkówki (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, Hsp72, syntaza glutaminianowa). Najwięcej uszkodzonych oksydacyjnie białek znajdowało się w INL (Tezel i wsp. 2005). Doświadczalna jaskra wywoływana podwyższonym IOP wpływała też na aktywność SOD, która była o połowę mniejsza w oczach „jaskrowych" niż w oczach kontrolnych (Moreno i wsp. 2004) – zmniejszenie aktywności SOD mogło więc także być przyczyną stresu oksydacyjnego.

Wyniki doświadczeń na zwierzętach znalazły potwierdzenie w obserwacjach prowadzonych na pacjentach. Poziom MDA był ponad dwukrotnie większy w cieczy wodnistej pobranej od pacjentów z jaskrą otwartego kąta niż od zdrowych kontroli (Ghanem i wsp. 2010; Yildirim i wsp. 2005). Pacjenci z jaskrą otwartego kąta mieli też zwiększony poziom oksydacyjnych uszkodzeńDNA w komórkach siateczki beleczkowej, który był skorelowany z IOP i ze stopniem zmniejszenia pola widzenia (Izzotti i wsp. 2003; Sacca i wsp. 2005). W cieczy wodnistej pobranej od pacjentów z jaskrą obniżony był poziom antyoksydantów niskocząsteczkowych – glutationu, askorbinianu i tyrozyny (Ferreira i wsp. 2004). Zwiększona była natomiast (inaczej niż u zwierząt doświadczalnych) aktywność SOD, a także innego enzymu antyoksydacyjnego, peroksydazy glutationowej.

1.3.3.2. Rola żelaza

Żelazo w jest składnikiem wielu kluczowych dla życia enzymów (np. cytochromów a, b i c, reduktazy rybonukleotydowej). W siatkówce żelazo jest także niezbędne do funkcjonowania kaskady fototransdukcji. Z drugiej strony, wolne kationy Fe^{2+} to silny generator wolnych rodników, gdyż katalizują konwersję nadtlenku wodoru do wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego (He i wsp. 2007). Dla prawidłowego funkcjonowania organizmu konieczne jest skuteczne wiązanie wolnego żelaza. W warunkach fizjologicznych poziom żelaza jest precyzyjnie regulowany (przegląd w pracy He i wsp. 2007). Praktycznie całe nie-hemowe krążące we krwi żelazo (III) jest związane z transferyną, a żelazo (II) jest utleniane do żelaza (III) przez białko ceruloplazminę. Transferyna nie przechodzi przez barierę krew-siatkówka, ale może być internalizowana po związaniu ze specyficznym receptorem. Żelazo wewnątrzkomórkowe jest zaś związane przez białko ferrytynę.

http://rcin.org.pl

Żelazo w organizmie jest akumulowane z wiekiem – gdyż jest wchłaniane z pożywienia, ale poza menstruacją nie jest wydalane (Hahn i wsp. 2006). Jest prawdopodobne, że akumulacja żelaza odgrywa rolę w patogenezie chorób, dla których czynnikiem ryzyka jest wiek, np. w różnych chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona (Davalos i wsp. 2000; Ke i Ming 2003; Millan i wsp. 2007; Riederer i wsp. 1989). Akumulacja żelaza może także odgrywać rolę w patogenezie retinopatii dla których wiek jest czynnikiem ryzyka, tj. jaskry (He i wsp. 2007) i AMD (Wong i wsp. 2007). Niektórzy autorzy sugerowali, że obciążenie organizmu żelazem może modelować procesy zachodzące w starzejącym się mózgu (Nagy i wsp. 1985).

Levin i Geszvain (Levin i Geszvain 1998) pokazali, że zmiażdżenie nerwu wzrokowego powodowało zwiększenie poziomu mRNAceruloplazminy w obrębie INL i GCL. W małpim modelu jaskry wywołanej laserową fotokoagulacją siateczki beleczkowej zwiększona była ekspresja ceruloplazminy w komórkach Müllera (Miyahara i wsp. 2003). Farkas i wsp. (2004) zaobserowali zwiększony poziom białek związanych z metabolizmem żelaza (ferrytyny, ceruloplazminy i transferyny) w siatkówkach pobranych z oczu małp z jaskrą wywołaną laserową fotokoagulacją siateczki beleczkowej w porównaniu do oczu kontrolnych. Zwiększony poziom tych białek zaobserwowali też w oczach pobranych od ludzi z jaskrą w stosunku do oczu pobranych od ludzi, u których nie zdiagnozowano choroby oczu. Obserwacje te potwierdzają mozliwość zaangażowania żelaza w procesy patologiczne w jaskrze.

1.3.3.3. Rola ekscytotoksyczności

W 1957 roku odkryto, że karmienie młodych myszy glutaminianem sodu powoduje uszkodzenie neuronów w siatkówce (Lucas i Newhouse 1957). Ponad dekadę później Olney (1969) rozszerzył tę obserwację pokazując, że rejony degeneracji neuronów wywołanej glutaminianem pojawiają się w całym mózgu. Zjawisko to nazwano ekscytotoksycznością, ponieważ jest związane z nadmierną aktywacją receptorów dla glutaminianu, który jest głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w OUN.

Receptory glutaminianergiczne to zarówno receptory jonotropowe (tzw. bramkowane glutaminianem kanały jonowe) – AMPA, NMDA i kainowy jak

http://rcin.org.pl

i metabotropowe (działające poprzez wtórne przekaźniki wewnątrzkomórkowe) – mGluR. Neurotoksyczność spowodowana nadmierną aktywacją receptorów glutaminianergicznych jest związana z napływem jonów wapnia do komórki nerwowej, prowadzącym do wielu potencjalnie neurotoksycznych zdarzeń. Należą do nich: aktywacja syntazy tlenku azotu i generowanie tlenku azotu ($NO^{\bullet}$), aktywacja fosfolipazy A2 (skutkująca przede wszystkim uszkodzeniem błon biologicznych), nadmierny wzrost stężenia wapnia w mitochondriach i zwiększona produkcja anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet -}$). $NO^{\bullet}$ i $O_2^{\bullet -}$ reagują tworząc nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), silnie nitrujący związek, który uszkadza neurony w sposób zależny od dawki (Lipton i wsp. 1993).

Egzogenny glutaminian podany do ciała szklistego jest toksyczny dla RGC (Lucas i Newhouse 1957; Quigley 1999). Podanie agonisty receptorów glutaminianergicznych NMDA – N-metylo-D-asparaginianu (NMDA) powoduje wybiórczą śmierć RGC (Nakazawa i wsp. 2005). Poziom glutaminianu w ciele szklistym pacjentów z jaskrą przechodzących operację zaćmy jest wyższy niż w ciele szklistym z oczu pacjentów bez jaskry; podobnie jaku małp z doświadczalną jaskrą (Dreyer i wsp. 1996). Doniesiono także o podwyższonym poziomie glutaminianu w spontanicznych chorobach przypominających jaskrę u psów i przepiórek (Brooks i wsp. 1997; Dkhissi i wsp. 1999) oraz w cieczy wodnistej, ale nie w ciele szklistym u szczurów po PONC (Yoles i Schwartz 1998).

Należy jednak wspomnieć, że badania Honkanena i wsp. (2003) nie potwierdziły zwiększonego poziomu glutaminianu w ciele szklistym u pacjentów z różnymi typami jaskry, a wyniki Cartera-Dawsona i wsp. (2002) nie przyniosły potwierdzenia podwyższonego poziomu glutaminianu w ciele szklistym małp z eksperymentalną jaskrą. Co więcej, doniesienia o nadużyciach naukowych jednego z kluczowych badaczy w tej dziedzinie wzbudziły dyskusję, czy wiarygodne są jego wcześniejsze doniesienia o podwyższonym poziomie glutaminianu u pacjentów z jaskrą i w zwierzęcym modelu jaskry (Lotery 2005). Rola glutaminianu w etiologii jaskry jest więc w dalszym ciągu niejasna.

1.3.3.4. Rola tlenku azotu

Tlenek azotu ($NO^{\bullet}$) odgrywa istotną rolę w nitrozylacji i fragmentacji DNA, które poprzedzają apoptotyczną śmierć komórki. Nadmiar $NO^{\bullet}$ produ-

http://rcin.org.pl

kowanego przez indukowalną izoformę enzymu syntazy tlenku azotu NOS-2 w astrocytach i mikrogleju w tarczy nerwu wzrokowego u pacjentów z jaskrą może przyczyniać się do neuropatii wzrokowej związanej z chorobą (Neufeld 2004). U szczurów zarówno podwyższone IOP jak i zapalenie oka stymulują ekspresję NOS-2, nitrozylację białek siatkówki i apoptozę komórek siatkówki (Aslan i wsp. 2006). Jednakże inne badania wskazują, że jaskrowa neuropatia wzrokowa nie była związana ze znaczącą zmianą w ekspresji NOS-2 w siatkówce, tarczy nerwu wzrokowego czy nerwie wzrokowym (Pang i wsp. 2005).

1.3.4. Koncepcje leczenia jaskry; leczenie neuroprotekcyjne

Według Bautista (1999) neuroprotekcja to zbiorczy termin dla każdego podejścia terapeutycznego, którego celem jest spowalnianie bądź zapobieganie degeneracji neuronów. Koncepcja neuroprotekcyjnego leczenia jaskry została poparta przez szereg autorów (Farkas i Grosskreutz 2001; Levin 2005; Marcic i wsp. 2003). Niektórzy pozostają jednak sceptyczni zwracając uwagę, że w innych chorobach neurodegeneracyjnych wyniki badań klinicznych były rozczarowujące mimo zachęcających wyników badań przedklinicznych (Haefliger i wsp. 2000).

Obecne leczenie jaskry polega głównie na obniżaniu IOP (Geringer i Imami 2008). IOP można obniżać farmakologicznie, podając leki zwiększające odpływ cieczy wodnistej i/lub zmniejszające jej produkcję (beta-blokery adrenergiczne takie jak timolol, bloker receptorów alfa-2-adrenergiczncyh brimonidyna, leki zwężające źrenice – parasympatykomimetyki, pewne pochodne prostaglandyn, inhibitory anhydrazy węglanowej). W celu udrożnienia odpływu cieczywodnistej stosuje się laseroterapię lub zabiegi chirurgiczne takie jak wycięcie tęczówki lub trabekulektomię – wycięcie elementów tkanek w kącie przesączania.

Niektóre leki obniżające IOP przejawiają własności neuroprotekcyjne niezależne od wpływu na IOP. Przykładami są betaksolol, który posiada pewną aktywność blokera kanałów wapniowych (Bautista 1999); timolol, który aplikowany w postaci kropli zwiększał przeżycie RGC u myszy DBA/2J (Schuettauf i wsp. 2002); neuroprotekcyjne działanie wykazywała także brimonidyna w modelu uszkodzenia nerwu wzrokowego (Wheeler i wsp. 2003).

http://rcin.org.pl

Niestety działanie neuroprotekcyjne tych leków jest skromne i nie są one pozbawione efektów ubocznych, niebezpiecznych szczególnie dla starszych pacjentów. Dla przykładu, podawany w postaci kropli do oczu betaksolol wpływa na układ naczyniowy i płuca (Rait 1999), timolol może wywoływać bradykardię, brimonidyna suchość w ustach, bóle głowy i zmęczenie (Novack i wsp. 2002).

Wśród kandydatów na leki neuroprotekcyjne do stosowania w leczeniu jaskry istotne miejsce zajmują substancje ograniczające stres wolnorodnikowy, wśród których można wyróżnić następujące grupy:

- ***Zmiatacze wolnych rodników*** (substancje szczególnie łatwo reagujące z rodnikami i obniżające ich stężenie). Witaminy A i E wydają się być użyteczne w usuwaniu wolnych rodników w czasie neurodegeneracji siatkówki (Bartlett i Eperjesi 2004), chociaż nie ma klinicznych dowodów ich aktywności w zatrzymywaniu czy spowolnianiu jaskrowej utraty RGC.
- ***Inhibitory enzymów generujących ROS***. Tlenek azotu ($NO^{\bullet}$) odgrywa istotną rolę w nitrozylacji i fragmentacji DNA poprzedzających apoptozę. Tak więc dobrze tolerowany farmakologiczny inhibitor indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) podawany doustnie bądź miejscowo mógłby być dobrym kandydatem na substancję neuroprotekcyjną w leczeniu jaskry (Neufeld 2004).
- ***Chelatory***obniżając stężenie wolnych jonów metali mogą hamować katalizowane przez Fe(II) reakcje pro-oksydacyjne (Fentona i Habera-Weissa), w wyniku których dochodzi do wytworzenia rodnika ponadtlenkowego i hydroksylowego.

Wiele innych leków neuroprotekcyjnych o różnych mechanizmach działania jest potencjalnymi kandydatami do leczenia jaskry. Spore nadzieje wiązane są z antagonistami NMDA, którehamują nadmierną aktywację receptorów NMDA i zapobiegają nadmiernemu napływowi wapnia do komórki. Niestety niedawne wyniki badań klinicznych z użyciem antagonisty NMDA memantyny w leczeniu jaskry są zniechęcające (Osborne 2009). Wśród potencjalnych substancji leczniczych można wymienić CDP-cholinę i lit, które w połą-

http://rcin.org.pl

czeniu efektywnie zapobiegały apoptotycznej śmierci RGC w modelu PONC, prawdopodobnie poprzez stymulowanie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 (Schuettauf i wsp. 2006). Przykładami mogą być także erytropoetyna wykazująca oprócz aktywności krwiotwórczej także silną aktywność neuroprotekcyjną (Tsai i wsp. 2005) i nietoksyczny induktor białek szoku cieplnego Hsp70 geranylgeranylaceton (GGA; Ishii i wsp. 2003).

1.4. Starcze zwyrodnienie plamki

AMD jest przewlekłą, postępującą chorobą centralnej części siatkówki, zwykle rozpoczynającą się po 50. roku życia. Objawia się ona postępującym spadkiem ostrości wzroku, szczególnie zauważalnym przy czytaniu. Ponadto występuje zamglenie widzenia, zmiana kształtu obrazów oraz krzywienie się linii prostych. Dochodzi do zaburzeń w rozpoznawaniu barw, adaptacji do ciemności oraz wrażliwości na kontrast. Objawy mogą pozostać niezauważone, gdy dotyczą tylko jednego oka, ale gdy choroba obejmie drugie oko, stają się bardzo uciążliwe dla pacjenta (Polaczek-Krupa i wsp. 2005).

Zmiany w AMD dotyczą fotoreceptorów, komórek barwnikowych, błony Brucha i choriokapilar. AMD charakteryzuje się występowaniem na dnie oka, w okolicach plamki żółtej (miejsca na siatkówce o największym zagęszczeniu czopków) biało-żółtych złogów zwanych druzami. Są to zewnątrzkomórkowe depozyty glikoprotein i lipidów w obrębie błony Brucha (Regillo i wsp. 2007).

Wyróżnia się postać zanikową (suchą) i wysiękową (mokrą) AMD. W postaci suchej (ok. 90% przypadków) zmiany chorobowe zachodzą powoli, w ciągu miesięcy lub lat. Klinicznym obrazem tej postaci AMD jest charakterystyczny zanik PE, zwany zanikiem geograficznym. Charakteryzuje się on występowaniem mniej więcej owalnych obszarów hipopigmentacji. Ponieważ komórki barwnikowe „opiekują się" leżącymi pod nimi fotoreceptorami, ich zanik prowadzi także do zaniku fotoreceptorów; w ciężkich przypadkach zmiany mogą dotyczyć także OPL i INL (Borucka i Szaflik 2007). Wysiękowa AMD, która dotyczy ok. 10% pacjentów charakteryzuje się dramatycznym przebiegiem – do znacznego upośledzenia widzenia może dojść w ciągu kilku dni. Znacznie częściej prowadzi też do całkowitej utraty wzroku – 90% niewidomych z powodu AMD to chorzy z postacią wysiękową. Jej wyróżnikiem jest

http://rcin.org.pl

neowaskularyzacjapodsiatkówkowa – powstają podsiatkówkowe błony złożone z patologicznych naczyń, następuje surowicze lub krwotoczne odwarstwienie nabłonka barwnikowego siatkówki, uniesienie siatkówki sensorycznej, obrzęk torbielowaty plamki, wylewy krwi, wysięki lipidowe, włókniste blizny. W miarę postępuchoroby na skutek wysięków i krwotoków z nowoutworzonych naczyń następuje degeneracja komórek barwnikowych i fotoreceptorów (Polaczek-Krupa i wsp. 2005).

W postaci suchej może dojść do wystąpienia neowaskularyzacjipodsiatkówkowej i tym samym do przekształcenia w postać mokrą. Nie jest jednak do końca jasne, czy obie formy AMD – sucha i mokra są jedną chorobą o różnym przebiegu, czy też dwoma różnymi chorobami o różnym pochodzeniu i różnych patomechanizmach (Bird i wsp. 1995; Green 1999).

1.4.1. Modele zwierzęce starczego zwyrodnienia plamki

Używanym od dawna modelem degeneracji siatkówki mogącym odzwierciedlać uszkodzenia obserwowane w AMD jest uszkodzenie światłem (Noell i wsp. 1966). W tym modelu degeneracja siatkówki przebiega w trzech fazach (Marc i wsp. 2008). W pierwszej dochodzi do uszkodzenia zewnętrznych segmentów fotoreceptorów i zmian architektury połączeń synaptycznych (co często prowadzi do zerwania połączeń fotoreceptorów z komórkami dwubiegunowymi jeszcze przed zanikiem tych pierwszych). W fazie drugiej dezorganizacji ulega warstwa jądrowa zewnętrzna (ONL) – umierają fotoreceptory, a ich pozostałości są usuwane przy udziale mikrogleju. Pod koniec tej fazy „rusztowanie” ONL zapada się i powstaje twór zbliżony do blizny astrocytarnej. W fazie trzeciej pozostałe typy komórek wytwarzają „błędne” (przypadkowe) połączenia nerwowe. Dochodzi też do migracji neuronów poprzez warstwy siatkówki, zwłaszcza w pobliżu hipertroficznych komórek Müllera (Jones i wsp. 2003).

Marc i wsp. (2008) sugerują, że model uszkodzenia światłem wierniej niż modele transgeniczne odzwierciedla warunki patologiczne występujące w zaawansowanej zanikowej postaci AMD. Jednak w modelu tym choroba rozwija się względnie szybko – zmiany pierwszej i drugiej fazy zachodzą w ciągu tygodni od początkowego urazu. Stopień uszkodzenia w tym modelu

http://rcin.org.pl

zależy od czasu ekspozycji na światło, intensywności światła, fazy rytmu okołodobowego (Vaughan i wsp. 2002) i rejonu siatkówki (Vaughan i wsp. 2003).

Również pewne genetycznie zmodyfikowane linie mysie (transgeniczne lub *knock*-out) są wykorzystywane jako modele zwierzęce AMD (Rakoczy i wsp. 2006). Myszy co prawda nie posiadają plamki, ale w modelach tych obserwowano kluczowe dla rozwoju AMD zmiany patologiczne – powstawanie druz, pogrubienie błony Brucha, degenerację siatkówki, neowaskularyzacjępodsiatkówkową i zanik PE. Największym wyzwaniem w tworzeniu transgenicznych modeli AMD jest odtworzenie chronologii postępów choroby – od akumulacji lipofuscyny poprzez rozwój miękkich druzów, zanik PE i fotoreceptorów aż do neowaskularyzacjipodsiatkówkowej.Niektóre modele przejawiają niektóre oznaki wczesnego AMD, ale tylko nieliczne przejawiają postęp do zaawansowanego suchego lub mokrego AMD (Rakoczy i wsp. 2006).

Innym modelem AMD mogą być zwierzęta o zmniejszonej aktywności dysmutaz ponadtlenkowych. Myszy będące nokautami pod względem genu dysmutazy ponadtlenkowej-1 (*Sod1*$^{-/-}$) rozwijały charakterystyczne dla AMD patologie siatkówki. Pojawiały się druzy, pogrubieniu ulegała błona Brucha, obserwowano neowaskularyzacjępodsiatkówkową. Co więcej, liczba druz zwiększała się, gdy młode myszy eksponowano na intensywne światło (Imamura i wsp. 2006). Podobne rezultaty uzyskano wyciszając za pomocą rybozymu ekspresję SOD-2. Obserwowano zmniejszenie odpowiedzi w badaniu elektroretinograficznym (ERG), pogrubienie błony Brucha, degenerację komórek barwnikowych i fotoreceptorów, zwiększoną autofluorescencję. Obserwowano też zwiększoną zawartość składników lipofuscyny (Justilien i wsp. 2007).

Modelem AMD mogą być też zwierzęta ze zmutowanymi genami białek związanych z układem odpornościowym, np. *Ccr2* lub *Ccl2*(białko CCR2 to receptor chemokiny CCL2, znajdowany na makrofagach; CCL2 natomiast odpowiada za adhezję komórek odpornościowych do naczyń krwionośnych). U myszy będących nokautami pod względem tych genów (*Ccr2*$^{-/-}$ lub *Ccl2*$^{-/-}$) zmniejszona jest zawartość makrofagów w siatkówce. W dziewiątym miesiącu życia obserwowane są u nich druzy, akumulacja lipofuscyny, pogrubienie błony Brucha i zwiększona liczba melanosomów, a w wieku 16-18 miesięcy roz-

http://rcin.org.pl

wija się zanik geograficzny PE i neowaskularyzacjapodsiatkówkowa (Ambati i wsp. 2003).

1.4.2. Patogeneza starczego zwyrodnienia plamki

Uważa się, że w patogenezę AMD zaangażowane są cztery główne procesy zachodzące w fotoreceptorach siatkówki i w ich bezpośrednim otoczeniu (Nowak 2006). Są to: (1) lipofuscynogeneza oczna, (2) druzogeneza, (3) lokalny proces „para-zapalny" (ang.: *parainflammatory*) i (4) neowaskularyzacja siatkówki.

Lipofuscynogenezaoczna to proces skutkujący gromadzeniem w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki lipofuscyny. Nazwą tą określa się żółtobrązową substancję, którejwewnątrzlizosomalna akumulacja w komórkach postmitotycznych uważana jest za wskaźnik starzenia się (Jung i wsp. 2007). Tworzenie lipofuscyny ocznej jest procesem związanym z ciągłą wymianą zewnętrznych fragmentów fotoreceptorów. Fragmenty te są fagocytowane przez sąsiadujące z fotoreceptorami komórki nabłonka barwnikowego – ale wraz z wiekiem, w wyniku ograniczonej aktywności lizosomalnych enzymów degradujących, dochodzi do gromadzenia się we wnętrzu fagolizosomów nierozpuszczalnych złogów. Warto nadmienić, że lipofuscyna oczna różni się od lipofuscyny akumulowanej w innych starzejących się komórkach, gdyż zawiera szczególnie dużo składników fotowrażliwych i cytotoksycznych (Boulton i wsp. 2004).

Druzogeneza to proces odkładania się pomiędzy warstwą komórek nabłonka barwnikowego a błoną Brucha nierozpuszczalnych złogów białkowo-lipidowych zwanych druzami. Druzy tworzą się przede wszystkim w części centralnej siatkówki, w okolicy plamki żółtej, co jest wiązane ze szczególnie intensywnym stresem wolnorodnikowym w tej okolicy (Booij i wsp. 2010).

Lokalny proces para-zapalny w siatkówce jest prawdopodobnie tkankową odpowiedzią adaptacyjną na lipofuscynogenezę oczną i druzogenezę. Jest to proces zapalny o niskiej intensywności - stanowi stadium pośrednie pomiędzy rozwiniętym stanem zapalnym zachodzącym z naciekami komórek układu odpornościowego i prowadzącym do destrukcji tkanek a normalną homeostazą tkankową w której następuje eliminacja umierających komórek na drodze „niezapalnej" apoptozy (Xu i wsp. 2009).

http://rcin.org.pl

Neowaskularyzacja, do której dochodzi w wysiękowej postaci AMD, polega na tworzeniu naczyń włosowatych tuż pod siatkówką w obszarze plamki - czyli w miejscu, w którym naturalnie one nie występują. Jest ona skutkiem lokalnej czynnościowej przewagi czynników proangiogennych (głównie VEGF) nad czynnikami antyangiogennymi (takimi jak PEDF – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego). Nowo tworzone włośniczki pochodzą z naczyniówki i są zazwyczaj kruche i nieszczelne, czego skutkiem są wysięki i krwotoki.

1.4.2.1. Rola wolnych rodników i ekspozycji na światło

Uważa się, że jednym z głównych mechanizmów prowadzących do uszkodzenia komórek barwnikowych i fotoreceptorowych siatkówki w AMD jest stres oksydacyjny. Może on być związany z silną akumulacją lipofuscyny w komórkach barwnikowych; zawartość tej substancji osiągać w nich może do 19% objętości cytoplazmy (Feeney-Burns i wsp. 1984). Wykazano, że lipofuscyna w wyniku ekspozycji na światło generuje ROS – anionorodnik ponadtlenkowy, tlen singletowy, nadtlenek wodoru i rodniki lipidowe (Boulton i wsp. 1993; Gaillard i wsp. 1995; Rozanowska i wsp. 1995; Rozanowska i wsp. 1998). Ich tempo powstawania jest zależne od intensywności światła, ale także od długości fali – światło niebieskie (400-520 nm) powoduje większą produkcję $O_2^{-\bullet}$ niż światło czerwone (660-730 nm) lub białe.

Silne generowanie wolnych rodników przez lipofuscynę pod wpływem światła o krótszej długości fali może wyjaśniać zjawisko tzw. fotochemicznego zatrucia siatkówki światłem niebieskim (*bluelight hazard*) – uszkodzenia siatkówki w wyniku przedłużonej ekspozycji na światło o długości fali <550 nm (Ham, Jr. i wsp. 1980). Uszkodzenie to dotyczy komórek barwnikowych, a spektrum uszkadzającego światła jest zgodne ze spektrum absorpcji melaniny i lipofuscyny. Fotoreaktywność wyizolowanych z PE barwników wzrasta z wiekiem, co jest związane głównie z lipofuscyną (Rozanowska i wsp. 1995). Obserwowana w AMD (zwłaszcza w postaci suchej AMD) akumulacja lipofuscyny może mieć silny związek z powstawaniem zmian patologicznych.

Do siatkówki dociera jedynie część widma promieniowania słonecznego. Większość promieniowania ultrafioletowego o długości fali poniżej 295 nm jest absorbowana przez rogówkę, a promieniowanie UVA (315-400 nm) i UVB

http://rcin.org.pl

(280-315 nm) - przez soczewkę. Część promieniowania o długości fali poniżej 400 nm (maksimum długości fali 320 nm) dociera jednak do siatkówki (Boettner i Wolter 1962).

Mechanizm uszkodzenia siatkówki przez światło jest dwojakiego rodzaju. Uszkodzenie fotochemiczne klasy I powstaje w wyniku przedłużonej ekspozycji na światło o małej intensywności. Jest związane przede wszystkim z uszkodzeniem pręcików. Za ten rodzaj toksyczności odpowiedzialna jest absorpcja światła przez rodopsynę – fototoksyczne jest światło o długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji przez rodopsynę, a myszy z nokautem genu rodopsyny nie przejawiały wrażliwości na ten rodzaj uszkodzenia (Grimm i wsp. 2001).

Uszkodzenie fotochemiczne klasy II dotyczy uszkodzenia w wyniku krótkiej (rzędu minut, godzin) ekspozycji na światło o stosunkowo dużej intensywności. Najbardziej uszkadzające jest światło o krótkiej długości fali (400-500 nm), z maksimum 440 nm. U naczelnych uszkodzenie w wyniku takiej ekspozycji dotyczy głównie PE (Ham, Jr. i wsp. 1978). Ten rodzaj uszkodzenia wydaje się być związany z produkcją wolnych rodników – stopień uszkodzenia siatkówki jest zależny od stężenia tlenu, a podawanie antyoksydantów zmniejsza uszkodzenie (Tanito i wsp. 2007b; Yilmaz i wsp. 2007; Zhou i wsp. 2008).

W ekspozycji na światło dochodzi więc do uszkodzenia zarówno fotoreceptorów jak i komórek barwnikowych. Rodzaj pierwotnego uszkodzenia zależy od wielu czynników – m.in. od intensywności światła, czasu ekspozycji i długości fali. Niezależnie jednak od tego, które komórki uległy pierwotnemu uszkodzeniu, ze względu na bliskie powiązania anatomiczne i metaboliczne wtórnie może dojść do uszkodzenia komórek innego typu (Organisciak i Vaughan 2009).

1.4.2.2. Rola układu odpornościowego

Szereg obserwacji wskazuje na rolę układu odpornościowego w rozwoju AMD. M.in. w obu formach AMD – suchej i wysiękowej zaobserwowano obecność makrofagów i aktywowanego mikrogleju (Dastgheib i Green 1994; Gupta i wsp. 2003). W AMD zaangażowany jest układdopełniacza. Składniki układu dopełniacza lokalizowano w druzach, komórkach barwnikowych i bło-

http://rcin.org.pl

nie Brucha (Crabb i wsp. 2002; Johnson i wsp. 2001; Nozaki i wsp. 2006). Obecność makrofagów i powiązanych z nimi komórek olbrzymich została wykazana w oczach pacjentów z AMD, a zwłaszcza w rejonach zaniku PE, uszkodzenia błony Brucha czy neowaskularyzacjipodsiatkówkowej (Dastgheib i Green 1994; Grossniklaus i wsp. 2002). Makrofagi wykazują ekspresję proangiogennego czynnika VEGF i w ten sposób mogą indukować neowaskularyzacjępodsiatkówkową (Grossniklaus i wsp. 2002). Nie jest jednak do końca jasne, czy akumulacja makrofagów jest czynnikiem wzmagającym rozwój AMD, czy też przeciwnie – jest wynikiem adaptacji powstałej w wyniku akumulacji patologicznych depozytów i uszkodzenia tkanki związanego z AMD (Patel i Chan 2008). Dane pochodzące z modeli zwierzęcych wykorzystujących laserowo wywołaną neowaskularyzacjępodsiatkówkową są sprzeczne – jedne wskazują na szkodliwą rolę makrofagów – zmniejszanie ich aktywacji zmniejszało neowaskularyzację po indukcji laserowej (Espinosa-Heidmann
i wsp. 2003; Sakurai i wsp. 2003), inne wskazują na ich rolę protekcyjną – zwiększenie ich rekrutacji zmniejszało neowaskularyzację po indukcji laserowej (Apte i wsp. 2006). Być może makrofagi pełnią podwójną rolę – „przeciwzapalne" makrofagi usuwają druzy i inne depozyty, a makrofagi „prozapalne" indukują uszkodzenie tkanki.

1.4.3. Perspektywy leczenia starczego zwyrodnienia plamki

Nie jest obecnie znane skuteczne leczenie zanikowej postaci AMD (Cook i wsp. 2008). Dobre rezultaty uzyskuje się natomiast w leczeniu wysiękowej postaci AMD stosując terapię antyangiogenną. W użyciu są trzy preparaty o działaniu antyangiogennym – Avastin, Macugen i Lucentis. Leki te podawane są doszklistkowo. Avastin (bevacizumab) to kompletne przeciwciało monoklonalne przeciwko VEGF-A. Lucentis (ranibizumab) to fragment przeciwciała monoklonalnego przeciwko VEGF-A. Macugen (pegaptanib) to pegylowany oligonukleotyd, który wiąże się z $VEGF_{164}$ ograniczając wiązanie VEGF z jego receptorem. W trakcie badań klinicznych są też inne substancje o działaniu antyangiogennym (Andreoli i Miller 2007). Stosowane są też inne metody leczenia wysiękowego AMD – terapia laserowa i fotodynamiczna, ale tracą one obecnie na znaczeniu (Cook i wsp. 2008).

http://rcin.org.pl

Koncepcja neuroprotekcyjnej terapii AMD jest mniej popularna niż koncepcja neuroprotekcyjnego leczenia jaskry, ale prace prezentujące takie podejście można znaleźć w literaturze (Fawcett i Osborne 2007; Petrukhin 2007; Vojnikovic i Spanjol 2007; Zhang i Osborne 2006). Wśród kandytatów na neuroprotektanty warto wymienić substancje ograniczające (pośrednio lub bezpośrednio) stres wolnorodnikowy:

- ***Zmiatacze wolnych rodników***. Dane grupy AREDS (2001) wskazują, że „koktail" antyoksydantów – witaminy A, E, β-karotenu i cynku ograniczał postęp zanikowego AMD w badaniach klinicznych. Późniejsza metaanaliza i przegląd systematyczny potwierdziły korzyści płynące z podawania takiej kombinacji antyoksydantów, ale sugerowano ostrożność ze względu na możliwe skutki uboczne takiej suplementacji (Evans 2008). Przedmiotem trwających obecnie badań AREDS 2 są barwniki plamki – luteina i zeaksantyna w połączeniu wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi omega-3 (Petrukhin 2007). Protekcyjne działanie w modelu uszkodzenia światłem wykazywał fenylo-N-tert-butylonitron (PBN); jest to substancja o własnościach pułapki spinowej, która może reagować z krótko żyjącymi wolnymi rodnikami tworząc bardziej trwałe rodniki wykrywalne przy pomocy elektronowego rezonansu paramagnetycznego (*electronparamagnetic*resonance, EPR; Ranchon i wsp. 2001).
- ***Inhibitory enzymów generujących ROS/RNS***. Ester metylowy NG-nitro-L-argininy (L-NAME) – inhibitor syntazy tlenku azotu (NOS) działał protekcyjnie w szczurzym modelu uszkodzenia światłem (Goureau i wsp. 1993).
- ***Chelatory***wychwytujące jony żelaza mogą hamować reakcje generujące rodniki hydroksylowe (Fentona i Habera-Weissa).

Spośród innych koncepcji neuroprotekcyjnego leczenia AMD wspomnieć należy zwłaszcza o lekach przeciwzapalnych blokujących alternatywną drogę aktywacji dopełniacza (RNAi, specyficzne przeciwciała; Petrukhin 2007). Interesujące są też substancje hamujące nagromadzanie się lipofuscyny poprzez hamowanie cyklu wzrokowego. W ten sposób działa nietoksyczny syntetyczny retinoid – fenretynid. Obniżał on stężenie składnika lipofuscyny A2E u myszy

http://rcin.org.pl

Abca4$^{-/-}$ (Radu i wsp. 2005). Obecnie jest on testowany w fazie II badań klinicznych (Petrukhin 2007).

1.5. Tempol i jego pochodne jako potencjalne leki retinoprotekcyjne

Tempol został wynaleziony w latach 60-tych XX wieku w ramach wojskowego programu poszukiwania substancji o działaniu radioprotekcyjnym, które zapobiegałyby rozwojowi choroby popromiennej. Okazał się on substancją o wielostronnej aktywności biologicznej. Uważa się, że jest to związane z jego aktywnością katalityczną, podobną do aktywności SOD.

1.5.1. Właściwości fizykochemiczne tempolu

Tempol (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-N-oksyl, rys. 9) to niskocząsteczkowy (masa cząsteczkowa 172 g/mol) stabilny rodnik nitroksylowy. W temperaturze pokojowej ma formę pomarańczowych jednoskośnych kryształów o gęstości 1,187 g/cm^3. Temperatura topnienia wynosi 70-72°C. Łatwo rozpuszcza się zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach (jest substancją amfifilową). Tempol jest substancją paramagnetyczną (czyli podlegającą magnetyzacji w zewnętrznym polu magnetycznym w kierunku zgodnym z kierunkiem tego pola) i jest źródłem sygnału w spektroskopii EPR i w jądrowym rezonansie magnetycznym (*nuclearmagneticresonance*, NMR). Maksimum absorbcji w spektroskopii w zakresie widzialnym i ultrafiolecie (UV/VIS) jest rejestrowane przy długości fali 240 nm (Reaxys 2011).

1.5.2. Aktywność chemiczna i potencjalny mechanizm działania farmakologicznego tempolu

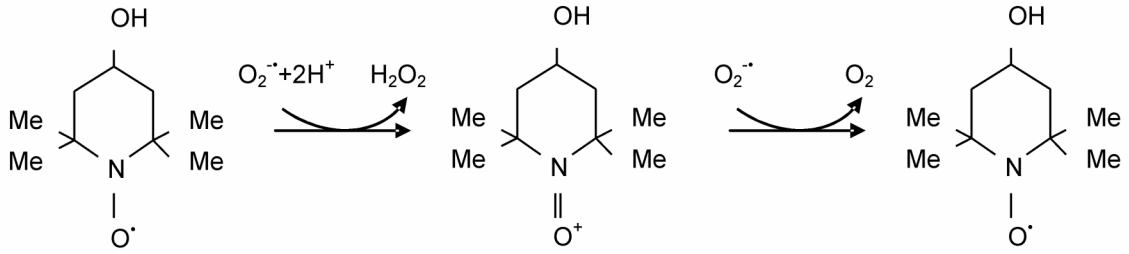
Charakterystyczną cechą tempolu jest wysoka zdolność reakcji z wolnymi rodnikami. Można je podzielić na dwa typy (Wilcox i Pearlman 2008):

- reakcje, w których tempol jest „zmiataczem" wolnych rodników – w wyniku reakcji z wolnymi rodnikami jest „zużywany", tj. przekształcany w inną substancję;

http://rcin.org.pl

- reakcje, w których tempol jest katalizatorem przekształcania wolnych rodników w mniej reaktywne substancje (jest „katalitycznym antyoksydantem”), a więc działa podobnie do enzymu antyoksydacyjnego.

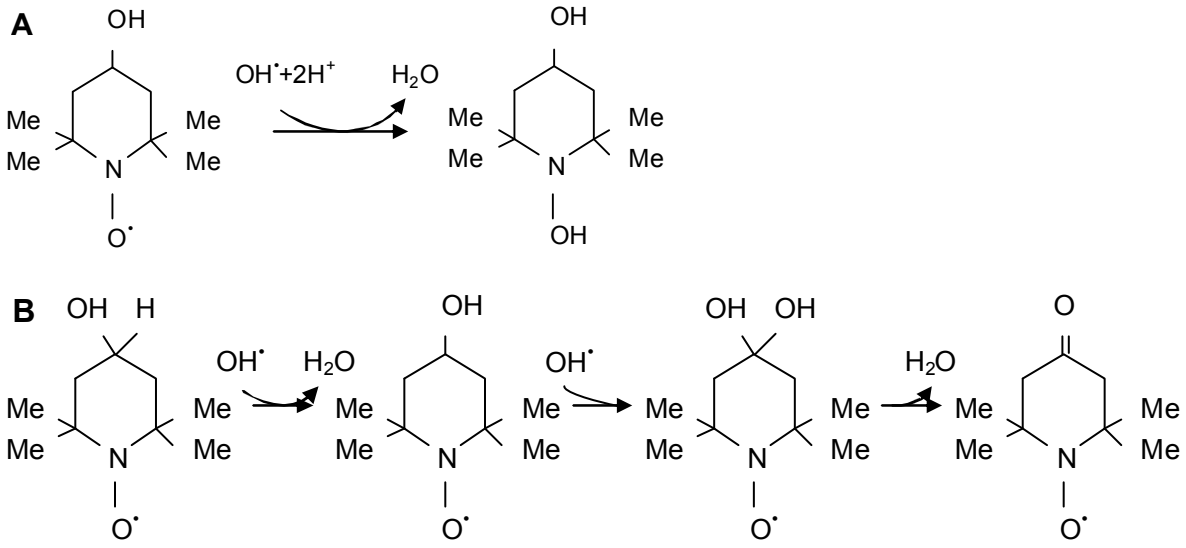
Przypuszczalnie najważniejszą dla farmakologicznej aktywności tempolu jest reakcja z anionorodnikiem ponadtlenkowym, w której działa on jako katalityczny antyoksydant – mimetyk SOD (rys. 6). Co prawda wyniki uzyskane za pomocą techniki zatrzymanego przepływu (*stopped-flow*) sugerowały, że nitroksydy wymiatają rodniki $O_2^{-\bullet}$ (Weiss i wsp. 1993), ale Krishna i wsp. (1996) wskazali, że stężenia rodnika i tempolu były w tym eksperymencie dalekie od tych, jakie można obserwować w organizmie; używając spektroskopii elektronowego rezonansu magnetycznego (*electronparamagneticresonance*, EPR) autorzy ci w swoim układzie doświadczalnym zaobserwowali, że nitroksydy poddawane działaniu generatora $O_2^{-\bullet}$ nie ulegają „zużyciu”.



Rys. 6. Reakcja tempolu z rodnikiem ponadtlenkowym.

Natomiast wobec rodnika hydroksylowego tempol działać może jako zużywalny zmiatacz. Tempol zmiata rodnik hydroksylowy w reakcjach, w których powstaje tempon lub hydroksylamina tempolu (rys. 7; Saito i wsp. 2003). Preferowana jest reakcja, w której powstaje hydroksylamina, a reakcja w pozycji 4’ pierścienia piperydynowego (tworzenie temponu) odpowiada za ok. 1/10 zmiatającej aktywności tempolu w stosunku do rodnika hydroksylowego (Kudo i wsp. 2008).

http://rcin.org.pl



Rys. 7. Możliwe reakcje tempolu z rodnikiem hydroksylowym. (A) Reakcja z wytworzeniem hydroksylaminy tempolu. (B) Reakcja w pozycji 4' z wytworzeniem temponu.

Ponadto tempol utlenia Fe^{2+} do Fe^{3+} (wykazuje aktywność ferroksydazy) i w ten sposób ogranicza powstawanie rodnika hydroksylowego (Samuni i wsp. 1991). Nitroksydy także metabolizują lub zapobiegają wytwarzaniu tlenu singletowego, rodników peroksylowych, anionu nitroksylowego, nadtlenoazotynu, dwutlenku azotu, produktów peroksydacji lipidów i fosfolipidów (Wilcox i Pearlman 2008).

W literaturze można znaleźć sprzeczne doniesienia dotyczące zdolności tempolu do katalizowania rozkładu nadtlenku wodoru (tj. posiadania aktywności katalazy). Niektórzy uważają, że tempol, w przeciwieństwie do niektórych innych mimetyków SOD, jak np. tzw. związki salenowe (EUK-8 i EUK-134), nie wykazuje aktywności katalazy. Z tego względu podawanie tempolu miałoby prowadzić do zwiększenia produkcji nadtlenku wodoru i w pewnych warunkach być szkodliwe (Asaba i wsp. 2007). Inni autorzy twierdzą jednak, że tempol posiada aktywność katalazy. Dowodem ma być zapobieganie przez tempol niektórym uszkodzeniom komórek wywoływanym nadtlenkiem wodoru, np. hemolizie erytrocytów (Li i wsp. 2006). Co prawda inkubacja mysich komórek śródbłonka z tempolem powodowała przejściowe zwiększenie stężenia H_2O_2, ale w wyniku dłuższej inkubacji poziom H_2O_2 obniżał się, co autorzy interpretowali jako wynik aktywności katalazo-podobnej tempolu (Chen i wsp. 2007). Jest także możliwe, że tempol nie zmiata bezpośrednio

http://rcin.org.pl

H_2O_2(Simonsen i wsp. 2009), a jego protekcyjne właściwości w wyżej wspomnianych modelach doświadczalnych wynikają z degradacji rodnika hydroksylowego.

1.5.3. Aktywność farmakologiczna tempolu i hydroksylaminy tempolu

W wielu modelach doświadczalnych tempol wykazywał własności cytoprotekcyjne i korzystnie wpływał na komórki i organizmy. Dla przykładu, dobrze udokumentowano jego własności radioprotekcyjnie zarówno *in vitro* (Xavier i wsp. 2002) jak i *in vivo* (Hahn i wsp. 1992). Tempol działał też przeciwnowotworowo (Gariboldi i wsp. 2003; Mitchell i wsp. 2003), a w zwierzęcych modelach nadciśnienia tętniczego obniżał ciśnienie krwi (Wilcox i Pearlman 2008).

Tempol chronił również komórki nerwowe przed uszkodzeniem w wyniku hipoksji, urazu czy ekspozycji na toksyczne substancje. Substancja ta działała protekcyjnie w modelach ischemii/reperfuzji, np. chroniła mózg przed skutkami zaciśnięcia tętnicy środkowej mózgu (Rak i wsp. 2000). Tempol działał ochronnie w modelach urazowego uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego (Hillard i wsp. 2004; Zhang i wsp. 1998). Działał także protekcyjnie w modelach chorób neurodegeneracyjnych, m. in. w mysim modelu choroby Parkinsona (Liang i wsp. 2005). Wilcox i wsp. (2010) wskazują jednak, że obniżanie ciśnienia krwi przez tempol może ograniczać korzyści z jego stosowania w tych modelach.

Niewiele wiadomo na temat aktywności tempolu w chorobach oczu. Jak dotąd okazał się on skuteczny w modelu zapaleniu naczyniówki oka (Zamir i wsp. 1999) i chronił komórki soczewki oka przed uszkodzeniem w wyniku ekspozycji na nadtlenek wodoru (Reddan i wsp. 1993), a ponadto chronił komórki RGC w pierwotnej hodowli przed toksycznymi skutkami hipoksji i ekspozycji na TNFα (Tezel i Yang 2004). Tempol działał również protekcyjnie w modelu toksyczności NMDA (El Remessy i wsp. 2003). W doświadczeniu tym szczurom szczepu Sprague-Dawley podawano doszklistkowo NMDA (2 µl 100 mM roztworu) równocześnie z roztworem tempolu (0,4 mg/oko) lub z nośnikiem. Podawanie tempolu zmniejszało liczbę TUNEL-pozytywnych komórek w preparatach siatkówek i intensywność barwienia na obecność nitrotyrozyny. Ponadto Wang i wsp. (1995) pokazali protekcyjne działanie tempolu

http://rcin.org.pl

w modelu uszkodzenia siatkówki światłem u albinotycznych szczurów szczepu Lewis; wyrażało się ono zmniejszeniem wywołanych ekspozycją na światło zmian w grubości warstw siatkówki.

Jedyne przeprowadzone dotąd badania kliniczne tempolu dotyczyły wykorzystania jego aktywności radioprotekcyjnej. W badaniach klinicznych I fazy stwierdzono, że podawanie roztworu tempolu miejscowo na skórę zapobiegało łysieniu wywołanemu przez radioterapię mózgu (Metz i wsp. 2004).

Z punktu widzenia możliwości klinicznego zastosowania wadą tempolu jest stosunkowo niski indeks terapeutyczny (niewielka różnica dawek wywołujących efekty terapeutyczne i toksyczne). U myszy wartość LD_{50} po podaniu dootrzewnowym wynosi 341 mg/kg (Hahn i wsp. 1992), podczas gdy u nieuśpionych świń wietnamskich dawka 100 mg/kg prowadziła do wystąpienia napadu padaczkowego typu *grand mal*. Obserwowano również inne efekty toksyczne, jak pobudzenie, odmowa przyjmowania pokarmu, śpiączka, drgawki, obniżone ciśnienie krwi, tachykardia. Obniżone ciśnienie krwi było obserwowane już po podaniu dawek tempolu tak niskich jak 25 mg/kg i pojawiało się 5-10 min po podaniu. Zaraz potem występowała tachykardia (co może być interpretowane jako odruchowa odpowiedź serca na obniżone ciśnienie). Ponadto stwierdzono podwyższenie temperatury powierzchni skóry. Zwrócono także uwagę, że w wysokich stężeniach – rzędu 10^{-4}-10^{-2} M tempol może działać pro-oksydacyjnie (Offer i wsp. 2000).

Aktywny farmakologicznie jest także produkt metabolicznej przemiany tempolu – **hydroksylamina tempolu** (tempol-H). Substancja ta działała protekcyjnie w modelu uszkodzenia siatkówki światłem u szczura (Tanito i wsp. 2007b). Podobne wyniki uzyskano na linii komórek barwnikowych siatkówki ARPE-19, które akumulowały składnik lipofuscyny A2E. W układzie bezkomórkowym tempol-H inaktywował tlen singletowy (Zhou i wsp. 2008). Tempol-H chronił także przed wywołanym H_2O_2 zmętnieniem soczewki (Zigler, Jr. i wsp. 2003).

Metabolizowana do tempolu-H pochodna tempolu OT-551 (chlorowodorek 1-hydroksy-4-cyklopropanokarbonyloksy-2,2,6,6-tetrametylopiperidiny) chroniła częściowo siatkówkę w szczurzym modelu uszkodzenia światłem

http://rcin.org.pl

(Tanito i wsp. 2007b; Tanito i wsp. 2010). Niedawno zakończone badania kliniczne II fazy na pacjentach z zanikowym AMD nie potwierdziły jednak jego skuteczności (Wong i wsp. 2010).

Tempol-H ma podobną do tempolu toksyczność – podawany dootrzewnowo myszom w dawce do 325 mg/kg nie wywoływał efektu letalnego (Hahn i wsp. 2000). 30% śmiertelność odnotowano po podaniu tempolu-H w dawce 350 mg/kg. Obserwowane efekty uboczne były podobne jak w przypadku tempolu, m.in. niepokój ruchowy i drgawki.

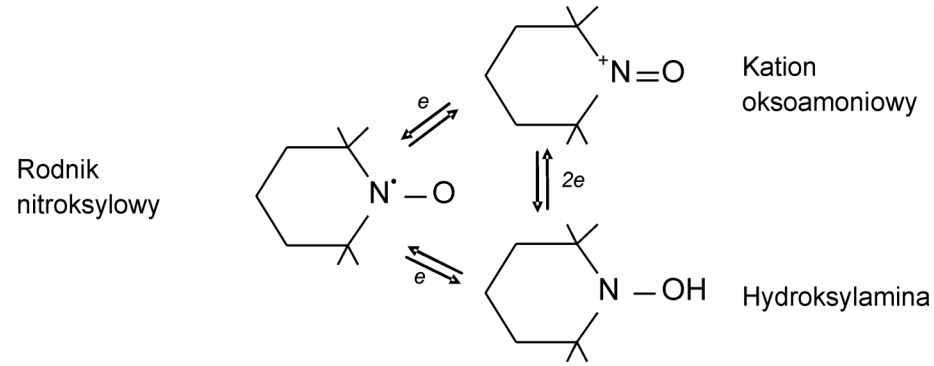
1.5.4. Biodystrybucja

Nitroksydy mogą być wykrywane metodą NMR, bądź EPR. Po podaniu dożylnym u myszy czas połowicznego zaniku tempolu we krwi wynosi 1,0±0,2 min, a po podaniu podskórnym 5,0±0,5 min (Kuppusamy i wsp. 1998). Gdy mierzone jest całkowite stężenie tempolu i jego zredukowanej formy, czas półtrwania we krwi jest znacznie dłuższy i wynosi u myszy po podaniu dootrzewnowym ok. 50 min (Hahn i wsp. 1992). Czas półtrwania tempolu w tkankach jest zmienny i zależy od ich statusu redoks (Wilcox i Pearlman 2008).

W obu przypadkach sygnały rezonansowe zanikają po redukcji nitroksydu do diamagnetycznej hydroksylaminy (rys. 8; Wilcox i Pearlman 2008; Swartz i wsp. 2007). Jest to reakcja odwracalna, w jej wyniku dochodzi do ustalenia równowagi między tempolem a tempolem-H, a równowaga ta jest zależna od stanu redoks tkanki. Przekształcenie tempolu w tempol-H dokonuje się głównie w mikrosomach hepatocytów i jest zależne od cytochromu c i NADPH (Iannone i wsp. 1989a; Iannone i wsp. 1989b). Tempol może być także redukowany przez grupy sulfhydrylowe białek (Couet i wsp. 1985), reszty tyrozynowe białek (Simonsen i wsp. 2009) i kwas askorbinowy (Keana i wsp. 1987). Zredukowany tempol jest dalej metabolizowany i/lub wydalany.

Nitroksydy, w tym tempol, nie wiążą się w sposób znaczący z białkami osocza krwi (Okajo i wsp. 2006). Tempol przenika przez barierę krew-mózg, co wykazano niedawno przy pomocy obrazowania rezonansu magnetycznego (Davis i wsp. 2011). Penetruje też do tkanek oka (Zamir i wsp. 1999). Ponieważ tempol łatwo przenika przez błony biologiczne może działać zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowo.

http://rcin.org.pl



Rys. 8. Utleniona i zredukowane formy nitroksydu i ich przemiany. Według Soule i wsp. (2007).

Tempol jest wszechstronnie działającym, łatwo penetrującym błony biologiczne antyoksydantem, który okazał się działać protekcyjnie w wielu zwierzęcych modelach chorób, w tym schorzeń oka i siatkówki. Jego wadą jednak jest krótki czas półtrwania w organizmie i konieczność stosowania dawek zbliżonych do toksycznych. Dość poważne są też skutki uboczne. W celu zmniejszenia ryzyka działań niepożądanych poszukuje się pochodnych tempolu, które działać będą w mniejszych dawkach i/lub będą lepiej tolerowane.

Modyfikacją mogącą spotęgować aktywność cytoprotekcyjną tempolu może być dołączenie „molekuły adresowej", która skieruje jego cząsteczki do miejsc, w których intensywnie wytwarzane są wolne rodniki. Znanym rozwiązaniem tego rodzaju są koniugaty tempolu „adresowane" do mitochondriów poprzez połączenie z fragmentem cyklicznego antybiotyku hemigramicydyny, o wysokim powinowactwie do błon bakteryjnych i również mitochondrialnych (Fink i wsp. 2007). Jak już wspomniano, wolne rodniki mogą jednak być wytwarzane nie tylko w mitochondriach, ale także w błonach komórkowych, w związku z funkcjonowaniem PMOR. Z tego względu wysunęliśmy przypuszczenie, że neuroprotekcyjną skuteczność tempolu można wzmocnić przez dołączenie lipofilnych „molekuł adresowych", których obecność zwiększy względne stężenie tej substancji we frakcji błonowej.

http://rcin.org.pl

1.6. Podsumowanie

Wiele danych pozyskanych z obserwacji wykonanych na pacjentach i z doświadczeń wykorzystujących modele zwierzęce pozwala przypuszczać, że w patogenezie najważniejszych chorób neurodegeneracyjnych siatkówki – jaskry i AMD – istotną rolę odgrywają endogenne wolne rodniki. Kaskadę reakcji wolnorodnikowych rozpoczyna anionorodnik ponadtlenkowy, a pierwszym krokiem w jego detoksykacji jest dysmutacja katalizowana przez enzymy SOD. Anionorodnik ponadtlenkowy charakteryzuje się dużą toksycznością, toteż jego inaktywacja może przynosić korzyści terapeutyczne.

Anionorodnik ponadtlenkowy jest szczególnie szkodliwy dla fazy lipidowej, a główne enzymy generujące $O_2^{\bullet -}$ związane są z błonami. Z tych względów oczekiwać można, że lipofilne pochodne tempolu będą bardziej skuteczne w zastosowaniach neuroprotekcyjnych od substancji macierzystej (tempolu).

http://rcin.org.pl

2. Cele pracy

1) **scharakteryzowanie nowozsyntetyzowanych estrów tempolu pod względem fizykochemicznym** – wyznaczenie ich lipofilności, zbadanie oddziaływań z modelowymi błonami lipidowymi, oraz wyznaczenie widm EPR dla potwierdzenia ich charakteru wolnorodnikowego i własności katalitycznych.

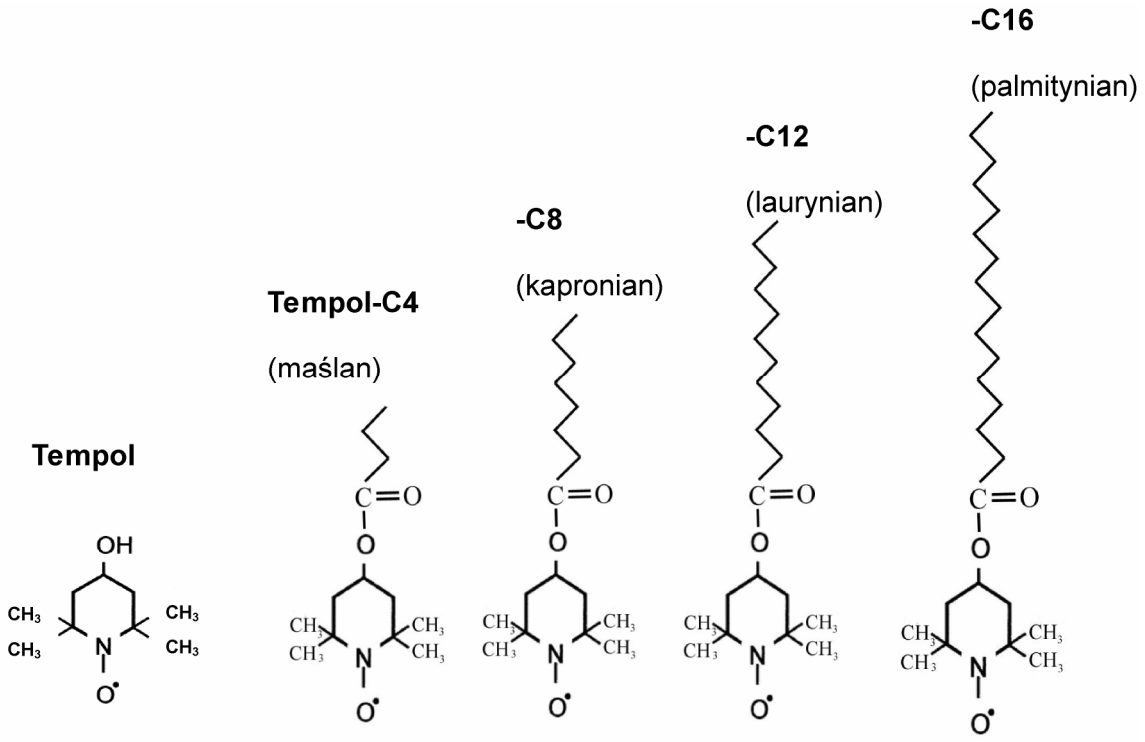
2) **zbadanie aktywności retinoprotekcyjnej tempolu i jego estrów** w modelach dwóch chorób degeneracyjnych siatkówki: jaskry i AMD. Jako modele jaskry wykorzystane zostały: (1) częściowe zmiażdżenie nerwu wzrokowego, które prowadzi do wybiórczej śmierci RGC (w modelu tym aktywność neuroprotekcyjną badanych substancji ocenia się na podstawie ich zdolności do ograniczania utraty komórek zwojowych siatkówki); (2) modyfikacja tego modelu polegającą na dodatkowym obciążeniu ustroju żelazem(co może być modelem starzenia się); (3) doszklistkowe podanie NMDA będące modelem ekscytotoksyczności glutaminianu w patogenezie jaskry. Jako model AMD wykorzystano uszkodzenie fotoreceptorów silnym światłem.

http://rcin.org.pl

3. Materiał i metody

3.1. Substancje i odczynniki wykorzystane w badaniach

Pochodne tempolu, zsyntetyzowane przez przyłączenie na drodze estryfikacji łańcuchów acylowych o różnej liczbie atomów węgla (C4, C8, C12 i C16, rys. 9), zostały przekazane przez prof. Michała Woźniaka (Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny).



Rys. 9. Struktura chemiczna tempolu i badanych estrów acylowych tempolu.

Pozostałe odczynniki (w tym tempol), o ile nie zaznaczono inaczej, zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

http://rcin.org.pl

3.2. Badanie właściwości fizyko-chemicznych tempolu i jego pochodnych

3.2.1. Wyznaczanie współczynnika rozdziału woda-oktanol

Badania wykonano w Zakładzie Lekkiej Syntezy Organicznej Instytutu Chemii Przemysłowej w Warszawie. Tempol i jego pochodne rozpuszczano w mieszaninie oktanolu i wody (stosunek 1:1) w stężeniu 1 mg/ml i mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej w ciemności (Kułakowska-Pawlak 2010). Następnie oznaczano badane związki w fazach wodnej i oktanolowej- przy pomocy wysokosprawnego chromatografu cieczowego (HPLC). Próbkę fazy oktanolowej rozcieńczano dziesięciokotnie (tempol, tempol-C4, -C8, -C12) lub stukrotnie (tempol-C16) acetonitrylem.

Tab. 1. Warunki chromatograficzne dla oznaczania tempolu i jego pochodnych – skład fazy ruchomej

Związek	**Woda + 5% acetonitrylu**	**Acetonitryl**
Tempol	70%	30%
Tempol-C4	50%	50%
Tempol-C8	25%	75%
Tempol-C12	5%	95%
Tempol-C16	5%	95%

Analizy wykonywano na wysokosprawnym chromatografie cieczowym firmy Merck-Hitachi (Tokio, Japonia) wyposażonym w detektor spektrofotometryczny UV-VIS typ L-7400 i pompę wraz z czterorozpuszczalnikowym niskociśnieniowym systemem gradientowym typ L-7100. System sterowany był programem HPLC System Manager Model D-7000 przez interfejs typu D-7000. Rozdziały wykonywano na kolumnach wypełnionych modyfikowanym grupami oktadecylowymi żelem krzemionkowym: Agilent Extended-C-18 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA; tempol, tempol-C4, -C8 i –C12) i XTerra RP18 (WatersCorporation, Milford, MA, USA; tempol-C16). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min, długość fali λ = 240 nm. Pomiary

http://rcin.org.pl

wykonywano w układzie izokratycznym – skład fazy ruchomej dla różnych substancji podsumowano w tab. 1.

3.2.2. Elektronowy rezonans paramagnetyczny

Pomiary elektronowego rezonansu paramagnetycznego wykonano w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na spektrometrze EPR na pasmo X (9,3 GHz) Mini-Scope MS200 (Magnettech GmbH, Berlin, Niemcy). Częstość modulacji wynosiła 100 kHz. Do rejestracji widm tempolu i jego estrów użyto następujących parametrów: pole centralne 334 mT, zakres przemiatania 8,5 mT, czas przemiatania 30 s, liczba przemiatań 3, amplituda modulacji 0,08 mT, moc mikrofalowa 12,5 mW, faza 180°. Widma rejestrowano dla 100 µM roztworów tempolu i jego pochodnych w 96% etanolu.

3.2.3. Badanie interakcji analizowanych związków z modelową błoną lipidową

Badania kalorymetryczne wykonano we Wrocławskich Laboratoriach Agregatów Lipidowych. Ich celem było określenie entalpii transferu tempolu i jego estrów acylowych między liposomami jako modelowymi błonami biologicznymi. Kalorymetria jest techniką, w której, mierząc przepływ ciepła między badanym układem (próbką) a otoczeniem, wnioskuje się o zachodzących w próbce procesach. W niniejszej pracy zastosowano technikę nazywaną izotermicznym miareczkowaniem kalorymetrycznym (*isothermaltitrationcalorimetry*, ITC). Układ pomiarowy kalorymetru składa się z komory pomiarowej i komory odniesienia. W trakcie doświadczenia do komory pomiarowej wstrzykiwane są dokładnie odmierzone porcje reagenta (w tym przypadku były to liposomalnepreparaty tempolu bądź estrów tempolu, o znanym stężeniu), a zachodzące zmiany energetyczne są obliczane na podstawie energii, jaką trzeba dostarczyć, aby wyrównać zmieniającą się temperaturę w komorze pomiarowej do temperatury w komorze odniesienia. Uzyskany w ten sposób termogram – wykres zależności dostarczonej energii od czasu – służy do obliczenia (na podstawie pola powierzchni pod wykresem) zmiany entalpii w wyniku dodania znanej objętości reagenta. Sumując obliczone w ten sposób zmiany entalpii następujące po podaniu kolejnych porcji reagentu można

http://rcin.org.pl

skonstruować wykres zależności sumarycznej zmiany entalpii od stężenia reagenta w komorze pomiarowej.

Liposomy były przygotowywane za pomocą klasycznej metody hydratacji cienkiego filmu lipidowego: chloroformowy roztwór 1,2-dioleoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholiny (DOPC, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) albo roztwór DOPC zmieszany z estrami tempolu w mieszaninie chloroformu i metanolu (1:1) był suszony w strumieniu azotu. Ślady rozpuszczalników organicznych były usuwane poprzez osuszanie próbki w próżni przez 2 h. Suchy film lipidowy był uwadniany 10 mM buforem HEPES (pH 7,4) i wytrząsany przez 10 min. Zawiesina dużych wielowarstwowych liposomów była następnie ekstrudowana (przetłaczana) przez membranowy filtr poliwęglanowy o średnicy porów równej 100 nm, w wyniku czego powstała populacja małych jednowarstwowych liposomów o średnicy 104 ± 10 nm jak określono techniką dynamicznego rozpraszania światła. Do doświadczeń używano zawiesiny liposomów o stężeniu 10 mg/ml.

Pomiary kalorymetryczne wykonano przy pomocy izotermicznego kalorymetru miareczkowego TAM III (ThermoMetric AB, Jarfalla, Szwecja) wyposażonego w moduł do miareczkowania izotermicznego. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w temperaturze 25°C. Liczba kroków miareczkowania wynosiła 9, a objętość pojedynczego wstrzyknięcia wynosiła 10 µl. Każdy eksperyment poprzedzało pojedyncze wstrzyknięcie o objętości 1 µl, które było pomijane w dalszej analizie. Liposomy DOPC były miareczkowane liposomowympreparatem tempolu lub estrów tempolu, tj. zawiesiną liposomów DOPC zawierających tempol lub estry tempolu (10 mg/ml). Wykonano też doświadczenia kontrolne polegające na miareczkowaniu buforu HEPES liposomowymipreparatami badanych substancji. Wypadkowe entalpie transferu tempolu bądź jego pochodnych do dwuwarstwy lipidowej wyznaczono poprzez odjęcie wyników eksperymentów kontrolnych od wyników odpowiednich miareczkowań.

3.3. Doświadczenia na zwierzętach

Badania wykonano w Centre for Ophtalmology w Tybindze (Niemcy) zgodnie z wytycznymi Association for Research in Vision and Opthalmology

http://rcin.org.pl

i po uzyskaniu stosownych pozwoleń (zezwolenia nr AK 03/04 i AZ 35/9185.81-2 wydane przez Prezydium Rejencji Tybinga). Wszystkie doświadczeniazostały wykonane na samcach szczurówszczepu Brown Norway (Charles River, Niemcy) o masie 100-120 g (wiek 6 tygodni – zwierzęta „młodsze") lub 190-210 g (wiek 9-10 tygodni – zwierzęta „starsze"). Każda grupa liczyła około 8-10 siatkówek w badaniach, w których liczono komórki zwojowe, 3-4 zwierzęta w badaniach immunohistochemicznych i 5-6 zwierząt w badaniach elektroretinograficznych. W badaniach wykorzystano trzy modele jaskry normotensyjnej i model uszkodzenia fotoreceptorów światłem.

3.3.1. Model częściowego zmiażdżenia nerwu wzrokowego

Doświadczenia wykonywano zgodnie z procedurą opisaną w pracy Schuettauf i wsp. (2006). Zwierzęta były znieczulane przez dootrzewnowe wstrzyknięcie 7% roztworu wodzianu chloralu w buforze fosforanowym (PB; 0,1 M pH 7,4). Podawano również miejscowo do oka krople oksybuprokainy (Conjucain, BauschundLomb, Madison, NJ, USA). Nerw wzrokowy jednego z oczu odsłaniano przez nacięcie spojówki i rozcięcie opon pęsetą ze stępionymi końcami. Kalibrowana pęseta była umieszczana około 2 mm od gałki ocznej i zaciskana na nerwie wzrokowym na 15 sekund. Przy pomocy mikroskopu operacyjnego sprawdzano, czy nie zostało znacznie zaburzone krążenie w obrębie nerwu wzrokowego. Po 15 s pęsetę wyjmowano, a do oka wkraplano antybiotyk ofloksacynę (Floxal, BauschundLomb). Drugie oko („ kontrolne") było poddawane pozorowanej operacji, tzn. wypreparowywano nerw wzrokowy, ale nie zaciskano na nim kalibrowanej pęsety.

3.3.2. Modyfikacja modelu częściowego zmiażdżenia nerwu wzrokowego przez obciążenie ustroju żelazem

Modyfikacja ta polegała na jednorazowym dootrzewnowym podaniu 24h przed zabiegiem dekstranu żelaza (III) w dawce 500 mg żelaza/kg masy ciała. Podanie takiej dawki żelaza prowadziło do długotrwałego podwyższenia poziomu żelaza we krwi i w nerkach i powodowało zwiększony stres oksydacyjny w nerkach i we krwi (Zhou i wsp. 2000), może więc symulować obser-

http://rcin.org.pl

wowane w jaskrze zaburzenia gospodarki żelaza skutkujące zwiększonym stresem wolnorodnikowym (Farkas i wsp. 2004).

3.3.3. Model ekscytotoksyczności NMDA

Zwierzętom w znieczuleniu ogólnym (7% wodzian chloralu, 6 ml/kg masy ciała) podawano do ciała szklistego 2µl 10 mM roztworu NMDA w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS; 0,2 M, pH 7,2; ponieważ objętość ciała szklistego oka szczura wynosi około 20 µl, końcowe stężenie NMDA wynosiło w nim około 1 mM; Nakazawa i wsp. 2005). Do oczu kontrolnych podawano 2µl PBS. Podawano również miejscowo do oka środek znieczulający – krople oksybuprokainy (Conjucain, BauschundLomb) oraz antybiotyk ofloksacynę (Floxal, BauschundLomb).

3.3.4. Model uszkodzenia światłem

Adaptowane przez 12 h do ciemności zwierzęta umieszczano pojedynczo w dobrze wentylowanych klatkach o ścianach obłożonych od wewnątrz folią aluminiową, a nad klatką umieszczano lampę fluorescencyjną dającą zimne białe światło o natężeniu 2700 lx. Natężenie światła było mierzone na poziomie dna klatki przy pomocy fotometru IL1700 Research (International Light, Newburyport, MA, USA) skierowanego w stronę źródła światła. Początek ekspozycji na światło miał miejsce między 14.00 a 16.00. Źrenice były rozszerzane przy pomocy kropli tropikamidu (Mydriacyl, Alcon, Inc., Fort Worth, TX, USA). Tropikamid podawano na początku doświadczenia, a potem w miarę potrzeby, aby utrzymać rozszerzenie źrenic, średnio co półtorej godziny. Zwierzęta w czasie trwania doświadczenia miały dostęp do wody i pokarmu. Temperatura w czasie ekspozycji na światło była utrzymywana na poziomie 23,5±1,0°C. Po zakończeniu ekspozycji zwierzęta wracały do pokoju hodowlanego z oświetleniem 12:12 h.

3.4. Podawanie tempolu i jego pochodnych

Wszystkie substancje podawano dootrzewnowo. Tempol rozpuszczano w PBS, estry tempolu rozpuszczano w 5% roztworze etanolu w PBS. Zwierzę-

http://rcin.org.pl

ta kontrolne otrzymywały nośnik – PBS lub 5% roztwór etanolu w PBS. W modelach jaskry roztwory badanych substancji podawano 24 h i 30 min przed urazem, a następnie codziennie do zakończenia doświadczenia. W modelu uszkodzenia światłem podawano pojedynczą dawkę badanych substancji 30 min przed rozpoczęciem ekspozycji na światło.

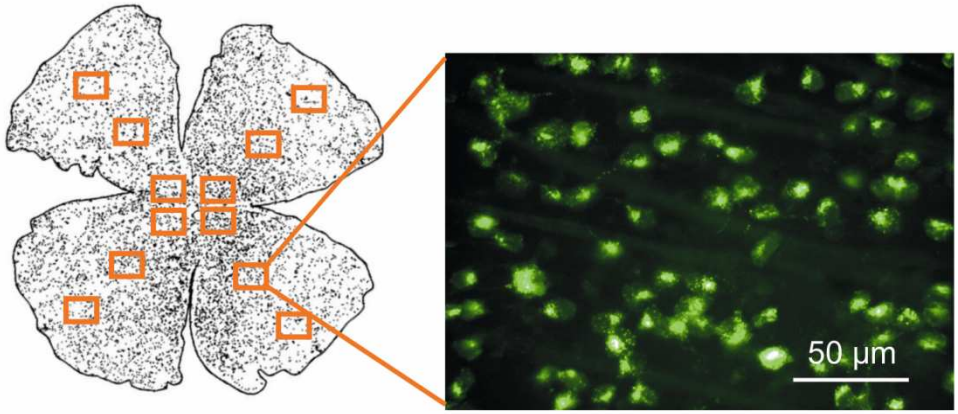
3.5. Ocena degeneracji siatkówki

3.5.1. Ocena ilościowa komórek zwojowych siatkówki

Pięć dni po zmiażdżeniu nerwu wzrokowego lub doszklistkowym podaniu NMDA zwierzęta były ponownie usypiane i podawano im w okolice wzgórków czworaczych górnych (przy pomocy aparatu stereotaktycznego) 14 µl (7 µl do każdej półkuli) znacznika fluorescencyjnego Fluorogold (hydroxystilbamidinemethanesulfonate, MolecularProbes, Eugene, OR, USA), który jest transportowany wstecznie w aksonach komórek zwojowych i znakuje ich ciała (Thaler i wsp. 2006). Po wstrzyknięciu ranę zaszywano i podawano w jej okolice lokalnie działający środek znieczulający (oksybuprokainę).

Dwa dni po zabiegu zwierzęta uśmiercano przy pomocy CO_2 i pobierano oczy, z których izolowano siatkówki i utrwalano je przez 30 min w 2% roztworze paraformaldehydu. Tego samego dnia wykonywano zdjęcia preparatów siatkówki w mikroskopie fluorescencyjnym. Uzyskane obrazy były kodowane przed poddaniem analizie. Zliczano barwiące się komórki w 12 różnych obszarach siatkówki , każdy o powierzchni 62 500 μm^2 (Schuettauf i wsp. 2000). Wyniki przedstawiano jako średnią liczbę barwiących się komórek na mm^2 powierzchni siatkówki [$1/mm^2$].

http://rcin.org.pl



Rys. 10. Sposób wykonywania zdjęć mikroskopowych na preparacie całej siatkówki (*wholemount*). Dla każdego preparatu wykonywano 12 zdjęć. Z prawej strony zdjęcie reprezentujące średnią gęstość komórek zwojowych dla nieuszkodzonej siatkówki.

3.5.2. Elektroretinografia

Badanie ERG przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanym protokołem (Thaler i wsp. 2008). Zwierzęta były adaptowane do ciemności przez 12 godzin (przez noc), wszystkie operacje były następnie wykonywane przy przyciemnionym czerwonym świetle. Szczury były usypiane przez dootrzewnowe podanie mieszaniny ketaminy (100 mg/kg) i ksylazyny (5 mg/kg). Tuż przed badaniem rozszerzano źrenice przez podanie kropli 1% tropikamidu, stosowano też miejscowe znieczulenie w postaci oksybuprokainy. Na oko zakładano elektrodę aktywną (złota nić zakładana pod powiekę), elektrodą odniesienia była igła umieszczona w skórze między oczami, a na ogonie umieszczano igłę służącą jako uziemienie. Badania ERG rozpoczynano 10 min po wyłączeniu czerwonego światła. Badania wykonywano przed uszkodzeniem światłem, następnie 1 dzień i 7 dni po uszkodzeniu światłem.

ERG było rejestrowane za pomocą systemu Espion (Diagnosys LLC, Littleton, MA, USA). Rejestrowany sygnał był na bieżąco filtrowany w zakresie od 0,3 do 300 Hz. Impedancja elektrody była sprawdzana przed i po każdym pomiarze za pomocą wbudowanego algorytmu i wynosiła mniej niż 10 kΩ przy częstotliwości 25 Hz (zgodnie z zaleceniami producenta). Siatkówki były pobudzane przy pomocy stymulatora typu Ganzfeld (tj. pełnego pola; ColorDome, Diagnosys LLC, Littleton, MA, USA).

http://rcin.org.pl

Protokół badania ERG składał się z następujących kroków:

(1) badania odpowiedzi na bodźce o rosnącej jasności w warunkach skotopowych (tj. ciemności). Użyto trwających 4 ms bodźców o rosnącej luminancji (luminancja od 0,0000003 do 0,3cd.s/m^2) do uzyskania odpowiedzi od linii podstawowej (fala b niewykrywalna) do nasyconej odpowiedzi fali b. Dla pierwszych czterech kroków (0,0000003 do 0,00001 cd.s/m^2) wyniki były uśredniane z 15 odpowiedzi z przerwami między bodźcami (ISI, *inter-stimulus interval*) wynoszącymi 10 s. Dla kolejnych 4 kroków (0,00003 do 0,001 cd.s/m^2) wyniki były uśredniane z 5 odpowiedzi z ISI 25 s. Dla ostatnich 3 kroków (0,003 do 0,3 cd.s/m^2) wyniki uśredniano z dwóch odpowiedzi z ISI 40 s.

(2) oceny odpowiedzi czopków w warunkach fotopowych (tj. po adaptacji do światła). Oczy adaptowano przez 5 min do światła przy pomocy stymulatora Ganzfeld (25 cd/m^2, światło białe o temperaturze 6500 K) w celu nasycenia pręcików. Używano pojedynczego błysku o luminancji 10 cd.s/m^2 (średnia 10 odpowiedzi z ISI 10 s).

3.5.3. Analiza histologiczna siatkówki

Siedem dni po ekspozycji na silne światło zwierzęta uśmiercano zgodnie z opisaną w podrozdziale 3.5.1. procedurą i natychmiast pobierano oczy. Gałki oczne rozcinano wzdłuż rąbka zębatego i usuwano rogówkę, soczewkę i ciało szkliste. Pozostałą część oka utrwalano przez 30 min w 4% paraformaldehydzie i zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe były barwione hematoksyliną i eozyną. Oceniano siatkówkę w dwóch rejonach: centralnym i obwodowym (brzuszno-nosowym).

3.5.4. Barwienia immunohistochemiczne

3.5.4.1. Przygotowanie skrawków mrożeniowych

W różnych czasach po zmiażdżeniu nerwu wzrokowego lub po podaniu NMDA pobierano oczy i przygotowywano mrożone skrawki siatkówek. Zwierzęta uśmiercano zgodnie z opisaną w podrozdziale 3.3.1. procedurą i natychmiast pobierano oczy. Gałki oczne rozcinano wzdłuż rąbka zębatego

http://rcin.org.pl

i usuwano rogówkę, soczewkę i ciało szkliste. Powstałe preparaty utrwalano przez 30 min w 4% (w/v) paraformaldehydzie w PB w 4°C. Po trzykrotnym płukaniu w PB preparaty poddawano krioprotekcji przez inkubację w 4°C przez 16 h w 30% (w/v) roztworze sacharozy w PB. Następnie zatapiano je w cryo-matrix(Jung, Leica, Heidelberg, Niemcy). Zatopiona tkanka była cięta na mikrotomie mrożeniowym Leica cm3050s (Heidelberg, Niemcy), a powstałe skrawki były zbierane na pokryte silanem szkiełka podstawowe i suszone.

3.5.4.2. Barwienie na obecność nitrotyrozyny

Wszystkie płukania przeprowadzono przy pomocy PBS zawierającego 0,2% Tritonu X-100 (PBST). W celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy skrawki inkubowano w 0,3% roztworze nadtlenku wodoru w PBS przez 20 min i płukano intensywnie PBST. W celu zredukowania tła skrawki inkubowano z 3% normalną surowicą kozią (NGS, *normalgoat serum*), a przeciwciało pierwszorzędowe rozpuszczono w 1% NGS w PBST. Użyto pierwszorzędowego poliklonalnego przeciwciała króliczego przeciwko nitrotyrozynie (Millipore, Schwalbach, Niemcy, rozc. 1:100). Drugorzędowe kozie przeciwciało skierowane przeciwko antygenom króliczym i skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP, Bio-Rad, Monachium, Niemcy) rozcieńczono 1:100 w PBST. Produkt reakcji HRP uwidoczniono zestawem odczynnikowym SG (VectorLabs, Peterborough, Wielka Brytania). W celu sprawdzenia specyficzności barwienia pomijano inkubację z pierwszorzędowym przeciwciałem.

3.5.4.3. Barwienie na obecność żelaza

W celu uwidocznienia żelaza przeprowadzano tzw. barwienie Perlsa: skrawki po utrwaleniu w 4% formaldehydzie były traktowane mieszaniną kwasu chlorowodorowego (1%) i żelazocyjanku potasu (2%) przez 20 min (Bagiński1951). W wyniku reakcji z żelazem powstaje związek o ciemnoniebieskim zabarwieniu – żelazocyjanek żelaza (błękit pruski). Po płukaniu wodą destylowaną, preparaty dodatkowo barwiono eozyną wodną (0,2%, 1 min).

http://rcin.org.pl

3.6. Analiza statystyczna

Dla wyników zliczania RGC wykonanywano test Kruskala-Wallisa (tzw. nieparametryczna analiza wariancji), a następnie test *post hoc* wielokrotnych porównań Dunna. Różnice były uważane za statycznie istotne dla $P<0,05$. Jeżeli nie zaznaczono inaczej, dane były prezentowane jako średnie z błędami standardowymi.

Dla danych pochodzących z ERG wykonywano jednoczynnikową analizę wariancji (*one-way*ANOVA), a następnie test *post hoc* Tukeya do porównania wyników uzyskanych po jednym i siedmiu dniach o uszkodzenia siatkówki światłem z wynikami uzyskanymi przed uszkodzeniem. Do porównania wyników uzyskanych w grupie, która otrzymywała PBS i leczonej tempolem zastosowano test t Studenta. Różnice były uznawane za statycznie istotne dla $P<0,05$.

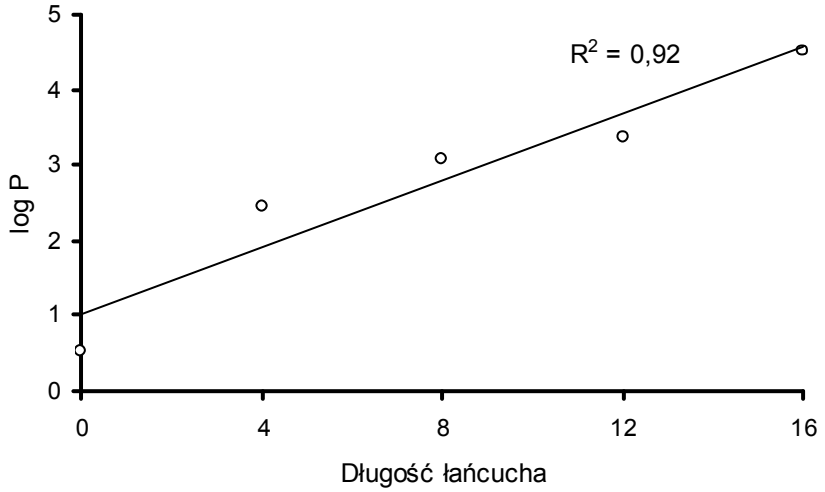
http://rcin.org.pl

4. Wyniki

4.1. Własności fizyko-chemiczne tempolu i jego estrów acylowych oraz ich oddziaływanie z błonami biologicznymi

4.1.1. Własności fizyko-chemiczne tempolu

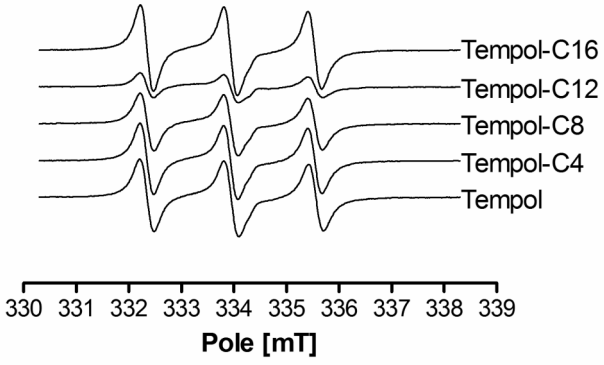
Ester-C4 tempolu w temperaturze pokojowej jest w stanie stałym, ma postać kryształków, rozpuszcza się w wodzie. Pozostałe badane estry tempolu mają w temperaturze pokojowej postać oleistej cieczy, nie rozpuszczają się w wodzie. Wyznaczone doświadczalnie współczynniki podziału woda-oktanol (log P) wynosiły: 0,53 dla tempolu niemodyfikowanego, 2,44 dla tempolu-C4, 3,08 dla tempolu-C8, 3,38 dla tempolu-C12 i 4,51 dla tempolu-C16. Zależność log P od długości dołączonego łańcucha miała charakter liniowy (rys. 11) – wraz ze wzrostem długości przyłączanego łańcuch węglowego wzrastała hydrofobowość.



Rys. 11. Zależność współczynnika podziału woda-oktanol (log P) od długości dołączonego do cząsteczki tempolu łańcucha węglowego. Dla tempolu przyjęto długość łańcucha zero.

Widma EPR tempolu i jego acylowych pochodnych miały podobny kształt (rys. 12).

http://rcin.org.pl



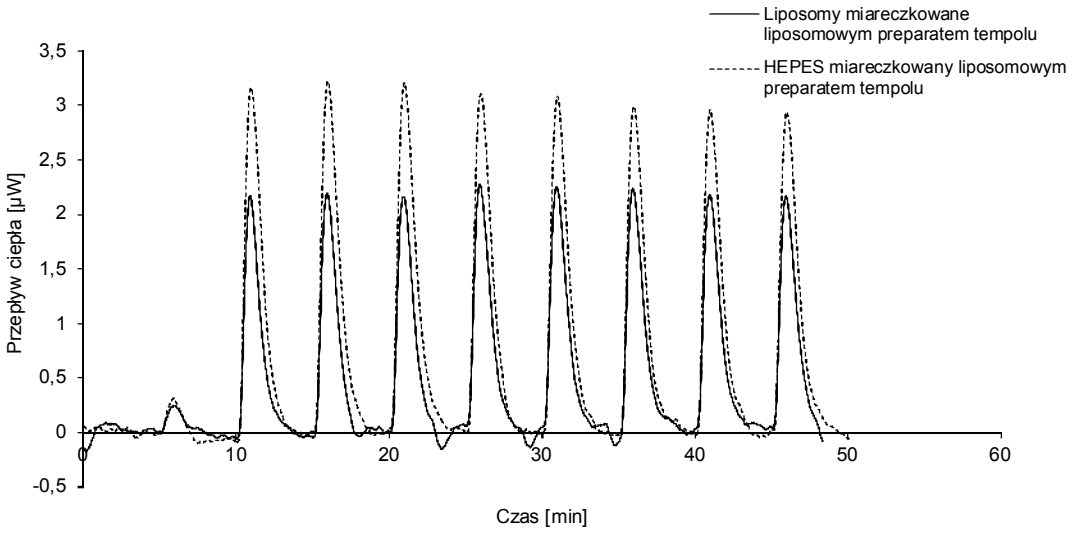
Rys. 12. Widma EPR tempolu, tempolu-C4, tempolu-C8, tempolu-C12 i tempolu-C16. Widma zarejestrowano używając tych samych parametrów i zostały przedstawione w tej samej skali.

4.1.2. Oddziaływanie tempolu i jego pochodnych z modelową błoną lipidową

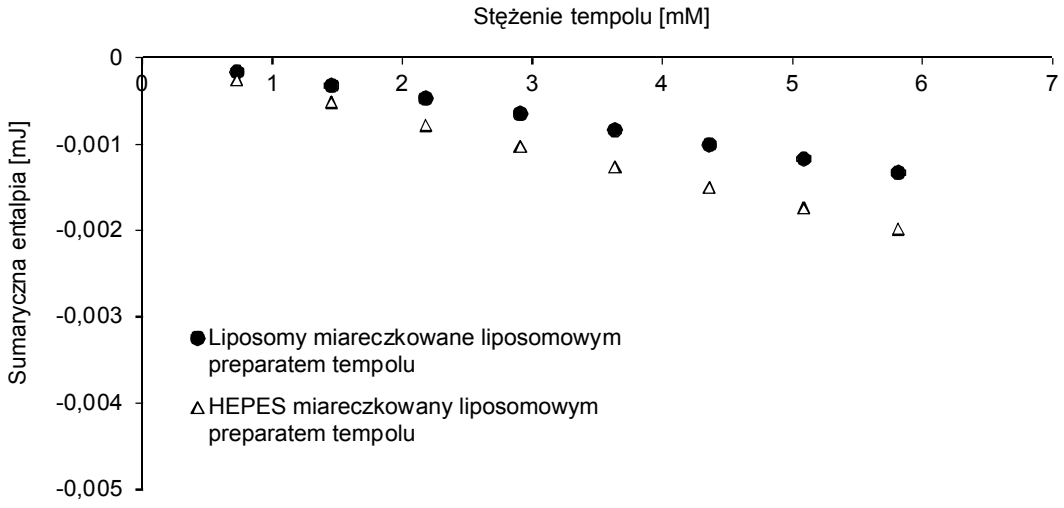
Rys. 13 przedstawia termogram miareczkowania „pustych" liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu. Miareczkowanie buforu HEPES liposomowympreparatem tempolu dawało sygnał egzotermiczny, a wartość generowanego ciepła (której miarą jest pole pod pasmem sygnału) nie zmieniała się w trakcie trwania doświadczenia. Słabszy, ale również egzotermiczny był sygnał powstający w wyniku miareczkowania liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu, sygnał ten był praktycznie stały w badanym zakresie pomiarowym.

Sumaryczne wartości entalpii w zależności od stężenia tempolu w komorze pomiarowej przedstawia rys. 14. Wypadkowa entalpiatransferu tempolu z liposomowegopreparatu do „pustych" liposomów była bliska zeru i została przedstawiona na rys. 23.

http://rcin.org.pl



Rys. 13. Termogramy pomiarów transferu tempolu z preparatu liposomowego do liposomów„pustych”.

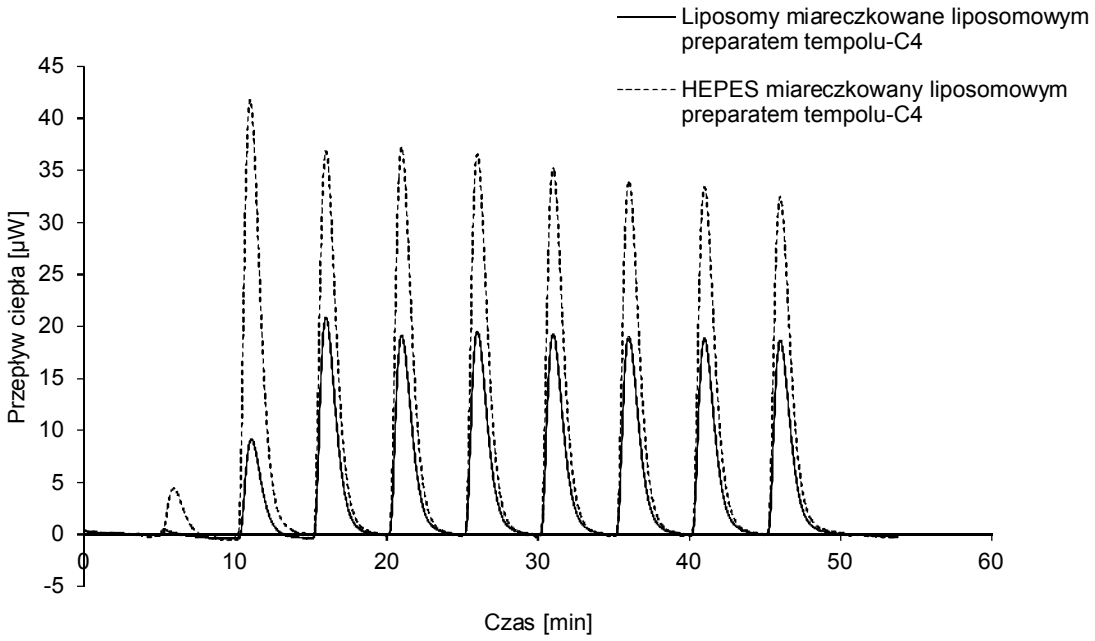


Rys. 14. Sumaryczne wartości entalpii rozcieńczania liposomowegopreparatu tempolu (trójkąty) oraz transferu tempolu do liposomów „pustych”(koła) w funkcji stężenia tempolu w komorze pomiarowej.

Rys. 15 przedstawia termogramy miareczkowania liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu-C4. Rozcieńczanie liposomowegopreparatu tempolu-C4 w buforze HEPES jest procesem egzotermicznym, a wartości ge-

http://rcin.org.pl

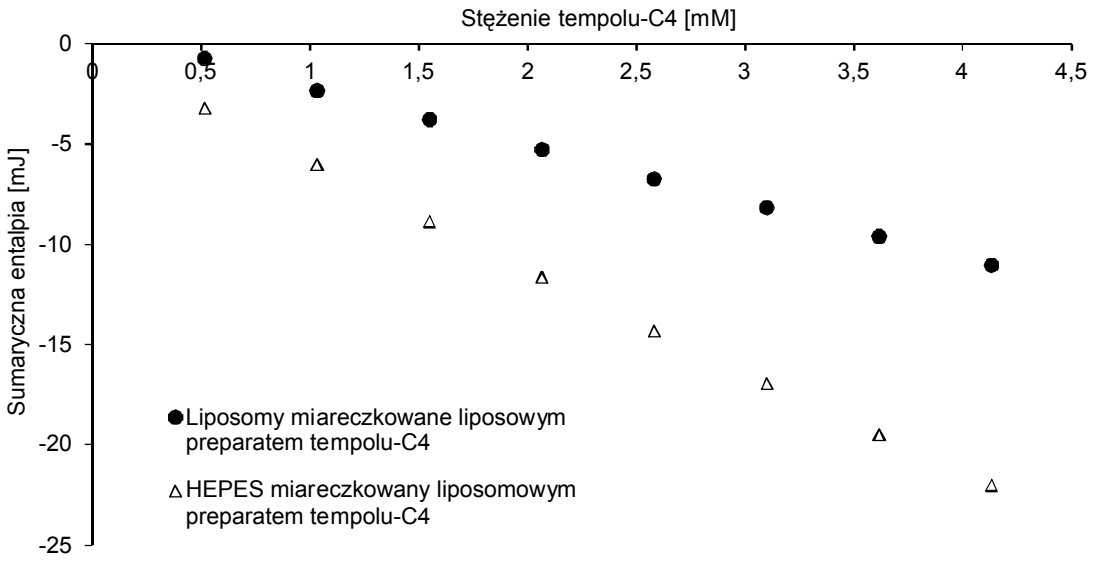
nerowanego ciepła zmniejszały się nieznacznie w trakcie trwania doświadczenia. Podobnie miareczkowanie „pustych" liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu-C4 dawało sygnał egzotermiczny, który był stały w badanym przedziale stężeń.



Rys. 15. Termogramy pomiarów transferu tempolu-C4 z preparatu liposomowego do zawiesiny liposomów DOPC.

Sumaryczne wartości entalpii w zależności od stężenia liposomowegopreparatu tempolu-C4 w komorze pomiarowej przedstawia rys. 16. Wypadkowa entalpia transferu tempolu-C4 z liposomowegopreparatu do „pustych" liposomów jest dodatnia i została przedstawiona na rys. 23.

http://rcin.org.pl

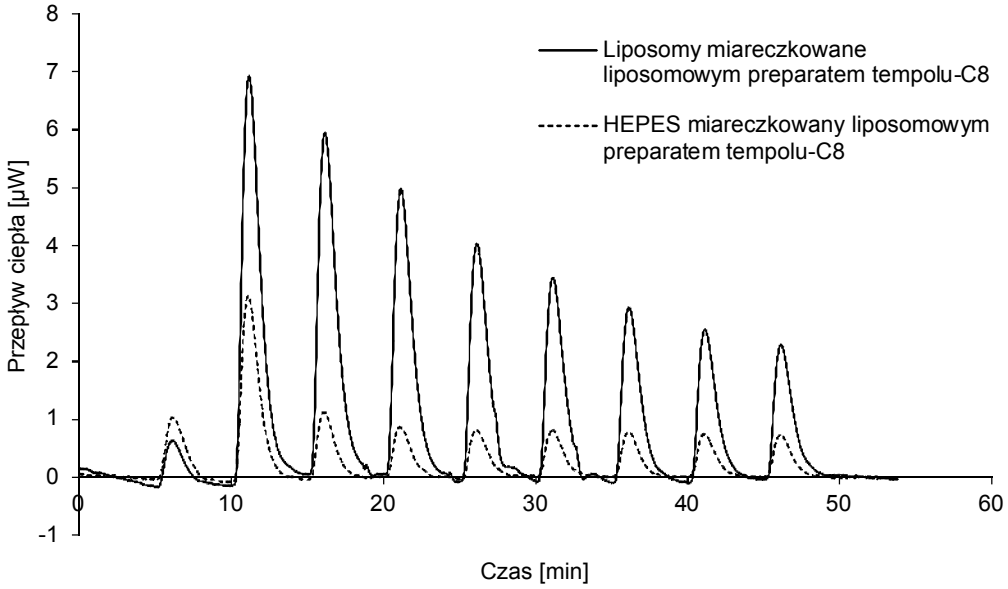


Rys. 16. Sumaryczne wartości entalpii rozcieńczania liposomowegopreparatu tempolu-C4 (trójkąty) oraz transferu tempolu-C4 do liposomów DOPC (koła) w funkcji stężenia tempolu-C4 w komorze pomiarowej.

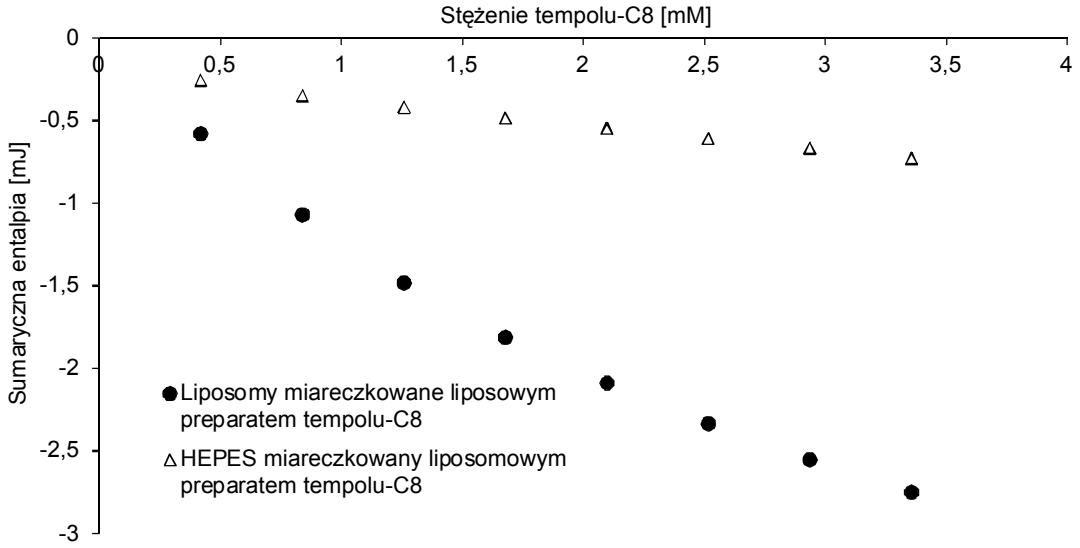
Rys. 17 przedstawia termogramy pomiarów transferu tempolu-C8 z preparatu liposomowego do zawiesiny liposomów DOPC. Rozcieńczanie liposomowegopreparatu tempolu-C8 w buforze HEPES było reakcją egzotermiczna o charakterze wysyceniowym w badanym zakresie stężeń. Silniejszy jednak był sygnał powstający w wyniku miareczkowania liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu-C8. Reakcja ta miała także charakter wysyceniowy.

Sumaryczna entalpia w zależności od stężenia tempolu-C8 w postaci liposomowego preparatu w komorze pomiarowej została przedstawiona na rys. 18. Wypadkowa entalpia była ujemna i została przedstawiona narys. 23.

http://rcin.org.pl



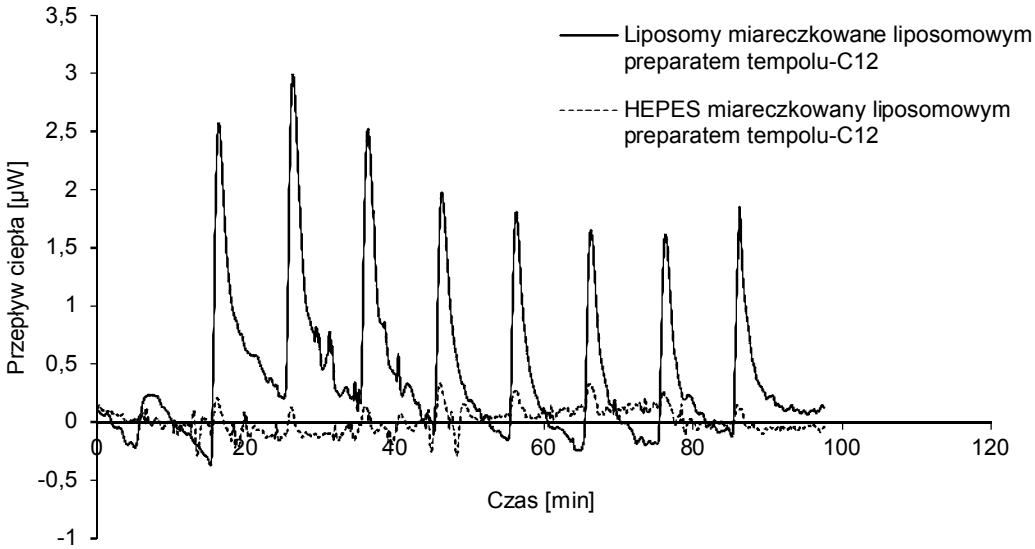
Rys. 17. Termogramy pomiarów transferu tempolu-C8 z preparatu liposomowego do zawiesiny liposomów DOPC.



Rys. 18. Sumaryczne wartości entalpii rozcieńczania liposomowegopreparatu tempolu-C8 (trójkąty) oraz transferu tempolu-C8 do liposomów DOPC (koła) w funkcji stężenia tempolu-C8 w komorze pomiarowej.

http://rcin.org.pl

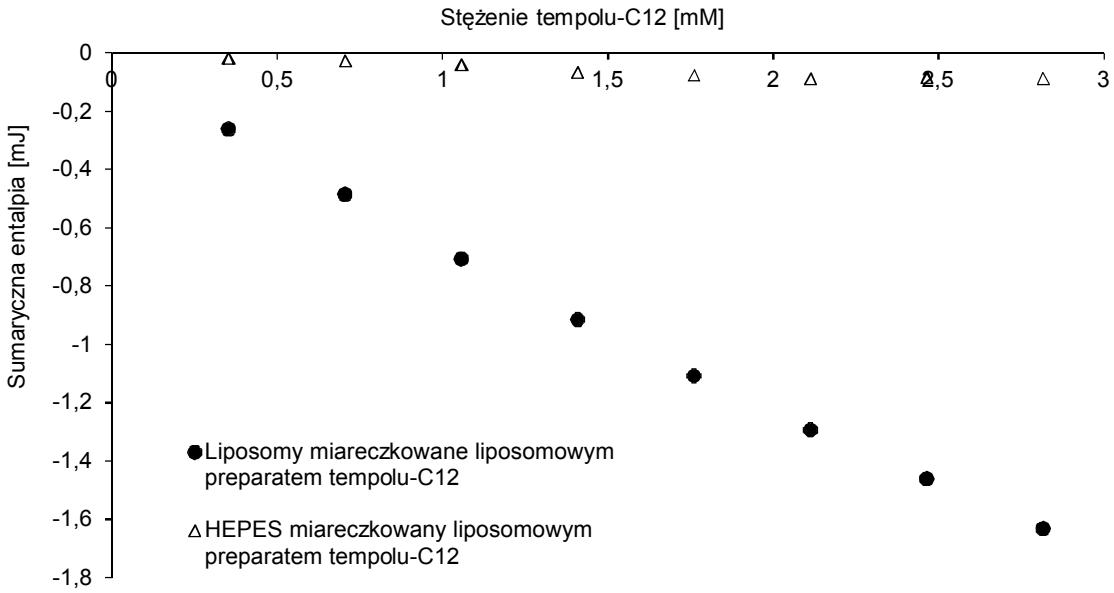
Rys. 19 przedstawia termogramy transferu tempolu-C12 z liposomowego preparatu do liposomów DOPC. Rozcieńczanie liposomowego preparatu tempolu-C12 w buforze HEPES dawało bardzo niewielki sygnał, który trudno odróżnić od szumów. Miareczkowanie liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu-C12 dawało sygnał o charakterze egzotermicznym, wartości generowanego ciepła zmniejszały się nieznacznie wraz z postępem doświadczenia.



Rys. 19. Termogramy pomiarów transferu tempolu-C12 z liposomowego preparatu do zawiesiny liposomów DOPC.

Sumaryczna entalpia w zależności od stężenia tempolu-C12 w komorze pomiarowej została przedstawiona na rys. 20. Wypadkowa entalpia była ujemna (rys. 23).

http://rcin.org.pl

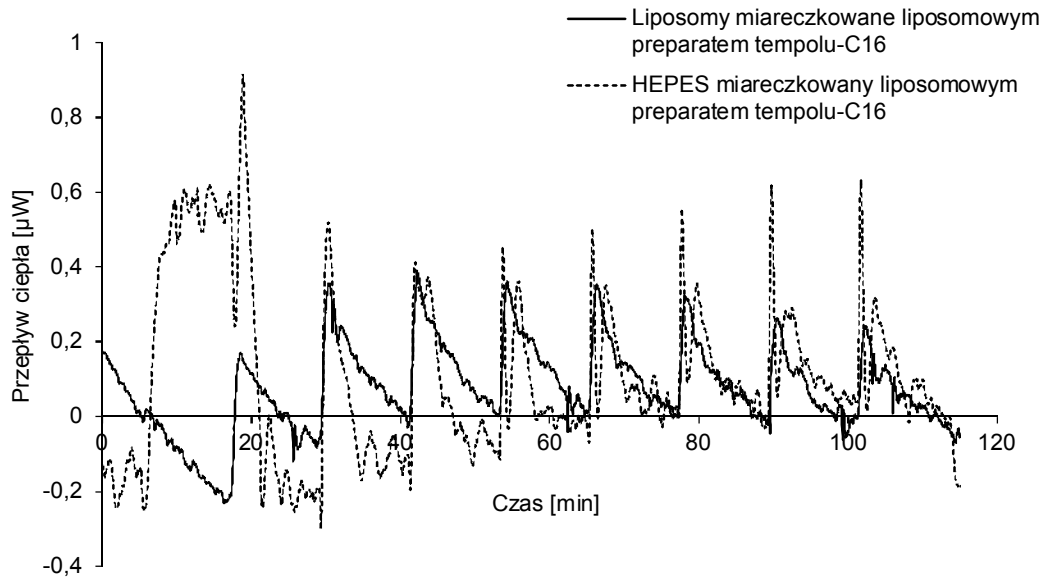


Rys. 20. Sumaryczne wartości entalpii rozcieńczania liposomowegopreparatu tempolu-C12 (trójkąty) oraz transferu tempolu-C12 do liposomów DOPC (koła) w funkcji stężenia tempolu-C12 w komorze pomiarowej.

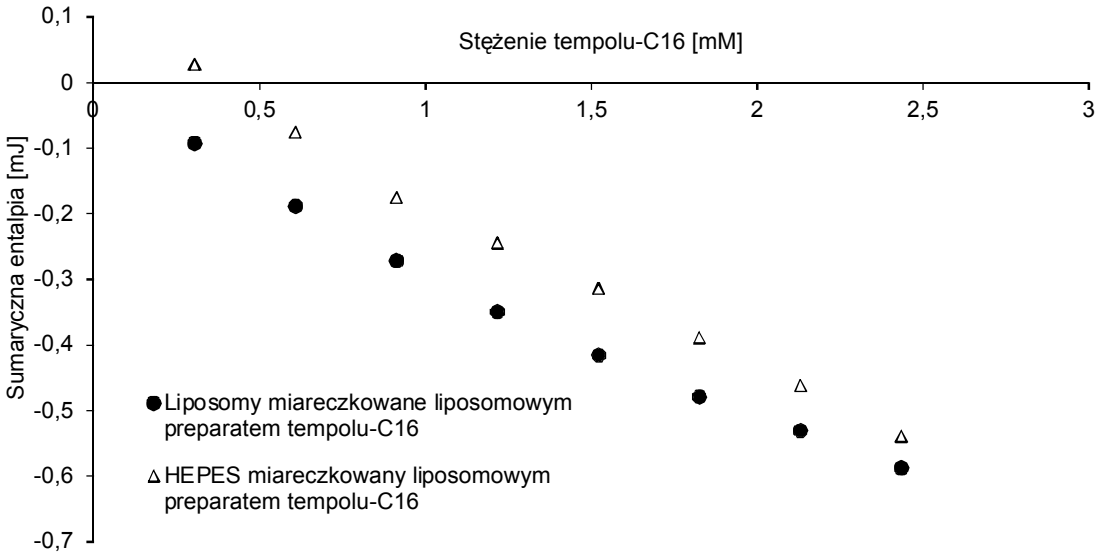
Termogramy transferu tempolu-C16 z liposomowego preparatu do liposomów DOPC zostały przedstawione na rys. 21. Rozcieńczanie liposomowego preparatu tempolu-C16 w buforze HEPES miało charakter egzotermiczny, a mierzony sygnał był stały w badanym przedziale stężeń. Podobny był sygnał, który uzyskano w wyniku miareczkowania liposomów DOPC liposomowympreparatem tempolu-C16, mierzony sygnał był stały w badanym przedziale stężeń.

Sumaryczna entalpia została przedstawiona na rys. 22. Wypadkowa entalpia była bliska zeru i została przedstawiona narys. 23.

http://rcin.org.pl

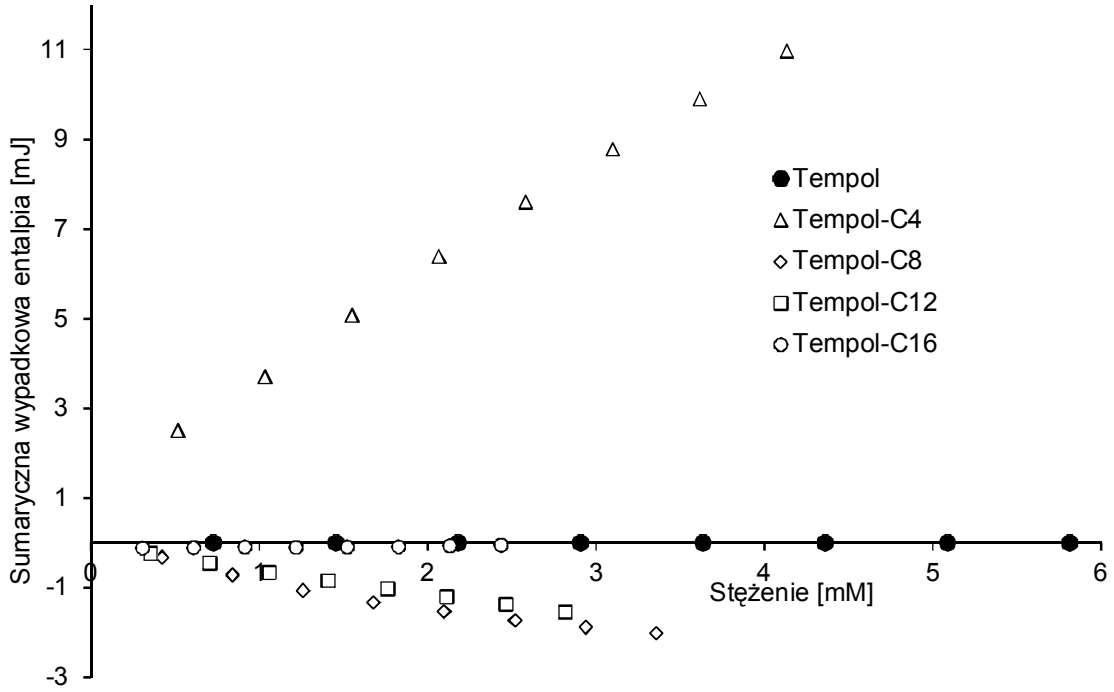


Rys. 21. Termogramy pomiarów transferu tempolu-C16 z liposomowego preparatu do zawiesiny liposomów DOPC.



Rys. 22. Sumaryczne wartości entalpii rozcieńczania liposomowegopreparatu tempolu-C16 (trójkąty) oraz transferu tempolu-C16 do liposomów DOPC (koła) w funkcji stężenia tempolu-C16 w komorze pomiarowej.

http://rcin.org.pl



Rys. 23. Sumaryczna wypadkowa entalpia transferu tempolu i estrów tempolu z liposomowych preparatów do liposomów DOPC.

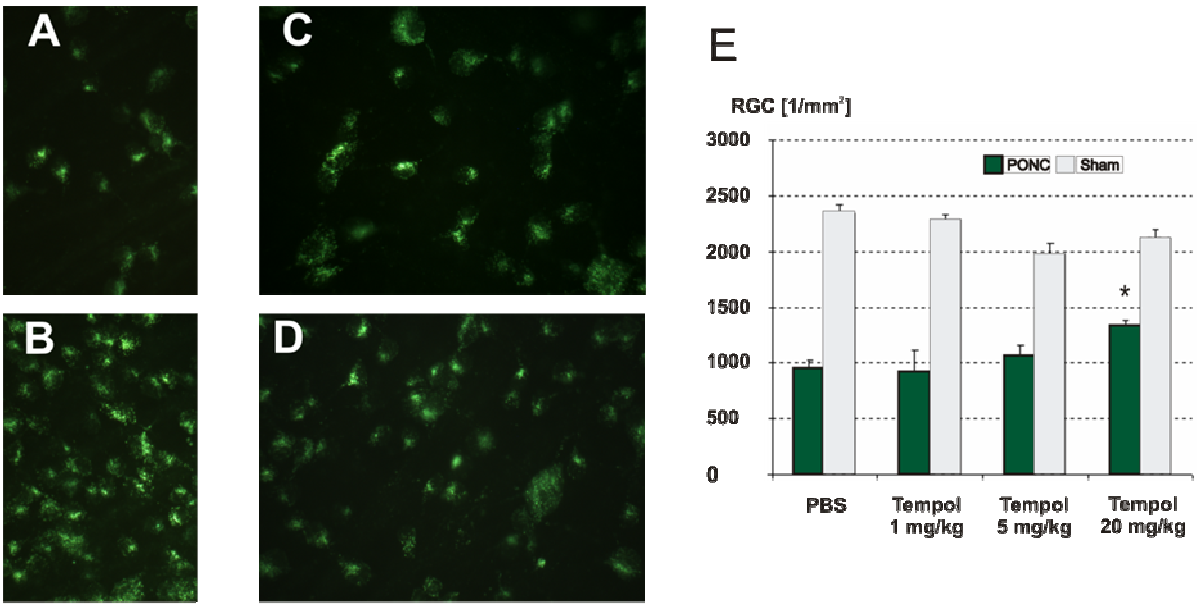
Tempol i jego estry różniły się wyraźnie charakterem interakcji z modelową błoną lipidową (rys. 23). Transfer tempolu-C8 i -C12 między błonami lipidowymi miał charakter egzotermiczny, w przypadku pozostałych związków transfer między błonami wymagał dostarczenia ciepła (tempol, tempol-C4) bądź nie zarejestrowano znaczącego sygnału przepływu ciepła (tempol-C16).

4.2. Działanie tempolu i jego estrów acylowych u zwierząt poddanych częściowemu zmiażdżeniu nerwu wzrokowego

Średnia gęstość RGC w siatkówkach, których nerwy wzrokowe poddano pozorowanej operacji i pobranych od zwierząt, którym podawano nośnik wynosiła 2342±78 mm^{-2} (n=8). Nie było znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy zwierzętami, którym podawano tempol a tymi, którym podawano nośnik. Nie było też różnicy w oczach poddanych pozorowanej operacji między grupami leczonymi estrami tempolu -C4, -C8 i -C12 a leczonymi nośnikiem.

http://rcin.org.pl

Gęstość RGC była jednak niższa u zwierząt leczonych tempolem-C16 (rys. 25).

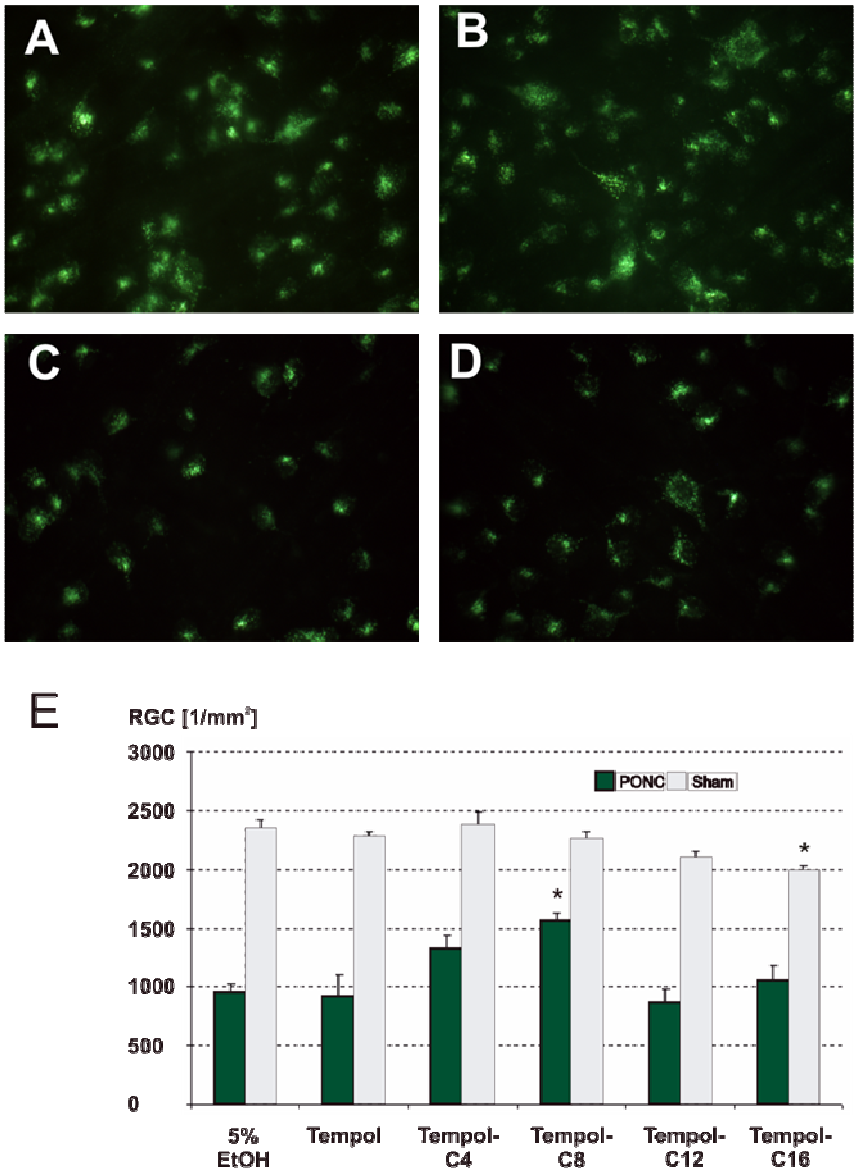


Rys. 24. Zdjęcia preparatów *wholemount* szczurzych siatkówek 7 dni po PONC, pobranych od zwierząt, którym podawano tempol w różnych dawkach lub nośnik. RGC są wyznakowane znacznikiem Fluorogold. (A) PONC + nośnik; (B) pozorowane PONC + nośnik; (C) PONC + tempol 1 mg/kg; (D) PONC + tempol 20 mg/kg. (E) Średnie gęstości RGC. PONC zmniejszał liczbę RGC o ok. 59%. Tempol częściowo chronił przed utratą RGC w dawce 20 mg/kg, ale nie 1 i 5 mg/kg. *P<0,05.

W siatkówkach, których nerwy wzrokowe poddano PONC gęstość RGC była obniżona do 952±71 mm^{-2} (n=8), czyli o ok. 59%. Tempol podawany codziennie przez siedem kolejnych dni zapobiegał częściowo uszkodzeniu wywoływanemu przez PONC (rys. 24). Dawką działającą była dawka 20 mg/kg masy ciała (P<0,05) – średnia gęstość RGC wynosiła 1321±173 mm^{-2} (n=8). Tempol nie działał protekcyjnie w niższych dawkach, tj. 1 i 5 mg/kg.

Tempol-C8 działał protekcyjnie w modelu PONC. Ester ten działał w dawce równoważnej molowo 1 mg tempolu/kg (rys. 25) – średnia gęstość RGC w siatkówkach zwierząt, które go otrzymywały wynosiła 1519±85 mm^{-2} (n=7). Tempol-C12 i -C16 nie były skuteczne w badanej dawce. U zwierząt, które otrzymywały tempol-C4 zauważono nieznamienny statycznie wzrost liczby komórek – średnia gęstość RGC wynosiła 1255±113 mm^{-2} (n=9).

http://rcin.org.pl



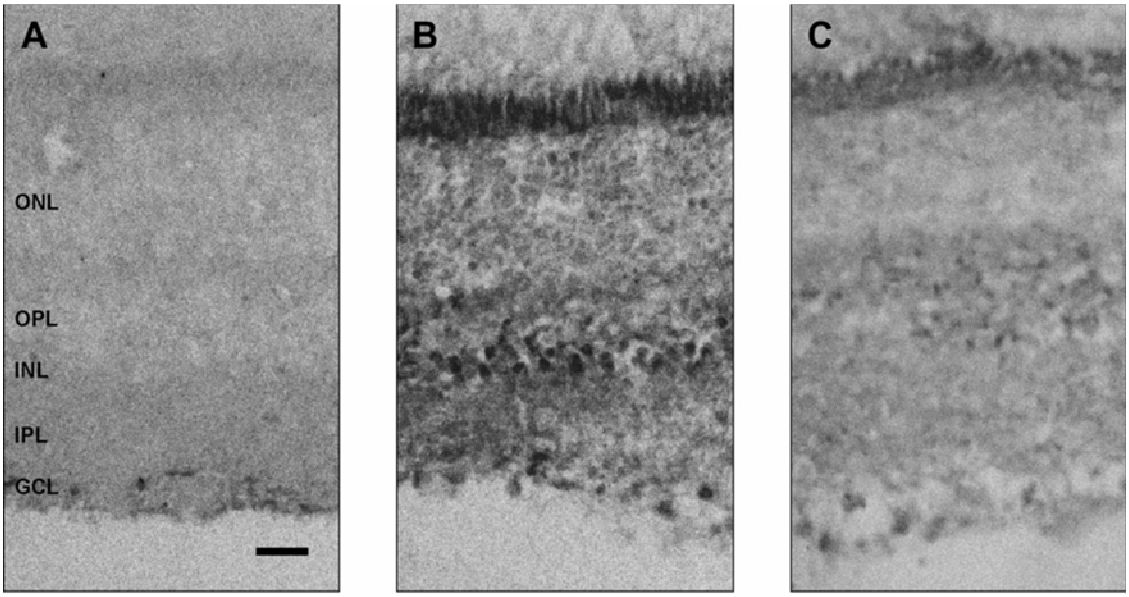
Rys. 25. Zdjęcia preparatów *wholemount* szczurzych siatkówek 7 dni po PONC, pobranych od zwierząt, którym podawano różne estry tempolu. RGC są wyznakowane znacznikiem Fluorogold. (A) tempol-C4; (B) tempol-C8; (C) tempol-C12; (D) tempol-C16. (E) Średnie gęstości RGC w siatkówkach zwierząt, którym podawano nośnik, tempol w dawce 1 mg/kg lub estry tempolu w dawce odpowiadającej molowo 1 mg tempolu/kg. Tempol-C8 wykazał działanie neuroprotekcyjne, które nie było widoczne w przypadku tempolu-C4, -C12 i –C16. Podawanie tempolu-C16 zmniejszało liczbę RGC u zwierząt poddanych pozorowanej operacji w stosunku do zwierząt, które otrzymały nośnik. *P<0,05.

http://rcin.org.pl

4.3. Działanie tempolu u zwierząt poddanych częściowemu zmiażdżeniu nerwu wzrokowego i obciążonych żelazem

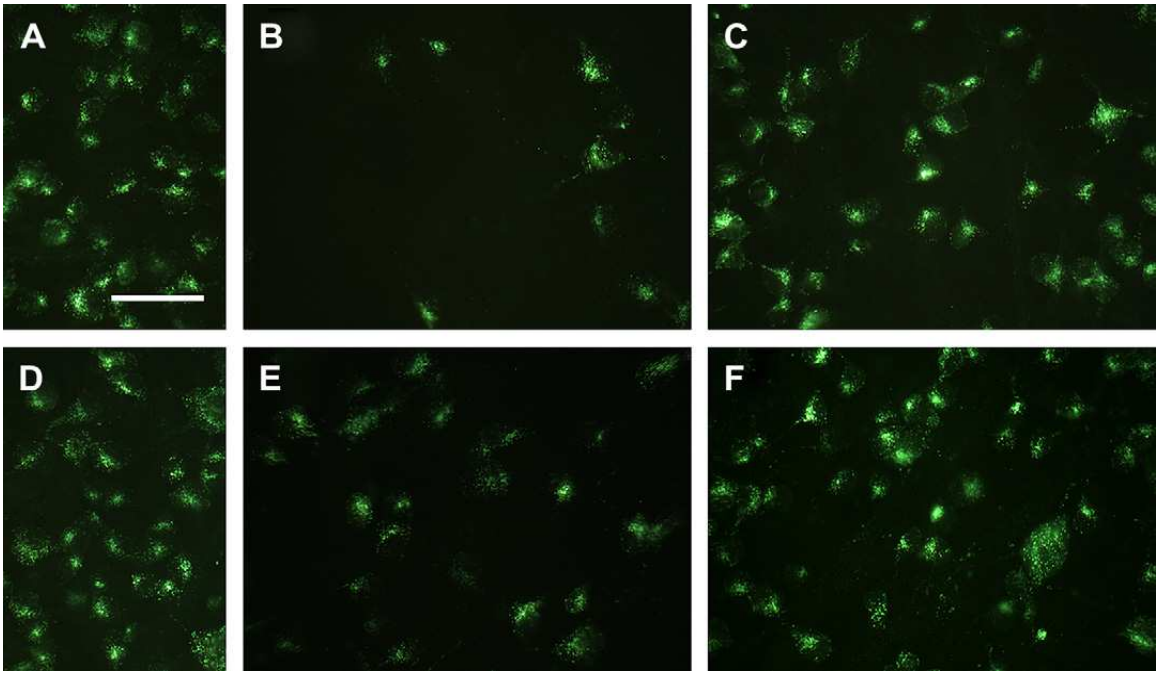
Gęstość RGC w siatkówkach zwierząt poddanych pozorowanej operacji, którym podawano dekstran żelaza lub PBS nie różniła się (rys. 28). W oczach poddanych PONC podanie dekstranu żelaza zmniejszało znamiennie gęstość RGC – z 730±144 mm^{-2} (n=7) do 297±138 mm^{-2} (n=4) (P<0,05).

W celu potwierdzenia, że podanie dekstranu żelaza prowadzi do podwyższenia poziomu wolnego żelaza w siatkówce wykonano barwienie Perlsa. Podanie dekstranu żelaza wyraźnie zwiększało intensywność barwienia w siatkówkach poddanych PONC, ale nie w siatkówkach poddanych pozorowanej operacji (rys. 26). Nie zauważono zmniejszenia akumulacji żelaza po podaniu tempolu.



Rys. 26. Akumulacja żelaza uwidoczniona przy pomocy barwienia Perlsa w skrawkach siatkówek po PONC. (A) PONC, bez podania dekstranu żelaza; (B) PONC + dekstran żelaza; (C) pozorowana operacja + dekstran żelaza. Akumulacja żelaza jest bardziej widoczna w oczach poddanych PONC niż poddanych pozorowanej operacji. Skala odpowiada 25 µm.

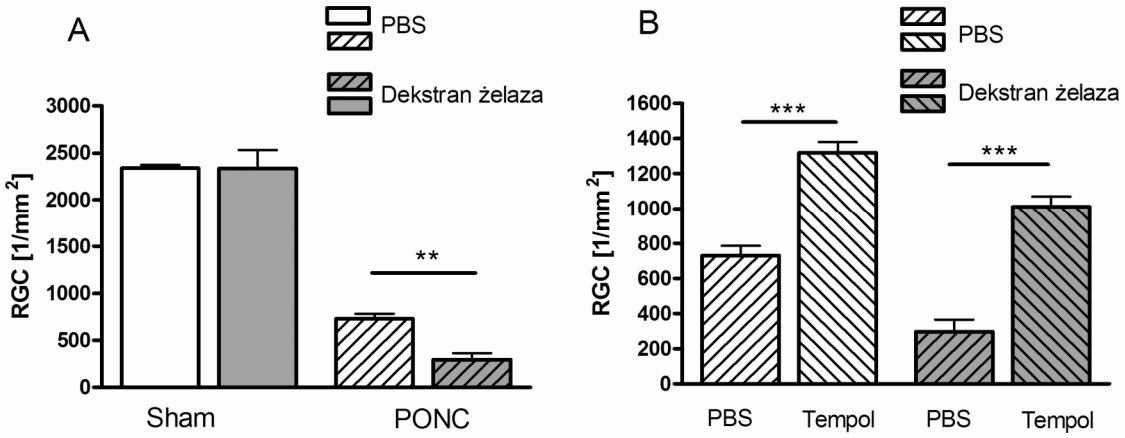
http://rcin.org.pl



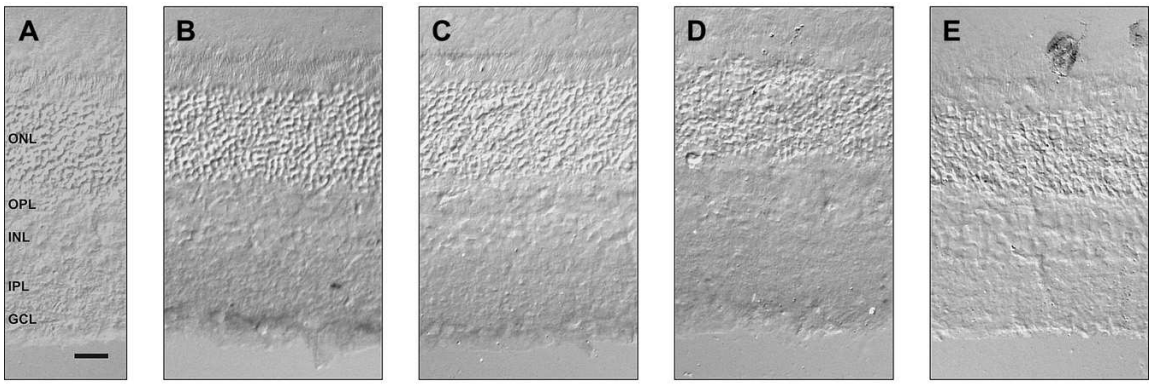
Rys. 27. Preparaty *wholemount*siatkówki po wybarwieniu RGC znacznikiem Fluorogold. Liczba RGC w siatkówkach poddanych pozorowanej operacji nie różniła się znacząco u zwierząt, którym podano dekstran żelaza (A) lub PBS (D). Po PONC liczba RGC była znacząco niższa u zwierząt, którym podano żelazo (B) niż u tych, którym podano PBS (E). Podanie tempolu (20 mg/kg) zmniejszało utratę RGC zarówno u zwierząt, którym podano żelazo (C) jak i u tych, którym podano PBS (F). Skala odpowiada 50 μm.

Podawanie tempolu w dawce 20 mg/kg u zwierząt, które otrzymały wcześniej dekstran żelaza powodowało, że utrata RGC w wyniku PONC była mniejsza niż u zwierząt otrzymujących dekstran żelaza i PBS (1011±130, n=5 vs. 297±138, n=4; P=0,0002; rys. 28B). Tempol u zwierząt, którym podano dekstran żelaza „ratował" większy procent RGC niż u zwierząt niepoddanych obciążeniem żelazem (3,4-krotny vs. 1,8-krotny wzrost wzrost przeżywających RGC).

http://rcin.org.pl



Rys. 28. Średnia gęstość komórek zwojowych u szczurów, którym podawano dekstran żelaza lub PBS. (A) Liczba RGC nie różniła się w zależności od tego, czy podano PBS czy dekstran żelaza w oczach poddanych pozorowanej operacji. Liczba ta była jednak różna w oczach poddanych PONC pobranych od zwierząt, które otrzymały dekstran żelaza lub PBS. (B) Podawanie tempolu zmniejszało wywołaną PONC utratę RGC w obu grupach zwierząt. **P<0,01; ***P<0,001.



Rys. 29. Barwienie na obecność nitrotyrozyny w skrawkach siatkówki 7 dni po PONC lub pozorowanej operacji. (A) Nie obserwowano barwienia w obrębie GCL w oczach poddanych pozorowanej operacji w żadnej z grup doświadczalnych. (B) Obserwowano silne barwienie na obecność nitrotyrozyny w oczach poddanych PONC pobranych od zwierząt, którym podano dekstran żelaza. Barwienie to było silniejsze niż w oczach pobranych od zwierząt, którym nie podano żelaza (C). (D) Podanie tempolu u zwierząt, którym podano dekstran żelaza powodowało zmniejszenie barwienia na obecność nitrotyrozyny (por. B). (E) U zwierząt leczonych tempolem, którym nie podano dekstranu żelaza poziom barwienia na obecność nitrotyrozyny był niemal tak niski jak w oczach poddanych pozorowanej operacji. Skala 50 μm.

http://rcin.org.pl

Po PONC w grupie, której podawano PBS pojawiła się silna immunoreaktywność przeciwko nitrotyrozynie w obrębie GCL w porównaniu z oczami poddanymi pozorowanej operacji. U zwierząt, którym podawano dekstran żelaza ta różnica była nawet bardziej widoczna (rys. 28).

Podawanie tempolu w dawce 20 mg/kg zmniejszało znacząco barwienie na obecność nitrotyrozyny w oczach poddanych PONC pobranych od zwierząt, którym nie podano dekstranu żelaza. U zwierząt, którym podano dekstran żelaza podanie tempolu w dawce 20 mg/kg jedynie nieznacznie zmniejszyło barwienie na obecność nitrotyrozyny, mniej było barwiących się ciał komórkowych w obrębie GCL.

Nie obserwowano zauważalnego barwienia na obecność nitrotyrozyny w skrawkach oczu poddanych pozorowanej operacji.

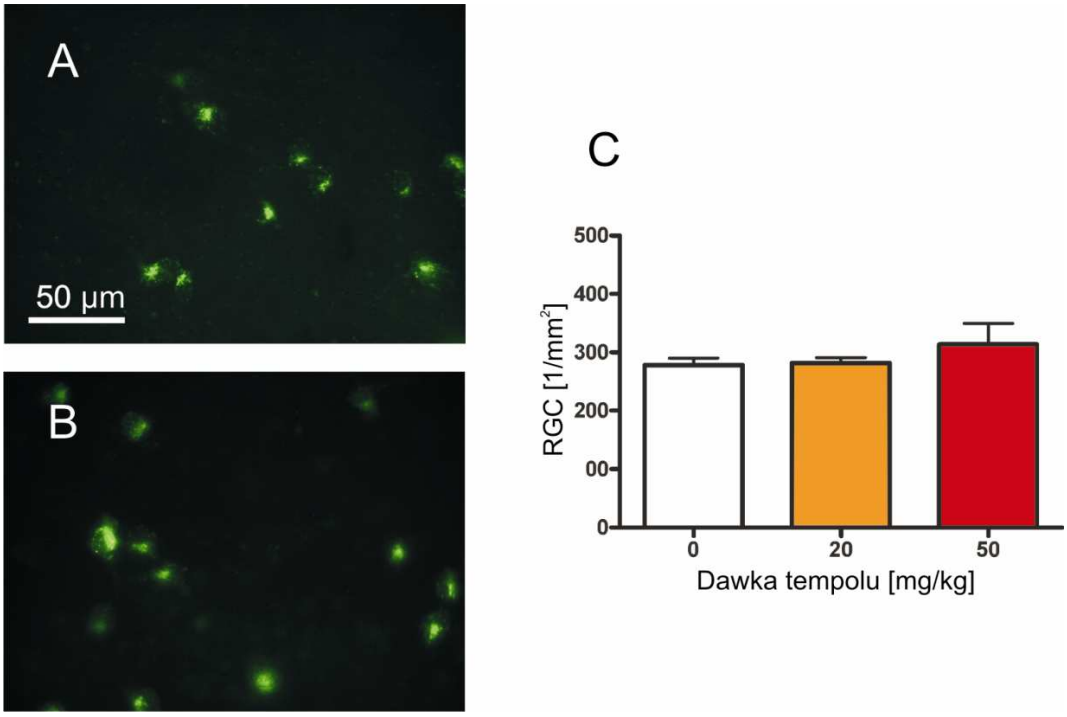
4.4. Działanie tempolu i jego estrów -C4 i -C8 w modelu ekscytotoksyczności NMDA

W oczach, do których ciała szklistego podawano PBS średnia gęstość komórek zwojowych wynosiła 2342±78 mm^{-2}. Nie zauważono znamiennej statystycznie różnicy między zwierzętami młodymi (6-tygodniowymi) a starszymi (9-10-tygodniowymi). Również podawanie tempolu, tempolu-C4 czy tempolu-C8 nie wpływało znamiennie na tę liczbę. Podanie doszklistkowo NMDA zmniejszało liczbę RGC o ok. 90%, czyli do 278±12 mm^{-2} (n=8). Nie zauważono statystycznie znamiennej różnicy między zwierzętami młodymi a starszymi.

Podawanie tempolu nie wywołało efektu protekcyjnego przeciwko wywołanej NMDA utracie RGC w żadnej z badanych dawek (do 50 mg/kg; rys. 30). Nie było statystycznie znamiennej różnicy między grupą młodych zwierząt a zwierząt starszych. Również tempol-C4 nie działał protekcyjnie w żadnej z badanych dawek w żadnej z badanych grup zwierząt.

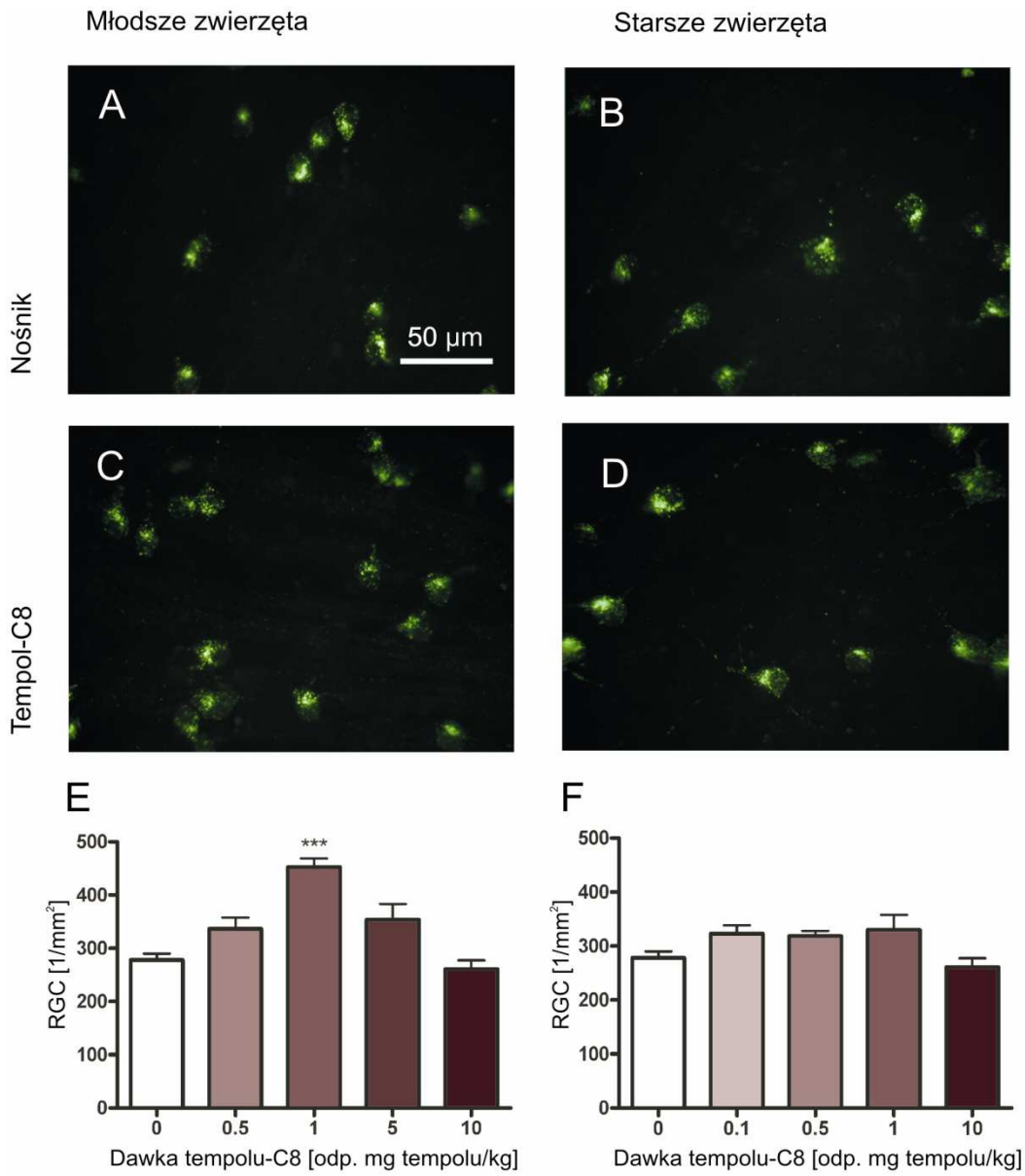
Protekcyjne działanie zauważono natomiast w przypadku tempolu-C8. Podawanie tempolu-C8 chroniło częściowo przed utratą RGC wywołaną podaniem doszklistkowym NMDA (rys. 31). Liczba komórek była większa o 63% niż w grupie, która otrzymywała nośnik i wynosiła 453±16 mm^{-2} (n=12).

http://rcin.org.pl



Rys. 30. Reprezentatywne zdjęcia preparatów *wholemount*siatkówki po wybarwieniu RGC znacznikiem Fluorogold. Siatkówki zostały pobrane od młodych zwierząt, którym podano NMDA i nośnik tempolu (A) lub tempol w dawce 20 mg/kg (B). Gęstość RGC nie różniła się istotnie po podaniu tempolu (C).

http://rcin.org.pl



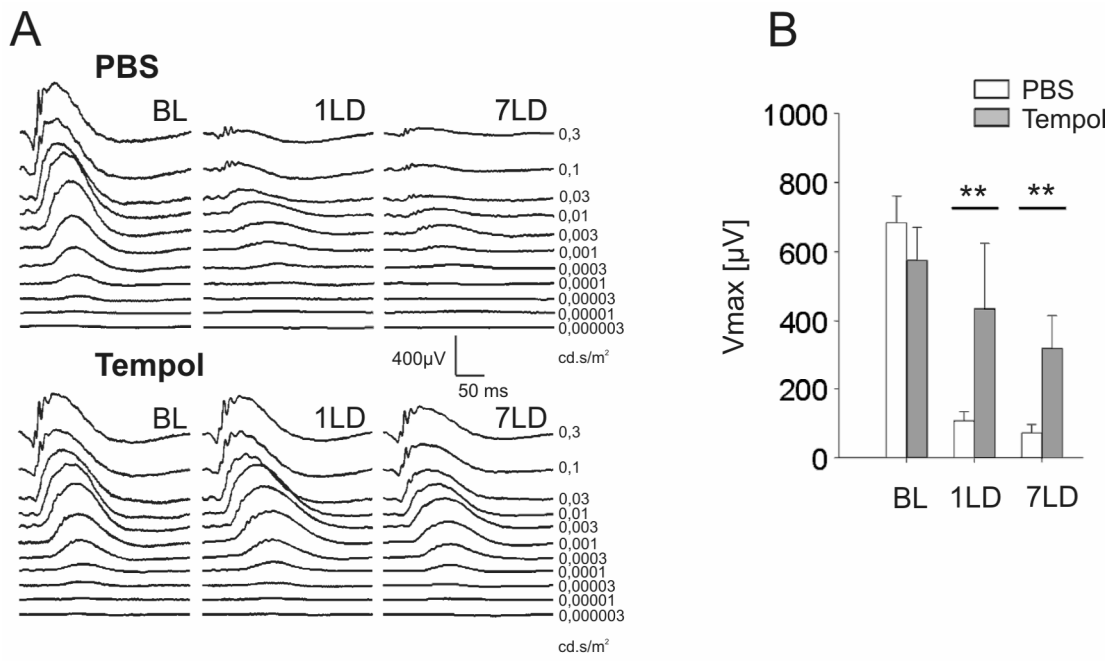
Rys. 31. Reprezentatywne zdjęcia preparatów *wholemount*siatkówki po wybarwieniu RGC znacznikiem Fluorogold. Siatkówki zostały pobrane od zwierząt, którym podawano nośnik (A, B) lub tempol-C8 w dawce odpowiadającej molowo 1 mg tempolu/kg (C, D) przez 7 dni po podaniu doszklistkowym NMDA. Widoczna jest różnica między zwierzętami młodszymi (A, C) a starszymi (B, D). Gęstość RGC była statystycznie znamiennie wyższa u młodszych zwierząt, którym podano NMDA i tempol-C8 w dawce odpowiadającej 1 mg tempolu na kg (E). Efekt ten nie był obserwowany u zwierząt starszych (F). ***P<0,001.

http://rcin.org.pl

4.5. Działanie tempolu w modelu uszkodzenia silnym światłem

Sześciogodzinna ekspozycja na światło o intensywności 2700 lx powodowała u zwierząt, które otrzymywały nośnik głęboką, choć niecałkowitą utratę sygnału ERG zarówno w warunkach skotopowych jak (rys. 32) i fotopowych (rys. 33). W warunkach skotopowych maksymalna amplituda sygnału (Vmax) po uszkodzeniu siatkówki silnym światłem wynosiła, po jednym i siedmiu dniach od urazu, 19% i 11% amplitudy przed uszkodzeniem. Tempol w sposób znaczący zapobiegał pogorszeniu ERG. Vmax u szczurów traktowanych tempolem wynosiła, po jednym i siedmiu dniach od uszkodzenia, 82% i 56%. U szczurów poddanych ekspozycji na silne światło, którym podawano PBS obserwowano również znaczące zmniejszenie odpowiedzi ERG w warunkach fotopowych – amplituda fali b po jednym dniu od uszkodzenia silnym światłem zmniejszyła się do 24% amplitudy przed uszkodzeniem, a po siedmiu dniach nie zauważono poprawy. Zmniejszenie amplitudy fali b w wyniku ekspozycji na silne światło było znacznie mniejsze u zwierząt, które otrzymały tempol – amplituda ta wynosiła 74% i 55% po jednym i siedmiu dniach od ekspozycji na światło.

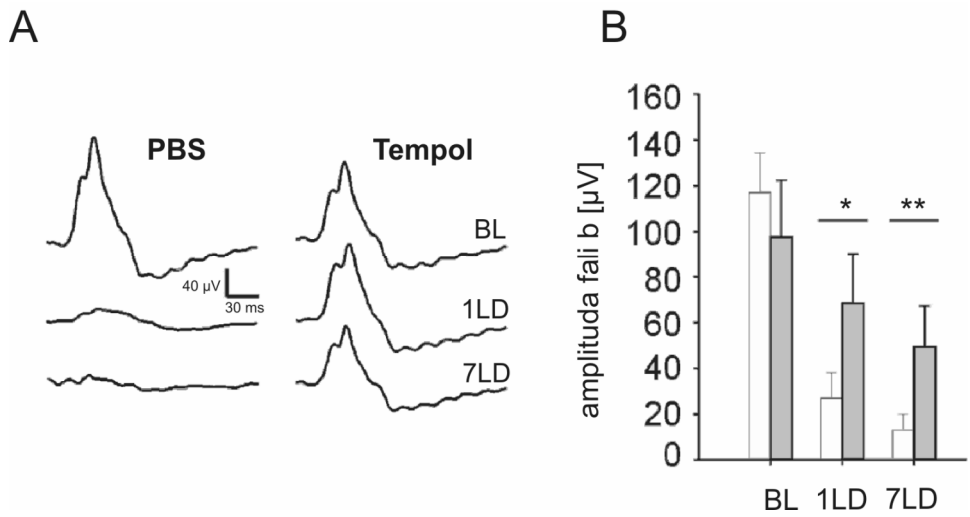
http://rcin.org.pl



Rys. 32. Reprezentatywne odpowiedzi ERG w warunkach skotopowych na bodźce o rosnącej luminancji uzyskane od zwierzęcia leczonego tempolem (100 mg/kg, 30 min przed ekspozycją na silne światło) i zwierzęcia, któremu podano nośnik (A). ERG rejestrowano przed uszkodzeniem światłem (BL, *baseline*), 1 dzień po uszkodzeniu (1 LD) i 7 dni po uszkodzeniu światłem (7 LD). Podawanie tempolu zmniejszało wywołane ekspozycją na silne światło pogorszenie skotopowego ERG w 1. i 7. dniu po ekspozycji na silne światło, co uwidaczniają różnice w maksymalnej amplitudzie sygnału ERG (Vmax) (B). **P<0,01. Słupki przedstawiają średnią ± odchylenie standardowe.

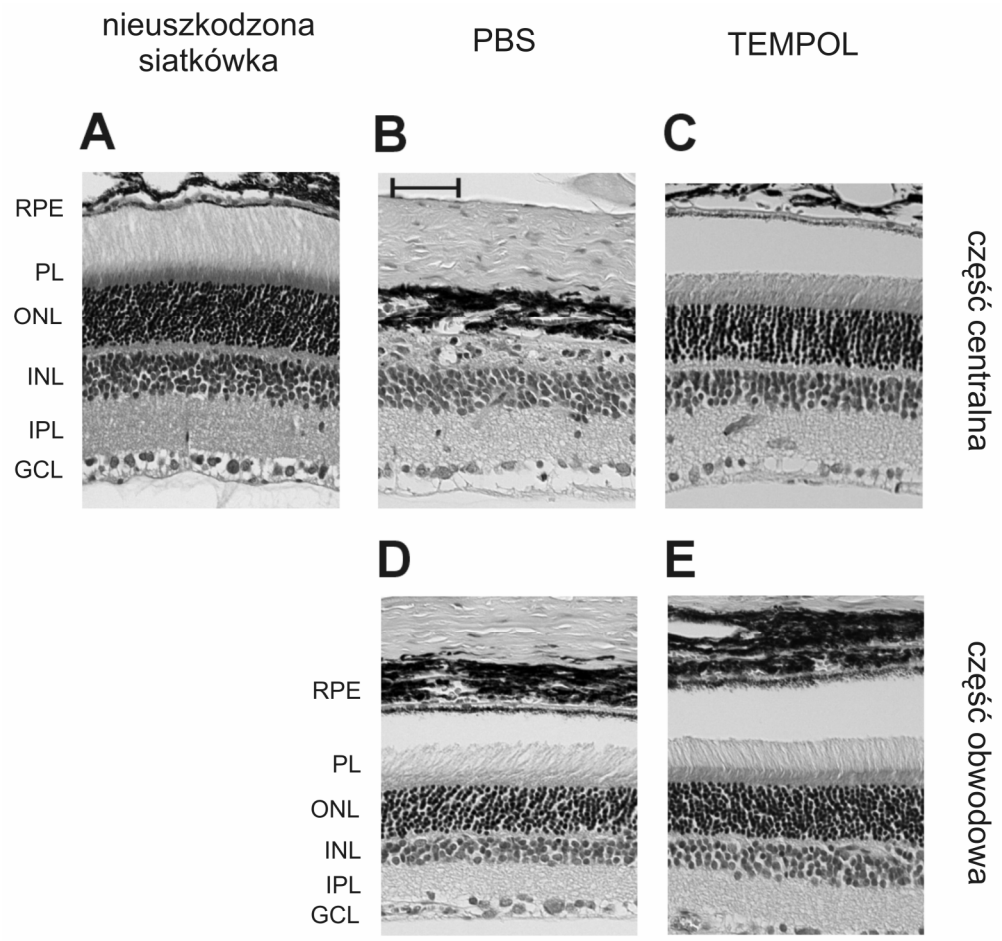
W siatkówkach szczurów poddanych ekspozycji na światło o natężeniu 2700 lx obserwowano w centralnej części siatkówki utratę jąder komórkowych fotoreceptorów (rys. 34). W obrębie ONL pozostawały jedynie nieliczne jądra komórkowe. Zanikały zewnętrzne i wewnętrzne segmenty fotoreceptorów. Podobnie zanikały komórki barwnikowe. OPL ulegała dezintegracji. Jednakże zarówno jądra fotoreceptorów jak i ich segmenty były dobrze zachowane w obwodowej części siatkówki u szczurów, które otrzymały PBS. U szczurów, które otrzymały tempol, jądra fotoreceptorów w obrębie ONL były dobrze zachowane. Jedynie w niektórych częściach siatkówki obserwowane nieznaczne skrócenie zewnętrznych segmentów fotoreceptorów. Podobnie jak w grupie, która otrzymywała PBS nie zaobserwowano zmian w obwodowej części siatkówki.

http://rcin.org.pl



Rys. 33. Reprezentatywne odpowiedzi ERG w warunkach fotopowych na bodziec o luminancji 10 cd.s/m^2 uzyskane od zwierzęcia leczonego tempolem (100 mg/kg, 30 min przed ekspozycją na silne światło) i zwierzęcia, któremu podano nośnik (A). ERG rejestrowano przed uszkodzeniem światłem (BL, *baseline*), 1 dzień po uszkodzeniu (1 LD) i 7 dni po uszkodzeniu światłem (7 LD). Amplituda fali b była znamiennie wyższa u zwierząt, którym podano tempol (B). *P<0,05,**P<0,01. Słupki przedstawiają średnią ± odchylenie standardowe.

http://rcin.org.pl



Rys. 34. Reprezentatywne obrazy skrawków siatkówki (wybarwionych hematoksyliną i eozyną) pobranych od (A) niepoddanych uszkodzeniu światłem i nieleczonych szczurów lub pobranych siedem dni po sześciogodzinnej ekspozycji na światło o natężeniu 2700 lx. Szczurom tym podano PBS (B,D) lub tempol (C,E). Tempol chronił przed uszkodzeniem w centralnej części siatkówki. Obwodowa część siatkówki (część brzuszno-nosowa) nie wykazywała żadnych zmian morfologicznych zarówno u szczurów, które otrzymywały PBS jak i u tych, które otrzymywały tempol. Skala 50 µm.

http://rcin.org.pl

5. Dyskusja

Uważa się, że w chorobach neurodegeneracyjnych siatkówki znaczącą rolę odgrywa stres wolnorodnikowy. W związku z tym jedną ze strategii terapeutycznych może być podawanie mimetyków kluczowego enzymu antyoksydacyjnego – SOD.

W ramach niniejszej pracy badałem mimetyk SOD tempol i jego pochodne, które różniły się długością przyłączonego łańcucha węglowego. Modyfikowanie w ten sposób cząsteczki tempolu miało spotęgować aktywność neuroprotekcyjną powstałych związków zwiększając ich powinowactwo do błon, a przez to efektywność wychwytywania rodników w błonach. Mogłoby to znacznie ograniczyć uszkodzenia wolnorodnikowe w komórce poprzez unieszkodliwianie rodników w miejscu ich powstania, a także poprzez efektywną ochronę wrażliwych na peroksydację składników błon.

Badane związki różniły się wyraźnie hydrofobowością, a także charakterem interakcji z błoną modelową. Nie różniły się natomiast znacząco ich widma EPR. Spośród czterech przebadanych nowych związków na największą uwagę zasługuje tempol-C8, która okazał się być bardziej efektywny niż tempol w modelach PONC i toksyczności NMDA.

5.1. Wpływ modyfikacji cząsteczki tempolu na własności fizykochemiczne i farmakologiczne powstałych związków

5.1.1. Znaczenie lipofilności dla własności farmakologicznych potencjalnego leku

W celu zwiększenia powinowactwa tempolu do błon biologicznych stworzono estry tempolu i kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha węglowego, a więc związki, które miały być bardziej lipofilne od wyjściowej cząsteczki. Inną metodę zwiększenia powinowactwa do błon zastosowali np. Pignatello i wsp. (2006), którzy stworzyli estry idebenonu (zmiatacza wolnych rodników będącego syntetycznym analogiem koenzymu Q10) i krótkołańcuchowych kwasów 2-alkiloaminowych. Sugerowali oni, że takie koniugaty nie tylko są bardziej hydrofobowe, ale także mają własności amfifilowe, co zwięk-

http://rcin.org.pl

sza ich wchłanianie poprzez błony biologiczne i zwiększa ich stabilność we krwi. Stwierdzili też przy pomocy metod kalorymetrycznych, że pochodne te mają większe powinowactwo do modelowej błony biologicznej niż estry idebenonu i kwasów tłuszczowych o takiej samej długości łańcucha.

Modyfikowanie aktywności leku przy pomocy wpływania na jego lipofilność jest znane od dawna. Lipofilność potencjalnego leku ma bowiem ogromne znaczenie dla jego właściwości – wpływa na jego charakterystykę wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji z organizmu, a także na farmakodynamikę i profil toksykologiczny. Większa lipofilność sprzyja przechodzeniu przez barierę krew-mózg (Liu i wsp. 2008). Zbyt duża lipofilność nie jest jednak korzystna, gdyż związana jest z niepożądanymi cechami leku, takimi jak szybki i nieprzewidywalny metabolizm, intensywne wiązanie się z białkami osocza krwi i nagromadzanie się w tkankach (Smith i wsp. 1996). Wysoka lipofilność powoduje też problemy z rozpuszczalnością substancji, wiąże się ze słabym wchłanianiem, może też skutkować wiązaniem się z hydrofobowymi domenami białek, które nie są celem badanego leku i w ten sposób zwiększać jego toksyczność (Pajouhesh i Lenz 2005).

Zależność aktywności grupy podobnych substancji (np. o różnej długości dołączonego łańcucha alkilowego) od hydrofobowości ma charakter paraboliczny – zwiększanie lipofilności zwiększa aktywność do pewnej granicy, dalsze zwiększanie hydrofobowości prowadzi do obniżenia aktywności substancji. Taki efekt obserwowano w przypadku homologicznych serii substancji o działaniu przeciwbakteryjnym (Birnie i wsp. 2000), znieczulającym (Nakahiro i wsp. 1996), cytotoksycznym (Locatelli i wsp. 2008) i plemnikobójczym (Wong i wsp. 2002). Optymalne długości dołączonego łańcucha węglowego były różne dla tych substancji. Nie jest znana uniwersalna optymalna lipofilność leczniczej substancji (mierzona np. opisanym w dalszej części podrozdziału współczynnikiem podziału woda-oktanol, log P), ale dla niektórych grup substancji udało się ją określić, np. w przypadku barbituranów, których aktywność biologiczna bardzo wyraźnie zależała od wartości log P ustalono, że jego optymalna wartość wynosi 2 (Hansch i wsp. 1968).

W oparciu o właściwości obecnych na rynku leków Lipinski i wsp. (1997) sformułowali obecnie szeroko akceptowaną tzw. regułę pięciu (*rule of 5*) – warunki, które powinna spełniać substancja będąca dobrym kandydatem

http://rcin.org.pl

na lek. Jako jeden z tych warunków wymieniana jest wartość log P nieprzekraczająca 5.

Szczególnie istotna wydaje się lipofilność w przypadku zmiataczy wolnych rodników. Ich powinowactwo do błon lipidowych determinuje bowiem zdolność do hamowania peroksydacji lipidów. Przy pomocy EPR wykazano, że lipofilne substancje – α-tokoferol i zbliżony do niego strukturalnie TAK-218 wydajnie hamowały peroksydację lipidów w liposomach, przy czym bardziej efektywny był bardziej lipofilny TAK-218 (Murakami i wsp. 2000).

Niektóre doświadczenia z antyoksydantami stosowanymi w przemyśle spożywczym i kosmetycznym wskazują na istnienie innej zależności między lipofilnością a wydajnością zmiatania wolnych rodników w emulsjach lipidowych. Porter i wsp. (1989) sformułowali hipotezę paradoksu polarności (*polar paradox*), zgodnie z którą polarne antyoksydanty (hydrofilowe) są bardziej efektywne niż niepolarne w niepolarnych lipidach, ale w emulsjach lipidów i błonach lipidowych to antyoksydanty niepolarne (hydrofobowe) są bardziej aktywne. Późniejsze badania wykazały, że zależność między hydrofobowością antyoksydantu a jego aktywnością jest bardziej złożona i nie jest zależnością liniową (Laguerre i wsp. 2009). W przypadku serii estrów kwasu rozmarynowego i alkoholi o różnej długości łańcucha zależność między aktywnością antyoksydacyjną w emulsji lipidów a długością łańcucha miała kształt paraboliczny z maksimum dla łańcucha ośmiowęglowego (Laguerre i wsp. 2010). Podobnie było z aktywnością estrów hydroksytyrozolu i kwasów tłuszczowych – w emulsjach lipidowych najsilniej przeciwutleniająco działała pochodna hydroksytyrozolu i kwasu oktanowego (Medina i wsp. 2009). Jedno z wyjaśnień tego zjawiska sformułowane przez Frankela (1994) jest związane z lokalizacją antyoksydantu w micelach lipidowych lub błonach lipidowych. Zgodnie z tą hipotezą antyoksydant działa najskuteczniej, jeśli jest zlokalizowany w przestrzeni międzyfazowej, gdzie dochodzi do procesów utleniania lipidów. Zbyt duża hydrofobowość powoduje, że antyoksydant jest zlokalizowany w głębi miceli lub błony, gdzie jest znacznie mniej skuteczny.

W przypadku kilku substancji (kwas rozmarynowy, hydroksytyrozol, tyrozol) aktywność antyoksydacyjną w emulsjach lipidowych najbardziej zwiększało dołączenie ośmiowęglowego łańcucha do wyjściowej cząsteczki antyoksydantu (Laguerre i wsp. 2010; Lucas i wsp. 2010; Medina i wsp. 2009).

http://rcin.org.pl

5.1.2. Lipofilność badanych substancji i ich oddziaływanie z błonami biologicznymi

Powszechnie przyjętym sposobem badania lipofilności związków jest określanie współczynnika podziału woda-oktanol, który przedstawiany jest zazwyczaj w formie logarytmicznej. Współczynnik ten jest znany dla wielu substancji i podawany w komercyjnie dostępnych bazach danych, możliwe jest też jego szacowanie z wykorzystaniem programów komputerowych. Parametr ten jest wykorzystywany w wielu modelach komputerowych służących do analizy zależności między strukturą związku a jego aktywnością biologiczną (QSAR, *quantitativestructure-activityrelationship*; Giaginis i Tsantili-Kakoulidou 2008).

Pojawiają się jednak głosy, że log P nie do końca odzwierciedla rozpuszczalność substancji w błonach biologicznych. Chociaż korelacja między współczynnikiem podziału woda-oktanol a rozpuszczalnością badanego związku w lipidach nie ulega wątpliwości, to jednak Alakoskela i wsp. (2009) dowodzą, że wartość log P nie jest wystarczająca do przewidywania oddziaływań konkretnej substancji z błonami. Zgodnie z ich argumentacją współczynnik podziału woda-oktanol jest stosunkowo słabym predyktorem rozpuszczalności w błonie, gdyż w przeciwieństwie do oktanoludwuwarstwa lipidowa jest anizotropowym i heterogennym środowiskiem (grupy polarne znajdują się bliżej powierzchni dwuwarstwy lipidowej, a w jej wnętrzu znajdują bardziej hydrofobowe grupy lipidów). Dla podziału między dwuwarstwę lipidową a fazę wodną ma znaczenie wzajemne położenie w badanej cząsteczce grup hydrofobowych i hydrofilowych, co nie ma znaczenia w przypadku podziału między wodę a oktanol. Z tego względu rozpatrywanych jest wiele nowych metod, które pomogłyby ocenić oddziaływanie związków chemicznych z błonami (przegląd w pracy Giaginis i Tsantili-Kakoulidou 2008). Również w tej pracy zastosowałem dodatkowo drugą metodę, która miała na celu zbadanie interakcji badanych substancji z błonami biologicznymi.

Estry tempolu są bardziej lipofilowe od tempolu – wartość log P dla estrów tempolu była wyższa niż dla wyjściowej cząsteczki i zależała w sposób liniowy od długości dołączonego łańcucha acylowego. Zależność oddziaływania z modelowymi błonami biologicznymi w zastosowanym układzie doświadczalnym od długości dołączonego łańcucha węglowego była jednak bardziej

http://rcin.org.pl

skomplikowana. Oddziaływanie tempolu z modelową błoną złożoną z DOPC było endotermiczne, co sugeruje, niskie powinowactwo tempolu do fazy lipidowej, zgodnie z niską wartością współczynnika podziału cząsteczki,a co za tym idzie, niską wydajność transferu tempolu do błon lipidowych. Podobnie tempol-C4, choć bardziej lipofilny zgodnie z pomiarem współczynnika podziału woda-oktanol, oddziaływał z modelową błoną w sposób endotermiczny. Oddziaływanie dwóch estrów acylowych: tempolu-C8 i tempolu-C12 było egzotermiczne, co sugeruje, że mogą akumulować się w błonach biologicznych. W końcu, dla tempolu-C16 nie zarejestrowano znaczącego sygnału przepływu ciepła, co oznacza, że jego wysokie powinowactwo do środowiska lipidowego zapobiega transferowi pomiędzy błonami lipidowymi w związku z barierą energetyczną związaną z transferem poprzez fazę wodną.

Wszystkie badane substancje spełniały również pozostałe zawarte w regule pięciu warunki (por. tab. 2) – ich masa cząsteczkowa była mniejsza niż 500, liczba donorów wiązania wodorowego nie przekraczała 5, a akceptorów 10.

Tab. 2. Właściwości tempolu i jego estrów i ich zgodność z regułą pięciu Lipinskiego.

Substancja	**Masa cząsteczkowa**	**Log P**	**Donory protonu**	**Akceptory protonu**	**Zgodność z regułą pięciu**
Tempol	172,24	0,53	1	3	TAK
Tempol-C4	242,34	2,44	0	4	TAK
Tempol-C8	298,45	3,08	0	4	TAK
Tempol-C12	354,55	3,38	0	4	TAK
Tempol-C16	410,66	4,51	0	4	TAK

Wyniki analizy kalorymetrycznej miareczkowania liposomów DOPC tempolem i jego liposomowymi preparatami mogą być również wykorzystane do projektowania nośnika lipidowego i wyboru optymalnej pochodnej tempolu do terapii z wykorzystaniem nośnika lipidowego. Na podstawie uzyskanych danych najbardziej obiecujące wydają się być liposomowe preparaty tempolu-C8 i -C12.

http://rcin.org.pl

5.1.3. Wpływ dołączenia łańcuchów acylowych do cząsteczki tempolu na otoczenie chemiczne rodnika nitroksydowego w powstałych związkach

W spektroskopii EPR sygnał pochodzi od związków posiadających niesparowane elektrony – wolnych rodników. Widmo EPR jest charakterystyczne dla danego rodnika. Otoczenie chemiczne rodnika może jednak wpływać na parametry widma EPR, a zjawisko to jest szeroko wykorzystywane do badania struktury makromolekuł, do których przyłącza się dające sygnał EPR znaczniki spinowe (Biswas i wsp. 2001). Przy pomocy EPR można było więc nie tylko potwierdzić obecność i rodzaj rodnika obecnego w badanych związkach, ale też stwierdzić, czy nie zmieniło się otoczenie chemiczne tego rodnika. Widma EPR wszystkich badanych związków nie różniły się znacząco, co sugeruje, że ich grupy nitroksydowe mogą reagować podobnie jak grupa nitroksydowa tempolu. Należy jednak pamiętać, że w badanych estrach tempolu nieobecna jest grupa hydroksylowa, która w cząsteczce tempolu również może reagować z niektórymi wolnymi rodnikami (patrz wstęp, str. 43).

5.1.4. Estry tempolu – substancje działające w niezmienionej postaci czy „proleki" tempolu?

Można postawić pytanie, czy estry acylowe tempolu działają jako wymiatacze wolnych rodników w postaci niezmienionej, czy też są prekursorami aktywnej substancji – tempolu. Przekształcenie estrów tempolu w tempol i kwasy tłuszczowe mogłoby się odbywać za pomocą enzymów esteraz obecnych w osoczu krwi (Koitka i wsp. 2010; Li i wsp. 2005). Jednak niektóre estry tempolu działały w dawkach znacznie mniejszych niż tempol, z czego wynika, że działają one przede wszystkim w niezmienionej postaci, a nie jako „proleki".

5.2. Wpływ podawania tempolu i jego estrów na uszkodzenia siatkówki w modelach jaskry i starczego zwyrodnienia plamki

Do oceny neuroprotekcyjnej aktywności estrów tempolu użyłem szczurzych modeli chorób neurodegeneracyjnych siatkówki wykonywanych na szczurach szczepu Brown Norway. Budowa histologiczna siatkówki szczurzej

http://rcin.org.pl

i ludzkiej nie jest jednak identyczna (Hanson 2004a) i trzeba o tym pamiętać interpretując wyniki ze szczurzych modeli w odniesieniu do ludzkich chorób siatkówki. Przede wszystkim w siatkówce szczura nie występuje obecna u ludzi plamka żółta – miejsce szczególnego nagromadzenia fotoreceptorów. U ludzi występują trzy rodzaje czopków – odpowiedzialne za widzenie koloru zielonego, niebieskiego i czerwonego. Szczury posiadają tylko dwa rodzaje czopków – zielone i niebieskie. Niebieskie czopki u szczura są wrażliwe na krótsze fale niż ludzkie – szczury widzą więc ultrafiolet (soczewka szczurza w odróżnieniu od ludzkiej przepuszcza aż 50% promieniowania UVA). Ponadto w siatkówce szczura znajduje się mniej czopków – u człowieka stanowią one 5% fotoreceptorów, a u szczura tylko 1%. Inną ważną różnicą między siatkówką ludzką a szczurzą jest znacznie większa liczba fotoreceptorów przypadających na komórki dwubiegunowe i RGC w siatkówce szczurzej (Hanson 2004a). RGC mają u szczura znacznie większe pola recepcyjne. Rezultatem jest większa czułość szczurzej siatkówki, uzyskiwana kosztem gorszej ostrości widzenia.

Mimo tych różnic szczurze modele jaskry i AMD są szeroko wykorzystywane w badaniach nad tymi chorobami i uważa się je za cenne źródło informacji o patogenezie tych chorób (Johnson i Tomarev 2010; Tanito i wsp. 2008).

5.2.1.Neuroprotekcyjna aktywność tempolu i jego estrów w modelach jaskry normotensyjnej

W niniejszej pracy zastosowałem trzy różne modele zwierzęce jaskry normotensyjnej. Ich cechą wspólną jest eliminacja RGC.

PONC jest procedurą, która prowadzi do wystandaryzowanej i powtarzalnej niekompletnej aksotomii RGC. Jej zastosowanie prowadzi do pierwotnej i wtórnej degeneracji RGC.Po zmiażdżeniu nerwu wzrokowego można wyróżnić cztery populacje w różny sposób dotkniętych uszkodzeniem komórek zwojowych:

- degenerujące szybko w wyniku nekrozy (uszkodzenie pierwotne)
- degenerujące wolniej poprzez drogę apoptotyczną (uszkodzenie wtórne)

http://rcin.org.pl

- przeżywające długi czas pomimo aksotomii (ich aksony mogą ulec regeneracji)
- przeżywające, z nienaruszonymi połączeniami z ich celami w mózgu.

Dokładne proporcje między tymi populacjami zależą od zastosowanej procedury uszkodzenia, ale populacja wolno umierających komórek jest zawsze stosunkowo duża (Kreutz i wsp. 1999). Znaczny odsetek uszkodzonych aksonów regeneruje (Dieterich i wsp. 2002).

Można się spierać, czy PONC jest modelemjaskry, czy też raczej modelem urazu nerwu wzrokowego (Gellrich i wsp. 2002). Jaskrowa utrata RGC jest znacznie powolniejsza niż ma to miejsce po PONC – zachodzi w ciągu lat, a nie tygodni. Prawdopodobnie też PONC różni się znacząco na poziomie molekularnym od innych modeli jaskry. Różnice takie występowały bowiem między kompletną aksotomią nerwu wzrokowego a modelami polegającymi na zwiększeniu ciśnienia śródgałkowego (Levkovitch-Verbin i wsp. 2003; Levkovitch-Verbin i wsp. 2006). Z drugiej jednak strony PONC może rekapitulować postulowany przez niektórych autorów (patrz wstęp, str. 25) mechanizm uszkodzenia nerwu wzrokowego w wyniku ekspozycji na różnicę ciśnienia śródgałkowego i śródczaszkowego w blaszce sitowej.

Podawanie tempolu w dawce 20 mg/kg masy ciała statystycznie znamiennie ograniczało utratę RGC w wyniku PONC. Takiego efektu nie powodowało podawanie tempolu w dawce 5 mg/kg i 1 mg/kg. Inni autorzy uzyskali podobne wyniki. W różnych modelach doświadczalnych *in vivo* tempol działał neuroprotekcyjnie po podaniu dożylnym bądź dootrzewnowym w dawkach od 5 do 100 mg/kg masy ciała (Beit-Yannai i wsp. 1996; Rak i wsp. 2000; Tanito i wsp. 2007b). Jednorazowe podanie tempolu w dawce 300 mg/kg okazało się protekcyjne w modelu urazowego uszkodzenia mózgu (Deng-Bryant i wsp. 2008). Podawany dootrzewnowo tempol chronił siatkówkę w podobnych dawkach, jak w modelach uszkodzenia mózgu. Można więc pośrednio wnioskować, że stężenie tempolu w siatkówce po podaniu dootrzewnowym jest podobne jak w mózgu.

Porównałem także neuroprotekcyjne działanie tempolu i czterech jego estrów acylowych. Tempol-C8 działał protekcyjnie w stosunku do RGC w modelu PONC w znacznie niższych dawkach niż tempol: w dawce odpowiadającej

http://rcin.org.pl

molowo 1 mg tempolu/kg działał podobnie jak tempol w dawce 20 mg/kg. Wydaje się możliwe, że estry tempolu po podaniu do organizmu akumulują się w miejscach intensywnego generowania ROS, np. w mitochondriach (Turrens 2003b) i błonach komórkowych. Bardziej lipofilne od tempolu estry tempolu mogą mieć też dłuższy okres półtrwania w tkankach. Lipofilne estry tempolu akumulując się w błonach mogą chronić przed uszkodzeniem wolnorodnikowym obecne tam wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Inne lipofilne substancje były opisywane jako neuroprotekcyjne. Lipofilny antyoksydant witamina E (α-tokoferol) spowalniał u pacjentów jaskrowych utratę pola widzenia (Engin 2009). Melatonina, inny lipofilny antyoksydant, jest proponowany jako potencjalny lek w terapii jaskry (przegląd w pracy Lundmark i wsp. 2007).

Estry -C4, -C12 i -C16 nie działały jednak protekcyjnie. Co więcej, tempol-C16 okazał się toksyczny względem RGC. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami Jianga i wsp. (Jiang i wsp. 2007), które sugerują, że wysoka hydrofobowość nie jest wystarczająca dla protekcyjnej aktywności nitroksydu. Brak neuroprotekcyjnej aktywności tempolu-C16 można wyjaśnić trudnościami z transferem między błonami. Trudniejszy do wyjaśnienia jest brak protekcyjnej aktywności tempolu-C12. Być może kluczowa jest lokalizacja związku w dwuwarstwie lipidowej. Wyjaśnienie tego zagadnienia wymagałoby dalszych badań z wykorzystaniem modelowania komputerowego oddziaływania estrów tempolu z błonami lipidowymi.

Modyfikacja modelu częściowego zmiażdżenia nerwu wzrokowego. 24h przed wykonaniem PONC podano jednorazowo dootrzewnowo dekstran żelaza (III). Podanie dekstranu żelaza prowadziło do zwiększenia poziomu żelaza w siatkówkach, co było szczególnie widoczne w siatkówkach poddanych PONC. Podwyższenie poziomu żelaza miało charakter długotrwały, gdyż poziom ten był podwyższony w osiem dni od podania żelaza. Jest to zgodne z obserwacjami Zhou i wsp. (2000), którzy donoszą, że podanie dekstranu żelaza prowadziło do długotrwałego podwyższenia poziomu żelaza we krwi i w nerkach i powodowało zwiększony stres oksydacyjny w nerkach i we krwi. Również obserwacja poziomu nitrotyrozyny wskazuje, że podanie dek-

http://rcin.org.pl

stranu żelaza prowadzi do zwiększonego stresu wolnorodnikowego w siatkówce.

W siatkówce, żelazo jest szczególnie ważne dla funkcjonowania kaskady fototransdukcji. W warunkach fizjologicznych poziom żelaza jest precyzyjnie regulowany (He i wsp. 2007). Niemalże całe nie-hemowe żelazo jest związane z transferyną, białkiem wiążącym żelazo (III). Transferyna nie przechodzi przez barierę krew-siatkówka i może być internalizowana jedynie przez wiązanie z odpowiednim receptorem. Wewnątrzkomórkowe żelazo jest kompleksowane przez inne białko – ferrytynę. Ten układ jest zaburzony w różnych sytuacjach patologicznych. Żelazo, a w szczególności akumulacja żelaza odgrywa rolę w różnych chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w AMD (Wong i wsp. 2007). Może też odgrywać rolę w innych związanych z wiekiem chorobach siatkówki, gdyż poziom żelaza w siatkówce wzrasta z wiekiem (Hahn i wsp. 2006). Wzrost związanych z żelazem białek był obserwowany w jaskrowych oczach ludzkich i w małpim modelu jaskry (Farkas i wsp. 2004). Wydaje się więc, że modyfikacja PONC polegająca na podaniu dekstranu żelaza może pełniej odzwierciedlać sytuację kliniczną w jaskrze niż sam PONC.

Kombinacja podania dekstranu żelaza i PONC prowadziła do większego uszkodzenia RGC niż sam PONC. W siatkówkach oczu poddanych pozorowanej operacji podanie żelaza nie wpływało na gęstość RGC. Również akumulacja żelaza w siatkówkach po podaniu dekstranu żelaza była wyraźnie silniejsza w oczach poddanych PONC niż w oczach poddanych pozorowanej operacji. Podobne wyniki uzyskano w modelu niedokrwienia mózgu – podanie żelaza potęgowało uszkodzenie po niedokrwieniu mózgu, ale nie w grupie kontrolnej (Mehta i wsp. 2004). Autorzy tej pracy sugerowali, że żelazo może uszkadzać mózg jedynie po uszkodzeniu bariery krew-mózg. Możliwe też, że stres oksydacyjny wywoływany przez podanie żelaza nie jest wystarczający, aby doprowadzić do śmierci zdrowych neuronów, ale może potęgować uszkodzenie, jeśli szlaki sygnałowe prowadzące do śmierci komórkowej zostały już aktywowane, np. w wyniku PONC czy niedokrwiennego uszkodzenia mózgu.

Co ciekawe, neuroprotekcyjne działanie tempolu było znacząco wyraźniejsze w grupie zwierząt, które otrzymały dekstran żelaza i zostałe poddane PONC niż w grupie, która została poddana jedynie PONC. Wydaje się, że nie

http://rcin.org.pl

było to jednak związane ze zmniejszoną akumulacją żelaza w grupie otrzymującej tempol, gdyż w siatkówkach zwierząt z tej grupy nie zaobserwowałem mniej intensywnego barwienia na obecność żelaza. Mechanizm działania tempolu jest dość złożony i działa on nie tylko jako mimetyk SOD, ale również m. in. mimetykferoksydazy, w wyniku czego może hamować reakcję Fentona ograniczając toksyczność żelaza (Mehlhorn i Swanson 1992; Samuni i wsp. 2003).

3-nitrotyrozyna (3-NT), która jest uznawana za miarodajny znacznik stresu nitrooksydacyjne (Radi 2004) była również badana w opisywanym doświadczeniu. Wyraźne barwienie na obecność 3-NT bylo obecne w siatkówkach poddanych PONC, ale nie w siatkówkach poddanych pozorowanej operacji – zarówno u zwierząt, którym podano dekstran żelaza jak i tych, które otrzymały nośnik.

Podawanie tempolu zmniejszało intensywność barwienia na obecność 3-NT, co sugeruje że tempol zapobiegał nitrozylacji tyrozyny. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (Deng-Bryant i wsp. 2008). Jednakże u zwierząt, którym podano żelazo intensywność barwienia na obecność nitrotyrozyny zmniejszyła się dość nieznacznie. Biorąc pod uwagę obserwowane dość znaczące działanie neuroprotekcyjne tempolu w tej grupie, wydaje się, że tempol może ograniczać inne niż wywoływanie stresu nitrooksydacyjnego efekty podawania żelaza. Mogłoby to być np. ograniczanie indukowanej żelazem ekscytotoksyczności (Coyle i Puttfarcken 1993; Davalos i wsp. 2000).

Model toksyczości NMDA opiera się na założeniu, że w jaskrze dochodzi do ekscytotoksycznego uszkodzenia RGC, a w szczególności na hipotezie, że w wyniku jaskry dochodzi do zwiększenia stężenia glutaminianu w ciele szklistym. Jak już wspomniano we wstępie, hipoteza o zwiększonej zawartości glutaminianu w ciele szklistym w jaskrze jest obecnie dość kontrowersyjna. Nie udało się potwierdzić wcześniejszych doniesień wskazujących na prawdziwość tej hipotezy. Nie wyklucza to jednak udziału ekscytotoksyczności w patomechanizmie jaskry.

Mechanizm, jaki prowadzi w modelu toksyczności NMDA do śmierci RGC jak już wspomniano we wstępie polega prawdopodobnie m. in. na nadmiernej aktywacji syntazy tlenku azotu i zwiększonej produkcji anionorodnika

http://rcin.org.pl

ponadtlenkowego. $NO^{\bullet}$ i $O_2^{\bullet-}$ reagują tworząc nadtlenoazotyn, który uszkadza neurony (Lipton i wsp. 1993). Mechanizm uszkodzenia w wyniku ekscytotoksyczności jest jednak bardziej skomplikowany i jest zależny od wieku. Nie zaobserwowałem co prawda różnic ilościowych w ubytku RGC między zwierzętami w różnym wieku, jednak różna podatność na leczenie tempolem-C8 wskazuje na różnice w mechanizmie działania NMDA u zwierząt w różnym wieku.

Doszklistkowe podanie NMDA prowadziło do masowej śmierci RGC, co udowodniłem barwiąc te komórki barwnikiem Fluorogold po tygodniu od podania NMDA. Uszkodzenie było największe spośród zastosowanych trzech modeli uszkodzenia RGC – po tygodniu od urazu barwiło się około 90% komórek mniej niż w oczach kontrolnych. Znaczna utrata RGC jest zgodna z obserwacjami innych autorów (Li i wsp. 1999).

Obserwacje Li i wsp. (1999) wskazują, że podobnie jak w wyniku PONC doszklistkowe podanie NMDA prowadzi do apoptotycznej śmierci RGC. Być może więc mechanizm uszkodzenia RGC jest zbliżony. Dużą zaletą modelu toksyczności NMDA w porównaniu z PONC było to, że jest to model dużo mniej skomplikowany w wykonaniu. Być może dzięki temu uzyskane wyniki mają znacznie mniejszy rozrzut. Podobnie jak PONC model ten prowadzi do szybkiej i masowej śmierci RGC. Sytuacja ta odbiega więc od tego, co obserwowane jest w jaskrze, gdzie mamy do czynienia z procesem przewlekłym.

Niespodziewanie w modelu toksyczności NMDA, inaczej niż w PONC, tempol nie wykazywał protekcyjnej aktywności w stosunku do RGC. Wynik ten różni się od wyniku El-Remessy i wsp. (2003), którzy pokazali, że podawany doszklistkowo tempol (0,4 mg/oko) ograniczył barwienie TUNEL w obrębie GCL i INL,gdy podawano go jednocześnie z NMDA (200 nmoli/oko, tj. 2 µl 100 mM roztworu NMDA). Tempol zmniejszał także intensywność barwienia na obecność malondialdehydu i nitrotyrozyny. Model użyty przez tych autorów różnił się jednak znacząco od użytego w moich badaniach: roztwór NMDA był 10 razy bardziej stężony niż podawany przeze mnie, a tempol był podawany inną drogą (stężenie tempolu w oku mogło być wielokrotnie większe niż w moich doświadczeniach). Tempol był też podawany w tym samym czasie, co NMDA.

http://rcin.org.pl

Tempol-C8 podobnie jak w PONC był również neuroprotekcyjny w modelu toksyczności NMDA. Co zaskakujące jednak, tempol-C8 działał protekcyjnie jedynie w grupie młodych (6-tygodniowych), a nie starszych (młodych dorosłych, 9-10-tygodniowych) zwierząt. U zwierząt otrzymujących nośnik tempolu-C8 liczba RGC po podaniu NMDA nie różniła się jednak znamiennie u obu tych grup zwierząt. Być może ta „niewrażliwość" RGC starszych zwierząt na tempol-C8 jest związana z różnymi mechanizmami wywołującymi uszkodzenie RGC aktywowanymi w wyniku podania NMDA. Rzeczywiście w badaniach *in vitro* na neuronach pochodzących z hipokampa pokazano wyraźne następujące z wiekiem zmiany w podatności na ekscytotoksyczne bodźce. Obserwowano tzw. dojrzewanie do ekscytotoksyczności: neurony izolowane z trzydniowych szczurów nie wykazywały niemal żadnej podatności, a te izolowane od szczurów 21-dniowych były w ponad 90% podatne na śmierć komórkową wywołaną NMDA (Marks i wsp. 2000). Również Ullian i wsp. (2004) pokazali, że hodowane *in vitro* RGC wyizolowane z sześciodniowych szczurów jak i eksplanty siatkówek sześciodniowych szczurów nie były podatne na uszkodzenie w wyniku ekspozycji na NMDA.

Wydaje się, że zależne od wieku różnice w mechanizmie ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów występują również u starszych zwierząt. Indukowana glutaminianem produkcja ROS i uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (znacznika śmierci komórkowej) były znacząco wyższe u szczurów 80- niż u 21-dniowych (Kannurpatti i wsp. 2004). Wiadomo też, że w zależności od stopnia rozwoju organizmu aktywacja różnych receptorów odpowiada za zjawisko toksyczności glutaminianu. Zostało to udowodnione zarówno na skrawkach kory mózgowej (Sanganahalli i wsp. 2006) jak i RGC (Cady i wsp. 2001; Luo i wsp. 2001).

5.2.2.Neuroprotekcyjna aktywność tempolu w modelu starczego zwyrodnienia plamki

Uszkodzenie siatkówki obserwowane w AMD można modelować nie tylko z użyciem modeli transgenicznych, ale również z użyciem modelu uszkodzenia światłem. Co więcej, jak już wspomniano we wstępie niektórzy autorzy (Marc i wsp. 2008) sugerują, że model uszkodzenia światłem wierniej niż modele transgeniczne odzwierciedla warunki patologiczne występujące w za-

http://rcin.org.pl

awansowanej zanikowej postaci AMD. Model uszkodzenia światłem może też służyć jako model różnych chorób degeneracyjnych siatkówki przebiegających z degeneracją fotoreceptorów, np. *retinitispigmentosa* (Tanito i wsp. 2007a). Uszkodzenie w tym modelu przebiega, inaczej niż w zanikowej AMD szybko, bo w ciągu dni-tygodni od ekspozycji na silne światło. Zmiany w ERG były obserwowane już następnego dnia po ekspozycji na silne światło.

Stopień uszkodzenia w tym modelu zależy nie tylko od czasu ekspozycji na światło i jego intensywności światła, ale też od fazy rytmu okołodobowego (Vaughan i wsp. 2002) i rejonu siatkówki (Vaughan i wsp. 2003). Z tego względu doświadczenia przeprowadzano zawsze o tej samej porze, a do analizy histologicznej pobierano skrawki tych samych rejonów siatkówki.

Duże znaczenie dla wykonania tego modelu ma pigmentacja, gdyż szczury albinotyczne, które nie posiadają barwnika w tęczówce ani barwnika w obrębie RPE, mają zaburzone widzenie (Hanson 2004b). Ich siatkówka jest znacznie bardziej narażona na działanie światła niż u szczurów z normalną pigmentacją. Światło jest w mniejszym stopniu absorbowane przez tęczówkę, a to, które dostało się już do komory tylnej oka nie jest pochłaniane przez barwnik siatkówki. W związku z tym u szczurów albinotycznych dochodzi do spontanicznej degeneracji siatkówki. U szczurów albinotycznych obserwuje się szereg zaburzeń w rozwoju siatkówki – m. in. zmniejszoną liczbę fotoreceptorów i zaburzeń widzenia – małą ostrość widzenia, upośledzone widzenie w jasnym świetle, wolniejszą adaptację do widzenia w ciemności, gorszą percepcję ruchu i upośledzoną koordynację obu oczu.

Zaletą zastosowanej procedury była stosunkowo krótka (6h) ekspozycja na silne światło (w innym doświadczeniu z użyciem szczurów Brown Norway ekspozycja trwała 24h, Ishikawa i wsp. 2006), która jednak pozwoliła na wywołanie znaczącego uszkodzenia siatkówki. W wyniku tego uszkodzenia zmniejszyła się znacząco amplituda fali a i fali b w badaniu ERG. Na tej podstawie można przypuszczać, że poważnemu uszkodzeniu uległy nie tylko fotoreceptory, ale i RPE (Noell 1980). Uszkodzenie to było trwałe, badanie ERG powtórzone po siedmiu dniach od ekspozycji na silne światło nadal wskazywało na podobny jak po jednym dniu poziom uszkodzenia funkcji siatkówki.

Uszkodzenie siatkówki, choć widoczne w badaniach histologicznych jedynie w centralnej części siatkówki miało silny wpływ na odpowiedź elektrofi-

http://rcin.org.pl

zjologiczną całej siatkówki. Być może więc nie tylko bezpośrednie uszkodzenie fotoreceptorów przez silne światło wpływało na odpowiedź ERG, ale również w sposób pośredni (głównie poprzez uszkodzenie RPE).

Uzyskane wyniki wskazują, że tempol może częściowo uchronić przed uszkodzeniem w wyniku ekspozycji na silne światło. Podobne wyniki uzyskano w badaniach z zastosowaniem morfologicznych metod oceny siatkówki u szczurów albinotycznych (Tanito i wsp. 2007b; Wang i wsp. 1995). Wyniki prezentowane w tej pracy wskazują, że podawanie tempolu nie tylko zapobiegało uszkodzeniu siatkówki obserwowanym w badaniach morfologicznych, ale również gwarantowało zachowanie funkcji siatkówki.

5.3. Potencjalne uboczne skutki wzmocnienia obrony przed wolnymi rodnikami

Antyoksydanty często są ukazywane jednostronnie jako wszechstronne i bezpieczne leki mające chronić przed nowotworami i skutkami starzenia poprzez zmniejszanie destrukcyjnego wpływu wolnych rodników na organizm. Wolne rodniki okazują się jednak działać nie tylko niekorzystnie na funkcjonowanie organizmu – pełnią rolę cząsteczek sygnałowych w komórce, a szczególne znaczenie odgrywają w regulowaniu proliferacji i apoptozy komórek (Clement i Pervaiz 1999). Co więcej, oprócz pozytywnych skutków podawania antyoksydantów obserwuje się też działania niepożądane, a w niektórych sytuacjach ich podawanie może mieć skutek odwrotny do zamierzonego – zwiększać uszkodzenie, np. poprzez działanie pro-oksydacyjne (Halliwell 2000; Meffert 2008).

Szczególną grupą zmiataczy wolnych rodników są mimetyki SOD, a wśród nich tempol i inne związki nitroksydowe. We wstępie przedstawiłem argumenty za zwiększaniem aktywności SOD w tkankach w celach terapeutycznych. Należy jednak wspomnieć, że podwyższony poziom SOD może paradoksalnie prowadzić do zwiększonego stresu oksydacyjnego i działać szkodliwie. Szkodliwość nadekspresji SOD jest znana od dawna i została potwierdzona w wielu układach doświadczalnych – zarówno *in vitro* w transfekowanych SOD-1 liniach komórkowych (Groner i wsp. 1986) jak i *in vivo* u *Drosophilamelanogaster* (Orr i Sohal 1993; Reveillaud i wsp. 1991) oraz u myszy

http://rcin.org.pl

transgenicznych (Avraham i wsp. 1988; Ceballos-Picot i wsp. 1991; Ceballos-Picot i wsp. 1992; Minc-Golomb i wsp. 1991; Schickler i wsp. 1989). Nadekspresja SOD-1, którego gen znajduje się na chromosomie 21 jest też od dawna kojarzona ze zwiększonym stresem oksydacyjnym obserwowanym w zespole Downa (Sinet 1982). Krzywa zależności dawka-efekt dla SOD w różnych układach doświadczalnych ma kształt dzwonowy – po osiągnięciu maksymalnego efektu dalsze zwiększanie dawki prowadzi do zmniejszenia efektu, a niekiedy następnie obserwowana jest toksyczność SOD (McCord 2008).

Mechanizm, w wyniku którego zbyt duża dawka SOD prowadzi do zwiększonego stresu oksydacyjnego nie został do końca wyjaśniony. Najpopularniejsza jest hipoteza zgodnie z którą nadekspresja SOD prowadzi do zwiększonej produkcji nadtlenku wodoru. Inne wyjaśnienie związane jest ze zdolnością SOD zarówno do hamowania jak i inicjowania wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych, których wynikiem jest peroksydacja lipidów. Dokładny mechanizm, który stoi za tym zjawiskiem jest przedmiotem kontrowersji (Gardner i wsp. 2006; Kowald i wsp. 2006). Offer i wsp. (2000) twierdzą, że wyższe stężenie SOD jedynie nieznacznie wpływa na stężenie H_2O_2, ale znacznie obniża stężenie anionorodnika ponadtlenkowego. W wyniku tego SOD reaguje nie tylko z $O_2^{\cdot -}$, ale też atakuje i utlenia cząsteczki, które miał chronić.

Jak już wspomniałem we wstępie nitroksydowemimetyki SOD przejawiają znacznie więcej działań niż sam SOD. Skutki ich przedawkowania zdają się być jednak podobne jak skutki nadekspresji SOD. Podobnie jak SOD charakteryzują się dzwonową krzywą zależności dawka-efekt (Offer i wsp. 2000). Podobnie jak w przypadku SOD proponowane są różne wyjaśnienia tego zjawiska – Offer i wsp. proponują mechanizm związany z obniżeniem stężenia $O_2^{\cdot -}$ i zmianą kinetyki reakcji katalizatora.

W przypadku tempolu-C8 w modelu toksyczności NMDA również zaobserwowałem krzywą zależności dawka-efekt o dzwonowym kształcie. Optymalna była dawka odpowiadająca molowo 1 mg tempolu/kg masy ciała. Podawanie wyższych dawek tempolu-C8 (odpowiadających 5 mg tempolu/kg i większych) nie wywierało efektu neuroprotekcyjnego. Zakres dawek terapu-

http://rcin.org.pl

tycznych jest więc w tym przypadku dość wąski, węższy niż w przypadku tempolu (Wilcox 2010).

5.4. Perspektywy praktycznego zastosowania estrów tempolu

Wydaje się, że mimo pewnych wątpliwości badane estry tempolu, a zwłaszcza tempol-C8 są interesującymi związkami, które warto dalej badać pod kątem ich wykorzystania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych siatkówki. Oczywiście wykonane badania mogą stanowić jedynie wstęp do dalszych badań, które mogłyby zaowocować badaniami klinicznymi. Poniżej opisuję drogi dalszego rozwijania tej koncepcji leczenia chorób neurodegeneracyjnych siatkówki, a także możliwe rozwiązania problemów, które pojawiły się w trakcie badań nad estrami tempolu.

Modyfikowanie cząsteczki tempolu poprzez dołączanie do niej łańcuchów acylowych i zwiększanie jej lipofilności skutkuje niestety powstaniem substancji, które w znacznie mniejszym stopniu niż wyjściowa substancja rozpuszczają się w wodzie. Skutkuje to problemami z przygotowaniem odpowiedniego do podania preparatu. Zmniejszona jest także dostępność badanych substancji. Rozwiązaniem tego problemu może być przygotowanie liposomowych preparatów badanych związków. Zastosowanie liposomowego nośnika leku może poprawiać farmakokinetykę, chronić podawaną substancję przed degradacją, wydłużyć czas obecności leku w krążeniu, a także może skutkować selektywnym działaniem leku (Langner i Kral 1999). Możliwe jest też tworzenie „adresowanych" liposomów, które mogłyby być np. aktywowane światłem (Shum i wsp. 2001). Niektórzy autorzy (Drummond i wsp. 2008) zwracają jednak uwagę, że korzyści z opracowania liposomowej postaci hydrofobowego leku są dość skromne w porównaniu z innymi grupami substancji – np. zazwyczaj znacznie krótszy jest okres półtrwania takiegopreparatu we krwi niż np. liposomowej postaci lekko zasadowego amfifilowego leku.

Ochrona przed neurodegeneracją, jaką zapewnia tempol i jego estry ma swoje ograniczenia. Również w moich badaniach tempol-C8 chronił maksymalnie 41% komórek przed degeneracją w modelu PONC. Według Offera i wsp. (2000) zarówno z SOD jak i jej mimetykami synergistycznie działa katalaza, chociaż autorzy ci nie byli w stanie wyjaśnić mechanizmu tego zjawi-

http://rcin.org.pl

ska. Znane są również mimetyki katalazy, takie jak metaloporfiryny AEOL10150 i AEOL11207 czy mimetykisalenowe EUK-134 i EUK-189 (przegląd na temat mimetyków katalazy w pracy Day 2009). Być może jednoczesne podawanie estrów tempolu i mimetyku katalazy pozwoliłoby osiągnąć lepszy efekt terapeutyczny.

http://rcin.org.pl

6. Wnioski

1. Wzmacnianie naturalnych mechanizmów obrony przed wolnymi rodnikami przy pomocy układowego podawania mimetyku dysmutazy ponadtlenkowej tempolu może być skuteczną strategią terapeutyczną w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych siatkówki, takich jak jaskra i AMD.

2. Ester tempolu i kwasu kaprylowego– tempol-C8 w niektórych badanych modelach działał w stężeniach mniejszych niż tempol i spośród badanych związków budzi największe nadzieje jako potencjalny lek. Wydaje się, że jego własności katalityczne są podobne do tempolu, ale oddziaływanie z błonami biologicznymi sprzyja penetrowaniu do przedziałów komórkowych, w których rodniki te dokonują największych zniszczeń.

3. W badaniach z użyciem jednego z modeli jaskry (model ekscytotoksyczności NMDA) wiek zwierząt doświadczalnych może decydować o skuteczności testowanego leczenia; Zależność zachodzących procesów degeneracyjnych od wieku w modelach zwierzęcych chorób retinodegeneracyjnych jest słabo poznana - ale nie można wykluczyć możliwości, że mechanizmy neurodegeneracji są odmienne u zwierząt młodych i dojrzałych.

http://rcin.org.pl

7. Bibliografia

1. Abello N., Kerstjens H. A., Postma D. S., Bischoff R., 2009. *Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins.* J Proteome Res 8, 3222-3238.
2. Alakoskela J. M., Vitovic P., Kinnunen P. K., 2009. *Screening for the drug-phospholipid interaction: correlation to phospholipidosis.* Chem Med Chem 4, 1224-1251.
3. Algvere P. V., Marshall J., Seregard S., 2006. *Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard.* Acta Ophthalmol Scand 84, 4-15.
4. Amatore C., Arbault S., 2007. *Oxidative Stress at the Single Cell Level* [W:] *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Michael A. C., Borland L. M. (red.), CRC Press, Boca Raton (FL), str. 261-284.
5. Ambati J., Anand A., Fernandez S., Sakurai E., Lynn B. C., Kuziel W. A., Rollins B. J., Ambati B. K., 2003. *An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice.* Nat Med 9, 1390-1397.
6. Anderson D. R., Hendrickson A., 1974. *Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve.* Invest Ophthalmol 13, 771-783.
7. Andreoli C. M., Miller J. W., 2007. *Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease.* Curr Opin Ophthalmol 18, 502-508.
8. Apte R. S., Richter J., Herndon J., Ferguson T. A., 2006. *Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration.* PLoS Med 3, e310-
9. AREDS, 2001. *A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8.* Arch Ophthalmol 119, 1417-1436.
10. Asaba K., Tojo A., Onozato M. L., Goto A., Fujita T., 2007. *Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy.* J Cardiovasc Pharmacol 49, 13-19.
11. Ascenzi P., di M. A., Sciorati C., Clementi E., 2010. *Peroxynitrite-An ugly biofactor?* Biofactors 36, 264-273.
12. Aslan M., Yucel I., Akar Y., Yucel G., Ciftcioglu M. A., Sanlioglu S., 2006. *Nitrotyrosine formation and apoptosis in rat models of ocular injury.* Free Radic Res 40, 147-153.

http://rcin.org.pl

13. Avraham K. B., Schickler M., Sapoznikov D., Yarom R., Groner Y., 1988. *Down's syndrome: abnormal neuromuscular junction in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase.* Cell 54, 823-829.
14. Bagiński S., 1951. *Technika histologiczna.* PZWL, Warszawa.
15. Bartlett H., Eperjesi F., 2004. *An ideal ocular nutritional supplement?* Ophthalmic Physiol Opt 24, 339-349.
16. Bautista R. D., 1999. *Glaucomatous neurodegeneration and the concept of neuroprotection.* Int Ophthalmol Clin 39, 57-70.
17. Beit-Yannai E., Zhang R., Trembovler V., Samuni A., Shohami E., 1996. *Cerebroprotective effect of stable nitroxide radicals in closed head injury in the rat.* Brain Res 717, 22-28.
18. Benov L., 2001. *How superoxide radical damages the cell.* Protoplasma 217, 33-36.
19. Berdahl J. P., Allingham R. R., 2010. *Intracranial pressure and glaucoma.* Curr Opin Ophthalmol 21, 106-111.
20. Bird A. C., Bressler N. M., Bressler S. B., Chisholm I. H., Coscas G., Davis M. D., de Jong P. T., Klaver C. C., Klein B. E., Klein R., 1995. *An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group.* Surv Ophthalmol 39, 367-374.
21. Birnie C. R., Malamud D., Schnaare R. L., 2000. *Antimicrobial evaluation of N-alkyl betaines and N-alkyl-N, N-dimethylamine oxides with variations in chain length.* Antimicrob Agents Chemother 44, 2514-2517.
22. Biswas R., Kuhne H., Brudvig G. W., Gopalan V., 2001. *Use of EPR spectroscopy to study macromolecular structure and function.* Sci Prog 84, 45-67.
23. Bloodgood, R. A. 2003. *Cell biology and histology of the human eye.* http://www.med-ed.virginia.edu/public/CourseSitesDocs/ HistologyCellBiologyThread/handouts/unrestricted/original/MMHndt_Eye.html. Dostęp: 27-9-2010.
24. Boettner E. A., Wolter J. R., 1962. *Transmission of the ocular media.* Invest Ophthalmol 1, 776-783.
25. Booij J. C., Baas D. C., Beisekeeva J., Gorgels T. G., Bergen A. A., 2010. *The dynamic nature of Bruch's membrane.* Prog Retin Eye Res 29, 1-18.
26. Borucka A. I., Szaflik J., 2007. *Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem - obraz kliniczny i diagnostyka.* Okulistyka Suppl 1, 5-10.
27. Boucard C. C., Hernowo A. T., Maguire R. P., Jansonius N. M., Roerdink J. B., Hooymans J. M., Cornelissen F. W., 2009. *Changes in cortical grey*

http://rcin.org.pl

matter density associated with long-standing retinal visual field defects. Brain 132, 1898-1906.

28. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M., Svistunenko D., 1993. *Lipofuscin is a photoinducible free radical generator.* J Photochem Photobiol B 19, 201-204.
29. Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B., Wess T., 2004. *The photoreactivity of ocular lipofuscin.* Photochem Photobiol Sci 3, 759-764.
30. Broeyer F. J., van Aken B. E., Suzuki J., Kemme M. J., Schoemaker H. C., Cohen A. F., Mizushima Y., Burggraaf J., 2008. *The pharmacokinetics and effects of a long-acting preparation of superoxide dismutase (PC-SOD) in man.* Br J Clin Pharmacol 65, 22-29.
31. Brooks D. E., Garcia G. A., Dreyer E. B., Zurakowski D., Franco-Bourland R. E., 1997. *Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma.* Am J Vet Res 58, 864-867.
32. Buki A., Povlishock J. T., 2006. *All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited.* Acta Neurochir (Wien) 148, 181-193.
33. Buonocore G., Perrone S., Tataranno M. L., 2010. *Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species.* Semin Fetal Neonatal Med 15, 186-190.
34. Cady C., Evans M. S., Brewer G. J., 2001. *Age-related differences in NMDA responses in cultured rat hippocampal neurons.* Brain Res 921, 1-11.
35. Carter-Dawson L., Crawford M. L., Harwerth R. S., Smith E. L., III, Feldman R., Shen F. F., Mitchell C. K., Whitetree A., 2002. *Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 2633-2637.
36. Casson R. J., 2006. *Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma.* Clin Experiment Ophthalmol 34, 54-63.
37. Catala A., 2010. *A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids.* Biochem Biophys Res Commun 399, 318-323.
38. Ceballos-Picot I., Nicole A., Briand P., Grimber G., Delacourte A., Defossez A., Javoy-Agid F., Lafon M., Blouin J. L., Sinet P. M., 1991. *Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's syndrome.* Brain Res 552, 198-214.
39. Ceballos-Picot I., Nicole A., Clement M., Bourre J. M., Sinet P. M., 1992. *Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase.* Mutat Res 275, 281-293.

http://rcin.org.pl

40. Chen Y., Pearlman A., Luo Z., Wilcox C. S., 2007. *Hydrogen peroxide mediates a transient vasorelaxation with tempol during oxidative stress.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 293, H2085-H2092.
41. Cheng F. C., Jen J. F., Tsai T. H., 2002. *Hydroxyl radical in living systems and its separation methods.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 781, 481-496.
42. Clement M. V., Pervaiz S., 1999. *Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis.* Free Radic Res 30, 247-252.
43. Cook H. L., Patel P. J., Tufail A., 2008. *Age-related macular degeneration: diagnosis and management.* Br Med Bull 85:127-49., 127-149.
44. Couet W. R., Brasch R. C., Sosnovsky G., Tozer T. N., 1985. *Factors affecting nitroxide reduction in ascorbate solution and tissue homogenates.* Magn Reson Imaging 3, 83-88.
45. Coyle J. T., Puttfarcken P., 1993. *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.* Science 262, 689-695.
46. Crabb J. W., Miyagi M., Gu X., Shadrach K., West K. A., Sakaguchi H., Kamei M., Hasan A., Yan L., Rayborn M. E., Salomon R. G., Hollyfield J. G., 2002. *Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14682-14687.
47. Dastgheib K., Green W. R., 1994. *Granulomatous reaction to Bruch's membrane in age-related macular degeneration.* Arch Ophthalmol 112, 813-818.
48. Davalos A., Castillo J., Marrugat J., Fernandez-Real J. M., Armengou A., Cacabelos P., Rama R., 2000. *Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction.* Neurology 54, 1568-1574.
49. Davis R. M., Matsumoto S., Bernardo M., Sowers A., Matsumoto K., Krishna M. C., Mitchell J. B., 2011. *Magnetic resonance imaging of organic contrast agents in mice: capturing the whole-body redox landscape.* Free Radic Biol Med 50, 459-468.
50. Day B. J., 2009. *Catalase and glutathione peroxidase mimics.* Biochem Pharmacol 77, 285-296.
51. Deng-Bryant Y., Singh I. N., Carrico K. M., Hall E. D., 2008. *Neuroprotective effects of tempol, a catalytic scavenger of peroxynitrite-derived free radicals, in a mouse traumatic brain injury model.* J Cereb Blood Flow Metab 28, 1114-1126.
52. Dieterich D. C., Trivedi N., Engelmann R., Gundelfinger E. D., Gordon-Weeks P. R., Kreutz M. R., 2002. *Partial regeneration and long-term*

http://rcin.org.pl

survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. Eur J Neurosci 15, 1433-1443.

53. Dkhissi O., Chanut E., Wasowicz M., Savoldelli M., Nguyen-Legros J., Minvielle F., Versaux-Botteri C., 1999. *Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder.* Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 990-995.
54. Douglas G. R., 1998. *Pathogenetic mechanisms of glaucoma not related to intraocular pressure.* Curr Opin Ophthalmol 9, 34-38.
55. Dreyer E. B., Zurakowski D., Schumer R. A., Podos S. M., Lipton S. A., 1996. *Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma.* Arch Ophthalmol 114, 299-305.
56. Drummond D. C., Noble C. O., Hayes M. E., Park J. W., Kirpotin D. B., 2008. *Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development.* J Pharm Sci 97, 4696-4740.
57. El Remessy A. B., Khalil I. E., Matragoon S., Abou-Mohamed G., Tsai N. J., Roon P., Caldwell R. B., Caldwell R. W., Green K., Liou G. I., 2003. *Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite.* Am J Pathol 163, 1997-2008.
58. Engin K. N., 2009. *Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant.* Mol Vis 15, 855-860.
59. Espinosa-Heidmann D. G., Suner I. J., Hernandez E. P., Monroy D., Csaky K. G., Cousins S. W., 2003. *Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 3586-3592.
60. Evans J., 2008. *Antioxidant supplements to prevent or slow down the progression of AMD: a systematic review and meta-analysis.* Eye (Lond) 22, 751-760.
61. Faraci F. M., Didion S. P., 2004. *Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 1367-1373.
62. Farkas R. H., Chowers I., Hackam A. S., Kageyama M., Nickells R. W., Otteson D. C., Duh E. J., Wang C., Valenta D. F., Gunatilaka T. L., Pease M. E., Quigley H. A., Zack D. J., 2004. *Increased expression of iron-regulating genes in monkey and human glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 1410-1417.
63. Farkas R. H., Grosskreutz C. L., 2001. *Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview.* Int Ophthalmol Clin 41, 111-130.

http://rcin.org.pl

64. Fawcett R. J., Osborne N. N., 2007. *Flupirtine attenuates sodium nitroprusside-induced damage to retinal photoreceptors, in situ.* Brain Res Bull 73, 278-288.
65. Feeney-Burns L., Hilderbrand E. S., Eldridge S., 1984. *Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci 25, 195-200.
66. Ferreira S. M., Lerner S. F., Brunzini R., Evelson P. A., Llesuy S. F., 2004. *Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients.* Am J Ophthalmol 137, 62-69.
67. Fink M. P., Macias C. A., Xiao J., Tyurina Y. Y., Delude R. L., Greenberger J. S., Kagan V. E., Wipf P., 2007. *Hemigramicidin-TEMPO conjugates: novel mitochondria-targeted antioxidants.* Crit Care Med 35, S461-S467.
68. Flammer J., Orgul S., Costa V. P., Orzalesi N., Krieglstein G. K., Serra L. M., Renard J. P., Stefansson E., 2002. *The impact of ocular blood flow in glaucoma.* Prog Retin Eye Res 21, 359-393.
69. Forrester J., Dick A. D., McMenamin P. G., Roberts F., 2008. *The Eye. Basic Sciences in Practice.* Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
70. Frankel E. N., Huang S. W., Kanner J., German J. B., 1994. *Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions.* J Agric Food Chem 42, 1054-1059.
71. Gaillard E. R., Atherton S. J., Eldred G., Dillon J., 1995. *Photophysical studies on human retinal lipofuscin.* Photochem Photobiol 61, 448-453.
72. Garcia-Valenzuela E., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z., Sharma S. C., 1994. *Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy.* J Neurobiol 25, 431-438.
73. Gardner R., Moradas-Ferreira P., Salvador A., 2006. *Why does superoxide dismutase overexpression often increase hydrogen peroxide concentrations? An alternative explanation.* J Theor Biol 242, 798-800.
74. Gariboldi M. B., Ravizza R., Petterino C., Castagnaro M., Finocchiaro G., Monti E., 2003. *Study of in vitro and in vivo effects of the piperidine nitroxide Tempol--a potential new therapeutic agent for gliomas.* Eur J Cancer 39, 829-837.
75. Gellrich N. C., Schimming R., Zerfowski M., Eysel U. T., 2002. *Quantification of histological changes after calibrated crush of the intraorbital optic nerve in rats.* Br J Ophthalmol 86, 233-237.
76. Geringer C. C., Imami N. R., 2008. *Medical management of glaucoma.* Int Ophthalmol Clin 48, 115-141.

http://rcin.org.pl

77. Ghanem A. A., Arafa L. F., El Baz A., 2010. *Oxidative stress markers in patients with primary open-angle glaucoma.* Curr Eye Res 35, 295-301.
78. Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A., 2008. *Alternative measures of lipophilicity: from octanol-water partitioning to IAM retention.* J Pharm Sci 97, 2984-3004.
79. Goureau O., Jeanny J. C., Becquet F., Hartmann M. P., Courtois Y., 1993. *Protection against light-induced retinal degeneration by an inhibitor of NO synthase.* Neuroreport 5, 233-236.
80. Green W. R., 1999. *Histopathology of age-related macular degeneration.* Mol Vis 5:27., 27-
81. Grimm C., Wenzel A., Williams T., Rol P., Hafezi F., Reme C., 2001. *Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching.* Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 497-505.
82. Groner Y., Elroy-Stein O., Bernstein Y., Dafni N., Levanon D., Danciger E., Neer A., 1986. *Molecular genetics of Down's syndrome: overexpression of transfected human Cu/Zn-superoxide dismutase gene and the consequent physiological changes.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1:381-93., 381-393.
83. Grossniklaus H. E., Ling J. X., Wallace T. M., Dithmar S., Lawson D. H., Cohen C., Elner V. M., Elner S. G., Sternberg P., Jr., 2002. *Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization.* Mol Vis 8:119-26., 119-126.
84. Gupta N., Brown K. E., Milam A. H., 2003. *Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration.* Exp Eye Res 76, 463-471.
85. Gupta N., Yucel Y. H., 2007. *What changes can we expect in the brain of glaucoma patients?* Surv Ophthalmol 52 Suppl 2:S122-6., S122-S126.
86. Haefliger I. O., Fleischhauer J. C., Flammer J., 2000. *In glaucoma, should enthusiasm about neuroprotection be tempered by the experience obtained in other neurodegenerative disorders?* Eye (Lond) 14, 464-472.
87. Hahn P., Ying G. S., Beard J., Dunaief J. L., 2006. *Iron levels in human retina: sex difference and increase with age.* Neuroreport 17, 1803-1806.
88. Hahn S. M., Krishna M. C., DeLuca A. M., Coffin D., Mitchell J. B., 2000. *Evaluation of the hydroxylamine Tempol-H as an in vivo radioprotector.* Free Radic Biol Med 28, 953-958.
89. Hahn S. M., Tochner Z., Krishna C. M., Glass J., Wilson L., Samuni A., Sprague M., Venzon D., Glatstein E., Mitchell J. B., ., 1992. *Tempol, a*

http://rcin.org.pl

stable free radical, is a novel murine radiation protector. Cancer Res 52, 1750-1753.

90. Halliwell B., 2000. *The antioxidant paradox.* Lancet 355, 1179-1180.
91. Halliwell B., Gutteridge J. M., 1984. *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.* Biochem J 219, 1-14.
92. Ham W. T., Jr., Ruffolo J. J., Jr., Mueller H. A., Clarke A. M., Moon M. E., 1978. *Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light.* Invest Ophthalmol Vis Sci 17, 1029-1035.
93. Ham W. T., Jr., Ruffolo J. J., Jr., Mueller H. A., Guerry D., III, 1980. *The nature of retinal radiation damage: dependence on wavelength, power level and exposure time.* Vision Res 20, 1105-1111.
94. Hansch C., Steward A. R., Anderson S. M., Bentley D., 1968. *The parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics.* J Med Chem 11, 1-11.
95. Hanson, A. 2004a. *Rat Biology: The Rat's Eyes.* http://www.ratbehavior.org/Eyes.htm. Dostęp: 25-5-2010a.
96. Hanson, A. 2004b. *Rat Sensory World: What do rats see?*http://www.ratbehavior.org/RatVision.htm. Dostęp: 1-3-2010b.
97. He X., Hahn P., Iacovelli J., Wong R., King C., Bhisitkul R., Massaro-Giordano M., Dunaief J. L., 2007. *Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration.* Prog Retin Eye Res 26, 649-673.
98. Hillard V. H., Peng H., Zhang Y., Das K., Murali R., Etlinger J. D., Zeman R. J., 2004. *Tempol, a nitroxide antioxidant, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats.* J Neurotrauma 21, 1405-1414.
99. Honkanen R. A., Baruah S., Zimmerman M. B., Khanna C. L., Weaver Y. K., Narkiewicz J., Waziri R., Gehrs K. M., Weingeist T. A., Boldt H. C., Folk J. C., Russell S. R., Kwon Y. H., 2003. *Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy.* Arch Ophthalmol 121, 183-188.
100. Huang T. T., Carlson E. J., Kozy H. M., Mantha S., Goodman S. I., Ursell P. C., Epstein C. J., 2001. *Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice.* Free Radic Biol Med 31, 1101-1110.
101. Iannone A., Bini A., Swartz H. M., Tomasi A., Vannini V., 1989a. *Metabolism in rat liver microsomes of the nitroxide spin probe tempol.* Biochem Pharmacol 38, 2581-2586.
102. Iannone A., Hu H. P., Tomasi A., Vannini V., Swartz H. M., 1989b. *Metabolism of aqueous soluble nitroxides in hepatocytes: effects of cell*

http://rcin.org.pl

integrity, oxygen, and structure of nitroxides. Biochim Biophys Acta 991, 90-96.

103. Imamura Y., Noda S., Hashizume K., Shinoda K., Yamaguchi M., Uchiyama S., Shimizu T., Mizushima Y., Shirasawa T., Tsubota K., 2006. *Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A 103, 11282-11287.
104. Isenmann S., Klocker N., Gravel C., Bahr M., 1998. *Short communication: protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF in vivo.* Eur J Neurosci 10, 2751-2756.
105. Ishii Y., Kwong J. M., Caprioli J., 2003. *Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 1982-1992.
106. Ishikawa F., Ohguro H., Ohguro I., Yamazaki H., Mamiya K., Metoki T., Ito T., Yokoi Y., Nakazawa M., 2006. *Prolonged rhodopsin phosphorylation in light-induced retinal degeneration in rat models.* Invest Ophthalmol Vis Sci 47, 5204-5211.
107. Iwata F., Patronas N. J., Caruso R. C., Podgor M. J., Remaley N. A., Kupfer C., Kaiser-Kupfer M. I., 1997. *Association of visual field, cup-disc ratio, and magnetic resonance imaging of optic chiasm.* Arch Ophthalmol 115, 729-732.
108. Izzotti A., Sacca S. C., Cartiglia C., De Flora S., 2003. *Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients.* Am J Med 114, 638-646.
109. Jiang J., Kurnikov I., Belikova N. A., Xiao J., Zhao Q., Amoscato A. A., Braslau R., Studer A., Fink M. P., Greenberger J. S., Wipf P., Kagan V. E., 2007. *Structural requirements for optimized delivery, inhibition of oxidative stress, and antiapoptotic activity of targeted nitroxides.* J Pharmacol Exp Ther 320, 1050-1060.
110. Johnson L. V., Leitner W. P., Staples M. K., Anderson D. H., 2001. *Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration.* Exp Eye Res 73, 887-896.
111. Johnson T. V., Tomarev S. I., 2010. *Rodent models of glaucoma.* Brain Res Bull 81, 349-358.
112. Jonas J. B., Berenshtein E., Holbach L., 2004. *Lamina cribrosa thickness and spatial relationships between intraocular space and cerebrospinal fluid space in highly myopic eyes.* Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 2660-2665.

http://rcin.org.pl

113. Jones B. W., Watt C. B., Frederick J. M., Baehr W., Chen C. K., Levine E. M., Milam A. H., Lavail M. M., Marc R. E., 2003. *Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations.* J Comp Neurol 464, 1-16.
114. Jung T., Bader N., Grune T., 2007. *Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences.* Ann N Y Acad Sci 1119:97-111., 97-111.
115. Justilien V., Pang J. J., Renganathan K., Zhan X., Crabb J. W., Kim S. R., Sparrow J. R., Hauswirth W. W., Lewin A. S., 2007. *SOD2 knockdown mouse model of early AMD.* Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 4407-4420.
116. Kagan V. E., Bayir H. A., Belikova N. A., Kapralov O., Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Jiang J., Stoyanovsky D. A., Wipf P., Kochanek P. M., Greenberger J. S., Pitt B., Shvedova A. A., Borisenko G., 2009. *Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death.* Free Radic Biol Med 46, 1439-1453.
117. Kannurpatti S. S., Sanganahalli B. G., Mishra S., Joshi P. G., Joshi N. B., 2004. *Glutamate-induced differential mitochondrial response in young and adult rats.* Neurochem Int 44, 361-369.
118. Kass M. A., Heuer D. K., Higginbotham E. J., Johnson C. A., Keltner J. L., Miller J. P., Parrish R. K., Wilson M. R., Gordon M. O., 2002. *The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma.* Arch Ophthalmol 120, 701-713.
119. Kaushik S., Pandav S. S., Ram J., 2003. *Neuroprotection in glaucoma.* J Postgrad Med 49, 90-95.
120. Ke Y., Ming Q. Z., 2003. *Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders.* Lancet Neurol 2, 246-253.
121. Keana J. F., Pou S., Rosen G. M., 1987. *Nitroxides as potential contrast enhancing agents for MRI application: influence of structure on the rate of reduction by rat hepatocytes, whole liver homogenate, subcellular fractions, and ascorbate.* Magn Reson Med 5, 525-536.
122. Kermer P., Klocker N., Weishaupt J. H., Bahr M., 2001. *Transection of the optic nerve in rats: studying neuronal death and survival in vivo.* Brain Res Brain Res Protoc 7, 255-260.
123. Kerrigan L. A., Zack D. J., Quigley H. A., Smith S. D., Pease M. E., 1997. *TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma.* Arch Ophthalmol 115, 1031-1035.
124. Klein R., Klein B. E., Linton K. L., 1992. *Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study.* Ophthalmology 99, 933-943.
125. Koitka M., Hochel J., Gieschen H., Borchert H. H., 2010. *Improving the ex vivo stability of drug ester compounds in rat and dog serum:*

http://rcin.org.pl

inhibition of the specific esterases and implications on their identity. J Pharm Biomed Anal 51, 664-678.

126. Kowald A., Lehrach H., Klipp E., 2006. *Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase.* J Theor Biol 238, 828-840.
127. Kreutz M. R., Seidenbecher C. I., Sabel B. A., 1999. *Molecular plasticity of retinal ganglion cells after partial optic nerve injury.* Restor Neurol Neurosci 14, 127-134.
128. Krishna M. C., Russo A., Mitchell J. B., Goldstein S., Dafni H., Samuni A., 1996. *Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O2-. or as SOD mimics?* J Biol Chem 271, 26026-26031.
129. Kudo W., Yamato M., Yamada K., Kinoshita Y., Shiba T., Watanabe T., Utsumi H., 2008. *Formation of TEMPOL-hydroxylamine during reaction between TEMPOL and hydroxyl radical: HPLC/ECD study.* Free Radic Res 42, 505-512.
130. Kumar D. M., Agarwal N., 2007. *Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence.* J Glaucoma 16, 334-343.
131. Kuppusamy P., Wang P., Shankar R. A., Ma L., Trimble C. E., Hsia C. J., Zweier J. L., 1998. *In vivo topical EPR spectroscopy and imaging of nitroxide free radicals and polynitroxyl-albumin.* Magn Reson Med 40, 806-811.
132. Kułakowska-Pawlak, B. 2010. *Wyznaczanie współczynnika podziału n-oktanol/woda dla wybranych chemicznych zanieczyszczeń środowiska.* www.zcha.pwr.wroc.pl/chc0475/cwiczenie5.doc. Dostęp: 26-4-2011.
133. Laguerre M., Giraldo L. J., Lecomte J., Figueroa-Espinoza M. C., Barea B., Weiss J., Decker E. A., Villeneuve P., 2009. *Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cutoff theory behind the polar paradox.* J Agric Food Chem 57, 11335-11342.
134. Laguerre M., Lopez Giraldo L. J., Lecomte J., Figueroa-Espinoza M. C., Barea B., Weiss J., Decker E. A., Villeneuve P., 2010. *Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "phenolipids" in emulsion: a parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters.* J Agric Food Chem 58, 2869-2876.
135. Langner M., Kral T. E., 1999. *Liposome-based drug delivery systems.* Pol J Pharmacol 51, 211-222.
136. Leske M. C., Connell A. M., Wu S. Y., Hyman L. G., Schachat A. P., 1995. *Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study.* Arch Ophthalmol 113, 918-924.
137. Levin L. A., 2005. *Neuroprotection and regeneration in glaucoma.* Ophthalmol Clin North Am 18, 585-96, vii.

http://rcin.org.pl

138. Levin L. A., Geszvain K. M., 1998. *Expression of ceruloplasmin in the retina: induction after optic nerve crush.* Invest Ophthalmol Vis Sci 39, 157-163.
139. Levkovitch-Verbin H., Dardik R., Vander S., Nisgav Y., Kalev-Landoy M., Melamed S., 2006. *Experimental glaucoma and optic nerve transection induce simultaneous upregulation of proapoptotic and prosurvival genes.* Invest Ophthalmol Vis Sci 47, 2491-2497.
140. Levkovitch-Verbin H., Quigley H. A., Martin K. R., Zack D. J., Pease M. E., Valenta D. F., 2003. *A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 3388-3393.
141. Li B., Sedlacek M., Manoharan I., Boopathy R., Duysen E. G., Masson P., Lockridge O., 2005. *Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma.* Biochem Pharmacol 70, 1673-1684.
142. Li W. G., Zhang X. Y., Wu Y. J., Gao M. T., Zheng R. L., 2006. *The relationship between structure and antioxidative activity of piperidine nitroxides.* J Pharm Pharmacol 58, 941-949.
143. Li Y., Schlamp C. L., Nickells R. W., 1999. *Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 1004-1008.
144. Li Y., Schlamp C. L., Poulsen G. L., Jackson M. W., Griep A. E., Nickells R. W., 2002. *p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate.* Mol Vis 8, 341-350.
145. Liang Q., Smith A. D., Pan S., Tyurin V. A., Kagan V. E., Hastings T. G., Schor N. F., 2005. *Neuroprotective effects of TEMPOL in central and peripheral nervous system models of Parkinson's disease.* Biochem Pharmacol 70, 1371-1381.
146. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., 1997. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.* Adv Drug Deliv Rev 23, 3-25.
147. Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J., Stamler J. S., 1993. *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds.* Nature 364, 626-632.
148. Liu X., Chen C., Smith B. J., 2008. *Progress in brain penetration evaluation in drug discovery and development.* J Pharmacol Exp Ther 325, 349-356.

http://rcin.org.pl

149. Locatelli C., Rosso R., Santos-Silva M. C., de Souza C. A., Licinio M. A., Leal P., Bazzo M. L., Yunes R. A., Creczynski-Pasa T. B., 2008. *Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells.* Bioorg Med Chem 16, 3791-3799.
150. Longstaff A., 2002. *Krótkie wykłady. Neurobiologia.* WN PWN, Warszawa.
151. Lotery A. J., 2005. *Glutamate excitotoxicity in glaucoma: truth or fiction?* Eye (Lond) 19, 369-370.
152. Lucas D. R., Newhouse J. P., 1957. *The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina.* AMA Arch Ophthalmol 58, 193-201.
153. Lucas R., Comelles F., Alcantara D., Maldonado O. S., Curcuroze M., Parra J. L., Morales J. C., 2010. *Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: a potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions.* J Agric Food Chem 58, 8021-8026.
154. Lundmark P. O., Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Cardinali D. P., Rosenstein R. E., 2007. *Melatonin in the eye: implications for glaucoma.* Exp Eye Res 84, 1021-1030.
155. Luo X., Heidinger V., Picaud S., Lambrou G., Dreyfus H., Sahel J., Hicks D., 2001. *Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro.* Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 1096-1106.
156. Manabe S., Lipton S. A., 2003. *Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 385-392.
157. Marberger H., Huber W., Bartsch G., Schulte T., Swoboda P., 1974. *Orgotein: a new antiinflammatory metalloprotein drug evaluation of clinical efficacy and safety in inflammatory conditions of the urinary tract.* Int Urol Nephrol 6, 61-74.
158. Marc R. E., Jones B. W., Watt C. B., Vazquez-Chona F., Vaughan D. K., Organisciak D. T., 2008. *Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration.* Mol Vis 14, 782-806.
159. Marcic T. S., Belyea D. A., Katz B., 2003. *Neuroprotection in glaucoma: a model for neuroprotection in optic neuropathies.* Curr Opin Ophthalmol 14, 353-356.
160. Marks J. D., Bindokas V. P., Zhang X. M., 2000. *Maturation of vulnerability to excitotoxicity: intracellular mechanisms in cultured postnatal hippocampal neurons.* Brain Res Dev Brain Res 124, 101-116.

http://rcin.org.pl

161. McCord J. M., 2000. *The evolution of free radicals and oxidative stress.* Am J Med 108, 652-659.
162. McCord J. M., 2008. *Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves.* Dose Response 6, 223-238.
163. Medina I., Lois S., Alcantara D., Lucas R., Morales J. C., 2009. *Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions.* J Agric Food Chem 57, 9773-9779.
164. Meffert H., 2008. *Antioxidants--friend or foe?* Ger Med Sci 6:Doc09., Doc09-
165. Mehlhorn R. J., Swanson C. E., 1992. *Nitroxide-stimulated H2O2 decomposition by peroxidases and pseudoperoxidases.* Free Radic Res Commun 17, 157-175.
166. Mehta S. H., Webb R. C., Ergul A., Tawfik A., Dorrance A. M., 2004. *Neuroprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286, R283-R288.
167. Metz J. M., Smith D., Mick R., Lustig R., Mitchell J., Cherakuri M., Glatstein E., Hahn S. M., 2004. *A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy.* Clin Cancer Res 10, 6411-6417.
168. Mey J., Thanos S., 1993. *Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo.* Brain Res 602, 304-317.
169. Millan M., Sobrino T., Castellanos M., Nombela F., Arenillas J. F., Riva E., Cristobo I., Garcia M. M., Vivancos J., Serena J., Moro M. A., Castillo J., Davalos A., 2007. *Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke.* Stroke 38, 90-95.
170. Minc-Golomb D., Knobler H., Groner Y., 1991. *Gene dosage of CuZnSOD and Down's syndrome: diminished prostaglandin synthesis in human trisomy 21, transfected cells and transgenic mice.* EMBO J 10, 2119-2124.
171. Mitchell J. B., Xavier S., DeLuca A. M., Sowers A. L., Cook J. A., Krishna M. C., Hahn S. M., Russo A., 2003. *A low molecular weight antioxidant decreases weight and lowers tumor incidence.* Free Radic Biol Med 34, 93-102.
172. Miyahara T., Kikuchi T., Akimoto M., Kurokawa T., Shibuki H., Yoshimura N., 2003. *Gene microarray analysis of experimental glaucomatous retina from cynomologous monkey.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 4347-4356.

http://rcin.org.pl

173. Moreno M. C., Campanelli J., Sande P., Sanez D. A., Keller Sarmiento M. I., Rosenstein R. E., 2004. *Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure.* Free Radic Biol Med 37, 803-812.
174. Morre D. J., Morre D. M., 2003. *Cell surface NADH oxidases (ECTO-NOX proteins) with roles in cancer, cellular time-keeping, growth, aging and neurodegenerative diseases.* Free Radic Res 37, 795-808.
175. Morre D. M., Lenaz G., Morre D. J., 2000. *Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging.* J Exp Biol 203, 1513-1521.
176. Morrison J. C., 2005. *Elevated intraocular pressure and optic nerve injury models in the rat.* J Glaucoma 14, 315-317.
177. Murakami M., Fukatsu K., Ohkawa S., Kasahara F., Sugawara T., 2000. *ESR study on the antioxidant activity of TAK-218 in biological model membranes.* Chem Pharm Bull (Tokyo) 48, 784-792.
178. Nagy K., Floyd R. A., Simon P., Nagy I., 1985. *Studies on the effect of iron overload on rat cortex synaptosomal membranes.* Biochim Biophys Acta 820, 216-222.
179. Nakahiro M., Arakawa O., Nishimura T., Narahashi T., 1996. *Potentiation of GABA-induced Cl- current by a series of n-alcohols disappears at a cutoff point of a longer-chain n-alcohol in rat dorsal root ganglion neurons.* Neurosci Lett 205, 127-130.
180. Nakazawa T., Shimura M., Endo S., Takahashi H., Mori N., Tamai M., 2005. *N-Methyl-D-Aspartic acid suppresses Akt activity through protein phosphatase in retinal ganglion cells.* Mol Vis 11:1173-82., 1173-1182.
181. Naskar R., Quinto K., Romann I., Schuettauf F., Zurakowski D., 2002. *Phenytoin blocks retinal ganglion cell death after partial optic nerve crush.* Exp Eye Res 74, 747-752.
182. Neufeld A. H., 2004. *Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma.* Brain Res Bull 62, 455-459.
183. Newman E., Reichenbach A., 1996. *The Muller cell: a functional element of the retina.* Trends Neurosci 19, 307-312.
184. Newman E. A., 2003. *New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission.* Trends Neurosci 26, 536-542.
185. Noell W. K., 1980. *Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes.* Vision Res 20, 1163-1171.
186. Noell W. K., Walker V. S., Kang B. S., Berman S., 1966. *Retinal damage by light in rats.* Invest Ophthalmol 5, 450-473.
187. Noor R., Mittal S., Iqbal J., 2002. *Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases.* Med Sci Monit 8, RA210-RA215.

http://rcin.org.pl

188. Novack G. D., O'Donnell M. J., Molloy D. W., 2002. *New glaucoma medications in the geriatric population: efficacy and safety.* J Am Geriatr Soc 50, 956-962.
189. Nowak J. Z., 2006. *Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy.* Pharmacol Rep 58, 353-363.
190. Nozaki M., Raisler B. J., Sakurai E., Sarma J. V., Barnum S. R., Lambris J. D., Chen Y., Zhang K., Ambati B. K., Baffi J. Z., Ambati J., 2006. *Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization.* Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2328-2333.
191. Offer T., Russo A., Samuni A., 2000. *The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics.* FASEB J 14, 1215-1223.
192. Okajo A., Matsumoto K., Mitchell J. B., Krishna M. C., Endo K., 2006. *Competition of nitroxyl contrast agents as an in vivo tissue redox probe: comparison of pharmacokinetics by the bile flow monitoring (BFM) and blood circulating monitoring (BCM) methods using X-band EPR and simulation of decay profiles.* Magn Reson Med 56, 422-431.
193. Okisaka S., Murakami A., Mizukawa A., Ito J., 1997. *Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes.* Jpn J Ophthalmol 41, 84-88.
194. Olney J. W., 1969. *Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.* Science 164, 719-721.
195. Organisciak D. T., Vaughan D. K., 2009. *Retinal light damage: Mechanisms and protection.* Prog Retin Eye Res
196. Orr W. C., Sohal R. S., 1993. *Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster.* Arch Biochem Biophys 301, 34-40.
197. Osborne N. N., 2009. *Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned.* Acta Ophthalmol 87, 450-454.
198. Pajouhesh H., Lenz G. R., 2005. *Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs.* NeuroRx 2, 541-553.
199. Pang I. H., Johnson E. C., Jia L., Cepurna W. O., Shepard A. R., Hellberg M. R., Clark A. F., Morrison J. C., 2005. *Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage.* Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 1313-1321.
200. Patel M., Chan C. C., 2008. *Immunopathological aspects of age-related macular degeneration.* Semin Immunopathol 30, 97-110.
201. Pease M. E., McKinnon S. J., Quigley H. A., Kerrigan-Baumrind L. A., Zack D. J., 2000. *Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci 41, 764-774.

http://rcin.org.pl

202. Peinado-Ramon P., Salvador M., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., 1996. *Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study.* Invest Ophthalmol Vis Sci 37, 489-500.
203. Petrukhin K., 2007. *New therapeutic targets in atrophic age-related macular degeneration.* Expert Opin Ther Targets 11, 625-639.
204. Polaczek-Krupa B., Czechowicz-Janicka, K., 2005. *Objawy, diagnostyka i leczenie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem.* Przew Lek 8, 45-53.
205. Porter W. L., Black E. D., Drolet A. M., 1989. *Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems.* J Agric Food Chem 37, 615-624.
206. Quigley H., Anderson D. R., 1976. *The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve.* Invest Ophthalmol 15, 606-616.
207. Quigley H. A., 1999. *Neuronal death in glaucoma.* Prog Retin Eye Res 18, 39-57.
208. Quigley H. A., McKinnon S. J., Zack D. J., Pease M. E., Kerrigan-Baumrind L. A., Kerrigan D. F., Mitchell R. S., 2000. *Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats.* Invest Ophthalmol Vis Sci 41, 3460-3466.
209. Radi R., 2004. *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration.* Proc Natl Acad Sci U S A 101, 4003-4008.
210. Radu R. A., Han Y., Bui T. V., Nusinowitz S., Bok D., Lichter J., Widder K., Travis G. H., Mata N. L., 2005. *Reductions in serum vitamin A arrest accumulation of toxic retinal fluorophores: a potential therapy for treatment of lipofuscin-based retinal diseases.* Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 4393-4401.
211. Rait J. L., 1999. *Systemic effects of topical ophthalmic beta-adrenoceptor antagonists.* Aust N Z J Ophthalmol 27, 57-64.
212. Rak R., Chao D. L., Pluta R. M., Mitchell J. B., Oldfield E. H., Watson J. C., 2000. *Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia.* J Neurosurg 92, 646-651.
213. Rakoczy P. E., Yu M. J. T., Nusinowitz S., Chang B., Heckenlively J. R., 2006. *Mouse models of age-related macular degeneration.* Exp Eye Res 82, 741-752.

http://rcin.org.pl

214. Ranchon I., Chen S., Alvarez K., Anderson R. E., 2001. *Systemic administration of phenyl-N-tert-butylnitrone protects the retina from light damage.* Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 1375-1379.
215. Rasmussen C. A., Kaufman P. L., 2005. *Primate glaucoma models.* J Glaucoma 14, 311-314.
216. Reaxys 2011. *TEMPOL.* Baza danych Reaxys ID 1369575. Dostęp: 26-4-20110.
217. Reddan J. R., Sevilla M. D., Giblin F. J., Padgaonkar V., Dziedzic D. C., Leverenz V., Misra I. C., Peters J. L., 1993. *The superoxide dismutase mimic TEMPOL protects cultured rabbit lens epithelial cells from hydrogen peroxide insult.* Exp Eye Res 56, 543-554.
218. Regillo C., Chang T. S., Johnson M. W., Kaiser P. K., Scott I. U., Spaide R., Griggs P. B., 2007. *Siatkówka i ciało szkliste.*Elsevier Urban & Partner, Wrocław.
219. Ren R., Jonas J. B., Tian G., Zhen Y., Ma K., Li S., Wang H., Li B., Zhang X., Wang N., 2010. *Cerebrospinal fluid pressure in glaucoma: a prospective study.* Ophthalmology 117, 259-266.
220. Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G. P., Mariotti S. P., 2004. *Global data on visual impairment in the year 2002.* Bull World Health Organ 82, 844-851.
221. Reveillaud I., Niedzwiecki A., Bensch K. G., Fleming J. E., 1991. *Expression of bovine superoxide dismutase in Drosophila melanogaster augments resistance of oxidative stress.* Mol Cell Biol 11, 632-640.
222. Riederer P., Sofic E., Rausch W. D., Schmidt B., Reynolds G. P., Jellinger K., Youdim M. B., 1989. *Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains.* J Neurochem 52, 515-520.
223. Riedl C. R., Sternig P., Galle G., Langmann F., Vcelar B., Vorauer K., Wagner A., Katinger H., Pfluger H., 2005. *Liposomal recombinant human superoxide dismutase for the treatment of Peyronie's disease: a randomized placebo-controlled double-blind prospective clinical study.* Eur Urol 48, 656-661.
224. Rozanowska M., Jarvis-Evans J., Korytowski W., Boulton M. E., Burke J. M., Sarna T., 1995. *Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species.* J Biol Chem 270, 18825-18830.
225. Rozanowska M., Wessels J., Boulton M., Burke J. M., Rodgers M. A., Truscott T. G., Sarna T., 1998. *Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media.* Free Radic Biol Med 24, 1107-1112.

http://rcin.org.pl

226. Sacca S. C., Pascotto A., Camicione P., Capris P., Izzotti A., 2005. *Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma.* Arch Ophthalmol 123, 458-463.
227. Saito K., Takeshita K., Ueda J., Ozawa T., 2003. *Two reaction sites of a spin label, TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl), with hydroxyl radical.* J Pharm Sci 92, 275-280.
228. Sakurai E., Anand A., Ambati B. K., van Rooijen N., Ambati J., 2003. *Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 3578-3585.
229. Samuni A., Mitchell J. B., DeGraff W., Krishna C. M., Samuni U., Russo A., 1991. *Nitroxide SOD-mimics: modes of action.* Free Radic Res Commun 12-13 Pt 1:187-94., 187-194.
230. Samuni A. M., Chuang E. Y., Krishna M. C., Stein W., DeGraff W., Russo A., Mitchell J. B., 2003. *Semiquinone radical intermediate in catecholic estrogen-mediated cytotoxicity and mutagenesis: chemoprevention strategies with antioxidants.* Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5390-5395.
231. Sanganahalli B. G., Joshi P. G., Joshi N. B., 2006. *NMDA and non-NMDA receptors stimulation causes differential oxidative stress in rat cortical slices.* Neurochem Int 49, 475-480.
232. Schickler M., Knobler H., Avraham K. B., Elroy-Stein O., Groner Y., 1989. *Diminished serotonin uptake in platelets of transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity.* EMBO J 8, 1385-1392.
233. Schmidt K. G., Bergert H., Funk R. H., 2008. *Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery.* Curr Neuropharmacol 6, 164-178.
234. Schuettauf F., Naskar R., Vorwerk C. K., Zurakowski D., Dreyer E. B., 2000. *Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors.* Invest Ophthalmol Vis Sci 41, 4313-4316.
235. Schuettauf F., Quinto K., Naskar R., Zurakowski D., 2002. *Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: the DBA/2J mouse model.* Vision Res 42, 2333-2337.
236. Schuettauf F., Rejdak R., Thaler S., Bolz S., Lehaci C., Mankowska A., Zarnowski T., Junemann A., Zagorski Z., Zrenner E., Grieb P., 2006. *Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat.* Exp Eye Res 83, 1128-1134.
237. Schwartz M., 2001. *Neuroprotection as a treatment for glaucoma: pharmacological and immunological approaches.* Eur J Ophthalmol 11 Suppl 2:S7-11., S7-11.

http://rcin.org.pl

238. Schwartz M., Yoles E., 2000. *Neuroprotection: a new treatment modality for glaucoma?* Curr Opin Ophthalmol 11, 107-111.
239. Shum P., Kim J. M., Thompson D. H., 2001. *Phototriggering of liposomal drug delivery systems.* Adv Drug Deliv Rev 53, 273-284.
240. Simonsen U., Christensen F. H., Buus N. H., 2009. *The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure.* Pharmacol Ther 122, 109-124.
241. Sinet P. M., 1982. *Metabolism of oxygen derivatives in down's syndrome.* Ann N Y Acad Sci 396, 83-94.
242. Smith D. A., Jones B. C., Walker D. K., 1996. *Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics.* Med Res Rev 16, 243-266.
243. Sorce S., Krause K. H., 2009. *NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease.* Antioxid Redox Signal 11, 2481-2504.
244. Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K., Simone N. L., Cook J. A., Krishna M. C., Mitchell J. B., 2007. *The chemistry and biology of nitroxide compounds.* Free Radic Biol Med 42, 1632-1650.
245. Stroman G. A., Stewart W. C., Golnik K. C., Cure J. K., Olinger R. E., 1995. *Magnetic resonance imaging in patients with low-tension glaucoma.* Arch Ophthalmol 113, 168-172.
246. Sun Q., Ooi V. E., Chan S. O., 2001. *N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in adult rat retina is antagonized by single systemic injection of MK-801.* Exp Brain Res 138, 37-45.
247. Swartz H. M., Khan N., Khramtsov V. V., 2007. *Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy to evaluate the redox state in vivo.* Antioxid Redox Signal 9, 1757-1771.
248. Tanito M., Kaidzu S., Anderson R. E., 2007a. *Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats.* Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 1864-1872.
249. Tanito M., Kaidzu S., Ohira A., Anderson R. E., 2008. *Topography of retinal damage in light-exposed albino rats.* Exp Eye Res 87, 292-295.
250. Tanito M., Li F., Anderson R. E., 2010. *Protection of retinal pigment epithelium by OT-551 and its metabolite TEMPOL-H against light-induced damage in rats.* Exp Eye Res
251. Tanito M., Li F., Elliott M. H., Dittmar M., Anderson R. E., 2007b. *Protective effect of TEMPOL derivatives against light-induced retinal damage in rats.* Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 1900-1905.
252. Tatton N. A., Tezel G., Insolia S. A., Nandor S. A., Edward P. D., Wax M. B., 2001. *In situ detection of apoptosis in normal pressure glaucoma.*

http://rcin.org.pl

a preliminary examination. Surv Ophthalmol 45 Suppl 3:S268-72; discussion S273-6., S268-S272.

253. Tezel G., 2006. *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences.* Prog Retin Eye Res 25, 490-513.
254. Tezel G., Yang X., 2004. *Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro.* Invest Ophthalmol Vis Sci 45, 4049-4059.
255. Tezel G., Yang X., Cai J., 2005. *Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 3177-3187.
256. Thaler S., Haritoglou C., Choragiewicz T. J., Messias A., Baryluk A., May C. A., Rejdak R., Fiedorowicz M., Zrenner E., Schuettauf F., 2008. *In vivo toxicity study of rhodamine 6G in the rat retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci 49, 2120-2126.
257. Thaler S., Rejdak R., Dietrich K., Ladewig T., Okuno E., Kocki T., Turski W. A., Junemann A., Zrenner E., Schuettauf F., 2006. *A selective method for transfection of retinal ganglion cells by retrograde transfer of antisense oligonucleotides against kynurenine aminotransferase II.* Mol Vis 12, 100-107.
258. Tsai J. C., Wu L., Worgul B., Forbes M., Cao J., 2005. *Intravitreal administration of erythropoietin and preservation of retinal ganglion cells in an experimental rat model of glaucoma.* Curr Eye Res 30, 1025-1031.
259. Turrens J. F., 2003a. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* J Physiol 552, 335-344.
260. Turrens J. F., 2003b. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* J Physiol 552, 335-344.
261. Ullian E. M., Barkis W. B., Chen S., Diamond J. S., Barres B. A., 2004. *Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity.* Mol Cell Neurosci 26, 544-557.
262. Van Remmen H., Ikeno Y., Hamilton M., Pahlavani M., Wolf N., Thorpe S. R., Alderson N. L., Baynes J. W., Epstein C. J., Huang T. T., Nelson J., Strong R., Richardson A., 2003. *Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging.* Physiol Genomics 16, 29-37.
263. Vaughan D. K., Coulibaly S. F., Darrow R. M., Organisciak D. T., 2003. *A morphometric study of light-induced damage in transgenic rat models of retinitis pigmentosa.* Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 848-855.
264. Vaughan D. K., Nemke J. L., Fliesler S. J., Darrow R. M., Organisciak D. T., 2002. *Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage.* Photochem Photobiol 75, 547-553.

http://rcin.org.pl

265. Veronese F. M., Caliceti P., Schiavon O., Sergi M., 2002. *Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation.* Adv Drug Deliv Rev 54, 587-606.
266. Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Rasminsky M., Bray G. M., Aguayo A. J., 1993. *Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats.* J Neurobiol 24, 23-36.
267. Vojnikovic B., Spanjol J., 2007. *Prednisolone neuroprotective therapy in age-related macular degeneration.* Coll Antropol 31 Suppl 1, 69-70.
268. Vorwerk C. K., Lipton S. A., Zurakowski D., Hyman B. T., Sabel B. A., Dreyer E. B., 1996. *Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine.* Invest Ophthalmol Vis Sci 37, 1618-1624.
269. Wang M., Lam T. T., Fu J., Tso M. O., 1995. *TEMPOL, a superoxide dismutase mimic, ameliorates light-induced retinal degeneration.* Res Commun Mol Pathol Pharmacol 89, 291-305.
270. Wein F. B., Levin L. A., 2002. *Current understanding of neuroprotection in glaucoma.* Curr Opin Ophthalmol 13, 61-67.
271. Weiss R. H., Flickinger A. G., Rivers W. J., Hardy M. M., Aston K. W., Ryan U. S., Riley D. P., 1993. *Evaluation of activity of putative superoxide dismutase mimics. Direct analysis by stopped-flow kinetics.* J Biol Chem 268, 23049-23054.
272. Wheeler L., WoldeMussie E., Lai R., 2003. *Role of alpha-2 agonists in neuroprotection.* Surv Ophthalmol 48 Suppl 1:S47-51., S47-S51.
273. Whitmore A. V., Libby R. T., John S. W., 2005. *Glaucoma: thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes?* Prog Retin Eye Res 24, 639-662.
274. Wilcox C. S., 2010. *Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress.* Pharmacol Ther 126, 119-145.
275. Wilcox C. S., Pearlman A., 2008. *Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides.* Pharmacol Rev 60, 418-469.
276. Winkler B. S., Boulton M. E., Gottsch J. D., Sternberg P., 1999. *Oxidative damage and age-related macular degeneration.* Mol Vis 5, 32-42.
277. Wong R. W., Richa D. C., Hahn P., Green W. R., Dunaief J. L., 2007. *Iron toxicity as a potential factor in AMD.* Retina 27, 997-1003.
278. Wong W. T., Kam W., Cunningham D., Harrington M., Hammel K., Meyerle C. B., Cukras C., Chew E. Y., Sadda S. R., Ferris F. L., 2010. *Treatment of geographic atrophy by the topical administration of OT-551: results of a phase II clinical trial.* Invest Ophthalmol Vis Sci 51, 6131-6139.

http://rcin.org.pl

279. Wong Y. L., Curfman C. L., Doncel G. F., Hubieki M. P., Dudding T. C., Savle P. S., Gandour R. D., 2002. *Spermicidal, anti-HIV, and micellar properties of di- and trihydroxylated cationic surfactants.* Tetrahedron 58, 45-58.
280. Wright M. V., Kuhn T. B., 2002. *CNS neurons express two distinct plasma membrane electron transport systems implicated in neuronal viability.* J Neurochem 83, 655-664.
281. Xavier S., Yamada K., Samuni A. M., Samuni A., DeGraff W., Krishna M. C., Mitchell J. B., 2002. *Differential protection by nitroxides and hydroxylamines to radiation-induced and metal ion-catalyzed oxidative damage.* Biochim Biophys Acta 1573, 109-120.
282. Xu H., Chen M., Forrester J. V., 2009. *Para-inflammation in the aging retina.* Prog Retin Eye Res 28, 348-368.
283. Yablonski M. E., Ritch R., Pokorny K. S., 1979. *Effect of decreased intracranial pressure on optic disc.* Invest Ophthalmol 18, 165-165.
284. Yang X. L., 2004. *Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons.* Prog Neurobiol 73, 127-150.
285. Yildirim O., Ates N. A., Ercan B., Muslu N., Unlu A., Tamer L., Atik U., Kanik A., 2005. *Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma.* Eye (Lond) 19, 580-583.
286. Yilmaz T., Aydemir O., Ozercan I. H., Ustundag B., 2007. *Effects of vitamin e, pentoxifylline and aprotinin on light-induced retinal injury.* Ophthalmologica 221, 159-166.
287. Yoles E., Schwartz M., 1998. *Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve.* Arch Ophthalmol 116, 906-910.
288. Yucel Y. H., Zhang Q., Gupta N., Kaufman P. L., Weinreb R. N., 2000. *Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma.* Arch Ophthalmol 118, 378-384.
289. Zamir E., Zhang R., Samuni A., Kogan M., Pe'er J., 1999. *Nitroxide stable radical suppresses autoimmune uveitis in rats.* Free Radic Biol Med 27, 7-15.
290. Zhang B., Osborne N. N., 2006. *Oxidative-induced retinal degeneration is attenuated by epigallocatechin gallate.* Brain Res 1124, 176-187.
291. Zhang R., Shohami E., Beit-Yannai E., Bass R., Trembovler V., Samuni A., 1998. *Mechanism of brain protection by nitroxide radicals in experimental model of closed-head injury.* Free Radic Biol Med 24, 332-340.

http://rcin.org.pl

292. Zhou J., Jang Y. P., Chang S., Sparrow J. R., 2008. *OT-674 suppresses photooxidative processes initiated by an RPE lipofuscin fluorophore.* Photochem Photobiol 84, 75-80.
293. Zhou X. J., Laszik Z., Wang X. Q., Silva F. G., Vaziri N. D., 2000. *Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis.* Lab Invest 80, 1905-1914.
294. Zigler J. S., Jr., Qin C., Kamiya T., Krishna M. C., Cheng Q., Tumminia S., Russell P., 2003. *Tempol-H inhibits opacification of lenses in organ culture.* Free Radic Biol Med 35, 1194-1202.

http://rcin.org.pl