

TRATAMENTUL CU FACTORI NEUROTROFICI ÎN NEUROPATIA GLAUCOMATOASĂ – REZULTATE EXPERIMENTALE

D. Mureșanu¹, Anca Rădulescu², Mariana Mărginean³

¹Clinica de Neurologie Cluj-Napoca, ²Spitalul Clinic de Urgențe Oftalmologice București,

³Catedra de Histologie, UMF Cluj-Napoca

Glaucomul, una dintre cauzele majore ale orbirii în lume, este caracterizat prin neuropatie optică cu pierderea de celule ganglionare retiniene (RGCs), excavarea discului optic și atrofia inelului neural, manifestată prin diminuarea câmpului vizual cu un pattern specific. Deoarece presiunea intraoculară crescută este un factor de risc major pentru neuropatia optică, tratamentul farmacologic sau chirurgical urmărește scăderea acesteia. Neacordarea de suficientă importanță disfuncției nervului optic și a celulelor ganglionare retiniene duce la pierderea vederii. Mecanismul prin care se produce moartea celulelor ganglionare retiniene este incomplet elucidat, studiile recente indicând însă tot mai mult implicarea apoptozei, moarte celulară programată.

FACTORII NEUROTROFICI IMPLICAȚI ÎN TROFICITATEA NERVULUI OPTIC

Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF) poate susține supraviețuirea celulelor ganglionare retiniene *in vivo* și *in vitro*. BDNF este exprimat de o subpopulație de celule din stratul celulelor ganglionare. Gao și col. (1997) au examinat exprimarea BDNF în retină după zdrobirea nervului optic intraorbital la șobolani.

S-a constatat o creștere a nivelului exprimării BDNF cu 54% și o creștere de 5-6 ori mai mare a celulelor BDNF pozitive. Intensificarea exprimării BDNF a fost maximă după 48 de ore și a revenit la nivelul bazal după două săptămâni de la lezarea nervului optic. În concluzie, celulele ganglionare intensifică exprimarea genei BDNF în răspuns cu lezarea axonilor. BDNF poate contribui la procesul neuroprotector natural după traumatisme ale nervului optic.

În retină, BDNF și NT-3 promovează supraviețuirea celulelor ganglionare diferențiate. NT-3 susține supraviețuirea celulelor amacrine și facilitează diferențierea neuronilor retinieni în cultură. Das și col.

(1997) au examinat imunohistochimic exprimarea proteinelor BDNF și NT-3 precum și a receptorilor acestora Trk-B, Trk-C și P75 în retina de pui de găină în curs de dezvoltare. În ziua embrionară 8 (E8) toate aceste proteine au prezentat o exprimare difuză pe toată grosimea retinei. Suprapunerea exprimării neurotrofinelor cu cea a receptorilor demonstrează localizarea lor împreună, de unde concluzia că, în cursul dezvoltării embrionare, neurotrofinele acționează local (nu sunt transportate retrograd).

Ma și col. (1998) au injectat BDNF în unul dintre coliculi superiori la hamsterii neonatali la vârsta la care rata morții naturale a celulelor ganglionare retiniene era cea mai mare. BDNF produce la 20 de ore după injectare o reducere de 13 la 15 ori a ratei morții celulelor ganglionare retiniene în comparație cu hamsterii injectați numai cu vehicul (martori). În acest caz, BDNF este transportat retrograd de la coliculi superiori.

BDNF secretat de fibroblaste transgenice promovează creșterea celulelor din retina embrionară când este transplantată în cortexul cerebral. Pe acest model și pe culturi de explante retiniene *in vitro*, Atkinson și col. (1999) au examinat rolurile NT-3, NT-4 și BDNF asupra creșterii neuronilor retinieni. S-a constatat că BDNF promovează creșterea retinei *in vitro* numai în prezența glicei în curs de proliferare.

Dryfus și col (1997), în experimente pe culturi de celule retiniene gliale Muller, au constatat că o singură adăugare la mediul de cultură de 500 picomoli de bFGF sau EGF determină, după 48 ore, o creștere semnificativă a concentrației de gangliozide (30-40%). Incubarea culturilor de celule gliale Muller cu ³H. – glucozamină în prezența bFGF sau EGF a determinat o creștere a cantității de gangliozide de două ori.

Celulele dopaminergice din retină exprimă receptori pentru BDNF. Celerino și col. (1998), în experiențe pe șoareci, au efectuat injecții intraoculare de BDNF în cursul celei de a doua și a treia săptămâni

postnatale și au vizualizat sistemul dopaminergic imuno-histochimic (tirozin hidroxilaza) (TH).

Tratamentul a determinat o creștere a imuno-reactivității în stratul plexiform intern. BDNF a determinat o înmugurire a fibrelor dopaminergice din stratul plexiform intern. În concluzie, BDNF controlează densitatea inervației dopaminergice din retină.

În ochiul vertebratelor, epiteliul pigmentar retinian și retina nervoasă iau naștere dintr-un singur strat de celule ale neuroectodermului. BDNF are rol autocrin în diferențierea și supraviețuirea epiteliului pigmentar retinian la broasca *Xenopus laevis*.

Celulele epiteliului pigmentar în curs de diferențiere exprimă pe aceleași celule și BDNF și receptori Trk-B pentru BDNF.

La mutații dominați negativi pentru Trk-B, diferențierea celulelor pigmentare retiniene este sever împiedicată (Lin și col. 1997).

Di Polo și col. (1998) au efectuat următoarele constatări:

1. Injectarea unui vector adenoviral care conținea gena BDNF (Ad. BDNF) în corpul vitros la șobolani adulți a determinat o exprimare transgenică de BDNF către celulele Muller.
2. În culturi, celulele Muller infectate cu Ad. BDNF secretă BDNF care susține supraviețuirea neuronilor.
3. Injectarea de Af. BDNF *in vitro*, și deci exprimarea BDNF de către celulele Muller infectate, prelungeste supraviețuirea celulelor ganglionare retiniene axotomizate. La 16 zile după axotomie, retinele tratate cu Ad. BDNF prezintă o creștere a supraviețuirii de 4,5 ori mai mare a celulelor ganglionare în comparație cu retinele martor.
4. Exprimarea transgenică a BDNF durează aproximativ 10 zile și poate fi prelungită cu imunosupresoare până la cel puțin 30 zile.

Autorii au opinat că metoda are perspectivă în terapeutică. Având în vedere că, în retină, cel mai activ factor neurotrofic este BDNF considerăm că indicați pentru un studiu al maladiilor ischemice ale retinei ar fi factorii care stimulează secreția de BDNF.

La fel de indicat este Cerebrolysin, ale cărei polipeptide conțin centrii activi ai multor factori neurotrofici inclusiv BDNF. Restul substanțelor de mai sus stimulează secreția sau mimează acțiunea NGF.

Extrem de promițătoare pare tehnica injectării în corpul vitros a vectorului adenoviral ce conține gene BDNF.

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) are un efect protector împotriva excitotoxinei induse de afectarea sistemul nervos central, nivelurilor crescute de calciu intracelular și stresului oxidativ. BDNF poate să salveze celulele ganglionare retiniene după

axotomie sau în culturile de celule. Receptorii TrkB pentru BDNF mRNA au fost identificați în celulele ganglionare retiniene și la nivelul stratului nuclear.

Presiunea intraoculară crescută produsă prin cauterizarea a 2-3 vene episclerale duce la moartea celulelor ganglionare retiniene la modelul șobolan și pare să mimeze câteva dintre semnele galucomului cu unghi deschis.

Mei-Lan Ko și colaboratorii [Neurosciences Letters 305 (2001) 139-142] au investigat efectul BDNF pe celule ganglionare retiniene expuse la presiuni intraoculare crescute pe durate variabile de timp.

La acest studiu s-au folosit femele de șobolan Wistar cu greutatea de 225-250 g. Marcarea celulelor ganglionare retiniene s-a realizat prin injectarea de soluție de fluorogold 5% la nivelul colicuilor cvadrigemeni superiori. La 3 zile după injectarea intratectală, s-a efectuat cauterizarea a trei vene episclerale, urmată de administrarea de BDNF intravitreal. Cauterizarea venelor episclerale a dus la o creștere a presiunii intraoculare de 22-31 mmHg față de valorile normale de 12-16 mmHg. Animalele au fost împărțite în 3 grupuri BDNF și în 3 grupuri de control. S-au administrat doze diferite de BDNF pentru fiecare grup (primul a primit o injecție cu 0.1 μg BDNF, al doilea – două injecții și al treilea- trei injecții) (figura 1).

Aceste rezultate demonstrează că moartea celulelor ganglionare retiniene (RGC) la ochiul hipertensiv se face cu o rată de 4,3% pe săptămână la grupul de control și cu 2,6% pe săptămână la grupul BDNF.

Celulele ganglionare retiniene de la periferia retinei sunt mai vulnerabile la creșterea presiunii oculare decât cele centrale sau de la mijloc. BDNF reduce moartea RGC în întreaga retină. Câteodată, efectul protector al BDNF asupra RGC nu crește semnificativ prin repetarea injecțiilor intravitreene.

Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) este o proteină citosolică exprimată postnatal în celulele Schwann și astrocite care promovează supraviețuirea anumitor clase de neuroni în sistemul nervos periferic. *In vitro* s-a dovedit că CNTF-ul asigură

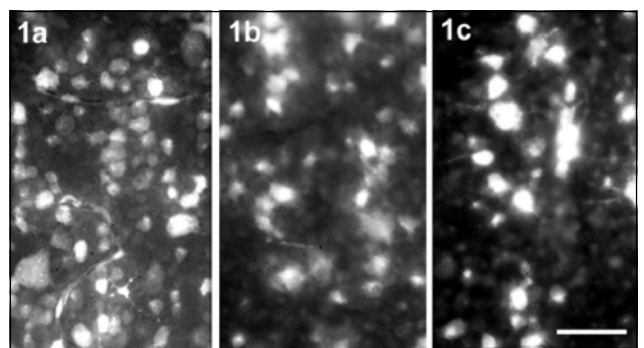


Figura 1

supraviețuirea neuronilor periferici senzoriali și a ganglionilor simpatici în diferite stadii de dezvoltare precum și diferențierea celulelor gliale în astrocite de tip 2. CNTF previne degenerarea retrogradă a neuronilor motori axotomizați în nucleul facial la șobolanii nou-născuți.

Spre deosebire de NGF (nerve growth factor), nu s-a demonstrat că CNTF ar fi transportat retrograd.

Jian-Zhong Ji și colaboratorii (2001) au examinat efectul neuroprotector al CNTF asupra celulelor ganglionare retiniene pe un model de șobolani cu glaucom, urmărind activarea Janus-kinazei (transductor de semnal și activator al căii de transcripție) mediate de CNTF.

Creșterea presiunii intraoculare a fost indusă prin fotocoagularea laser a venelor episclerale și limbice.

A fost investigat efectul neuroprotectiv al CNTF asupra RGC pe un model de glaucom experimental indus cu laser. S-a demonstrat că o singură administrare de CNTF poate extinde supraviețuirea RGC până la 4 săptămâni în retina expusă la valori ridicate ale presiunii intraoculare. S-au studiat căile de semnalizare legate de această neuroprotecție și s-a stabilit că STAT3 poate fi activat tranzitor după inducerea glaucomului în intervalul 6 ore o zi. Câteodată, administrarea de CNTF poate extinde activarea STAT3 până la 2 săptămâni după creșterea presiunii intraoculare.

Glaucomul este a doua cauză principală de orbire în lume, după cataractă (Quigley și Pease, 1996). El este caracterizat prin valori ridicate ale presiunii intraoculare, moartea celulelor ganglionare retiniene și diminuarea câmpului vizual cu progresie lentă.

Până în momentul de față, patofiziologia și tratamentul efectiv al glaucomului erau încă în investigație. Studii recente pe pacienți sau pe modele experimentale de glaucom indus la maimuță și șobolan au sugerat că la pierderile de RGC contribuie și apoptoza. (Garcia-Valenzuela et al, 1995; Quigley et al, 1995; Kerrigan et al, 1997). S-a sugerat că dereglarea vasculară este unul dintre factorii de risc majori pentru glaucom (Flammer, 1994). Mai mult, s-a demonstrat ca toxicitatea glutamatului este parțial responsabilă de moartea RGC (Dryer 1998).

Deprivarea de factori trofici în urma unei compresiuni pe nervul optic are un rol în moartea RGC (Minckler & Bunt, 1977). Pe șobolan s-a observat că la presiuni intraoculare crescute are loc blocarea transportului retrograd pentru BDNF și blocarea receptorului Trk B (Quigley & Addicks, 1980). Jian-Zhong Ji și col, 2001, susțin că injecțiile intravitreene cu BDNF pot preveni parțial moartea RGC la șobolanul cu glaucom.

Principiile de bază în terapia neuropatiei optice sunt îmbunătățirea aportului sanguin și a metabolis-

mului retinei și al nervului optic, ca și stimularea activității fibrelor nervoase care mai prezintă condiții parabiote normale.

În acest scop, pe lângă preparatele ce influențează fluxul din microcirculație și proprietățile reologice ale sângelui, se folosesc și preparate cu efecte neurotrofice, dintre care în ultimii ani, cel mai folosit este Cerebrolysinul (amestec de fragmente active de factori neurotrofici).

Cerebrolysinul are efecte neurotrofice majore pe țesutul nervos, cum ar fi influențarea excitației electrice a membranei pre și postsinaptice, stimularea multiplicării numărului de mitocondrii și a structurilor lizozomale în celulele nervoase, creșterea celulelor nervoase și gliale, mărirea numărului de sinapse și a rezistenței celulelor nervoase la hipoxie, proprietăți antineurotoxice, reducerea acidozei lactice și a formării de radicali liberi, îmbunătățirea permeabilității glucozei la nivelul barierei hematoencefalice, a metabolismului aminoacizilor și prelungirea efectelor altor medicamente pe celulele nervoase.

Gusjewa și col. au studiat efectele Cerebrolysinului în terapia neuropatiei optice de diferite etiologii.

Cerebrolysinul a fost administrat intramuscular sau local – prin injecții retrobulbare (de 0,5 ml și 2 ml), sau printr-un sistem silionic de irigare în spațiul peribulbar.

Avantajul utilizării sistemului de irigare ca metodă aplicată este posibilitatea unei administrări mai frecvente și nedureroase a Cerebrolysinului la nivelul nervului optic și, mai mult, a obținerii unei concentrații mai mari și egal distribuite a substanței active folosind doze minime. Toleranța bună și lipsa complicațiilor în tratamentul local permite administrarea Cerebrolysinului prin sistem de irigare, de 5-6 ori pe zi și prin injecții retrobulbare zilnice.

Rezultatele acestor investigații arată ca aplicarea locală de Cerebrolysin este o metodă eficientă de tratament al neuropatiei optice de diverse etiologii. Cele mai semnificative rezultate au fost obținute prin administrarea Cerebrolysinului prin sistem de irigare ducând la o rată de succes de aproape 10%. Un efect pozitiv a fost găsit și la 50% dintre ochii tratați prin injecții retrobulbare.

Îmbunătățirea acuității vizuale a fost observată la majoritatea pacienților începând cu ziua a cincea de tratament. Simultan cu îmbunătățirea acuității vizuale s-a observat și o lărgire a periferiei câmpului vizual cu 10-15% precum și îmbunătățirea rezultatelor de la metoda vizuală de contrast și a susceptibilității la stimuli.

Urmărirea grupului de studiu pe o perioadă de un an a demonstrat stabilizarea acuității vizuale la majoritatea pacienților.

CONCLUZII

Acumularea datelor experimentale din ultimul deceniu privind factorii neurotrofici și apoptoza a dus la creșterea speranței privind dezvoltarea unor tehnologii revoluționare cu înalt potențial terapeutic.

Neuropatia glaucomatoasă în esență de etiologie ischemică se pare că va fi una dintre beneficiarele unor asemenea progrese. Ultimii trei ani au dus la validarea clinică a acestui remediu, fapt ce a produs optimism în mediile de cercetare. Studiile prezentate de noi aduc evidențe ce justifică preocupările viitoare.

BIBLIOGRAFIE

1. **Castren E, Zafra F, Thoenen H, Lindholm D** – Light regulates expressions of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 89 (1992), 9444-9448.
2. **Cellerino A, Kohler K** – Brain derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebral retina. *J Comp Neurol*, 386 (1997), 149-160.
3. **Climent E, Sancho-Tello M, Minana R, Baretino D, Guerri C** – Astrocytes in culture express the full-length TrkB receptor and respond to brain derived neurotrophic factor by changing intracellular calcium levels: effect of ethanol exposure in rats. *Neurosci Lett*, 288 (2000), 53-56.
4. **Cui Q, Harvey AR** – At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J Neurosci*, 15 (1995), 8143-8155.
5. **Dreyer EB, Zurakowsk D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA** – Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 114 (1996), 299-305.
6. **Duan W, Guo Z, Mattson MP** – Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *J Neurochem*, 76 (2001), 619-626.
7. **Frank L, Ventimiglia R, Anderson K, Lindsay RM, Rudge JS** – BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, trkB protein and trkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 8 (1996), 1220-1230.
8. **Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC** – Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res*, 61 (1995), 33-44.
9. **Isenmann S, Klocker N, Gravel C, Bahr M** – Protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF in vivo. *Eur J Neurosci*, 10 (1998), 2751-2756.
10. **Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H** – Brain derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 6 (1986), 3031-3038.
11. **Klocker N, Cellerino A, Bahr M** – Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of Brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. *J Neurosci*, 18 (1998), 1038-1046.
12. **Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC** – The combined effect of brain derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (2000), 2967-2971.
13. **Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW** – Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science*, 268 (1995), 573-575.
14. **Laquis P, Chaudhary P, Sharma SC** – The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res*, 784 (1998), 100-104.
15. **Mittag TW, Danias J, Poborenc G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos S, Tatton W** – Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (2000), 3451-3459.
16. **Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS** – Retrograde axon transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (2000), 3460-3466.
17. **Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ** – Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (2000), 764-774.
18. **Sawasa A, Neufeld AH** – Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*, 69 (1999), 525-531.
19. **Unoki K, La-Vail MM** – Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol, Vis Sci*, 35 (1994), 907-917.