

Pom J Life Sci 2015, 61, 1, 81–89

Powolna degeneracja siatkówki oka w modelu mysim – aspekty morfologiczne i funkcjonalne*

Slow retinal degeneration in a mouse model: morphological and functional aspects

Andrzej Sobieniecki¹, Anna Machalińska², Dorota Rogińska¹, Irena Baranowska-Bosiacka³, Barbara Wiszniewska², Bogusław Machaliński¹

¹Katedra i Zakład Patologii Ogólnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Bogusław Machaliński*

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin Kierownik: prof. dr hab. n. med. Barbara Wiszniewska

³Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin Kierownik: prof. dr hab. n. med. Dariusz Chlubek

SUMMARY

Introduction: Diseases causing sensory impairments are a major clinical and sociological problem, especially those that cause loss of vision, which can significantly decrease the quality of a patient's life. It is therefore necessary to comprehend the mechanisms of the disease and find a treatment which can eliminate its cause. To achieve it, researchers use genetically modified animals for examination, as models of human diseases.

Material and methods: In this paper, two animal models of slow retinal degeneration are compared to assess changes in their retinas – mice, homozygous for the *PRPH2* gene, and heterozygotes which were obtained by crossing with BALB/c. The degeneration rate was determined by measuring the thickness of particular retinal layers at specific time points. The Flat Mount technique was used to evaluate pigment epithelium deterioration, while electroretinography was used monthly to estimate electrophysiological changes of the retinal photoreceptors in dark and light adaptation.

Results: It was found that the most severe and rapid deterioration was present in homozygotes. It caused a total loss of photoreceptor outer and inner segments, outer nuclear layer and outer plexiform layer. ERG revealed absolute suppression of retinal electrophysiology from the 1st month. Heterozygous mice were less impaired and degeneration progressed more gradually. None of the layers were completely destroyed. Electroretinography revealed progressive loss of retinal activity for the duration of the experiment.

In the group of mice manifesting homozygous mutation in the *PRPH2* gene, the RPE65 protein expression was abnormal. The cells of these mice were characterized by a lack of cytoplasm continuity and the presence of numerous vacuoles, which may indicate degenerative changes in the pigment epithelium. There were no significant differences in RPE65 protein expression between the control and heterozygous individuals. This may indicate correct cell morphology.

Conclusions: Each of the tested mouse models of retinal degeneration may find its application in the study of this disease. The differences between them allow the selection of the optimal model for a particular experiment.

Key words: slow retinal degeneration, retinitis pigmentosa, atrophy of the retinal pigment epithelium.

STRESZCZENIE

Wstęp: Choroby narządów zmysłów są poważnym problemem badawczym oraz społecznym. Schorzenia wywołujące ślepotę stanowią znaczny odsetek wśród tych, które zdecydowanie obniżają jakość życia pacjenta, dlatego należy próbować zrozumieć mechanizmy będące źródłem problemu, a następnie znaleźć metodę leczenia, która go wyeliminuje. Wykorzystuje się do tego celu zwierzęta, u których występuje określona mutacja genetyczna będąca przyczyną choroby.

W niniejszej pracy oceniono doświadczalnie model powolnej degeneracji siatkówki.

Materiał i metody: Do badań wykorzystano homozygotyczne myszy pod względem mutacji w genie *PRPH2* oraz osobniki

* Praca sfinansowana w ramach grantu 2012/07/B/NZ5/02498.

heterozygotyczne uzyskane poprzez skrzyżowanie homozygot z myszami BALB/c. Określono postęp zmian degeneracyjnych w czasie za pomocą pomiarów grubości poszczególnych warstw siatkówki w kolejnych punktach czasowych. Do oceny nabłonka barwnikowego użyto barwienia immunofluorescencyjnego preparatów Flat Mount z wykorzystaniem przeciwciała anty-RPE65. Funkcję bioelektryczną siatkówki oszacowano za pomocą elektroretinografii zarówno w adaptacji nocnej, jak i dziennej w comiesięcznych badaniach.

Wnioski: Analizując uzyskane dane, zauważono, że zmiany zwyrodnieniowe u homozygot wywołały całkowitą atrofię zewnętrznych oraz wewnętrznych odcinków komórek receptorowych, warstwy jądrzastej zewnętrznej, a także splotowatej zewnętrznej. Badanie ERG wykazało całkowite wygaszenie aktywności siatkówki już od 1. miesiąca życia. W przypadku heterozygot kinetyka zmian była znacznie wolniejsza. W przeciwieństwie do homozygot nie zaobserwowano całkowitej atrofii żadnej warstwy siatkówki. Elektroretinografia wykazała stopniowy zanik funkcji bioelektrycznej siatkówki do 15. miesiąca życia. **Słowa kluczowe**: powolna degeneracja siatkówki – zwyrodnienie barwnikowe siatkówki – atrofia nabłonka barwnikowego.

WSTĘP

Wzrok jest kluczowym zmysłem człowieka. Zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (*retinitis pigmentosa* – RP) jest chorobą dotykającą 2 mln ludzi na świecie i często prowadzącą do ślepoty. Badacze od lat usiłują poznać geny odpowiedzialne za jej rozwój oraz przede wszystkim opracować skuteczną metodę leczenia.

Obecnie stosuje się różne metody umożliwiające spowolnienie postępów choroby, jednak ich skuteczność nie jest potwierdzona. Dlatego wciąż szuka się nowych strategii wpływających na powstrzymanie degeneracji siatkówki i poprawienie jakości życia pacjentów. Heterogeniczność RP sprawia, że nie istnieje jedna bezpieczna i zatwierdzona terapia umożliwiająca całkowite wyleczenie. Poszukiwanie nowych leków i terapii wymaga więc zastosowania w badaniach odpowiednich modeli doświadczalnych odzwierciedlających jak najdokładniej ludzkie zmiany degeneracyjne. Różnice między szczepami zwierząt doświadczalnych obejmują stopień progresji objawów, mechanizm powstawania uszkodzeń, a także różnice w obrazie histologicznym. Wynika to z faktu, iż występują w nich mutacje różnych genów odpowiedzialnych za rozwój zmian degeneracyjnych siatkówki.

Celem niniejszej pracy było oszacowanie przydatności mysich modeli degeneracji siatkówki w badaniach nad RP. W niniejszej pracy porównano homozygotyczne i heterozygotyczne myszy, u których występuje mutacja w genie *PRPH2*. Odpowiedzialny jest on za kodowanie białka obecnego w fotoreceptorach siatkówki – peryferyny. Porównanie objęło zarówno ocenę morfologiczną kinetyki zmian degeneracyjnych, analizę funkcji bioelektrycznej siatkówki, jak i ocenę stopnia atrofii oraz zmian nabłonka barwnikowego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły myszy ze szczepu O20/A-Prph2<Rd2>/J sprowadzone z The Jackson Laboratory (USA). Osobniki z tego szczepu manifestują mutację insercyjną w exonie 2 genu *PRPH2*. Badania przeprowadzono zarówno w modelu homo-, jak i heterozygotycznym. Heterozygoty uzyskano, krzyżując homozygoty z myszami szczepu BALB/c. Grupę kontrolną stanowiły myszy BALB/c (Instytut Medycyny Pracy w Łodzi). Myszy przechowywano w standardowych warunkach laboratoryjnych z 12-godzinnym cyklem światło/mrok, w temperaturze 21°C. Wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez lokalną komisję bioetyczną.

Elektroretinografia

Myszy zostały podzielone na grupy kontrolną i doświadczalną. Brak standardów dotyczących badania ERG u myszy, a także podobieństwo siatkówki ludzkiej i mysiej pod względem stosunku czopków do pręcików były przyczyną zastosowania metodyki ERG używanej rutynowo podczas badań u ludzi. Badanie ERG prowadzono w comiesięcznych odstępach czasowych, począwszy od 1. do 12. miesiąca, a następnie w 15. miesiącu, zarówno w warunkach adaptacji nocnej, jak i dziennej. Wykorzystywano system UTAS-E 2000 (LKC Technologies, Gaithersburg, USA) z zastosowaniem stymulacji całopolowej (Ganzfeld).

Badanie poprzedzało podanie znieczulenia dootrzewnowo w dawkach – ketamina 87 mg/kg i ksylazyna 13 mg/kg. Stosowano również 4-godzinną adaptację do ciemności i rozszerzenie źrenic 1% roztworem atropiny. Biorąc pod uwagę, iż zapis ERG jest ściśle skorelowany z temperaturą ciała zwierzęcia, utrzymywano ją za pomocą maty grzewczej. Zapis ERG uzyskiwano, stosując następujący układ odprowadzeń: a) elektroda czynna (rogówkowa) – soczewka kontaktowa zawierająca złoty pierścień (LKC, USA), b) elektroda bierna – elektroda igłowa wkłuwana podskórnie w okolicy czoła (LKC, USA), c) elektroda uziemiająca – umieszczana podskórnie w okolicy ogona elektroda igłowa (LKC, USA). Odpowiedź pręcikową uzyskiwano poprzez stymulację siatkówki tłumionym błyskiem białego światła (filtr neutralny 24 dB) w warunkach adaptacji nocnej. Dokonano 8 zapisów w odstępie 8 s, które następnie uśredniano.

Odpowiedź mieszaną, pręcikowo-czopkową wywoływano białym standardowym błyskiem światła w adaptacji do ciemności. Uśredniano 2 zapisy w 28-sekundowym odstępie. Potencjały oscylacyjne otrzymywano w adaptacji nocnej, wywoływane błyskiem standardowym. Czopkowa odpowiedź uzyskiwana była po 10-minutowej adaptacji dziennej, za pomocą pojedynczego standardowego białego błysku. Uśredniano 8 zapisów w odstępie 1 s. We wszystkich etapach używano filtra pasmowo-zaporowego do redukcji zakłóceń sieciowych. Wartość progowa odrzucania artefaktów ustawiona została na 500 µV, a zastosowane pasmo przenoszenia wynosiło 0,05–1500 Hz.

Badania histologiczne

Gałki oczne pobierano w miesięcznych odstępach, oczyszczano z pozostałości tkanek, a następnie utrwalano przez 24 godz. w płynie Davidsona. Następnie gałki oczne kilkukrotnie przepłukiwano wodą destylowaną oraz przeprowadzano przez szereg alkoholi o rosnącym stężeniu (50%, 70%, 96%) oraz szereg składający się z roztworu alkoholu absolutnego i ksylenu w stosunku 1:1, alkoholu absolutnego oraz ksylenu. Po zatopieniu preparaty krojono za pomocą mikrotomu na skrawki o grubości 3 μm i umieszczano je na pokrytych poly-L-lizyną szkiełkach podstawowych.

Preparaty na szkiełkach podstawowych odparafinowywano i przepłukiwano wodą destylowaną. Następnie przeprowadzano procedurę barwienia hematoksyliną i eozyną. Zdjęcia siatkówki wykonano pod mikroskopem Axiovert 40 CFL za pomocą podłączonej kamery AxioCam Erc 5s (Zeiss). Pomiary grubości siatkówki oraz fotoreceptorów dokonano w odległości do 230 µm od brzegu nerwu wzrokowego, po obu jego stronach za pomocą oprogramowania AxioVision.

Preparaty Flat Mount

Gałki oczne pobrano i utrwalono przez 24 godz. w 4% roztworze zbuforowanej formaliny. Ciało szkliste i siatkówkę neurosensoryczną usuwano, odsłaniając nabłonek barwnikowy. Wykonano szereg promienistych nacięć w kierunku nerwu wzrokowego, aby uniknąć fałdowania tkanki. Tak przygotowane preparaty nakładano na szkiełka podstawowe.

Na szkiełka nakrapiano 1% Triton X-100 w celu permeabilizacji błon komórkowych. Preparaty inkubowano 24 godz. w komorze wilgotnej w temperaturze 4°C. Po przepłukaniu PBS na preparaty nanoszono 5% roztwór surowicy blokującej. Nadmiar roztworu usuwano po 1 godz. w komorze wilgotnej. Po naniesieniu roztworu przeciwciała pierwszorzędowego anty-RPE65 w PBS w stosunku 1:50, preparaty inkubowano przez noc w komorze wilgotnej w temperaturze 4°C. Następnie przepłukiwano preparaty w PBS i nanoszono roztwór przeciwciała drugorzędowego w PBS w stosunku 1:50. Preparaty inkubowano 1 godz. w ciemności w temperaturze pokojowej. Po kolejnym przepłukaniu w PBS na preparaty nanoszono 20 µL DAPI w celu wybarwienia jąder komórkowych i inkubowano w ciemności przez 30 min. Po przepłukaniu w PBS preparaty zamykano szkiełkami nakrywkowymi po dodaniu Dako Fluorescent Mounting Medium. Preparaty wizualizowano, używając laserowego skanującego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 700.

WYNIKI

Analiza morfometryczna

Analizę morfometryczną poszczególnych warstw siatkówki dokonano w odległości ok. 230 µm od nerwu wzrokowego. W czasie 15 miesięcy grubość siatkówki heterozygot pod względem genu *PRPH2* zmalała średnio o 43,98 µm. Minimalna średnia wartość zmierzona w ostatnim miesiącu pomiarów wynosiła 103,49 µm, co stanowiło 70,2% wyjściowej grubości siatkówki. W grupie kontrolnej średnia grubość siatkówki osiągnęła wartość 184,57 µm (ryc. 1).

U myszy homozygotycznych analiza wykazała gwałtowny spadek grubości siatkówki widoczny już od 1. miesiąca. Pomiędzy 9. a 13. miesiącem grubość siatkówki utrzymywała się na podobnym poziomie, osiągając minimalną wartość (60,45 µm) po roku od narodzin. Stanowiło to 43% wartości wyjściowej oraz 33% grubości siatkówki obserwowanej u myszy BALB/c (ryc. 1). Szczegółowa ocena kinetyki uszkodzenia wymagała uzupełnienia analizy o pomiary poszczególnych warstw siatkówki.

Analiza zmian grubości włókien nerwu II, warstwy komórek zwojowych oraz IPL wykazała, że zmiany degeneracyjne w modelu heterozygot nie obejmują warstw wewnętrznych siatkówki. Średnia wartość dokonanych pomiarów utrzymywała się na podobnym poziomie w trakcie całego okresu obserwacji (ryc. 2).

Homozygoty wykazywały spadek grubości wewnętrznych warstw siatkówki. W pierwszym miesiącu pomiarów grubość tych warstw była mniejsza o 10,83 µm w porównaniu do grupy kontrolnej, a różnica pomiędzy wartością początkową a końcową wynosiła 17,15 µm. Stanowi to 37% pierwotnej grubości siatkówki (ryc. 2).

W ciągu 15 miesięcy wystąpiła niewielka redukcja średniej grubości INL u heterozygot – średnio o 13,2% pierwotnej wartości (4,38 μ m). Średnia grubość INL w 15. miesiącu wynosiła 28,88 μ m, co stanowi 67,6% wartości zmierzonej u myszy BALB/c (ryc. 3).

Degradacja INL u homozygot następowała stopniowo, aż do 9. miesiąca życia do wartości ok. 22 μ m, po czym stabilizowała się. W 13. miesiącu INL stanowiła 54% początkowej grubości. Średnia grubość tej warstwy w 12. miesiącu była o 7,92 μ m mniejsza niż ta zmierzona u heterozygot z tego samego przedziału czasowego (ryc. 3).

W przypadku warstwy OPL w grupie heterozygotycznej degeneracja była bardziej widoczna. Do 15. miesiąca grubość warstwy zmniejszyła się o ponad połowę – do 4,32 µm z 8,9 µm. W 2. miesiącu życia osobników średnia wartość zmierzona w grupie eksperymentalnej była porównywalna do grupy kontrolnej (ryc. 4).

W grupie homozygotycznej OPL wykazywała stosunkowo gwałtowną degenerację, aż do całkowitego zaniku w 9. miesiącu. Była to znacząca różnica w odniesieniu do heterozygot, gdzie OPL osiągała najniższą wartość w 15. miesiącu, a redukcja grubości wynosiła ok. 56% (ryc. 4).

Grubość warstwy ONL w 15. miesiącu życia heterozygot wynosiła 49,9% swojej pierwotnej wartości. Proces degeneracji warstwy jądrzastej zewnętrznej przebiegał najszybciej pomiędzy 5. a 15. miesiącem życia. Dynamika zmian w ONL u homozygot byłą porównywalna do OPL. Całkowita degeneracja ONL nastąpiła w 9. miesiącu życia (ryc. 5).

Pomiar grubości zewnętrznych odcinków komórek receptorowych oraz nabłonka barwnikowego heterozygot wykazał stopniową redukcję. Proces przebiegał najszybciej od 4. do 12. miesiąca. Najniższa średnia wartość została zmierzona w ostatnim miesiącu pomiarów i wynosiła 56% wartości początkowej. Zewnętrzne odcinki komórek receptorowych oraz nabłonek barwnikowy u homozygot również ulegały stopniowemu zanikowi do 9. miesiąca życia. Następnie występowały jedynie w stanie szczątkowym (ryc. 6).

Na rycinach 7 i 8 przedstawiono reprezentatywne zdjęcia preparatów histologicznych siatkówki heterozygotycznych i homozygotycznych myszy względem genu *PRPH2* wybarwione hematoksyliną oraz eozyną w zestawieniu z grupą kontrolną (2-miesięczne BALB/c).







RYCINA 2. Kinetyka zmian grubości włókien nerwu II, GC oraz IPL w zależności od wieku



RYCINA 3. Kinetyka zmian grubości warstwy INL w zależności od wieku

Analiza zmian RPE w oparciu o preparaty Flat Mount

Preparaty Flat Mount wykonano z nabłonka barwnikowego siatkówki heterozygot w wieku 7, 8, 9 oraz 12 miesięcy oraz 12-miesięcznych homozygot. Grupę kontrolną stanowiły myszy BALB/c w wieku 12 miesięcy (ryc. 9). Zestawienie porównujące odsetek jedno-, dwu- i wielojądrzastych komórek, a także średni pomiar pola powierzchni komórek przedstawiono w tabeli 1. Wewnątrzkomórkowej oceny ekspresji białka RPE65 dokonano po barwieniu immunofluorescencyjnym preparatów.



RYCINA 4. Kinetyka zmian grubości warstwy OPL w zależności od wieku



RYCINA 5. Kinetyka zmian grubości warstwy ONL w zależności od wieku



RYCINA 6. Kinetyka zmian grubości warstwy OS i RPE w zależności od wieku

Jednojądrzaste komórki dominowały w grupie heterozygotycznych myszy manifestujących mutację w genie *PRPH2*. Dla porównania w grupie kontrolnej (myszy BALB/c) główną populację komórek RPE stanowiły komórki dwujądrzaste. W grupie kontrolnej stwierdzono również obecność komórek zawierających więcej niż 2 jądra komórkowe, które stanowiły nie więcej niż 3% ogólnej populacji. W przypadku heterozygot średnie pole powierzchni komórek RPE było istotnie mniejsze niż w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji białka RPE65 pomiędzy grupą kontrolną a osobnikami heterozygotycznymi. Może to świadczyć o prawidłowej morfologii komórek (ryc. 9).



RYCINA 7. Zdjęcia preparatów histologicznych siatkówki: A – kontrola, B, C, D, E, F, G – heterozygoty kolejno w wieku 2, 3, 4, 5, 12, 15 miesięcy



RYCINA 8. Zdjęcia preparatów histologicznych siatkówki: A - kontrola, B, C, D, E, F, G - homozygoty kolejno w wieku 1, 3, 6, 9, 11, 12 miesięcy



RYCINA 9. Preparaty Flat Mount nabłonka barwnikowego. A, B – BALB/c w wieku 12 miesięcy; C, D – homozygoty w wieku 12 miesięcy; E, F, G, H – heterozygoty kolejno w wieku 7, 8, 9, 12 miesięcy (kolor zielony – białko RPE65; kolor niebieski – DAPI)

TABELA 1. Pomiar parametrów morfologicznych komórek RPE na preparatach Flat Mount myszy heterozygotycznych i homozygotycznych pod względem genu PRPH2

Parametry	BALB/c 12. miesiąc	Heterozygoty 12. miesiąc	р	Homozygoty 12. miesiąc	р
Średnie pole powierzchni komórek (µm×µm)	498,15 ±216,30	347,75 ±134,5	0,004	400,62 ±115,17	0,3
Odsetek komórek jednojądrzastych	25% ±3%	55% ±17%	0,02	27% ±1%	0,5
Odsetek komórek dwujądrzastych	73% ±1%	45% ±17%	0,02	73% ±1%	0,8
Odsetek komórek wielojądrzastych	2% ±2%	0%	0,05	0%	0,05

Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w odsetku komórek jedno- i dwujądrzastych pomiędzy grupą kontrolną a homozygotami. Podobnie średnie pole powierzchni komórek RPE nie różniło się istotnie pomiędzy homozygotami a grupą kontrolną. W grupie myszy manifestujących homozygotyczną mutację w genie *PRPH2* zaobserwowano zaburzenia ekspresji białka RPE65. Komórki tych osobników charakteryzuje brak ciągłości cytoplazmy oraz obecność licznych wakuoli, co może świadczyć o degeneracyjnych zmianach nabłonka barwnikowego (ryc. 9).

Ocena funkcji bioelektrycznej siatkówki myszy heterozygotycznych i homozygotycznych (gen **PRPH2**)

Badanie elektroretinograficzne prowadzono w miesięcznych odstępach czasowych. Umożliwiło to oszacowanie stopnia progresji zmian degeneracyjnych. Uzyskane dane przedstawiono na wykresach zależności wysokości amplitudy fali b od wieku myszy (ryc. 10).

Na rycinie 10 porównano średnie zmian amplitudy fali b heterozygot i myszy BALB/c. W 1. miesiącu wartość wynosiła odpowiednio 374,96 μ V dla myszy z mutacją w genie *PRPH2*, natomiast dla grupy kontrolnej 418,94 μ V. Odpowiedź siatkówki sukcesywnie malała, osiągając najniższą wartość w 15. miesiącu badań. Minimalna wartość amplitudy fali b u heterozygot wyniosła 52,5 μ V.

Odpowiedź pręcikowa także zmniejsza się wraz z wiekiem w grupie badanej. Amplituda fali b w 1 miesiącu wynosi 597 μV u heterozygot, zaś w grupie kontrolnej 745,7 μV. Na przestrzeni 15 miesięcy amplituda fali b stopniowo malała, osiągając 17% pierwotnej wartości (ryc. 11).

Na podstawie badania odpowiedzi czopkowej przeprowadzanego w adaptacji dziennej wykazano brak zmian amplitudy fali b od 4. do 12. miesiąca. Przyczyną mogło być pobudzenie siatkówki po adaptacji świetlnej, co spowodowało znaczne odchylenia linii wartości progowej (*baseline*). Czynnik ten mógł mieć wpływ na dokładność pomiaru przez elektrody i późniejszą analizę wyników (ryc. 12).

Funkcję bioelektryczną siatkówki homozygot oszacowano za pomocą elektroretinografii zarówno w adaptacji nocnej, jak i dziennej. Badanie ERG wykazało całkowite wygaszenie aktywności siatkówki już od 1. miesiąca życia. Nie zaobserwowano odpowiedzi czopkowo-pręcikowej, pręcikowej ani czopkowej.

DYSKUSJA

Badania porównujące kinetykę degeneracji siatkówki w modelach zwierzęcych są istotne z punktu widzenia badaczy usiłujących dobrać odpowiedni model do tematu swoich prac badawczych.

Homozygoty pod względem genu *PRPH2* były początkowo nazywane modelem powolnej degeneracji siatkówki. Przyczyną jest relatywnie późny początek choroby w porównaniu do myszy z mutacją w genie *Pde6b*. Mutacja w genie *PRPH2*^{Rd2} zaburza produkcję peryferyny – białka obecnego



RYCINA 10. Kinetyka zmian amplitudy fali b w odpowiedzi czopkowo--pręcikowej na przestrzeni 15 miesięcy



RYCINA 11. Kinetyka zmian amplitudy fali b w odpowiedzi pręcikowej na przestrzeni 15 miesięcy



RYCINA 12. Kinetyka zmian amplitudy fali b w odpowiedzi czopkowej na przestrzeni 15 miesięcy

w zewnętrznych błonach dysków komórek wzrokowych siatkówki [1]. Rolą peryferyny jest ich stabilizacja. U myszy badanego w niniejszej pracy szczepu występuje mutacja insercyjna o wielkości ok. 10 kb po nukleotydzie 899, zaburzająca sekwencję kodującą w exonie 2. Mutacja przyczynia się do zmiany struktury drugorzędowej białka, co prowadzi do zaburzenia stabilności zewnętrznych błon dysków fotoreceptorów, powodując ich degenerację [2, 3, 4].

U myszy homozygotycznych pozostaje szczątkowa warstwa receptorowa, jednak komórki pozostałych warstw siatkówki wykazują normalną proliferację podczas pierwszych 2 tygodni po narodzinach. Następnie warstwy zawierające komórki wzrokowe – OS, ONL, OPL – podlegają stopniowej atrofii. Ich utrata uwidacznia się wyraźnie poprzez redukcję ONL i jest zauważalna po raz pierwszy po 14 dniach od narodzin. Degeneracja przebiega najszybciej do 2.–3. miesiąca życia, kiedy ONL zostaje zredukowana do połowy swojej pierwotnej grubości [5]. Przytoczone wyniki potwierdzono w niniejszej pracy. Grubość warstwy ONL w 3. miesiącu życia wyniosła 18,04 μm, co stanowi zaledwie 53% wartości początkowej.

Sanyal i wsp. [5] wykazali, iż warstwa receptorowa oraz OPL także ulega degradacji. W 9. miesiącu obrzeża siatkówki, a w 12. miesiącu cała siatkówka jest pozbawiona fotoreceptorów [5]. Analiza własnych wyników wykazała, że już w 9. miesiącu w siatkówce nie występują komórki fotoreceptorowe. Zarówno ONL, jak i OPL zanikają.

Sanyal i wsp. [5] wykazali, że do 6. miesiąca w centrum siatkówki populacja zarówno pręcików, jak i czopków pozostaje podobna do normalnej. Na obwodzie oraz w centrum siatkówki widoczny jest relatywny wzrost stosunku czopków do pręcików, co wskazuje na zwiększoną podatność pręcików na późne zmiany degeneracyjne. Wewnętrzne warstwy siatkówki – INL, IPL, GC – pozostają morfologicznie nietknięte. W późnym stadium degeneruje również nabłonek barwnikowy; staje się niejednolity. Obok obszarów z prawidłowo wyglądającym nabłonkiem znajdują się rejony całkowicie pozbawione komórek. Powyższe doniesienia korespondują z obserwacjami dokonanymi w niniejszej pracy.

Wykazano, że u myszy homozygotycznych względem genu *PRPH2* następuje niewielka degeneracja warstw INL, IPL, a także GC. Początkowo średnia grubość warstwy INL wynosiła 39,4 µm. Kolejne pomiary wykazały, iż następuje stopniowa jej degeneracja do 9. miesiąca życia, po czym grubość warstwy stabilizuje się na poziomie ok. 22 µm, co stanowi 54% początkowej wartości. Warstwa IPL oraz GC była mierzona wraz z włóknami nerwu II. Łączna grubość tych warstw w 1. miesiącu pomiarów wynosiła średnio 46 µm. Natomiast wraz z upływem czasu osiągnęła minimalną wartość 28,8 µm w ostatnim, 13. miesiącu pomiarów. W pomiarach uzyskano ok. 37% redukcję grubości tych warstw siatkówki.

Jansen i Sanyal [6] zaobserwowali, że wraz z rozpoczęciem zmian degeneracyjnych oraz postępującą utratą fotoreceptorów w cytoplazmie komórek nabłonka barwnikowego pojawiają się 2 rodzaje ziarnistości. W pierwszej kolejności są to małe wtręty o dużej gęstości pojawiające się ok. 21. dnia. W cytoplazmie komórek RPE starszych zwierząt w zaawansowanym stadium degeneracji pojawiają się duże, wielopęcherzykowe ciałka, które gromadzone są w cytoplazmie, pozostając w formie niezmienionej. Wraz z postępem zmian degeneracyjnych i zanikiem fotoreceptorów ok. 9.–12. miesiąca cytoplazma komórek RPE ulega ścieńczeniu [6].

W niniejszej pracy przeanalizowano morfologię RPE homozygotycznych względem genu *PRPH2* myszy, wykonując preparaty Flat Mount. Grupę kontrolną stanowiły myszy szczepu BALB/c. Dokonano pomiarów pola powierzchni komórek oraz oceniono ekspresję RPE65 za pomocą immunofluorescencyjnego barwienia preparatów. Nie odnotowano różnic w odsetku komórek jedno- i dwujądrzastych w stosunku do grupy kontrolnej. Na podstawie analizy immunofluorescencyjnej ekspresji białka RPE65 w komórkach RPE 12-miesięcznych homozygotycznych myszy stwierdzono, że cytoplazma komórek ma mniejszą grubość, a połączenia międzykomórkowe nie stanowią szczelnej bariery. Komórki nie są widoczne w całym polu widzenia, co potwierdza przytoczone obserwacje *Sanyala i wsp.* [5].

Reuter i Sanyal [7] poddali ocenie funkcję siatkówki homozygot względem genu PRPH2. Myszy od 1. miesiąca życia wykazywały znacznie obniżoną amplitudę fali b, jednak czas latencji fali b pozostawał prawidłowy. Wśród 2-3-miesięcznych oraz 6-7-miesięcznych myszy zaobserwowano dalszy spadek odpowiedzi bioelektrycznej siatkówki w związku ze zmniejszeniem się liczby fotoreceptorów wywołanej degeneracją, natomiast czas latencji wzrósł. Całkowite wygaszenie odpowiedzi ERG występuje u rocznych myszy, co jest konsekwencja braku komórek receptorowych. W porównaniu do myszy kontrolnych ERG zarejestrowany u myszy homozygotycznych wskazuje dużo mniejsze amplitudy fali a oraz amplitudy fali b [7]. W niniejszym badaniu, w przeciwieństwie do przytoczonej publikacji, ERG homozygot był wygaszony już od 1. miesiąca badania. Różnice mogą wynikać z zastosowania innej metodyki badania. W doświadczeniu Reutera i Sanyal [7] zastosowano 24-godzinną inkubację w ciemności oraz podano atropinę w niedługim czasie przed badaniem. W niniejszym przypadku myszom najpierw zakrapiano atropinę, a następnie inkubowano w ciemności przez 4 godz. Powyższe różnice mogły wpłynąć na stopień rozszerzenia źrenic, co w konsekwencji mogło powodować różny dostęp światła do siatkówki. Biorąc pod uwagę niewielką liczbę komórek światłoczułych w siatkówce, nawet nieznaczne różnice w protokole mogą być przyczyną zdecydowanie innych wyników badania potencjałów elektrofizjologicznych.

Heterozygoty PRPH2/+ nie są opisane w literaturze naukowej tak dokładnie, jak osobniki homozygotyczne. Wiadomo, że wykazują haploinsuficjencję – posiadają tylko jeden prawidłowy allel genu, którego produktem jest peryferyna. W efekcie prawidłowe białko powstaje, lecz w zbyt małej ilości, aby zapewnić odpowiednie funkcjonowanie komórek fotoreceptorowych [8]. W związku z tym degradacja fotoreceptorów jest bardziej stopniowa niż u homozygot. Kształtowanie się zewnętrznych odcinków komórek fotoreceptorowych jest nieprawidłowe, jednakże zarówno wewnętrzne, jak i zewnętrzne odcinki występują w 3. miesiącu życia. Jądra fotoreceptorów nigdy nie ulegają całkowitej atrofii, jak w przypadku homozygot [1].

Hawkins i wsp. [9] wykazali, iż bardzo powolna utrata komórek wzrokowych zaczyna się od 2. miesiąca życia. Tempo degeneracji jest zdecydowanie wolniejsze i trwa przez cały okres życia osobnika. W wieku 18 miesięcy i więcej ONL jest zredukowana do mniej niż połowy swej pierwotnej grubości [9]. W niniejszej pracy zaobserwowano podobne tempo degeneracji siatkówki. Liczba komórek wzrokowych maleje stopniowo od 2. do 5. miesiąca. Pomiędzy 5. a 15. miesiącem zaobserwowano największy spadek grubości zarówno ONL, jak i OS. W ostatnim pomiarze średnia grubość ONL wyniosła 18,83 µm, co stanowiło 49,9% pierwotnej wartości. Degeneracja OS także przebiegała stopniowo przez cały okres trwania badania, aż do osiągnięcia 54,9% wartości z 1. miesiąca badań. Warstwa splotowata zewnętrzna także wykazywała stopniowy zanik, aż do 15. miesiąca. Największe różnice w grubości warstwy zauważono pomiędzy 5. a 15. miesiącem. Ostatni pomiar wykazał różnicę w odniesieniu do stanu początkowego wynoszącą 51,5%. Na podstawie analizy zmian grubości wewnętrznych warstw

siatkówki wykazano, iż nie są one objęte procesem degeneracji. Średnie wartości pomiarów utrzymywały się na podobnym poziomie w trakcie całego okresu obserwacji.

Na zdjęciach preparatów Flat Mount wykonanych z nabłonka barwnikowego heterozygot zauważono wzrost odsetka jednojądrzastych komórek nabłonka barwnikowego w odniesieniu do myszy kontrolnych BALB/c. Dostrzeżono również znaczący spadek liczby komórek dwu- i wielojądrzastych. Nadmierna degeneracja zewnetrznych segmentów fotoreceptorów może powodować zwiększone tempo fagocytozy, co w konsekwencji może przyczyniać się do indukowania proliferacji. Pole powierzchni komórek RPE heterozygotycznych względem genu PRPH2 myszy jest mniejsze w odniesieniu do grupy kontrolnej. Stanowi 30% średniej wartości uzyskanej u myszy BALB/c. Ponadto nabłonek jest jednolity, a w polu widzenia nie zauważono rejonów pozbawionych komórek. W dostępnej literaturze nie przeprowadzono analizy immunofluorescencyjnej komórek RPE heterozygot za pomocą preparatów Flat Mount. Powyższe obserwacje należy zatem zweryfikować w dalszych badaniach.

Badanie ERG prowadzono w miesięcznych odstępach czasowych. Grupę kontrolną stanowiły miesięczne myszy BALB/c. Na podstawie wyników stwierdzono, że zmniejszenie odpowiedzi pręcikowo-czopkowej siatkówki jest jednostajne i prowadzi do niemal całkowitego wygaszenia amplitudy fali b w 15. miesiącu. Wartość w ostatnim miesiącu stanowi jedynie 14% wartości początkowej. Sytuacja prezentuje się podobnie w przypadku odpowiedzi pręcikowej. Odpowiedź w adaptacji nocnej jest zmniejszona już od 1. miesiąca życia, pomimo że preparaty histologiczne oceniające morfologię siatkówki nie wykazywały dużych zmian degeneracyjnych przed 4.–5. miesiącem życia. Pobudliwość siatkówki zmalała w trakcie trwania badania aż o 83% w porównaniu do wartości wyjściowej. Wyniki uzyskanej odpowiedzi czopkowej przeprowadzanej w adaptacji świetlnej są niejednoznaczne. Cheng i wsp. [8] wykazali, że amplituda fali b w odpowiedzi czopkowej u 2-miesięcznych myszy mieści się w normie, a jej obniżenie jest łagodne i postępuje wraz z wiekiem. Spowodowane jest to faktem, iż haploinsuficjencja występująca wśród heterozygot wywiera większy wpływ na pręciki niż czopki [8]. Ponadto uzyskane w niniejszej pracy amplitudy fali b odpowiedzi czopkowej mogą być obarczone błędem ze względu na trudność odpowiedniego ustawienia wartości progowej w oprogramowaniu urządzenia LKC. Fotoreceptory siatkówki po inkubacji w świetle są pobudzone, w związku z tym prawidłowa kalibracja elektrod jest kluczowym etapem badania. Brak doświadczenia mógł być przyczyną uzyskania tak niejednorodnych rezultatów.

Podsumowując, w niniejszej pracy przeanalizowano model zwyrodnienia barwnikowego siatkówki pod kątem szybkości postępu zmian degeneracyjnych, zaburzeń morfologii nabłonka barwnikowego oraz zmian funkcji bioelektrycznej siatkówki. Wyniki badań pozwoliły stwierdzić, iż degeneracja homozygotycznych pod względem genu *PRPH2* myszy przebiega szybciej, prowadząc do całkowitego zaniku fotoreceptorów. Postęp choroby u heterozygot jest wolniejszy, a zmiany nie prowadzą do zupełnej utraty komórek receptorowych siatkówki. Ponadto wykazano, iż atrofia komórek nabłonka barwnikowego dotyczy homozygot. Obecność licznych wakuoli oraz brak ciągłości cytoplazmy sugeruje degenerację komórek RPE. W przypadku heterozygot pod względem genu *PRPH2* istotne zmniejszenie pola powierzchni komórek, a także znacznie zwiększony odsetek komórek jednojądrzastych w odniesieniu do grupy kontrolnej może świadczyć o zwiększonej proliferacji komórek. Brak zauważalnych różnic w ekspresji RPE65 pomiędzy myszami BALB/c a grupą heterozygot przemawia za prawidłową morfologią komórek RPE u heterozygotycznych osobników. Oba wyżej wymienione mysie modele zwyrodnienia barwnikowego siatkówki mogą znaleźć swoje zastosowanie w badaniach nad tą chorobą. Różnice pomiędzy nimi umożliwiają wybór odpowiedniego modelu do określonego eksperymentu.

WNIOSKI

1. Zwyrodnieniowe zmiany siatkówki homozygot pod względem genu *PRPH2* są bardziej gwałtowne. Prowadzą do całkowitego zaniku warstwy splotowatej zewnętrznej, jądrzastej zewnętrznej oraz fotoreceptorów w trakcie trwania obserwacji. Badanie ERG wykazuje brak pobudliwości siatkówki już od 1. miesiąca życia.

2. Heterozygoty pod względem genu *PRPH2* są modelem bardzo powolnej degeneracji siatkówki. Na przestrzeni 15 miesięcy zaobserwowano jedynie redukcję grubości warstwy jądrzastej zewnętrznej oraz skrócenie zewnętrznych odcinków fotoreceptorów. Badanie ERG ukazuje stopniowy zanik funkcji bioelektrycznej siatkówki w trakcie 15-miesięcznej obserwacji.

3. U homozygot pod względem genu *PRPH2* występuje degeneracja komórek RPE. U osobników heterozygotycznych obserwacje pozwalają wnioskować, iż komórki RPE proliferują; nie stwierdzono zmian degeneracyjnych.

PIŚMIENNICTWO

- Smith R.S., John S.W.M., Nishina P.M., Sundberg J.P.: Retina, systematic evaluation of mouse eye: anatomy, pathology, and biomethods. CRC Press, Boca Raton 2002, 67–227.
- 2. OMIM. http://www.omim.org/entry/179605 (18.06.2013).
- Duncan J.L., Talcott K.E., Ratnam K., Sundquist S.M., Lucero A.S., Day S. et al.: Cone structure in retinal degeneration associated with mutations in the peripherin/RDS gene. Invest Ophthal Vis Sci. 2011, 52 (3), 1557–1566.
- 4. The Jackson Laboratory. http://jaxmice.jax.org/strain/001981.html (18.06.2013).
- Sanyal S., De Ruiter A., Hawkins R.K.: Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. J Comp Neurol. 1980, 194 (1), 193–207.
- Jansen H.G., Sanyal S.: Development and degeneration of retina in rds mutant mice: Electron microscopy. J Comp Neurol. 1984, 224 (1), 71–84.
- Reuter J.H., Sanyal S.: Development and degeneration of retina in rds mutant mice: the electroretinogram. Neurosci Lett. 1984, 48, 231–237.
- 8. *Cheng T., Peachey N.S., Li S., Goto Y., Cao Y., Naash M.I.*: The effect of peripherin/rds haploinsufficiency on rod and cone photoreceptors. J Neurosci. 1997, 17 (21), 8118–8128.
- Hawkins R.K., Jansen H.G., Sanyal S.: Development and degeneration of retina in rds mutant mice: photoreceptor abnormalities in the heterozygotes. Exp Eye Res. 1985, 41 (6), 701–720.