

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

MARIUS DRAGAŠIUS

Biochemijos magistro studijų programos II kurso studentas

Magistro baigiamasis darbas

**BDNF NEUROPROTEKCINIO POVEIKIO TINKLAINĖS GANGLINĖMS
LĄSTELĖMS TYRIMAS**

Darbo vadovas:

Doc. dr. Giedrius Kalesnykas

(parašas)

Darbo konsultantė:

MSc. Dovilė Litviničiūtė

(parašas)

Studentas _____
(parašas)

Vilnius, 2024

Turinys

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Tinklainės ganglinės ląstelės	7
1.1.1. Funkcija ir svarba	7
1.1.2. Morfologinė klasifikacija ir tipai.....	8
1.1.3. Pagrindiniai molekuliniai žymenys	9
1.2. Glaukoma	10
1.2.1. Vystymasis.....	10
1.2.2. Akispūdžio poveikis	11
1.3. Tinklainės ganglinių ląstelių neuroprotekcija	14
1.3.1. Neuroprotekcijos tikslai	14
1.3.2. Neurotrofiniai faktoriai	15
1.3.3. BDNF neurotrofinis faktorius	16
1.3.4. BDNF trūkumo teorija	18
1.4. Glaukomos gyvūnų modeliai	18
1.5. Nuo mitochondrijų priklausoma ganglinių ląstelių žūtis	19
2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI	21
2.1. Naudoti tirpalai ir reagentai.....	21
2.2. Pagrindinė naudota įranga.....	23
2.3. Mechaninis regos nervo pažeidimas	23
2.4. Tyrime naudotos eksperimentinės grupės	23
2.5. Audinių rinkimas.....	24
2.6. Tinklainių išsklotinių imunohistocheminis dažymas ir analizė	25
2.7. RNR išskyrimas iš tinklainių.....	26
2.8. RNR kiekio nustatymas.....	27
2.9. Kopijinės DNR sintezė.....	27
2.10. Realaus laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos atlikimas (kPGR)	28
2.11. Statistinė duomenų analizė.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1. Imunohistocheminis dažymas	29

3.2.	RNR koncentracija ir grynumas	31
3.3.	Genų raiškos tyrimai	32
3.3.1.	Pasirinkti genų žymenys.....	32
3.3.2.	DNR amplifikacijos efektyvumas	33
3.3.3.	Genų raiška.....	35
	IŠVADOS	40
	SANTRAUKA	41
	SUMMARY	42
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	43

SANTRUMPOS

- Apaf-1** – apoptozinis proteazę aktyvuojantis faktorius 1 (angl. *apoptotic protease activating factor 1*)
- BAX** – apoptozę inicijuojantis BCL-2 šeimos baltymas
- BAK** – BCL-2 homologinis antagonistas/žudikas (angl. *Bcl-2 homologous antagonist killer*)
- BDNF** – smegenų kilmės neurotrofinis faktorius (angl. *brain-derived neurotrophic factor*)
- BCL2** – apoptozę slopinantis BCL-2 šeimos baltymas
- Brn3a** – smegenims specifinis baltymas 3a (angl. *brain-specific homeobox/POU domain protein 3A*)
- CNTF** – ciliarinis neurotrofinis faktorius (angl. *ciliary neurotrophic factor*)
- DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenilindolas (angl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)
- GAPDH** – gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazė (angl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
- GDNF** – glijos neurotrofinis faktorius (angl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*)
- IVT** – intravitrealinė injekcija (angl. *intravitreal injection*)
- JNK** – c-Jun N-galinė kinazė (angl. *c-Jun N-terminal kinase*)
- MAPK** – mitogenu aktyvuota baltymų kinazė (angl. *mitogen-activated protein kinase*)
- MYOC** – miocilinas (angl. *myocilin*)
- NEFL** – neurofilamentų lengvoji grandinė (angl. *neurofilament light chain*)
- NGF** – nervų augimo faktorius (angl. *nerve growth factor*)
- Noxa** – forbol-12-miristato-13-acetato sužadintas baltymas 1 (angl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*)
- NT-4/5** – neurotrofinas-4/5 (angl. *neurotrophin-4/5*)
- NTF-3** – neurotrofinas-3 (angl. *neurotrophin-3*)
- OPTN** – optineurinas (angl. *optineurin*)
- p75NTR** – p75 neurotrofino receptorius (angl. *p75 neurotrophin receptor*)
- PI3K** – fosfoinozitido 3-kinazė (angl. *phosphoinositide 3-kinase*)
- PLC- γ** – fosfolipazė C- γ (angl. *phospholipase C-gamma*)
- POU-IV** – Pit-1, Oct-1 ir Unc-86 transkripcijos faktorių IV klasės domenai (angl. *the class IV domain of Pit-1, Oct-1 and Unc-86 transcription factors*)
- RBPMs** – RNR surišantis baltymas su daugybiniu splaisingu (angl. *RNA-binding protein with multiple splicing*)
- SMAC** – antrasis mitochondrijų kilmės kaspazių aktyvatorius (angl. *second mitochondria-derived activator of caspase*)

STAT3 – signalo perdavimo ir transkripcijos aktyvatorius 3 (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*)

TBK1 – kinazė-1, surišanti su TNF receptoriumi susijusį NF-kappa-B aktyvatorių (angl. *TANK-binding kinase 1*)

TrkA – tropomiozino receptorių kinazė A (angl. *tropomyosin receptor kinase A*)

TrkB – tropomiozino receptorių kinazė B (angl. *tropomyosin receptor kinase B*)

TrkC – tropomiozino receptorių kinazė C (angl. *tropomyosin receptor kinase C*)

TNF – navikų nekrozės faktoriai (angl. *tumour necrosis factor*)

6-FAM – 6-karboksifluoresceinas (angl. *6-carboxyfluorescein*)

IVADAS

Tinklainės ganglinės ląstelės yra regos sistemos neuronai, atsakingi už signalų perdavimą regos nervu į smegenis. Šios ląstelės yra būtinos vaizdinės informacijos apdorojimui, o jų praradimas sukelia negrįžtamą aklumą. Optinės neuropatijos, tokios kaip glaukoma, yra antra pagrindinė aklumo priežastis pasaulyje. Vienas iš pagrindinių minėtos ligos rizikos veiksnių yra padidėjęs akispūdis, kuris gali sukelti apoptotinių ganglinių ląstelių praradimą ir regos nervo skaidulų degeneraciją (Lambuk et al., 2022). Ligos vystymosi metu, tinklainės ganglinių ląstelių išsaugojime dalyvauja neurotrofiniai faktoriai. Vienas jų – smegenų kilmės neurotrofinis faktorius (angl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), kurio didžioji dalis ekspresuojama smegenyse ir regos nervu perduodama tinklainės ganglinėms ląstelėms. Neurotrofinis faktorius jungiasi prie tropomiozino receptorių kinazės B (angl. tropomyosin receptor kinase B, TrkB) receptoriaus ir aktyvuoja apoptozę slopinančius signalinius kelius tinklainės ganglinėse ląstelėse (Osborne et al., 2018).

Vienas iš patikimiausių gyvūnų modelių, tiriant glaukomos sukeltus neurodegeneracinius procesus, yra mechaninis regos nervo pažeidimas (angl. optic nerve crush). Jis sukelia regos nervo aksonų degeneraciją, ko pasekoje prasideda tinklainės ganglinių ląstelių apoptozė.

Tiriamąo darbo tikslas – *post-mortem* tyrimais įvertinti BDNF neuroprotekinį poveikį žiurkių mechaninio regos nervo pažeidimo modelyje.

Tikslui įgyvendinti buvo išskirti šie **uždaviniai**:

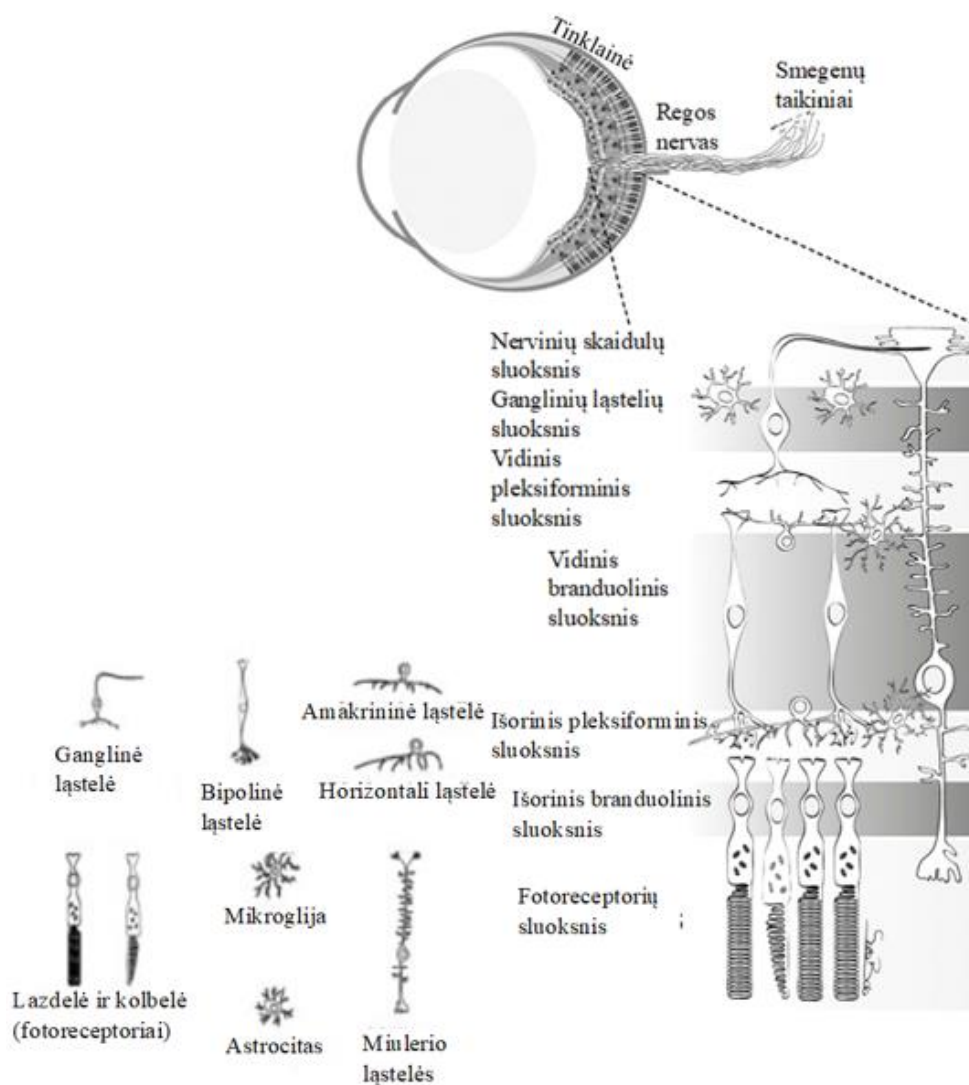
1. Tinklainės ganglinių ląstelių imunohistocheminio dažymo kiekybinės analizės metodu įvertinti mechaninio regos nervo pažeidimo modelio indukciją ir BDNF neuroprotekinį poveikį tinklainės ganglinėms ląstelėms.
2. Genų raiškos tyrimų metodais įvertinti modelio indukcijos ir BDNF neuroprotekinį poveikį pasirinktų, tinklainės ganglinių ląstelių struktūrą palaikančių ir apoptozę reguliuojančių, genų raiškos pokyčiams.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Tinklainės ganglinės ląstelės

1.1.1. Funkcija ir svarba

Tinklainės ganglinės ląstelės sudaro vidinį tinklainės sluoksnį ir yra nervinio tinklo ląstelės, kurios paskutinės gauna vaizdinį stimulą (angl. visual stimulus) akyje (Fudalej et al., 2021). Morfologiniu požiūriu šios ląstelės susideda iš ląstelės kūno, sudėtingos dendritinės struktūros ir vieno aksono. Pagrindinė dendritų funkcija yra gauti sinapsėmis perduodamus signalus iš bipolinių ir amakrinių ląstelių, kurios yra tarpiniai neuronai, atsakingi už fotoreceptorių sukurtų signalų gavimą ir perdavimą (1.1 pav.) (Feng et al., 2023).

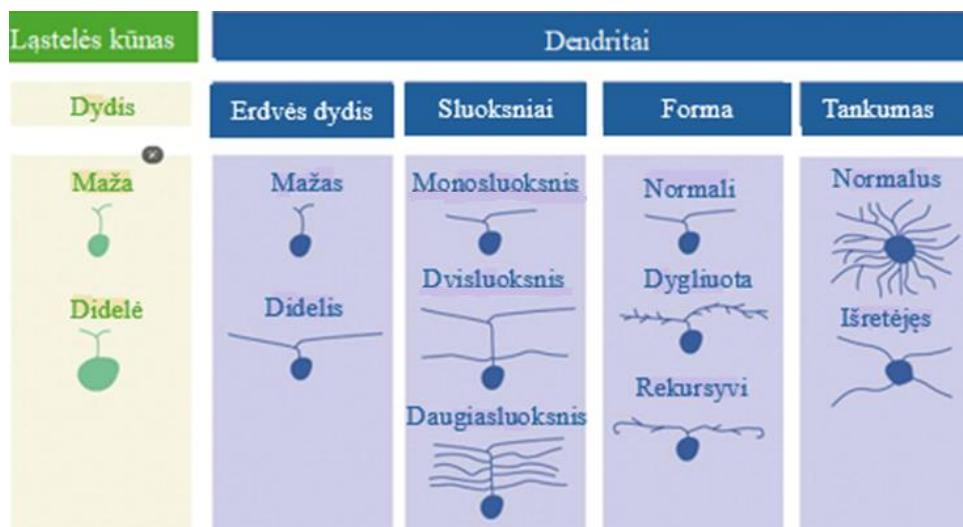


1.1 pav. Tinklainės struktūra. Šis paveikslėlis apibūdina tinklainės ląstelių išdėstymą branduoliniuose ir pleksiforminiuose sluoksniuose. Ganglinių ląstelių kūnai yra ganglinių ląstelių sluoksnyje, o jų aksonai tęsiasi nervinių skaidulų sluoksnyje ir sudaro regos nervą (Boia et al., 2020).

Aksonai sudaro regos nervą, kuris perduoda vaizdinę informaciją impulsais į smegenis. Šios hierarchinės ląstelių grandinės buvimas leidžia tinklainės ganglinėms ląstelėms įsitraukti į sudėtingą fotoreceptorių signalų integravimą ir apdorojimą, vedantį prie veikimo potencialų susidarymo. Šie potencialai sklinda impulsais tinklainės ganglinių ląstelių aksonais, kol pasiekia lateralinio kelinio branduolio (angl. lateral geniculate nucleus) sinapses, esančias smegenų gumbure. Vaizdinė informacija sinapsėmis perduodama į pirminę regos žievę (angl. primary visual cortex), kurioje atliekamas aukštesnio lygio vaizdinės informacijos apdorojimas ir integravimas. Taigi, tinklainės ganglinės ląstelės atlieka svarbų vaidmenį, sujungiant pradinį šviesos aptikimą tinklainėje su vaizdiniu suvokimu smegenyse (Vernazza et al., 2021).

1.1.2. Morfologinė klasifikacija ir tipai

Morfologinė klasifikacija yra būtina siekiant suprasti ganglinių ląstelių struktūrinę įvairovę bei funkcinės savybes tinklainėje. Didelės ganglinės ląstelės turi gana greitą atsaką ir daugiausiai susijusios su greitų regos pokyčių, tokių kaip judesys ar mirgėjimas, aptikimu. Tuo tarpu mažos ganglinės ląstelės gali turėti ilgalaikį atsaką ir specializuotis smulkių erdvinų detalių bei spalvų informacijos apdorojime. Morfologinio klasifikavimo pagrindas yra ląstelės kūno dydis ir dendritų morfologija – užimamos erdvės dydis, išsisklaidymas, forma ir tankumas (1.2 pav.) (Kim et al., 2021).



1.2 pav. Morfologinis tinklainės ganglinių ląstelių klasifikavimas pagal ląstelės kūno dydį ir dendritų morfologiją (Kim et al., 2021).

Labiausiai paplitę ir išskiriami trys pagrindiniai morfologiniai ganglinių ląstelių tipai – mažo dendritinio lauko (angl. midget), skėčio formos (angl. parasol) ir dendritinio dvisluoksnio (angl. bistratified). Mažo dendritinio lauko ganglinės ląstelės, kurių pavadinimas ir atsirado dėl joms būdingo mažo dendritų tinklo lauko spindulio, yra gausiausias ganglinių ląstelių tipas. Šios ląstelės pasižymi

tankiu dendritų tinklu. Jos labai svarbios didelio aštrumo ir raudonos-žalios spalvų regėjimui. Ląstelės gauna signalą iš kolbelių fotoreceptorių ir yra atsakingos už išsamios informacijos apie vaizdinius dirgiklius perdavimą. Dėka šių ląstelių atliekamos centrinio regėjimo užduotys – tokios kaip smulkių detalių atpažinimas ir skaitymas. Priešingai nei mažo dendritinio lauko ganglinės ląstelės, skėčio formos ląstelės turi aiškiai didesnę dendritinio tinklo lauką. Jos dalyvauja žemo aštrumo ir nespalvoto regėjimo apdorojime. Ląstelės gauna signalą iš abiejų – lazdelių ir kolbelių – fotoreceptorių ir yra ypač jautrios kontrasto bei judesio pokyčiams. Taigi, šios ląstelės yra labai svarbios mažo vaizdinio kontrasto regėjimo apdorojimui.

Dendritinio dvisluoksnio ląstelės turi dendritus, kurie vidiniame pleksiforminiame sluoksnyje išsiskirsto į du sluoksnius – vidinį ir išorinį. Šios ląstelės daugiausiai signalų gauna iš bipolinių ląstelių, kurios signalus gauna iš abiejų fotoreceptorių tipų, ir dalyvauja mėlynos-geltonos spalvos regėjimo apdorojime. Jos taip pat svarbios vaizdinės informacijos, susijusios su kontrastu ir judesiu, apdorojimui (Grünert, Martin, 2021; Kim et al., 2021).

Be regėjimą formuojančių ganglinių ląstelių taip pat yra ir regėjimo neformuojančios ląstelės. Šiose ląstelėse yra fotopigmento melanopsino, todėl jos yra jautrios šviesai net ir negaudamos signalų iš fotoreceptorių. Pagrindinės minėtų ląstelių funkcijos yra cirkadinio ritmo ir vyzdžio šviesos reflekso (angl. pupillary light reflex) reguliavimas (Do, 2019).

1.1.3. Pagrindiniai molekuliniai žymenys

Ganglinių ląstelių žymens tinkamumas tyrimui priklauso nuo to, ko ieškome. Jei tikslas yra atpažinti visų tipų ląsteles, žymuo turėtų pasižymėti raiška visose arba bent jau daugumoje ganglinių ląstelių. Morfologiniams tyrimams tinkamiausi žymenys, kurių baltymai randami visoje ganglinėje ląstelėje (ląstelės kūnas, aksonai ir dendritai). Tuo tarpu kiekybiniam ląstelių įvertinimui labiausiai tinkami branduoliniai arba citoplazminiai žymenys. Visais atvejais galioja trys pagrindinės taisyklės: 1) žymuo turi būti specifinis – jo raiška tinklainėje arba bent jau ganglinių ląstelių sluoksnyje turi apsiriboti ganglinėmis ląstelėmis; 2) po pažeidimo žymuo neturėtų pakeisti savo raiškos modelio; 3) tai turėtų būti gyvybingumo žymuo, o jo raiška turėtų mažėti ląstelėms žūstant. Tai ypatingai svarbu atliekant gyvybingumo ir neuroprotekcijos tyrimus (Nadal-Nicolás et al., 2023).

Dažniausiai naudojami ir kartais net auksiniu standartu laikomi du žymenys – RBPMS ir Brn3a (Corral-Domenge et al., 2022). RNR surišantis baltymas su daugybiniu splaisingu (RBPMS) yra konservatyvus RNR surišantis baltymas su vienu RNR sekos atpažinimo motyvu. Didžiausia RBPMS raiška yra pastebima tinklainėje, širdyje, kepenyse ir inkstuose; daug mažesnė – smegenyse, plaučiuose ir plonojoje žarnoje. Tinklainėje šis baltymas gausia raiška pasižymi tik ganglinėse ląstelėse ir dėl to yra

tinkamas žymuo atskirti minėtas ląsteles nuo kitų neuronų tinklainėje (Pereiro et al., 2020). Žinduolių tinklainėje daugiausiai RBPMS aptinkama ganglinių ląstelių kūnuose, esančiuose ganglinių ląstelių sluoksnyje, ir tik labai retai baltymas pastebimas dendrituose. Vidutinis RBPMS žymėtų ląstelių skersmuo pelėse ir žiūrėse atitinkamai yra $17,9 \mu\text{m} \pm 3,6 \mu\text{m}$ ir $16,9 \mu\text{m} \pm 3,5 \mu\text{m}$ (standartiniai nuokrypiai, SD). Minėtuose gyvūnuose tik 0,2 % RBPMS žymėtų ląstelių yra mažesnės nei $10 \mu\text{m}$ (Rodriguez et al., 2014). Vienos ląstelės transkriptominei analizė parodė, jog RBPMS geno raiška yra panaši visuose ganglinių ląstelių tipuose. Tai patvirtina, kad minėtas žymuo yra tinkamas visų tipų tinklainės ganglinėms ląstelėms. Specifinis antikūnų prieš RBPMS baltymą veikimas parodo, jog žymuo gali būti naudojamas kiekybinei ganglinių ląstelių analizei (Rodriguez et al., 2014; Rheaume et al., 2018).

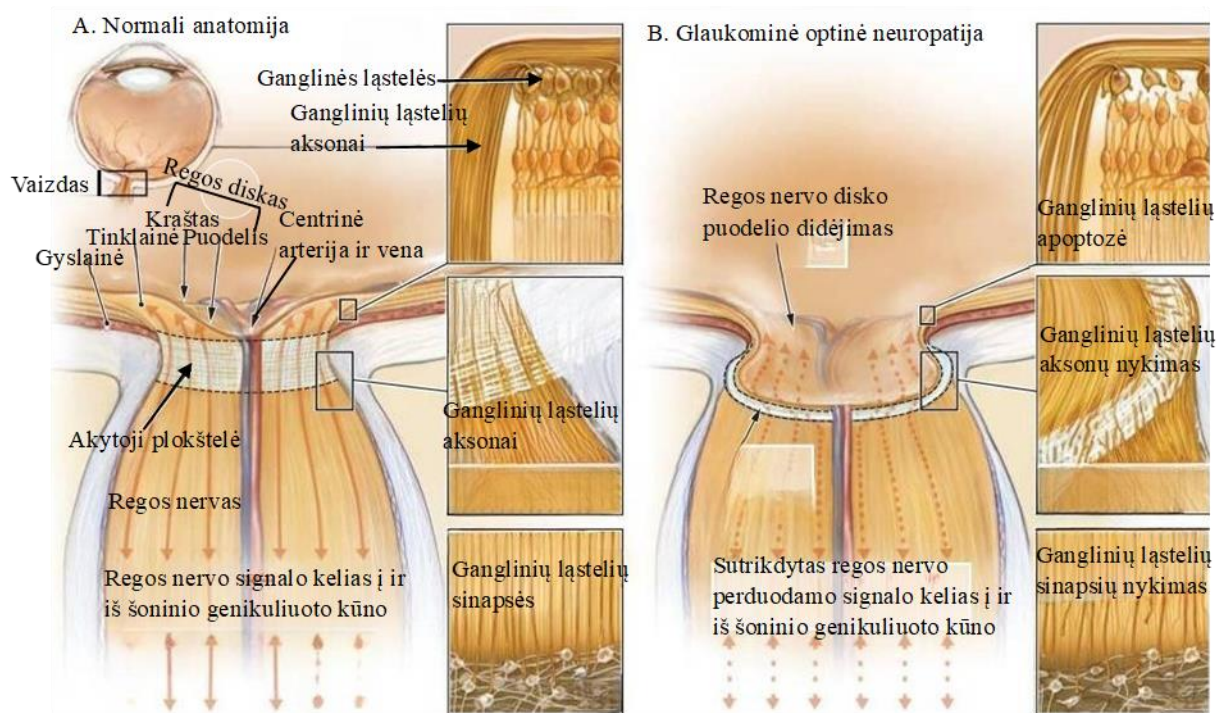
Brn3a žymuo kartu su Brn3b ir Brn3c priklauso POU-IV nervų sistemos transkripcijos faktorių klasei. Šie baltymai labai svarbūs ganglinių ląstelių vystymuisi, diferenciacijai ir aksonų ilgėjimo procesuose (Ghinia et al., 2019; Parmhans et al., 2021). Brn3a dalyvauja neuronų išgyvenamumo procesuose, aktyvuodamas apoptozę slopinančių genų raišką ir slopindamas apoptozę inicijuojančių genų raišką. Jis slopina p53 signalinio kelio aktyvuotą, apoptozę inicijuojančių BAX ir Noxa genų raišką (Hudson et al., 2016). Brn3a raiška tinklainėje mažėja, kai ganglinės ląstelės inicijuoja apoptozę. Tai parodo, jog šis baltymas yra geras ląstelių gyvybingumo žymuo (Sánchez-Migallón et al., 2016). Tačiau verta paminėti, jog Brn3a raiška pasižymi tik regėjimą formuojančios ganglinės ląstelės, kai tuo tarpu RBPMS raiška pasižymi visų tipų ganglinės ląstelės – tiek regėjimą formuojančios, tiek regėjimo neformuojančios. Dėl šios priežasties RBPMS žymėtų ganglinių ląstelių kiekis įprastai yra didesnis nei Brn3a (Nadal-Nicolás et al., 2012; Sánchez-Migallón et al., 2018; Masin et al., 2021). Tačiau atlikus tyrimą su pelėmis buvo pastebėta, jog senstant skirtumas tarp RBPMS ir Brn3a žymenimis žymėtų ganglinių ląstelių skaičiaus mažėja ir neatitikimas tarp abiejų žymenų tampa mažiau ryškus. Svarbu paminėti, jog minėto tyrimo optinės neuropatijos modelyje nebuvo pastebėta RBPMS geno raiškos pokyčio, bet Brn3a geno raiška ženkliai padidėjo. Tai parodo, jog RBPMS yra nuoseklesnis ir patikimesnis ganglinių ląstelių žymuo (Meng et al., 2023).

1.2. Glaukoma

1.2.1. Vystymasis

Glaukoma yra viena iš pagrindinių aklumo priežasčių pasaulyje, kuri paveikia milijonus žmonių (Kaushik et al., 2024). Apskaičiuota, kad 2010 metais glaukoma sirgo 60,5 mln. žmonių. Tačiau 2020 metais šis skaičius išaugo iki 79,6 mln. (Zhang et al., 2021). Prognozuojama, jog iki 2040 metų glaukoma sergančių žmonių skaičius gali išaugti iki 111,8 mln. (Kaushik et al., 2024). Ši liga yra degeneracinė optinė neuropatija, atsirandanti dėl tinklainės ganglinių ląstelių aksonų pažeidimo ir laipsniško nykimo.

Pažeidus aksonus prasideda ir ląstelės kūnų apoptozė. Dėl šių priežasčių atsiranda būdingas regos nervo susitraukimas (angl. optic nerve cupping) ir kiti regėjimo lauko defektai, matomi atliekant oftalmoskopiją (Hsu, Desai, 2023). Stebimi ryškūs regos disko, sudaryto iš nervinio, kraujagyslinio ir jungiamojo audinių, pokyčiai (1.3 pav.). Glaukominės optinės neuropatijos metu vyksta regos nervo disko audinių ir aktytosios plokštelės (lot. lamina cribrosa) pažeidimas ir persitvarkymas. Nykstant ganglinių ląstelių aksonams aktytoji plokštelė pasislenka ir plonėja, dėl to regos nervo disko puodelis (angl. optic nerve disc cup) gilėja ir stumiasi prie regos nervo krašto. Dėl šių priežasčių sutrinka signalo perdavimas aksonais į ir iš ganglinių ląstelių kūnų (Weinreb et al., 2014). Minėtos regos nervo patologijos dažnai yra padidėjusio akispūdžio priežastis (Hsu, Desai, 2023).

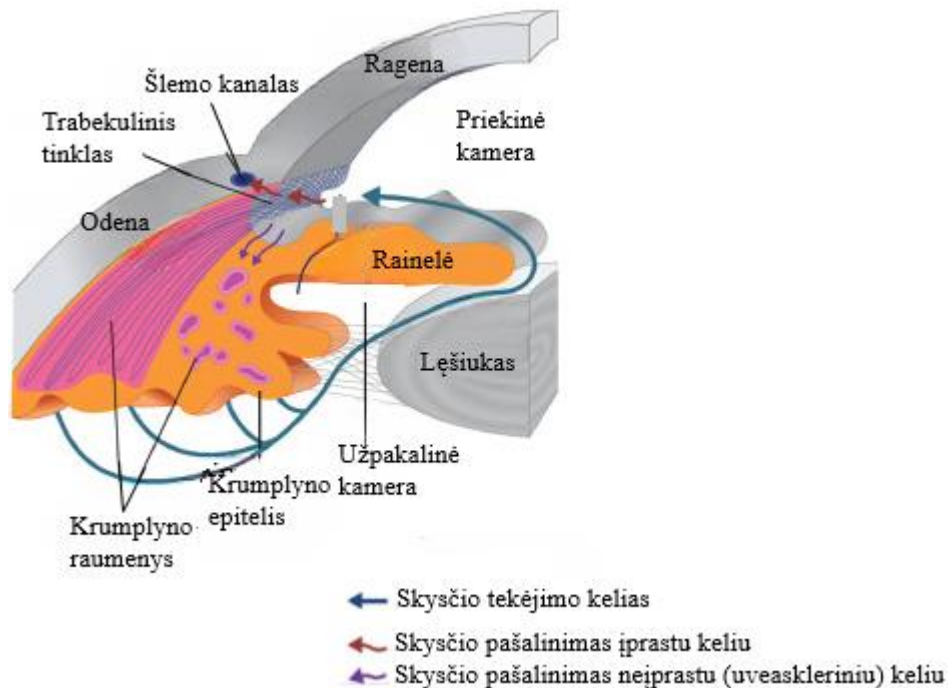


1.3 pav. Regos nervas normaliomis (A) ir glaukominės optinės neuropatijos (B) sąlygomis (Weinreb et al., 2014).

1.2.2. Akispūdžio poveikis

Akispūdis yra akyje esančio skysčio slėgis. Jį lemia priekinės kameros skysčio susidarymo ir ištekėjimo pusiausvyra (1.4 pav.). Šis skystis, kurį gamina krumplynas (angl. ciliary body), yra svarbus ne tik normalaus akispūdžio palaikymui, bet ir maistinių medžiagų tiekimui avaskulinėms akies priekinio segmento struktūroms. Krumplyno išskirtas priekinės kameros skystis teka už rainelės ir per vyzdį patenka į priekinę kamerą, kurioje pašalinamas šiais keliais:

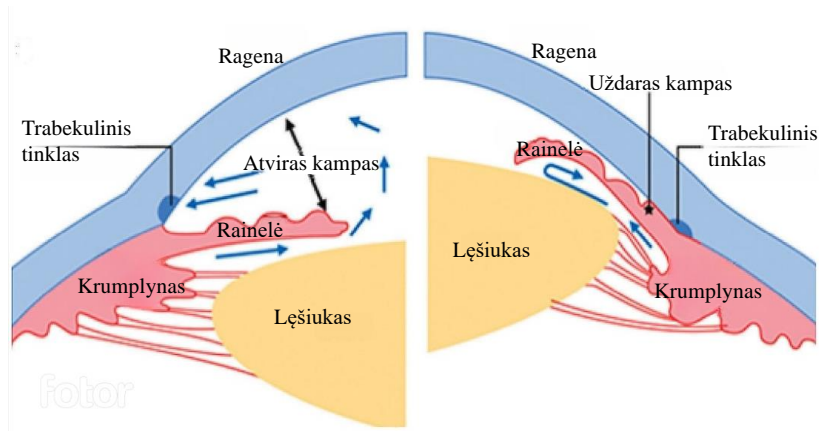
1. Didžioji dalis priekinės kameros skysčio per trabekulinį tinklą nuteka (angl. trabecular meshwork) į Šlemo kanalą (angl. Schlemm's canal), kuriame patenka į episkleros venas;
2. Mažas priekinės kameros skysčio kiekis uveaskleriniu keliu (angl. uveoscleral pathway) praeina į supragyslaininę ertmę (angl. suprachoroidal space) ir patenka į krumplyno, gyslainės ir odenos veninę kraujotaką;
3. Dar mažesnis priekinės kameros skysčio kiekis praeina per rainelę ir atgal į užpakalinę kamerą (1.4 pav).



1.4 pav. Priekinės kameros skysčio tekėjimo schema (Crawley et al., 2012).

Teoriškai akispūdį galima nustatyti pagal Goldmano lygtį (angl. Goldmann equation), kuri yra: $\text{akispūdis} = (F/C) + P$, kur F reiškia priekinės kameros skysčio tekėjimo greitį, C – skysčio ištekėjimo greitį ir P reiškia episkleros venų slėgį. Bet kurio iš šių parametru pasikeitimas neišvengiamai pakeičia akispūdį (Hsu, Desai, 2023; Machiele et al., 2022).

Priklausomai nuo akispūdžio padidėjimo, esant atviram ar uždaram kampui tarp rainelės ir ragenos (priekinės kameros kampui), glaukoma skirstoma į atviro ir uždaro kampo (1.5 pav.). Kaip jau žinome, šiame kampe yra priekinės kameros skysčio pašalinimui kritiškai svarbus trabekulinis tinklas (Hsu, Desai, 2023).



1.5 pav. Atviro kampo (kairė) ir uždaro kampo (dešinė) glaukoma (Wiggs, Pasquale, 2017).

Atviro kampo glaukoma atsiranda tuomet, kai yra padidėjęs trabekulinio tinklo pasipriešinimas skysčio ištekimui, tačiau priekinės kameros kampas nebūna pakitęs arba netrukdo pasiekti trabekulinį tinklą. Sergant šia glaukoma, sutrinka trabekulinio tinklo arba Šlemo kanalo funkcija ir dėl to pakyla akispūdis. Viena iš priežasčių gali būti kietųjų dalelių patekimas į smulkias trabekulinio tinklo angas, kas sumažina trabekulinio tinklo pralaidumą (Mahabadi et al., 2022). Galimi keli įvairūs kietųjų dalelių atsiradimo keliai:

1. Lęšiuko baltymai. Kataraktos operacijos metu didelės molekulinės masės baltymai, išsiskykę fakolizės¹ (angl. phacolysis) metu, gali patekti į trabekulinį tinklą ir sumažinti jo pralaidumą (Călugăru et al., 2016);
2. Eritrocitai. Trauminio akies sužalojimo atveju senstantys raudonieji kraujo kūneliai gali įsitvirtinti trabekuliniame tinkle (Alamri et al., 2016);
3. Pigmento granulės. Pigmentas gali atsiskirti nuo rainelės epitelio ir įsitvirtinti trabekuliniame tinkle (Călugăru et al., 2016);
4. Naviko dalelės. Nekrozinių navikų dalelės taip pat gali užkimšti trabekulinį tinklą (Mcmenam, Lee, 1986);
5. Kortikosteroidai. Bet kokios rūšies steroidų terapija gali padidinti akispūdį (Distelhorst, Hughes, 2003).

Atviro kampo glaukoma siejama ir su įvairiais genais ar jų mutacijomis. Teigiama šeimos istorija yra rizikos veiksnys 4-16 % šios ligos atveju, kai liga pasireiškia daugeliui tos pačios šeimos narių. Dėl to manoma, jog ši liga gali būti paveldima (Drewry et al., 2018). Genominių tyrimų metu aptikti net 127

¹ Lęšiuko irimas, kurio metu lęšiuko baltymai patenka į priekinę kamerą.

genetiniai lokusai, susiję su atviro kampo glaukoma (Gharahkhani et al., 2021). Šiuo metu labiausiai su liga siejamos trijų genų mutacijos – MYOC (miocilinas), OPTN (optineurinas) ir TBK1 (kinazė-1, surišanti su TNF receptoriumi susijusį NF-kappa-B aktyvatorių). Visų šių genų koduojami baltymai labai svarbūs normaliai trabekulinio tinklo veiklai. Kiekvieno iš šių genų mutacijos gali sukelti patofiziologinius ir funkcinius trabekulinio tinklo pokyčius (Sears et al., 2019).

Uždaro kampo glaukoma siejama su įvairiais anatominiiais faktoriais, įskaitant padidėjusį lęšiuko storį, sumažėjusį priekinės kameros gylį, pasikeitusią priekinę lęšiuko-rainelės diafragmos padėtį bei susiaurėjusį įėjimą į priekinę kamerą (Liu et al., 2017). Negilus priekinės kameros kampas sukelia platų rainelės ir lęšiuko kontaktą, trukdantį priekinės kameros skysčiui tekėti iš užpakalinės kameros į priekinę kamerą, dėl ko susidaro slėgių skirtumas tarp kamerų, žinomas kaip vyzdžio blokas. Vyzdžio blokavimo mechanizmas skatina rainelės rietimąsi, o tai dar labiau susiaurina priekinės kameros kampą. Šis nuolatinis procesas išlaiko vis didėjančią akispūdį (Suwan et al., 2017). Uždaro kampo glaukoma dažniausiai pasireiškia nuo 55 metų iki 65 metų amžiaus žmonėms. Tikėtina, kad ši patologija vystosi dėl su amžiumi didėjančio lęšiuko storio ir mažėjančio priekinės kameros gylio (Jonas et al., 2015). Tačiau traumos, uždegimai, navikai ar kitos sisteminės būklės, turinčios įtakos akies struktūroms, irgi gali būti uždaro kampo glaukomos susidarymo priežastys (Annadurai, Vijaya, 2014).

Nepaisant to, kad akispūdis gali būti modifikuojamas mediciniais ir chirurginiais gydymo būdais, glaukoma dažnai progresuoja – regos nervo pažeidimas tęsiasi. Kadangi tinklainės ganglinės ląstelės negali dalintis ir atsinaujinti, regos nervo pažeidimas yra negrįžtamas. Todėl neuroprotektiniai vaistai, skirti tinklainės ganglinių ląstelių ir regos nervo aksonų struktūrai ir funkcijai išsaugoti, yra svarbi tyrimų sritis (Vishwaraj et al., 2022).

1.3. Tinklainės ganglinių ląstelių neuroprotekcija

1.3.1. Neuroprotekcijos tikslai

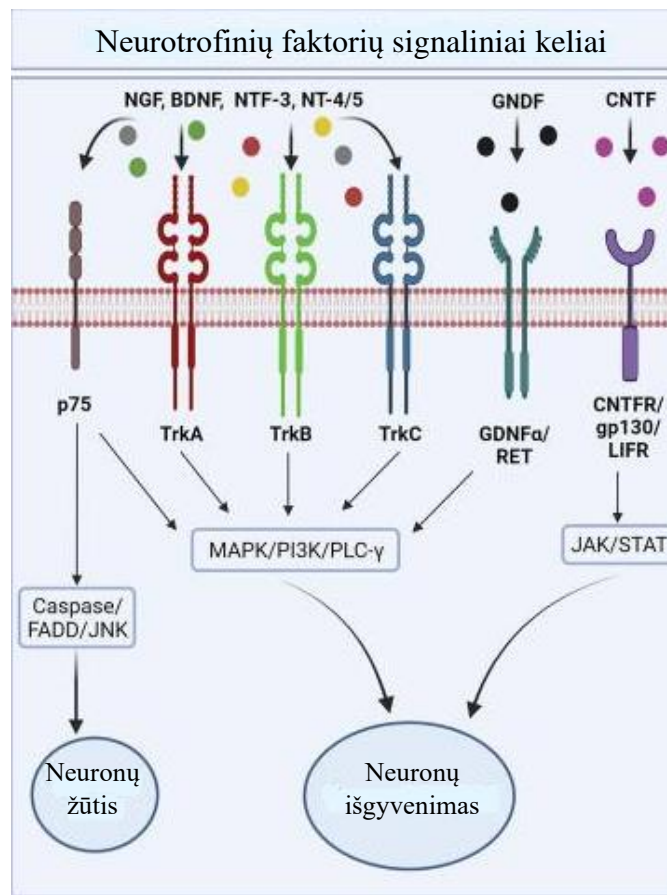
Vystymosi metu tinklainės ganglinės ląstelės prailgina savo aksonus iki sinapsių tikslinėse smegenų srityse. Grauzikuose daugiausiai ląstelių žūsta 2–5 dienos po gimimo, užtikrinant, kad išgyventų tik tos ląstelės, kurios pasiekė smegenų taikinius. Ganglinių ląstelių gebėjimas prailginti savo aksonus mažėja su amžiumi, o gebėjimas atnaujinti aksonus prarandamas ankstyvame vystymosi etape (Boia et al., 2020).

Neuroprotekcijos metodu siekiama išsaugoti nervinių ląstelių struktūrą ir funkcijas. Neuroprotekcija glaukomos atveju reikštų ganglinių ląstelių išsaugojimą nepriklausomai nuo kintančio akispūdžio (Kuo, Liu, 2022). Nemažai tyrėjų atrado citotoksinius dirgiklius, kurie, sergant glaukoma,

prisideda prie ganglinių ląstelių žūties, įskaitant neurotrofinių faktorių netekimą, glutamato citotoksiškumą, mitochondrijų disfunkciją, glijos ląstelių aktyvaciją, endoplazminio tinklo stresą, išemiją ir oksidacinį stresą (Almasieh et al., 2012; Almasieh, Levin, 2017). Terapiniu požiūriu, kiekvienas iš šių mechanizmų gali būti potencialiai patraukli intervencijos strategija neuroprotekcijai pasiekti. Todėl neuroprotektantai, galintys blokuoti signalinius kelius ląstelėse, kuriuos sukelia įvairūs citotoksiniai dirgikliai, yra plačiai tiriami, siekiant panaikinti arba sulėtinti regos nervo degeneraciją. Nors ir pastebėtas teigiamas šiuo metu tiriamų neuroprotektinių medžiagų poveikis gyvūnų glaukomos modeliuose, tačiau klinikiniai tyrimai dar neatlikti (Claes et al., 2019).

1.3.2. Neurotrofiniai faktoriai

Nervų augimo faktorius (NGF) buvo pirmasis 1951-ais metais nustatytas augimo faktorius, pasižymintis trofiniu (išgyvenimą ir augimą skatinančiu) poveikiu jutiminiams ir simpatiniams neuronams. Vėliau, 1982-ais metais, buvo atrastas antrasis neurotrofinį poveikį turintis smegenų kilmės neurotrofinis faktorius (BDNF), kuris buvo izoliuotas ir išgrynintas iš kiaulių smegenų. Buvo įrodyta, jog jis skatina neuronų subpopuliacijos išgyvenimą dorsalinių šaknelių ganglijuose (angl. dorsal root ganglion). Po NGF ir BDNF atradimo buvo aptikti ir kiti neurotrofiniai faktoriai, tokie kaip neurotrofinas-3 (NTF-3), neurotrofinas-4/5 (NT-4/5), ciliarinis neurotrofinis faktorius (CNTF) ir glijos neurotrofinis faktorius (GDNF). Jie sintetunami kaip proneurotrofinai – nesubrendę pirmtakai, kurie po proteolitinio skilimo virsta subrendusiais baltymais. Šios molekulės jungiasi prie tropomiozino receptorių kinazės (Trk) ir p75 neurotrofino receptoriaus (p75NTR). Kiekvienas neurotrofinis faktorius selektyviai jungiasi prie specifinių Trk receptorių: NGF specifiškai jungiasi prie TrkA receptoriaus, NT-4/5 ir BDNF aktyvuoja TrkB, o NTF-3 jungiasi prie TrkC (1.6 pav.).



1.6 pav. Neurotrofinių faktorių sąveika su atitinkamais receptoriais ir signalinių kelių aktyvacija tinklainės ganglinėse ląstelėse (Lambuk et al., 2022).

Giminingumas kiekvienam iš šių receptorių priklauso nuo neurotrofinių faktorių brandumo. Brandūs neurotrofiniai faktoriai turi didelį giminingumą Trk receptoriams, o tai lemia ląstelių išgyvenimą ir augimą. Tuo tarpu proneurotrofinai turi didelį giminingumą p75NTR receptoriui, kuris daugiausia sukelia ląstelių apoptozę. Kiekvienas receptorius po aktyvacijos reguliuoja keletą signalinių kelių, kurie yra būtini ganglinių ląstelių vystymuisi ir funkcijai. Trk receptoriai labiausiai reguliuoja tris signalinius kelius, kurie tarpininkauja ganglinių ląstelių diferenciacijai ir išgyvenimui – mitogenu aktyvuotos baltymų kinazės (MAPK), fosfoinozotido 3-kinazės (PI3K) ir fosfolipazės C- γ (PLC- γ) signalinius kelius (Claes et al., 2019; Kuo, Liu, 2022; Lambuk et al., 2022).

1.3.3. BDNF neurotrofinis faktorius

Ląstelėse pagamintas BDNF gali būti aktyvuotas dvejomis formomis: aktyvioji pirmtako forma (prodomenas, pro-BDNF) ir po proteolitinio skilimo gautas subrendęs BDNF (mBDNF). Pro-BDNF didžiausiu giminingumu pasižymi p75 receptoriui, dėl to gali aktyvuoti ir neuronų žūties signalinius kelius. Tuo tarpu mBDNF didžiausią giminingumą turi TrkB receptoriui, kuris aktyvuoja neuronų

išgyvenimo signalinius kelius. Dėl priešingų giminingumų, BDNF viduląstelinis arba ekstraląstelinis skilimas tampa svarbiu veiksniumi reguliuojant BDNF signalinį poveikį (Kutsarova et al., 2021).

Prisijungdamas prie TrkB receptoriaus, BDNF inicijuoja jo dimerizaciją ir tirozino liekanų fosforilinimą. dėl kurio sukuriama viduląstelinė signalinių molekulių prijungimo vieta (Kowiański et al., 2018). Gali būti aktyvuojami 1.3.2. skyriuje paminėti signaliniai keliai:

1. MAPK signalinis kelias. Šio kelio aktyvavimas sukelia ekstraląstelinės signalo reguliuojamos kinazės (ERK) fosforilinimą ir aktyvaciją. Fosforilinta ERK gali būti pernešta į branduolį ir reguliuoti transkripcijos faktorių, atsakingų už apoptozę slopinančių, ląstelių diferenciaciją ir proliferaciją skatinančių genų raišką, aktyvumą (Moustardas et al., 2023);
2. PI3K signalinis kelias. Šis signalinis kelias skatina ląstelių išgyvenimą, slopindamas apoptozę. PI3K fosforilina ir aktyvina baltymų kinazę B (Akt). Aktyvuota Akt fosforilina ir inaktyvuoja kelis apoptozę inicijuojančius baltymus, užkirsdamas kelią ląstelių žūčiai. Taip pat šis kelias reguliuoja įvairius ląstelių procesus, įskaitant baltymų sintezę ir ląstelių proliferaciją (Xi et al., 2022);
3. PLC- γ signalinis kelias. Aktyvuota PLC- γ katalizuoja fosfatidilinozitolio 4,5-bisfosfato (PIP2) hidrolizę į inozitolio 1,4,5-trifosfatą (IP3) ir diacilglicerolį (DAG). IP3 mobilizuoja kalcio jonus iš viduląstelinių atsargų, tokių kaip endoplazminis tinklas. Padidėjęs kalcio kiekis gali sukelti įvairius procesus ląstelėje, įskaitant baltymų kinazių aktyvavimą ir jonų kanalų aktyvumo reguliavimą. DAG kartu su kalcio jonais gali aktyvuoti baltymų kinazę C (PKC). Tuomet PKC gali fosforilinti įvairius tikslinius baltymus ir keisti jų aktyvumą. Taip reguliuojamas ląstelių išgyvenamumas ir proliferacija (Rajala, 2021).

Tinklainėje BDNF gali būti gaminamas ganglinėse ląstelėse ir astrocituose, iš kurių parakriniais ir autokriniais ląstelių signaliniais keliais jis pernešamas į tikslines vietas. Galimi retrogradinis (angl. retrograde) ir anterogradinis (angl. anterograde) aksoniniai BDNF transportavimo būdai. Retrogradinis būdas pasižymi tuo, jog BDNF pagaminamas tikslinėse srityse, pavyzdžiui smegenyse, ir transportuojamas į ganglinių ląstelių kūnus. Tuo tarpu anterogradinis būdas apima BDNF, pagaminto pačioje tinklainėje, transportavimą į tikslines smegenų sritis. Pagal šį scenarijų BDNF gali palaikyti ganglinių ląstelių išgyvenamumą, paveikdamas tikslines smegenų sritis, o ne tiesiogiai ganglines ląsteles. Tačiau mokslininkai vis dar nesutaria, kuriuo transportavimo būdu BDNF palaiko ganglinių ląstelių išgyvenamumą viso vystymosi metu ir ar šie būdai išlieka po ląstelės vystymosi. Neginčijama yra tai, jog BDNF skatina neuronų išgyvenamumą, aksonų valdymą ir reguliuoja sužadavimo ir slopinimo sinapsinį signalą regos sistemoje (Maday et al., 2014; Lambuk et al., 2022). BDNF yra svarbus nuo

neuronų aktyvumo priklausomam neuronų augimui ir šakojimuisi vidurinių smegenų viršutinio kalnelio (angl. superior colliculus) srityje, kuri yra labai svarbi vaizdinės informacijos apdorojime. Taip pat BDNF yra svarbus ganglinių ląstelių aksonų struktūros ir jungčių pokyčiams, reaguojant į įvairius dirgiklius ir vystymosi procesus (Marler et al., 2014).

Eksperimentiniai glaukomos tyrimai rodo, jog neurotrofiniai faktoriai veiksmingai skatina neuronų išgyvenamumą ir lėtina ar net užkerta kelią apoptozinei ganglinių ląstelių žūčiai (Mallone et al., 2020). Genų terapijos metu padidėjusi BDNF raiška padėjo išsaugoti ganglines ląsteles žiurkių glaukomos modelyje, palyginus su negydyta kontrole (Martin et al., 2003). Toliau, siekiant įrodyti BDNF neuroprotektinį poveikį, buvo pastebėta, kad egzogeniškai naudojamas BDNF slopina ganglinių ląstelių praradimą ir regos nervo pažeidimą įvairiuose ūminės ir lėtinės glaukomos modeliuose (Mohd Lazaldin et al., 2020; Fudalej et al., 2021). Įveikdamas smegenų–kraujo barjerą, BDNF gali patekti ir į kraują. Atlikus tyrimą su pacientais, sergančiais ankstyva ir vidutinio sunkumo glaukoma, buvo pastebėta, kad BDNF koncentracija serume statistiškai reikšmingai sumažėjo, palyginus su sveika kontrole. Tai parodo, jog BDNF gali būti taip pat tiriamas kaip potencialus biologinis žymuo ankstyvam glaukomos nustatymui (Oddone et al., 2017).

1.3.4. BDNF trūkumo teorija

Manoma, jog glaukomos vystymosi metu sutrikęs ganglinių ląstelių gynybos mechanizmas atsiranda dėl pažeisto neurotrofinių faktorių transportavimo aksonais į ląstelių kūnus (Feng et al., 2023). BDNF į tinklainę daugiausiai pernešamas retrogradiniu būdu. Sutrikusi pernešimo sistema galimai neleidžia ganglinių ląstelių kūnuose pagamintam BDNF anterogradiniu būdu pasiekti ir prisijungti prie aksonų galuose esančių TrkB receptorių. Neurotrofinio faktoriaus trūkumas ląstelių kūnuose ir aksonų galuose gali suaktyvinti apoptozę inicijuojančius signalinius kelius (Dekeyster et al., 2015; Kimura et al., 2016). BDNF trūkumas aktyvuoja c-Jun N-galinės kinazės (JNK) tarpininkaujamą apoptozę inicijuojantį signalinį kelią, kurio metu aktyvuojami BCL2 šeimos apoptozę inicijuojantys baltymai ir sukeliama mitochondrijų disfunkcija. Atsižvelgiant į BDNF vaidmenį ganglinėms ląstelėms, organizmo natūralių BDNF gamybos endogeninių procesų slopinimas sukelia didelį pažeidimą ląstelėms. Įvairiuose tyrimuose įrodyta, jog nepakankamas BDNF-TrkB signalinio kelio aktyvavimas yra susijęs su ganglinių ląstelių praradimu (Iwabe et al., 2007; Osborne et al., 2018).

1.4. Glaukomos gyvūnų modeliai

Siekiant geriau suprasti ligas, ištirti jų pagrindinius mechanizmus ir išbandyti galimus gydymo būdus, dažnai naudojami ligos modeliai gyvūnuose. Į ligas panašioms sąlygoms imituoti ir jų poveikiui

tirti naudojamos įvairios gyvūnų rūšys, tačiau dažniausiai naudojami graužikai. Norint suprasti sudėtingą glaukomos patologiją ir analizuoti naujus gydymo būdus, šiuo metu naudojami įvairūs glaukomos modeliai (Agarwal et al., 2023; Loo et al., 2024). Nemažai glaukomos modelių, ypač žinduoliuose, yra pagrįsti lėtiniu akispūdžio padidėjimu ir vadinami akių hipertenzijos modeliais. Šiuo atveju mokslininkai dirbtinai sukelia padidėjusį akispūdį gyvūnams, blokuodami priekinės kameros skysčio ištekėjimo takus, suleisdami tokias medžiagas kaip hipertoninis fiziologinis tirpalas arba sukurdami genetinį pakitimą, kuris blokuoja skysčio ištekėjimą (Biswas, Wan, 2019; Mead, 2023; Ramírez et al., 2023).

Kaip jau žinome, glaukoma yra kompleksinė ir multifaktorinė liga, o padidėjęs akispūdis nėra vienintelis patologinis veiksnys. Todėl labai svarbu atsižvelgti ir į kitus veiksnius, tokius kaip genetinės mutacijos, kraujagyslių pokyčiai ir neurodegeneraciniai procesai (Tsai et al., 2024). Vienas iš patikimiausių modelių, tiriant ganglinių ląstelių išgyvenamumą ir regeneraciją arba, kitaip tariant, glaukomos neurodegeneracinius procesus, yra mechaninis regos nervo pažeidimas (angl. optic nerve crush) (Ahmed, 2023). Procedūra apima anestezuoto gyvūno regos nervo kontroliuojamą mechaninį suspaudimą, dėl kurio susidaro pažeidimas. Siekiant optimizuoti pažeidimo sunkumą gali būti reguliuojama suspaudimo jėga ir trukmė (Cammalleri, 2022). Tyrimai rodo, jog ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas koreliuoja su regos nervo suspaudimo jėgos impulsu ir trukme (Liu et al., 2020; Norat et al., 2021). Po pažeidimo, ganglinių ląstelių žūtis prasideda gana greitai – praėjus vienai savaitei žūsta apie 50 % ląstelių (Cammalleri, 2022). Taigi, šis modelis puikiai tinka tirti neuroprotekcinę medžiagų poveikį ganglinių ląstelių ir jų aksonų regeneracijai glaukomos vystymosi metu (Gokoffski et al., 2020).

1.5. Nuo mitochondrijų priklausoma ganglinių ląstelių žūtis

Neuronai yra ypatingai jautrūs mitochondrijų funkcijos pokyčiams, nes jiems reikia daug ATP energijos, kad išlaikytų elektrocheminius gradientus, būtinus optimaliam signalo perdavimui (Jassim et al., 2021). Dėl didelio energijos poreikio labai svarbu, kad tinklainės neuronai turėtų tinkamą mitochondrijų skaičių ir kad jos tinkamai funkcionuotų (Osborne et al., 2016). Buvo pastebėta, kad padidėjusio akispūdžio glaukomos modelyje farmakologinis atsakas į ATP išgyvenusiose ganglinėse ląstelėse sumažėjo (Niittykoski et al., 2010). Transplantavus iš kepenų izoliuotas mitochondrijas į ganglines ląsteles po mechaninio regos nervo pažeidimo, pastebėtas padidėjęs ganglinių ląstelių kūnų ir aksonų išgyvenamumas (Nascimento-dos-Santos et al., 2020). Taip pat pastebėta, kad glaukoma sergančių pacientų ATP kiekis kraujyje ir priekinės kameros skystyje yra ženkliai mažesnis nei kontrolinės grupės (Nucci et al., 2013). Apoptozę inicijuojančio BAX geno slopinimas lėtina ganglinių ląstelių žūtį mechaninio regos nervo pažeidimo modelyje (Donahue et al., 2020). Tuo tarpu apoptozę

slopinančių BCL2 ir BCL2L1 baltymų raiškos padidėjimas skatina ganglinių ląstelių išgyvenamumą mechaninio regos nervo pažeidimo modelyje (Donahue et al., 2021). Tai parodo, jog ganglinių ląstelių žūtis gali vykti nuo mitochondrijų priklausomu apoptozės būdu. Iniciavus ląstelių apoptozę, BAX baltymas patiria konformacinius pokyčius ir yra perkeliamas į išorinę mitochondrijų membraną. Šioje membranoje BAX sudaro heterodimerus su BCL-2 homologiniu antagonistu/žudiku (BAK) baltymu arba homodimerus su kitomis BAX baltymo molekulėmis. Dimerizacija palengvina BAX oligomerų susidarymą, kurie padidina mitochondrijų išorinės membranos laidumą. Tai sukelia citochromo c, antrojo mitochondrijų kilmės kaspazių aktyvatoriaus (SMAC), apoptozės proteazę aktyvuojančio faktoriaus 1 (Apaf-1) baltymų išsiskyrimą į citozolį. Į citozolį išsiskyres citochromas c ir Apaf-1 su prokaspaze-9 suformuoja apoptosomą, kurioje prokaspazė-9 virsta aktyvia iniciacijos kaspaze-9. Minėta kaspazė aktyvuoja kaspazę-3, katalitiškai suskaldydama jos aktyvacijos domeną. Aktyvuota kaspazė-3 atlieka įvairių ląstelės baltymų proteolitinį skaldymą ir sukelia ląstelių žūtį (Thomas et al., 2017; Risner et al., 2022; Maes et al., 2023).

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Naudoti tirpalai ir reagentai

2.1 lentelė. Audinių fiksavimui ir imunohistocheminiam dažymui naudoti tirpalai ir reagentai

Pavadinimas	Komponentai	Gamintojas	Katalogo nr.
4 % paraformaldehidas 0,1 M fosfatiniame buferiniame tirpale	4 % Paraformaldehidas 0,1 M fosfatinis buferis ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) Dejonizuotas vanduo	Paraformaldehidas – Merck goup $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – Merck group $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – Merck group	Paraformaldehidas – 8.18715.1000 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 1.06346.1000 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1.06580.1000
70 % etanolis	70 % nedenatūruotas etilo alkoholis Dejonizuotas vanduo	Nedenatūruotas etilo alkoholis – Vilniaus degtinė	Nedenatūruotas etilo alkoholis – 309.262110
Tris buferinis natrio chlorido tirpalas	0,661 % Tris-HCl 0,096 % Tris bazė 0,9 % NaCl Dejonizuotas vanduo	Tris-HCl – Carl Roth Tris bazė – Merck group NaCl – Thermo Fisher Scientific	Tris HCl – 9090.2 Tris bazė – T1503- 1KG NaCl – 10428420
Blokavimo tirpalas	10 % ožkos serumas 0,5 % Triton X-100 Tris buferinis natrio chlorido tirpalas	Ožkos serumas – Biowest Triton X-100 – Merck group	Ožkos serumas – S2000-500 Triton X-100 – T9284-100ML
Plovimo tirpalas	1 % ožkos serumas 0,1 % Triton X-100 Tris buferinis natrio chlorido tirpalas	Ožkos serumas – Biowest Triton X-100 – Merck group	Ožkos serumas – S2000-500 Triton X-100 – T9284-100ML
Pirminis triušio kilmės polikloninis antikūnas prieš RBPMS	Netaikoma	Phosphosolution	1830-RBPMS
Antrinis ožkos kilmės polikloninis antikūnas prieš triušį, žymėtas fluorescencine žyme Alexa Fluor 568	Netaikoma	Thermo Fisher Scientific	A11036
100 ng/ml DAPI	100 ng/ml DAPI Tris buferinis natrio chlorido tirpalas	DAPI – Carl Roth	DAPI – 6843.1
„Fluoroshield“ klijai	Netaikoma	Merck group	F6937-20ML

2.2 lentelė. Genų raiškos tyrimams naudoti tirpalai ir reagentai

Pavadinimas	Komponentai	Gamintojas	Katalogo nr.
Trizol™ reagentas	Netaikoma	Thermo Fisher Scientific	15596026
Chloroformas	Netaikoma	Thermo Fisher Scientific	10122190
70 % etanolio tirpalas be nukleazių	70 % nedenatūruotas etilo alkoholis Vanduo be nukleazių	Nedenatūruotas etilo alkoholis – Vilniaus degtinė Vanduo be nukleazių – Thermo Fisher Scientific	Nedenatūruotas etilo alkoholis – 309.262110 Vanduo be nukleazių - R0582
PureLink™ RNR Mini rinkinys RNR grynimui	Naudoti komponentai: Pirmasis plovimo tirpalas Antrasis plovimo tirpalas	Thermo Fisher Scientific	12183025
Deoksiribonukleazių tirpalas	Vienam mėginiui 80 µl: 8 µl 10X deoksiribonukleazių reakcijos buferis I 10 µl deoksiribonukleazių tirpalas 62 µl vanduo be nukleazių	Thermo Fisher Scientific	12185010
Kopijinės DNR atvirkštinės transkripcijos rinkinys	10X atvirkštinės transkriptazės buferis 25X deoksinukleotidų mišinys (100 mM) 10X atvirkštinės transkriptazės atsitiktiniai pradmenys MultiScribe atvirkštinė transkriptazė Ribonukleazės inhibitorius	Thermo Fisher Scientific	4374966
2X TaqMan Fast Advanced kPGR reakcijos mišinys	Netaikoma	Thermo Fisher Scientific	4444963
20X TaqMan tiriamųjų genų pradmenų mišinys	Pažymėti 6-FAM dažų: Žiurkės NEFL, BAX, STAT3 Pažymėti VIC dažų: Žiurkės I tipo kolagenas, kaspazė 3, BCL2	Thermo Fisher Scientific	NEFL, BAX, STAT3 – 4331182 I tipo kolagenas, kaspazė 3, BCL2 – 4448489
60X TaqMan kontrolinio geno pradmenų mišinys	Žiurkės GAPDH, pažymėtas ABY dažų	Thermo Fisher Scientific	CCU001S

2.2. Pagrindinė naudota įranga

2.3 lentelė. Pagrindinė tyrimų metu naudota įranga ir jos paskirtis

Pavadinimas	Gamintojas, šalis	Paskirtis
Analitinės svarstyklės	RADWAG, Lenkija	Genų raiškos tyrimams skirtų tinklainių svėrimas
Šulinėlių plokštelių purtyklė PSU-2T mini-shaker	Biosan, Latvija	Imunohistocheminio dažymo šulinėlių plokštelėse esančių skysčių maišymas
Leica DM6 B mikroskopas su DFC3000 G kamera	Leica Microsystems, Vokietija	Imunohistocheminio dažymo būdu nudažytų tinklainių vaizdinimas
Purtyklė Vortex-Genie 2	Scientific Industries, JAV	Genų raiškos tyrimai
Centrifuga 5430 R	Eppendorf, Germany	RNR gryninimo procedūra
NanoDrop OneC spektrofotometras	Thermo Fisher Scientific	RNR koncentracijos matavimas
Realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos sistema QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific	Genų raiškos tyrimai

2.3. Mechaninis regos nervo pažeidimas

Tyrimai su laboratoriniais gyvūnais buvo atlikti gavus Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimą, atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą nr. G2-216. Mechaninio regos nervo pažeidimo procedūrą atliko kolegos iš *in vivo* komandos įmonėje UAB „Experimentica“.

Šešių-8 savaičių žiurkių patinams mechaninis regos nervo pažeidimas atliktas dešinems akims, o kairės akys paliktos kaip kontrolė (nepažeistos). Anestezuotoms žiurkėms temporalinėje akies dalyje žirklutėmis įkerpama odena ir savaime užsidarančiu chirurginiu plėstuku į gylį praplečiami aplink akį esantys audiniai – raumenys ir jungiamasis audinys. Akies audiniai plečiami, kol yra atidengiamas regos nervas. Galiausiai, atidengus regos nervą, jis 3 sekundes mechaniškai suspaudžiamas 2-3 milimetrų atstumu nuo akies (Kalesnykas et al., 2012).

2.4. Tyrime naudotos eksperimentinės grupės

Procedūrą atliko kolegos iš *in vivo* komandos įmonėje UAB „Experimentica“.

Brimonidinas (teigiama kontrolė, AbbVie, JAV) ir 0,9 % NaCl tirpalas (neigiama kontrolė, izotoninis tirpalas, B Braun, Vokietija) buvo lašinami į dešinę akį 3 kartus per dieną dešimt dienų:

gydymas pradėtas trys dienos prieš regos nervo pažeidimą (-3-čia tyrimo diena) ir tęsiamas iki septintos dienos po regos nervo pažeidimo (7-ta tyrimo diena). BDNF (Alomone labs, Izraelis) ir izotoninio tirpalo intravitrealinės injekcijos (IVT) atliktos po mechaninio regos nervo pažeidimo, tą pačią dieną (0-inė diena). Antros ir šeštos grupės gyvūnams papildomai atlikta intravitrealinė injekcija 3-čią dieną po regos nervo pažeidimo.

Tyrimė naudotos šios grupės:

- 1 grupė: izotoninis tirpalas, IVT, audinių rinkimas 3-čią dieną;
- 2 grupė: izotoninis tirpalas, IVT, audinių rinkimas 7-tą dieną;
- 3 grupė: Brimonidinas, lašinimas, audinių rinkimas 3-čią dieną;
- 4 grupė: Brimonidinas, lašinimas, audinių rinkimas 7-tą dieną;
- 5 grupė: BDNF IVT, audinių rinkimas 3-čią dieną;
- 6 grupė: BDNF IVT, audinių rinkimas 7-tą dieną;
- 7 grupė: izotoninis tirpalas, lašinimas, audinių rinkimas 3-čią dieną;
- 8 grupė: izotoninis tirpalas, lašinimas, audinių rinkimas 7-tą dieną.

Kiekvienoje grupėje buvo naudoti 8-9 gyvūnai, kurių akių tinklainės buvo nudažytos imunohistocheminiu būdu, ir 3 gyvūnai, kurių tinklainės buvo paskirtos genų raiškos tyrimams.

2.5. Audinių rinkimas

Trečią (1, 3, 5 ir 7 grupės) arba septintą (2, 4, 6 ir 8 grupės) tyrimo dieną po mechaninio regos nervo pažeidimo žiurkės buvo eutanizuojamos. Audiniai surenkami pagal šias procedūras:

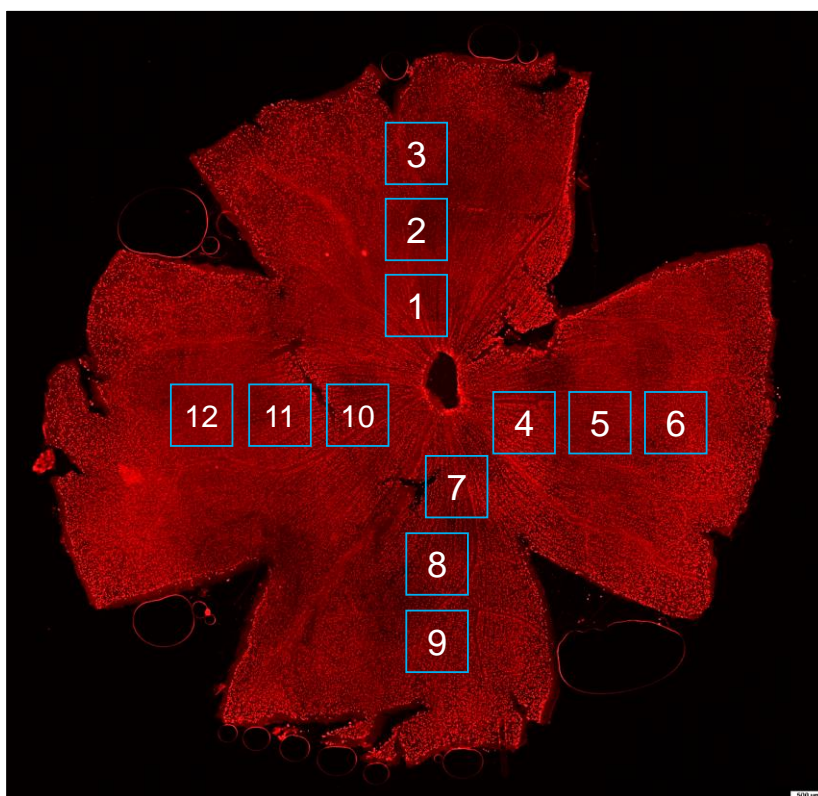
- Imunohistocheminiam dažymui skirtų gyvūnų akys buvo išimtos ir fiksuojamos 4 % paraformaldehido tirpale. Praėjus 30 minučių buvo paruošiamos akių tinklainių išklotinės ir fiksuojamos iki kitos dienos ryto.
- Genų raiškos tyrimams skirtų gyvūnų akys buvo išimamos su steriliais instrumentais. Laboratorijos stalo paviršius nuvalomas 70 % etanolio tirpalu. Su steriliais instrumentais išimamos akių tinklainės, įdedamos į iš anksto pasvertus kriomėgintuvėlius ir užšaldomos skystame azote. Kriomėgintuvėliai su tinklainėmis laikomi -80 °C temperatūroje.

Gyvūnus eutanizavo ir akių audinius surinko kolegos iš *in vivo* komandos įmonėje UAB „Experimentica“.

2.6. Tinklainių išklotinių imunohistocheminis dažymas ir analizė

Po fiksavimo tinklainių išklotinės 5-6 valandas 4 °C temperatūroje buvo plaunamos Tris buferiniu natrio chlorido tirpalu, kuris plovimo metu pakeičiamas keletą kartų. Audiniai blokuojami kambario temperatūroje 30 min., naudojant blokavimo tirpalą, susidedantį iš 10 % ožkos serumo, 0,5 % Triton X-100 ir Tris buferinio natrio chlorido tirpalo. Audiniai plaunami plovimo tirpalu, susidedančiu iš 1 % ožkos serumo, 0,1 % Triton X-100 ir Tris buferinio natrio chlorido tirpalo, 10 min. kambario temperatūroje. Audiniai inkubuojami su 200 kartų plovimo tirpalu skiestu pirminiu triušio kilmės antikūnu prieš RBPMS per naktį 4 °C temperatūroje. Po to audiniai praplaunami plovimo tirpalu 3 kartus po 10 min. kambario temperatūroje. Audiniai inkubuojami su 500 kartų plovimo tirpalu skiestu antriniu ožkos kilmės antikūnu prieš triušį, žymėtu fluorescencine žyme Alexa Fluor 568, 3 val. 4 °C temperatūroje. Audiniai praplaunami plovimo tirpalu 3 kartus po 10 min. kambario temperatūroje. Audiniai inkubuojami su Tris buferiniame natrio chlorido tirpale paruoštu 100 ng/ml koncentracijos DAPI tirpalu (ląstelės branduolių žymuo, besijungiantis prie DNR) 30 min. kambario temperatūroje. Audiniai praplaunami plovimo tirpalu 2 kartus po 10 min. Tinklainės išklojamos ant objektinių stikliukų ir uždengiamos dengiamaisiais stikliukais naudojant „Fluoroshield“ kljus. Stikliukai laikomi tamsoje 4 °C temperatūroje.

Atlikus imunohistocheminį dažymą, tinklainės buvo vaizdinamos fluorescenciniu mikroskopu 12-oje skirtingų vietų (4 periferijoje, 4 viduryje ir 4 centrinėje tinklainės vietose) (2.1 pav.). Padarius nuotrauką, RBPMS antikūnu žymėtos ganglinės ląstelės skaičiuotos rankiniu būdu naudojant ImageJ (NIH, JAV) programinę įrangą. Ląstelių skaičius buvo įvertintas kaip visų 12 nuotraukų vidurkis ir perskaičiuojamas į ląstelių kiekį kvadratiname milimetre.



2.1 pav. Tinklainės išsklotinė, pažymėta RBPMS antikūnu. Ląstelių kiekio įvertinimui buvo padarytos nuotraukos 12-oje skirtingų tinklainės vietų (mėlyni kvadratai).

2.7. RNR išskyrimas iš tinklainių

Prieš RNR išskyrimą, kriomėgintuvėlis su užšaldyta tinklaine yra pasveriamas. Ant audinio užpilama 200 μ l Trizol™ reagento ir turinys yra perkeliamas iš kriomėgintuvėlio į mėgintuvėlį su aštriakampiais akmenukais (angl. garnet beads), skirtais audinių lizei. Audinys homogenizuojamas maišant ant purtyklės 5 min. arba kol suyra. Homogenatas surenkamas į naują mėgintuvėlį. Aštriakampiai akmenukai užpilami 100 μ l Trizol™ reagentu, siekiant užtikrinti pilną RNR surinkimą, ir maišomi dar apie 1-2 minutes. Homogenatas surenkami į tą patį mėgintuvėlį. Ant homogenato užpilama chloroformo santykiu 1:5. Mišinys maišomas rankose 15 sek. ir inkubuojamas 3 min. kambario temperatūroje. Mišinys centrifuguojamas 15 min. 4 °C temperatūroje 11 000 G jėga. Po centrifugavimo, supernatantas surenkamas ir užpilamas toks pat kiekis 70 % etanolio tirpalo be nukleazių. Toliau RNR gryninimas yra atliekamas su PureLink™ RNR Mini rinkiniu. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir visas mišinys perkeliamas ant centrifuginės gryninimo kolonėlės membranos. Kolonėlė centrifuguojama 15 sek. 12 000 G jėga. Supernatantas išpilamas, membrana įstatoma atgal į mėgintuvėlį ir ant jos užpilama 350 μ l pirmojo plovimo tirpalo (angl. Wash Buffer I). Centrifuguojama 15 sek. 12 000 G jėga. Membrana įstatoma į naują surinkimo mėgintuvėlį ir ant jos užpilama 80 μ l deoksiribonukleazių tirpalo. Mėgintuvėlis inkubuojamas 15 min. kambario temperatūroje. Ant membranos užpilama 350 μ l pirmojo

plovimo tirpalo ir centrifuguojama 15 sek. 12000 G jėga. Membrana įstatoma į naują surinkimo mėgintuvėlį ir ant jos užpilama 500 µl antrojo plovimo tirpalo (angl. Wash Buffer II). Centrifuguojama 15 sek. 12 000 G jėga. Supernatantas išpilamas, membrana įstatoma atgal į mėgintuvėlį ir ant jos pakartotinai užpilama 500 µl antrojo plovimo tirpalo. Centrifuguojama 15 sek. 12 000 G jėga. Supernatantas išpilamas, membrana įstatoma atgal į mėgintuvėlį. Centrifuguojama 1 min. 12 000 G jėga, siekiant išdžiovinti membraną. Kolonėlė įdedama į naują mėgintuvėlį (angl. recovery tube). Ant membranos užlašinama 30 µl vandens be nukleazių. Inkubuojama 1 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama 2 min. 12 000 G jėga. Mėgintuvėlyje lieka išgryninta RNR.

2.8. RNR kiekio nustatymas

RNR koncentracija išmatuojama naudojant NanoDrop OneC spektrofotometrą (Thermo Fisher Scientific). Ant matavimo platformos užlašinama 1 µl vandens be nukleazių fono įvertinimui. Platforma nuvaloma servetėle ir paeiliui po 1 µl užlašinama išskirta tinklainės RNR. Kiekvieno mėginio matavimas atliekamas 2-3 kartus. Absorbcijos matavimai atliekami ties 260 nm, 280 nm ir 230 nm bangos ilgiais. Likęs RNR kiekis mėgintuvėlyje (27-28 µl) užšaldomas -80 °C temperatūroje. Spektrofotometro programa automatiškai paskaičiuoja RNR koncentraciją (ng/µl) pagal absorbcijos duomenis. Įvertinamas RNR grynumas analizuojant 260/280 ir 260/230 absorbcijų santykius. Gryna RNR yra laikoma tuomet, kai šie santykiai yra apie 2,0. Apskaičiuojami RNR koncentracijos ir grynumo aritmetiniai vidurkiai. RNR koncentracija perskaičiuojama į µg/µl.

2.9. Kopijinės DNR sintezė

RNR skiedžiama iki 0,03 µg/µl koncentracijos su vandeniu be nukleazių. Paruošiamas reakcijos mišinys, kuris yra naudojamas kopijinės DNR (kDNR) sintezės reakcijai atlikti, sumaišant išvardintus reagentus iš kopijinės DNR atvirkštinės transkripcijos rinkinio (kiekiai surašyti vienam plokštelės šulinėliui užpildyti): 10X atvirkštinės transkriptazės buferis – 2 µl, 25X deoksinukleotidų mišinys (100 mM) – 0,8 µl, 10X atvirkštinės transkriptazės atsitiktiniai pradmenys – 2 µl, MultiScribe atvirkštinė transkriptazė – 1 µl, ribonukleazės inhibitorius – 1 µl, vanduo be nukleazių – 3,2 µl. Kaip kontrolė, paruošiamas reakcijos mišinys be atvirkštinės transkriptazės, kuriame reakcija turėtų nevykti, sumaišant išvardintus reagentus iš kopijinės DNR atvirkštinės transkripcijos rinkinio (kiekiai surašyti vienam plokštelės šulinėliui užpildyti): 10X atvirkštinės transkriptazės buferis – 2 µl, 25X deoksinukleotidų mišinys (100 mM) – 0,8 µl, 10X atvirkštinės transkriptazės atsitiktiniai pradmenys – 2 µl, ribonukleazės inhibitorius – 1 µl, vanduo be nukleazių – 4,2 µl. Paruošti mišiniai išpilstomi po 10 µl į 96 šulinėlių

plokštelę. Į atitinkamus šulinėlius, kuriuose yra reakcijos mišinys, įpilama po 10 µl RNR skiedimų arba vandens be nukleazijų neigiamai reakcijos kontrolei. Plokštelė užklijuojama lipnia plėvele. Plokštelės turinys sumaišomas ant purtyklės. Centrifuguojama 1 min. 2000 G jėga. Plokštelė įdedama į QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) instrumentą. Paleidžiamas protokolas, skirtas kopijinės DNR sintezei. Protokolo etapai: pradmenų prilydymas 10 min. 25 °C, kDNR sintezė 2 val. 37 °C, fermentų inaktyvacija 5 min. 85 °C, laikymas po reakcijos neribotai 4 °C. Po reakcijos, plokštelės turinys perpilamas į mėgintuvėlius ir užšaldomas -80 °C temperatūroje.

2.10. Realus laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos atlikimas (kPGR)

kDNR skiedžiama iki 1 ng/µl su vandeniu be nukleazijų. Paruošiamas reakcijos mišinys, kuris yra naudojamas kDNR padauginimui, sumaišant išvardintus reagentus (kiekiai surašyti vienam plokštelės šulinėliui užpildyti): 2X TaqMan Fast Advanced Master Mix – 7,5 µl, 20X TaqMan tiriamųjų genų pradmenų mišiniai – po 0,75 µl (iki 2 skirtingų), 60X TaqMan kontrolinio geno pradmenų mišinys – 0,25 µl, vanduo be nukleazijų – 0,75 arba 1,5 µl. Paruoštas reakcijos mišinys išpilstomas po 10 µl į 96 šulinėlių plokštelę. Į šulinėlius su mišiniu įpilama po 5 µl kDNR skiedimų. Supilstoma po tris techninius pakartojimus kiekvienam mėginiui. Plokštelė užklijuojama lipnia plėvele. Plokštelės turinys sumaišomas ant purtyklės. Centrifuguojama 2000 G jėga 1 min. Plokštelė įdedama į realaus laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (kPGR) aparatą (QuantStudio 3). Paleidžiamas protokolas, skirtas genų amplifikacijai. Protokolo etapai: inkubacija 2 min. 50 °C, fermentų aktyvacija 2 min. 95 °C, DNR denatūracija 1 sek. 95 °C ir pradmenų prilydymas/DNR amplifikacija 20 sek. 60 °C (40 ciklų), laikymas po reakcijos neribotai 4 °C. Gauti kPGR duomenys analizuojami Design and Analysis (Thermo Fisher Scientific) programine įranga. Santykiniam realaus laiko PGR duomenų kiekybiniam įvertinimui naudojamas $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodas (Livak, Schmittgen, 2001).

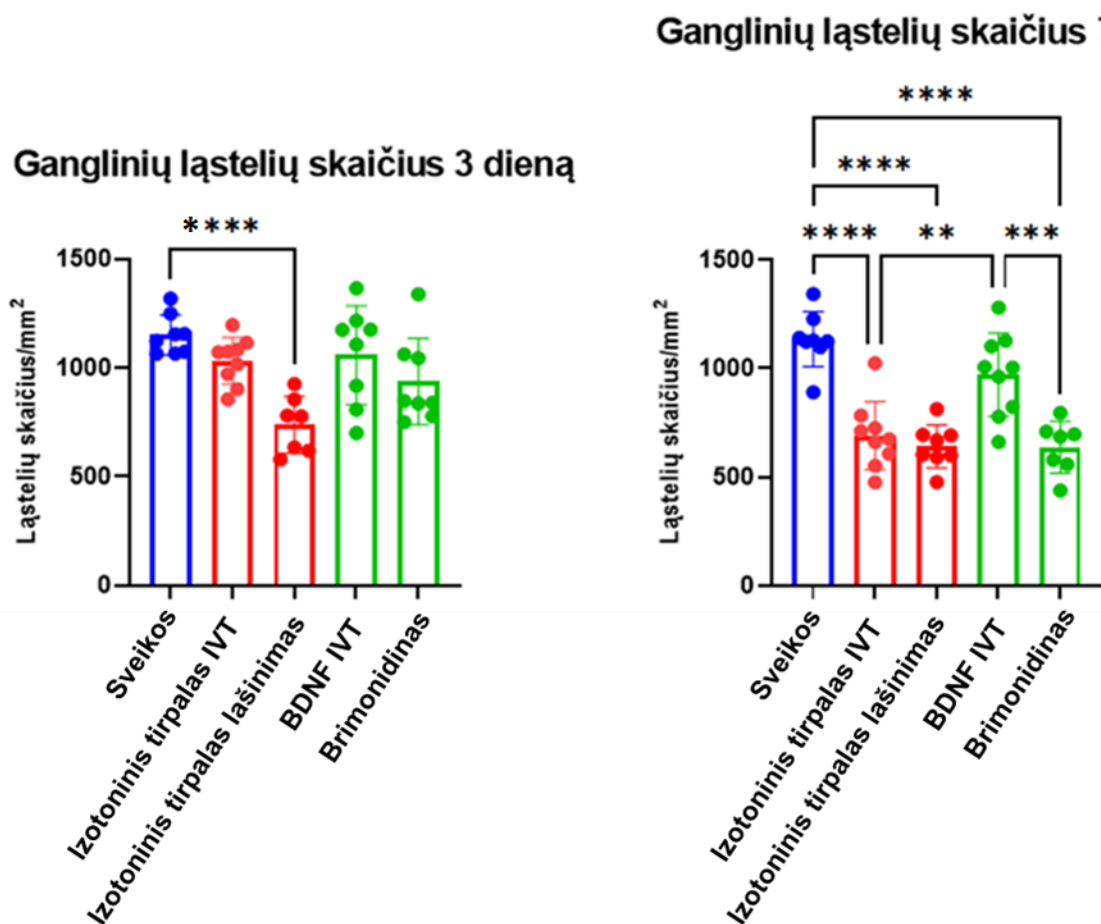
2.11. Statistinė duomenų analizė

Statistinė analizė atlikta su GraphPad Prism 10 programine įranga (GraphPad Software, JAV). Duomenų rinkiniams pritaikyta vieno faktoriaus dispersinė analizė (angl. One-Way ANOVA) ir atskirų grupių palyginimui pritaikytas Šidako daugybinio palyginimo (angl. multiple comparison) testas. Ląstelių skaičiavimo ir genų raiškos duomenų grafikuose pavaizduoti vidurkiai su standartiniais nuokrypiais (angl. standard deviation, SD). Reikšmingi skirtumai identifikuoti tuomet, kai P vertė mažesnė nei 0,05.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Imunohistocheminis dažymas

Sėkmingas mechaninio regos nervo pažeidimas sukelia ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimą lyginant su sveikomis akimis. Siekiant įvertinti modelio indukcijos efektyvumą buvo lyginami sveikų akių ir neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo ganglinių ląstelių skaičiai (3.1 pav.). Praėjus 3 dienoms po modelio indukcijos, dar nebuvo reikšmingo skirtumo tarp sveikų akių ir neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo IVT grupių (ANOVA $***P<0,001$, Šidako daugybinio palyginimo testas $P=0,63$). Tuo tarpu, izotoninio tirpalo lašinimo grupėje 3 dieną jau buvo matomas reikšmingas skirtumas lyginant su sveikomis akimis ($****P<0,0001$, Šidako daugybinio palyginimo testas). Tai parodo, kad intravitrealinė injekcija galimai suaktyvina imuninį atsaką trumpuoju 3 dienų laikotarpiu. Reikšmingą ląstelių skaičiaus sumažėjimą abejose izotoninio tirpalo grupėse jau matome 7 dieną po mechaninio regos nervo pažeidimo – skirtumas, palyginus su sveikomis akimis, yra statistiškai reikšmingas (ANOVA $****P<0,0001$, Šidako daugybinio palyginimo testas $****P<0,0001$).



3.1 pav. Skirtingų tyrimo grupių ganglinių ląstelių skaičius 3-čią ir 7-tą dienomis po modelio indukcijos.

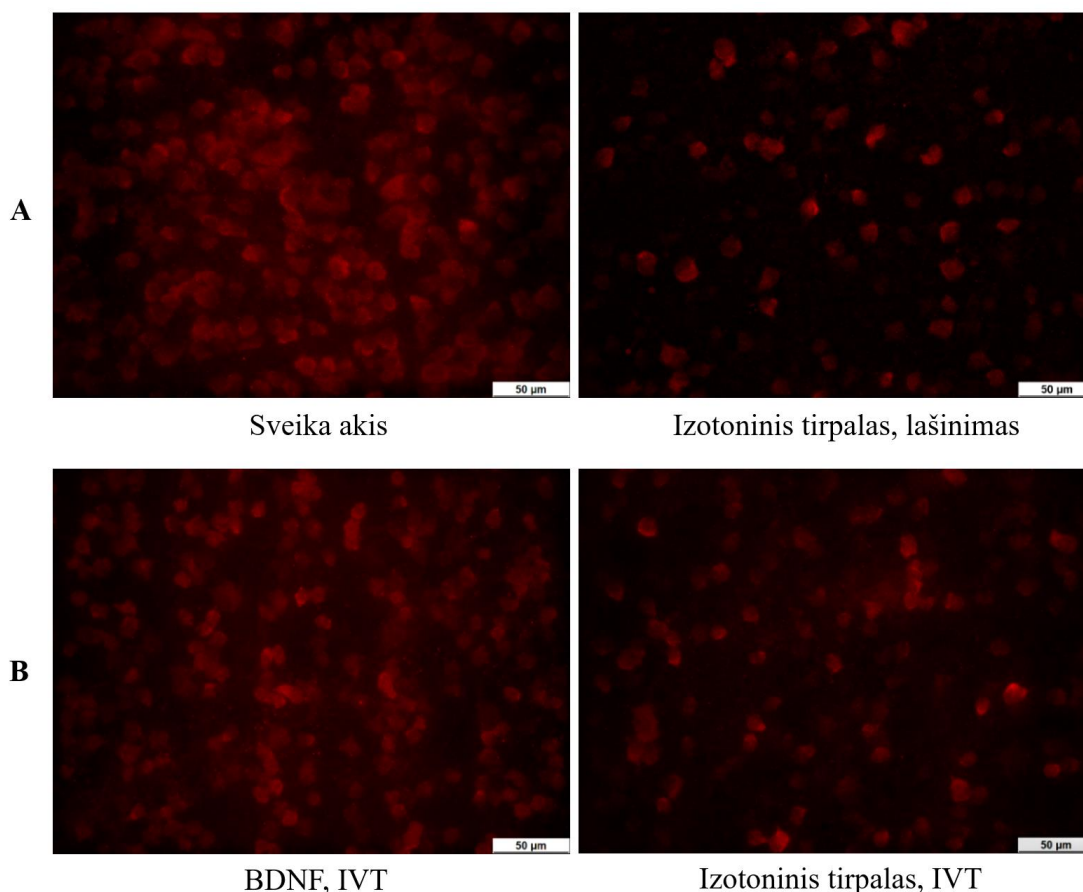
Neurotrofinio faktoriaus BDNF neuroprotekcinis poveikis buvo įvertintas palyginus BDNF IVT grupės ląstelių skaičių su sveikų akių ir neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo IVT grupių ganglinių ląstelių skaičiumi (3.1 pav.): ląstelių skaičius BDNF IVT grupėje statistiškai nesiskyrė nuo sveikų akių grupių tiek 3 dieną ($P=0,8701$, Šidako daugybinio palyginimo testas), tiek ir 7 dieną ($P=0,1712$, Šidako daugybinio palyginimo testas) po modelio indukcijos. Tuo tarpu ląstelių skaičius neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo IVT grupėje ($**P=0,0015$, Šidako daugybinio palyginimo testas) ar brimonidinu gydytoje grupėje ($***P=0,0004$, Šidako daugybinio palyginimo testas) statistiškai reikšmingai sumažėjo 7 dieną po indukcijos lyginant su BDNF IVT. Šie rezultatai patvirtina, kad neurotrofinis faktorius BDNF padeda išsaugoti tinklainės ganglines ląsteles. Svarbu paminėti, jog šis tyrimas nesuteikia informacijos apie ląstelių funkcinę būklę ir gyvybingumą.

Iš 3.1 lentelės duomenų matome, jog 3-čią iki 7-tą dieną po regos nervo pažeidimo ląstelių skaičius izotoninio tirpalo IVT grupėje sumažėjo atitinkamai 10 % ir 39 %. Neigiamos kontrolės, izotoninio tirpalo lašinimo, grupėje ląstelių žūtis prasideda anksčiau, nes matome ląstelių skaičiaus sumažėjimą net 44 % 7-tą dieną po modelio indukcijos. Tuo tarpu BDNF IVT grupės ląstelių skaičius sumažėjo tik 14 % palyginus su sveikomis akimis ir išliko beveik trečdaliu (29 %) didesnis už izotoninio tirpalo IVT grupės ląstelių skaičių.

3.1 lentelė. Skirtingų tyrimo grupių ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas 3-čią ir 7-tą dienomis po modelio indukcijos, palyginus su sveikomis akimis. Duomenys pateikti kaip vidurkiai su \pm standartine vidurkio paklaida.

		Tyrimo grupė				
		Izotoninis tirpalas, IVT	Izotoninis tirpalas, lašinimas	BDNF, IVT	Brimonidinas, lašinimas	Sveikos akys
Ganglinių ląstelių skaičius/mm ²	3-čią dieną	1032 \pm 36	739 \pm 49	1058 \pm 80	937 \pm 70	1151 \pm 32
	7-tą dieną	691 \pm 52	642 \pm 35	972 \pm 64	638 \pm 45	1135 \pm 45
Absoliutus skirtumas nuo sveikų akių	3-čią dieną	-119	-412	-93	-214	NT
	7-tą dieną	-444	-493	-163	-497	NT
Santykinis skirtumas, %	3-čią dieną	10	36	8	19	NT
	7-tą dieną	39	44	14	36	NT

Apibendrinant, mechaninio regos nervo pažeidimo modelis buvo indukuotas sėkmingai ir pasižymi reikšminga ganglinių ląstelių žūtimi. BDNF, kaip ir tikėtasi, padėjo išsaugoti tinklainės ganglines ląsteles. RBPMS imunohistocheminio dažymo pavyzdžiai yra pristatyti 3.2 pav.



3.2 pav. Pavyzdinės, praėjus 7-ioms dienoms po mechaninio regos nervo pažeidimo, RBPMS antikūnu žymėtų ganglinių ląstelių nuotraukos. **A** – mechaninio regos nervo pažeidimo modelio indukcijos efektyvumas, **B** – BDNF neuroprotekcinis poveikis.

3.2. RNR koncentracija ir grynumas

Atlikus tinklainių RNR išskyrimą buvo apskaičiuota RNR koncentracija ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ir įvertintas grynumas remiantis absorbcijos santykių 260/280 nm ir 260/230 nm vertėmis. RNR pasižymi didžiausia absorbcija esant 260 nm bangos ilgiui. Tuo tarpu esant 280 nm bangos ilgiui didžiausia absorbcija pasižymi baltymai, o 230 nm – tokios organinės medžiagos kaip fenolis, guanidino tiocianatas ir angliavandeniai. RNR laikoma gryna, kai santykiai 260/280 nm ir 260/230 nm yra apie 2,0.

Iš 3.2 lentelės duomenų matome, jog visų mėginių 260/280 absorbcijos santykiai svyruoja nuo 2,1 iki 2,2. Tai parodo aukštą mėginių grynumą nuo baltymų priemaišų. Tuo tarpu įvertinus 260/230 absorbcijos santykius, 10-ame mėginyje pastebėtas didelis užterštumas kitais organiniais junginiais – 260/230 absorbcijos santykio vertė lygi 1,20. Minėtas mėginys nebuvo atmestas, nes tolimesniuose tyrimuose mėginio rezultatai buvo panašūs į kitų tos pačios tiriamosios grupės mėginių rezultatus. Visi kiti mėginiai pasižymėjo aukštu grynumu – absorbcijos santykių vertės svyravo nuo 1,9 iki 2,4. Kadangi

kopijinės DNR sintezei RNR skiedžiama iki 0,03 µg/µl koncentracijos, visų RNR mėginių koncentracija buvo pakankama tolimesniems tyrimams (koncentracija svyravo nuo 0,18 µg/µl iki 0,45 µg/µl).

3.2 lentelė. RNR koncentracija ir grynumas. Duomenys pateikti kaip 2-3 matavimų aritmetiniai vidurkiai.

Mėginio nr.	Tyrimo grupė	RNR koncentracija, µg/µl	260/280 absorbcijos santykis	260/230 absorbcijos santykis
1	Izotoninis tirpalas, IVT, 3-čią dieną	0,280	2,137	2,304
2	Izotoninis tirpalas, IVT, 3-čią dieną	0,328	2,146	2,268
3	Izotoninis tirpalas, IVT, 3-čią dieną	0,327	2,146	2,312
4	Izotoninis tirpalas, IVT, 7-tą dieną	0,394	2,160	2,342
5	Izotoninis tirpalas, IVT, 7-tą dieną	0,321	2,151	2,011
6	Izotoninis tirpalas, IVT, 7-tą dieną	0,316	2,153	2,283
7	Brimonidinas, 3-čią dieną	0,267	2,151	2,099
8	Brimonidinas, 3-čią dieną	0,250	2,152	2,304
9	Brimonidinas, 3-čią dieną	0,176	2,151	2,286
10	Brimonidinas, 7-tą dieną	0,390	2,173	1,203
11	Brimonidinas, 7-tą dieną	0,255	2,140	1,924
12	Brimonidinas, 7-tą dieną	0,259	2,146	2,106
13	BDNF IVT, 3-čią dieną	0,285	2,156	2,097
14	BDNF IVT, 3-čią dieną	0,313	2,147	2,244
15	BDNF IVT, 3-čią dieną	0,315	2,152	2,248
16	BDNF IVT, 7-tą dieną	0,312	2,151	2,235
17	BDNF IVT, 7-tą dieną	0,308	2,139	2,278
18	BDNF IVT, 7-tą dieną	0,349	2,156	2,162
19	Izotoninis tirpalas, lašinimas, 3-čią dieną	0,191	2,127	2,048
20	Izotoninis tirpalas, lašinimas, 3-čią dieną	0,445	2,160	2,219
21	Izotoninis tirpalas, lašinimas, 3-čią dieną	0,378	2,141	2,351
22	Izotoninis tirpalas, lašinimas, 7-tą dieną	0,370	2,133	2,384
23	Izotoninis tirpalas, lašinimas, 7-tą dieną	0,357	2,129	2,366
24	Izotoninis tirpalas, lašinimas, 7-tą dieną	0,360	2,131	2,333
25	Sveikos akys	0,252	2,124	2,036
26	Sveikos akys	0,201	2,118	2,414
27	Sveikos akys	0,177	2,107	2,347
28	Sveikos akys	0,331	2,132	2,381
29	Sveikos akys	0,390	2,136	2,301

3.3. Genų raiškos tyrimai

3.3.1. Pasirinkti genų žymenys

Siekiant įvertinti regos nervo pažeidimo ir vėlesnio BDNF gydymo poveikį genų raiškai buvo pasirinkti žymenys, dalyvaujantys apoptozės inicijavimo, apoptozės slopinimo ir neuronų struktūros palaikymo procesuose. Buvo pasirinkti du apoptozę inicijuojantys genų žymenys – BAX ir kaspazė 3, du apoptozę slopinantys genų žymenys – BCL2 ir STAT3, ir du neurono struktūros palaikyme

dalyvaujantys genų žymenys – NEFL ir I tipo kolagenas. Išsamesnis pasirinktų genų koduojamų baltymų aprašymas pateiktas 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Pasirinktų genų koduojamų baltymų funkcijos.

Baltymas	Funkcijos
BAX	Apoptozę inicijuojantis BCL-2 šeimos baltymas. Po aktyvacijos BAX baltymai persikelia iš citozolio į mitochondrijų išorinę membraną. Šioje membranoje BAX sudaro heterodimerus su BCL-2 homologiniu antagonistu/žudiku (BAK) baltymu arba homodimerus su kitomis BAX baltymo molekulėmis. Dimerizacija palengvina BAX oligomerų susidarymą, kurie padidina mitochondrijų išorinės membranos laidumą. Tai sukelia citochromo c, SMAC (antrasis mitochondrijų kilmės kaspazių aktyvatorius), Apaf-1 (apoptozinis proteazę aktyvuojantis faktorius 1) baltymų išsiskyrimą į citozolį ir paskatina ląstelių žūtį (Risner et al., 2022).
Kaspazė-3	Apoptozę inicijuojantis cisteino proteazių šeimos narys. Į citozolį išsiskyrę citochromas c ir APAF-1 su prokaspazė-9 suformuoja apoptosomą, kurioje prokaspazė-9 virsta aktyvia iniciacijos kaspazė-9. Minėta kaspazė aktyvuoja kaspazė-3, katalitiškai suskaldydama jos aktyvacijos domeną. Aktyvuota kaspazė-3 atlieka įvairių ląstelės baltymų proteolitinį skaldymą ir sukelia ląstelių žūtį (Thomas et al., 2017).
BCL2	Apoptozę slopinantis BCL-2 šeimos baltymas. Šis baltymas slopina apoptozę inicijuojančius baltymus – BAX ir BAK. Dėka to išvengiama mitochondrijų išorinės membranos laidumo didėjimo. Dėl to stabdomas citochromo c, SMAC, Apaf-1 baltymų išsiskyrimas į citozolį (Singh et al., 2019).
STAT3	Transkripcijos signalo keitiklių ir aktyvatorių (STAT) šeimos baltymas. Ekstraląstelinį signalų citokinai ir neurotrofiniai faktoriai jungiasi prie atitinkamų receptorių ląstelės paviršiuje. Tai inicijuoja STAT3 fosforilinimo signalinį kelią. Dėka to STAT3 aktyvuojamas ir veikia kaip transkripcijos faktorius, inicijuojantis apoptozę slopinančių genų raišką. Tai didina neuroprotektinį poveikį tinklainės ganglinėms ląstelėms (Kim et al., 2018; Husain et al., 2021).
NEFL	Neurofilamentų lengvoji grandinė (NEFL) yra struktūrinis neuronų citoskeleto baltymas. Ši grandinė, kartu su vidutine ir sunkiąja grandinėmis, prisideda prie neurofilamentų formavimosi. Neurofilamentai padeda palaikyti neuronų struktūrą, aksonų vientisumą ir formą (Lin et al., 2023).
I tipo kolagenas	Struktūrinis baltymas, randamas įvairių audinių, įskaitant tinklainę ir optinį nervą, tarpląstelinėje medžiagoje. Jis padeda palaikyti audinių struktūros vientisumą ir organizuotumą. Šis baltymas tinklainės ganglinėms ląstelėms suteikia erdvinę orientaciją, padėdamas joms judėti ir prisitvirtinti vystymosi metu. Tai svarbu tinkamam ląstelių išdėstymui ir funkcijai tinklainėje (Song et al., 2021).

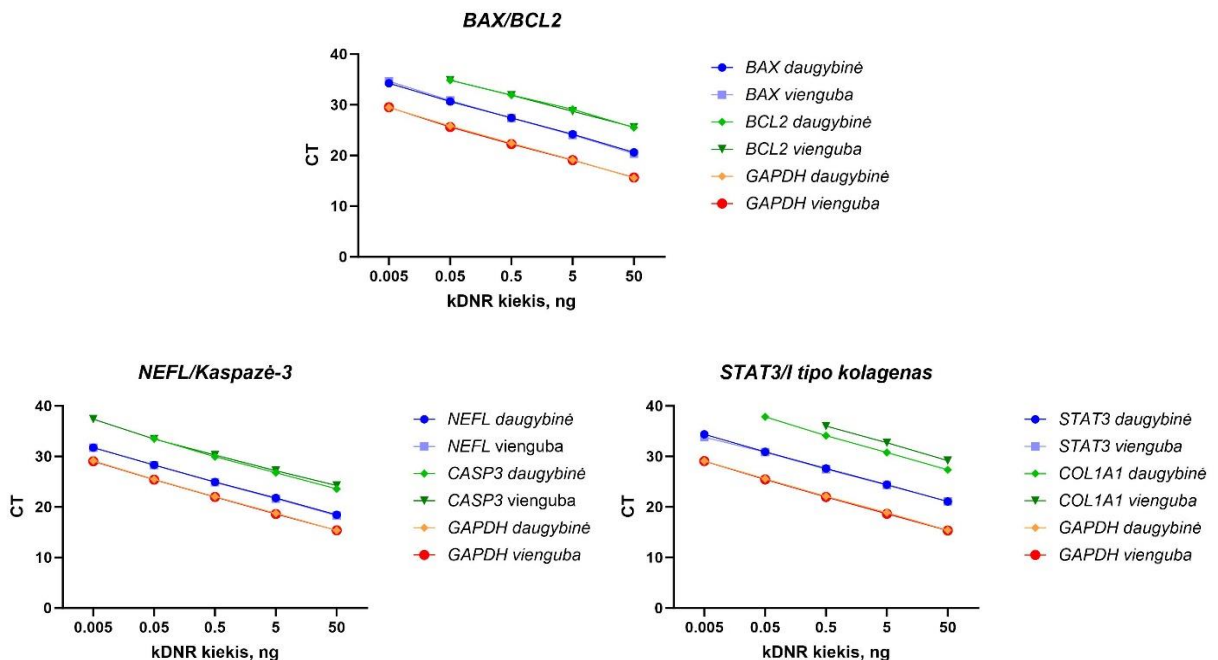
3.3.2. DNR amplifikacijos efektyvumas

Siekiant optimizuoti DNR amplifikacijoje naudojamo reakcijos mišinio kiekį ir užtikrinti reakcijos tiesiškumą atskirų genų atvejais buvo atliekami amplifikacijos efektyvumo tyrimai. Buvo atrenkami labiausiai tinkančių genų porų deriniai daugybinei kPGR (angl. multiplex PCR). Tam buvo naudojami trejais skirtingais fluorescenciniais dažais žymėti genų raiškos pradmenų mišiniai: tiriamųjų genų BAX, NEFL, STAT3 pradmenys buvo pažymėti 6-FAM dažų, kaspazės-3, I tipo kolageno, BCL2 pradmenys – VIC dažų, o endogeninė GAPDH kontrolė – ABY dažų. Standartinės kreivės buvo sudaromos iš penkių

kDNR kiekių reakcijoje (50, 5, 0,5, 0,05 ir 0,005 ng). Standartinėms kreivėms buvo išsikelti šie kriterijai, pagal kuriuos ir buvo atrinktos tinkamiausios genų poros ir optimaliausias kDNR kiekis reakcijoje:

- Iš gautų kPGR rezultatų Ct (angl. Cycle Threshold) reikšmių sudaroma logaritminė kreivė, kurios nuožulnumo vertė -3,1 – (-3,6) ribose yra laikoma tinkama;
- Koreliacijos koeficiento R^2 reikšmė yra ne mažesnė nei 0,98;
- Reakcijos efektyvumo reikšmė turėtų būti 90-110 %;
- Ct reikšmių skirtumas tarp daugybinės ir viengubos kPGR reakcijų turėtų būti ne didesnis nei 3,0 %;
- Standartiniai nuokrypiai tarp reakcijos pakartojimų turėtų būti ne didesni nei 0,15.

Labiausiai kriterijus atitikusių genų porų (BAX/BCL2, NEFL/kaspazė-3, STAT3/I tipo kolagenas) standartinės kreivės pavaizduotos 3.3 pav. Matome, jog kai kurių genų kDNR amplifikacijos detekcijai nepakanka 0,005 ng (BCL2, I tipo kolagenas) ir 0,05 ng (I tipo kolagenas) kDNR kiekio reakcijoje. Dėl to, atsižvelgiant į galimą tiriamųjų audinių genų raiškos sumažėjimą, tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas 5 ng kDNR kiekis reakcijoje.



3.3 pav. Genų porų (BAX/BCL2, NEFL/kaspazė-3 ir STAT3/I tipo kolagenas) standartinių kreivių grafikai.

3.4 lentelėje pateikti pasiekti genų porų standartinių kreivių parametrai daugybinėje kPGR reakcijoje. Nuožulnumo vertė svyravo nuo -3,128 iki -3,465. Koreliacijos koeficiento reikšmė buvo didesnė nei 0,99. Reakcijos efektyvumas svyravo nuo 94,38 % iki 108,80 %. Ct reikšmių skirtumas tarp

daugybinės ir viengubos kPGR reakcijų buvo ne didesnis nei 3,0 %, išskyrus I tipo kolageno vertę (5,93 %). Dėl šios priežasties buvo nuspręsta atlikti atskirą šio geno kDNR amplifikaciją (poroje tik su endogenine kontrole GAPDH). Standartiniai nuokrypiai tarp reakcijos pakartojimų svyravo nuo 0,018 iki 0,119. Taigi, BAX/BCL2 ir NEFL/kaspazė-3 genų porų standartinių kreivių parametrai atitiko išsikeltus kriterijus.

3.4 lentelė. Pasirinktų genų porų standartinių kreivių parametrai daugybinėje kPGR.

Genas	Nuožulnumo vertė	R ²	Efektyvumas, %	Ct skirtumas (5 ng/reakcijoje), %	SD (5 ng/ reakcijoje)
BAX	-3,37	0,999	98,02	-0,54	0,018
BCL2	-3,128	0,994	108,80	-1,36	0,118
NEFL	-3,316	0,999	100,25	-0,53	0,038
Kaspazė-3	-3,296	0,998	101,07	1,48	0,051
STAT3	-3,308	0,999	100,59	-0,40	0,073
I tipo kolagenas	-3,465	0,999	94,38	5,93	0,119

3.3.3. Genų raiška

Po amplifikacijos gauti genų raiškos duomenys buvo analizuojami $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu. Genų raiška normalizuota pagal endogeninės kontrolės GAPDH geno raišką.

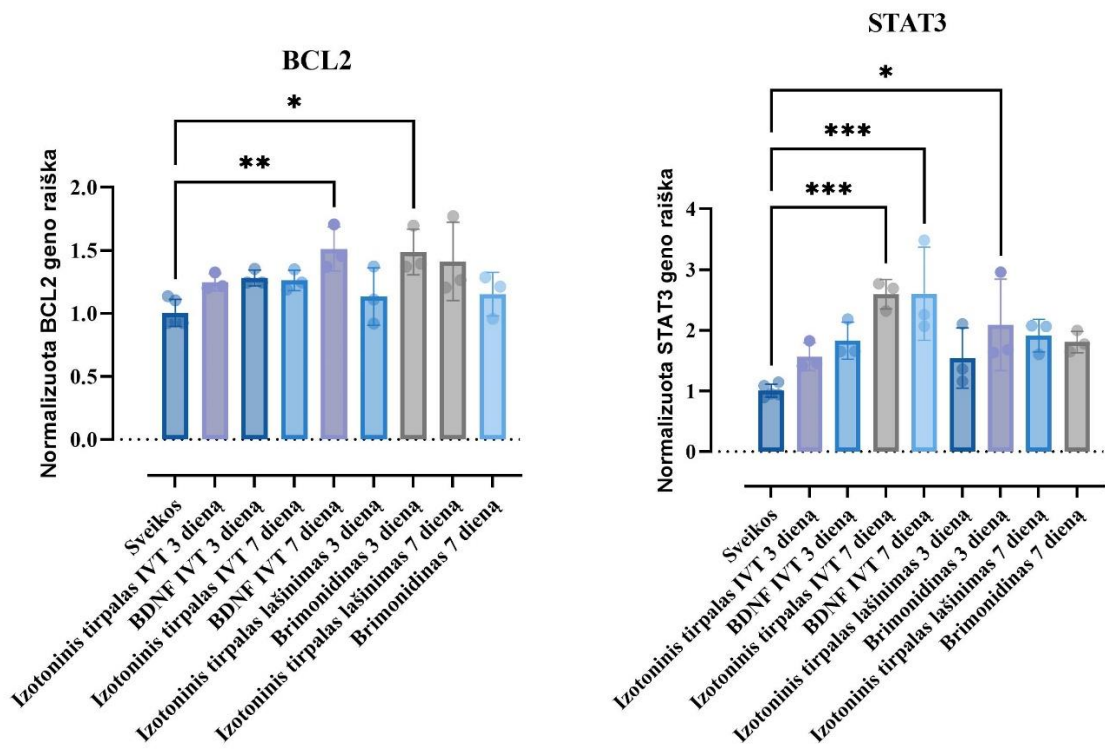
Siekiant įvertinti modelio indukcijos poveikį apoptozę inicijuojančių (3.4 pav.), apoptozę slopinančių (3.5 pav.) ir neurono struktūros palaikyme dalyvaujančių (3.6 pav.) genų raiškai, buvo lyginamos sveikų akių ir neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo grupės. Praėjus 7-ioms dienoms po modelio indukcijos, BAX geno raiška buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo IVT ir lašinimo grupėse palyginus su sveikomis akimis (ANOVA **** $P < 0,0001$, Šidako daugybinio palyginimo testas atitinkamai * $P = 0,0256$ (37 %) ir ** $P = 0,001$ (50 %)). Tai parodo, jog modelio indukcija inicijuoja šio geno, dalyvaujančio mitochondrijų membranos pralaidumo didinimo procese, raišką. Tuo tarpu, kaspazės-3 geno raiška statistiškai reikšmingai padidėjo tik izotoninio tirpalo IVT grupėje 7-tą dieną po modelio indukcijos (ANOVA ** $P < 0,01$, Šidako daugybinio palyginimo testas ** $P < 0,01$ (48 %)). Galima teigti, jog minėtoje grupėje galimai aktyvuojama nuo kaspazių priklausoma ląstelių apoptozė. Įdomu, jog reikšmingo kaspazės-3 geno raiškos padidėjimo nebuvo pastebėta izotoninio tirpalo lašinimo grupėje, nors ganglinių ląstelių skaičius buvo sumažėjęs tiek 3-čią, tiek 7-tą dienomis (3.4 pav.). To priežastis galimai galėtų būti nuo kaspazių nepriklausomos ląstelių apoptozės inicijavimas. BCL2 geno raiškoje statistiškai reikšmingų pokyčių nenustatyta, tačiau izotoninio tirpalo lašinimo grupėje 7-tą dieną buvo matoma geno raiškos padidėjimo tendencija (ANOVA ** $P < 0,01$,

Šidako daugybinio palyginimo testas $P=0,051$). Galime daryti prielaidą, jog BCL2 geno raiškos aktyvacija izotoninio tirpalo lašinimo grupėje galėjo slopinti BAX veikimą potransliaciniame baltymo lygyje, todėl nebuvo aktyvuota kaspazės-3 geno raiška. Svarbu paminėti ir apoptozę slopinančio transkripcijos faktoriaus STAT3 geno raiškos pokyčius, sukeltus modelio indukcijos. Nustatyta, jog šio geno raiška statistiškai reikšmingai padidėjo 2,6 karto 7-tą dieną izotoninio tirpalo IVT grupėje (ANOVA $***P<0,001$, Šidako daugybinio palyginimo testas $***P<0,001$). Izotoninio tirpalo lašinimo grupėje statistiškai reikšmingo pokyčio nenustatyta, tačiau buvo matoma STAT3 geno raiškos padidėjimo tendencija ($P=0,0839$). Tai parodo, jog pati intravitrealinė injekcija galimai sukelia uždegimą ir imuninį atsaką tinklainėje, dėl ko inicijuojama STAT3 geno raiška. Neuronų struktūros palaikyme dalyvaujančio NEFL geno raiška izotoninio tirpalo IVT grupėje statistiškai reikšmingai sumažėjo tik 7-tą dieną po modelio indukcijos (ANOVA $**P<0,01$, Šidako daugybinio palyginimo testas $***P=0,001$ (78 %)). Izotoninio tirpalo lašinimo grupėje statistiškai reikšmingas šio geno sumažėjimas matomas tik 3-čią dieną ($*P=0,0227$ (57 %)), o 7-tą dieną pastebima didelė biologinė variacija tarp mėginių. Ląstelėms inicijuojant apoptozę ir prarandant vientisumą bei formą, NEFL baltymas išsiskiria iš ląstelių į stiklakūnį ir priekinės kameros skystį, dėl ko slopinama ir geno raiška (Lin et al., 2023). Struktūrinio I tipo kolageno geno raiškoje statistiškai reikšmingų pokyčių tarp izotoninio tirpalo ir sveikų akių grupių nepastebėta (ANOVA $P=0,46$). Tai parodo, jog modelio indukcija nesukelia šio tarpląstelinėje medžiagoje randamo baltymo geno raiškos pokyčio.

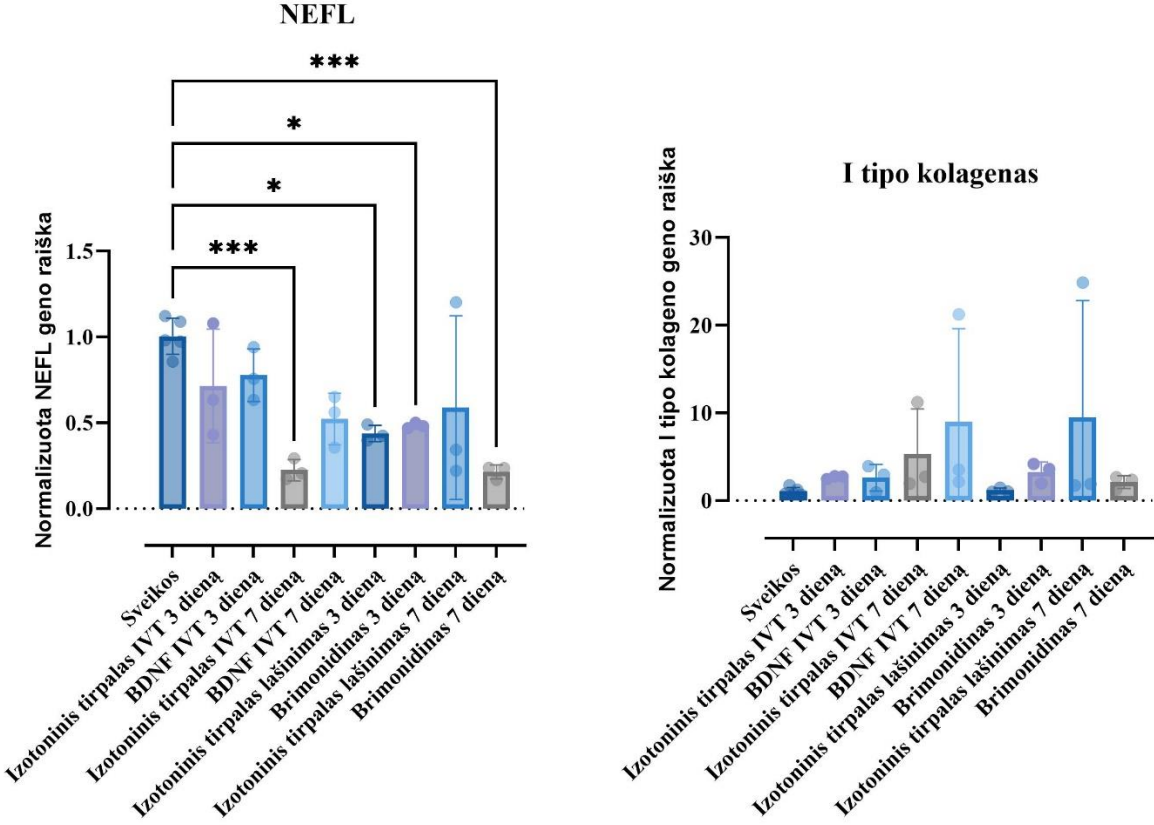
Siekiant įvertinti BDNF poveikį apoptozę inicijuojančių (3.4 pav.), apoptozę slopinančių (3.5 pav.), ir neuronų struktūros palaikyme dalyvaujančių (3.6 pav.) genų raiškai buvo lyginama BDNF IVT grupė su sveikų akių ir neigiamos kontrolės izotoninio tirpalo IVT grupėmis. Praėjus 7-ioms dienoms po modelio indukcijos, BAX geno raiška nebuvo statistiškai reikšmingai padidėjusi BDNF IVT grupėje, lyginant su sveikomis akimis. Matome, jog nėra ir statistiškai reikšmingo sumažėjimo BDNF IVT grupėje, palyginus su izotoninio tirpalo IVT grupe, nors šios grupės BAX geno raiška buvo reikšmingai padidėjusi, lyginant su sveikomis akimis ($*P=0,0256$ (37 %), Šidako daugybinio palyginimo testas). BCL2 geno raiška 7-tą dieną BDNF IVT grupėje buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi, lyginant su sveikomis akimis ($**P<0,01$ (51 %)), bet ne su izotoninio tirpalo IVT gydymo grupe (šioje grupėje nebuvo nustatytas statistiškai reikšmingas pokytis, lyginant su sveikomis akimis). Tai parodo, jog gydymas BDNF turi tik tendenciją mažinti BAX ir didinti BCL2 genų raiškas, dėl ko galimai sukeliamas mitochondrijų membranos pralaidumo mažėjimas ir apoptozės slopinimas. Tai patvirtina ir kaspazės-3 geno raiškos rezultatai 7-tą dieną BDNF IVT grupėje – nors ir nematome statistiškai reikšmingo sumažėjimo, lyginant su izotoninio tirpalo IVT grupe, tačiau nematome ir statistiškai reikšmingo

padidėjimo lyginant su sveikomis akimis. Svarbu paminėti, jog minėto geno raiškoje 3-čią dieną BDNF IVT grupėje matomas statistiškai reikšmingas padidėjimas, lyginant su sveikomis akimis ($*P=0,0455$ (40%)). Šie rezultatai parodo, jog gydymas BDNF neturi ryškaus poveikio kaspazės-3 geno raiškai. STAT3 geno raiška BDNF IVT grupėje 7-tą dieną gana panaši į izotoninio tirpalo IVT grupės STAT3 geno raišką ir statistiškai reikšmingai padidėjusi 2,6 karto, lyginant su sveikomis akimis ($***P<0,001$). Galima teigti, jog gydymas BDNF neturi poveikio STAT3 geno raiškai 7-ių dienų modelyje. Apibendrinant, pastebime BDNF poveikio tendenciją slopinti apoptozę, pasirinktų apoptozę inicijuojančių ir apoptozę slopinančių genų raiškos atžvilgiu. Taip pat pastebime BDNF poveikio tendenciją išlaikyti NEFL geno raišką – BDNF IVT grupėje nematome statistiškai reikšmingo pokyčio, lyginant tiek su sveikų akių, tiek ir su izotoninio tirpalo IVT grupėmis, nors pastarojoje grupėje nustatytas statistiškai reikšmingas sumažėjimas, lyginant su sveikomis akimis ($***P=0,001$ (78%)). Tai galėtų būti paaiškinta tuo, jog gydymas BDNF turi tendenciją padėti išlaikyti neuronų struktūrą – vientisumą ir formą. Tuo tarpu I tipo kolageno geno raiškoje statistiškai reikšmingų pokyčių nepastebėta. Remiantis ląstelių skaičiavimo ir tirtų genų raiškos rezultatais galime daryti prielaidą, jog gydymas BDNF inicijuoja kitų transkripcijos faktorių genų raišką ir kitus apoptozę slopinančius signalinius kelius.

Verta paminėti ir galimai teigiamos kontrolės brimonidino poveikį pasirinktų genų raiškai. Nustatyta, jog 3-čią dieną BAX geno raiška statistiškai reikšmingai padidėjo lyginant tiek su izotoninio tirpalo lašinimo grupe ($**P<0,01$ (54%)), tiek ir su sveikomis akimis ($****P<0,0001$ (72 %)). Tačiau 7-tą dieną nustatytas statistiškai reikšmingas geno raiškos sumažėjimas, lyginant su izotoninio tirpalo lašinimo grupe ($*P=0,0477$ (38 %)). Tai parodo, jog gydymo pradžioje brimonidinas padidina šio geno raišką, galimai inicijuodamas ir mitochondrijų membranos pralaidumo padidėjimą, ir tik po tam tikro laiko (po daugiau nei 3-jų dienų) geno raiška pradeda mažėti, galimai slopinamas mitochondrijų membranos pralaidumas. BCL2 geno raiška buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi 3-čią dieną, palyginus su sveikomis akimis ($*P=0,0126$ (48 %)), bet statistiškai reikšmingo pokyčio, lyginant su izotoninio tirpalo lašinimo grupe, nenustatyta. Septintą dieną statistiškai reikšmingų pokyčių taip pat nenustatyta. Tai parodo, jog brimonidinas gydymo pradžioje turi tendenciją inicijuoti BCL2 geno raišką, tačiau vėlesnėmis gydymo dienomis šis poveikis pranyksta. Kaspazės-3 geno raiška buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi 3-čią dieną, lyginant su sveikomis akimis ($**P<0,01$ (58 %)), bet statistiškai reikšmingo pokyčio, palyginus su izotoninio tirpalo lašinimo grupe, nenustatyta. 7-tą dieną statistiškai reikšmingų pokyčių taip pat nebuvo. Tai parodo, jog vis dėlto brimonidinas gydymo pradžioje galimai inicijuoja mitochondrijų membranos pralaidumo didinimą ir nuo kaspazės priklausomą ląstelių apoptozę, tačiau vėlesnėmis gydymo dienomis šis poveikis pranyksta. STAT3 geno raiška 3-čią dieną buvo



3.5 pav. Skirtingų tyrimo grupių apoptozę slopinančių genų (BCL2, STAT3) raiškos pokyčiai 3-čią ir 7-tą dienomis po modelio indukcijos.



3.6 pav. Skirtingų tyrimo grupių neuronų struktūros palaikyme dalyvaujančių genų (NEFL, I tipo kolagenas) raiškos pokyčiai 3-čią ir 7-tą dienomis po modelio indukcijos.

IŠVADOS

1. Mechaninis regos nervo pažeidimas sukelia ženklią tinklainės ganglinių ląstelių žūtį, kuri yra reguliuojama su apoptoze ir su mitochondrijų pralaidumo reguliavimu susijusių genų raiška.
2. Intravitrealiai sušvirškintas BDNF apsaugo tinklainės ganglines ląsteles mechaninio regos nervo pažeidimo modelyje, reguliuodamas su apoptoze, neurofilamentų lengvąja grandine ir mitochondrijų pralaidumu susijusių genų raišką.
3. BDNF ekspresuojantys vektoriai galėtų būti veiksminga glaukomos gydymo strategija.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Marius Dragašius
Magistro baigiamasis darbas

**BDNF NEUROPROTEKCINIO POVEIKIO TINKLAINĖS GANGLINĖMS LĄSTELĖMS
TYRIMAS**

SANTRAUKA

Glaukoma yra viena iš pagrindinių aklumo priežasčių pasaulyje. Liga sukelia tinklainės ganglinių ląstelių, atsakingų už vaizdinės informacijos signalų perdavimą į smegenis, apoptozę ir regos nervo aksonų degeneraciją. Šių ląstelių išsaugojime dalyvauja neurotrofiniai faktoriai. Vienas iš svarbiausių yra smegenų kilmės neurotrofinis faktorius (angl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF).

Tiriamąjį darbo tikslas buvo *post-mortem* tyrimais įvertinti BDNF neuroprotekinį poveikį žiurkių mechaninio regos nervo pažeidimo modelyje. Naudojant žiurkių akių tinklaines buvo siekiama:

1. Tinklainės ganglinių ląstelių imunohistocheminio dažymo kiekybinės analizės metodu įvertinti mechaninio regos nervo pažeidimo modelio indukciją ir BDNF neuroprotekinį poveikį tinklainės ganglinėms ląstelėms. 2. Genų raiškos tyrimų metodais įvertinti modelio indukcijos ir BDNF neuroprotekinį poveikį pasirinktų, tinklainės ganglinių ląstelių struktūrą palaikančių ir apoptozę reguliuojančių, genų raiškos pokyčiams.

Imunohistocheminiam dažymui ir kiekybinei analizei buvo pasirinktas specifinis ganglinių ląstelių žymuo – RNR surišantis baltymas su daugybiniu splaisingu (RBPMS). Buvo pastebėta, jog praėjus 7-ioms dienoms po mechaninio regos nervo pažeidimo, sėkmingai indukuotame modelyje tinklainės ganglinių ląstelių skaičius neigiamos gydymo kontrolės intravitrealinės injekcijos grupėje sumažėjo 39 % (**** $P < 0,0001$ lyginant su sveikomis akimis). Tuo tarpu BDNF intravitrealinės injekcijos gydymo grupėje ląstelių skaičius sumažėjo tik 14 % ($P=0,1712$ lyginant su sveikomis akimis), ir išliko trečdaliu (29 %; ** $P=0,0015$) didesnis už neigiamos kontrolės intravitrealinės injekcijos grupės ląstelių skaičių. Genų raiškos pokyčiams nustatyti buvo pasirinkti du apoptozę inicijuojantys (BAX, kaspazė-3), du apoptozę slopinantys (BCL2, STAT3) ir du neuronų struktūros palaikyme dalyvaujantys (NEFL, I tipo kolagenas) genai. Pastebėta, jog neigiamos kontrolės intravitrealinės injekcijos grupėje galimai aktyvuojama nuo kaspazių priklausoma ganglinių ląstelių apoptozė ir slopinama NEFL geno raiška. Gydymas BDNF turi tendenciją skatinti apoptozę slopinančių genų raišką, galimai per mitochondrijų membranos pralaidumo mažėjimą, ir išlaikyti NEFL geno raišką. Nei modelio indukcija, nei gydymas BDNF nesukėlė tarpląstelinės medžiagos I tipo kolageno geno raiškos pokyčio.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Marius Dragasius
Master thesis

**STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BDNF ON RETINAL GANGLION
CELLS**

SUMMARY

Glaucoma is one of the leading causes of blindness worldwide. The disease causes apoptosis of retinal ganglion cells, which are responsible for transmitting visual information signals to the brain, and degeneration of the optic nerve axons. Neurotrophic factors are involved in the preservation of these cells. One of the most important is brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

The aim of the research work was to evaluate the neuroprotective effect of BDNF in a rat optic nerve crush model using *post-mortem* analyses. Our aims were as following: 1. To evaluate the induction of the optic nerve crush model and the neuroprotective effect of BDNF on retinal ganglion cells by quantitative analysis of retinal ganglion cell immunohistochemical staining. 2. To assess the neuroprotective effect of BDNF in relation to the change in the expression of the selected genes that support the structure of retinal ganglion cells and regulate apoptosis.

A specific retinal ganglion cell marker, RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMS), was chosen for immunohistochemical staining and quantitative analysis. It was observed that 7 days after optic nerve crush, the number of retinal ganglion cells was reduced by 39% in the negative control intravitreal injection group (**** $P < 0.0001$ compared to healthy eyes). Meanwhile, the number of cells in the BDNF intravitreal injection treatment group decreased by only 14% ($P = 0.1712$ compared to healthy eyes) and remained 29% (** $P = 0.0015$) higher than the number of cells in the negative control intravitreal injection group. Two pro-apoptotic (BAX, caspase 3), two anti-apoptotic (BCL2, STAT3), and two cell structure supporting (NEFL, type I collagen) genes were selected to detect changes in gene expression. It was observed that caspase-dependent apoptosis of retinal ganglion cells was possibly activated, and NEFL gene expression was suppressed in the negative control intravitreal injection group. We conclude that BDNF treatment has a tendency to induce the expression of anti-apoptotic genes, possibly through a decrease in mitochondrial membrane permeability, and to maintain NEFL gene expression. Neither induction of the model nor treatment with BDNF induced a change in the gene expression of extracellular matrix type I collagen.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agarwal R., Agarwal P., Iezhitsa I., 2023. Exploring the current use of animal models in glaucoma drug discovery: where are we in 2023? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 18(11), 1287–1300.
2. Ahmed Z., 2023. Optic Nerve Crush Injury in Rodents to Study Retinal Ganglion Cell Neuroprotection and Regeneration. *Methods Mol Biol.*, 2708, 99-106.
3. Almasieh M., and Levin L. A., 2017. Neuroprotection in Glaucoma: Animal Models and Clinical Trials. *Annu. Rev. Vis. Sci*, 3, 91–120.
4. Almasieh M., Wilson A. M., Morquette B., Cueva Vargas J. L., Di Polo A., 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(2), 152–181.
5. Alamri A., Alkatan H., Aljadaan I., 2016. Traumatic Ghost Cell Glaucoma with Successful Resolution of Corneal Blood Staining Following Pars Plana Vitrectomy. *Middle East Afr J Ophthalmol*, 23(3), 271-273.
6. Annadurai P., and Vijaya L., 2014. Management of secondary angle closure glaucoma. *Journal of Current Glaucoma Practice*, 8(1), 25-32.
7. Biswas S., and Wan K. H., 2019. Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmologica*, 97(3), 331-340.
8. Boia R., Ruzafa N., Aires I. D., Pereiro X., Ambrósio A. F., Vecino E., Santiago A. R., 2020. Neuroprotective strategies for retinal ganglion cell degeneration: Current status and challenges ahead. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2262.
9. Călugăru D, Mang A, Călugăru M., 2016. Secondary open-angle pigmentary glaucoma resulting from pseudophakia. Case report. *Rom J Ophthalmol*, 60(2), 125-130.
10. Cammalleri M., 2022. Optic nerve crush as a model of retinal ganglion cell degeneration. *Annals of Eye Science*, 7.
11. Claes M., De Groef L., Moons L., 2019. Target-derived neurotrophic factor deprivation puts retinal ganglion cells on death row: Cold hard evidence and caveats. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4314.
12. Corral-Domenge C., de la Villa P., Mansilla A., Germain F., 2022. Tools and Biomarkers for the Study of Retinal Ganglion Cell Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4287.
13. Crawley L., Zamir S. M., Cordeiro M. F., Guo L., 2012. Clinical Options for the Reduction of Elevated Intraocular Pressure. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 30(4), 43-64.
14. Dekeyster E., Geeraerts E., Buyens T., Van Den Haute C., Baekelandt V., De Groef L., Salinas-Navarro M., Moons L., 2015. Tackling glaucoma from within the brain: An unfortunate interplay of BDNF and TrkB. *PLoS ONE*, 10(11), e0142067.
15. Distelhorst J. S., and Hughes G. M. 2003. Open-Angle Glaucoma - American Family Physician. *American Academy of Family Physicians*, 67 (9), 1937-1944.
16. Donahue R. J., Fehrman R. L., Gustafson J. R., Nickells R. W., 2021. BCLXL gene therapy moderates neuropathology in the DBA/2J mouse model of inherited glaucoma. *Cell Death and Disease*, 12, 781.
17. Donahue R. J., Maes M. E., Grosser J. A., Nickells R. W., 2020. BAX-Depleted Retinal Ganglion Cells Survive and Become Quiescent Following Optic Nerve Damage. *Molecular Neurobiology*, 57(2), 1070–1084.
18. Drewry M. D., Challa P., Kuchtey J. G., Navarro I., Helwa I., Hu, Y., Mu, H., Stamer W. D., Kuchtey R. W., Liu Y., 2018. Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics*, 27(7), 1263–1275.
19. Do M. T. H., 2019. Melanopsin and the Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: Biophysics to Behavior. *Neuron*, 104(2), 205-226.

20. Feng K. M., Tsung T. H., Chen Y. H., Lu D. W., 2023. The Role of Retinal Ganglion Cell Structure and Function in Glaucoma. *Cells*, 12(24), 2797.
21. Fudalej E., Justyniarska M., Kasarełło K., Dziedziak J., Szaflik J. P., Cudnoch-Jędrzejewska A. 2021. Neuroprotective Factors of the Retina and Their Role in Promoting Survival of Retinal Ganglion Cells: A Review. *Ophthalmic Research*, 64(3), 345-355.
22. Gharahkhani P., Jorgenson E., Hysi P., Khawaja A. P., Pendergrass S., Han X., Ong J. S., Hewitt A. W., Segrè A. V., Rouhana J. M., Hamel A. R., Igo R. P., Choquet H., Qassim A., Josyula N. S., Cooke Bailey J. N., Bonnemaier P. W. M., Iglesias A., Siggs O. M., ... Wiggs J. L., 2021. Genome-wide meta-analysis identifies 127 open-angle glaucoma loci with consistent effect across ancestries. *Nature Communications*, 12(1), 1258.
23. Ghinia M. G., Novelli E., Sajgo S., Badea T. C., Strettoi E., 2019. Brn3a and Brn3b knockout mice display unvaried retinal fine structure despite major morphological and numerical alterations of ganglion cells. *Journal of Comparative Neurology*, 527(1), 187–211.
24. Gokoffski K. K., Peng M., Alas B., Lam P., 2020. Neuro-protection and neuro-regeneration of the optic nerve: Recent advances and future directions. *Current Opinion in Neurology*, 33(1), 93-105.
25. Grünert U., and Martin P. R., 2021. Morphology, Molecular Characterization, and Connections of Ganglion Cells in Primate Retina. *Annu. Rev. Vis. Sci.*, 7, 73–103.
26. Hsu E., and Desai M., 2023. Glaucoma and Systemic Disease. *Life*, 13(4), 1018.
27. Hudson C. D., Morris P. J., Latchman D. S., Budhram-Mahadeo V. S., 2016. Brn-3a transcription factor blocks p53-mediated activation of proapoptotic target genes Noxa and Bax in vitro and in vivo to determine cell fate. *Journal of Biological Chemistry*, 291(30), 11851-11858.
28. Husain S., Zaidi S. A. H., Singh S., Guzman W., Mehrotra S., 2021. Reduction of Neuroinflammation by δ -Opioids Via STAT3-Dependent Pathway in Chronic Glaucoma Model. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 601404.
29. Iwabe S., Moreno-Mendoza N. A., Trigo-Tavera F., Crowder C., García-Sánchez G. A., 2007. Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma. *Veterinary Ophthalmology*, 10, 12-19.
30. Jassim A. H., Inman D. M., Mitchell C. H., 2021. Crosstalk Between Dysfunctional Mitochondria and Inflammation in Glaucomatous Neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 699623.
31. Jonas J. B., Iribarren R., Nangia V., Sinha A., Pardhi P., Shukla R., Panda-Jonas S., 2015. Lens position and age: The central india eye and medical study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(9), 5309–5314.
32. Kalesnykas G., Oglesby E. N., Zack D. J., Cone F. E., Steinhart M. R., Tian J., Pease M. E., Quigley H. A., 2012. Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(7), 3847–3857.
33. Kaushik M., Tiwari P., Dada T., Dada R., 2024. Beyond the optic nerve: Genetics, diagnosis, and promising therapies for glaucoma. *Gene*, 894, 147983.
34. Kim M., Morales L. D., Jang I. S., Cho Y. Y., Kim D. J., 2018. Protein tyrosine phosphatases as potential regulators of STAT3 signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2708.
35. Kim U. S., Mahroo O. A., Mollon J. D., Yu-Wai-Man P., 2021. Retinal Ganglion Cells—Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Frontiers in Neurology*, 12, 661938.
36. Kimura A., Namekata K., Guo X., Harada C., Harada T., 2016. Neuroprotection, growth factors and BDNF-TRKB signalling in retinal degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1584.
37. Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J., 2018. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), 579-593.

38. Kuo C. Y., and Liu C. J. L., 2022. Neuroprotection in Glaucoma: Basic Aspects and Clinical Relevance. *Journal of Personalized Medicine*, 12(11), 1884.
39. Kutsarova E., Schohl A., Munz M., Wang A., Yuan Y., Bilash O. M., Ruthazer E. S., 2021. BDNF signaling in Hebbian and Stentian structural plasticity in the developing visual system. *PLOS Biology*.
40. Lambuk L., Mohd Lazaldin M. A., Ahmad S., Iezhitsa I., Agarwal R., Uskoković V., Mohamud R., 2022. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Neuroprotection in Glaucoma: A Review of Current State of the Art. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 875662.
41. Lin J. B., Pitts K. M., Helwe H. El, Neeson C., Hall N. E., Falah H., Schultz S. A., Wang S. L., Lo K., Song C., Margeta M. A., Valle D. S. Del., 2023. Neurofilament Light Chain in Aqueous Humor as a Marker of Neurodegeneration in Glaucoma. *Clinical Ophthalmology*, 17, 2209–2217.
42. Liu L., Liu X., Huang C., Wang G., Ma D., Zhang W., Zheng C., Zhang M., 2017. Associated factors of acute primary angle closure glaucoma in a sub-group of Chinese people: Comparison between attack eyes and normal controls. *Scientific Reports*, 7(1), 14885.
43. Liu X., Feng L., Shinde I., Cole J. D., Troy J. B., Saggere L., 2020. Correlation between retinal ganglion cell loss and nerve crush force-impulse established with instrumented tweezers in mice. *Neurological Research*, 42(5), 379–386.
44. Livak K. J., and Schmittgen T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
45. Loo Y., Chan A. S. Y., Khor C. C., Aung T., Wang Z., 2024. Rodent genetically modified models of glaucoma. *Molecular Aspects of Medicine*, 95, 101229.
46. Maes M. E., Donahue R. J., Schlamp C. L., Marola O. J., Libby R. T., Nickells R. W., 2023. BAX activation in mouse retinal ganglion cells occurs in two temporally and mechanistically distinct steps. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), 67.
47. Mahabadi N, Foris LA, Tripathy K., 2022. Open Angle Glaucoma. *StatPearls* [žiūrėta 2024-03-21]. Prieiga per internetą <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441887/>
48. Mallone F., Sacchetti M., Bruscolini A., Scuderi L., Marengo M., Lambiase A., 2020. Neurotrophic factors in glaucoma and innovative delivery systems. *Applied Sciences*, 10(24), 1-22.
49. Marler K. J., Suetterlin P., Dopplapudi A., Rubikaite A., Adnan J., Maiorano N. A., Lowe A. S., Thompson I. D., Pathania M., Bordey A., Fulga T., Van Vactor D. L., Hindges R., Drescher U., 2014. BDNF promotes axon branching of retinal ganglion cells via miRNA-132 and p250GAP. *Journal of Neuroscience*, 34(3), 969–979.
50. Martin K. R. G., Quigley H. A., Zack D. J., Levkovitch-Verbin H., Kielczewski J., Valenta D., Baumrind L., Pease M. E., Klein R. L., Hauswirth W. W., 2003. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: Retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(10), 4357–4365.
51. Masin L., Claes M., Bergmans S., Cools L., Andries L., Davis B. M., Moons L., De Groef L., 2021. A novel retinal ganglion cell quantification tool based on deep learning. *Scientific Reports*, 11(1), 702.
52. Mcmenamin P. G., and Lee W. R., 1986. Ultrastructural pathology of melanolytic glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*, 70(12), 895-906.
53. Mead B., 2023. Microbead-Induced Ocular Hypertension in a Rodent Model of Glaucoma. *Methods Mol Biol.*, 2708, 71-76.
54. Meng M., Dine K., Chaqour B., Shindler K. S., Yue J., Ross A. G., 2023. Evaluating the reliability of Brn3a and RBPMS as markers of retinal ganglion cells with age and ocular hypertension-induced disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 64(8), 5461.
55. Mohd Lazaldin M. A., Iezhitsa I., Agarwal R., Bakar N. S., Agarwal P., Mohd Ismail N., 2020. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor against amyloid beta 1-40-induced retinal and optic nerve damage. *European Journal of Neuroscience*, 51(12), 2394–2411.

56. Moustardas P., Aberdam D., Lagali N., 2023. MAPK Pathways in Ocular Pathophysiology: Potential Therapeutic Drugs and Challenges. *Cells*, 12(4), 617.
57. Machiele R., Motlagh M., Bhupendra C. Patel. Intraocular Pressure. StatPearls [žiūrėta 2024-03-18]. Prieiga per internetą <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532237/>
58. Nadal-Nicolás F. M., Galindo-Romero C., Lucas-Ruiz F., Marsh-Amstrong N., Li, W., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M., 2023. Pan-retinal ganglion cell markers in mice, rats, and rhesus macaques. *Zoological Research*, 44(1), 226–248.
59. Nadal-Nicolás F. M., Jiménez-López M., Salinas-Navarro M., Sobrado-Calvo P., Albuquerque-Béjar J. J., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M., 2012. Whole Number, Distribution and Co-Expression of Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cells of Adult Albino and Pigmented Rats. *PLoS ONE*, 7(11), e49830.
60. Nascimento-dos-Santos G., de-Souza-Ferreira E., Lani R., Faria C. C., Araújo V. G., Teixeira-Pinheiro L. C., Vasconcelos T., Gonçalo T., Santiago M. F., Linden R., Galina A., Petrs-Silva H., 2020. Neuroprotection from optic nerve injury and modulation of oxidative metabolism by transplantation of active mitochondria to the retina. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165686.
61. Niittykoski M., Kalesnykas G., Larsson K. P., Kaarniranta K., Åkerman K. E. O., Uusitalo H., 2010. Altered calcium signaling in an experimental model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(12), 6387–6393.
62. Norat P., Gao J., Soldozy S., Zhang H., Liu X., 2021. A standardized crush tool to produce consistent retinal ganglion cell damage in mice. *Neural Regeneration Research*, 16(7), 1442-1443.
63. Nucci C, Di Pierro D, Varesi C, Ciuffoletti E, Russo R, Gentile R, Cedrone C, Pinazo Duran MD, Coletta M, Mancino R., 2013. Increased malondialdehyde concentration and reduced total antioxidant capacity in aqueous humor and blood samples from patients with glaucoma. *Mol Vis.*, 7(19), 1841-1846.
64. Oddone F., Roberti G., Micera A., Busanello A., Bonini S., Quaranta L., Agnifili L., Manni G., 2017. Exploring serum levels of Brain Derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor across glaucoma stages. *PLoS ONE*, 12(1), e0168565.
65. Osborne A., Khatib T. Z., Songra L., Barber A. C., Hall K., Kong G. Y. X., Widdowson P. S., Martin K. R., 2018. Neuroprotection of retinal ganglion cells by a novel gene therapy construct that achieves sustained enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor-B signaling. *Cell Death and Disease*, 9(10), 1007.
66. Osborne N. N., Núñez-Álvarez C., Joglar B., del Olmo-Aguado S., 2016. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *European Journal of Pharmacology*, 787, 127–133.
67. Parmhans N., Fuller A. D., Nguyen E., Chuang K., Swygart D., Wienbar S. R., Lin, T., Kozmik Z., Dong L., Schwartz G. W., Badea T. C., 2021. Identification of retinal ganglion cell types and brain nuclei expressing the transcription factor Brn3c/Pou4f3 using a Cre recombinase knock-in allele. *Journal of Comparative Neurology*, 529(8), 1926–1953.
68. Pereiro X., Ruzafa N., Urcola J. H., Sharma S. C., Vecino E., 2020. Differential distribution of rbpm in pig, rat, and human retina after damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–12.
69. Rajala R. V. S. (2021). Signaling roles of phosphoinositides in the retina. *Journal of Lipid Research*, 62, 100041.
70. Ramírez J. M., Salobar-García E., de Hoz R., Salazar J. J., Matamoros J. A., Sánchez-Puebla L., López-Cuenca I., Fernández-Albarral J. A., Ramírez A. I., 2023. Laser-Induced Ocular Hypertension in a Mouse Model of Glaucoma. *Methods Mol Biol.*, 2708, 49-56.

71. Rheaume B. A., Jereen A., Bolisetty M., Sajid M. S., Yang Y., Renna K., Sun L., Robson P., Trakhtenberg E. F., 2018. Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nature Communications*, 9(1), 3203.
72. Risner M. L., Pasini S., McGrady N. R., Calkins D. J., 2022. Bax Contributes to Retinal Ganglion Cell Dendritic Degeneration During Glaucoma. *Molecular Neurobiology*, 59(3), 1366–1380.
73. Rodriguez A. R., de Sevilla Müller L. P., Brecha N. C., 2014. The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *Journal of Comparative Neurology*, 522(6), 1411–1443.
74. Sánchez-Migallón M. C., Valiente-Soriano F. J., Nadal-Nicolás F. M., Di Pierdomenico J., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M., 2018. Survival of melanopsin expressing retinal ganglion cells long term after optic nerve trauma in mice. *Experimental Eye Research*, 174, 93–97.
75. Sánchez-Migallón M. C., Valiente-Soriano F. J., Nadal-Nicolás F. M., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M., 2016. Apoptotic retinal ganglion cell death after optic nerve transection or crush in mice: Delayed RGC loss with BDNF or a caspase 3 inhibitor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(1), 81–93.
76. Sears N. C., Boese E. A., Miller M. A., Fingert J. H., 2019. Mendelian genes in primary open angle glaucoma. *Experimental Eye Research*, 186:107702.
77. Singh R., Letai A., Sarosiek K., 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193.
78. Song Y., Overmass M., Fan J., Hodge C., Sutton G., Lovicu F. J., You J., 2021. Application of Collagen I and IV in Bioengineering Transparent Ocular Tissues. *Frontiers in Surgery*, 8, 639500.
79. Suwan Y., Jiamsawad S., Supakontanasan W., Teekhasaene C., 2017. Hidden mechanisms beyond the pupillary block in acute angle closure: ultrasound biomicroscopic study. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 45(4), 366–370.
80. Thomas C. N., Berry M., Logan A., Blanch R. J., Ahmed Z., 2017. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell Death Discovery*, 3(1), 17032.
81. Tsai T., Reinehr S., Deppe L., Strubbe A., Kluge N., Dick H. B., Joachim S. C., 2024. Glaucoma Animal Models beyond Chronic IOP Increase. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 906.
82. Vernazza S., Oddone F., Tirendi S., Bassi A. M., 2021. Risk factors for retinal ganglion cell distress in glaucoma and neuroprotective potential intervention. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7994.
83. Vishwaraj C. R., Kavitha S., Venkatesh R., Shukla A. G., Chandran P., Tripathi S., 2022. Neuroprotection in glaucoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, 70(2), 380-385.
84. Weinreb R. N., Aung T., Medeiros F. A., 2014. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. *JAMA*, 311(18), 1901-1911.
85. Wiggs J. L., and Pasquale L. R., 2017. Genetics of glaucoma. *Human Molecular Genetics*, 26(R1), R21-R27.
86. Xi X., Chen Q., Ma J., Wang X., Xia Y., Wen X., Cai B., Li Y., 2022. Acteoside protects retinal ganglion cells from experimental glaucoma by activating the PI3K/AKT signaling pathway via caveolin 1 upregulation. *Annals of Translational Medicine*, 10(6), 312–312.
87. Zhang N., Wang J., Li Y., Jiang B., 2021. Prevalence of primary open angle glaucoma in the last 20 years: a meta-analysis and systematic review. *Scientific Reports*, 11(1), 13762.