lek. Piotr Rodak

Interakcja między selektywnymi modulatorami receptora estrogenowego (SERM) a szlakiem FasR/FasL w modelu niedokrwienia siatkówki u gryzoni poddanych owariektomii

Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Adrian Smędowski, prof. ŚUM,
Katedra Okulistyki, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Edyta Olakowska,
Katedra i Zakład Fizjologii, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Katowice 2026

Lek. Piotr Rodak
Katedra i Klinika Neurologii Dziecięcej
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Pracownia Badań Translacyjnych w Okulistyce
Katedra Okulistyki
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Adres do korespondencji:
Katedra Okulistyki
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Ceglana 35
40-514 Katowice
piotr.rodak@sum.edu.pl

Rozprawa Doktorska powstała w oparciu o finansowanie:
NCN PRELUDIUM 2021/41/N/N24/01271

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w artykule pt. „Surgical *Menopause Impairs Retinal Conductivity and Worsens Prognosis in an Acute Model of Rat Optic Neuropathy”* w czasopiśmie *Cells* MDPI i zostały wykorzystane za zgodą wydawcy zgodnie z licencją CC BY oraz zasadami dobrej praktyki naukowej.

Spis treści

Wykaz skrótów **6**

Wykaz tabel **8**

Wykaz rycin **8**

1. Wstęp **9**

1.1. Struktura siatkówki 9

1.2. Fizjologia siatkówki i przetwarzanie informacji wzrokowej 9

1.3. Neurodegeneracja 11

1.3.1. Ogólne mechanizmy procesu neurodegeneracji 11

1.3.2. Mechanizmy śmierci komórkowej neuronów 12

1.3.3. Neurodegeneracja w obrębie siatkówki 13

1.4. Choroby neurodegeneracyjne siatkówki i nerwu wzrokowego 13

1.4.1. Znaczenie kliniczne i terapeutyczne 15

1.5. Szlak FasR/FasL 15

1.5.1. Składowe i fizjologia szlaku FasR/FasL 15

1.5.2. Rola szlaku FasR/FasL w regulacji apoptozy 16

1.5.3. Szlak FasR/FasL w procesach neurodegeneracji 17

1.6. Estrogeny i menopauza 19

1.6.1. Estrogeny 19

1.6.2. Menopauza 21

1.7. Selektywne modulatory receptora estrogenowego 23

1.7.1. Mechanizm działania SERMs 23

1.7.2. Przewaga SERMs nad estrogenami w zastosowaniu terapeutycznym 25

2. Założenia i cele pracy **26**

2.1. Cel główny 26

2.2. Cele szczegółowe 26

3. Materiały i metody **28**

3.1. Zwierzęta, znieczulenie 28

3.2. Schemat przeprowadzenia badań 28

3.2.1. Schemat przeprowadzenia pierwszej części badania 28

3.2.2. Schemat przeprowadzenia drugiej części badania. 29

3.3. Owariektomia 31

3.4. Zmiażdżenie nerwu wzrokowego 31

3.5. Model niedokrwienia/reperfuzji siatkówki 32

3.6. Elektroretinografia 32
3.7. Aplikacja leków 33
3.8. Analiza LDH 33
3.9. Barwienie immunohistochemiczne 33
3.10. Stereologia 34
3.11. Western Blot 34
3.12. Statystyka 35

4. Wyniki 37

4.1. Wyniki pierwszej części badania 37
4.1.1. Wpływ dwutygodniowego okresu menopauzy na neurony siatkówki 37
4.1.2. Wpływ sześciotygodniowego okresu menopauzy na neurony siatkówki. 38
4.1.3. Analiza funkcji siatkówki w badaniu elektroretinografii 40
4.2. Wyniki drugiej części badania 41
4.2.1. Wyniki analiz ex vivo 41
4.2.2. Wyniki analizy in vivo 42
4.2.3. Wyniki elektroretinografii z drugiej części badania 44

5. Dyskusja 49

6. Wnioski 63

6.1. Wnioski z pierwszej części badania 63
6.2. Wnioski z drugiej części badania 63

7. Piśmiennictwo 64

8. Streszczenie 70

9. Abstract 71

Wykaz skrótów

AMD (ang. age-related macular degeneration) – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem

AP-1 (ang. activator protein 1) – białko aktywujące 1

BID (ang. BH3 interacting-domain death agonist) – agonista śmierci zawierający domenę interakcji BH3

cAMP/PKA (ang. cyclic AMP/protein kinase A) – szlak sygnalizacyjny cyklicznego AMP/ kinazy białkowej A

DD (ang. death domain) – domena śmierci

DED (ang. death effector domain) – efektorowa domena śmierci

DISC (ang. death-inducing signaling complex) – kompleks sygnałowy indukujący śmierć komórki

ERα/β (ang. estrogen receptor α/β) – receptor estrogenowy α/β

ERG (ang. electroretinography) – elektroretinografia

ERK (ang. extracellular signal-regulated kinases) – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym

FAIM2 (ang. Fas apoptotic inhibitory molecule 2) – białko hamujące apoptozę indukowaną przez Fas

FADD (ang. Fas-associated death domain protein) – białko adaptorowe z powinowactwem do domeny śmierci receptora Fas

FasL (ang. Fas ligand) – ligand Fas

FasR (ang. Fas receptor) – receptor Fas

GFAP (ang. glial fibrillary acidic protein) – kwaśne białko włókienkowe

GPR30 (ang. G protein-coupled receptor 30) – receptor błonowy sprzężony z białkiem G

I/R (ang. ischemia/reperfusion) – niedokrwienie/reperfuzja

Iba-1 (ang. ionized calcium-binding adapter molecule 1) – cząsteczka adapterowa 1 wiążąca zjonizowany wapń

IOP (ang. intraocular pressure) – ciśnienie wewnątrzgałkowe

IL (ang. interleukin) – interleukina

LDH (ang. lactate dehydrogenase) – dehydrogenaza mleczanowa

MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases) – kinazy aktywowane mitogenami

mFasL (ang. membrane-bound Fas ligand) – związany z błoną ligand Fas

NeuN (ang. neuronal nuclear antigen) – białkowy antygen jądrowy

NF-κB (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – czynnik jądrowy κB

ONC (ang. optic nerve crush) – zmiażdżenie nerwu wzrokowego

OP (ang. oscillatory potentials) – potencjały oscylacyjne

OVA (ang. ovariectomy) – owariektomia

PBS (ang. phosphate buffered saline) – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PFA (ang. paraformaldehyde) – paraformaldehyd

PhNR (ang. photopic negative response) – fotopowa odpowiedź negatywna

PI3K/AKT (ang. phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B) – szlak sygnalizacyjny kinazy fosfoinozytolu-3/kinazy białkowej B

PKA/CREB (ang. protein kinase A/cAMP response element-binding protein) – szlak sygnalizacyjny kinazy białkowej A/białko wiążące element odpowiedzi na cAMP

RBPMS (ang. RNA-binding protein with multiple splicing) – białko wiążące RNA z wieloma miejscami splicingu

RGC (ang. retinal ganglion cells) – komórki zwojowe siatkówki

ROS (ang. reactive oxygen species) – reaktywne formy tlenu

RPE (ang. retinal pigment epithelium) – nabłonek barwnikowy siatkówki

sFasL (ang. soluble Fas ligand) – rozpuszczalny ligand Fas

SERMs (ang. selective estrogen receptor modulators) - selektywne modulatory receptora estrogenowego

TNF-α (ang. tumor necrosis factor-α) – czynnik martwicy nowotworów

Wykaz tabel

Tabela I. Potencjały oscylacyjne (OP1, OP2, OP3) zarejestrowane u zwierząt……40

Wykaz rycin

Rycina 1. Schemat ukazujący aktywację szlaku FasR/FasL..... 16
Rycina 2. Neuroprotekcyjne działania estradiolu. 21
Rycina 3. Przebieg i metodologia doświadczenia. 36
Rycina 4. Liczba komórek RGC u zwierząt po OVA oraz w grupie kontrolnej.. 37
Rycina 5. Rozmieszczenie receptorów estrogenowych ERβ w komórkach zwojowych siatkówki u zwierząt z grupy OVA oraz grupy kontrolnej. 38
Rycina 6. Wpływ wydłużonego okresu niedoboru estrogenów na komórki w warstwie zwojowej siatkówki po uszkodzeniu nerwu wzrokowego..... 39
Rycina 7. Analiza amplitudy fali PhNR w badanych grupach..... 40
Rycina 8. Charakterystyka potencjałów oscylacyjnych w zapisie ERG z pierwszej części badania. 41
Rycina 9. Barwienie immunofluorescencyjne eksplantów siatkówkowych z użyciem przeciwciała przeciwko Tuj1 42
Rycina 10. Wpływ estrogenu oraz modulacji apoptozy na neurony siatkówki po uszkodzeniu niedokrwiennym.. 44
Rycina 11. Analiza funkcji siatkówki na podstawie zapisów ERG 46
Rycina 12. Analiza funkcji komórek zwojowych siatkówki na podstawie fotopowej odpowiedzi negatywnej (PhNR) w zapisie ERG. 48

1. Wstęp

1.1. Struktura siatkówki

Siatkówka stanowi wyspecjalizowaną strukturę neuronabłonkową będącą integralną częścią ośrodkowego układu nerwowego, odpowiedzialną za odbiór bodźców świetlnych oraz wstępne przetwarzanie informacji wzrokowej. Jej budowa charakteryzuje się wysokim stopniem uporządkowania przestrzennego i funkcjonalnego, umożliwiającym równoległe przetwarzanie sygnałów na wielu poziomach neuronalnych [1]. Siatkówka człowieka zawiera kilka głównych grup neuronów, które pełnią odrębne funkcje w przetwarzaniu informacji wzrokowej. Fotoreceptory dzielą się na pręciki, odpowiedzialne za widzenie skotopowe (przy słabym oświetleniu), oraz czopki, umożliwiające widzenie barwne oraz zapewniającą wysoką ostrość i rozdzielczość wzroku. Komórki dwubiegunowe przekazują sygnał z fotoreceptorów do komórek zwojowych, natomiast komórki poziome modulują sygnał, umożliwiając integrację informacji przestrzennej. Komórki amakrynowe wykazują bardzo dużą różnorodność morfologiczną i funkcjonalną – uczestniczą w przetwarzaniu sygnałów wpływając m.in. na detekcję ruchu i kontrastu [2]. Ostatecznym elementem drogi wzrokowej w siatkówce są komórki zwojowe siatkówki (ang. retinal ganglion cells, RGC), które generują potencjały czynnościowe i przekazują informacje do ośrodków w mózgu (ciało kolankowate boczne wzgórza) poprzez nerw wzrokowy [3]. Oprócz neuronów, istotną rolę pełnią komórki glejowe, w szczególności komórki Müllera, które przebiegają przez całą grubość siatkówki i zapewniają jej integralność strukturalną oraz homeostazę środowiska zewnątrzkomórkowego. Komórki te regulują stężenie jonów, usuwają nadmiar neuroprzekaźników, takich jak glutaminian i kwas gamma-aminomasłowy, oraz uczestniczą w sprzężeniu metabolicznym pomiędzy neuronami a naczyniami krwionośnymi [4]. Dodatkowo komórki glejowe reprezentowane są przez astrocyty oraz mikroglej, które biorą udział w odpowiedzi zapalnej i procesach neurodegeneracyjnych [4].

1.2. Fizjologia siatkówki i przetwarzanie informacji wzrokowej

Funkcjonowanie siatkówki opiera się na procesie fototransdukcji, w którym energia świetlna przekształcana jest w sygnał elektryczny. Fotoreceptory reagują na światło zmianą potencjału błonowego, co prowadzi do modulacji uwalniania neuroprzekaźników, głównie kwasu glutaminowego. Sygnał ten jest następnie

przetwarzany przez komórki dwubiegunowe i amakrynowe, które integrują informacje przestrzenne i czasowe, umożliwiając detekcję kontrastu, ruchu oraz zmian natężenia światła. Na poziomie siatkówki dochodzi do wstępnej analizy bodźców wzrokowych, obejmującej m.in. separację sygnałów na drogę włączeniową (typu ON) i wyłączeniową (typu OFF), analizę kierunku ruchu oraz kodowanie informacji o intensywności i barwie światła. Procesy te zachodzą dzięki złożonym interakcjom synaptycznym w obrębie warstwy splotowatej wewnętrznej oraz modulacji sygnału przez komórki amakrynowe.

Komórki zwojowe siatkówki stanowią końcowy element przetwarzania informacji w siatkówce i jednocześnie reprezentują jedyne neurony, których aksony opuszczają gałkę oczną, tworząc nerw wzrokowy. Ich dendryty odbierają sygnały od komórek dwubiegunowych i amakrynowych [3]. Komórki zwojowe pełnią funkcję neuronów projekcyjnych, przekazujących przetworzoną informację wzrokową do struktur mózgowych - ciała kolankowatego bocznego wzgórza czy wzgórków górnych blaszki pokrywy śródmózgowia, skąd impulsy wzrokowe pod postacią potencjału czynnościowego przekazywane są przez promienistość wzrokową do kory wzorkowej. Aksony komórek zwojowych siatkówki biegną w pierwszej kolejności w warstwie włókien nerwowych siatkówki, zbiegając się w tarczy nerwu wzrokowego, gdzie formują nerw wzrokowy [3]. Jedną z kluczowych cech komórek zwojowych jest ich różnorodność funkcjonalna. W siatkówce ssaków opisano kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt typów RGC, różniących się morfologią, wielkością pola dendrytycznego oraz właściwościami elektrofizjologicznymi [2]. Poszczególne typy komórek zwojowych odpowiadają za różne aspekty przewodzenia bodźca wzrokowego, takie jak kontrast, ruch czy kierunek.

Komórki zwojowe odgrywają kluczową rolę w patogenezie wielu chorób siatkówki i nerwu wzrokowego, w tym jaskry oraz niedokrwienia siatkówki. Uszkodzenie ich aksonów prowadzi do zaburzeń wstecznego transportu aksonalnego, co ma potencjalne znaczenie w inicjacji i propagacji procesów neurodegeneracyjnych, które zwykle kończą się apoptotyczną śmiercią komórek [5]. Istotnym problemem klinicznym jest brak spontanicznej zdolności regeneracyjnej komórek zwojowych siatkówki – w warunkach uszkodzenia neurony te nie są w stanie efektywnie odtworzyć swoich aksonów, co prowadzi do trwałej utraty funkcji wzrokowych [3]. Z tego względu stanowią one główny cel badań nad mechanizmami neuroprotekcji oraz terapiami mającymi na celu zahamowanie procesów neurodegeneracyjnych.

1.3. Neurodegeneracja

Neurodegeneracja to proces prowadzący do postępującej dysfunkcji oraz nieodwracalnej utraty neuronów, będący wspólnym mianownikiem licznych chorób ośrodkowego układu nerwowego, w tym również siatkówki, która stanowi jego integralną część [6,7]. W warunkach fizjologicznych homeostaza neuronalna utrzymywana jest poprzez złożone mechanizmy regulujące metabolizm komórkowy, synaptyczną transmisję sygnałów oraz odpowiedzi na stres komórkowy. Zaburzenie tych procesów prowadzi do aktywacji kaskad prowadzących do uszkodzenia i śmierci komórek nerwowych.

1.3.1. Ogólne mechanizmy procesu neurodegeneracji

Neurodegeneracja jest procesem wieloczynnikowym, wynikającym z interakcji czynników genetycznych, epigenetycznych oraz środowiskowych [7]. Jednym z kluczowych elementów patogenezy jest akumulacja nieprawidłowo sfałdowanych białek, które ulegają agregacji w neuronach i komórkach glejowych, prowadząc do zaburzeń metabolizmu komórki. Zjawisko to określane jest mianem proteinopatii i obejmuje m.in. odkładanie amyloidu β, białka tau, α-synukleiny czy TDP-43 [7]. Akumulacja nieprawidłowych białek zaburza funkcjonowanie systemów degradacyjnych komórki, w tym układu ubikwityna–proteasom oraz autofagii [8]. W konsekwencji dochodzi do stresu proteotoksycznego, który inicjuje kolejne mechanizmy uszkodzenia komórki, takie jak dysfunkcja mitochondriów, zaburzenia homeostazy wapniowej oraz aktywacja odpowiedzi zapalnej.

Kolejnym z mechanizmów neurodegeneracji jest stres oksydacyjny wynikający z nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) oraz niewydajnych mechanizmów antyoksydacyjnych [9]. Nadmiar ROS prowadzi do uszkodzenia lipidów budujących błony komórkowe niszcząc jej integralność, uszkodzenia białek oraz DNA. Mitochondria odgrywają centralną rolę w tym procesie, będąc głównym miejscem powstawania ROS. Dysfunkcja mitochondrialna prowadzi do spadku produkcji ATP, co jest szczególnie istotne w komórkach mających wysokie zapotrzebowanie energetyczne, np. RGC. Niedobór energii prowadzi do zaburzeń transportu aksonalnego oraz utraty funkcji synaptycznych indukując procesy degeneracyjne [9].

Ekscytotoksyczność, to uszkodzenie neuronów wynikające z zwiększonej aktywacji receptorów glutaminergicznych. Nadmiar glutaminianu prowadzi do nadmiernego napływu jonów wapnia do komórki, co aktywuje enzymy, takie jak proteazy, lipazy i endonukleazy, prowadząc do uszkodzenia struktur komórkowych [9]. W siatkówce mechanizm ten ma szczególne znaczenie ze względu na wysoką aktywność synaptyczną oraz intensywną transmisję glutaminergiczną. Zaburzenia równowagi pomiędzy neurotransmiterami pobudzającymi a hamującymi prowadzi do uszkodzenia neuronów, zwłaszcza komórek zwojowych.

Coraz większą uwagę poświęca się roli neurozapalenia w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Mikroglej oraz astrocyty, pełniące funkcje immunologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym, ulegają aktywacji w odpowiedzi na działanie czynników uszkadzających tkankę nerwową [10]. W początkowych etapach, odpowiedź zapalna ma charakter protekcyjny, prowadząc do usuwania uszkodzonych komórek i regeneracji tkanki. Jednak przewlekła aktywacja mikrogleju i astrocytów prowadzi do wydzielania cytokin prozapalnych oraz powstawania ROS, które nasilają uszkodzenie neuronów [10]. W kontekście starzenia szczególne znaczenie przypisuje się zjawisku „inflammaging", czyli przewlekłego stanu zapalnego o niskim nasileniu, który zwiększa podatność układu nerwowego na zachodzące procesy degeneracyjne [11]. Starzejące się komórki mikrogleju wykazują zmniejszoną zdolność do usuwania uszkodzonych elementów komórkowych oraz zwiększoną produkcję mediatorów zapalnych, co przyczynia się do progresji neurodegeneracji, stanowiąc jedną z przyczyn wzrostu częstości występowania chorób neurodegeneracyjnych wraz z wiekiem.

1.3.2. Mechanizmy śmierci komórkowej neuronów

Śmierć neuronów w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych zachodzi głównie na drodze apoptozy lub nekrozy, które różnią się zarówno mechanizmem molekularnym, jak i konsekwencjami dla tkanki nerwowej. Apoptoza jest procesem programowanej, ściśle kontrolowanej śmierci komórki, wymagającym energii i przebiegającym z udziałem specyficznych szlaków sygnałowych, w tym aktywacji kaspaz oraz mechanizmów mitochondrialnych prowadzących do uwolnienia cytochromu c i fragmentacji DNA. Proces ten charakteryzuje się kondensacją chromatyny, zachowaniem integralności błony komórkowej oraz powstawaniem ciałek apoptotycznych, które następnie ulegają fagocytozie, co ogranicza indukcję reakcji zapalnej [9]. W

przeciwieństwie do tego, nekroza ma charakter niekontrolowany i jest wynikiem ostrego uszkodzenia komórki, najczęściej związanego z niedoborem ATP, zaburzeniem homeostazy jonowej, nadmiernym napływem jonów wapnia oraz nasilonym stresem oksydacyjnym. Prowadzi to do obrzęku komórki i organelli, utraty integralności błony komórkowej oraz uwolnienia zawartości komórkowej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co wywołuje silną reakcję zapalną. W kontekście chorób neurodegeneracyjnych apoptoza dominuje w przewlekłych procesach degeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, natomiast nekroza jest bardziej charakterystyczna dla ostrych uszkodzeń, jak ostre niedokrwienie tkanki nerwowej czy urazy. W wielu stanach patologicznych oba mechanizmy mogą współwystępować i wzajemnie się uzupełniać, determinując ostateczny zakres uszkodzenia tkanki nerwowej [9].

1.3.3. Neurodegeneracja w obrębie siatkówki

Siatkówka jako integralna część ośrodkowego układu nerwowego, podlega tym samym mechanizmom neurodegeneracyjnym co pozostałe neurony [12]. Ze względu na wysokie zapotrzebowanie energetyczne, intensywną transmisję synaptyczną oraz ograniczone zdolności regeneracyjne, jest szczególnie podatna na uszkodzenia. W przebiegu neurodegeneracji siatkówki dochodzi do utraty neuronów, w tym fotoreceptorów oraz komórek zwojowych, co prowadzi do zaburzeń generowania i przewodzenia sygnału wzrokowego i utraty widzenia. Istotną rolę odgrywają również patologie naczyniowe – zaburzenia ukrwienia oraz uszkodzenie bariery krew-siatkówka, które nasilają procesy zapalne i degeneracyjne [12].

1.4. Choroby neurodegeneracyjne siatkówki i nerwu wzrokowego

Choroby neurodegeneracyjne siatkówki stanowią heterogenną grupę schorzeń prowadzących do postępującej utraty funkcji wzrokowych, będących konsekwencją uszkodzenia neuronów siatkówki oraz ich połączeń synaptycznych. Wspólną cechą tych schorzeń jest progresywna utrata neuronów oraz brak efektywnej regeneracji, co prowadzi do nieodwracalnego pogorszenia wzroku [13]. W chwili obecnej strategie terapeutyczne w chorobach neurodegeneracyjnych siatkówki skupiają się na leczeniu objawowym, brak jest leczenia przyczynowego ingerującego bezpośrednio w patomechanizm neurodegeneracji lub odwracającego go. Choroby te można

klasyfikować na podstawie dominującej patogenezy (np. uwarunkowane genetycznie lub środowiskowo), lokalizacji uszkodzenia (np. nerw wzrokowy lub fotoreceptory) oraz obrazu klinicznego. Do najczęstszych należą: jaskra, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (ang. age-related macular degeneration, AMD), retinopatia cukrzycowa oraz różnorodne neuropatie nerwu wzrokowego [13].

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem jest przewlekłą, postępującą chorobą neurodegeneracyjną siatkówki, prowadzącą do uszkodzenia fotoreceptorów oraz komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. retinal pigment epithelium, RPE). W jej patomechanizmie kluczową rolę odgrywają stres oksydacyjny, dysfunkcja mitochondriów, przewlekły stan zapalny oraz odkładanie się złogów lipidowo-białkowych (tzw. druzy) w RPE, co zaburza transport składników odżywczych i prowadzi do degeneracji komórek. AMD stanowi jedną z głównych przyczyn utraty widzenia u osób powyżej 60. roku życia w krajach rozwiniętych, a częstość jej występowania wzrasta wraz z wiekiem. Klinicznie choroba objawia się stopniowym pogorszeniem widzenia centralnego, metamorfopsją (zniekształceniem obrazu), trudnościami w czytaniu oraz rozpoznawaniu twarzy, przy względnym zachowaniu widzenia obwodowego; w zaawansowanych stadiach może prowadzić do znacznej niepełnosprawności wzrokowej [14].

Jaskra stanowi przewlekłą neuropatię nerwu wzrokowego, w której dochodzi do postępującej utraty komórek zwojowych siatkówki oraz ich aksonów tworzących nerw wzrokowy. Patomechanizm postępującej utraty neuronów w przebiegu jaskry jest wieloczynnikowy i nie do końca poznany. Za jeden z głównych czynników ryzyka neurodegeneracji w przebiegu jaskry uważa się podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, jego występowanie nie jest jednak warunkiem koniecznym do rozpoznania jaskry. Potencjalna patogeneza choroby obejmuje również niedokrwienie, stres oksydacyjny oraz aktywację procesów apoptotycznych [15].

Retinopatia cukrzycowa jest przewlekłym powikłaniem cukrzycy o charakterze mikroangiopatii siatkówki, wynikającym z długotrwałej hiperglikemii prowadzącej do uszkodzenia naczyń włosowatych, zwiększonej przepuszczalności bariery krew-siatkówka oraz niedokrwienia tkanki. W patomechanizmie istotną rolę odgrywają stres oksydacyjny, stan zapalny oraz czynniki pochodzenia naczyniowego, w tym czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF), którego działanie sprzyja patologicznej neowaskularyzacji, czyli tworzeniu nieprawidłowych naczyń włosowatych, obszarów niedokrwienia siatkówki, krwotoków i

wysięków, a w konsekwencji odwarstwienia siatkówki i utraty widzenia. Retinopatia cukrzycowa stanowi jedną z głównych przyczyn utraty wzroku u osób w wieku produkcyjnym. Przebieg choroby początkowo jest bezobjawowy, następnie następuje pogorszenie ostrości widzenia, obecność mroczków (ubytków w polu widzenia) oraz w zaawansowanych stadiach, znaczne upośledzenie widzenia związane z obrzękiem plamki lub krwotokami do ciała szklistego i odwarstwieniem siatkówki [16].

1.4.1. Znaczenie kliniczne i terapeutyczne

Pomimo postępu w zrozumieniu mechanizmów patogenetycznych, skuteczne leczenie chorób neurodegeneracyjnych siatkówki pozostaje ograniczone. Obecne strategie terapeutyczne koncentrują się głównie na spowolnieniu progresji choroby, jednak rozwój terapii neuroprotekcyjnych, w tym ingerujących w apoptozę i odpowiedź zapalną, stanowi obiecujący kierunek badań.

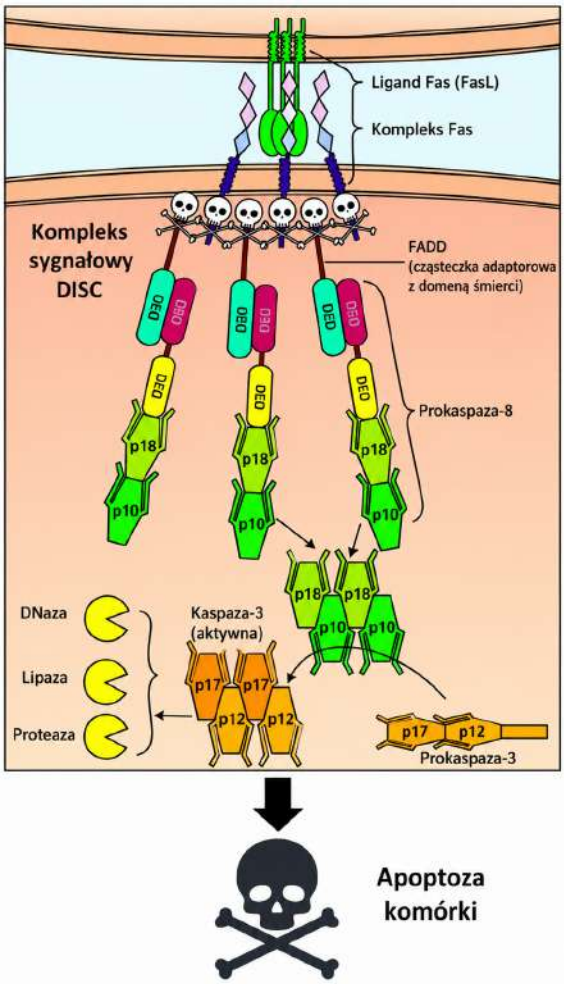
1.5. Szlak FasR/FasL

Szlak FasR/FasL (ang. Fas receptor/Fas ligand) stanowi jeden z kluczowych mechanizmów regulujących programowaną śmierć komórki – apoptozę. Jego aktywacja prowadzi do inicjacji apoptozy, odgrywając istotną rolę zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, w tym w procesach neurodegeneracyjnych [17,18].

1.5.1. Składowe i fizjologia szlaku FasR/FasL

Receptor Fas (FasR, CD95, APO-1) jest transbłonowym białkiem należącym do rodziny receptorów czynnika nekrozy nowotworów (ang. tumor necrosis factor receptors, TNFR), które zawiera charakterystyczną domenę śmierci (ang. death domain, DD) w części cytoplazmatycznej. Ligand Fas (FasL, CD95L) jest białkiem błonowym lub rozpuszczalnym, którego związanie z FasR prowadzi do oligomeryzacji receptora i inicjacji kaskady sygnałowej prowadząc do aktywacji procesu apoptozy [18,19]. Po związaniu FasL z FasR dochodzi do rekrutacji białka adaptorowego FADD (ang. Fas-associated death domain protein), które poprzez N'-końcową domenę efektorową (ang. death effector domain, DED) wiąże prokaspazę-8, prowadząc do powstania kompleksu sygnałowego indukującego śmierć komórki (ang. death-inducing signaling complex, DISC) [19]. W obrębie tego kompleksu następuje aktywacja kaspazy-8, która aktywuje kaskadę kaspaz wykonawczych, w tym kaspazy-3, prowadząc do apoptozy komórki [17].

Szlak FasR/FasL może również oddziaływać z innymi szlakami aktywacji apoptozy - poprzez aktywację białka BID (ang. BH3 interacting-domain death agonist), którego skrócona proteolitycznie forma tBID (ang. truncated BID) łączy się z białkami BAX oraz BAK na powierzchni mitochondriów, co promuje powstawanie porów w błonie mitochondrialnej, uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspazy-9 [20]. Składowe i podstawowe działanie szlaku FasR/FasL przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1. Schemat ukazujący aktywację szlaku FasR/FasL. Opracowanie własne opis zawarty w tekście.

1.5.2. Rola szlaku FasR/FasL w regulacji apoptozy

Szlak FasR/FasL w warunkach fizjologicznych stanowi jeden z najważniejszych mechanizmów eliminacji komórek uszkodzonych, zbędnych lub potencjalnie niebezpiecznych dla organizmu. Odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tkankowej poprzez kontrolę odpowiedzi immunologicznej oraz eliminowanie komórek autoreaktywnych [17]. W układzie odpornościowym, FasR/FasL odpowiada za tzw.

śmierć komórkową indukowaną aktywacją (ang. activation-induced cell death, AICD), która umożliwia eliminację nadmiernie aktywowanych limfocytów i utrzymanie tolerancji immunologicznej [21]. Zaburzenia funkcjonowania tego szlaku prowadzą do rozwoju chorób autoimmunologicznych oraz niekontrolowanej proliferacji komórek będąc jednym z patomechanizmów chorób rozrostowych. Rola szlaku FasR/FasL jest jednak bardziej złożona i nie ogranicza się tylko do wywoływania apoptozy komórek docelowych, oprócz indukcji apoptozy może on również uczestniczyć w procesach proliferacji, różnicowania oraz odpowiedzi zapalnej, w zależności od kontekstu komórkowego i aktywowanych szlaków sygnałowych [21]. W niektórych warunkach aktywacja Fas może prowadzić do aktywacji odpowiedzi anty-apoptotycznej, mediowanej np. szlakami NF-κB (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) czy MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases). Wskazuje to na bogactwo mechanizmów działania regulacyjnego szlaku FasR/FasL oraz jego liczne interakcje z innymi mechanizmami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, których złożoność pozostaje nadal obiektem badań naukowych. Aktywność szlaku FasR/FasL podlega ścisłej regulacji na wielu poziomach. Jednym z mechanizmów jest działanie białek inhibitorowych, takich jak FAIM2 (ang. Fas apoptotic inhibitory molecule 2), które ograniczają sygnalizację apoptotyczną i pełnią funkcję neuroprotekcyjną [22]. W siatkówce wykazano, że FAIM2 zmniejsza nasilenie apoptozy fotoreceptorów poprzez modulację aktywności szlaku Fas [22]. Ligand Fas występuje w postaci błonowej (ang. membrane-bound Fas ligand, mFasL) oraz rozpuszczalnej w cytoplazmie (ang. soluble Fas ligand, sFasL). Podczas gdy mFasL wykazuje silne działanie proapoptotyczne, forma rozpuszczalna może działać antagonistycznie, ograniczając aktywację receptora Fas i działając neuroprotekcyjnie [23]. Regulacja szlaku obejmuje także modyfikacje potranslacyjne oraz interakcje z innymi białkami sygnałowymi, takimi jak FADD, które mogą kierować sygnał w stronę apoptozy, nekroptozy lub odpowiedzi zapalnej [24].

1.5.3. Szlak FasR/FasL w procesach neurodegeneracji

W warunkach patologicznych, nadmierna aktywacja szlaku FasR/FasL prowadzi do utraty neuronów i progresji chorób neurodegeneracyjnych. Wykazano, że ekspresja składowych szlaku jest zwiększona w wielu schorzeniach układu nerwowego, w tym w chorobie Alzheimera. W tkankach mózgu pacjentów obserwuje się zwiększoną ekspresję zarówno receptora Fas, jak i jego ligandu, szczególnie w obszarach dotkniętych

degeneracją neuronów. Co istotne, ekspresja Fas/FasL nie ogranicza się wyłącznie do neuronów, lecz obejmuje również komórki glejowe, w tym mikroglej, który może odgrywać aktywną rolę w inicjowaniu i podtrzymywaniu procesów apoptotycznych oraz neurozapalnych [25]. W modelach eksperymentalnych, β-amyloid indukuje ekspresję FasL oraz aktywację szlaku apoptotycznego, co nasila proces neurodegeneracji i przyspiesza progresję choroby. Co istotne, blokowanie sygnalizacji FasR/FasL wykazuje działanie neuroprotekcyjne zarówno przez hamowanie apoptozy neuronów jak i hamowanie odpowiedzi zapalnej mediowanej przez komórki glejowe, co podkreśla znaczenie tego szlaku w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych [25].

W siatkówce, szlak FasR/FasL odgrywa kluczową rolę w procesach neurodegeneracyjnych, szczególnie w uszkodzeniach związanych z niedokrwieniem, jaskrą oraz odwarstwieniem siatkówki. W mysim modelu jaskry wykazano, że aktywacja szlaku prowadzi do apoptozy RGC oraz degeneracji ich aksonów, a zahamowanie tego szlaku znacząco ogranicza utratę neuronów [23]. Ponadto, jak i w chorobach neurodegeneracyjnych mózgu, aktywacja FasR/FasL wiąże się z nasileniem reakcji zapalnej i aktywacją mikrogleju. Jednym z białek działających neuroprotekcyjnie przez interakcje ze szlakiem FasR/FasL jest FAIM2. U myszy pozbawionych FAIM2 obserwowano nasiloną apoptozę fotoreceptorów oraz zwiększoną ekspresję genów proapoptotycznych, takich jak *Fas* i *Ripk1* (ang. Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1), zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i modelu odwarstwienia siatkówki. Wyniki te wskazują, że FAIM2 nie tylko hamuje aktywność szlaku FasR/FasL w odpowiedzi na stres, ale również pełni funkcję regulatora homeostazy komórkowej w siatkówce. Tym samym FAIM2 stanowi istotny element mechanizmów ochronnych ograniczających uszkodzenia neuronów siatkówki w przebiegu procesów neurodegeneracyjnych [22].

Z uwagi na centralną rolę szlaku FasR/FasL w regulacji apoptozy neuronów oraz neurozapalenia, stanowi on obiecujący cel terapeutyczny w chorobach neurodegeneracyjnych siatkówki. Strategie terapeutyczne obejmują: blokowanie receptora Fas, zwiększenie udziału rozpuszczalnej formy ligandu Fas, aktywację szlaków ingerujących w szlak Fas osłabiając jego proapoptotyczne działanie. Badania eksperymentalne wskazują, że modulacja tego szlaku może skutecznie ograniczać utratę neuronów i poprawiać funkcję siatkówki, co ma istotne znaczenie dla rozwoju terapii neuroprotekcyjnych.

1.6. Estrogeny i menopauza

1.6.1. Estrogeny

Estrogeny stanowią grupę steroidowych hormonów płciowych, które pełnią kluczową rolę nie tylko w regulacji funkcji rozrodczych, ale również w utrzymaniu homeostazy wielu układów organizmu, w tym układu nerwowego, sercowo-naczyniowego oraz kostnego. Wśród nich najważniejszym i biologicznie najbardziej aktywnym związkiem jest 17β-estradiol (E2), który wykazuje szerokie spektrum działania na poziomie komórkowym i tkankowym.

Biosynteza estrogenów zachodzi w wyniku wieloetapowego procesu steroidogenezy rozpoczynającego się od cholesterolu. Pierwszym etapem jest transport cholesterolu do mitochondrium oraz jego konwersja do pregnenolonu. Następnie pregnenolon ulega przemianom enzymatycznym prowadzącym do powstania androgenów, które stanowią bezpośrednie prekursory estrogenów [26]. Kluczowym etapem syntezy estrogenów jest aromatyzacja androgenów, katalizowana przez enzym aromatazę (CYP19A1), która przekształca testosteron w estradiol oraz androstendion w estron. Proces ten zachodzi głównie w jajnikach u kobiet, jednak istotna część estrogenów powstaje również w tkance tłuszczowej, kościach oraz nadnerczach [26]. U mężczyzn estrogeny również pełnią istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy hormonalnej, a większość krążącego estradiolu pochodzi z obwodowej aromatyzacji testosteronu powstającego w gonadach [27]. Współczesne badania wykazały, że synteza estrogenów nie ogranicza się wyłącznie do klasycznych narządów dokrewnych. Zarówno mózg, jak i siatkówka wykazują zdolność do lokalnej produkcji estrogenów, określanej jako neurosteroidogeneza. Komórki tych struktur posiadają pełen zestaw enzymów steroidogennych, umożliwiających konwersję cholesterolu do estradiolu, co pozwala na lokalną regulację jego stężenia niezależnie od aktywności steroidogenezy w gonadach i tkankach obwodowych [27,28]. Istotnym elementem regulacji biodostępności estrogenów jest ich wiązanie z białkami osocza, głównie globuliną wiążącą hormony płciowe (ang. sex hormone-binding globulin, SHBG) oraz albuminą. Jedynie niewielka frakcja wolnego hormonu wykazuje aktywność biologiczną i jest zdolna do dyfuzji przez błony komórkowe oraz interakcji z receptorami estrogenowymi [29].

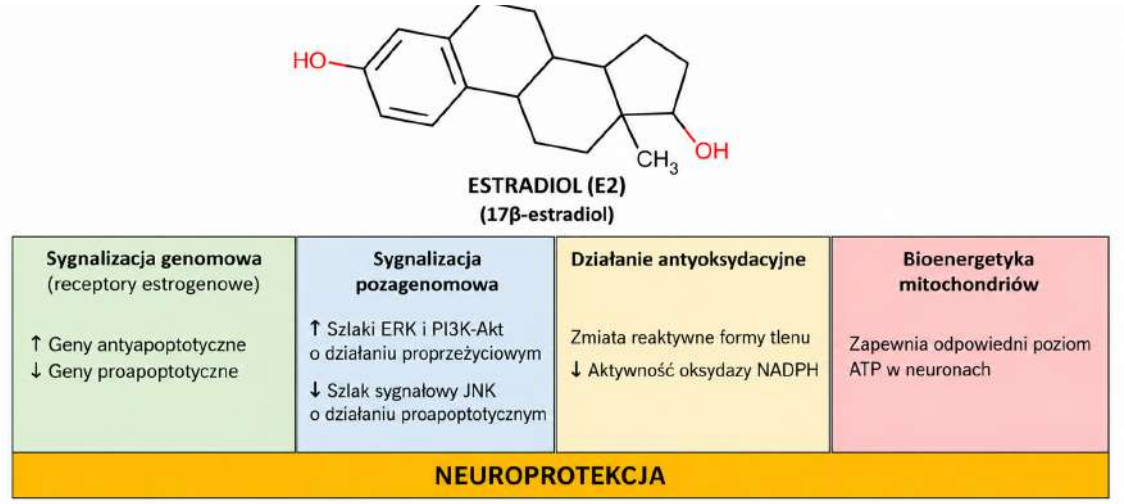
Działanie estrogenów realizowane jest poprzez specyficzne receptory estrogenowe, głównie α i β (ang. estrogen receptor alpha/beta, ERα/ERβ), należące do

rodziny receptorów jądrowych. Po związaniu ligandu receptory te ulegają dimeryzacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiążą się z elementami odpowiedzi estrogenowej (ang. estrogen response element, ERE) w obrębie DNA, regulując ekspresję genów docelowych [30]. Oprócz klasycznego mechanizmu genomowego estrogeny mogą również działać poprzez szybkie mechanizmy niegenomowe, angażujące receptory błonowe oraz szlaki sygnałowe takie jak PI3K/AKT (ang. phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B) MAPK/ERK (ang. mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) czy cAMP/PKA (ang. cyclic AMP/protein kinase A). Mechanizmy te umożliwiają szybkie dostosowanie funkcji komórki do zmieniających się warunków fizjologicznych oraz środowiskowych [30]. Receptory estrogenowe wykazują szeroką dystrybucję w organizmie, w tym w układzie nerwowym, gdzie obecne są zarówno w neuronach, jak i komórkach glejowych. Ich ekspresję stwierdzono również w strukturach oka, w tym w siatkówce, co wskazuje na istotną rolę estrogenów w regulacji funkcji narządu wzroku [30,31].

Estrogeny pełnią fundamentalną rolę w regulacji procesów fizjologicznych, obejmujących rozwój i regulację funkcjonowania żeńskiego układu rozrodczego, metabolizm kości i gospodarkę wapniowo-fosforanową, gospodarkę lipidową oraz funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. Wieloprofilowe działanie estrogenów jest niezbędne do utrzymania homeostazy zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Badania wykazały, że ich niedobór u mężczyzn prowadzi do zaburzeń metabolicznych, osteoporozy oraz dysfunkcji układu rozrodczego [27]. W układzie nerwowym, estrogeny pełnią funkcję neuromodulatorów i czynników troficznych. Regulują rozwój mózgu, różnicowanie neuronów oraz kształtowanie połączeń synaptycznych. W okresie rozwojowym wpływają na organizację struktur neuronalnych, natomiast u dorosłych odpowiadają za modulację aktywności neuronalnej oraz funkcji poznawczych [27]. Estrogeny uczestniczą w regulacji plastyczności synaptycznej, neurogenezy, procesów uczenia się oraz zapamiętywania, regulacji stanu emocjonalnego. Wykazano również ich wpływ na metabolizm neuronalny oraz utrzymanie integralności bariery krew-mózg, co jest istotne dla ochrony tkanki nerwowej [32].

Siatkówka jako część ośrodkowego układu nerwowego, wykazuje zdolność do lokalnej syntezy estrogenów oraz ekspresji ich receptorów. Estrogeny wpływają na funkcjonowanie komórek siatkówki, w tym komórek zwojowych, fotoreceptorów oraz komórek glejowych [28]. W warunkach fizjologicznych, hormony te uczestniczą przede wszystkim w regulacji przepływu krwi w naczyniach siatkówki oraz regulacji procesów

metabolicznych neuronów. Ich odpowiednie stężenie jest szczególnie istotne dla zachowania prawidłowej funkcji widzenia, zwłaszcza u kobiet w wieku pomenopauzalnym, u których spadek poziomu estrogenów wiąże się ze zwiększonym ryzykiem chorób narządu wzroku [31,32]. Istotnym aspektem działania estrogenów jest ich zdolność do modulowania ekspresji genów oraz aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm komórkowy. Dzięki temu, hormony te uczestniczą w adaptacji organizmu do zmieniających się warunków fizjologicznych, takich jak cykl miesiączkowy, ciąża czy starzenie. Udział estrogenów w mechanizmach neuroprotekcyjnych przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Neuroprotekcyjne działania estradiolu.

1.6.2. Menopauza

Menopauza stanowi fizjologiczny etap życia kobiety, definiowany jako trwałe ustanie czynności jajników i zakończenie cyklu menstruacyjnego, wynikające z wyczerpania puli pęcherzyków jajnikowych. Średni wiek wystąpienia menopauzy wynosi około 50–52 lat [33]. Proces ten wiąże się z istotnym spadkiem stężenia estrogenów, przede wszystkim 17β-estradiolu, co prowadzi do licznych zmian ogólnoustrojowych, w tym metabolicznych, naczyniowych oraz neurobiologicznych. Menopauza może mieć charakter naturalny lub być indukowana. Naturalna menopauza wynika z fizjologicznego starzenia się układu rozrodczego, natomiast menopauza indukowana (chirurgiczna) jest konsekwencją obustronnego usunięcia jajników (owariektomii). W przeciwieństwie do menopauzy naturalnej, która rozwija się stopniowo, menopauza chirurgiczna prowadzi do nagłego spadku stężenia hormonów

płciowych, co może wywoływać bardziej nasilone konsekwencje układowe niedoboru estrogenów [34]. Ważnym aspektem jest również wiek wystąpienia menopauzy. Wyróżnia się menopauzę przedwczesną (<40 r.ż.) oraz wczesną (40–45 r.ż.), które wiążą się z dłuższym okresem niedoboru estrogenów i zwiększonym ryzykiem powikłań zdrowotnych, w tym chorób neurodegeneracyjnych [35].

Spadek poziomu estrogenów w okresie menopauzy prowadzi do istotnych zmian w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Estrogeny odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu mózgu, w tym transportu glukozy, funkcji mitochondriów oraz produkcji ATP. Ich niedobór skutkuje przejściem do mniej wydajnego fenotypu metabolicznego, co zwiększa podatność neuronów na uszkodzenia [36]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że utrata estrogenów prowadzi do zaburzeń funkcji poznawczych, szczególnie w zakresie pamięci roboczej i koncentracji. W modelach zwierzęcych, owariektomia przyspiesza procesy zaburzeń funkcji kognitywnych, a deficyty te nasilają się wraz z wiekiem [37]. Zaburzenia funkcji poznawczych indukowane menopauzą są związane m.in. z zaburzeniem funkcjonowania układu cholinergicznego, który odgrywa kluczową rolę w procesach uczenia się i pamięci. Wykazano, że estrogeny modulują aktywność neuronów cholinergicznych oraz ekspresję enzymów odpowiedzialnych za syntezę acetylocholiny, a ich niedobór prowadzi do dysfunkcji tych układów [38].

Liczne badania epidemiologiczne wskazują na związek pomiędzy menopauzą, a zwiększonym ryzykiem chorób neurodegeneracyjnych u ludzi. Szczególne znaczenie ma wiek wystąpienia menopauzy, który koreluje z ryzykiem rozwoju otępienia. W analizie obejmującej ponad 230 tysięcy kobiet wykazano, że menopauza przed 40. rokiem życia wiąże się ze znacząco zwiększonym ryzykiem demencji, niezależnie od jej typu [35]. Podobne zależności obserwuje się w odniesieniu do chorób naczyniowych mózgu. Wczesna menopauza oraz chirurgiczne usunięcie jajników zwiększają ryzyko udaru niedokrwiennego, co wskazuje na ochronną rolę estrogenów w regulacji funkcji układu naczyniowego oraz procesów zapalnych [34]. Jednocześnie wyniki badań dotyczących wpływu hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) na funkcje poznawcze pozostają niejednoznaczne. W niektórych badaniach wykazano poprawę funkcji poznawczych, podczas gdy inne wskazują na brak efektu lub nawet zwiększone ryzyko demencji, szczególnie w przypadku rozpoczęcia terapii w późniejszym wieku [39]. Sugeruje to, że działanie estrogenów jest silnie zależne od kontekstu biologicznego i czasu ekspozycji.

Modele zwierzęce, szczególnie oparte na owariektomii, stanowią podstawowe narzędzie do badania wpływu niedoboru estrogenów na układ nerwowy. Wykazano, że usunięcie jajników prowadzi do przyspieszenia procesów neurodegeneracyjnych oraz pogorszenia funkcji poznawczych, co odzwierciedla zmiany obserwowane u kobiet w okresie menopauzy [37]. W kontekście narządu wzroku, szczególnie istotne są badania wskazujące na wpływ menopauzy na siatkówkę i nerw wzrokowy. W modelach zwierzęcych wykazano, że menopauza chirurgiczna prowadzi do pogorszenia funkcji siatkówki oraz zwiększenia podatności komórek zwojowych na uszkodzenia. Niedobór estrogenów zwiększa wrażliwość komórek zwojowych na uraz oraz przyspiesza procesy neurodegeneracyjne [40]. Wykazano również, że niedobór estrogenów przyspiesza procesy starzenia nerwu wzrokowego oraz zwiększa podatność na rozwój jaskry, co potwierdza ich istotną rolę w utrzymaniu integralności neuronów oka [40,41]. Związek pomiędzy menopauzą, a neurodegeneracją ma charakter wieloczynnikowy i obejmuje zaburzenia metabolizmu energetycznego i mitochondrialnego neuronów siatkówki, zwiększenie stresu oksydacyjnego, nasilenie neurozapalenia w siatkówce, zaburzenia neuroprzekaźnictwa oraz aktywację szlaków proapoptotycznych.

1.7. Selektywne modulatory receptora estrogenowego

Selektywne modulatory receptora estrogenowego (ang. selective estrogen receptor modulators, SERMs) stanowią grupę syntetycznych ligandów receptorów estrogenowych, które wykazują tkankowo swoistą aktywność agonistyczną lub antagonistyczną. Ich właściwości farmakodynamiczne czynią je atrakcyjną alternatywą dla klasycznej terapii estrogenowej, szczególnie w kontekście chorób neurodegeneracyjnych oraz zaburzeń funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego.

1.7.1. Mechanizm działania SERMs

SERMs wiążą się z receptorami estrogenowymi ERα oraz ERβ, indukując zmiany konformacyjne umożliwiające selektywną rekrutację szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego i transkrypcji, co prowadzi do tkankowo specyficznej regulacji ekspresji genów zależnych od estrogenów [42]. Mechanizm ich działania obejmuje zarówno klasyczne szlaki genomowe, jak i szybkie mechanizmy niegenomowe z udziałem receptorów błonowych, takich jak GPR30 (ang. G protein-coupled receptor 30) [43]. Aktywacja tych szlaków skutkuje uruchomieniem licznych kaskad sygnałowych, w

tym PI3K/AKT, MAPK/ERK oraz PKA/CREB (ang. protein kinase A/cAMP response element-binding protein), które odgrywają kluczową rolę w regulacji przeżycia komórki, odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz procesów zapalnych [43]. Istotną cechą SERMs jest ich zdolność do działania jako agonistów w obrębie mózgu przy jednoczesnym działaniu antagonistycznym w tkankach obwodowych, takich jak tkanka gruczołowa piersi czy endometrium macicy, co ogranicza działania niepożądane charakterystyczne dla estrogenów [42].

Jednym z najważniejszych mechanizmów neuroprotekcyjnych SERMs jest ich zdolność do hamowania procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym. Wykazano, że tamoksyfen i raloksyfen redukują aktywację mikrogleju oraz produkcję cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-6 (IL-6) czy czynnik martwicy nowotworów-α (ang. tumor necrosis factor-α, TNF-α) [44,45]. Mechanizm ten obejmuje modulację aktywności czynników transkrypcyjnych, w tym NF-κB oraz AP-1 (ang. activator protein 1) [44]. Regulacja aktywności mikrogleju i astrocytów ogranicza przewlekły stan zapalny, który odgrywa istotną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona [42]. SERMs wykazują działanie antyoksydacyjne poprzez redukcję produkcji ROS oraz hamowanie peroksydacji lipidów, co przyczynia się do ochrony neuronów przed uszkodzeniem [43]. Ponadto SERMs zmniejszają ekscytotoksyczność glutaminianową, będącą jednym z głównych mechanizmów śmierci neuronów. Badania eksperymentalne wykazały, że raloksyfen zwiększa przeżywalność neuronów oraz ich zdolność do wzrostu w modelach uszkodzeń indukowanych β-amyloidem, stresem oksydacyjnym oraz glutaminianem [46]. Wykazuje on również działanie neurotroficzne, szczególnie w obrębie hipokampa. SERMs wpływają na funkcję i liczebność komórek glejowych. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że raloksyfen, podobnie jak estradiol, zmniejsza liczbę astrocytów i komórek mikrogleju w hipokampie, co może ograniczać procesy neurozapalne [47]. SERMs wykazują również działanie ochronne w obrębie siatkówki. Raloksyfen zapobiega degeneracji fotoreceptorów poprzez stabilizację homeostazy wapniowej oraz hamowanie apoptozy komórek [48]. Dla porównania, estradiol również wykazuje silne działanie neuroprotekcyjne w siatkówce, jednak jego zastosowanie ograniczają działania ogólnoustrojowe [49].

1.7.2. Przewaga SERMs nad estrogenami w zastosowaniu terapeutycznym

Pomimo udokumentowanego działania neuroprotekcyjnego estrogenów, ich zastosowanie kliniczne jest ograniczone ze względu na działania niepożądane. Terapia estrogenowa wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nowotworów hormonozależnych, jak rak piersi i endometrium, oraz powikłań zakrzepowo-zatorowych [50]. Dodatkowo nawet miejscowe podanie estradiolu może prowadzić do istotnych efektów ogólnoustrojowych, co ogranicza jego bezpieczeństwo stosowania [49]. SERMs wykazują szereg istotnych przewag. SERMs działają jako agoniści w obrębie mózgu i tkanki kostnej, a jako antagoniści w tkankach rozrodczych, co znacząco redukuje ryzyko nowotworów [42]. W przeciwieństwie do estradiolu, raloksyfen nie wykazuje działania proliferacyjnego w obrębie macicy ani nie zwiększa istotnie ryzyka nowotworów w modelach eksperymentalnych [51]. SERMs zachowują wiele korzystnych efektów estrogenów, takich jak działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne oraz neurotroficzne, przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych [42]. Ze względu na opisane właściwości, SERMs stanowią obiecującą grupę związków w terapii chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera czy udaru mózgu [42].

Obecne strategie terapeutyczne stosowane w chorobach naczyniowych i neurodegeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego, w tym siatkówki koncentrują się przede wszystkim na różnych metodach wazoprotekcji, zmniejszaniu krzepliwości krwi oraz leczeniu powikłań niedokrwienia, na przykład poprzez hamowanie neowaskularyzacji. Aktualnie stosowane metody terapeutyczne nie są jednak ukierunkowane bezpośrednio na sam proces neurodegeneracji. Współczesne strategie terapeutyczne nie zapewniają wystarczającej ochrony przed utratą wzroku u pacjentów z naczyniowymi chorobami siatkówki ani nie umożliwiają przywrócenia utraconych funkcji neuronów. Dlatego jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny pozostaje opracowanie skutecznych metod neuroprotekcji i regeneracji komórek siatkówki. Biorąc pod uwagę obiecujące dane literaturowe dotyczące neuroprotekcyjnego działania SERMs, ich znanego profilu bezpieczeństwa oraz szerokiego zastosowania klinicznego, a także doniesienia wskazujące na istotną rolę szlaku FasR/FasL w regulacji procesu apoptozy w neuronach, za zasadne uznano opracowanie modelu doświadczalnego umożliwiającego ocenę potencjalnego zastosowania terapeutycznego raloksyfenu oraz antagonisty FasR/FasL (KP7-6) w procesach neurodegeneracyjnych. Model ten może w przyszłości stanowić podstawę do dalszych badań translacyjnych.

2. Założenia i cele pracy

2.1. Cel główny

Celem głównym przeprowadzonego badania było określenie neuroprotekcyjnego działania terapii indywidualnej lub łączonej agonistami receptorów estrogenowych (17β-estradiol lub SERM – raloksyfen) oraz antagonistą szlaku Fas (cząsteczka KP7-6) na neurony siatkówki u gryzoni poddanych owariektomii w modelu niedokrwienia siatkówki.

2.2. Cele szczegółowe

Niedobór estrogenów w okresie okołomenopauzalnym stanowi istotny czynnik ryzyka takich chorób neurodegeneracyjnych jak jaskra, retinopatia niedokrwienna, retinopatia cukrzycowa, czy AMD [52]. Neurodegeneracja zależna od zaburzeń hormonalnych prowadzi do śmierci neuronów siatkówki (głównie RGC), które nie mają zdolności spontanicznej regeneracji. Niedobór estradiolu, istotny w procesie starzenia lub wynikający z przyczyn jatrogennych (menopauza po zabiegu owariektomii), może przyspieszać pierwotną lub wtórną apoptozę komórek RGC oraz sprzyjać rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych [28]. Ponieważ niedobór estrogenów w okresie okołomenopauzalnym jest powszechnym problemem, a klasyczna hormonalna terapia zastępcza obciążona jest licznymi działaniami niepożądanymi, istnieje potrzeba szeroko zakrojonych badań nad alternatywnymi metodami zapobiegania pogorszeniu widzenia zależnemu od niedoboru estrogenów. Dodatkowo istnieją dowody na interakcje między sygnalizacją estrogenową a szlakiem apoptotycznym z udziałem FasR/FasL, uzasadnione wydaje się być badanie tej zależności w neuronach siatkówki. Modulowanie receptorów estrogenowych przy użyciu SERMs, będących bezpieczniejszą alternatywą dla klasycznej hormonalnej terapii zastępczej oraz blokowanie szlaku FasR/FasL mogłoby dostarczyć odpowiedzi na temat interakcji między tymi dwoma złożonymi układami sygnalizacyjnymi, a uzyskane wyniki potencjalnie otworzyłyby nowe możliwości terapii celowanych w chorobach naczyniowych siatkówki. Jest to szczególnie istotne, ponieważ częstość procesów neurodegeneracyjnych wzrasta wraz z wiekiem, a ich zapobieganie może znacząco poprawić jakość życia oraz opóźnić utratę wzroku u osób dotkniętych tymi schorzeniami.

Całość przeprowadzonego badania składała się z dwóch głównych części. Cele szczegółowe obu części badania prezentują się następująco:

Część pierwsza:

- Porównanie wpływu dwu- i siedmiotygodniowego okresu menopauzy (wywołanej zabiegiem owariektomii) na funkcjonowanie i przeżywalność komórek zwojowych siatkówki.
- Ocena wpływu menopauzy wywołanej zabiegiem owariektomii na funkcjonowanie i przeżywalność komórek zwojowych siatkówki w szczurzym modelu ostrej neuropatii nerwu wzrokowego.

Część druga:

- Ocena antyapoptotycznego działania terapii agonistami receptorów estrogenowych (17β-estradiol lub raloksyfen), antagonistą szlaku Fas (cząsteczką KP7-6) oraz terapii łączonych na neurony siatkówki w modelu niedokrwienia ostrego (eksplanty siatkówkowe) oraz przewlekłego (model niedokrwienia/reperfuzji).
- Porównanie antyapoptotycznego efektu terapii w grupie zwierząt poddanych oraz niepoddanych owariektomii.
- Ocena występowania potencjalnych synergistycznych działań molekularnych prowadzonych terapii.

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta, znieczulenie

Wszystkie procedury na zwierzętach zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję ds. Doświadczeń na Zwierzętach i przeprowadzone zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego (2010/63/UE). Zwierzęta (szczury Long Evans oraz myszy C57BL/6) pochodziły z Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, gdzie były namnażane oraz hodowane. Zabiegi chirurgiczne wykonywano w znieczuleniu ogólnym, indukowanym dootrzewnowym podaniem ketaminy (50 mg/kg; VetaKetam, Vetagro) i ksylazyny (5 mg/kg; Xylapan, Vetoquinol Biowet). Do znieczulenia miejscowego stosowano 0,5% chlorowodorek proksymetakainy (Alcaine, Alcon), podawany w postaci kropli do worka spojówkowego. Eutanazję przeprowadzano poprzez dootrzewnowe przedawkowanie ketaminy i ksylazyny, a następnie dekapitację.

3.2. Schemat przeprowadzenia badań

Całość przeprowadzonego badania składała się z dwóch części. W pierwszej części oceniano wpływ wywołanej chirurgicznie poprzez zabieg owariektomii (ang. ovariectomy, OVA) menopauzy na funkcjonowanie i przeżywalność komórek zwojowych siatkówki w szczurzym modelu ostrej neuropatii nerwu wzrokowego wywołanej zabiegiem zmiażdżenia nerwu wzrokowego (ang. optic nerve crush, ONC). Po wykazaniu istotnego wpływu owariektomii na przebieg procesu neurodegeneracji w siatkówce zaplanowano oraz przeprowadzono drugą część doświadczenia, w której przeprowadzono ocenę wpływu suplementacji 17β-estradiolu, raloksyfenu (SERM), oraz KP7-6 (antagonista szlaku FasR/FasL) na przeżywalność RGC w mysim modelu niedokrwienia siatkówki zarówno u zwierząt poddanych owariektomii jak i w grupie kontrolnej bez wykonanego zabiegu.

3.2.1. Schemat przeprowadzenia pierwszej części badania

W pierwszej części badania wykorzystano dwadzieścia siedem ośmiotygodniowych samic szczura szczepu Long Evans, podzielonych na dwie główne grupy w zależności od czasu pomiędzy zabiegiem owariektomii a eutanazją. Schemat doświadczenia przedstawiono na Rycinie 3.

Pierwsza grupa składała się z 12 zwierząt: 10 poddano owariektomii, a 2 pozostawiono jako grupę kontrolną. Zwierzęta poddano eutanazji dwa tygodnie po owariektomii, a następnie przeprowadzono perfuzję przezsercową z użyciem 500 ml buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (ang. phosphate buffered saline, PBS) oraz 500 ml 4% roztworu paraformaldehydu (PFA). Z pobranych gałek ocznych wyizolowano siatkówki celem barwienia immunohistochemicznego (Ryc. 3A).

Druga grupa obejmowała 15 zwierząt, podzielonych na 3 równe podgrupy: zwierzęta poddane wyłącznie owariektomii (OVA, n = 5), zwierzęta poddane owariektomii oraz jednostronnemu zmiażdżeniu nerwu wzrokowego 6 tygodni po owariektomii (OVA + ONC, n = 5) oraz zwierzęta poddane jednostronnemu zmiażdżeniu nerwu wzrokowego bez wcześniejszej owariektomii (ONC, n = 5). W trakcie trwania badania funkcja siatkówki była oceniana w badaniu elektroretinografii (ERG) w trzech punktach czasowych: przed owariektomią, 6 tygodni po owariektomii (przed ONC) i przed eutanazją. Zwierzęta poddano eutanazji siedem tygodni po owariektomii (jeden tydzień po zmiażdżeniu nerwu wzrokowego). Następnie wypreparowano gałki oczne, z których wyizolowano tkankę siatkówki. W każdej z trzech podgrup jedną parę siatkówek homogenizowano do dalszych analiz metodą Western Blot, natomiast pozostałe cztery pary siatkówek przygotowano jako preparaty całościowe do barwień immunohistochemicznych i analiz stereologicznych (Ryc. 3B).

3.2.2. Schemat przeprowadzenia drugiej części badania.

Druga część badania składała się z dwóch elementów – badania in vivo i ex vivo.

Badanie in vivo badania obejmowało wykorzystanie 62 samic myszy C57BL/6, które początkowo podzielono na 12 grup eksperymentalnych. Sześć z tych grup poddano obustronnej owariektomii (+OVA) w celu wywołania niedoboru estrogenów, natomiast pozostałe sześć grup stanowiło kontrolę „*sham”*, bez owariektomii (-OVA). Siedem tygodni po zabiegu chirurgicznym, myszy zarówno z grup +OVA, jak i -OVA otrzymały skojarzone leczenie farmakologiczne ogólnoustrojowe oraz doszklistkowe. Utworzono następujące podgrupy:

(1) Pozorowany zabieg podskórny (*sham*) połączony z jednorazowym doszklistkowym podaniem nośnika (10% dimetylosulfotlenek; DMSO w PBS, n=4), określana jako grupa „Kontrolna”.

(2) Pozorowany zabieg podskórny (*sham*) połączony z jednorazowym doszklistkowym podaniem KP7-6 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (n = 6), określana jako grupa „KP7-6".
(3) Wszczepienie podskórnego implantu zawierającego raloksyfen (5 mg na implant uwalnianie przez 60 dni, Innovative Research of America, USA) połączone z jednorazowym doszklistkowym podaniem nośnika (10% DMSO w 0,9% PBS, n = 6), określana jako grupa „Raloksyfen"
(4) Wszczepienie podskórnego implantu zawierającego raloksyfen połączone z jednorazowym doszklistkowym podaniem KP7-6 (n = 6), określana jako grupa „Raloksyfen+KP7-6".
(5) Jednorazowe doszklistkowe podanie PBS (n = 4), określane jako grupa „PBS".
(6) Jednorazowe doszklistkowe podanie 17β-estradiolu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), określane jako grupa „Estradiol" (n = 5).

Lewe oczy zwierząt kontrolnych nie były poddane niedokrwieniu i stanowiły fizjologiczny, nieuszkodzony narząd. PBS służył jako rozpuszczalnik dla 17β-estradiolu, natomiast DMSO wykorzystano jako rozpuszczalnik dla KP7-6. Tydzień po rozpoczęciu leczenia (tj. 8 tygodni po operacji) wszystkie myszy poddano standaryzowanemu uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnemu siatkówki (ang. ischemia/reperfusion, I/R) w prawym oku poprzez indukcję podwyższonego ciśnienia wewnątrzgałkowego. Po kolejnych dwóch miesiącach wszystkie zwierzęta uśmiercono w celu pobrania tkanek i przeprowadzenia dalszych analiz. Przebieg drugiej części doświadczenia przedstawiono na rycinie 10.

W badaniu ex vivo, 15 samic myszy szczepu C57BL/6 uśmiercono poprzez przedawkowanie ketaminy i ksylazyny, a następnie dekapitację. Gałki oczne pobrano i umieszczono w schłodzonym PBS zawierającym 1% roztwór penicyliny-streptomycyny (Invitrogen, USA). Po usunięciu przednich segmentów oka wyizolowano siatkówki, przecięto je wzdłuż osi poziomej i przeniesiono na wkładki hodowlane Millicell o porowatości 0,4 μm (Millipore, USA), umieszczając je warstwą komórek zwojowych ku górze. Szczególną uwagę zwrócono na zachowanie ciała szklistego przylegającego do powierzchni siatkówki. Wkładki umieszczono w płytkach 12-dołkowych zawierających podłoże Neurobasal A wzbogacone 2% roztworem B-27, 1% roztworem N2, 1% roztworem penicyliny oraz 0,4% roztworem GlutaMax (Invitrogen, USA) i inkubowano

w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO_2. Eksplanty traktowano roztworem KP7-6/DMSO o stężeniu 0,5 mg/mL, roztworem raloksyfenu/DMSO o stężeniu 15 μM, kombinacją KP7-6 i raloksyfenu lub roztworem 17β-estradiolu/PBS (10 μM). Podłoże wymieniano co drugi dzień, a pożywkę pohodowlaną zbierano do oznaczenia aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase, LDH). Po 8 dniach, eksplanty siatkówki utrwalano w 4% PFA przez noc w temperaturze 4°C, a następnie przygotowywano do barwienia immunofluorescencyjnego oraz ilościowej analizy komórek RGC (Ryc. 3C)

3.3. Owariektomia

W znieczuleniu ogólnym ogolono grzbietową skórę każdego gryzonia (szczura w 1. części badania i myszy w 2. części badania) i zdezynfekowano ją 70% etanolem. Obustronną owariektomię przeprowadzono poprzez pośrodkowe nacięcie grzbietowe poniżej łuków żebrowych. Po otwarciu jamy otrzewnej, każdy z jajników wyizolowano, podwiązano wchłanialnymi szwami 4/0 Vicryl (Ethicon, Johnson & Johnson, USA), a następnie usunięto. Warstwy mięśniową i otrzewną zamknięto szwami 4/0 Prolene, a skórę szwami 3/0 Vicryl (Ethicon, Johnson & Johnson, USA). Pole operacyjne zdezynfekowano 10% roztworem powidonu jodyny (Teva Pharmaceuticals, Polska). Po operacji zwierzętom podawano doustnie paracetamol (4 mg/mL w wodzie do picia; Polfa, Polska) w celu zapewnienia analgezji (Ryc. 3D)

3.4. Zmiażdżenie nerwu wzrokowego

Zabieg przeprowadzano w znieczuleniu ogólnym jak opisano powyżej. Zwierzęta umieszczano pod mikroskopem operacyjnym, a do prawego oka aplikowano jedną kroplę 0,5% chlorowodorku proksymetakainy w celu dodatkowego znieczulenia miejscowego. Zakrzywioną pęsetę delikatnie wsuwano pomiędzy górną i dolną powiekę, powodując niewielkie wysunięcie gałki ocznej z oczodołu. Drugą ręką, przy użyciu mikronożyczek, przecinano spojówkę wzdłuż górno-skroniowej części rąbka rogówki, do uzyskania dostępu do przestrzeni podspojówkowej. Nacięcie podspojówkowe poszerzano tępą stroną nożyczek, a następnie tkanki oddzielano pęsetą w celu wyraźnego uwidocznienia przestrzeni zagałkowej. Samozaciskowe kleszczyki przesuwano wzdłuż gałki ocznej, powyżej mięśnia prostego górnego oraz pomiędzy dużymi naczyniami rzęskowymi, odsuwając tkankę tłuszczową i odsłaniając nerw wzrokowy. Samozaciskowe kleszczyki

zakładano na nerw wzrokowy w odległości 0,5 mm od gałki ocznej, po czym uchwyt luzowano i utrzymywano w stałej pozycji przez 10 sekund w celu zmiażdżenia nerwu. Po zakończeniu zabiegu, narzędzia delikatnie usuwano, a na powierzchnię oka miejscowo aplikowano maść z 2% chloramfenikolem (Detreomycyna 2%, Chema-Elektromet, Polska), po czym oko zabezpieczano jałowym opatrunkiem. Zwierzęta umieszczano w czystych klatkach i codziennie kontrolowano pod kątem ewentualnych objawów zakażenia.

3.5. Model niedokrwienia/reperfuzji siatkówki

Jednostronne uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne siatkówki (I/R) indukowano w prawym oku każdego zwierzęcia (myszy C57BL/6). Po zastosowaniu znieczulenia ogólnego i miejscowego do worka spojówkowego podano 10% roztwór powidonu jodyny. Do komory przedniej oka, przez rąbek rogówki, wprowadzono szklaną kaniulę 30G połączoną ze strzykawką zawierającą 0,9% roztwór soli fizjologicznej. Roztwór wstrzykiwano do komory przedniej aż do wystąpienia obrzęku rogówki, co oznaczało wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego powyżej około 55 mmHg [53], utrzymywanego przez około 15 minut. Podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe przekraczające ciśnienie zamknięcia naczyń (ang. venous occlusion pressure, VOP) prowadzi do zaburzeń mikrokrążenia, które wywołują zmiany niedokrwienne w siatkówce. Po okresie niedokrwienia kaniulę usuwano, a na powierzchnię oka aplikowano maść z 2% chloramfenikolem.

3.6. Elektroretinografia

Po nocnej adaptacji do ciemności zwierzęta poddawano znieczuleniu ogólnemu. Do obu oczu aplikowano jedną kroplę 0,5% chlorowodorku proksymetakainy w celu znieczulenia miejscowego, a źrenice rozszerzano przy użyciu 1% tropikamidu (Polfa, Polska). Podczas każdego badania zwierzę było umieszczane na podgrzewanej platformie. Rejestrację ERG przeprowadzano z wykorzystaniem systemu Celeris (Diagnosys LLC, Wielka Brytania). Warunki pomiarowe obejmowały: 0,01 cds/m², 0,1 cds/m², 1,0 cds/m², błysk 3,0, błysk 10 oraz migotanie 10 Hz. Funkcję siatkówki oceniano za pomocą flash ERG z analizą fotopowej odpowiedzi ujemnej (ang. photopic negative response, PhNR) jako wskaźnika funkcji komórek RGC. Po zakończeniu procedury

zwierzęta odprowadzano do klatek i utrzymywano w standardowym cyklu dobowym dzień–noc (Ryc. 3E).

3.7. Aplikacja leków

Raloksyfen podawano w postaci podskórnego implantu o przedłużonym uwalnianiu (5 mg na implant uwalniane przez 60 dni), co odpowiadało dziennej dawce 83,3 µg. Zabieg pozorowany przeprowadzano w analogiczny sposób, implantując placebo o dopasowanej wielkości. KP7-6 podawano w stężeniu 2 µg/µL, natomiast 17β-estradiol w stężeniu 10 µM doszklistkowo. Iniekcje (3 µL/prawe oko) wykonywano przy użyciu strzykawki Hamiltona o objętości 10 µL, wyposażonej w igłę 34 G o długości 6 mm. Igłę wprowadzano do dolnego kwadrantu oka, około 0,5 mm za rąbkiem rogówki. Zachowano szczególną ostrożność, aby nie uszkodzić soczewki; roztwór podawano powoli, a igłę pozostawiano w miejscu przez około jedną minutę po zakończeniu iniekcji. Po zabiegu na powierzchnię oka aplikowano maść z 2% chloramfenikolem.

3.8. Analiza LDH

Uwalnianie LDH z eksplantów siatkówkowych do medium hodowlanego oceniano przy użyciu zestawu CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. Aktywność LDH mierzono za pomocą czytnika mikropłytek (BIO-RAD, USA) przy długości fali 490 nm, z długością odniesienia 655 nm.

3.9. Barwienie immunohistochemiczne

Po eutanazji zwierzęta poddano perfuzji przezsercowej z użyciem PBS, a następnie 4% PFA w celu utrwalenia tkanek. Gałki oczne pobierano i izolowano z nich siatkówki w postaci preparatów całościowych. Siatkówki poddawano barwieniom immunohistochemicznym z użyciem następujących przeciwciał pierwszorzędowych: przeciwko β3-tubulinie (Tuj1, 1:300), przeciwko RBPMS (ang. RNA-binding protein with multiple splicing) (1:300), przeciwko NeuN (ang. neuronal nuclear antigen) (1:100), przeciwko GFAP (ang. glial fibrillary acidic protein) (1:300), przeciwko receptorowi ERα (1:100), przeciwko receptorowi ERβ (1:100), przeciwko Iba-1 (ang. ionized calcium-binding adapter molecule 1) (1:500) oraz przeciwko białku FADD (1:100). Skrawki początkowo blokowano przez 30 minut w roztworze zawierającym 10%

normalną surowicę kozią, 0,1% Triton X-100 w buforze TBS. Następnie nanoszono przeciwciała pierwszorzędowe i inkubowano skrawki przez noc w temperaturze 4 °C. Kolejnego dnia skrawki inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z odpowiadającymi gatunkowo drugorzędowymi przeciwciałami sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi Alexa Fluor (1:500; Life Technologies, USA). Jądra komórkowe kontrastowano barwnikiem DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol; Sigma, USA). Obrazowanie fluorescencyjne wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Niemcy).

3.10. Stereologia

Komórki wyznakowane przeciwciałem dla β3-tubuliny, NeuN oraz RBPMS zliczano ręcznie w warstwie komórek zwojowych górnych i dolnych kwadrantów siatkówki z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Dla każdej siatkówki pozyskiwano dziesięć obrazów przy powiększeniu 200×. Zliczenia komórek wykonywano na każdym obrazie, a wyniki wyrażano jako średnia ± odchylenie standardowe (SD).

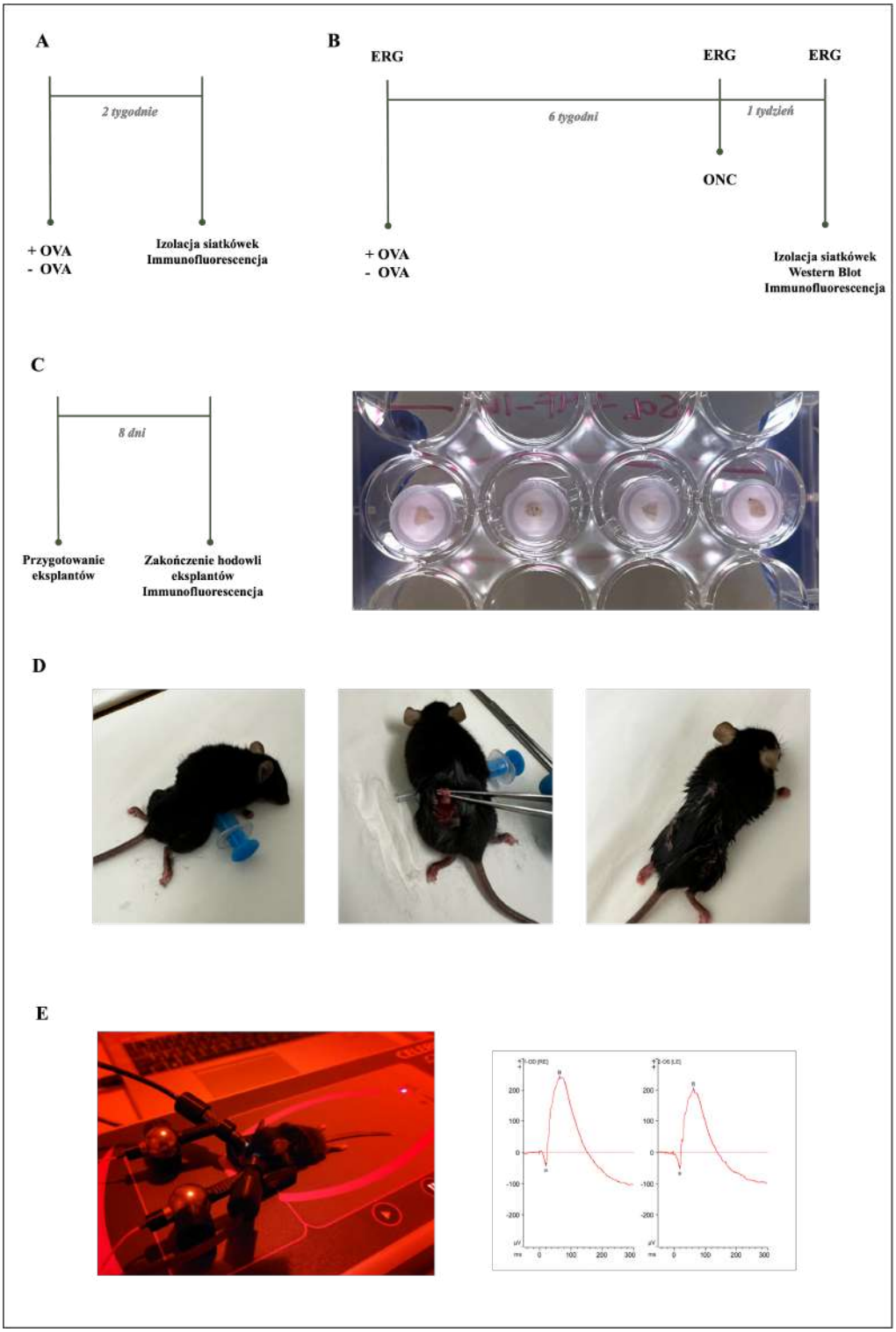
3.11. Western Blot

W celu uzyskania frakcji jądrowych i cytoplazmatycznych komórek siatkówki przeprowadzono frakcjonowanie z wykorzystaniem zestawu Nuclear Extract Kit (Active Motif, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. Stężenie białka oznaczano przy użyciu odczynnika Bradforda (BioRad, USA), wykorzystując zestaw wzorców Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set (BioRad, USA) do sporządzenia krzywej standardowej. Łącznie 15 µg koncentratu białka rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) przy napięciu 120 V, a następnie przenoszono na membrany z polifluorku winylidenu (PVDF) (Pall Life Sciences, USA) przy natężeniu 250 mA przez 90 minut. Po transferze membrany PVDF blokowano przez 1,5 godziny w buforze TBS zawierającym 3% surowiczą albuminę wołową, a następnie inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko Erβ (1:500). Jako przeciwciało drugorzędowe zastosowano kozie przeciwciało IgG StarBright Blue 700 (rozcieńczenie 1:3000, BioRad, USA) inkubując membrany przez 1 godzinę w ciemności w temperaturze pokojowej. Celem kontroli referencyjnej użyto przeciwciał przeciwko α-tubulinie sprzężonych z

rodaminą (Anti-tubulin hFAB Rhodamine, rozcieńczenie 1:3000, BioRad, USA). Sygnały na membranach odczytywano metodą multipleksowej fluorescencji z wykorzystaniem systemu ChemiDoc MP (BioRad, USA). Ilościową analizę prążków białkowych przeprowadzono za pomocą oprogramowania Image Lab (BioRad, USA).

3.12. Statystyka

Analizę statystyczną oraz wizualizację danych przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., USA). Wszystkie dane przedstawiono jako średnia ± SD. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$. Porównania względem kontroli przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), po której zastosowano test post hoc Bonferroniego, natomiast porównania między grupami wykonano za pomocą testu t Welcha.



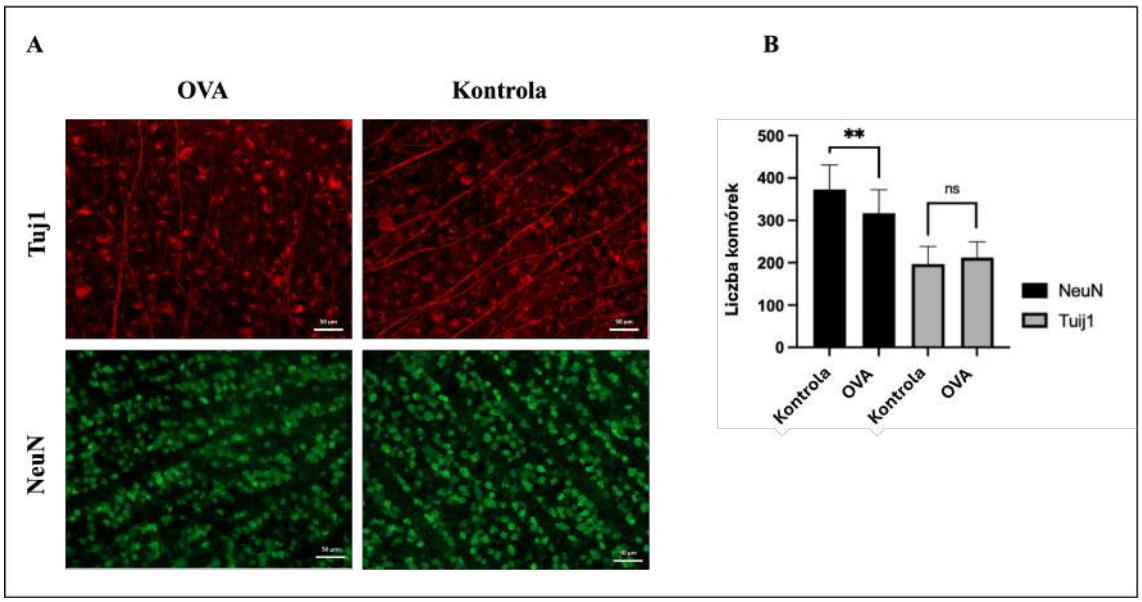
Rycina 3. Przebieg i metodologia doświadczenia. (A) Schemat przedstawiający I część doświadczenia. (B) Schemat przedstawiający II część doświadczenia. (C) Schemat przebiegu badania ex vivo z wykorzystaniem hodowli eksplantów siatkówkowych oraz zdjęcie poglądowe eksplantów siatkówkowych. Materiały własne. (D) Poszczególne etapy zabiegu owariektomii. Materiały własne. (E) Mysz podczas badania ERG w warunkach skotopowych oraz przykładowy zapis odpowiedzi.

4. Wyniki

4.1. Wyniki pierwszej części badania

4.1.1. Wpływ dwutygodniowego okresu menopauzy na neurony siatkówki

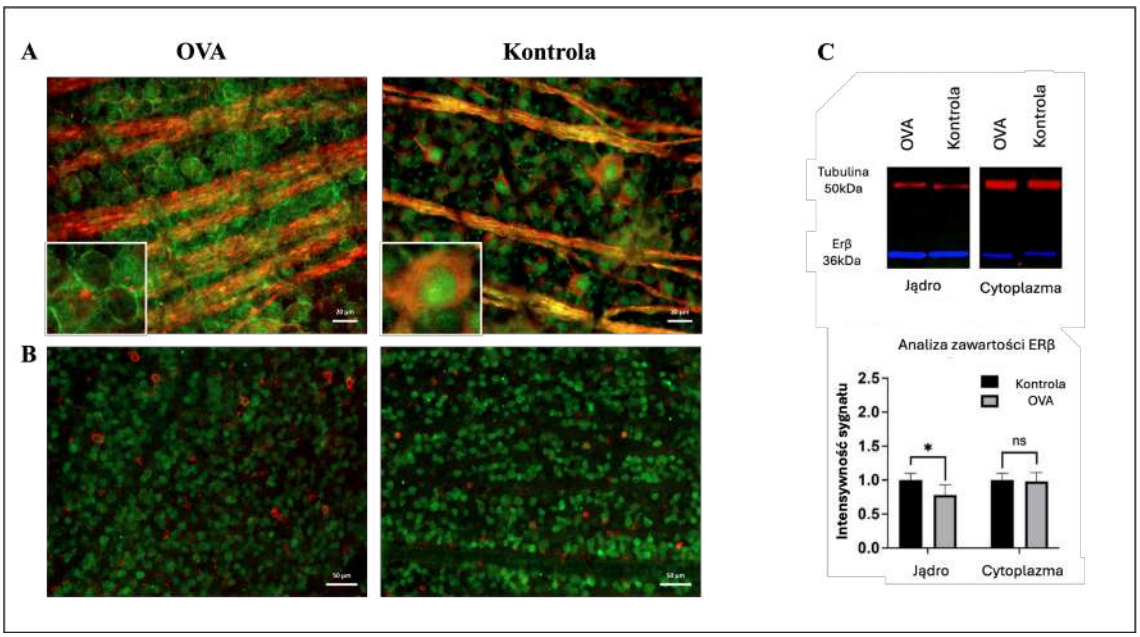
Dwa tygodnie po wywołaniu owariektomii, liczba komórek w warstwie zwojowej siatkówki wykazała istotne zmiany. Liczba komórek Tuj1-dodatnich (komórek RGC) nie wykazywała istotnych różnic (197,1 ± 41,5 vs. 212 ± 37,9 odpowiednio dla grupy kontrolnej i OVA; $p > 0,05$, test t Welcha). Liczba komórek NeuN-pozytywnych w warstwie komórek zwojowych wynosiła 372,9 ± 58,3 w grupie kontrolnej oraz 316,9 ± 55,5 w grupie OVA ($p < 0,01$, test t Welcha). Komórki NeuN-pozytywne w warstwie zwojowej siatkówki obejmują zarówno RGC, jak i zdelokalizowane interneurony (najprawdopodobniej komórki amakrynowe). Brak istotnych różnic w liczbie komórek zwojowych siatkówki ocenianych markerem Tuj1 sugerowało, że obserwowane zmiany w ekspresji NeuN wynikały w pierwszej kolejności z utraty interneuronów po zabiegu owariektomii (Rycina 4).



Rycina 4. Liczba komórek RGC u zwierząt po OVA oraz w grupie kontrolnej. (A) Barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciał przeciwko Tuj1 oraz NeuN. Skala: 50 µm. (B) Analiza liczby komórek zwojowych siatkówki po 2 tygodniach od wykonania owariektomii. ns - brak istotności statystycznej, **: $p < 0,01$.

W siatkówkach pobranych od zwierząt poddanych owariektomii zauważono zmiany w ekspresji receptorów estrogenowych. Receptory ERα ulegały agregacji w jądrach komórek RGC, natomiast receptory ERβ w siatkówkach zwierząt poddanych

owariektomii ulegały translokacji z jąder na powierzchnię komórek w okolicę błony komórkowej (Rycina 5A). Analiza metodą Western Blot wykazała zwiększoną ekspresję jądrowej frakcji ERβ ($p < 0,03$, test t Welcha) przy niezmienionej zawartości frakcji cytoplazmatycznej ($p > 0,05$, test t Welcha) (Rycina 5C i 5D), co w połączeniu z uwidocznionymi w barwieniu immunohistochemicznym zmianami może sugerować, że obserwowany w komórkach zwojowych siatkówki sygnał translokacji pochodzi z błon komórkowych, a nie z cytoplazmy. Ponieważ niedobór estrogenów jest czynnikiem aktywującym procesy zapalne, w naszym badaniu zaobserwowano naciek aktywowanych komórek mikrogleju w obrębie siatkówki u zwierząt poddanych owariektomii (Rycina 5B).

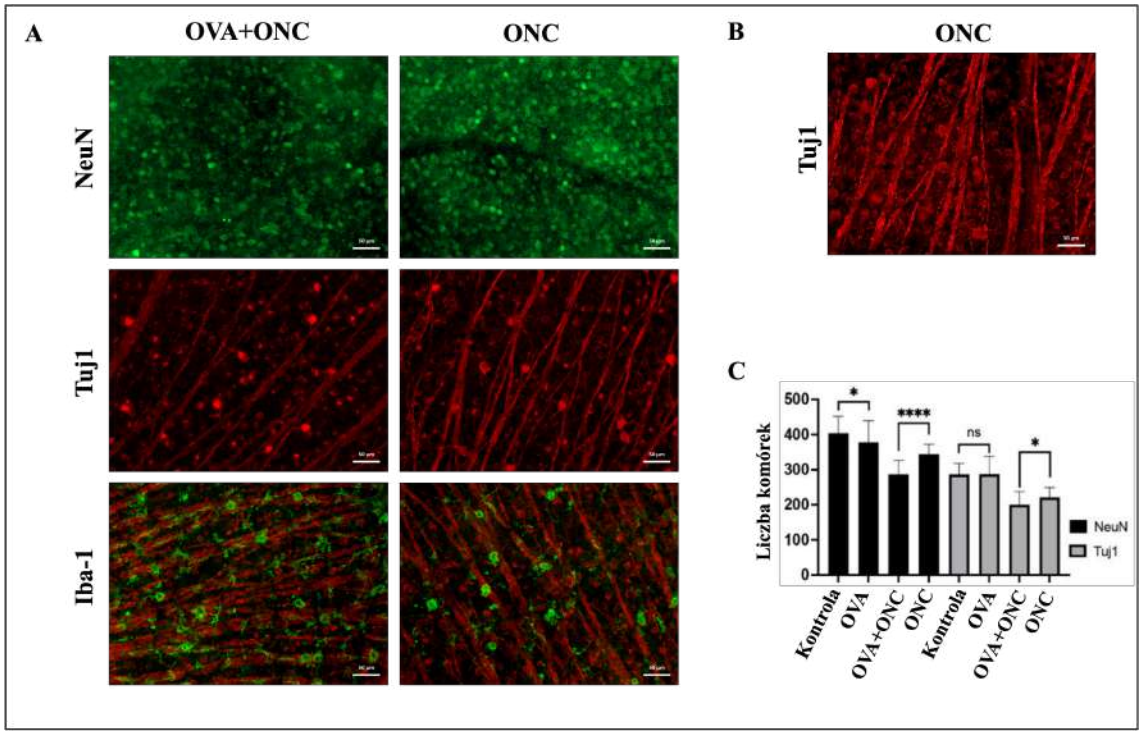


Rycina 5. Rozmieszczenie receptorów estrogenowych ERβ w komórkach zwojowych siatkówki u zwierząt z grupy OVA oraz grupy kontrolnej. Skala: 20 µm. ERβ (zielony), Tuji1 (czerwony) (A). (B) Naciek komórek mikrogleju w siatkówkach zwierząt z grupy OVA oraz z grupy kontrolnej. Skala: 50 µm. NeuN (zielony), Iba-1 (czerwony). (C) Analiza zawartości ERβ we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej u zwierząt z grupy kontrolnej oraz poddanych owariektomii. Ns - brak istotności statystycznej, *: $p < 0,03$.

4.1.2. Wpływ sześciotygodniowego okresu menopauzy na neurony siatkówki

Wydłużenie okresu niedoboru estrogenów wywołało podobny, aczkolwiek bardziej nasilony wpływ na neurony siatkówki jak w obserwacji dwutygodniowej. Liczba komórek NeuN-pozytywnych w warstwie komórek zwojowych wynosiła 403,9 ± 48,5 w grupie kontrolnej oraz 378,2 ± 61 w grupie OVA ($p < 0,03$, test t Welcha), natomiast

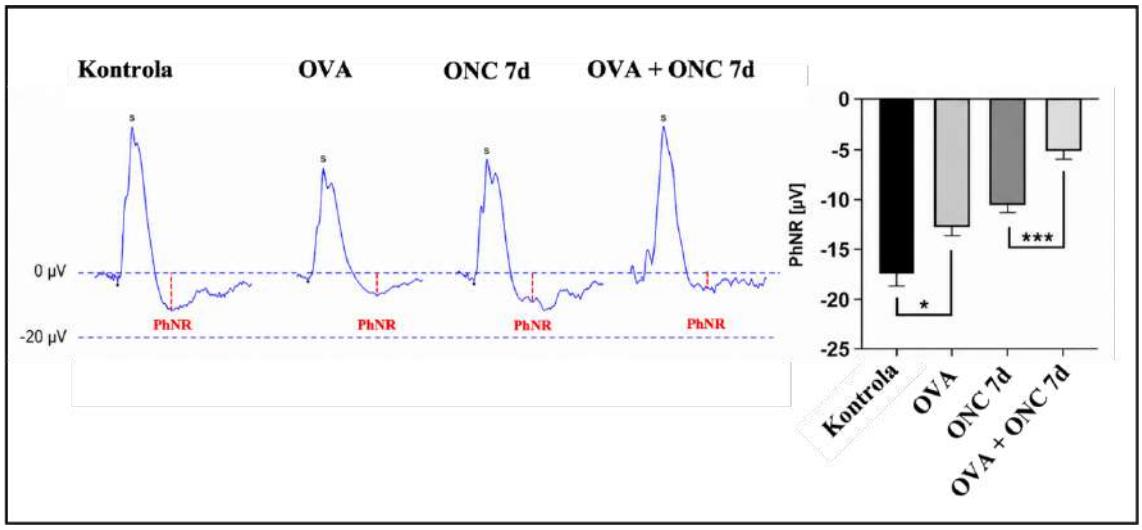
liczba komórek Tuj1-pozytywnych wynosiła odpowiednio 286,2 ± 31,7 i 286,9 ± 50,7 dla zwierząt niepoddanych owariektomii i OVA ($p > 0,05$, test t Welcha) (Rycina 6A i 6C). Chociaż menopauza chirurgiczna nie wpływała na liczbę komórek zwojowych siatkówki przed wystąpieniem jakiegokolwiek urazu, znaczenie neuroprotekcyjnego działania estrogenów było wyraźnie widoczne po wykonaniu procedury ONC. W tych warunkach zaobserwowano niekorzystne nasilenie procesu degeneracji komórek zwojowych siatkówki oraz interneuronów, szczególnie w grupie OVA + ONC. Po ostrym urazie liczba komórek NeuN-dodatnich wynosiła 344,7 ± 27,7 w grupie ONC oraz 286,2 ± 40 w grupie OVA + ONC ($p < 0,0001$, test t Welcha). Ponadto liczba komórek Tuj1-dodatnich wynosiła 221,4 ± 27,7 w grupie ONC oraz 200,3 ± 37,5 w grupie OVA + ONC ($p < 0,03$, test t Welcha) (Rycina 6A i 6C). Niedobór estrogenów w połączeniu z aksonalnym urazem neuropatycznym (ONC) indukował widoczną aksonopatię komórek zwojowych, obserwowaną jako „chropowata" struktura aksonów w barwieniu Tuj1 (Rycina 6B).



Rycina 6. Wpływ wydłużonego okresu niedoboru estrogenów na komórki w warstwie zwojowej siatkówki po uszkodzeniu nerwu wzrokowego. (A) Barwienie immunofluorescencyjne siatkówki pobranej od zwierząt z grup OVA+ONC oraz ONC z użyciem przeciwciał przeciwko NeuN (zielony), Tuj1 (czerwony) oraz Iba-1 (zielony). Skala: 50 µm. (B) Aksonopatia komórek zwojowych siatkówki po wykonaniu zabiegu ONC, widoczna jako kropkowana struktura aksonów w barwieniu Tuj1. Skala: 50 µm. (C) Analiza liczby komórek zwojowych siatkówki po wydłużonym okresie niedoboru estrogenów.

4.1.3. Analiza funkcji siatkówki w badaniu elektroretinografii

W grupie z sześciotygodniowym okresem menopauzy wartości odpowiedzi PhNR, odzwierciedlające aktywność komórek RGC, wynosiły odpowiednio -16,8 ± 2,1 oraz -13,3 ± 1,1 µV dla grupy zdrowej i OVA ($p < 0,03$, test t Welcha) oraz -10,4 ± 0,8 i -5,5 ± 0,5 µV odpowiednio dla grup ONC i OVA + ONC ($p < 0,001$, test t Welcha) (Rycina 7).

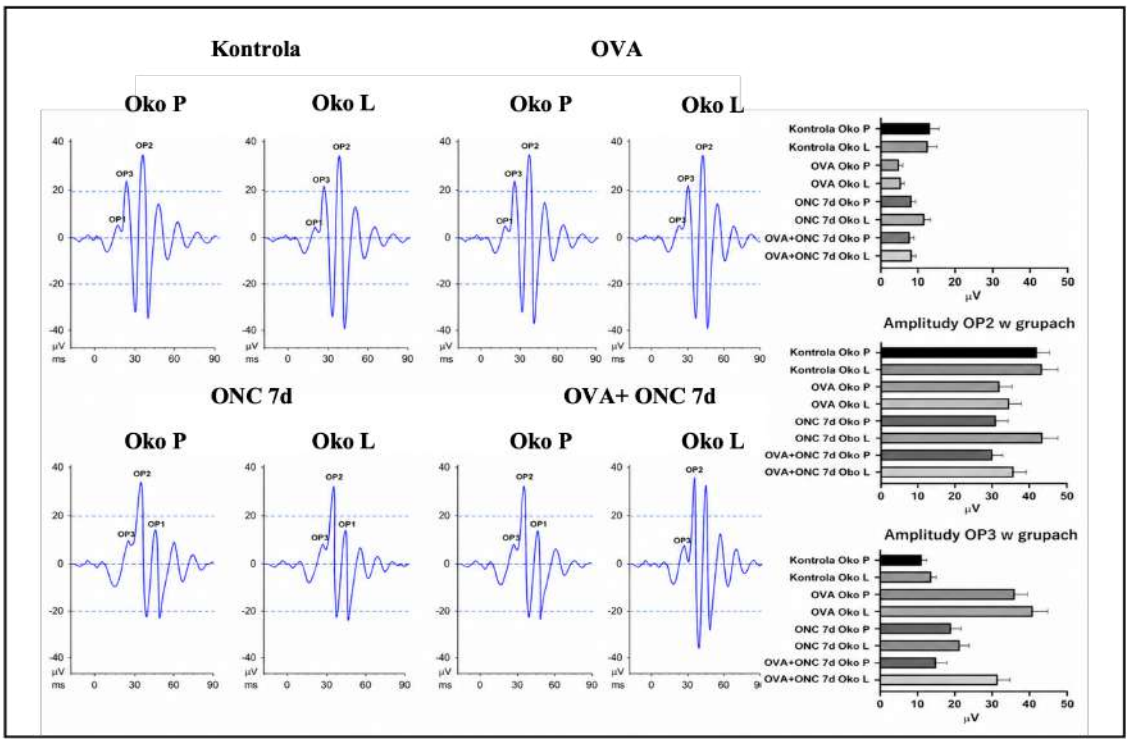


Rycina 7. Analiza amplitudy fali PhNR w badanych grupach. *: $p < 0.03$; ***: $p < 0,001$.

Analiza potencjałów oscylacyjnych (ang. oscillatory potentials, OPs) pozwoliła na wyciągnięcie wniosków dotyczących stanu czynnościowego interneuronów siatkówki (głównie komórek amakrynowych – OP1-2) oraz ogólnego stanu naczyniowego siatkówki (glej siatkówki, naczynia siatkówkowe i przepływ krwi – OP3). Czasy kulminacji potencjałów oscylacyjnych, które zostały przedstawione w tabeli poniżej (Tabela I), nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy grupami (Rycina 8).

Tabela I. Potencjały oscylacyjne (OP1, OP2, OP3) zarejestrowane u zwierząt.

GRUPA	OP1 PRAWE OKO (µV)	OP1 LEWE OKO (µV)	OP2 PRAWE OKO (µV)	OP2 LEWE OKO (µV)	OP3 PRAWE OKO (µV)	OP3 LEWE OKO (µV)
ZDROWA	11,42 ± 2,0	10,61 ± 1,93	40,68 ± 3,10	42,02 ± 4,04	11,22 ± 1,10	13,46 ± 1,13
OVA	4,5 ± 0,49	4,8 ± 0,50	31,21 ± 3,15	33,66 ± 3,18	36,31 ± 2,93	40,6 ± 4,08
ONC	6,9 ± 0,60	10,6 ± 1,10	30,6 ± 2,91	42,6 ± 4,12	19,8 ± 2,10	21,22 ± 2,21
OVA + ONC	6,7 ± 0,60	7,3 ± 0,58	29,8 ± 2,10	35,1 ± 3,18	16,3 ± 1,97	31,4 ± 3,27



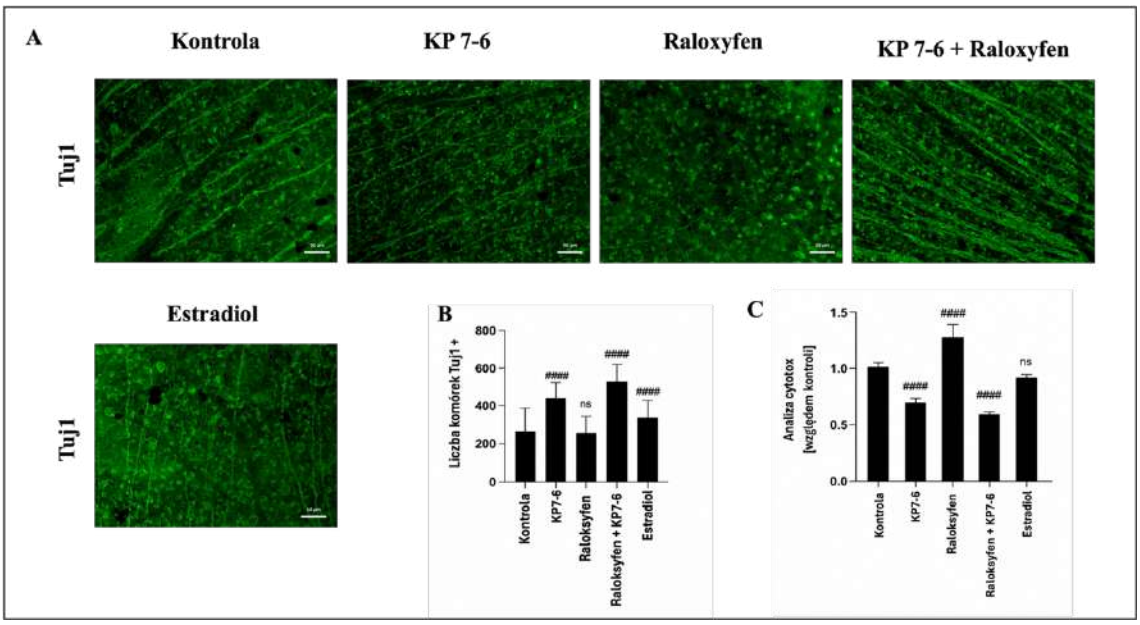
Rycina 8. Charakterystyka potencjałów oscylacyjnych w zapisie ERG z pierwszej części badania.

4.2. Wyniki drugiej części badania

4.2.1. Wyniki analiz ex vivo

Barwienie immunofluorescencyjne eksplantów siatkówkowych z użyciem przeciwciała anty-Tuj1, będącego markerem komórek zwojowych siatkówki, wykazało, że traktowanie KP7-6 lub estradiolem zwiększało przeżywalność komórek odpowiednio o 67% i 30% w porównaniu z tkanką nieleczoną. Leczenie raloksyfenem w monoterapii również sprzyjało przeżyciu neuronów, powodując zmniejszenie śmiertelności komórek o 35% względem kontroli. Ponadto, w eksplantach poddanych terapii skojarzonej raloksyfenem i KP7-6 liczba komórek Tuj1-pozytywnych była dwukrotnie większa niż w grupie kontrolnej, świadcząc o dodatkowym nasileniu efektu pro-przeżyciowego po zastosowaniu terapii skojarzonej (Rycina 9A i 9B). Celem potwierdzenia wyników histologicznych, przeprowadzono dodatkowo test cytotoksyczności. Grupy leczone KP7-6, a także te poddane terapii skojarzonej KP7-6 i raloksyfenem, wykazywały niższą aktywność LDH w porównaniu zarówno z grupą kontrolną, jak i grupą otrzymującą monoterapię raloksyfenem, w której obserwowany wzrost LDH można dodatkowo tłumaczyć wysoką objętością DMSO użytego jako rozpuszczalnik (Rycina 9C). Wyniki te sugerują, że współdziałanie szlaków apoptotycznych oraz sygnalizacji receptorów

estrogenowych odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu sygnalizacji sprzyjającej przeżyciu neuronów siatkówki, a obniżona odporność neuronów może zostać przywrócona poprzez jednoczesną modulację obu tych szlaków.

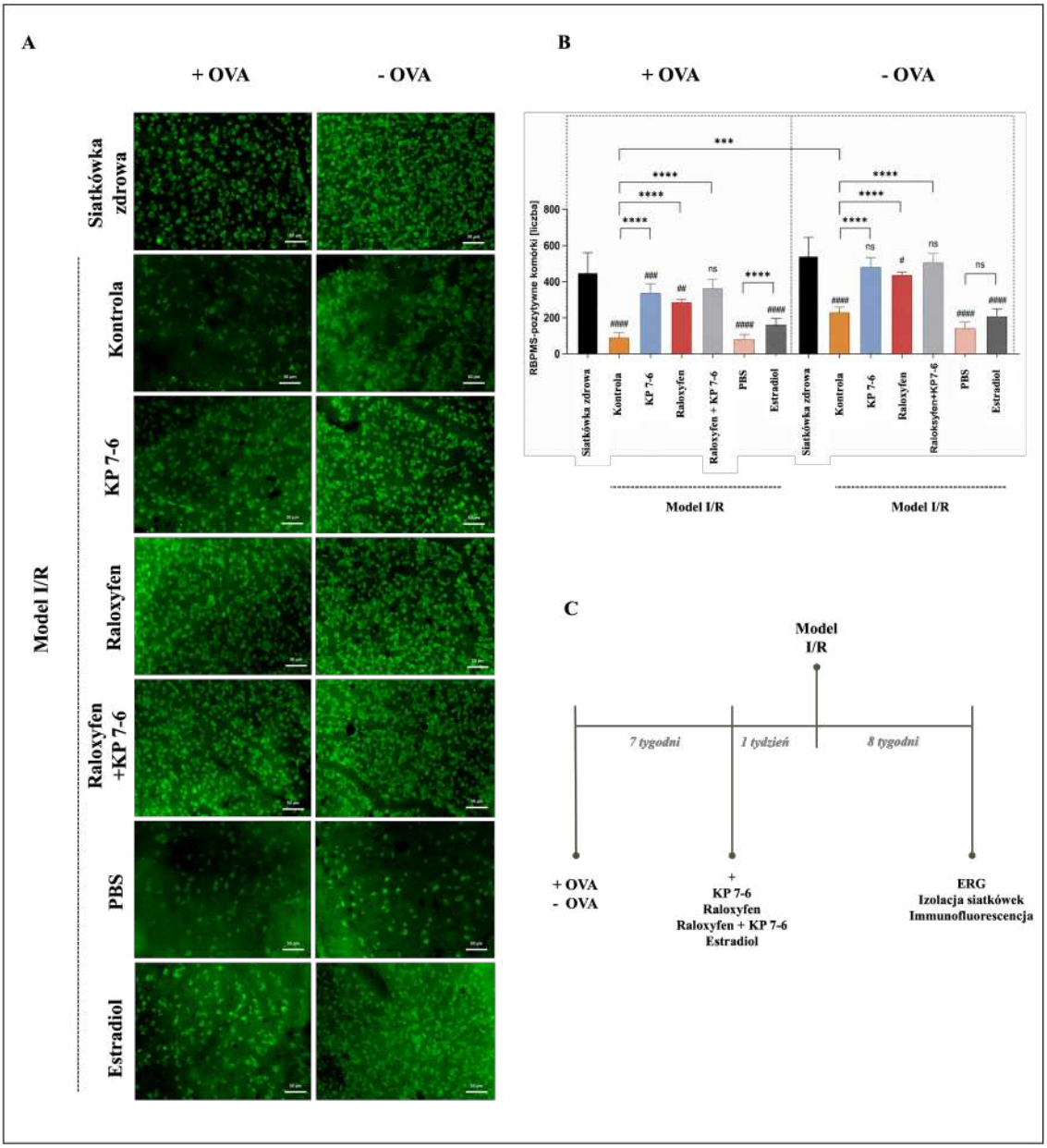


Rycina 9. Barwienie immunofluorescencyjne eksplantów siatkówkowych z użyciem przeciwciała przeciwko Tuj1. Skala: 50 µm. (B) Ilościowa analiza przeżywalności komórek Tuj1-pozytywnych. (C) Ocena cytotoksyczności na podstawie uwalniania LDH. Wartości znormalizowano względem kontroli (kontrola = 1). ns – brak istotności statystycznej; ####: $p < 0{,}0001$ względem kontroli.

4.2.2. Wyniki analizy in vivo

Aby zbadać neuroprotekcyjny potencjał zastosowanych modulatorów sygnalizacji apoptotycznej i estrogenowej, wykorzystaliśmy dobrze ugruntowany model in vivo uszkodzenia siatkówki typu I/R u myszy [53]. Procedura ta wywołuje znaczny wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego (ang. intraocular pressure, IOP), prowadząc do zaburzeń przepływu krwi w mikrokrążeniu siatkówkowym, a w konsekwencji do niedokrwiennego uszkodzenia neuronów i procesu neurodegeneracji. Dodatkowo, aby zbadać, czy niedobór estrogenów nasila procesy degeneracji neuronów siatkówki po jej niedokrwieniu, zastosowano obustronną owariektomię na 8 tygodni przed procedurą I/R. Począwszy od tygodnia przed indukcją niedokrwienia, myszy leczono podskórnym implantem raloksyfenu o przedłużonym uwalnianiu oraz podawano im doszklistkowe iniekcje 17β-estradiolu, KP7-6 lub PBS (Rycina 10C). Po 8 tygodniach zwierzęta poddano eutanazji i przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne całych preparatów siatkówek wyizolowanych od zwierząt traktowanych badanymi związkami

oraz dokonano ilościowej oceny RGC, wykorzystując białko RBPMS jako specyficzny marker tej populacji komórek (Rycina 10A). Analiza ilościowa wykazała istotnie zwiększoną utratę RGC u zwierząt z grupy OVA w porównaniu z odpowiadającymi grupami nie poddanymi zabiegowi, bez względu na zastosowane leczenie. W grupach kontrolnych I/R bez zastosowanego leczenia liczba RGC była zmniejszona o około 60% w grupie +OVA względem grupy -OVA, co wskazuje, że menopauza może zwiększać podatność neuronów siatkówki na neurodegeneracje związaną z niedokrwieniem. Co interesujące, doszklistkowe leczenie 17ß-estradiolem u myszy z grupy +OVA w niewielkim stopniu łagodziło uszkodzenia wywołane niedokrwieniem w porównaniu z kontrolą leczoną doszklistkową iniekcją PBS, co dodatkowo potwierdza ochronne działanie estradiolu na tkankę siatkówki. Ponadto wykazano, że raloksyfen, KP7-6 oraz ich terapia skojarzona chronią neurony siatkówki po uszkodzeniu niedokrwiennym. U zwierząt po OVA terapia skojarzona raloksyfenem i KP7-6 wykazywała najwyższą skuteczność, zapewniając jedynie 18% spadek liczby RGC w porównaniu ze zdrową tkanką. Leczenie samym KP7-6 oraz samym raloksyfenem skutkowało odpowiednio 25% i 36% redukcją liczby RGC u myszy poddanych owariektomii. Podobny efekt pro-przeżyciowy w odniesieniu do RGC zaobserwowano również u myszy niepoddanych owariekotmii. Podobnie jak w grupie +OVA, terapia skojarzona raloksyfen + KP7-6, a także sam KP7-6, były najbardziej efektywne, utrzymując liczbę RGC na poziomie porównywalnym do zdrowej siatkówki (Rycina 10B). Wyniki te wskazują na nowe możliwości terapeutyczne nie tylko w warunkach niedoboru estrogenów, ale także przy ich fizjologicznym poziomie.

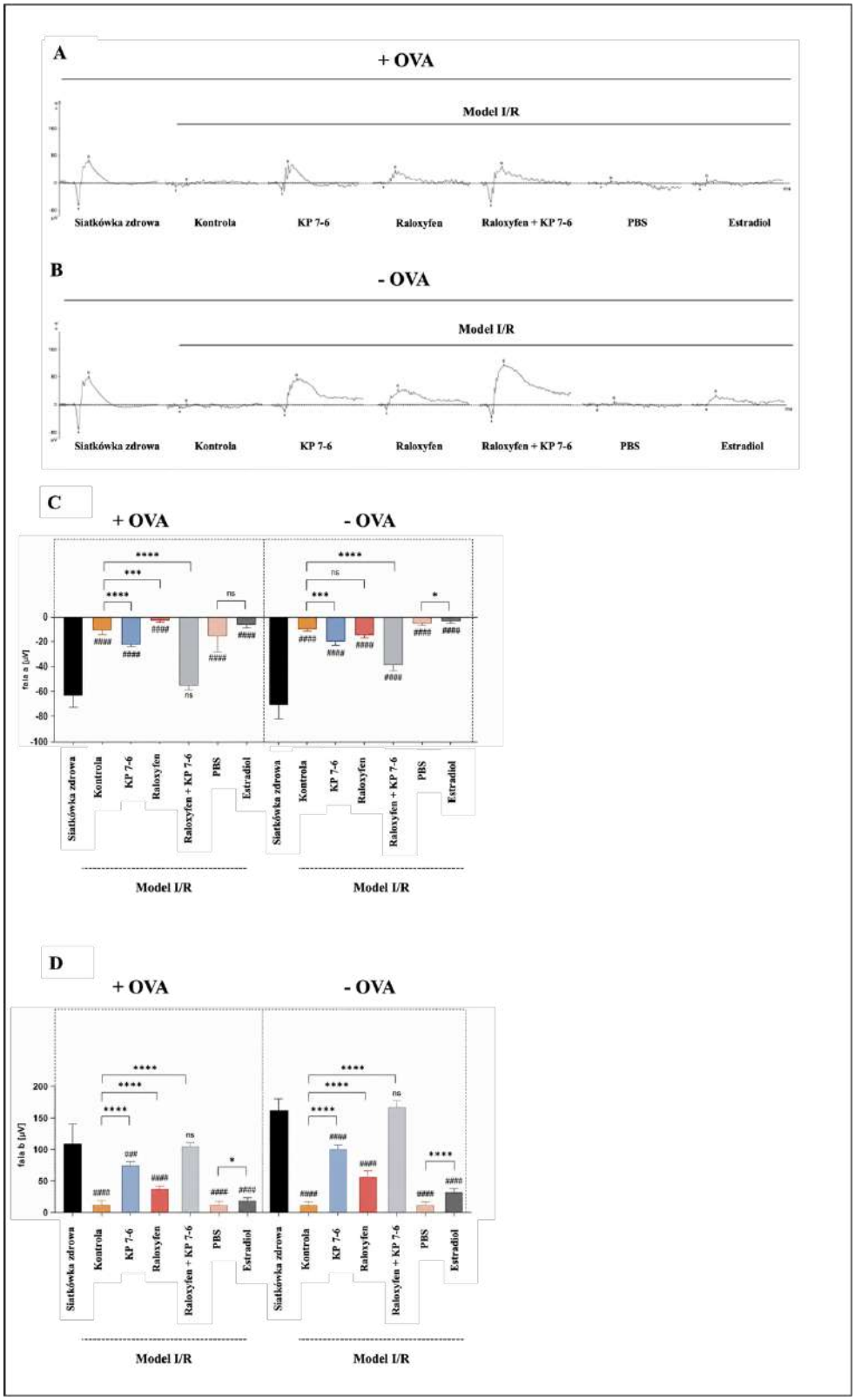


Rycina 10. Wpływ estrogenu oraz modulacji apoptozy na neurony siatkówki po uszkodzeniu niedokrwiennym. (A) Barwienie immunofluorescencyjne całych siatkówek z użyciem przeciwciała przeciwko RBPMS. Skala: 50 µm. (B) Ilościowa analiza przeżywalności komórek RBPMS-pozytywnych. (C) Graficzny schemat doświadczenia. ns – brak istotności statystycznej; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ####: $p < 0,0001$ (# względem zdrowej kontroli).

4.2.3. Wyniki elektroretinografii z drugiej części badania

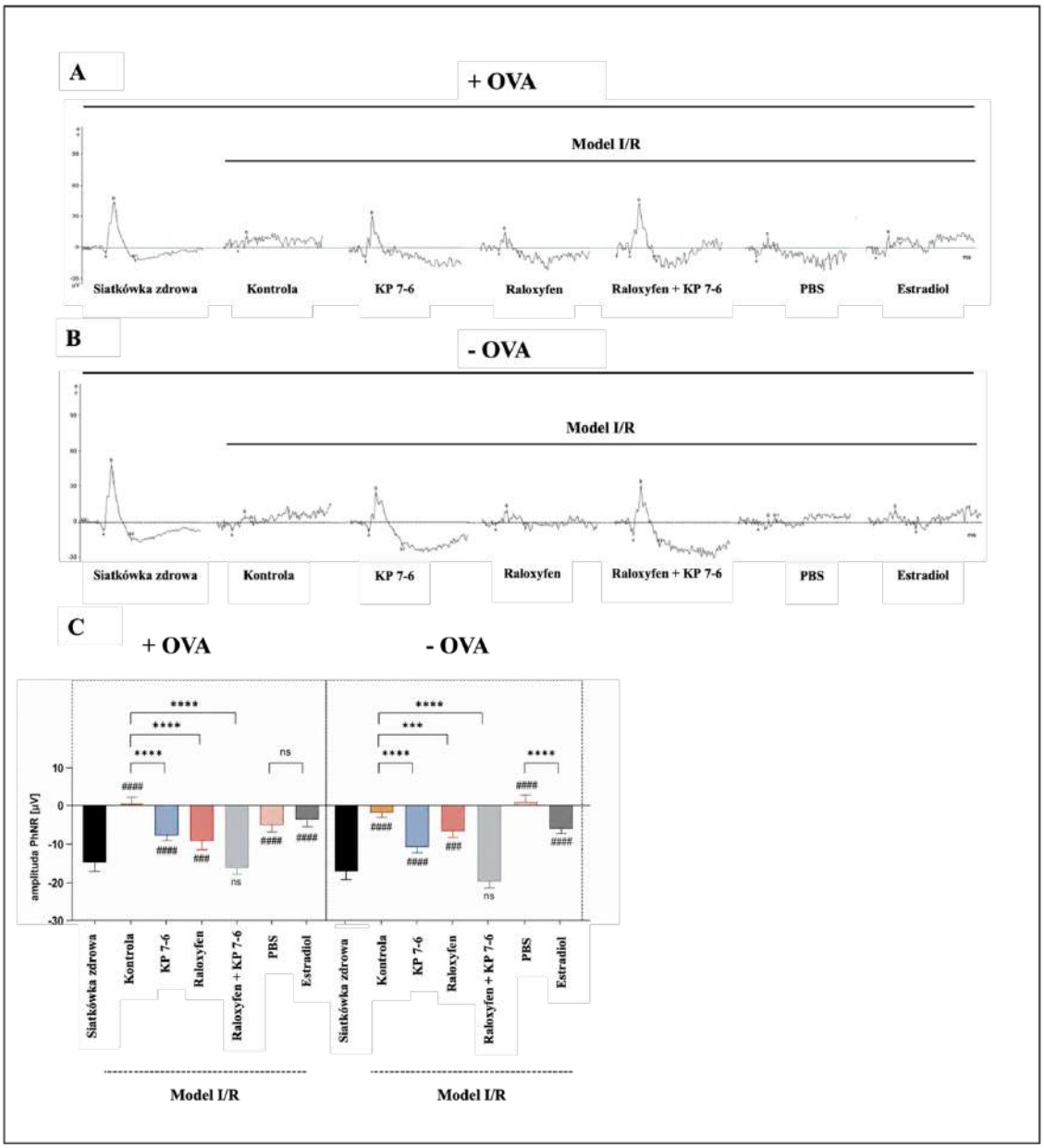
Aby ustalić, czy zmiany morfologiczne obserwowane po leczeniu KP7-6 i raloksyfenem znajdują odzwierciedlenie w funkcji siatkówki, wykonano ERG 8 tygodni po indukcji niedokrwienia. Początkowo uzyskano zapisy skotopowe ERG w celu oceny amplitudy fali a, odzwierciedlającej aktywność fotoreceptorów oraz fali b, generowanej

głównie przez komórki Müllera i komórki dwubiegunowe typu ON [54] (Rycina 11A i 11B). Analiza amplitud fal a i b wykazała istotne różnice u zwierząt leczonych badanymi związkami, zarówno w grupie +OVA, jak i -OVA. Estradiol wykazywał najniższą skuteczność, zachowując jedynie niewielki stopień funkcji siatkówki, głównie u myszy po owariektomii. Natomiast raloksyfen powodował spadek amplitudy fali a w porównaniu z grupą kontrolną, jednocześnie znacząco zwiększając amplitudę fali b – około 8-krotnie w grupie OVA oraz 11-krotnie w grupie bez OVA względem kontroli. KP7-6 wykazywał skuteczność pośrednią; jednak terapia skojarzona raloksyfen + KP7-6 przyniosła najsilniejszy efekt ochronny. U zwierząt OVA kombinacja ta zwiększała amplitudę fali a około 11-krotnie, a amplitudę fali b około 18-krotnie w porównaniu z kontrolą niedokrwienną (Rycina 11C i 11D). Co istotne, w tych warunkach amplitudy zostały przywrócone do poziomów nieodróżnialnych od obserwowanych u zdrowych zwierząt, co wskazuje, że leczenie raloksyfenem i KP7-6 prowadziło do odtworzenia „młodzieńczego" fenotypu funkcjonowania siatkówki.



Rycina 11. Analiza funkcji siatkówki na podstawie zapisów ERG. (A) Reprezentatywne zapisy odpowiedzi mieszanej ERG u zwierząt po zabiegu owariektomii (+OVA). (B) Reprezentatywne zapisy odpowiedzi mieszanej ERG u zwierząt bez owariektomii (−OVA). (C) Analiza statystyczna amplitudy fali a oraz fali b (D). ns – brak istotności statystycznej; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; ###: $p < 0,001$; ####: $p < 0,0001$ (# w porównaniu z oczami bez niedokrwienia).

Przeprowadzono analizę amplitud PhNR, odzwierciedlających aktywność komórek zwojowych siatkówki. Zgodnie z tymi wynikami, leczenie badanymi związkami wywoływało istotne zmiany zarówno u myszy z grup +OVA, jak i z grup -OVA. Niedokrwienie obniżyło amplitudy PhNR do poziomu bazowego w grupach kontrolnych, co potwierdza skuteczne przeprowadzenie modelu niedokrwienia. Leczenie KP7-6 lub raloksyfenem częściowo łagodziło szkodliwe skutki niedokrwienia. Najbardziej wyraźny efekt zaobserwowano przy terapii skojarzonej raloksyfen + KP7-6, która zabezpieczała zmniejszeniu amplitudy PhNR utrzymując ją na poziomie porównywalnym ze zdrową kontrolą, niezależnie od wykonania lub niewykonania owariektomii. Natomiast leczenie 17ß-estradiolem wykazywało słabszy efekt, zachowując funkcję RGC jedynie u zwierząt niepoddanych OVA. Wyniki ERG jednoznacznie potwierdziły obserwacje morfometryczne, pokazując, że modulacja zarówno sygnalizacji apoptotycznej, jak i estrogenowej zapewnia ochronę neuronów siatkówki po uszkodzeniu niedokrwiennym (Rycina 12).



Rycina 12. Analiza funkcji komórek zwojowych siatkówki na podstawie fotopowej odpowiedzi negatywnej (PhNR) w zapisie ERG. (A) Reprezentatywne zapisy fotopowego ERG u zwierząt po zabiegu owariektomii (+OVA). (B) Reprezentatywne zapisy fotopowego ERG u zwierząt bez owariektomii (−OVA). (C) Analiza statystyczna amplitudy fotopowej odpowiedzi negatywnej (PhNR–N1). ns – brak istotności statystycznej; ***: $p < 0{,}001$; ****: $p < 0{,}0001$; ###: $p < 0{,}001$; ####: $p < 0{,}0001$ (# w porównaniu z oczami bez niedokrwienia).

5. Dyskusja

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają istotną rolę sygnalizacji estrogenowej w utrzymaniu homeostazy siatkówki oraz w odpowiedzi neuroprotekcyjnej rozwijającej się po uszkodzeniu nerwu wzrokowego i niedokrwieniu. Zarówno dane funkcjonalne uzyskane w badaniach elektrofizjologicznych, jak i obserwowane zmiany molekularne wskazują, że niedobór estrogenów po owariektomii zwiększa podatność komórek zwojowych siatkówki na uszkodzenie neurodegeneracyjne. Wyniki te pozostają zgodne z licznymi doniesieniami eksperymentalnymi i klinicznymi wskazującymi, że estrogeny pełnią funkcję endogennych czynników neuroprotekcyjnych w ośrodkowym układzie nerwowym, w tym również w siatkówce [30,31].

Współczesne spojrzenie na rolę estrogenów znacząco wykracza poza ich klasyczne funkcje reprodukcyjne. Obecnie wiadomo, że 17β-estradiol oddziałuje na liczne procesy odpowiedzialne za przeżycie neuronów, plastyczność synaptyczną, odpowiedź zapalną oraz metabolizm mitochondrialny. Szczególne znaczenie mają receptory estrogenowe ERα oraz ERβ, które aktywują zarówno mechanizmy genomowe, jak i szybkie szlaki pozagenomowe związane między innymi z PI3K/AKT, MAPK/ERK czy CREB [5,42]. W niniejszej pracy obserwowano, że owariektomia prowadziła do pogorszenia parametrów elektrofizjologicznych siatkówki nawet przed wystąpieniem wyraźnej utraty komórek zwojowych, co może sugerować, że estrogeny są nie tylko czynnikami przeciwapoptotycznymi, ale również regulatorami prawidłowego funkcjonowania neuronalnego i synaptycznego siatkówki.

Istotnym elementem dyskusji jest fakt, że siatkówka nie stanowi wyłącznie biernego celu działania hormonów płciowych pochodzących z krążenia obwodowego. Coraz więcej danych wskazuje, że jest ona aktywną tkanką neurosteroidogenną zdolną do lokalnej syntezy estradiolu. Cascio i wsp. wykazali obecność enzymów steroidogenezy oraz aromatazy w różnych warstwach siatkówki, co sugeruje możliwość lokalnej regulacji stężenia estrogenów niezależnie od gonad [32]. Podobne obserwacje przedstawili Arevalo i wsp., podkreślając, że mózg oraz siatkówka posiadają zdolność kompensacyjnego zwiększania lokalnej steroidogenezy po utracie funkcji gonad [42]. Mechanizm ten może mieć istotne znaczenie adaptacyjne po owariektomii, jednak uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że kompensacja ta jest niewystarczająca do utrzymania pełnej neuroprotekcji siatkówki w warunkach dodatkowego stresu niedokrwiennego lub uszkodzenia aksonalnego.

Uzyskane wyniki pozostają zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Nakazawy i wsp., którzy wykazali, że owariektomia nasila utratę komórek zwojowych siatkówki po przecięciu nerwu wzrokowego, podczas gdy podanie egzogennego 17β-estradiolu wywierało wyraźny efekt neuroprotekcyjny [55]. Autorzy wykazali ponadto aktywację szlaku ERK/c-Fos po podaniu estradiolu, a zastosowanie inhibitora ERK znosiło działanie ochronne hormonu. Wyniki te wskazują, że jednym z kluczowych mechanizmów estrogenozależnej neuroprotekcji jest aktywacja kinaz MAPK/ERK odpowiedzialnych za przeżycie neuronów i regulację ekspresji genów antyapoptotycznych. Własne wyniki sugerujące zmniejszoną odporność siatkówki na uszkodzenie po owariektomii dobrze wpisują się w tę koncepcję. Podobne obserwacje przedstawili Russo i wsp., którzy badali wpływ 17β-estradiolu w modelu ostrego wzrostu ciśnienia śródgałkowego prowadzącego do niedokrwienia siatkówki [56]. Autorzy wykazali, że estradiol ogranicza utratę komórek zwojowych siatkówki oraz zmniejsza wzrost stężenia glutaminianu podczas reperfuzji. Szczególnie istotne jest to, że działanie ochronne było częściowo znoszone przez antagonistę receptorów estrogenowych ICI 182-780, co wskazuje na udział mechanizmów receptorozależnych. Jednocześnie częściowe utrzymywanie się efektu ochronnego po blokadzie ER sugeruje również obecność mechanizmów niezależnych od receptorów jądrowych, prawdopodobnie związanych z antyoksydacyjnymi właściwościami estradiolu. W kontekście własnych badań może to mieć szczególne znaczenie dla interpretacji efektów obserwowanych po zastosowaniu SERM, które modulują sygnalizację receptorową bez pełnego odtwarzania fizjologicznego działania estradiolu.

W licznych badaniach podkreślano również wpływ estrogenów na funkcję mitochondriów oraz metabolizm energetyczny neuronów. Estradiol zwiększa aktywność łańcucha oddechowego, stabilizuje potencjał błony mitochondrialnej oraz ogranicza produkcję reaktywnych form tlenu [31]. Mechanizmy te mają szczególne znaczenie w komórkach zwojowych siatkówki, które należą do najbardziej energochłonnych neuronów organizmu. Niedokrwienie prowadzi do gwałtownego zaburzenia funkcji mitochondrialnych, przeciążenia wapniowego oraz aktywacji kaskady apoptotycznej. Niedobór estrogenów może dodatkowo nasilać te procesy poprzez utratę mitochondrialnych mechanizmów ochronnych. Uzyskane w niniejszej pracy pogorszenie parametrów ERG po owariektomii może częściowo odzwierciedlać właśnie zaburzenia bioenergetyczne siatkówki. W badaniach własnych zwiększona podatność siatkówki po owariektomii mogła częściowo wynikać właśnie z utraty tego immunomodulacyjnego

działania estrogenów. Ma to szczególne znaczenie w kontekście szlaku Fas/FasL, którego aktywacja jest silnie związana z neurozapaleniem i aktywacją mikrogleju. Interesujące pozostają również dane dotyczące wpływu estrogenów na stres oksydacyjny. Zhou i wsp. wykazali, że 17β-estradiol zwiększa ekspresję tioredoksyny-1 oraz aktywuje szlak AKT/CREB w modelu jaskry u myszy DBA/2J [24]. Jednocześnie estrogen ograniczał aktywację NF-κB, MAPK oraz ekspresję IL-18. Mechanizmy te wskazują, że estrogeny nie działają wyłącznie jako klasyczne hormony steroidowe, lecz stanowią wielopoziomowe regulatory odpowiedzi stresowej neuronów. Własne wyniki sugerujące częściową skuteczność modulacji receptorów estrogenowych mogą wynikać właśnie z wpływu na te szlaki komórkowe. Hutchinson i wsp. zwracają natomiast uwagę, że niedobór estrogenów po menopauzie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem licznych chorób okulistycznych, w tym jaskry, AMD oraz zaburzeń powierzchni oka [28]. Obserwacje te wspierają koncepcję, że menopauza i związany z nią spadek stężenia estrogenów mogą stanowić istotny czynnik ryzyka neurodegeneracji siatkówki. Warto podkreślić, że wpływ estrogenów na układ nerwowy jest zależny od płci biologicznej oraz wieku. Arevalo i wsp. wskazują na istnienie tzw. „*critical window hypothesis*", zgodnie z którą skuteczność estrogenowej neuroprotekcji maleje wraz z długością okresu niedoboru hormonalnego [57]. Długotrwały brak estrogenów prowadzi bowiem do zmniejszenia ekspresji receptorów estrogenowych oraz osłabienia odpowiedzi komórkowej na estradiol. Mechanizm ten może mieć istotne znaczenie dla interpretacji wyników uzyskanych w modelu owariektomii, szczególnie w odniesieniu do czasu pomiędzy zabiegiem a indukcją uszkodzenia siatkówki. Istotnym problemem pozostaje jednak ograniczona możliwość stosowania klasycznej hormonalnej terapii zastępczej ze względu na ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych, nowotworowych oraz zakrzepowo-zatorowych [58]. Dlatego coraz większe zainteresowanie budzą selektywne modulatory receptorów estrogenowych, które mogą zachowywać korzystne działanie neuroprotekcyjne przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerujące skuteczność raloksyfenu wydają się szczególnie istotne w kontekście translacyjnego potencjału terapii ukierunkowanej na receptor estrogenowy.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że menopauza chirurgiczna istotnie zwiększa podatność siatkówki na uszkodzenie neurodegeneracyjne oraz pogarsza funkcję przewodnictwa neuronalnego. Obserwowane zmiany elektrofizjologiczne oraz większa utrata komórek zwojowych siatkówki po uszkodzeniu nerwu wzrokowego

pozostają zgodne z aktualną koncepcją traktującą niedobór estrogenów jako jeden z kluczowych czynników przyspieszających starzenie układu nerwowego [41]. Coraz więcej danych wskazuje bowiem, że menopauza, szczególnie indukowana chirurgicznie, nie jest wyłącznie procesem endokrynnym, lecz stanowi wielopoziomowy czynnik wpływający na metabolizm neuronalny, funkcję mitochondriów, odpowiedź immunologiczną oraz podatność neuronów na stres oksydacyjny i apoptozę. W niniejszej pracy wykazano, że owariektomia prowadziła do pogorszenia funkcji siatkówki jeszcze przed wystąpieniem masywnej utraty komórek zwojowych, co sugeruje, że niedobór estrogenów wpływa początkowo na funkcję neuronalną i przewodnictwo synaptyczne. Szczególnie istotne było znaczne obniżenie odpowiedzi PhNR, uznawanej za czuły marker funkcji RGC. Wyniki te wspierają koncepcję, że menopauza prowadzi do utraty tzw. „*neuronal resilience*", czyli zdolności neuronów do adaptacji do stresu i uszkodzenia.

Coraz więcej danych sugeruje, że estrogeny pełnią funkcję kluczowych regulatorów bioenergetyki mózgu i siatkówki. Rettberg i wsp. określają estrogen jako „*master regulator*" układów bioenergetycznych organizmu [59]. Autorzy wykazali, że estradiol reguluje transport glukozy, aktywność glikolizy tlenowej oraz funkcję mitochondriów, zwiększając produkcję ATP i stabilizując metabolizm energetyczny neuronów. W okresie menopauzy dochodzi natomiast do przejścia w kierunku fenotypu metabolicznie upośledzonego, charakteryzującego się zmniejszoną wydolnością mitochondrialną oraz większą podatnością na stres oksydacyjny [59]. Mechanizm ten wydaje się szczególnie istotny w siatkówce, której komórki zwojowe należą do najbardziej energochłonnych neuronów organizmu. Znaczenie estrogenów dla utrzymania funkcji mitochondrialnych może tłumaczyć obserwowane w badaniach własnych pogorszenie parametrów ERG po owariektomii. Niedokrwienie i uszkodzenie aksonalne prowadzą do przeciążenia wapniowego, zaburzenia funkcji mitochondriów oraz aktywacji kaskady apoptotycznej. W warunkach niedoboru estrogenów mechanizmy kompensacyjne są osłabione, co może skutkować szybszym wyczerpaniem energetycznym neuronów oraz nasileniem neurodegeneracji. Rettberg i wsp. wykazali ponadto obecność receptorów estrogenowych bezpośrednio w mitochondriach, co sugeruje możliwość bezpośredniej regulacji metabolizmu mitochondrialnego przez estradiol [59].

Istotnym aspektem menopauzy chirurgicznej jest gwałtowność zmian hormonalnych. W przeciwieństwie do menopauzy naturalnej, w której spadek stężenia estrogenów zachodzi stopniowo, bilateralna owariektomia prowadzi do nagłego przerwania ekspozycji neuronów na estrogeny. Georgakis i wsp. wykazali, że menopauza chirurgiczna przed 45. rokiem życia wiąże się ze zwiększonym ryzykiem otępienia oraz szybszym pogorszeniem funkcji poznawczych [60]. Szczególnie widoczne były zaburzenia pamięci werbalnej, funkcji wykonawczych oraz szybkości przetwarzania informacji. Autorzy sugerują, że przedwczesne pozbawienie organizmu estrogenów może przyspieszać procesy neurodegeneracyjne i starzenie mózgu. Podobne obserwacje przedstawili Dobson i wsp. w analizie obejmującej ponad 233 tysiące kobiet [35]. Wykazano, że menopauza przed 40. rokiem życia istotnie zwiększa ryzyko rozwoju demencji niezależnie od rodzaju menopauzy. Co istotne, ryzyko to było porównywalne z ryzykiem związanym z paleniem tytoniu lub przebytym udarem mózgu [35]. Wyniki te podkreślają znaczenie estrogenów jako długoterminowych czynników neuroprotekcyjnych oraz wskazują, że długość ekspozycji na endogenne estrogeny może wpływać na tempo starzenia układu nerwowego.

W kontekście neurodegeneracji siatkówki szczególnie interesująca pozostaje hipoteza przyspieszonego starzenia nerwu wzrokowego. Vajaranant i Pasquale wskazują, że niedobór estrogenów może prowadzić do przedwczesnego starzenia struktur nerwu wzrokowego oraz zwiększonej podatności na rozwój jaskry [41]. Autorzy podkreślają, że jaskra posiada liczne cechy choroby neurodegeneracyjnej związanej z procesem starzenia, a utrata estrogenów może przyspieszać degenerację włókien nerwowych siatkówki. Własne wyniki dotyczące większej podatności RGC na uszkodzenie po owariektomii dobrze wpisują się w tę koncepcję. Istotnym mechanizmem łączącym menopauzę z neurodegeneracją wydaje się również przewlekły stan zapalny. Niedobór estrogenów prowadzi do aktywacji mikrogleju oraz wzrostu ekspresji cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α, IL-1β czy IL-6. Proces ten określany jest niekiedy jako „*inflammaging*" i stanowi jeden z kluczowych elementów starzenia układu nerwowego. W siatkówce przewlekła aktywacja mikrogleju może dodatkowo nasilać aktywację szlaku Fas/FasL oraz zwiększać podatność neuronów na apoptozę. Uzyskane wyniki sugerują, że właśnie ten mechanizm może odpowiadać za większą wrażliwość siatkówki na uszkodzenie w warunkach niedoboru estrogenów.

Kolejnym istotnym zagadnieniem pozostaje wpływ menopauzy na funkcje poznawcze i układ cholinergiczny. Markowska i Savonenko wykazali, że długotrwały

niedobór estrogenów przyspiesza starzenie poznawcze oraz pogarsza pamięć roboczą u szczurów [39]. Autorzy obserwowali również zwiększoną wrażliwość na działanie skopolaminy, sugerującą upośledzenie funkcji cholinergicznych. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami Gibbsa, który wykazał obecność receptorów estrogenowych w neuronach cholinergicznych podstawnej części przodomózgowia [61]. Estrogeny zwiększały ekspresję acetylotransferazy cholinowej oraz modulowały aktywność układu cholinergicznego, który odgrywa istotną rolę w procesach poznawczych i plastyczności neuronalnej. Znaczenie układu cholinergicznego może wykraczać poza funkcje poznawcze i obejmować również regulację funkcji siatkówki. Zaburzenia neurotransmisji cholinergicznej wpływają na aktywność interneuronów siatkówkowych oraz przetwarzanie sygnału wzrokowego. Możliwe więc, że część obserwowanych zmian elektrofizjologicznych po owariektomii wynikała z zaburzenia estrogenozależnej regulacji układu cholinergicznego.

Istotnym problemem pozostaje możliwość terapeutycznego wykorzystania estrogenów. Początkowo hormonalna terapia zastępcza była rozważana jako potencjalna metoda ochrony funkcji poznawczych oraz ograniczania neurodegeneracji. Jednak wyniki badania WHIMS (ang. the Women's Health Initiative Memory Study) wykazały, że stosowanie terapii hormonalnej u starszych kobiet może zwiększać ryzyko demencji oraz pogarszać funkcje poznawcze [62]. Obserwacje te doprowadziły do powstania hipotezy, zgodnie z którą działanie estrogenów zależy od momentu rozpoczęcia terapii względem menopauzy. Wczesne wdrożenie leczenia może wykazywać działanie ochronne, natomiast późna terapia może być nieskuteczna lub wręcz szkodliwa [62]. Podobne wnioski przedstawili Rocca i wsp., analizując wpływ przedwczesnej menopauzy na ryzyko udaru niedokrwiennego [34]. Autorzy zaproponowali hipotezę „okna terapeutycznego", zgodnie z którą estrogeny działają ochronnie przed 50. rokiem życia, natomiast ich wpływ może zmieniać się wraz z wiekiem i nasileniem zmian naczyniowych. Mechanizm ten może mieć szczególne znaczenie w neurodegeneracji siatkówki, gdzie współistnieją komponenty neuronalne, mitochondrialne i naczyniowe.

Wyniki własne oraz dane literaturowe wskazują więc, że menopauza chirurgiczna stanowi istotny czynnik przyspieszający neurodegenerację siatkówki. Niedobór estrogenów prowadzi do zaburzeń bioenergetycznych, aktywacji neurozapalenia, dysfunkcji mitochondrialnej oraz utraty mechanizmów neuroprotekcyjnych. Procesy te zwiększają podatność komórek zwojowych siatkówki na uszkodzenie niedokrwienne i apoptotyczne. Szczególne znaczenie wydaje się mieć interakcja pomiędzy starzeniem

hormonalnym a aktywacją szlaku Fas/FasL, który może stanowić jedno z głównych ogniw odpowiedzialnych za progresję neurodegeneracji w warunkach niedoboru estrogenów.

Szlak Fas/FasL stanowi jeden z najlepiej poznanych mechanizmów regulujących apoptozę zależną od receptorów śmierci i odgrywa istotną rolę zarówno w homeostazie tkanek, jak i w procesach neurodegeneracyjnych. Receptor Fas należy do nadrodziny receptorów TNF i po związaniu z ligandem FasL aktywuje wewnątrzkomórkową kaskadę kaspaz prowadzącą do śmierci komórki [18]. Kluczowym elementem tego procesu jest rekrutacja białka adaptorowego FADD, (Fas-associated death domain), które umożliwia utworzenie kompleksu DISC (death-inducing signaling complex) oraz aktywację kaspazy-8 [17,19]. Następnie dochodzi do aktywacji kaspaz efektorowych, głównie kaspazy-3, oraz do uruchomienia mitochondrialnego szlaku apoptotycznego poprzez aktywację białka BID i uwolnienie cytochromu c [17]. Wyniki badań wskazują, że aktywacja szlaku Fas/FasL odgrywa istotną rolę w neurodegeneracji siatkówki, szczególnie w warunkach przewlekłego stresu, niedokrwienia i uszkodzenia aksonalnego. Zacks i wsp. wykazali, że po odwarstwieniu siatkówki dochodzi do szybkiej aktywacji kompleksu Fas/FasL, aktywacji kaspazy-8 oraz wtórnej aktywacji mitochondrialnego szlaku apoptozy [63]. Co istotne, szczyt aktywacji szlaku Fas poprzedzał maksymalną aktywność kaspazy-9, co sugeruje, że sygnalizacja zależna od Fas może inicjować wtórne mechanizmy mitochondrialne prowadzące do śmierci fotoreceptorów. Autorzy wykazali również, że blokowanie receptora Fas zmniejszało aktywność kaspazy-9, potwierdzając ścisły związek między szlakiem zewnętrznym i wewnętrznym apoptozy [63]. Znaczenie szlaku Fas/FasL w degeneracji komórek siatkówki zostało potwierdzone również w modelach jaskry. Krishnan i wsp. wykazali, że aktywacja Fas jest niezbędna do degeneracji aksonów i śmierci komórek zwojowych siatkówki w modelu podwyższonego ciśnienia śródgałkowego IOP [64]. Zastosowanie peptydowego antagonisty receptora Fas (ONL1204) prowadziło do zmniejszenia utraty RGC oraz ograniczenia aktywacji mikrogleju i ekspresji cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α, IL-1β, IL-6 czy IL-18 [64]. Wyniki te wskazują, że szlak Fas/FasL nie pełni wyłącznie funkcji proapoptotycznej, ale stanowi również istotny element neurozapalenia i aktywacji komórek glejowych. Coraz więcej danych wskazuje, że szlak Fas/FasL odgrywa również istotną rolę w neurodegeneracji ośrodkowego układu nerwowego. Su i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję Fas i FasL w mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera oraz ich związek z degeneracją neurytów i toksycznością β-amyloidu [25]. Neurony pozbawione

funkcjonalnego Fas lub FasL były bardziej odporne na toksyczne działanie β-amyloidu, co sugeruje, że sygnalizacja Fas może stanowić jeden z mechanizmów utraty neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych [25]. Wyniki te są szczególnie istotne w kontekście obserwowanego wzrostu ryzyka otępienia po menopauzie oraz potencjalnego związku między niedoborem estrogenów a aktywacją szlaku apoptotycznego.

Istotnym aspektem pozostaje regulacja szlaku Fas/FasL przez estrogeny. Dane literaturowe wskazują, że estradiol może modulować ekspresję zarówno Fas, jak i FasL, jednak efekt ten jest silnie zależny od typu komórki oraz dominującego receptora estrogenowego. Nilsen i wsp. wykazali, że estrogen może działać neuroprotekcyjnie poprzez receptor ERα, natomiast aktywacja ERβ sprzyja indukcji apoptozy zależnej od Fas/FasL [65]. Autorzy sugerują, że apoptoza neuronalna regulowana estrogenami stanowi istotny mechanizm kształtowania dymorfizmu płciowego mózgu w okresie rozwoju. Co istotne, efekt apoptotyczny zależny od ERβ wymagał obecności FasL oraz produktów wydzielanych przez mikroglej [65]. Związek estrogenów z aktywacją szlaku Fas/FasL został potwierdzony także w innych tkankach zależnych hormonalnie. Nakamura i wsp. wykazali, że estrogen poprzez receptor ERα indukuje ekspresję FasL w osteoklastach, prowadząc do ich apoptozy i ochrony przed utratą masy kostnej [66]. Podobne obserwacje przedstawili Jaita i wsp., którzy wykazali, że 17β-estradiol zwiększa ekspresję Fas oraz FasL w komórkach przysadki i nasila apoptozę laktotropów [67]. Dane te wskazują, że estrogeny mogą pełnić podwójną rolę – z jednej strony wykazują działanie neuroprotekcyjne i przeciwzapalne, z drugiej zaś mogą aktywować mechanizmy apoptotyczne zależne od Fas/FasL w określonych populacjach komórek. Wydaje się więc, że wpływ estrogenów na szlak Fas/FasL jest wysoce kontekstowy i zależy od rodzaju tkanki, stanu metabolicznego komórki oraz proporcji receptorów ERα i ERβ. W warunkach fizjologicznych estrogeny mogą ograniczać neurozapalenie oraz stabilizować funkcje mitochondrialne, natomiast ich nagły niedobór – jak ma to miejsce po menopauzie chirurgicznej – może zaburzać równowagę pomiędzy sygnałami pro- i antyapoptotycznymi. W efekcie dochodzi do większej podatności neuronów na aktywację Fas-zależnej śmierci komórkowej. Istotnym elementem regulującym aktywność szlaku Fas jest również białko FAIM2. Pawar i wsp. wykazali, że FAIM2 pełni funkcję endogennego czynnika neuroprotekcyjnego w siatkówce, ograniczając aktywację apoptozy zależnej od Fas [22]. Po odwarstwieniu siatkówki obserwowano wzrost ekspresji FAIM2 w fotoreceptorach, a brak tego białka prowadził do przyspieszonej degeneracji komórek. Autorzy wykazali ponadto, że FAIM2 oddziałuje z receptorem Fas

oraz białkami HSP90 (ang. heat shock protein 90) i czynnikiem transkrypcyjnym p53, modulując odpowiedź komórki na stres [22]. Mechanizm ten może stanowić jeden z kluczowych elementów ograniczających neurodegenerację w warunkach uszkodzenia siatkówki. Coraz większe znaczenie przypisuje się także różnym formom FasL. Krishnan i wsp. wykazali, że rozpuszczalna forma FasL (sFasL) działa neuroprotekcyjnie i przeciwzapalnie, hamując destrukcyjne działanie błonowej formy FasL (mFasL) [23]. Nadekspresja sFasL w modelach jaskry prowadziła do zahamowania aktywacji gleju, zmniejszenia produkcji TNF-α oraz ograniczenia śmierci RGC mimo utrzymującego się podwyższonego IOP [23]. Wyniki te sugerują, że równowaga pomiędzy formą błonową i rozpuszczalną FasL może decydować o kierunku odpowiedzi komórkowej – proapoptotycznej lub ochronnej.

Na szczególną uwagę zasługuje również możliwość terapeutycznego blokowania receptora Fas. Besirli i wsp. wykazali, że peptyd Met12, będący inhibitorem receptora Fas, skutecznie zmniejszał aktywację kaspaz oraz ograniczał śmierć fotoreceptorów po odwarstwieniu siatkówki [68]. Długoterminowo prowadziło to do lepszego zachowania grubości warstwy jądrowej zewnętrznej oraz większej liczby fotoreceptorów [68]. Wyniki te wskazują, że modulacja szlaku Fas/FasL może stanowić potencjalny kierunek terapii neuroprotekcyjnej w chorobach siatkówki.

Współczesne badania pokazują również, że sygnalizacja Fas/FasL nie ogranicza się wyłącznie do indukcji apoptozy. Yamada i wsp. opisali „dualną rolę" szlaku Fas/FasL w regulacji tolerancji immunologicznej i odpowiedzi zapalnej [21]. Aktywacja Fas może prowadzić zarówno do śmierci komórek, jak i do aktywacji szlaków proliferacyjnych oraz zapalnych zależnych od NF-κB. Z kolei Mouasni i Tourneur wskazują, że białko FADD uczestniczy nie tylko w apoptozie, ale także w regulacji inflamasomu, nekroptozy i odpowiedzi immunologicznej [19]. Dane te sugerują, że Fas/FasL należy traktować jako złożony system regulacyjny integrujący procesy śmierci komórki, neurozapalenia i regeneracji. Interesujące wyniki przedstawili również Zhou i wsp., którzy wykazali udział FasL w regeneracji nerwów obwodowych [24]. Autorzy zaobserwowali, że obniżenie ekspresji FasL po uszkodzeniu nerwu kulszowego sprzyjało regeneracji aksonów oraz zmniejszało apoptozę neuronów zwoju międzykręgowego (ang. dorsal root ganglion, DRG). Mechanizm ten był związany z aktywacją szlaków AKT, β-kateniny i NF-κB [24]. Wyniki te potwierdzają, że szlak Fas/FasL może pełnić również funkcje regulacyjne związane z przebudową i regeneracją tkanki nerwowej.

Selektywne modulatory receptora estrogenowego stanowią grupę związków wykazujących tkankowo swoiste działanie agonistyczne lub antagonistyczne wobec receptorów estrogenowych. Mechanizm ich działania opiera się na zdolności do wiązania receptorów ERα i ERβ oraz indukowania specyficznych zmian konformacyjnych receptora, które determinują rekrutację kofaktorów transkrypcyjnych i efekt biologiczny w danej tkance. Dzięki temu SERMs mogą wykazywać działanie estrogenopodobne w obrębie kości lub ośrodkowego układu nerwowego, jednocześnie działając antagonistycznie w tkankach obwodowych, takich jak gruczoł sutkowy czy endometrium [69]. Z tego względu związki te wzbudziły duże zainteresowanie jako potencjalna alternatywa dla klasycznej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet po menopauzie.

W ostatnich latach coraz więcej badań wskazuje, że SERMs wykazują istotne działanie neuroprotekcyjne, przeciwzapalne i przeciwapoptotyczne w obrębie siatkówki oraz ośrodkowego układu nerwowego. Arevalo i wsp. podkreślają, że tamoksyfen i raloksyfen zmniejszają uszkodzenie neuronów w modelach urazów mózgu, chorób neurodegeneracyjnych, stwardnienia rozsianego oraz zaburzeń poznawczych i afektywnych [57]. Mechanizmy te obejmują ograniczenie aktywacji mikrogleju, zmniejszenie stresu oksydacyjnego, redukcję ekscytotoksyczności glutaminianowej oraz aktywację szlaków przeżycia komórkowego zależnych od PI3K/AKT i MAPK/ERK [57]. Szczególnie istotne znaczenie w kontekście neurodegeneracji siatkówki wydaje się mieć raloksyfen – benzotiofenowy SERM drugiej generacji. O'Neill i wsp. wykazali, że raloksyfen w niskich stężeniach wykazuje wyraźne działanie neuroprotekcyjne wobec neuronów hipokampa eksponowanych na toksyczne działanie β-amyloidu, nadtlenku wodoru i glutaminianu [46]. Autorzy zaobserwowali również, że raloksyfen stymuluje wzrost wypustek neuronalnych oraz częściowo naśladuje neurotroficzne działanie 17β-estradiolu [46]. Jednocześnie efekt ten był słabszy niż w przypadku estradiolu, co sugeruje częściową agonistyczną aktywność raloksyfenu wobec receptorów estrogenowych w tkance nerwowej.

Dane eksperymentalne wskazują, że jednym z głównych mechanizmów neuroprotekcyjnych SERMs jest modulacja aktywności komórek glejowych i ograniczenie neurozapalenia. W badaniach in vitro raloksyfen oraz tamoksyfen zmniejszały wydzielanie tlenku azotu, IL-6 oraz innych mediatorów zapalnych przez aktywowane mikroglejowe komórki N9 oraz pierwotne mikroglejowe komórki szczura [70]. Co istotne, efekt przeciwzapalny był obserwowany nawet wtedy, gdy SERM podawano po aktywacji komórek lipopolisacharydem, co sugeruje potencjalne znaczenie

terapeutyczne także po rozpoczęciu procesu zapalnego. Autorzy wykazali ponadto, że działanie to może być związane z hamowaniem aktywności AP-1 oraz modulacją prozapalnych szlaków sygnałowych [70]. Podobne obserwacje przedstawili Ishihara i wsp., którzy wykazali, że tamoksyfen i raloksyfen hamują aktywację mikrogleju oraz wtórną śmierć neuronów poprzez mechanizm zależny od receptorów estrogenowych [45]. SERMs zmniejszały ekspresję TNF-α, IL-1β i chemotaktycznego białka monocytów 1 (ang. monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) oraz ograniczały toksyczny wpływ aktywowanego mikrogleju na komórki neuronalne SH-SY5Y [45]. Co ważne, efekt ochronny był znoszony po zastosowaniu antagonisty receptorów estrogenowych ICI182,780, co potwierdza udział klasycznych receptorów estrogenowych w tym procesie [45]. Znaczenie SERMs w modulacji neurozapalenia podkreślają również Arevalo i wsp., którzy wykazali, że raloksyfen, tamoksyfen, ospemifen oraz bazedoksyfen zmniejszają aktywację astrocytów i mikrogleju oraz ograniczają wydzielanie IL-6 i innych cytokin prozapalnych [70]. Mechanizm ten obejmuje hamowanie aktywacji NF-κB oraz zmniejszenie reaktywnej glejozy, która odgrywa istotną rolę w przewlekłej neurodegeneracji [70]. Wyniki te mają szczególne znaczenie w kontekście jaskry i innych chorób siatkówki, w których aktywacja komórek glejowych stanowi jeden z kluczowych elementów progresji choroby.

Coraz więcej badań wskazuje także na potencjalne zastosowanie SERMs w ochronie fotoreceptorów. Getter i wsp. wykazali, że raloksyfen chroni siatkówkę przed degeneracją wywołaną toksycznym działaniem all-trans-retinalu (atRAL), który odgrywa istotną rolę w patogenezie zwyrodnienia plamki żółtej, retinitis pigmentosa oraz choroby Stargardta [48]. Autorzy zaobserwowali, że raloksyfen stabilizuje homeostazę wapniową i ogranicza apoptozę fotoreceptorów, prowadząc do ochrony strukturalnej siatkówki [48]. Wyniki te sugerują, że SERMs mogą wpływać na mechanizmy ekscytotoksyczności i stresu oksydacyjnego niezależnie od klasycznych efektów hormonalnych. Ważnym aspektem jest również wpływ SERMs na komórki glejowe hipokampa i proces starzenia mózgu. Lei i wsp. wykazali, że zarówno estradiol, jak i raloksyfen zmniejszają liczbę mikrogleju i astrocytów w hipokampie starych samic myszy po OVA [47]. Autorzy sugerują, że działanie to może ograniczać przewlekły stan zapalny związany ze starzeniem oraz zmniejszać ryzyko neurodegeneracji [47]. Wyniki te są szczególnie istotne w kontekście menopauzy chirurgicznej, gdzie nagły niedobór estrogenów może prowadzić do nadmiernej aktywacji komórek glejowych i nasilenia neurozapalenia. Raloksyfen wykazuje również działanie neuroprotekcyjne wobec toksyczności β-

amyloidu, choć jego skuteczność wydaje się częściowo zależna od obecności endogennego estradiolu [46]. Dane te sugerują, że SERMs mogą wpływać na procesy neurodegeneracyjne związane z odkładaniem białek patologicznych.

Interesujące są także badania dotyczące wpływu SERMs na zachowanie i funkcje emocjonalne. W modelu szczurów z owariektomią raloksyfen zmniejszał zachowania lękowe i depresyjne, nie powodując jednocześnie tak silnej proliferacji tkanek obwodowych jak estradiol [51]. Estradiol zwiększał masę macicy oraz promował wzrost guzów indukowanych karcynogenem, podczas gdy raloksyfen wykazywał znacznie słabsze działanie proliferacyjne [51]. Wyniki te podkreślają potencjalną przewagę SERMs nad klasyczną terapią estrogenową pod względem bezpieczeństwa. Pomimo licznych korzyści neuroprotekcyjnych należy jednak pamiętać, że działanie SERMs jest złożone i zależne od typu tkanki, dawki oraz stosunku aktywacji ERα do ERβ. W niektórych warunkach raloksyfen może działać częściowo antagonistycznie wobec estradiolu [48]. Ponadto część efektów przeciwzapalnych może zachodzić niezależnie od klasycznych receptorów estrogenowych, poprzez bezpośrednią modulację szlaków sygnałowych związanych z AP-1 czy NF-κB [44].

W kontekście chorób siatkówki szczególne znaczenie ma możliwość miejscowego podawania estrogenów i potencjalnie również SERMs. Prokai-Tatrai i wsp. wykazali, że krople do oczu zawierające 17β-estradiol skutecznie chronią komórki zwojowe siatkówki i zachowują funkcję wzrokową w modelu jaskry [49]. Jednocześnie autorzy zwracają uwagę na problem ogólnoustrojowej ekspozycji estrogenowej po terapii miejscowej [49]. Wydaje się więc, że SERMs mogłyby stanowić atrakcyjną alternatywę terapeutyczną, zapewniając neuroprotekcję przy mniejszym ryzyku działań ubocznych związanych z proliferacją tkanek hormonozależnych. Mechanizmy neuroprotekcyjne SERMs obejmują aktywację receptorów estrogenowych ERα i ERβ, aktywację receptora błonowego GPR30, stymulację szlaków PI3K/AKT i MAPK/ERK, hamowanie NF-κB, redukcję produkcji ROS oraz ograniczenie reaktywnej glejozy [43]. Efektem tych działań jest zmniejszenie neurozapalenia, zahamowanie apoptozy, poprawa przeżywalności neuronów oraz stabilizacja funkcji mitochondrialnych. Wyniki przeprowadzonych badań ex vivo dostarczają bezpośrednich dowodów na znaczenie równoczesnej modulacji tych dwóch osi sygnalizacyjnych. Obserwowany wzrost przeżywalności neuronów po zastosowaniu KP7-6 wskazuje na skuteczne zahamowanie aktywacji kompleksu DISC oraz kaspaz. Jednocześnie raloksyfen, jako selektywny modulator receptora estrogenowego przywraca aktywność szlaków PI3K/AKT i ERK, co prowadzi do

zwiększenia ekspresji białek antyapoptotycznych [71]. Co szczególnie istotne, zastosowanie terapii skojarzonej prowadziło do efektu synergistycznego, co sugeruje, że jednoczesna modulacja obu szlaków pozwala na przerwanie dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy sygnalizacją apoptotyczną a dysfunkcją mitochondrialną. Model in vivo potwierdził te obserwacje w warunkach fizjologicznie bardziej złożonych. Znacząco większa utrata komórek zwojowych siatkówki w grupie OVA wskazuje, że estrogeny pełnią kluczową rolę w utrzymaniu integralności struktur neuronalnych w warunkach stresu niedokrwiennego. Na poziomie molekularnym może to wynikać z deregulacji osi PI3K/AKT/mTOR, która odpowiada za kontrolę autofagii oraz metabolizmu energetycznego komórek [72]. Zaburzenia tej osi prowadzą do akumulacji uszkodzonych mitochondriów i białek, co sprzyja aktywacji ścieżek apoptotycznych. Analiza funkcjonalna (ERG) wykazała, że przywrócenie sygnalizacji estrogenowej oraz zahamowanie szlaku Fas prowadzi nie tylko do zachowania struktury, ale również funkcji neuronów. Szczególnie istotne jest odtworzenie amplitudy PhNR, która bezpośrednio odzwierciedla aktywność RGCs. Na poziomie molekularnym może to oznaczać zachowanie integralności synaptycznej oraz stabilizację przewodnictwa aksonalnego, które są silnie zależne od prawidłowej funkcji mitochondriów i homeostazy wapniowej [73]. Interesującym aspektem wyników jest relatywnie niższa skuteczność estradiolu w porównaniu z raloksyfenem. Może to wynikać z faktu, że estradiol aktywuje szeroki wachlarz receptorów i szlaków sygnalizacyjnych, co prowadzi do efektów plejotropowych, nie zawsze korzystnych w warunkach stresu. W przeciwieństwie do tego, SERM działają bardziej selektywnie, modulując konformację receptorów estrogenowych i ich interakcję z kofaktorami transkrypcyjnymi, co pozwala na bardziej ukierunkowaną aktywację genów związanych z przeżyciem komórek [69]. Dodatkowo, wykazano, że raloksyfen może wpływać na aktywność mikrogleju poprzez modulację receptorów kannabinoidowych typu 2 (ang. cannabinoid receptor 2, CB2), co prowadzi do zmniejszenia stanu zapalnego i wtórnego uszkodzenia neuronów [74]. Z kolei skuteczność KP7-6 podkreśla centralną rolę sygnalizacji Fas w patogenezie uszkodzeń siatkówki. Hamowanie tego szlaku nie tylko zapobiega aktywacji kaspaz, ale również ogranicza wtórne procesy zapalne poprzez zmniejszenie uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α i IL-1β [75]. W kontekście niedokrwienia-reperfuzji, gdzie dochodzi do gwałtownego wzrostu stresu oksydacyjnego i aktywacji układu immunologicznego, efekt ten ma szczególne znaczenie.

Najbardziej istotnym odkryciem niniejszej pracy jest jednak wykazanie synergii pomiędzy modulacją sygnalizacji estrogenowej a hamowaniem apoptozy Fas-zależnej. Mechanistycznie, efekt ten można tłumaczyć równoczesnym zahamowaniem inicjacji apoptozy (na poziomie receptora Fas) oraz wzmocnieniem mechanizmów przeżycia (poprzez aktywację PI3K/AKT i ERK). Takie podejście pozwala nie tylko zatrzymać proces degeneracji, ale również przywrócić zdolność neuronów do adaptacji i regeneracji. Obserwowane przywrócenie amplitud a- i b-fali sugeruje, że efekt terapeutyczny obejmuje również inne typy komórek siatkówki, co wskazuje na globalną poprawę homeostazy tkankowej. Znaczenie translacyjne tych wyników wykracza poza układ wzrokowy. Podobne mechanizmy molekularne, obejmujące interakcję pomiędzy sygnalizacją hormonalną a apoptozą, odgrywają rolę w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy udar niedokrwienny [76]. W związku z tym, strategia polegająca na jednoczesnej modulacji szlaków przeżycia i śmierci komórki może stanowić uniwersalne podejście terapeutyczne w medycynie starzenia. Pomimo istotnych wyników, badanie nie pozostaje wolne od ograniczeń. Brak bezpośredniej analizy ekspresji białek kluczowych dla badanych szlaków (np. Fas, kaspaza-8, Bcl-2, Bax) ogranicza możliwość jednoznacznego potwierdzenia postulowanych mechanizmów. Ponadto, model owariektomii nie odzwierciedla w pełni dynamiki zmian hormonalnych zachodzących w trakcie naturalnej menopauzy. W przyszłych badaniach zasadne byłoby zastosowanie metod molekularnych, takich jak Western blot czy analiza transkryptomiczna, w celu dokładniejszej charakterystyki zmian sygnalizacyjnych.

Podsumowując, wyniki wskazują, że starzenie endokrynne wywołane chirurgicznym modelem menopauzy prowadzi do deregulacji kluczowych szlaków molekularnych odpowiedzialnych za przeżycie neuronów, a jednoczesna modulacja sygnalizacji estrogenowej i apoptozy Fas-zależnej pozwala skutecznie przywrócić ich funkcję i strukturę. Strategia ta może stanowić obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem.

6. Wnioski

6.1. Wnioski z pierwszej części badania

W prezentowanym badaniu wykazano, że chirurgicznie wywołana poprzez zabieg obustronnej owariektomii menopauza w modelu szczurzym już po dwóch tygodniach prowadzi do utraty interneuronów siatkówki, oraz powstania stanu zapalnego w siatkówce pod postacią nacieku komórek mikroglejowych. Przy obserwacji przez sześć tygodni dodatkowo nasilała ona podatność komórek zwojowych siatkówki na neurodegeneracje w modelu zmiażdżenia nerwu wzrokowego. Zapisy PhNR wykazały, że mimo braku widocznych zmian morfologicznych, menopauza chirurgiczna istotnie upośledza funkcję oraz endogenne zdolności neuroprotekcyjne komórek zwojowych siatkówki. Zapisy potencjałów oscylacyjnych sugerują zwiększone pobudzenie aktywności gleju oraz zaburzenia ukrwienia siatkówki w grupie zwierząt po owariektomii.

6.2. Wnioski z drugiej części badania

Połączenie działania selektywnych modulatorów receptora estrogenowego i antagonistów szlaku FasR/FasL stanowi obiecującą strategię terapeutyczną w chorobach niedokrwiennych siatkówki, szczególnie w kontekście pomenopauzalnego niedoboru estrogenów. Takie podejście pozwala zmaksymalizować skuteczność neuroprotekcyjną, jednocześnie omijając ryzyko związane z konwencjonalną hormonalną terapią zastępczą.

7. Piśmiennictwo

[1] Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. Prog Retin Eye Res 2014;42:44–84. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003.

[2] Grünert U, Martin PR. Cell types and cell circuits in human and non-human primate retina. Prog Retin Eye Res 2020;78. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100844.

[3] Boia R, Ruzafa N, Aires ID, Pereiro X, Ambrósio AF, Vecino E, et al. Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. Int J Mol Sci 2020;21. https://doi.org/10.3390/IJMS21072262.

[4] Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: A functional element of the retina. Trends Neurosci 1996;19:307–12. https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10040-0.

[5] Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. Exp Eye Res 1995;61:33–44. https://doi.org/10.1016/S0014-4835(95)80056-5.

[6] Forrest SL, Kovacs GG. Current concepts and molecular pathology of neurodegenerative diseases. Pathology 2025;57:178–90. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2024.10.006.

[7] Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol 2017;9:a028035. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A028035.

[8] Logroscino G, Urso D, Savica R. Descriptive Epidemiology of Neurodegenerative Diseases: What Are the Critical Questions? Neuroepidemiology 2022;56:309. https://doi.org/10.1159/000525639.

[9] Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci 2018;19. https://doi.org/10.3390/IJMS19103082.

[10] Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Translational Neurodegeneration 2020 9:1 2020;9:42-. https://doi.org/10.1186/S40035-020-00221-2.

[11] Rim C, You MJ, Nahm M, Kwon MS. Emerging role of senescent microglia in brain aging-related neurodegenerative diseases. Transl Neurodegener 2024;13. https://doi.org/10.1186/S40035-024-00402-3.

[12] Marchesi N, Fahmideh F, Boschi F, Pascale A, Barbieri A. Ocular Neurodegenerative Diseases: Interconnection between Retina and Cortical Areas. Cells 2021;10:2394. https://doi.org/10.3390/CELLS10092394.

[13] Wu W, Li Y, Hu T, Tao W, Wen D, Lei H. Editorial: Ocular neurodegenerative diseases: novel mechanisms, diagnosis, and therapeutic strategies. Front Neurosci 2023;17. https://doi.org/10.3389/FNINS.2023.1274778.

[14] Stahl A. The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. Dtsch Arztebl Int 2020;117:513. https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2020.0513.

[15] Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review. JAMA 2014;311:1901. https://doi.org/10.1001/JAMA.2014.3192.
[16] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. Lancet 2010;376:124–36. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
[17] Roy U. Structural Characterizations of the Fas Receptor and the Fas-Associated Protein with Death Domain Interactions. Protein J 2016;35:51–60. https://doi.org/10.1007/S10930-015-9646-6.
[18] Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, et al. Death the Fas way: Regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. Pharmacol Ther 2000;88:333–47. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00096-6.
[19] Mouasni S, Tourneur L. FADD at the Crossroads between Cancer and Inflammation. Trends Immunol 2018;39:1036–53. https://doi.org/10.1016/J.IT.2018.10.005.
[20] Flores-Romero H, Hohorst L, John M, Albert M, King LE, Beckmann L, et al. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. EMBO J 2021;41:e108690. https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108690.
[21] Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. Front Immunol 2017;8:403. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00403.
[22] Pawar M, Busov B, Chandrasekhar A, Yao J, Zacks DN, Besirli CG. FAS apoptotic inhibitory molecule 2 is a stress-induced intrinsic neuroprotective factor in the retina. Cell Death Differ 2017;24:1799–810. https://doi.org/10.1038/CDD.2017.109.
[23] Krishnan A, Fei F, Jones A, Busto P, Marshak-Rothstein A, Ksander BR, et al. Overexpression of soluble Fas ligand following AAV gene therapy prevents retinal ganglion cell death in chronic and acute murine models of glaucoma. J Immunol 2016;197:4626. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1601488.
[24] Zhou Y, Yao Y, Feng Y, Qiu Z, Luo S, Shi X, et al. Fas ligand regulate nerve injury and repair by affecting AKT, β-catenin, and NF-κB pathways. IBRO Neurosci Rep 2024;16:455–67. https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2024.02.008.
[25] Su JH, Anderson AJ, Cribbs DH, Tu C, Tong L, Kesslack P, et al. Fas and Fas Ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in β-amyloid-induced neuronal death. Neurobiol Dis 2003;12:182–93. https://doi.org/10.1016/S0969-9961(02)00019-0.
[26] Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2003;86:225–30. https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00360-1.
[27] De Ronde W, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM, De Jong FH. The importance of oestrogens in males. Clin Endocrinol (Oxf) 2003;58:529–42. https://doi.org/10.1046/J.1365-2265.2003.01669.X.
[28] Hutchinson C V., Walker JA, Davidson C. Oestrogen, ocular function and low-level vision: a review. J Endocrinol 2014;223:R9–18. https://doi.org/10.1530/JOE-14-0349.

[29] Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. J Endocrinol 2016;230:R13–25. https://doi.org/10.1530/JOE-16-0070.
[30] Maneesh Kumar D, Simpkins JW, Agarwal N. Estrogens and neuroprotection in retinal diseases. Mol Vis 2008;14:1480.
[31] Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. Prog Neurobiol 2001;63:29–60. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00025-3.
[32] Cascio C, Deidda I, Russo D, Guarneri P. The estrogenic retina: The potential contribution to healthy aging and age-related neurodegenerative diseases of the retina. Steroids 2015;103:31–41. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.002.
[33] Gold EB. The Timing of the Age at Which Natural Menopause Occurs. Obstet Gynecol Clin North Am 2011;38:425. https://doi.org/10.1016/J.OGC.2011.05.002.
[34] Rocca WA, Grossardt BR, Miller VM, Shuster LT, Brown RD. Premature menopause or early menopause and risk of ischemic stroke. Menopause 2012;19:272. https://doi.org/10.1097/GME.0B013E31822A9937.
[35] Dobson AJ, Xu Z, Wilson LF, Chung HF, Sandin S, Van Der Schouw YT, et al. Menopause age and type and dementia risk: a pooled analysis of 233 802 women. Age Ageing 2024;53. https://doi.org/10.1093/AGEING/AFAE254.
[36] Brinton RD. Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: Therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. Adv Drug Deliv Rev 2008;60:1504–11. https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.003.
[37] Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. J Neuroimmunol 2010;219:90–9. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.12.008.
[38] Newhouse P, Dumas J. Estrogen-Cholinergic Interactions: Implications for Cognitive Aging. Horm Behav 2015;74:173. https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2015.06.022.
[39] Markowska AL, Savonenko A V. Effectiveness of estrogen replacement in restoration of cognitive function after long-term estrogen withdrawal in aging rats. J Neurosci 2002;22:10985–95. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-24-10985.2002.
[40] Olakowska E, Rodak P, Pacwa A, Machowicz J, Machna B, Lewin-Kowalik J, et al. Surgical Menopause Impairs Retinal Conductivity and Worsens Prognosis in an Acute Model of Rat Optic Neuropathy. Cells 2022;11. https://doi.org/10.3390/CELLS11193062.
[41] Vajaranant TS, Pasquale LR. Estrogen deficiency accelerates aging of the optic nerve. Menopause 2012;19:942–7. https://doi.org/10.1097/GME.0B013E3182443137.
[42] Arevalo MA, Santos-Galindo M, Lagunas N, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. J Mol Endocrinol 2011;46. https://doi.org/10.1677/JME-10-0122.

[43] Baez-Jurado E, Rincón-Benavides MA, Hidalgo-Lanussa O, Guio-Vega G, Ashraf GM, Sahebkar A, et al. Molecular mechanisms involved in the protective actions of Selective Estrogen Receptor Modulators in brain cells. Front Neuroendocrinol 2019;52:44–64. https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2018.09.001.

[44] Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A, Salminen A. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. Inflamm Res 2005;54:194–203. https://doi.org/10.1007/S00011-005-1343-Z.

[45] Ishihara Y, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T. Selective estrogen-receptor modulators suppress microglial activation and neuronal cell death via an estrogen receptor-dependent pathway. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2015;145:85–93. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.002.

[46] O'Neill K, Chen S, Brinton RD. Impact of the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, on neuronal survival and outgrowth following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. Exp Neurol 2004;185:63–80. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.09.005.

[47] Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye KF, Ingram DK, et al. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. Neuroscience 2003;121:659–66. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00245-8.

[48] Getter T, Suh S, Hoang T, Handa JT, Dong Z, Ma X, et al. The selective estrogen receptor modulator raloxifene mitigates the effect of all-trans-retinal toxicity in photoreceptor degeneration. J Biol Chem 2019;294:9461. https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.008697.

[49] Prokai-Tatrai K, Xin H, Nguyen V, Szarka S, Blazics B, Prokai L, et al. 17β-estradiol eye drops protect the retinal ganglion cell layer and preserve visual function in an in vivo model of glaucoma. Mol Pharm 2013;10:3253–61. https://doi.org/10.1021/MP400313U.

[50] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 2002;288:321–33. https://doi.org/10.1001/JAMA.288.3.321.

[51] Walf AA, Frye CA. Raloxifene and/or estradiol decrease anxiety-like and depressive-like behavior, whereas only estradiol increases carcinogen-induced tumorigenesis and uterine proliferation among ovariectomized rats. Behavioural Pharmacology 2010;21:231–40. https://doi.org/10.1097/FBP.0B013E32833A5CB0.

[52] Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G. Gonadal Hormones and Retinal Disorders: A Review. Front Endocrinol (Lausanne) 2018;9. https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00066.

[53] Smedowski A, Pietrucha-Dutczak M, Kaarniranta K, Lewin-Kowalik J. A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. Sci Rep 2014;4. https://doi.org/10.1038/SREP05910.

[54] Bhatt Y, Hunt DM, Carvalho LS. The origins of the full-field flash electroretinogram b-wave. Front Mol Neurosci 2023;16. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2023.1153934.
[55] Nakazawa T, Takahashi H, Shimura M. Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. Brain Res 2006;1093:141–9. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2006.03.084.
[56] Russo R, Cavaliere F, Watanabe C, Nucci C, Bagetta G, Corasaniti MT, et al. 17Beta-estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat. Prog Brain Res 2008;173:583–90. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)01144-8.
[57] Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. Nat Rev Neurosci 2015;16:17–29. https://doi.org/10.1038/NRN3856.
[58] Zhang GQ, Chen JL, Luo Y, Mathur MB, Anagnostis P, Nurmatov U, et al. Menopausal hormone therapy and women's health: An umbrella review. PLoS Med 2021;18. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1003731.
[59] Rettberg JR, Yao J, Brinton RD. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. Front Neuroendocrinol 2014;35:8–30. https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2013.08.001.
[60] Georgakis MK, Beskou-Kontou T, Theodoridis I, Skalkidou A, Petridou ET. Surgical menopause in association with cognitive function and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. Psychoneuroendocrinology 2019;106:9–19. https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2019.03.013.
[61] Gibbs RB. Expression of estrogen receptor-like immunoreactivity by different subgroups of basal forebrain cholinergic neurons in gonadectomized male and female rats. Brain Res 1996;720:61–8. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00106-0.
[62] Craig MC, Maki PM, Murphy DGM. The Women's Health Initiative Memory Study: Findings and implications for treatment. Lancet Neurology 2005;4:190–4. https://doi.org/10.1016/s1474-4422(05)01016-1.
[63] Zacks DN, Zheng QD, Han Y, Bakhru R, Miller JW. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45:4563–9. https://doi.org/10.1167/IOVS.04-0598.
[64] Krishnan A, Kocab AJ, Zacks DN, Marshak-Rothstein A, Gregory-Ksander M. A small peptide antagonist of the Fas receptor inhibits neuroinflammation and prevents axon degeneration and retinal ganglion cell death in an inducible mouse model of glaucoma. J Neuroinflammation 2019;16. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1576-3.
[65] Nilsen J, Mor G, Naftolin F F. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system . J Neurobiol 2000:64–78.
[66] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas

ligand in osteoclasts. Cell 2007;130:811–23. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.07.025.
[67] Jaita G, Candolfi M, Zaldivar V, Zárate S, Ferrari L, Pisera D, et al. Estrogens up-regulate the Fas/FasL apoptotic pathway in lactotropes. Endocrinology 2005;146:4737–44. https://doi.org/10.1210/EN.2005-0279.
[68] Besirli CG, Chinskey ND, Zheng QD, Zacks DN. Inhibition of Retinal Detachment-Induced Apoptosis in Photoreceptors by a Small Peptide Inhibitor of the Fas Receptor. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:2177. https://doi.org/10.1167/IOVS.09-4439.
[69] Dutertre M, Smith CL. Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. J Pharmacol Exp Ther 2000;295:431–7. https://doi.org/10.1016/S0022-3565(24)38923-2.
[70] Arevalo MA, Diz-Chaves Y, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells. J Neuroendocrinol 2012;24:183–90. https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2011.02156.X.
[71] Karki P, Webb A, Zerguine A, Choi J, Son DS, Lee E. Mechanism of Raloxifene-induced Upregulation of Glutamate TransporterS in Rat Primary Astrocytes. Glia 2014;62:1270. https://doi.org/10.1002/GLIA.22679.
[72] Zhang F, Ma H, Wang ZL, Li WH, Liu H, Zhao YX. The PI3K/AKT/mTOR pathway regulates autophagy to induce apoptosis of alveolar epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease caused by PM2.5 particulate matter. J Int Med Res 2020;48:0300060520927919. https://doi.org/10.1177/0300060520927919.
[73] Yu DY, Cringle SJ, Balaratnasingam C, Morgan WH, Yu PK, Su EN. Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. Prog Retin Eye Res 2013;36:217–46. https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2013.07.001.
[74] P K, ZH S. Identification of raloxifene as a novel CB2 inverse agonist. Biochem Biophys Res Commun 2013;435. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.04.040.
[75] Choi C, Benveniste EN. Fas ligand/Fas system in the brain: Regulator of immune and apoptotic responses. Brain Res Rev 2004;44:65–81. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.08.007.
[76] Petanceska SS, Nagy V, Frail D, Gandy S. Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. Exp Gerontol 2000;35:1317–25. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00157-1.

8. Streszczenie w języku polskim

Niedobór estrogenów w okresie menopauzy stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju chorób neurodegeneracyjnych siatkówki, w tym neuropatii nerwu wzrokowego oraz retinopatii niedokrwiennych. Celem niniejszej rozprawy była ocena wpływu niedoboru estrogenów indukowanego zabiegiem owariektomii na funkcjonowanie i przeżywalność neuronów siatkówki oraz określenie neuroprotekcyjnego działania modulatorów receptorów estrogenowych i inhibitora szlaku FasR/FasL w modelach niedokrwienia siatkówki.

Badanie zostało podzielone na dwie części. W pierwszej części oceniano wpływ chirurgicznie indukowanej menopauzy na funkcję i przeżywalność komórek zwojowych siatkówki w zwierzęcym modelu zmiażdżenia nerwu wzrokowego. Analizy elektrofizjologiczne i histologiczne wykazały, że niedobór estrogenów prowadzi do zaburzeń funkcji siatkówki, utraty interneuronów oraz zwiększonej aktywacji mikrogleju. Dodatkowo wykazano, że menopauza chirurgiczna zwiększa podatność komórek zwojowych siatkówki na uszkodzenie neurodegeneracyjne.

Druga część pracy obejmowała ocenę działania neuroprotekcyjnego 17β-estradiolu, raloksyfenu oraz inhibitora szlaku FasR/FasL (KP 7-6) w modelach ostrego i przewlekłego niedokrwienia siatkówki. Wykazano, że zarówno modulacja receptorów estrogenowych, jak i hamowanie szlaku FasR/FasL wywierają działanie antyapoptotyczne, jednak największą skuteczność neuroprotekcyjną uzyskano przy zastosowaniu terapii skojarzonej. Połączenie raloksyfenu z antagonistą receptora Fas zwiększało przeżywalność komórek zwojowych siatkówki oraz pozwalało na zachowanie ich funkcji zarówno u zwierząt poddanych owariektomii, jak i w grupach kontrolnych.

Uzyskane wyniki wskazują, że niedobór estrogenów nasila podatność neuronów siatkówki na uszkodzenie niedokrwienne, natomiast jednoczesna modulacja sygnalizacji estrogenowej oraz szlaku apoptotycznego FasR/FasL może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną w chorobach neurodegeneracyjnych siatkówki związanych ze starzeniem i menopauzą.

Słowa kluczowe:

siatkówka, selektywne modulatory receptora estrogenowego, menopauza, estrogeny, niedokrwienie, apoptoza

9. Abstract

„Interaction between selective estrogen receptor modulators (SERM) and the FasR/FasL pathway in a model of retinal ischemia in ovariectomized rodents"

Estrogen deficiency during menopause is an important risk factor for the development of retinal neurodegenerative diseases, including optic neuropathies and ischemic retinal disorders. The aim of this dissertation was to evaluate the impact of estrogen deprivation induced by ovariectomy on the function and survival of retinal neurons, as well as to determine the neuroprotective effects of estrogen receptor modulators and inhibition of the FasR/FasL pathway in models of retinal ischemia.

The study was divided into two parts. In the first part, the effects of surgically induced menopause on retinal ganglion cell function and survival were assessed in an animal model of optic nerve crush injury. Electrophysiological and histological analyses demonstrated that estrogen deficiency leads to retinal dysfunction, loss of interneurons, and increased microglial activation. Furthermore, surgical menopause increased the susceptibility of retinal ganglion cells to neurodegenerative damage.

The second part of the study evaluated the neuroprotective effects of 17β-estradiol, raloxifene, and the FasR/FasL pathway inhibitor (KP 7-6) in acute and chronic models of retinal ischemia. It was shown that both estrogen receptor modulation and inhibition of the FasR/FasL pathway exert anti-apoptotic effects; however, the strongest neuroprotective efficacy was observed with combined therapy. The combination of raloxifene and the Fas receptor antagonist increased retinal ganglion cell survival and preserved their function both in ovariectomized and control animals.

The obtained results indicate that estrogen deficiency increases the vulnerability of retinal neurons to ischemic injury, whereas simultaneous modulation of estrogen signaling and the FasR/FasL apoptotic pathway may represent a promising therapeutic strategy for neurodegenerative retinal diseases associated with aging and menopause.

Key words:

retina, selective estrogen receptor modulators, menopause, estrogens, ischemia, apoptosis