

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Grażyna Palczewska

Zastosowanie metody wzbudzenia dwufotonowego do badania wczesnych zmian w siatkówce oka w odpowiedzi na stres środowiskowy, manipulacje genetyczne i farmakoterapię.

Promotor: Dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. nadzw.

Promotor pomocniczy: Dr inż. Monika Danielewska

Cel Pracy:

1. Opracowanie instrumentu i opartej na fluorescencji wzbudzonej dwufotonowo nieinwazyjnej metodologii służącej do charakterystyki zmian strukturalnych i funkcjonalnych w siatkówkach zdrowych oraz objętych chorobą.
2. Opracowanie opartej na dwufotonowej fluorescencji analizy sekwencji zdarzeń prowadzących do degeneracji siatkówki i określenie przebiegu w czasie procesów patologicznych w siatkówce po zaindukowaniu czynnika stresowego.
3. Charakterystyka wpływu farmaceutyków na cechy fluorescencji specyficzne dla wczesnych symptomów poprzedzających śmierć fotoreceptorów oraz identyfikacja składu patologicznych złogów powiązanych z degeneracją siatkówki w oparciu o obrazowanie za pomocą fluorescencji dwufotonowej.

Tezy pracy:

1. Zmiany strukturalne w siatkówce i nabłonku barwnikowym prowadzące do śmierci fotoreceptorów mogą być zidentyfikowane w przeciągu 24 h od wystąpienia czynnika stresującego.
2. Modyfikacje cyklu retinoidowego indukowane genetycznie bądź farmakologicznie mogą zapobiegać albo zaostrzać degenerację siatkówki.
3. Obrazowanie dwufotonowe w połączeniu ze spektroskopią wzbudzonej dwufotonowo fluorescencji może dostarczyć informacji o składnikach oraz pozwala określić spektralne atrybuty różnych typów złogów siatkówkowych.

Przeprowadzone prace badawcze i uzyskane wyniki:

W celu oceny przydatności mikroskopii dwufotonowej (TPF, ang. *two-photon fluorescence*) do monitorowania cyklu widzenia (retinoidowego) u ludzi, oraz zmian w składzie i koncentracji retinoidów w oczach ludzkich, zarejestrowano obrazy TPF fotoreceptorów oraz nabłonka barwnikowego siatkówki i zmierzono zawartość dwóch rodzajów retinoidów w oczach ssaków naczelnych [1]. Badania wykonane na ekstraktach pochodzących z ludzkich oczu za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC, ang. *High-Performance Liquid Chromatography*) wykazały, że zsumowane stężenie obu form izomerów, *cis* i *trans*, wynosiło ok. ~ 4 pmoli na mm^2 powierzchni siatkówki. Ten wynik jest zgodny z raportowaną wcześniej zawartością estrów retinyli w oczach myszy typu dzikiego (WT, ang. *wild type*) wynoszącą również ~ 4 pmoli na mm^2 powierzchni siatkówki. Ponadto średnia zawartość A2E (jeden z produktów kondensacji całkowicie-*trans*-retinalu) w oczach naczelnych była na poziomie $\sim 0,2$ pmoli na mm^2 powierzchni siatkówki, porównywalnie z wcześniej raportowanym $\sim 0,3$ pmoli na mm^2 powierzchni siatkówki u sześciomiesięcznych myszy typu WT. Powyższe obserwacje wykazują, że wzbudzenie dwufotonowe jest efektywne w obrazowaniu siatkówki nie tylko oczu mysich, ale również naczelnych i może umożliwić wczesną ocenę wpływu czynników genetycznych, środowiskowych oraz terapeutycznych na strukturę i funkcję siatkówki i jej nabłonka barwnikowego.

W celu zbadania nabłonka barwnikowego oraz siatkówki żywej myszy, skonstruowano instrument zawierający laser tytanowo-szafirowy zintegrowany z modułem kontrolującym dyspersję opóźnienia grupowego (GDD), jak również system optyki adaptywnej w wersji bez detektora frontu falowego [2]. W tym systemie wiązka światła laserowego, o froncie falowym modyfikowanym za pomocą zwierciadła deformowalnego, jest kierowana do mikroskopu epi-fluorescencyjnego wyposażonego w skanery galwanometryczne, własny - zaprojektowany specjalnie do systemu obiektyw o aperturze numerycznej 0,5 oraz fotopowielacz umieszczony przed skanerami w tzw. konfiguracji *non-descanned*. Początkowo obrazy nabłonka barwnikowego otrzymane poprzez rejestrację emisji endogennych fluoroforów były pozyskiwane z mysich oczu *ex vivo* umieszczonych w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Optymalizacja systemu polegająca na prekompensacji dyspersji spowodowała pięciokrotny wzrost średniego sygnału fluorescencji w porównaniu do przypadku bez kompensacji. Optymalizacja kształtu zwierciadła deformowalnego oparta na zmianach sygnału fluorescencji miała pozytywny wpływ zarówno na średnią fluorescencję, która wzrosła z 34,6 do 58,1 jednostek względnych, jak i na zakres dynamiczny

uzyskiwanych obrazów, rozumiany jako zakres wartości pikseli, który wzrósł ze 176 do 237 jednostek, przy czym 255 jednostek stanowi maksimum. Eksperymenty na żywych modelach mysich *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* z pigmentacją, które zostały poddane ekspozycji na silne białe światło wykazały, że fluoryzujące granule podlegające wzbudzeniu światłem o długości fali 850 nm były położone 3,0 mm poza rogówką. Granule te nie były wykryte u zwierząt, u których zastosowano retinylaminy przed ekspozycją na światło. Struktury przechowujące estry retinyłu u żywych myszy typu *Rpe65^{-/-}* były widoczne na rejestrowanych obrazach w położeniu tylnym za rogówką przy wzbudzeniu wiązką o długości fali 730 nm. Widma emisji fluorescencji wzbudzonej dwufotonowo wykazały obecność istotnie różnych fluoroforów w nabłonku barwnikowym myszy typu *Rpe65^{-/-}* oraz *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}*. Co więcej, żeby umożliwić obrazowanie dna oka również dla większych zwierząt, zaprojektowano specjalny obiektyw peryskopowy montowany na mikroskopie dwufotonowym z systemem optyki adaptywnej [3]. Projekt peryskopu wyeliminował konieczność używania grubej, spłaszczającej oko soczewki kontaktowej. Obrazy nabłonka barwnikowego oraz jego subkomórkowych organelli - retinozomów - u myszy typów WT oraz *Rpe65^{-/-}* uzyskane przy użyciu tego peryskopu charakteryzują się większym polem widzenia niż pozyskane prostszym obiektywem o aperturze numerycznej 0,5 [3].

Obrazowanie dwufotonowe pozwoliło zidentyfikować różne cechy fluorescencji nabłonka barwnikowego myszy z podwójnym nokautem (DKO, ang. *double knockout*) genu kodującego RDH8 – główny enzym odpowiedzialny za redukcję całkowicie *-trans*-retinalu (atRAL) do całkowicie *-trans*-retinolu oraz transportera ABCA4, który przenosi atRAL z wnętrza na zewnątrz membranowego dysku fotoreceptorów [4]. Widma emisji wzbudzonej dwufotonowo nabłonka barwnikowego myszy typu WT oraz DKO znacząco się różniły. Po wzbudzeniu za pomocą wiązki światła o długości fali 730 nm, emisja z nabłonka barwnikowego myszy WT osiągnęła maksimum w okolicach 480 nm, co koreluje z widmem wzbudzonego dwufotonowo całkowicie *-trans*-retinolu i/lub całkowicie *-trans* estrów retinyłu, podczas gdy siatkówka myszy DKO wykazała maksimum emisji dla 565 nm, co jest oznaką nadmiernej akumulacji produktów kondensacji retinoidów. Pod wpływem wzbudzenia wiązką światła o długości fali 910 nm maksimum emisji przesunęło się w stronę dłuższych długości fali u obu typów myszy wskazując, że mamy do czynienia z mieszaniną różnych fluoroforów. Ponadto widma myszy WT i DKO nałożyły się wykazując, że wzbudzenie światłem o długości fali 910 nm powoduje głównie fluorescencję produktów kondensacji, która również dominuje u dorosłych myszy typu WT. Ponadto stosunek fluorescencji wzbudzonej za pomocą światła o długości fali 910 nm do emitowanej pod wpływem wzbudzenia światłem o

długości fali 730 nm systematycznie rósł wraz z wiekiem myszy typu WT i był ponad dwa razy większy u odpowiednich wiekowo myszy typu DKO. Wyniki obrazowania, potwierdzone zostały dodatkowo pomiarami składu retinoidów przy użyciu HPLC w oczach myszy typu WT, z podwójnym nokautem oraz *Rpe65*^{-/-}. Skład retinoidów był zgodny z danymi spektroskopowymi uzyskanymi pod wpływem wzbudzenia dwufotonowego [4].

Zidentyfikowanie procesów zachodzących pod wpływem patologicznej ekspozycji na światło jest ważne dla zrozumienia mechanizmów prowadzących do degeneracji siatkówki, a co za tym idzie, dla rozwoju terapii chorób siatkówki m.in. takich jak choroba Stargardta oraz zwyrodnienie plamki żółtej (AMD, z ang. *Age-related Macular Degeneration*) [5]. W celu określenia sekwencji procesów degeneracyjnych siatkówki zainicjowanych przez ekspozycję na jaskrawe światło (10 000 lux) użyto mysich modeli wykazujących wiele cech zbieżnych z ludzką chorobą Stargardta oraz AMD. Obrazowanie dwufotonowe TPF, opracowane w ramach pracy doktorskiej, umożliwiło odkrycie, że pręciki (fotoreceptory) są pierwotnym ogniskiem degeneracji siatkówki wywołanej światłem. Pierwsze zmiany degeneracyjne zostały zaobserwowane już po 24 godzinach od ekspozycji. Zaobserwowano utworzenie fluoryzujących produktów metabolizmu retinoidów wewnątrz pręcików, prawie trzykrotne powiększenie pręcików, wtórne wniknięcie komórek mikrogleju/makrofagów w celu usunięcia zniszczonych fotoreceptorów oraz późniejszą formację długofalowo fluoryzujących granulek w nabłonku barwnikowym siatkówki. Wymienione zmiany powiązane były z utratą funkcji widzenia, co zbadano za pomocą elektretinografii [5].

Mikroskopia dwufotonowej fluorescencji TPF po ekspozycji na jaskrawe światło została zastosowana do oceny ochronnego wpływu na siatkówkę mysich oczu następujących medykamentów: apocyniny, retinylaminy, emixustatu oraz MB-002 [5, 6]. Apocynina jest inhibitorem oksydazy NADPH. Retinylamina, emixustat oraz MB-002 mają podobną strukturę i są inhibitorami RPE65, jednakże MB-002 nie posiada grupy aminowej, która jest krytyczna dla związania nadmiaru całkowicie-*trans*-retinalu. W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że apocynina, retinylamina i emixustat, chroniły fotoreceptory, podczas gdy ochrona przez MB-002 była jedynie częściowa. Ponadto w celu potwierdzenia, że różnice w ochronnych właściwościach emixustatu w porównaniu do MB-002 przed spowodowaną światłem degeneracją siatkówki nie są ograniczone do myszy nieposiadających genów kodujących ABCA4 oraz RDH8. Zbadano wpływ tych związków na ochronę siatkówki u myszy typu BALB/c. Uzyskane wyniki potwierdziły, że emixustat całkowicie chronił siatkówkę tych myszy przed niszczącym wpływem światła, podczas gdy ochrona

powodowana przez MB-002 była minimalna. Pomimo, że ekspozycja na światło myszy BALB/c była dwa razy większa (zarówno pod względem natężenia, jak i czasu trwania) w porównaniu do ekspozycji myszy *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}*, liczba uszkodzonych fotoreceptorów była mniejsza u myszy BALB/c. Eksperymenty na myszach z farmakologicznie stłumionym cyklem widzenia pokazują, że uszkodzenie siatkówki spowodowane światłem u tych gatunków jest spowodowane całkowicie-*trans*-retinalem uwalnianym z pigmentów wzrokowych po inicjującym proces widzenia fotobleachingu, a nie od pigmentów wzrokowych regenerowanych w czasie trwania ekspozycji na światło.

Osiągnięcia doktoranta

1. Badania wykonane przy użyciu technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej i mikroskopii dwufotonowej wykazały, że poziomy zsumowanych stężeń retinoidów w oczach myszy i ssaków naczelnych są porównywalne i umożliwiają obrazowanie przy użyciu wzbudzenia dwufotonowego [1].
2. Zbudowano instrument do obrazowania nabłonka barwnikowego oraz siatkówki żywej myszy poprzez rejestrację emisji endogennych fluoroforów. Instrument zawierał: system optyki adaptacyjnej, laser tytanowo-szafirowy zintegrowany z modułem kontrolującym dyspersję opóźnienia grupowego oraz zaprojektowane specjalnie na potrzeby eksperymentów obiektywy do obrazowania dna oka myszy i większych zwierząt [2] i [3].
3. Skonstruowany instrument oparty na efekcie wzbudzenia dwufotonowego, umożliwił charakterystykę spektralną i uzyskanie obrazów nabłonka barwnikowego u żywych myszy typów *Rpe65^{-/-}* i *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* [2] i [3].
4. Obrazowanie przy wykorzystaniu wzbudzenia dwufotonowego pozwoliło zidentyfikować różne cechy fluorescencji nabłonka barwnikowego myszy typu dzikiego, *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* oraz *Rpe65^{-/-}* [4].
5. Wyniki obrazowania dwufotonowego, potwierdzone poprzez pomiary składu retinoidów przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazały, że zawartość produktów kondensacji cyklu retinoidowego w oczach myszy typu dzikiego wzrasta z wiekiem myszy. Skład retinoidów u myszy typu dzikiego, *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* oraz *Rpe65^{-/-}* był zgodny z danymi spektroskopowymi uzyskanymi pod wpływem wzbudzenia dwufotonowego [4].
6. Stosując opracowaną w ramach pracy doktorskiej technikę obrazowania dwufotonowego wykazano, że to pręciki (fotoreceptory), a nie nabłonek barwnikowy

siatkówki, są pierwotnym ogniskiem degeneracji siatkówki wywołanej silnym światłem [5].

7. Zidentyfikowano sekwencję procesów zachodzących pod wpływem patologicznej ekspozycji na światło. Formacja długofalowo fluoryzujących granulek w nabłonku barwnikowym siatkówki była poprzedzona syntezą fluoryzujących produktów metabolizmu retinoidów wewnątrz pręcików. Jednocześnie zaobserwowano trzykrotne powiększenie średnicy pręcików, oraz wtórne wniknięcie komórek mikrogleju/makrofagów w celu usunięcia zniszczonych fotoreceptorów [5].

8. Wykazano, że wyżej wymienione zmiany strukturalne powiązane były z utratą funkcji widzenia, co zostało scharakteryzowane za pomocą elektroretinografii [5].

9. Używając techniki obrazowania dwufotonowego wykazano, że apocynina, retinylamina i emixustat, chroniły fotoreceptory przed spowodowaną światłem degeneracją siatkówki, podczas gdy ochrona przez MB-002 była jedynie częściowa. Powyższe wyniki były kluczowe dla potwierdzenia, że wiązanie nadmiaru całkowicie-*trans*-retinalu przez grupę aminową jest krytyczne dla ochrony fotoreceptorów [5] i [6].

Wnioski

W przebiegu prac badawczych skonstruowano system do obrazowania dwufotonowego (TPF) siatkówki oraz została opracowana metoda do studiowania biochemicznych procesów zaburzonych genetycznymi nieprawidłowościami, stresem środowiskowym oraz leczeniem farmaceutycznym. Charakterystyka składu retinoidów wykonana za pomocą obrazowania TPF oczu ssaków naczelnych oraz mysich wykazała, że technika ta jest efektywna dla obrazowania siatkówki nie tylko u myszy, ale również może być zastosowana u ludzi. Dalsze badania przeprowadzone z użyciem systemu TPF wykazały obecność i różnice w składzie dwóch różnych typów fluoroforów, a dokładnie form pośrednich oraz produktów kondensacji cyklu widzenia u myszy w różnym wieku i o różnym podłożu genetycznym. Uzyskane wyniki potwierdzono poprzez analityczne pomiary zawartości retinoidów. Ponadto nowa technika TPF umożliwiła spektralną charakterystykę oraz uzyskanie pierwszych obrazów fluoroforów występujących w cyklu widzenia w nabłonku barwnikowym żywych, pigmentowanych ssaków. Zastosowanie wzbudzenia dwufotonowego do studiowania przebiegu czasowego zmian strukturalnych siatkówki po ekspozycji na silne światło pozwoliło odkryć, że pręciki są pierwotnym ogniskiem uszkodzenia siatkówki. Pierwsze zmiany były zaobserwowane już po 24-godzinnej ekspozycji na jasne światło. Ostatecznie wykazano, że można zapobiec uszkodzeniu siatkówki poprzez zastosowanie środków farmakologicznych: apocyniny,

emixustatu, retinylaminy oraz, częściowo MB-002. Apocynina, retinylamina i emixustat całkowicie chroniły fotoreceptory, podczas gdy ochrona przez MB-002 była jedynie częściowa.

Nowa technika TPF, opracowana w ramach pracy doktorskiej, umożliwia badanie najwcześniejszych zmian w siatkówce i nabłonku barwnikowym, a także pozwala wykryć wczesne odstępstwa od normy w strukturze siatkówki oraz w wydajności biochemicznych ścieżek fundamentalnych dla zachowania widzenia. Wiedza ta jest kluczowa dla rozwoju związków będących kandydatami na leki oraz celowych metod leczenia w chorobach siatkówki.

Prace stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora:

1. **Palczewska G**, Golczak M, Williams DR, Hunter JJ, Palczewski K.; “Endogenous fluorophores enable two-photon imaging of the primate eye“. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2014 Jun 26;55(7):4438-47.
IF = 3.404, MNiSW = 40, wykaz A, pozycja 5321, nr ISSN: 0146-0404
2. **Palczewska G**, Dong Z, Golczak M, Hunter JJ, Williams DR, Alexander NS, Palczewski K.; “Noninvasive two-photon microscopy imaging of mouse retina and retinal pigment epithelium through the pupil of the eye“. *Nature Medicine*, 2014 Jul;20(7):785-9.
IF = 27.363, MNiSW = 50, wykaz A, pozycja 8267, nr ISSN: 1078-8956
3. Stremplewski, P., K. Komar, K. Palczewski, M. Wojtkowski, **G. Palczewska**. “A periscope for noninvasive two-photon imaging of murine retina in vivo“. *Biomedical Optics Express*, 2015 Aug 13;6(9):3352-61
IF = 3.648, MNiSW = 40, wykaz A, pozycja 1444, nr ISSN: 2156-7085
4. **Palczewska G**, Maeda T, Imanishi Y, Sun W, Chen Y, Williams DR, Piston DW, Maeda A, Palczewski K.; “Noninvasive multiphoton fluorescence microscopy resolves retinol and retinal condensation products in mouse eyes“. *Nature Medicine*; 2010 Dec;16(12):1444-9.
IF = 27.363, MNiSW = 50, wykaz A, pozycja 8267, nr ISSN: 1078-8956
5. Maeda A*, **Palczewska G***, Golczak M, Kohno H, Dong Z, Maeda T, Palczewski K.; “Two-photon microscopy reveals early rod photoreceptor cell damage in light-exposed mutant mice“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014 Apr 8;111(14):E1428-37.
IF = 9.674, MNiSW = 45, wykaz A, pozycja 9267, nr ISSN: 0027-8424
6. Zhang J, Kiser PD, Badiie M, **Palczewska G**, Dong Z, Golczak M, Tochtrop GP, Palczewski K.; “Molecular pharmacodynamics of emixustat in protection against retinal degeneration“. *The Journal of Clinical Investigation*, 2015 Jul 1;125(7):2781-94.
IF = 13.261, MNiSW = 50, wykaz A, pozycja 5812, nr ISSN: 0021-9738

*A.M. i G.P. autorzy mają równy wkład w publikację