

(23)

Udział tlenu azotu w procesach fizjologicznych i patologicznych zachodzących w oku

The role of nitric oxide in physiology and pathogenesis of ocular diseases

Katarzyna Komaszko^{1,2}, Renata Zalewska¹, Zofia Mariak¹, Róża Julia Wiśniewska²

¹ Z Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zofia Mariak

² Z Zakładu Farmakologii Akademii Medycznej w Białymstoku
P.o. kierownik: dr hab. Róża Julia Wiśniewska

Summary:

Nitric oxide (NO) is a gas with diverse biological activities produced from arginine by nitric oxide synthetase (NOS). The loss of retinal ganglion cells is a hallmark of many ophthalmic diseases including glaucoma, retinal ischemia due to central artery occlusion and anterior ischemic optic neuropathy. It may well be significant in optic neuritis, optic nerve, trauma and AIDS. NO appears to be involved in the regulation of intraocular pressure, in the modulation of ocular blood flow and in apoptosis. This article gives a short and simplified overview of the biochemistry of NO and its role in physiology and pathogenesis of ocular diseases.

Słowa kluczowe:

tlenu azotu, glutaminian, komórka zwojowa siatkówki, neuroprotekcja.

Key words:

nitric oxide, glutamate, retinal ganglion cell, neuroprotection.

Lokalizacja i funkcja poszczególnych syntaz tlenu azotu w oku

Aktywność enzymatyczną NOS badano w siatkówce i w izolowanych komórkach zwojowych, a ich właściwości wykazywały daleko idące podobieństwo z analogicznymi formami enzymów, badanych uprzednio w mózgu (nNOS, NOS-1). Badania immunohistochemiczne potwierdziły obecność NOS w komórkach warstwy jądrowej wewnętrznej, amakrynowych oraz fotoreceptorach siatkówki. Ostatnio udało się zidentyfikować obecność NOS-1 u niższych kręgowców oraz sklonować geny występujące w ludzkiej siatkówce. mRNA dla NOS-3 znaleziono w komórkach endotelium naczyń siatkówki oraz na zakończeniach włókien nerwowych zaopatrujących siatkówkowe naczynia krwionośne. We włóknach mięśnia rzęskowego i drodze odpływu cieczy wodnistej (utkanie beleczkowe, kanał Schlemma), w prawidłowo funkcjonujących gałkach ocznych wykazano znaczny poziom NADPH-diaforazy. Jest to pośredni marker produkcji NO, bogaty w syntazy NO (głównie NOS-3).

W siatkówce komórki Mullera uwalniają indukowaną formę NOS po kontakcie z endotoksynami bakteryjnymi i cytokinami. W badaniach *in vivo*, przeprowadzonych u szczurów, wykazano obecność mRNA dla NOS-2 w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki oraz wzmożoną aktywność tego enzymu, indukowaną synergistycznym działaniem INT- γ (interferon- γ) i LPS (lipopolisacharyd bakteryjny). Lokalizację i potencjalną rolę NO, produkowanego przez poszczególne izoenzymy NOS zestawiono w tabelach I i II (2).

Rola tlenu azotu w przednim odcinku oka

W literaturze jak dotąd brak jest danych na temat obecności i roli NO w obrębie soczewki i rogówki. Rola NO była badana w alergicznym zapaleniu spojówek. NO, produkowany w ostrej

fazie stanu zapalnego przez NOS-2 w komórkach endotelium, wywołuje rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększa przepływ krwi i ich przepuszczalność. Konsekwencją tych procesów jest rozwój obrzęku zapalnego (2). Tlenek azotu i endotelina, produkowane przez komórki śródbłonka naczyń przedniego odcinka oka biorą udział w procesach produkcji cieczy wodnistej i mechanizmach jej odpływu, a tym samym wpływają na regulację ciśnienia wewnątrzgałkowego. Istnieją dowody na to, że utkanie beleczkowe i jego elementy kurczące ulegają relaksacji pod wpływem NO, co w prosty sposób przekłada się na bezpośredni udział NO w regulacji ciśnienia wewnątrzgałkowego (6). U pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta (JPOK) stężenie NO w cieczy wodnistej było wyraźnie niższe niż u pacjentów z zaćmą i jaskrą pierwotną zamkniętego kąta (7). Natomiast u pacjentów po ostrym napadzie jaskry poziom NO w cieczy wodnistej był znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej, którą stanowili chorzy operowani z powodu zaćmy, przy czym średni poziom NO w ciele szklistym był wyższy niż w komorze przedniej (3). Powyższe dane jednoznacznie potwierdzają udział NO w regulacji mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowego poziomu ciśnienia wewnątrzgałkowego na poziomie przedniego odcinka oka. Przyczyny i rzeczywiste znaczenie obniżonego stężenia NO w cieczy wodnistej w patogenezie JPOK, jak również wzrostu jego stężenia w cieczy wodnistej oczu po ostrym napadzie jaskry pozostają nieznane i wymagają dalszych badań. Obecnie nie można jednoznacznie odpowiedzieć, czy wahania stężenia NO w badanych płynach (ciecz wodnista, ciało szkliste) są przyczyną choroby, czy też skutkiem.

Rola tlenu azotu w fizjologii i patofizjologii siatkówki

Wiele eksperymentów dowodzi, że NO odgrywa rolę neuromodulatora transmisji synaptycznej oraz zjawiska fototransduk-

Struktura anatomiczna Anatomical structure	Funkcja Function
rogówka cornea	nieznana unknown
spojówka conjunctiva	rozszerzenie i przepuszczalność naczyń vasodilatation and vascular permeability
nabłonek soczewki lens epithelium	nieznana unknown
śródbłonek naczyń vascular endothelium	rozszerzenie naczyń vasodilatation
ciało rzęskowe ciliary body	regulacja ciśnienia wewnątrzgałkowego intraocular pressure regulation
kąt przesączania filtration angle	relaksacja relaxation
neuronalna część siatkówki: neural retina:	neurotransmisja neurotransmission
komórki amakrynowe amacrine cells	neurotransmisja neurotransmission
komórki horyzontalne horizontal cells	neurotransmisja neurotransmission
komórki zwojowe ganglion cells	ekscytotoksyczność excitotoxicity
fotoreceptory photoreceptors	neurotransmisja, fototransdukcja neurotransmission, visual transduction

Tab. I. Lokalizacja i potencjalna rola NO produkowanego przez nNOS i eNOS w oku (według F. Becqueta – zmodyfikowano i uzupełniono).

Tab. I. Localization and potential roles of nitric oxide produced by nNOS and eNOS in the eye (modification after F. Becquet).

cji. Odbywa się to przez modulację blokowanego przez cGMP przewodnictwa w komórkach zwojowych, aktywację zależnego od cGMP przekąźnictwa w komórkach dwubiegunowych i modyfikację przekąźnictwa elektrycznego w komórkach horyzontalnych. NO może również modulować przewodnictwo impulsów w fotoreceptorach poprzez wpływ na kanały jonowe (8).

Wiadomo, że prawie wszystkie komórki organizmu wykazują zdolność do wejścia w proces zaprogramowanej śmierci zwanej apoptozą. Stanowi ona alternatywny w stosunku do martwicy model eliminacji komórki pod wpływem bodźca indukującego pochodzącego z wewnątrz. Zjawiska zachodzące podczas apoptozy mają charakter jednorazowy, ostateczny i nieodwracalny, ale pozostają pod stałą kontrolą genomu. I tak w wyniku genetycznie zaprogramowanego procesu prowadzącego do obumierania komórek bez wywoływania objawów stanu zapalnego każdy człowiek traci bezpowrotnie w warunkach fizjologicznych około 10 tys. komórek zwojowych siatkówki rocznie. Przyjmuje się również udział procesu apoptozy w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, w tym również w neuropatii jaskrowej nerwu wzrokowego (6,13,16).

Nadmierna aktywacja jonotropowego receptora glutaminergicznego typu NMDA przez glutaminian lub inne endogenne aminokwasy pobudzające nasila dokomórkowy prąd Ca^{2+} , a następnie zależną od układu Ca^{2+} – kalmodulina neuronalną syntazę tlenu azotu (nNOS) do produkcji dużych ilości tlenu azotu i wolnych rodników nadtlenkowych (O_2^-) w mitochondriach. Tlenek azotu w reakcji z anionem nadtlenkowym tworzy toksyczny peroksynitrat ($OOONO^-$), który stanowi biochemiczny

Tkanka Tissue	Funkcja Function
tęczówka i ciało rzęskowe iris and ciliary body	prozapalna?, cytotosycyczna? proinflammatory? cytotoxicity?
siatkówka retina	prozapalna?, cytotosycyczna?, antywirusowa? proinflammatory? cytotoxicity? antiviral?
astrocyty astrocyte	neurotoksyczność w stosunku do aksonów komórek zwojowych neurotoxicity on ganglion cells
komórki Mullera Muller cells	prozapalna?, modulacja procesów immunologicznych? proinflammatory? immune modulation?
komórki nabłonka barwnikowego retinal pigmented epithelial cells	antyfagocytna?, antyproliferacyjna i prozapalna? modulacja procesów immunologicznych? antiphagocytic? antiproliferative? proinflammatory? immune modulation?
naczynia (perycyty, endotelium) vessels (pericytes, endo- thelial cells)	rozszerzenie vasodilatation

Tab. II. Lokalizacja i potencjalna rola NO produkowanego przez iNOS w oku (według F. Becqueta – zmodyfikowano i uzupełniono).

Tab. II. Localization and potential role of nitric oxide produced by iNOS in the eye (modification after F. Becquet).

„zapłon” do uruchomienia kaskady apoptotycznej komórki zwojowej siatkówki, co doprowadza do jej wyeliminowania (3,6). Peroksynitrat to wysoce reaktywny anion, który wykazuje zdolność do nieodwracalnego uszkodzenia białek enzymatycznych i strukturalnych, oksydacji lipidów błonowych i zapoczątkowania procesów prowadzących do neurodegeneracji.

Indukowana syntaza tlenu azotu (iNOS, NOS-2) jest obecna wyłącznie w głowie nerwu wzrokowego oczu jaskrowych. Nie potwierdzono jej obecności w komórkach zwojowych nerwu wzrokowego zdrowych osobników (14). U pacjentów z jaskrą otwartego kąta przesączania NOS-2 została wykazana w aktywnych astrocytach regionu przedbłazkowego i blaszkowego głowy nerwu wzrokowego. Neufeld i wsp. wykazali podwyższony poziom NOS-2 i $OOONO^-$ w komórkach nerwu II pacjentów z jaskrą (12). Badacze ci wykazali ponadto obecność iNOS w głowie nerwu wzrokowego szczurów doświadczalnych z przewlekłym umiarkowanym podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym. Zwierzęta, którym przez 6 miesięcy podawano aminoguanidynę – specyficzny inhibitor iNOS, w porównaniu z grupą kontrolną miały całkowicie zabezpieczone przed uszkodzeniem apoptotycznym komórki zwojowe siatkówki (14).

Tlenek azotu i endotelina wpływają na regulację ciśnienia tętniczego i kształtowanie oporów w przepływie krwi, m.in. w siatkówce i głowie nerwu wzrokowego. Liczne obserwacje dotyczące systemowego podawania nitratów, prezentują nieraz skrajnie odmienne dane na temat udziału tych leków w regulacji ciśnienia wewnątrzgałkowego (18). Część danych sugeruje możliwość stosowania leków rozszerzających naczynia krwionośne w przebiegu

jaskry, gdyż w przeciwieństwie do ocznych leków hipotensyjnych pozbawione są właściwości naczyniokurczących i potencjalnie powodują wzrost siatkówkowego przepływu krwi (6). Częściej jednak efekt ich działania uzależniony jest bezpośrednio od ogólnoustrojowego działania naczyniorozszerzającego NO i wpływu na lokalny przepływ krwi w tkankach oka. Przewlekła terapia nitrata-
mi podawanymi ogólnoustrojowo dzięki zdolności NO do obniżania wrażliwości receptorów NMDA na glutaminian może chronić komórki zwojowe przed ekscytotoksycznością. Rola tlenu azotu w patomechanizmie neuropatii jaskrowej jest co najmniej podwójna. Z jednej strony NO, powodując relaksację elementów kąta przesączania, ułatwia odpływ cieczy wodnistej oraz działa naczyniorozszerzająco, regulując przepływ krwi w siatkówce i głowie nerwu wzrokowego, z drugiej zaś strony nadmierna aktywacja syntaz nNOS i iNOS doprowadza do intensyfikacji apoptozy komórek zwojowych siatkówki (11).

Konsekwencje podwyższonego poziomu NO w siatkówce u osób z cukrzycą mogą być dwojakie: neurotoksyczność i angiogeneza. Ekspresja iNOS *in vivo* została wykazana w siatkówkach osób chorych na cukrzycę. Wyniki badań sugerują, że wysoki poziom produkcji NO może być związany z patogenezą retinopatii cukrzycowej, a inhibitory iNOS (np. aminoguanidyna) mogą być użyteczne w prewencji mikronaczyniowych powikłań cukrzycy (4).

Osobny problem stanowią procesy zapalne, w których przebiegu powstający w dużych ilościach NO nasila objawy procesu zapalnego. Parks i wsp. wykazali istotną redukcję nasilenia odczynu zapalnego po podaniu L-NAME, sugerującą aktywność NO jako czynnika prozapalnego (15). Świadczy o tym również znacznie podwyższony poziom nitratów w cieczy wodnistej w okresie największego nasilenia objawów chorobowych (5).

Również prace polskich badaczy potwierdziły korzystny wpływ wspomnianego inhibitora syntazy NO na ciśnienie wewnątrzgałkowe u szczurów w przebiegu zapalenia błony naczyniowej, indukowanego endotoksyną. Szymaniec i wsp. wykazali w badaniach na zwierzętach, że u szczurów, którym dootrzewnowo podano L-NAME, ciśnienie wewnątrzgałkowe było niższe w porównaniu z grupą kontrolną, a podanie L-NAME powodowało zmniejszenie odczynu zapalnego, indukowanego podaniem LPS (17). Skuteczność stosowania inhibitorów NO w zwierzęcym modelu *uveitis* sugeruje, że redukcja syntezy i aktywności NO dają niewątpliwie korzyści, jeśli chodzi o przebieg choroby i rokowanie, jak również stwarzają możliwości terapeutyczne w przyszłości.

Poznanie roli NO i jego udziału w procesach fizjologicznych i patologicznych przebiegających w neuronach wpłynęło w sposób istotny na myślenie o patogenezie wielu chorób, w tym również neurodegeneracyjnych. Powszechnie wiadomo, że niejednokrotnie samo obniżanie ciśnienia wewnątrzgałkowego w jaskrze nie daje oczekiwanych rezultatów terapeutycznych, nie hamuje postępu choroby. Dlatego też coraz częściej postuluje się wprowadzanie szeroko pojmowanej terapii neuroprotektoryjnej, mającej na celu ochronę nieuszkodzonych neuronów przed ich wtórną degeneracją (9,10,11).

Neuroprotekcja, początkowo proponowana w terapii chorób OUN, coraz częściej stosowana jest jako dodatkowa możliwość w leczeniu neuropatii jaskrowej nerwu wzrokowego oraz innych rodzajach neuropatii tego nerwu. Dotychczas proponowane strategie neuroprotekcji obejmują blokowanie reakcji ekscytotoksyczności w siatkówce oraz podawanie czynników neurotropowych

(np. BDNF – brain derived neurotrophic factors), które zwiększają przeżywalność komórek zwojowych po doświadczalnej aksonotomii czy urazowym uszkodzeniu narządu wzroku. Brana też bywa pod uwagę aktywacja receptorów α_2 adrenergicznych, które zwiększają oporność na czynniki uszkodzające. Stosowana komercyjnie w terapii jaskry brimonidyna, w zwierzęcym modelu ostrej ischemii siatkówki podawana przed wywołaniem uszkodzenia, powodowała zdecydowanie mniejsze uszkodzenie komórek zwojowych, obniżając jednocześnie poziom glutaminianu w cieple szklistym (1). Wykorzystanie inhibitorów NOS w roli czynników neuroprotektoryjnych jest ostatnio coraz częściej rozważaną metodą terapii, należy jednak pamiętać, że NO jest jednym z wielu elementów składowych w procesach prowadzących do uszkodzenia komórki, szczególnie gdy występuje w zbyt dużych ilościach. Związki farmakologicznie czynne, będące inhibitorami NOS-1 i/ lub NOS-2, ale zachowujące aktywność NOS-3, mogą stać się użyteczne w leczeniu degeneracji nerwu wzrokowego, stanów zapalnych czy też angiopatii cukrzycowej.

Intensywne badania trwają również nad rolą i znaczeniem blokerów receptorów NMDA. MK-801 (dizocilpina) jest potencjalnym, niekompetytywnym blokerem receptorów NMDA, którego aktywność neuroprotektoryjną w stosunku do komórek siatkówki wykazano w wielu modelach jaskrowego uszkodzenia nerwu wzrokowego. Blokując utratę komórek i apoptozę po doszklitkowym podaniu NMDA u szczurów (1). Memantyna natomiast wykazała protekcyjne działanie w obrębie komórek siatkówki u szczurów poddanych zjawisku ischemia – reperfuzy. Okazała się również efektywna w badaniach klinicznych (głównie w chorobie Alzheimer), nie powodując toksycznych efektów ubocznych, takich, jakie wywołują inni antagoniści NMDA. Obecnie memantyna poddawana jest trzeciej fazie badań klinicznych w terapii jaskry.

Biorąc powyższe pod uwagę, rola NO, gazu o stosunkowo prostej budowie chemicznej, lecz olbrzymiej reaktywności, w regulowaniu mechanizmów fizjologicznych i patologicznych przebiegających w tkankach narządu wzroku wydaje się niemożliwa do pominięcia. Jednocześnie udział NO w regulacji miejscowego przepływu krwi, napięcia utkania beleczkowego, przekątnictwa nerwowego i wewnątrzkomórkowego oraz w procesie apoptozy stwarza potencjalne możliwości modulowania przebiegu wymienionych zjawisk. Poznanie kolejnych, nieznanych dotąd patomechanizmów przyczyniających się do powstania różnych chorób odsłania nowe możliwości ich terapii. Jednak jak na razie leczenie wszystkich rodzajów jaskry skupia się głównie na obniżaniu ciśnienia wewnątrzgałkowego – głównego udowodnionego czynnika ryzyka postępu choroby. Nie dysponujemy bowiem odpowiednio dużymi przeprowadzonymi na ludziach badaniami potwierdzającymi skuteczność neuroprotekcji. Przyszłość przyniesie być może nowe możliwości terapeutyczne oparte na ochronie jeszcze nieuszkodzonych komórek lub nawet tych częściowo dotkniętych procesami patologicznymi.

PIŚMIENNICTWO:

1. Barkana Y., Belkin M.: *Neuroprotection in ophthalmology*. Brain Res. Bull., 2004, 62, 447-453.
2. Becquet F., Courtois Y., Goureau O.: *Nitric oxide in the eye: Multifaceted roles and diverse outcomes*. Surv. Ophthalmol., 1997, Vol. 42(1), 71-82.

3. Chmielewska K.: *Współczesne koncepcje patogenyzy jaskrowej neuropatii nerwu wzrokowego*. Klin. Oczna, 2003, 3-4, 211-216.
4. El-Asrar A.M., Desmet S., Meersschaert A., Dralands L., Missothen S., Geboes K.: *Expression of inducible isoform of nitric oxide in the retinas of human subjects with diabetes melitus*. Am. J. Ophthalmol., 2001, Vol. 132, No. 4, 551-556.
5. Gaureau O., Bellot J., Thillaye B., et al.: *Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis: reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase*. J. Immunol., 1995, 154, 6518-6523.
6. Haefliger I.O., Dettmann E., Liu r., Meyer P., Prunte Ch., Messerli J., Flammer J.: *Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma*. Surv. Ophthalmol., 1999, Vol. 43, Suppl. 1, S51-S58.
7. Kosior-Jarecka E., Gerkowicz M., Latalaska M., Koziol-Montewka M., Szczepaniak A.: *Poziom tlenu azotu w cieczy wodnistej u pacjentów z jaskrą*. Klin. Oczna, Suppl. 2004, 1-2, 158-159.
8. Kureny D.E., Moroz L.L., Turner r.W. et al.: *Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide*. Neuron., 1994, 13, 315-324.
9. Levin L.A.: *Relevance of the site of injury of glaucoma to neuroprotective strategies*. Surv. Ophthalmol., 2001, Vol. 45, Suppl. 3, S 243-S 249.
10. Levin L.A.: *Retinal ganglion cells and neuroprotection in glaucoma*. Surv. Ophthalmol., 2003, Vol. 48, Suppl. 1, S 21-S 24.
11. Naskar r., Dreyer E.: *New Horizons in neuroprotection*. Surv. Ophthalmol., 2001, Vol. 45, Suppl. 3, S 250-S255.
12. Neufeld A.H., Hernandez M.R., Gonzalez M.: *Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head*. Arch. Ophthalmol., 1997, 115, 497-503.
13. Neufeld A.H.: *Nitric oxide: A potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma*. Surv. Ophthalmol., 1999, Vol. 43, Suppl. 1, S 129-S 135.
14. Neufeld A.: *Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma*. Brain Res. Bull., 2004, 62, 455-459.
15. Parks D.J., Cheung M.K., Chan C.C., Roberge F.G.: *The role of nitric oxide in uveitis*. Arch. Ophthalmol., 1994, 112, 544-546.
16. Sucher N.J., Lipton S.A., Drayer E.B.: *Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells*. Vision Res., 1997, Vol. 37, No. 24, 3483-3493.
17. Szymaniec S., Misiuk-Hojto M.: *Wpływ inhibitora syntazy tlenu azotu (L-NAME) na ciśnienie śródgałkowe u szczurów w przebiegu zapalenia błony naczyniowej indukowanego endotoksyną*. Klin. Oczna, 2002, 2, 87-88.
18. Zukawski D., Vorwerk C.K., Gorla M., Kanellopoulos A.J., Chaturvedi N., Grosskreutz C.L., Lipton S.A., Dreyer E.B.: *Nitrate therapy may retard glaucomatous optic neuropathy, perhaps through modulation of glutamate receptors*. Vision Res., 1998, 38, 1489-1494.

Praca wpłynęła do Redakcji 5.02.2005 r. (644).
Zakwalifikowano do druku 18.01.2006 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

**lek. med. Katarzyna Komasyło
Klinika Okulistyki AMB
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok**