

Praca pogładowa

Review

ANNA MACH^{1,3}, DAGMARA MIROWSKA-GUZEL^{1,2}, ANDRZEJ CZŁONKOWSKI²,
ANNA CZŁONKOWSKA^{1,2}

Czynniki neurotroficzne w chorobach neurodegeneracyjnych

Neurotrophic factors in neurodegenerative diseases

¹ II Klinika Neurologiczna Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

² Katedra i Zakład Farmakologii Akademii Medycznej w Warszawie

³ Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Centralnego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Warszawie

STRESZCZENIE

Czynniki neurotroficzne (NTFs) mają unikalną zdolność utrzymania prawidłowej budowy i funkcji neuronu, oraz stymulacji wzrostu neurytów w warunkach fizjologicznych, a także w przypadku uszkodzenia układu nerwowego. Badania prowadzone w ostatnim dwudziestolecu dostarczyły dowodów potwierdzających właściwości terapeutyczne NTFs. Mimo to, zastosowanie NTFs w leczeniu nadal wiąże się z licznymi ograniczeniami. Głównymi przeszkodami jest brak zdolności pokonania bariery krew- mózg oraz działania niepożądane, wynikające z nadmiernej ekspozycji układu nerwowego oraz innych struktur na NTFs. Wiele nadziei wiąże się z zastosowaniem wektorów wirusowych, za pomocą których możliwe jest długotrwałe, odpowiednio zlokalizowane dostarczenie NTFs w dawce zapewniającej działanie terapeutyczne. W niniejszej pracy zostały przytoczone niektóre doświadczenia przeprowadzone na modelach zwierzęcych z zastosowaniem NTFs oraz pierwsze badania kliniczne. Kontynuacja tych badań w kolejnych latach być może pozwoli określić czy NTFs są skuteczne w zapobieganiu i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Alzheimerera, choroba Parkinsona, choroba Huntigtona czy stwardnienie rozsiane.

SUMMARY

Neurotrophic factors (NTFs) have the unique potential to support neuronal structure, neuronal function, and stimulation of nerve growth in physiological environment and in case of injured nervous system. Numerous studies conducted over the last 20 years have provided evidence for the therapeutic potential of NTFs. However therapeutic use of NTFs still is hampered by many obstacles. Major problems are inability to cross the blood-brain-barrier and adverse effects resulting from the broad exposure of the nervous system and other structures to NTFs action. Viral vectors hopefully allow the targeted delivery of NTFs while providing a long-lasting supply in therapeutic doses. In this review, we consider some of experiments in animal model with use of NTFs. These insights had let to the first clinical trials with NTFs. Clinical trials to be continued over the next years will allow to determine whether NTFs are efficient in prevention and therapy of neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease, Parkinson's disease, Huntington disease or multiple sclerosis.

Słowa kluczowe: neurodegeneracja, neuroprotekcja, czynniki neurotroficzne

Key words: neurodegeneration, neuroprotection, neurotrophic factors

CZYNNIKI NEUROTROFICZNE

Czynniki neurotroficzne są to polipeptydy wytwarzane głównie przez układ nerwowy. Ich stałe, niskie stężenie jest wymagane do utrzymania przy życiu komórek nerwowych, zarówno ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego. Efekt działania wywierają poprzez wiązanie ze specyficznymi receptorami.

Wyróżnia się następujące czynniki neurotropowe:

- neurotrofiny (NT),
- cytokiny neuropoetyczne (m.in. rzęskowy czynnik neurotroficzny, *Ciliary Neurotrophic Factor* – CTNF),
- czynniki wzrostu fibroblastów (*Fibroblast Growth Factors*: FGF-1, FGF-2, FGF-5),
- glejowe czynniki neurotroficzne (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* -GDNF, neurturin, persephin, artemin),
- insulinopodobny czynnik neurotroficzny (*Insulin and the Insulinlike Growth Factor*: IGF-1, IGF-2),
- czynnik neurotroficzny naskórka (*Epidermal Growth Factor* – EGF),
- białaczkowy czynnik hamujący (*Leukemia Inhibitory Factor* – LIF).

Do najlepiej poznanych czynników neurotroficznych należą neurotrofiny, a wśród nich: czynnik neurotroficzny nerwów (*Nerve Growth Factor* – NGF), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (*Brain Derived Neurotrophic Factor* – BDNF) oraz neurotrofiny (NT-3, NT-4/5, NT-6, NT-7) (Holtzman i wsp. 1994). Neurotrofiny wywierają działanie poprzez wiązanie do receptorów przezbłonowych należących do dwóch różnych klas: p75^{NTR} oraz rodziny receptorów Trk. Za pośrednictwem receptorów Trk, uczestniczą we wzroście i przeżyciu neuronów, podczas gdy wiązanie z receptorem p75^{NTR} prowadzi do zahamowania wzrostu oraz apoptozy komórek nerwowych. W zależności od miejsca występowania, ekspresji receptorów oraz ich powinowactwa, każdy z NTFs wywiera inne działanie na komórki nerwowe (Krüttgen i wsp. 2006).

CZYNNIKI NEUROTROFICZNE W TERAPII

Potwierdzona zdolność NTFs do stymulacji przeżycia i różnicowania neuronów sugeruje możliwość ich zastosowania w chorobach neurodegeneracyjnych. Dokładniejsze poznanie NTFs, procesów i miejsc ich syntezy pozwoliły na oszacowanie, które z NTFs mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób neurologicznych (tabela 1) oraz na przybliżenie ich potencjalnych mechanizmów działania (tabela 2).

Tabela 1. Potencjalne zastosowanie czynników neurotroficznych w terapii*

Zaburzenie	Czynnik neurotroficzny
Neuropatie obwodowe	
Neurony czuciowe	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5
Neurony współczulne	NGF, FGF-2
Neurony przywspółczulne	CNTF
ALS	
Motoneurony	CNTF, BDNF, NT-4/5, IGF-1
Choroba Alzheimerera	
Neurony cholinergiczne	NGF
podstawy przodomózgowia	
Neurony mózdzka	BDNF, NT-3, NT-4/5
Neurony hipokampa	BDNF, NT-3, NT-4/5
Choroba Parkinsona	
Neurony dopaminergiczne	GDNF, BDNF, NT-4/5, FGF-1, FGF-2, IGF-1
Choroba Huntingtona	
Neurony dopaminergiczne	BDNF, NT-4/5
prążkowiec	
Neurony cholinergiczne	NGF
prążkowiec	

* wg Cuello 1997

Powyższe dane zachęciły do podjęcia badań klinicznych z wykorzystaniem NTFs. Podstawowym problemem jest jednak dostarczenie tych czynników do mózgu w aktywnej postaci. Białka takie jak BDNF, CTNF, przyjmowane doustnie, są rozkładane w żołądku, natomiast podane domięśniowo czy dożylnie nie mogą pokonać bariery krew-mózg. W związku z tym opracowano metodę polegającą na implantacji genetycznie zmodyfikowanych komórek, które są zdolne do miejscowego wytwarzania określonego czynnika troficznego.

Najlepsze efekty kliniczne, przy względnie niewielu działaniach niepożądanych, uzyskano przy zastosowaniu terapii genowej. Wymaga ona jednak jeszcze wielu badań. Trwają prace nad możliwością optymalnego wykorzystania NTFs w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

CZYNNIK NEUROTROFICZNY NERWÓW (NGF) W CHOROBIE ALZHEIMERA (AD)

NGF jest neurotrofiną, która została opisana jako pierwsza przez Levi-Montalcini i Hamburgera. Zaobserwowali oni hiperplazję unerwienia zwoju nerwowego korzenia grzbietowego u myszy z nowotworem typu sarkoma. Odchylenia w embrionalnym rozwoju zwoju nerwowego dotyczyły nie tylko obszaru objętego

Tabela 2. Działanie czynników neurotroficznych na różne typy neuronów*

Neurotrofina	Akronim	Receptory		Efekty, potencjalne zastosowanie
		Duże powinowactwo	Małe powinowactwo	
Nerwowy czynnik wzrostu	NGF	TrkA	p75NTR	Protekcja cholinergicznym neuronów przodomózgowia; synaptogeneza de novo. Choroba Alzheimerowa (?) Cukrzyca (?)
Czynnik troficzny pochodzenia mózgowego	BDNF	TrkB	p75NTR	Protekcja neuronów dopaminergicznym w rozwoju embrionalnym. Odnowa aksonotomizowanych korowych neuronów piramidowych Choroba Parkinsona(?) Udar mózgu (?)
Neurotrofina 3	NT3	TrkC	p75NTR	Odnowa aksonotomizowanych korowych neuronów piramidowych.
Neurotrofina 4/5	NT4/5	TrkB	p75NTR	Odnowa motoneuronów Stwardnienie zanikowe boczne (?)
Inne czynniki neurotroficzne				
Rzęskowy czynnik neurotroficzny	CNTF	CNTR α , LIFR gp130	-	Protekcja motoneuronów oraz neuronów czuciowych Stwardnienie zanikowe boczne (?)
Czynnik wzrostu fibroblastów (kwaśny)	a-FGF	FGFR2 i inne	HPS (Heparyn sulfat proteoglikan)	Odnowa neuronów cholinergicznym. Usprawnienie po przebytych zawale mięśnia sercowego? Udar mózgu (?)
Czynnik wzrostu fibroblastów (zasadowy)	b-FGF	FGFR1 i inne	HSP	Odnowa neuronów cholinergicznym przegrody przezroczystej; protekcja dojrzałych neuronów dopaminergicznym Choroba Parkinsona (?)
Czynnik troficzny pochodzenia glejowego	GDNF	c-ret GDNF α	-	Odnowa dojrzałych komórek dopaminergicznym. Choroba Parkinsona (?)

* wg Holtzman i wsp. 1994

hiperplazją, ale również zwoju odległego od miejsca występowania nowotworu. Patologiczne, nadmierne unerwienie pojawiło się także w różnych narządach wewnętrznych. Postawiono hipotezę, że komórki nowotworowe uwalniają rozprzestrzeniający się czynnik promujący różnicowanie i wzrost komórek współczulnego układu nerwowego oraz neuronów czuciowych. Levi-Montalcini i Hamburger nazwali go czynnikiem neurotroficznym nerwów (NGF) oraz zapoczątkowali wieloletnie badania nad właściwościami tej substancji (Levi-Montalcini i Hamburger 1953). Początkowo NGF przypisywano udział tylko w procesach rozwoju obwodowego układu nerwowego. Późniejsze doniesienia o ekspresji NGF w dojrzałej korze nowej (neocortex) oraz hipokampie potwierdziły również ważną rolę tej neurotrofiny w pełni dojrzałym ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).

W połowie lat osiemdziesiątych badania prowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że dokomorowe podanie NGF może powstrzymać procesy degeneracji neuronów cholinergicznym w przegrodzie prze-

zroczystej. Kromer zastosował dwutygodniową ciągłą infuzję NGF do komór bocznych u dorosłych szczurów z obustronnym uszkodzeniem aksonów cholinergicznym. Konsekwencją terapii był znaczący wzrost stężenia acetylotransferazy cholinowej (ChAT), która uczestniczy w syntezie acetylocholin z cholin i acetylokoenzymu A (Kromer 1987; Blech i wsp. 2006). W AD wczesne zmiany zwyrodnieniowe w neuronach cholinergicznym jąder podkorowych kresomózgowia stanowią stałą cechę neuropatologiczną. Ich wynikiem jest zmniejszenie stężenia acetylocholin, czego następstwem są zaburzenia funkcji poznawczych (Bartus i wsp.1982). Neurony cholinergiczne jąder podkorowych kresomózgowia, wraz z cholinergicznymi neuronami prądkowia, reagują na NGF wzmożeniem syntezy ChAT, wpływając na syntezę acetylocholin. Podobnie jak na obwodzie, tak i w zakresie jąder podkorowych kresomózgowia występuje ścisła korelacja między stężeniami NGF, mRNA dla NGF i gęstością unerwienia przez neurony cholinergiczne reagujące na NGF. W hipokampie różnice w gęstości

neuronów cholinergicznym mogą być wynikiem lokalnych różnic stężenia NGF (Leszek i wsp. 1998).

Kolejne badania przeprowadzone u naczelnym potwierdziły istotną rolę NGF w prewencji degeneracji neuronów cholinergicznym oraz poprawę ich funkcjonowania, przejawiającą się zwiększeniem produkcji acetylocholiny (Kordower i wsp. 1994). Na podstawie tych danych podjęto pierwsze niewielkie próby kliniczne z zastosowaniem infuzji NGF do komory mózgu. Niestety badania te zostały przerwane ze względu na wystąpienie objawów bólowych u niektórych pacjentów (Eriksdotter Jönhagen i wsp. 1998). Podobne objawy wystąpiły także podczas badań na modelu zwierzęcym wraz z innymi działaniami niepożądanymi, takimi jak: zmniejszenie masy ciała, zaburzenia apetytu, zwiększenie liczby komórek Schwanna, sprouting neuronów czuciowych i współczulnych (Blech i wsp. 2006).

Równocześnie prowadzono badania mające na celu ocenę skuteczności NGF dostarczonego do OUN śródmiażdżowo, przy użyciu komórek genetycznie modyfikowanych. Przeszczepienie takich komórek, działających jako biologiczne minipompy, w okolice uszkodzonych neuronów cholinergicznym dało dobre efekty w zapobieganiu neurodegeneracji u gryzoni (Dekker i wsp. 1994) oraz u naczelnym (Emerich i wsp. 1994). Ponadto zaobserwowano u zwierząt pozytywny wpływ na zaburzenia pamięci związane z wiekiem, co zostało ocenione w badaniach behawioralnych. U ssaków naczelnym dostarczenie NGF do podstawy mózgu przez genetycznie zmodyfikowane fibroblasty okazało się metodą bezpieczną i dobrze tolerowaną (Blech i wsp. 2006).

Na podstawie danych uzyskanych na zwierzętach zainicjowano badanie kliniczne z zastosowaniem terapii genowej NGF w grupie ośmiu pacjentów z AD. Ich celem było określenie bezpieczeństwa leczenia oraz ocena wpływu na zaburzenia poznawcze. Do badania zostali zakwalifikowani pacjenci w średnio zaawansowanym stadium choroby.

Autologiczne fibroblasty genetycznie modyfikowane do ekspresji NGF uzyskano z biopsji skóry pacjentów. Implantowano je do podstawy przodomózgowia w pobliżu jądra podstawnego Meynerta (*nucleus basalis of Meynert* – NBM). Wyniki testów oceniających funkcje poznawcze wykazały poprawę w tym zakresie, natomiast tomografia PET na wzrost metabolicznej aktywności kory nowej. Dodatkowa analiza histologiczna mózgu jednego z uczestników badania, który zmarł w piątym tygodniu badania, dowiodła występowania nowych neuronów cholinergicznym w NBM, powstających prawdopodobnie pod wpływem przeszczepionych komórek wydzielających NGF. Wyniki te wskazują, iż u chorych na AD neurony cholin-

giczne podstawy przodomózgowia reagują na czynnik NGF (Tuszynski i wsp. 2005).

Szybki rozwój terapii genowej wyeliminował potrzebę laboratoryjnego preparowania autologicznym komórek. Bezpośrednia iniekcja *in vivo* czynników neurotroficznym, związanych z niezdolnymi do replikacji wektorami wirusowymi, takimi jak adenoassociated virus (AAV) lub lentivirus, pozwala na zlokalizowanie czynników troficznym w OUN. Badania II fazy, prowadzone na Uniwersytecie Rush w Chicago, prawdopodobnie odpowiedzą na pytania, czy terapia genowa NGF ma znaczenie w ograniczaniu degeneracji neuronów cholinergicznym oraz czy może wpływać na opóźnienie upośledzenia funkcji poznawczym u pacjentów z AD (Blech i wsp. 2006).

GDNF W CHOROBIE PARKINSONA (PD)

W przebiegu PD dochodzi między innymi do zmian zwyrodnieniowych komórek nerwowych w istocie czarnej, znajdującej się w jądrach podstawy mózgu, oraz niedoboru dopaminy, będącego konsekwencją zaburzenia funkcji neuronów dopaminergicznym.

Wśród NTFs mających istotny wpływ na przeżywalność neuronów dopaminergicznym szczególne znaczenie przypisuje się rodzinie czynników troficznym pochodzenia glejowego (GFLs) (Lin i wsp. 1993). Najlepiej poznanym reprezentantem tej grupy jest GDNF, charakteryzujący się wysoką swoistością do dopaminergicznym neuronów śródmózgowia (Tomac i wsp. 1995). Odkryto również kilka innych, homologicznym substancji, należących do rodziny GFLs: neurturin (NRTN), persephin (PSPN) oraz artemin (ARTN) (Blech i wsp. 2006).

W połowie lat 90. rozpoczęto w modelu zwierzęcym PD z zastosowaniem neurotoksyny 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP) badania z zastosowaniem iniekcji GDNF w okolice istoty czarnej lub prądkowia. Zaobserwowano wyraźne działanie neuroprotekcyjne oraz naprawcze w układzie dopaminergicznym istoty czarnej (Tomac i wsp. 1995). Badania z zastosowaniem domózgowym iniekcji GDNF (w modelu MPTP) przeprowadzono także u małp, których mózg, pod względem funkcjonalnym i organizacyjnym, jest bardziej zbliżony do ludzkiego. Rezultatem tej terapii był dwukrotny wzrost stężenia dopaminy w OUN oraz znacząca poprawa w zakresie trzech objawów PD: bradykinezji, sztywności mięśniowej oraz niestabilnej postawy (Gash i wsp. 1996).

Podobne protekcyjne działanie na dopaminergiczne neurony uzyskano po zastosowaniu implantów fibroblastów genetycznie modyfikowanych, w celu zwiększenia syntezy GDNF u gryzoni (Emerich i wsp. 1996).

W następnym etapie przeprowadzono badania kliniczne u pacjentów z zaawansowaną postacią PD. Biologicznie aktywny GDNF podawano dokomorowo przez zaimplantowany dren. Nie uzyskano jednak oczekiwanego efektu klinicznego. Odnotowano natomiast działania niepożądane, takie jak: nudności, utrata masy ciała, a nawet anoreksja (Nutt i wsp. 2003). Brak pożądanego efektu terapeutycznego mógł być wywołany niewystarczającym przemieszczeniem GDNF z komory bocznej do prążkowiec. Pula GDNF mogła znajdować się w płynie mózgowo-rdzeniowym, nie oddziałując na neurony istoty czarnej (Blech i wsp. 2006). W kolejnym badaniu dostarczono GDNF bezpośrednio do prążkowiec. Wyniki były bardzo obiecujące. Odnotowano widoczną poprawę w Skali Oceny Choroby Parkinsona (UPDRS – *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*), zwiększenie stężenia dopaminy widoczne w PET oraz łagodne działania niepożądane (Gill i wsp. 2003). W celu potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa opisaną terapię GDNF, zastosowano ją w większej grupie pacjentów z PD. W badaniu uczestniczyło 34 chorych, którym podawano iniekcje preparatu zawierającego rekombinowaną postać ludzkiego GDNF (liatermin) bezpośrednio do skorupy, w dawce 15 µg/dz, mniejszej niż w badaniu poprzednim. Nie osiągnięto jednak zadowalających rezultatów (Lang i wsp. 2006), czego przyczyną mogła być zbyt niska dawka leku. W związku z tym zagadnienie potencjalnych korzyści, wynikających z działania GDNF u pacjentów z PD, jest nadal otwarte i wymaga dalszych badań.

Stosowanie GDNF stwarza problemy związane z niestabilnością, krótkim okresem działania czynnika neurotroficznego oraz działaniami niepożądanymi (infekcje). Doskonałą alternatywą może okazać się terapia genowa. Korzystnych rezultatów oczekuje się po podaniu GDNF pochodzącego z rekombinowanego adenowirusa, wektorów AAV oraz wektorów lentiwirusa (Blech i wsp. 2006).

Dużym zainteresowaniem cieszy się również neurturin, czynnik troficzny o właściwościach zbliżonych do GDNF. W badaniach przeprowadzonych w modelach zwierzęcych PD wykazał on skuteczność zbliżoną do GDNF (Horger i wsp. 1998).

Zachęcające wyniki uzyskane w badaniach przeprowadzonych u gryzoni i ssaków (Bartus i wsp. 2005), umożliwiły przeprowadzenie badań klinicznych z zastosowaniem neurtutinu dostarczanego za pomocą wektora AAV typu 2 (AAV-2). Obecnie prowadzone badania I, II i III fazy na Uniwersytetach w Kalifornii, San Francisco oraz Chicago być może odpowiedzią na pytania, czy terapia genowa neurtutinu może chronić neurony dopaminergiczne oraz poprawić sprawność pacjentów z PD (Blech i wsp. 2006).

NTFS W CHOROBY HUNTINGTONA (HD)

Przyczyną choroby Huntingtona jest mutacja w genie HD kodującym białko huntingtynę, położonym na chromosomie 4. Choroba dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący. Mutacja polega na ekspansji kodonu CAG kodującego glutaminę, co powoduje, że w sekwencji aminokwasowej huntingtyny pojawia się długi ciąg glutamin. Wadliwe białko gromadzi się w komórkach nerwowych, działając na nie neurotoksycznie.

W poszukiwaniu czynników mających działanie neuroprotektoryjne, przeprowadzono wiele badań na zwierzętach z zastosowaniem czynników troficznych, takich jak: NGF (Anderson i wsp. 1996), BDNF (Perez-Navarro i wsp. 2000), NT-3 (Anderson i wsp. 1996), NT4/5 (Alexi i wsp. 1997), GDNF (Perez-Navarro i wsp. 1996) oraz CTNF (Anderson i wsp. 1996). Część eksperymentów przeprowadzono w modelu neurotoksycznego uszkodzenia neuronów, który nie odzwierciedla jednak w pełni zmian zachodzących w HD spowodowanej mutacją. Dopiero zastosowanie modelu myszy transgenicznych z ekspresją różnej długości poli-glutamin dało szersze możliwości badawcze. Wszystkie testowane NTFs wykazały w różnym stopniu działanie neuroprotektoryjne, jednak jego mechanizmy nie zostały do końca poznane (Blech i wsp. 2006). Wydaje się, że zastosowanie NTFs wymaga dalszych badań w modelach zwierzęcych bliższych patogenetycznie ludzkiej postaci choroby. Okazało się bowiem, że korzystne działanie GDNF, uzyskane w badaniach z uszkodzeniem wywołanym cytotoksycznie (Perez-Navarro i wsp. 1996), nie zostało potwierdzone w modelach myszy transgenicznych z ekspresją mutacji huntington (Popovic i wsp. 2005).

Ostatnie badania przeprowadzono u zwierząt z HD, z zastosowaniem terapii genowej. Umożliwiła ona, dzięki wykorzystaniu AAV lub lentivirus, dostarczenie NTFs w odpowiednie miejsce OUN, a co jest z tym związane, ich długotrwałe działanie. Zwiększenie ekspresji BDNF, GDNF oraz CTNF, wywołane zastosowaniem wyżej wymienionych wirusów w modelu uszkodzenia cytotoksycznego, miało działanie protekcyjne (Blech i wsp. 2006).

Duże znaczenie przypisuje się mutacji huntington w zaburzeniu ekspresji i transportu BDNF. Zmniejszone stężenie BDNF w mózgu obserwowano u większości pacjentów HD. Sugeruje się dwa mechanizmy mające związek z tymi zmianami. Zmniejszenie ekspresji BDNF może być wynikiem oddziaływania między mutacją huntington a czynnikiem transkrypcyjnym dla BDNF (Zuccato i wsp. 2003). Istnieje także możliwość, że mutacja huntington hamuje transport

BDNF z kory do prążkowania, powodując wyczerpanie BDNF w prążkowie (Gauthier i wsp. 2004). O wzajemnym oddziaływaniu między BDNF i mutacją huntington może świadczyć fakt, że w modelu mysim HD postępujący niedobór BDNF prowadził do dysfunkcji ruchowej i degeneracji neuronów (Canals i wsp. 2004). Podsumowując te doniesienia, dostarczenie BDNF do jądra ogoniastego i skorupy może chronić lub opóźnić degenerację neuronów ośrodkowego u chorych na HD, ale wymaga to jeszcze dalszych badań (Blech i wsp. 2006).

CTNF jest jedynym czynnikiem troficznym, który do tej pory został testowany w badaniach klinicznych u pacjentów z HD. W badaniu przeprowadzonym w grupie 6 chorych z HD, którym dostarczano CTNF do komory bocznej mózgu, nie zaobserwowano jednak korzystnego działania (Bloch i wsp. 2004). Brak pożądanego efektu mógł być spowodowany ograniczoną możliwością dyfuzji CTNF przez ściany komory do sąsiadującej skorupy (Blech i wsp. 2006).

NTFS W STWARDNIENIU ZANIKOWYM BOCZNYM (AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS, ALS)

Opisane w 1869 roku przez francuskiego neurologa Jean-Marie Charcot stwardnienie zanikowe boczne jest jednym z najczęstszych schorzeń doprowadzających do niesprawności ruchowej dorosłych. Jego charakterystyczną cechą jest postępująca, względnie wybiórcza degeneracja motoneuronów rdzenia kręgowego i pnia mózgu, zwykle w ciągu 3-5 lat prowadząca do porażenia mięśni oddechowych i śmierci. Jego etiologia pozostaje nieznana. Większość źródeł podaje, że około 10%, nawet do 20% przypadków ALS jest uwarunkowanych genetycznie. Wykazano powiązanie pomiędzy niektórymi przypadkami ALS a mutacjami w genie dla enzymu dysmutazy ponadlenkowej typu 1 (SOD-1), którego locus znajduje się na chromosomie 21 (Gibb i wsp. 2007).

Niektóre czynniki neurotroficzne posiadają silne działanie zwiększające przeżycie neuronów czuciowych *in vivo* podczas rozwoju, po uszkodzeniu motoneuronów oraz w ich genetycznie uwarunkowanej degeneracji. Powyższe właściwości NTFs uzasadniają zastosowanie tych czynników w terapii ALS. Wyniki badań przeprowadzonych u zwierząt z chorobami neuronów czuciowych lub ALS, którym podawano BDNF, CTNF, IGF-1 lub GDNF, były zachęcające (Koliatsos i wsp. 1994). W oparciu o te doniesienia przeprowadzono pierwsze próby kliniczne z zastosowaniem CTNF (ALS CNTF Treatment Study Group 1996), BDNF (*The BDNF Study Group (phase*

III) 1999) i IGF-1 (Borasio i wsp. 1998). Nie były one jednak przełomowe – najprawdopodobniej istotny, niekorzystny wpływ miał sposób podania NTFs, ich niestabilność oraz nierównomierne rozmieszczenie, powodujące subkliniczne stężenie w OUN. Odnotowano też działania niepożądane, takie jak zmniejszenie masy ciała, uporczywy kaszel, gorączkę oraz wyniszczenie mięśniowe (Blech i wsp. 2006). Kolejne badania u pacjentów z ALS, oparte na dooponowej infuzji CTNF oraz zastosowaniu heterogenicznych komórek produkujących ten czynnik, nie powodowały co prawda działań niepożądanych, ale nie wywoływały również znaczącego efektu klinicznego, prawdopodobnie w wyniku nieodpowiedniego rozmieszczenia czynnika troficznego (Aebischer i wsp. 1996).

Podobnie jak w poprzednich przypadkach, wiele nadziei niesie ze sobą coraz lepiej poznana terapia genowa oraz możliwość regresywnego transportu czynników neurotroficznych sprzężonych z wektorami wirusowymi. W transgenicznym modelu mysim z ALS, zaobserwowano obecność NFTs w motoneuronach po ich domięśniowej iniekcji na wektorach wirusowych. Ekspresja śródnabłonkowego naczyniowego czynnika neurotroficznego (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF) w motoneuronach w wyniku regresywnego transportu z mięśni VEGF związanego z lentivirusem (Azzouz i wsp. 2004) oraz ekspresja IGF-1 w neuronach ruchowych po iniekcji domięśniowej AAV-2, wydłużyły czas życia zwierząt oraz opóźniły śmierć neuronów u myszy transgenicznych z mutacją SOD-1 (Kaspar i wsp. 2003). Podobne efekty uzyskano po zastosowaniu domięśniowej iniekcji AAV-2 z GDNF (Wang i wsp. 2002).

NTFS W STWARDNIENIU ROZSIANYM (SM)

Stwardnienie rozsiane jest przewlekłą chorobą demielinizacyjną OUN, prawdopodobnie o podłożu pierwotnie autoimmunologicznym. W ostatnich latach coraz większą rolę przypisuje się jednak procesom neurodegeneracji w jej przebiegu. W pracach doświadczalnych wykazano, że reakcja zapalna może wpływać także neuroprotekcynie. Prawdopodobnie główną rolę w neuroprotekcji immunologicznej odgrywają czynniki neurotroficzne produkowane przez limfocyty T, limfocyty B oraz monocyty (Hohlfeld i wsp. 2000). U chorych z SM podwyższony poziom NTFs zaobserwowano w miejscach występowania patologicznych zmian oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym. Szczególnie podkreślany jest udział BDNF i NGF, odgrywających istotną rolę w regeneracji i przeżywaniu różnych populacji neuronów. Wykaza-

no zwiększenie produkcji BDNF przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMcs – *peripheral blood mononuclear cells*) podczas rzutu i remisji choroby, w porównaniu do stabilnej postaci SM oraz zmniejszenie stężenia we wtórnie postępującej fazie choroby (SPMS – *secondary progressive*). Przypuszcza się, że zmniejszenie produkcji BDNF przez PBMcs może przyczynić się do progresji choroby związanej z uszkodzeniem aksonalnym. Prawdopodobnie istnieje bezpośredni związek między degeneracją lub regeneracją neuronów OUN, a obwodową produkcją BDNF i NGF (Gold i wsp. 2003).

Potwierdzono, że podanie BDNF bądź genu BDNF może ratować uszkodzone, zdegenerowane neurony oraz indukować wzrost aksonów (McTigue i wsp. 1998). Zastosowanie BDNF oraz innych NTFs w terapii ograniczone jest trudnościami związanymi z dostarczeniem ich w wystarczającej ilości do uszkodzonego miejsca OUN. Duże nadzieje pokłada się w wykorzystaniu metod opartych na transdukcji jednego lub kilku NTFs w swoistych antygenowo liniach komórek T. Komórki te po rozpoznaniu antygeny stymulują miejscową sekrecję NTFs. W ten sposób naśladują syntezę tych czynników, zachodzącą w warunkach fizjologicznych. Ponieważ w wielu przypadkach ilość syntetyzowanych NTFs jest niewystarczająca do zapobiegania SM, nadal prowadzone są badania nad ulepszeniem metody ich dostarczenia (Hohlfeld i wsp. 2000).

Zwiększenie wytwarzania NTFs, głównie NGF oraz BDNF, przez PBMcs, uzyskano również po podaniu interferonu beta. Wzrost ten korelował ze stanem klinicznym pacjentów (Caggiula i wsp. 2006). Nie przeprowadzono jednak jak do tej pory żadnych badań nad skutecznością i bezpieczeństwem stosowania NTFs u chorych z SM.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie NTFs może okazać się atrakcyjną strategią terapeutyczną w chorobach neurodegeneracyjnych. Wydaje się, że największym wyzwaniem jest określenie odpowiedniego miejsca podania NTFs. Zastosowanie wektorów wirusowych daje możliwość precyzyjnego dostarczenia NTFs oraz ich długotrwałego uwalniania. Dzięki temu być może uda się uniknąć działań niepożądanych, związanych z nadmierną ekspozycją OUN, obwodowego układu nerwowego oraz innych narządów na ich działanie. Kontynuacja badań klinicznych pozwoli na zdefiniowanie, czy neurotrofiny wpływają na opóźnienie lub spowolnienie degeneracji neuronów – procesu odpowiedzialnego zarówno za upośledzenie funkcji poznawczych, jak i sprawności ruchowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogenic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 1996; 2: 696-699.
2. Alexi T, Venero J L, Hefti F. Protective effects of neurotrophin-4/5 and transforming growth factor-alpha on striatal neuronal phenotypic degeneration after excitotoxic lesioning with quinolinic acid. *Neuroscience* 1997; 78: 73-86.
3. ALS CNTF Treatment Study Group: A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 1244-1249.
4. Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7346-7351.
5. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmieliet P, Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in mouse ALS model. *Nature* 2004; 429: 413-417.
6. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217: 408-414.
7. Bartus RT, Herzog CD, Cunningham JJ, Brandon EP, Wilson A, Hofer EK, Kordower JH, Ostorve JM, Gasmi M. Biological activity of CERE120, an AAV2 vector encoding human neurturin, in the rat 6-hydroxydopamine model of nigrostriatal degeneration and in the young intact and aged rat. *Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Soc Neurosci 2005; Online: Progr. No 545.541.
8. Blech A. Neurotrophic Factors in Neurodegeneration. *Brain Pathology* 2006; 4: 295-303.
9. Bloch J, Bachoud-Levi AC, Eglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugieres P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Puschanski M. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: result of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 968-975.
10. Borasio GD, Robberecht W, Leigh PN, Emile J, Guilloff RJ, Jerusalem F, Silani V, Vos PE, Wokke JH, Dobbins T. A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* 1998; 51: 583-586.
11. Caggiula M, Batocchi AP, Frisullo G, Angelucci F, Patanella AK, Sancricca C, Nociti V, Tonali PA, Mirabella M. Neurotrophic factors in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients during interferon beta therapy. *Clin Immunol* 2006; 118: 77-82.
12. Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, Bosch M, Martinbanez R, Munoz MT, Mengod G, Ernfors P, Alberch J. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 2004; 24: 7727-7739.
13. Cuello AC. Experimental Neurotrophic Factor Therapy Leads to Cortical Synaptic Remodeling and Compensates or Behavioral Deficits. *J Psych Neurosci* 1997; 22: 46-55.
14. Dekker AJ, Winkler J, Ray J, Thal LJ, Gage FH. Grafting of nerve growth factor – producing fibroblasts reduces behavioral deficits in rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Neuroscience* 1994; 60: 299-309.
15. Emerich DF, Plone M, Francis J, Frydel BR, Winn SR, Lindner MD. Alleviation of behavioral deficits in aged rodents following implantation of encapsulated GDNF-producing fibroblast. *Brain Res* 1996; 736: 99-110.

16. Emerich DF, Winn SR, Harper J, Hammang JP, Baetge EE, Kordower JH. Implants of polymer-encapsulated human NGF-secreting cells in the nonhuman primate: rescue and sprouting of degenerating cholinergic basal forebrain neurons. *J Comp Neurol* 1994; 349: 148-164.
17. Eriksson Jönhagen M, Nordberg A, Amberla K, Bäckman L, Ebendal T, Meyerson B, Olson L, Seiger A, Shigeta M, Theodorsson E, Viitanen M, Winblad B, Wahlund L O. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; 9: 246-257.
18. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 1996; 380: 252-255.
19. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres F P, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 2004; 118: 127-138.
20. Gibb SL, Boston-Howes W, Lavina SC, Gustincich S, Brown RH, Pasinelli P, Trotti D. A CASPASE-3 cleaved fragment of the glial glutamate transporter EAAT2 is sumoylated and targeted to promyelocytic leukemia nuclear bodies in mutant SOD1 linked ALS. *Am Soc Biochem Molec Biol* 2007; 1-13.
21. Gill SS, Patel NK, Hottton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003; 9: 589-595.
22. Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, Reer R, Braumann KM, Heesen C. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol* 2003; 138: 99-105.
23. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 107: 161-166.
24. Holtzman DM, Li Y, Chen K, Gage FU, Epstein CJ, Mobley WC. Nerve growth factor reverses neuronal atrophy in Down syndrome model of age-related neurodegeneration. *Neurology* 1993; 43: 2668-2673.
25. Holtzman DM, Mobley WC. Neurotrophic Factors and Neurologic Disease. *West J Med* 1994; 161: 246-254.
26. Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E Jr, Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Philips HS. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 4929-4937.
27. Kaspar BK, Liado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde Viral delivery of IGF-1 prolongs survival in mouse ALS model. *Science* 2003; 301: 839-842.
28. Koliatsos VE, Cayouette MH, Berkemeier LR, Clatterbuck RE, Price DL, Rosenthal A. Neurotrophin 4/5 is a trophic factor for mammalian facial motor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3304-3308.
29. Kordower JH, Winn SR, Liu YT, Mufson EJ, Sladek JR, Hammang JP, Baetge EE, Emerich G J. The aged monkey basal forebrain: rescue and sprouting of axotomized basal forebrain neurons after grafts of encapsulated cells secreting human nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10989-10902.
30. Kordower JH, Chen EY, Mufson EJ, Winn SR, Emerich DF. Intrastriatal implants of polymer encapsulated cells genetically modified to secrete human nerve growth factor: trophic effects upon cholinergic and noncholinergic striatal neurons. *Neuroscience* 1996; 72: 63-77.
31. Kromer LF. Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science* 1987; 235: 214-216.
32. Krüttgen A, Schneider I, Weis J. The Dark Side of the NGF Family: Neurotrophins in Neoplasias. *Brain Pathol* 2006; 4: 304-310.
33. Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hottton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 459-466.
34. Leszek J, Gąsiorowski K. Neurotroficzne czynniki wzrostu w chorobie Alzheimer. *Choroba Alzheimer* VOLUMED 1998; 212-218.
35. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-1132.
36. Levi-Montalcini R, Hamburger V. A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscerain the chick embryo. *J Exp Zool* 1953; 123: 233-288.
37. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1998; 18: 5354-5365.
38. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2003; 60: 69-73.
39. Pérez-Navarro E, Canudas AM, Akerund P, Alberch J, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem* 2000; 75: 2190-2199.
40. Pérez-Navarro E, Arenas E, Reiriz J, Calvo N, Alberch J. Glial cell line-derived neurotrophic factors protects striatal calbindin-immunoreactive neurons from excitotoxic damage. *Neuroscience* 1996; 75: 345-352.
41. Popovic N, Maingay M, Kirik D, Brundin P. Lentiviral gene delivery of GDNF into the striatum of R6/2 Huntington mice fails to attenuate behavioral and neuropathological changes. *Exp Neurol* 2005; 193: 65-74.
42. The BDNF Study Group (Phase III): A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: the BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 1999; 52: 1427-1433.
43. Tomac A, Lindqvist E, Lin FH, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 1995; 373: 335-339.
44. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 2005; 11: 551-555.
45. Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Miaukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci* 2002; 22: 6920-6928.
46. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Catadella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D, Cattaneo E. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 2003; 35: 76-83.

Adres korespondencyjny:

Anna Członkowska

II Klinika Neurologiczna, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie,

ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa,

tel. 022 842 76 83, fax. 022 842 40 23, e-mail: czlonkow@ipin.edu.pl