

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ-ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ
ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

SOMATOSTATIN – DOPAMINE INTERACTIONS
IN RAT RETINA

ΚΟΥΒΙΔΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2005

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Κυριακή Θερού	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Κρήτης
Κατερινόπουλος Χαράλαμπος	Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης
Τσιώτης Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
SUMMARY.....	10
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ.....	12
1.1.1 Βιοσύνθεση SST.....	13
1.1.2 Περιοχές έκφρασης και απελευθέρωσης SST.....	15
1.1.3 Δράσεις SST στα διάφορα συστήματα.....	16
1.2 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	18
1.2.1 Γενικά.....	18
1.2.2 Κλωνοποίηση SSTR.....	18
1.2.3 Εντοπισμός SSTR στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ.....	21
1.2.4 Ενδοκυτταρικά εκτελεστικά συστήματα μεταγωγής σήματος.....	22
1.3 ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ.....	24
1.3.1 Γενικά.....	24
1.3.2 Αμφιβληστροειδής και περιβάλλον.....	25
1.3.3 Ανατομία και φυσιολογία αμφιβληστροειδούς.....	26
1.4 ΟΙ ΝΕΥΡΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ SST, DA ΚΑΙ ΝΟ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ.....	29
1.4.1 SST και αμφιβληστροειδής.....	29
1.4.2 Ρόλος SST στον αμφιβληστροειδή.....	29
1.4.3 SSTRs στον αμφιβληστροειδή.....	30
1.4.4.1 Ντοπαμίνη.....	34
1.4.4.2 Ντοπαμίνη και αμφιβληστροειδής.....	36
1.4.5 Μονοξείδιο του αζώτου και αμφιβληστροειδής.....	38
1.4.6 Λειτουργικός ρόλος της SST στον αμφιβληστροειδή και αλληλεπιδράσεις της με την DA	40
Σκοπός και προοπτική της μελέτης.....	42
2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	43
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	43

2.2.1	Ανάλυση επιπέδων ντοπαμίνης.....	44
2.2.2	Ανάλυση δειγμάτων.....	45
2.2.3	Πρότυπα διαλύματα.....	46
2.2.4	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ιστού.....	46
2.2.5	Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	47
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1	Βασική απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.....	48
3.2	Επίδραση SST στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.....	49
3.3	Επίδραση του SSTR2 ανταγωνιστή CYN-154806 στην προκαλούμενη από την SST αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA από τον αμφιβληστροειδή.....	52
3.4	Επίδραση του SSTR2 αγωνιστή BIM-23014 στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.....	53
3.5	Επίδραση του SSTR1 αναλόγου L-797.591 στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.....	55
3.6	Επίδραση του SSTR3 αναλόγου L-796.778 στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.....	57
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	61
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	69

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλλαν στην προσπάθεια μου αυτή. Πρώτα από όλους ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Κυριακή Θερμού για την επιστημονική συμβολή, ηθική συμπαράσταση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Κατόπιν θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του ΕΠΕΑΕΚ και ιδιαίτερος τον υπεύθυνο του προγράμματος κύριο Μιχάλη Ορφανόπουλο ο οποίος προσφέρθηκε να με βοηθήσει σε ότι του ζήτησα, καθώς και τον κύριο Νικόλαο Χανιωτάκη για την βοήθεια του στην επίλυση προβλημάτων στο σύστημα μέτρησης HPLC.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδακτορικού διπλώματος Νίκη Μαστροδήμου για την πειραματική συνεργασία και την επιστημονική συμβολή της καθόλη την διάρκεια της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τους Αναστασία Παπαδιώτη, Έφη Καραγιάννη, Δέσποινα Παπασάββα, Μαρία Παπάζογλου, Κώστα Ξυδάκη και Γιάννη Μονεμβάσιο. Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την υποψήφια διδακτορικού διπλώματος Θέκλα Παπαδάκη για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου Τηλέμαχο και Ελένη Κουβίδη και τις αδερφές μου Αντιγόνη και Ιωάννα Κουβίδη για την ηθική και ψυχολογική συμπαράσταση που μου παρείχαν όλο αυτό τον καιρό.

Συντομογραφίες

AC	αδενυλική κυκλάση
ACTH	φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη
cAMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CBC	δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα κωνία
cDNA	συμπληρωματικό DNA
cGMP	κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
CRH	εκλυτική ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης
Cys	κυστεΐνη
DA	ντοπαμίνη
DOPAC	διυδροξυφαινυλοξικό
GABA	γ-άμινο βουτυρικό οξύ
GCL	στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων
GPCR	υποδοχείς που δεσμεύονται με G πρωτεΐνες
GHRH	εκλυτικός παράγοντας απελευθέρωσης της GH
GH	αυξητική ορμόνη
sGC	διαλυτή μορφή γουανυλικής κυκλάσης
HVA	ομοβανιλλικό οξύ
HPLC	υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία
INL	εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα
IPL	εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα
IP3	1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη
IR	ανοσοδραστικότητα
ΚΝΣ	κεντρικό νευρικό σύστημα
MAPK	μιτωτικά ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση
mRNA	αγγελιοφόρο RNA
NADPH	νικοτιναμίδο-αδενινοφωσφορικό δινουκλεοτίδιο
NO	μονοξειδίο του αζώτου
NOS	συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
ONL	εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα
OPL	εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα
PKA	πρωτεϊνική κινάση A

PKC	πρωτεϊνική κινάση C
PRL	προλακτίνη
ΠΝΣ	περιφερικό νευρικό σύστημα
preproSST	προπροσωματοστατίνη
proSST	προσωματοστατίνη
PLA2	φωσφολιπάση A2
PTX	τοξίνη του κοκκίτη
RBC	δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδία
RPE	μελάγχρουν επιθήλιο
SRIF	ανασταλτικός παράγοντας απελευθέρωσης της σωματοτροπίνης -σωματοστατίνη
SST	σωματοστατίνη
SSTRs	υποδοχείς σωματοστατίνης
TH	τυροσινική υδροξυλάση
TRH	εκλυτική ορμόνη θυρεοτροπίνης

Περίληψη

Η σωματοστατίνη αποτελεί ένα κυκλικό νευροπεπτίδιο με ποικίλες δράσεις στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Στον αμφιβληστροειδή η σωματοστατίνη εντοπίζεται κυρίως σε βραχύινα κύτταρα της εσωτερικής δικτυωτής στοιβάδας, καθώς επίσης και σε ορισμένους τύπους γαγγλιακών κυττάρων ή σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα. Παρότι πρόσφατα έχει επιτευχθεί η λειτουργική χαρτογράφηση των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTR1-5), (Thermos 2003), ο ρόλος της παραμένει αδιευκρίνιστος. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες υποστηρίζουν τον συνεντοπισμό των υποδοχέων SSTR1 και SSTR2 με το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης, το περιοριστικό ένζυμο σύνθεσης της ντοπαμίνης, σε βραχύινα ντοπαμινεργικά κύτταρα. Η ντοπαμίνη είναι ένας από τους κύριους νευροτροποποιητές της οπτικής διαδικασίας και των κυκλωμάτων του αμφιβληστροειδούς. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης αφορά στην αποσαφήνιση του ρόλου της σωματοστατίνης ως ρυθμιστή της απελευθέρωσης ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Χρησιμοποιήθηκαν αμφιβληστροειδείς οι οποίοι απομονώθηκαν από μάτια θηλυκών Sprague-Dawley αρουραίων, βάρους 250-280 gr και τοποθετήθηκαν σε πλάκες 24 οπών που περιείχαν θρεπτικό υλικό καλλιέργειας M-199. Ακολούθησε επώαση σε συνθήκες 95% αέρα και 5% CO₂ στους 37° C, υπό ανάδευση, αρχικά για μια ώρα προκειμένου να επιτευχθεί σταθερή βασική έκκριση ντοπαμίνης από τους ιστούς. Στη συνέχεια κάθε 20 λεπτά πραγματοποιήθηκε συλλογή δείγματος από το υπερκείμενο της καλλιέργειας. Μετά από επεξεργασία των δειγμάτων με ενεργοποιημένη μεθειϊκά όξινη αλούμινα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση ντοπαμίνης στα δείγματα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Τα πρώτα τρία δείγματα (20-60 λεπτά) αποτέλεσαν τη βασική απελευθέρωση ντοπαμίνης. Στο τέταρτο δείγμα της καλλιέργειας γίνεται προσθήκη στο θρεπτικό υλικό της ουσίας επίδρασης [σωματοστατίνη 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M, BIM-23014 (SSTR2 αγωνιστής) 10⁻⁴ και 10⁻⁵ M, CYN-154806 (SSTR2 ανταγωνιστής) 10⁻⁴ M-σωματοστατίνη 10⁻⁴ M, L-797.591 (SSTR1 αγωνιστής) 10⁻⁴ και 10⁻⁵ M), L-796.778 (SSTR3 αγωνιστής) 10⁻⁴ M], και ακολούθησε συλλογή άλλων 3 ή 4 δειγμάτων. Τα τρία πρώτα δείγματα σε κάθε πείραμα αποτέλεσαν τη βασική έκκριση ντοπαμίνης με την οποία συγκρίνονται τα επόμενα. Τα επίπεδα απελευθέρωσης ντοπαμίνης αυξήθηκαν κατά συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο μετά την επίδραση της

σωματοστατίνης. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική συγκρινόμενη με τα επίπεδα της βασικής απελευθέρωσης. Η προσθήκη του ανταγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων CYN-154806 στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας παράλληλα με την σωματοστατίνη, εμπόδισε την αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης, ενώ αντίθετα η επίδραση του BIM-23014, εκλεκτικού αγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων, εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης ντοπαμίνης. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων SSTR1 συντέλεσε επίσης στην αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή, ενώ το εκλεκτικό προς τους SSTR3 υποδοχείς ανάλογο, δεν είχε καμία δράση. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν για πρώτη φορά ότι η σωματοστατίνη μέσω ενεργοποίησης των SSTR1 και SSTR2 υποδοχέων μπορεί να παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην απελευθέρωση ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή.

Λέξεις κλειδιά : Νευροπεπτίδια, νευρορυθμιστές, σωματοστατίνη, ντοπαμίνη, υποδοχείς σωματοστατίνης, αμφιβληστροειδής.

Summary

Somatostatin is a cyclic neuropeptide, which mediate diverse actions in the central and peripheral nervous systems. In the retina, somatostatin is localized in amacrine cells in the inner plexiform layer, in displaced amacrine cells and in some types of ganglion cells. Five somatostatin receptor subtypes have been recently cloned, namely SSTR₁₋₅ and their localization in the retina studied (Thermos, 2003). Yet, the role of somatostatin in the retina remains to be ascertained. Immunohistochemical studies support the colocalization of the SSTR1 and SSTR2 receptors with the enzyme tyrosine hydroxylase, the marker for dopamine, in amacrine dopaminergic cells. Dopamine is one of the major neuromodulators in visual processes and in retinal circuitry. The aim of the present study was to determine the possible role of somatostatin as a regulator of dopamine release in rat retina. Retinas from female Sprague-Dawley rats (250-280 g) were employed. Retinas were detached and placed in a 24 well-plate which contained M-199 medium and incubated in a culture incubator at 37 °C (95% air and 5% CO₂) under shaking conditions for one hour in order to stabilize the release of dopamine from the tissues. Subsequently, samples were collected (medium) from the culture every 20 min. The samples were treated with acidic activated alumina and the concentration of dopamine in each sample determined by high performance liquid chromatography (HPLC), in combination with an electrochemical detector. The three first samples (20-60 minutes) represent the basal release of dopamine. In the fourth incubation, pharmacological agents were added [somatostatin (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M), or specific analogs BIM-23014 (SSTR2 agonist, 10⁻⁴, 10⁻⁵ M), CYN-154806 (SSTR2 antagonist 10⁻⁴ M with somatostatin 10⁻⁴ M), L-797.591 (SSTR1 agonist, 10⁻⁴ and 10⁻⁵ M), L-796.778 (SSTR3 agonist, 10⁻⁴ M)], and three to four more samples collected. Somatostatin increased dopamine levels in a concentration-dependent manner. The increase was statistical significant as compared to the basal release. The addition of the SSTR2 antagonist CYN-154806 blocked the somatostatin induced increase of dopamine, while the SSTR2 agonist BIM-23014 mimicked the somatostatin effect. Also the activation of SSTR1 receptors evoked increase of dopamine release, while activation of SSTR3 receptors had no effect. These results support for the first time a regulatory role for somatostatin in the release of dopamine in rat retina.

Key words: neuropeptides, neuromodulators, somatostatin, dopamine, somatostatin,
receptors, retina

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ

Η σωματοστατίνη (somatostatin, SST) είναι ένα κυκλικό ρυθμιστικό νευροπεπτίδιο το οποίο ανακαλύφθηκε τυχαία κατά την διάρκεια μελέτης αναζήτησης ρυθμιστικών παραγόντων που επηρεάζουν την έκκριση της αυξητικής ορμόνης GH (Growth Hormone, σωματοτροπίνη), (Olias, 2004). Η ουσία εμφανίστηκε να αναστέλλει την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης, από τον υποθάλαμο της αδενούπόφυσης αρουραίου (Krulich et al, 1968). Το 1973 ο Brazeau και οι συνεργάτες του απομόνωσαν και ταυτοποίησαν ένα κυκλικό υποθαλαμικό πεπτίδιο 14^{ov} αμινοξέων τη σωματοστατίνη-14. Το πεπτίδιο αυτό βρέθηκε να αναστέλλει την έκκριση της GH από τα κύτταρα της αδενούπόφυσης αρουραίου σε απομονωμένες καλλιέργειες (Brazeau et al, 1973).

Από τότε οι φυσιολογικές της δράσεις καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται στις δράσεις της, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών εργαστηρίων. Σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν δυο βιολογικά δραστικές μορφές σωματοστατίνη : η σωματοστατίνη-14 (SST-14) η οποία περιγράφεται στον υποθάλαμο (Brazeau et al, 1973, Olias, 2004) και η σωματοστατίνη-28 (SST-28) η οποία ανακαλύφθηκε αργότερα στα σπλάχνα (Pradayrol et al, 1980, Olias, 2004). Τα δυο βιοδραστικά πεπτίδια SST-14 και SST-28 παράγονται από διαφορετικά SST κύτταρα και δρουν ως νευροδιαβιβαστές, ενδοκρινικοί και παρακρινικοί ρυθμιστές ή περισσότερο διαμέσου της κυκλοφορίας επηρεάζουν φυσιολογικές λειτουργίες όπως η κυτταρική έκκριση, η νευρορύθμιση, η συσταλτικότητα των λείων μυών των αγγείων, η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, η κυτταρική ανάπτυξη και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Reichlin, 1983, Patel, 1999). Η SST φαίνεται να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία αρκετών ασθενειών όπως νεοπλασίες, επιληψία, φλεγμονές, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος του Alzheimer και το AIDS (Epelbaum et al, 1994, Patel, 1999). Ο μεγάλος αριθμός φυσιολογικών δράσεων καθώς και η εκλεκτικότητα του μορίου οφείλεται στην αλληλεπίδραση του με ειδικούς σωματοστατινεργικούς υποδοχείς της μεμβράνης του κυττάρου στόχου.

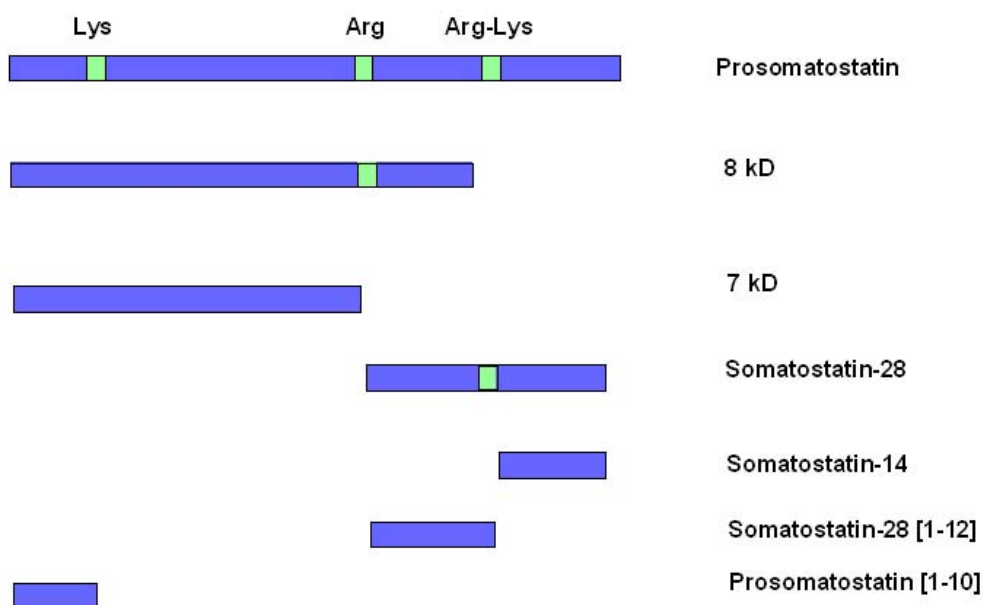
1.1.1 Βιοσύνθεση SST

Όπως και οι λοιπές πρωτεϊνικές ορμόνες έτσι και η SST συντίθενται από ένα μεγάλο αρχικό πρόδρομο μόριο την προπροσωματοστατίνη (preproSST) το οποίο διασπάται ενζυμικά για να δώσει πολλά ώριμα προϊόντα (Patel, 1999). Η δομή της preproSST έχει αποσαφηνιστεί βάσει της αλληλουχίας του συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) σε αρουραίο και άνθρωπο (Goodman et al, 1983, Shen et al, 1982). Το αρχικό προϊόν μετάφρασης preproSST δεν μπορούσε να απομονωθεί από κύτταρα εφόσον η αλληλουχία του σηματοδοτικού πεπτιδίου αποσπάται μετα-μεταφραστικά υπό φυσιολογικές συνθήκες, όταν το νεοσυντιθέμενο πεπτίδιο εισέρχεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου υφίσταται περαιτέρω τροποποιήσεις. Έτσι το cDNA αποτέλεσε το μόριο κλειδί για την αποσαφήνιση της δομής της preproSST εφόσον αποτελεί αντίγραφο δύο αλυσίδων του αγγελιοφόρου RNA (mRNA), (Larsen, 1995).

Η preproSST των θηλαστικών με πρωτεολυτική διάσπαση παρέχει την προσωματοστατίνη (proSST), η οποία αποτελείται από 92 αμινοξέα και παρουσιάζει εξαιρετική ομολογία ανάμεσα στα διάφορα είδη. Το πεπτίδιο είναι πανομοιότυπο στον άνθρωπο και στο χοίρο ενώ διαφέρει στις θέσεις 43 και 74 με αυτό του αρουραίου (Larsen 1995), (σχήμα 1). Η proSST υφίσταται ενζυμική επεξεργασία μετα-μεταφραστικά παράγοντας διάφορα προϊόντα ωρίμανσης (Patel et al, 1997, Patel&O'Neil, 1988, Rabban&Patel, 1990).

Η SST βρέθηκε ότι περιέχει δύο μόρια κυστεΐνης τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό (σχήμα 2), (Δομή σωματοστατίνης και αναλόγων, Παράρτημα Α). Ο δεσμός αυτός είναι σημαντικός για την βιολογική δραστηριότητα του μορίου, όπως επίσης και τα αμινοξέα στις θέσεις 6 και 9, τα οποία περιέχονται στη κυκλική δομή του μορίου. Δομικές μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας χαρακτηριστικής διβασικής θέσης πρωτεόλυσης της proSST στο καρβοξυτελικό άκρο, αυτής αργινίνης – λυσίνης (Arg-Lys) δίπλα στην αλληλουχία της SST-14. Σχάση στη θέση αυτή παράγει την σωματοστατίνη -14 (SST-14) και το αμινοτελικό πεπτίδιο proSST 1-76 (8kDa), ενώ πέψη σε μια μονοβασική θέση πρωτεόλυσης αργινίνης παράγει την σωματοστατίνη-28 (SST-28) και αμινοτελικό πεπτίδιο proSST 1-63 (7kDa). Πέρα από την SST-14 και την SST-28 τα οποία αποτελούν τις βιολογικά δραστικές δομές του μορίου της SST και τα οποία προέρχονται από την επεξεργασία του μορίου της

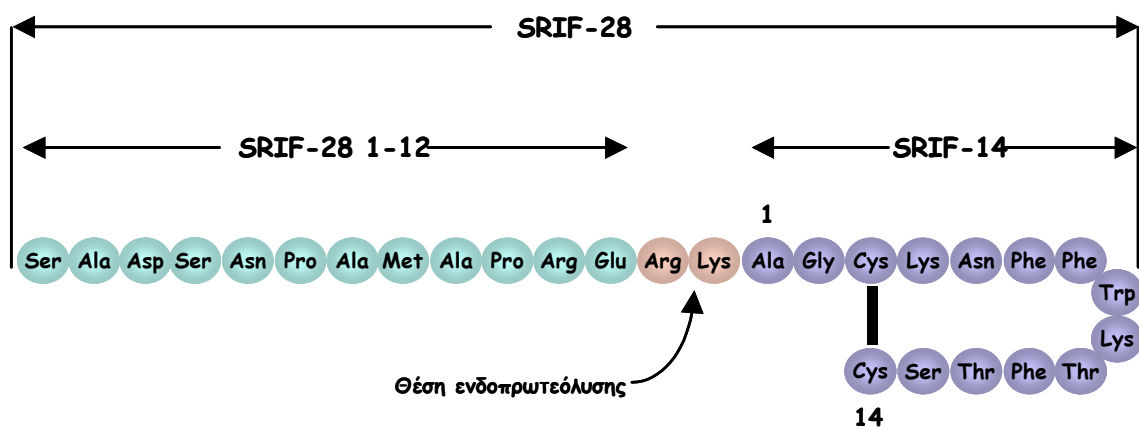
proSST στο καρβοξυτελικό άκρο, υπάρχει μια επιπλέον μονοβασική θέση πρωτεόλυσης λυσίνης (Lys) στο αμινοτελικό άκρο του μορίου. Πέψη στη θέση αυτή οδηγεί στη παραγωγή του δεκαπεπτιδίου proSST 1-10 (1kDa) ή αντρίνη το οποίο δεν φέρει κάποια γνωστή βιολογική δράση (Patel et al, 1988, Patel&O’Neil 1988, Bersani et al, 1989, Patel, 1997).



Σχήμα 1 : Σχηματική αναπαράσταση της proSST των θηλαστικών, των διβασικών και μονοβασικών θέσεων ενζυμικής επεξεργασίας και των γνωστών προϊόντων διάσπασης.

Τα δύο βιοδραστικά πεπτίδια SST-14 και SST-28 συντίθεται σε ποικίλες ποσότητες από διαφορετικά κύτταρα που παράγουν SST σύμφωνα με διαφορετικές επεξεργασίες του πρόδρομου μορίου. Έτσι η SST-14 υπερισχύει στις νησίδες του παγκρέατος, το στομάχι και το νευρικό ιστό ενώ αποτελεί τη μοναδική μορφή σωματοστατίνης στο αμφιβληστροειδή, τους περιφερειακούς και εντερικούς νευρώνες. Η SST-28 αποτελεί το 20 με 30% της συνολικής ανοσοδραστικής σωματοστατίνης στον εγκέφαλο, ενώ δεν είναι ξεκάθαρο αν παράγεται παράλληλα με την SST-14 ή αν παράγεται σε διαφορετικούς νευρώνες. Η εντερική βλέννη παράγει την SST-28 και φαίνεται να αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής αυτού του πεπτιδίου (Patel, 1999).

Οι ποικίλες μορφές της SST στα θηλαστικά προέρχονται όλες από το κοινό πρόδρομο μόριο της preproSST. Στα ψάρια όμως υπάρχουν δύο διαφορετικά γονίδια, ένα αντίστοιχο της preproSST των θηλαστικών, από το οποίο προέρχεται η SST-14 και ένα άλλο preproSST II το οποίο παρέχει μία αμινοτελική μορφή σωματοστατίνης η οποία αποτελεί ομόλογο της SST-28 των θηλαστικών. Εξελικτικά η SST-14 παρουσιάζεται πανομοιότυπη σε ψάρια και θηλαστικά ενώ η SST-28 φέρει ομολογία μόνο κατά 40-60% ανάμεσα σε αυτά τα είδη (Patel, 1999).



Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση των μορίων της σωματοστατίνης-14 και 28.

1.1.2 Περιοχές έκφρασης και απελευθέρωσης SST

Τα κύτταρα που παράγουν SST βρίσκονται ευρέως κατανεμημένα σε ολόκληρο το κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα, το ενδοκρινικό πάγκρεας και τα σπλάγχνα και σε μικρότερο βαθμό στο θυροειδή, τα νεφρά, τον προστάτη και τον πλακούντα (Reichlin, 1983, Patel, 1999). Η τυπική μορφολογική εμφάνιση των κυττάρων αυτών, είναι αυτή των νευρώνων που φέρουν πολλαπλές δενδριτικές διακλαδώσεις ή αυτής των εκκριτικών κυττάρων με μικρές κυτταροπλασματικές προεκτάσεις (δ κύτταρα), (Finley et al, 1981, Patel, 1999).

Εγκεφαλικές περιοχές πλούσιες σε SST είναι ο υποθάλαμος, οι βαθύτερες ζώνες του φλοιού, όλες οι μεταιχμιακές δομές, οι βασικές αισθητικές οδοί και τα βασικά γάγγλια. Επιπρόσθετα SST παράγουν σε μικρές ποσότητες μετά από ενεργοποίηση κύτταρα όγκων, κύτταρα ανοσολογικού και φλεγμονής (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, θυμικά και επιθηλιακά κύτταρα), τα νεφρά, ο αμφιβληστροειδής αλλά και ολόκληρο το οπτικό σύστημα (Aguila MC, 1994, Patel, 1999).

Η απελευθέρωση της SST από τους νευρώνες και τα εκκριτικά κύτταρα εξαρτάται συνήθως από μεμβρανική εκπόλωση ή αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και διεγείρεται από ποικιλία ορμονών, αυξητικών παραγόντων, θρεπτικών συστατικών και εκκριτικών ιόντων (Patel, 1999, Olias, 2004).

1.1.3 Δράσεις SST στα διάφορα συστήματα

Στον **εγκέφαλο** η SST δρα ως νευροδιαβιβαστής με επίδραση σε λειτουργίες του γνωστικού, κινητικού, αισθητικού και αυτόνομου νευρικού συστήματος. Επηρεάζει λειτουργίες όπως η μάθηση, η μνήμη, η κινητικότητα και η θερμορύθμιση (Reichlin, 1983, Patel, 1999). Παρουσιάζει μια γενική ανασταλτική δράση στην απελευθέρωση των ορμονών νορεπινεφρίνη, TRH, CRH, καθώς και της ενδογενούς SST από τον υποθάλαμο. Αναστέλλει επίσης την βασική και μετά από ενεργοποίηση απελευθέρωση της GH και των LH, FSH ενώ δεν έχει καμία επίδραση στην απελευθέρωση της προλακτίνης (PRL) ή της ACTH σε φυσιολογικές καταστάσεις, όμως δρα κατασταλτικά στην αύξηση των επιπέδων ACTH στη νόσο του Addison καθώς και σε όγκους που παράγουν ACTH. Ενώ αντίθετα στο ΚΝΣ (ραβδωτό σώμα βασικών γαγγλίων) δρα διεγερτικά στην απελευθέρωση της ντοπαμίνης (Πίνακας 1), (Thermos et al, 1996).

Στη **γαστρεντερική οδό** αναστέλλει ουσιαστικά την απελευθέρωση όλων των ορμονών στα σπλάγχνα με αποτέλεσμα την αναστολή όλων των γαστρικών εκκρίσεων (γαστρικού οξέος, πεψίνης, χολής), μείωση του ρυθμού γαστρικής κένωσης καθώς και της κινητικότητας του γαστρεντερικού σωλήνα (Patel, 1999). Στο **πάγκρεας** η SST αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης από τα β και α κύτταρα του παγκρέατος αντίστοιχα (Low, 2004).

Στον **θυροειδή** αναστέλλει την προκαλούμενη από την TRH απελευθέρωση των θυροειδικών ορμονών T₃ και T₄ καθώς και της καλσιτονίνης από τα κύτταρα του

θυροειδούς. Στα **νεφρά** αναστέλλει την απελευθέρωση ρενίνης και την προκαλούμενη από την ADH απορρόφηση νερού. Επίσης παρεμποδίζει την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων (IGF1, EGF, PDGF) και κυτοκινών (IL-6, IFN-γ) (Eliott et al, 1998, Patel, 1999).

Άλλες δράσεις της SST αποτελούν η αγγειοσυστολή, ειδικά στην σπλαχνική κυκλοφορία, η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυττάρων φλεγμονής, εντερικής βλέννης και πρόδρομων κυττάρων των οστών. Η μεγάλη αυτή ποικιλία δράσεων της SST μπορεί να εξηγηθεί μέσω της διέγερσης διαφορετικών υποτύπων του υποδοχέα (Patel, 1999, Olias, 2004).

Δράσεις της σωματοστατίνης

Πρόσθια υπόφυση	GH ↓ TSH ↓ ACTH ↓ Prl ↓	Εξωκρινικό πάγκρεας Γαστρεντερικός αωλήνας	Ένζυμα ↓ Δικαρβονικά ↓ Γαστρίνη ↓ Σεκρετίνη ↓ CCK-πανκρεοζυμίνη ↓ VIP ↓ GIP ↓ Μοτουλίνη ↓ Γαστρικό οξύ ↓ Πεψίνη ↓ Ρυθμός εκκένωσης γαστρικού ↓ Κινητικότητα ↓
Κ.Ν.Σ.	Νευροδιαβιβαστές ↓ ↑ CRH ↓ TRH ↓ Σωματοστατίνη ↓ Διέγερση νευρώνων ↑ Εγρήγορηση ↑ Tonic-clonic seizures ↑ Λήψη τροφής ↑ ↓ Ύπνος REM ↑		
Ενδοκρινικό πάγκρεας	Ινσουλίνη ↓ Γλουκαγόνο ↓ Παγκρεατικά πολυπεπτίδια ↓		Απορρόφηση ιόντων ↓ Απορρόφηση τροφών ↓ Πολλ/σμός βλεννογόνου ↓
Θυροειδής	T3 ↓ T4 ↓ Καλσιτονίνη ↓	Επινεφρίδια	Ροή αίματος ↓ Αλδοστερόνη ↓ Κατεχολαμίνες ↓
Νεφρό	Ρενίνη ↓ Απορρόφηση νερού ↓		

Τροποποίηση από Tannenbaum & Epelbaum, 2000

Πίνακας 1 : Δράσεις της SST στα διάφορα συστήματα

1.2 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

1.2.1 Γενικά

Η σωματοστατίνη ασκεί μεγάλη ποικιλία δράσεων μέσω της δέσμευσης της με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς (SST Receptors, SSTRs). Οι υποδοχείς αυτοί αρχικά αναγνωρίστηκαν σε κυτταρικές σειρές κυττάρων υπόφυσης GH_4C_1 με μελέτες αυτοραδιογραφίας (Schonbrunn&Tashjian, 1978). Ακολούθησαν περαιτέρω έρευνες σε διαφορές κυτταρικές σειρές και ιστούς, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε πληθώρα τεχνικών όπως *in vivo* και *in vitro* αυτοραδιογραφία και μελέτες μεμβρανικής δέσμευσης, κατά τις οποίες διαπιστώθηκε ότι οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται στον εγκέφαλο, τα σπλάχνα, το ενδοκρινικό και το εξωκρινικό πάγκρεας, το θυροειδή, τα νεφρά, τα επινεφρίδια και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Thermos&Reisine, 1988, Thermos et al, 1989). Τα δύο βιοδραστικά πεπτίδια SST-14 και SST-28 αλληλεπιδρούν με αυτούς τους υποδοχείς με εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια (Olias, 2004).

1.2.2 Κλωνοποίηση SSTR

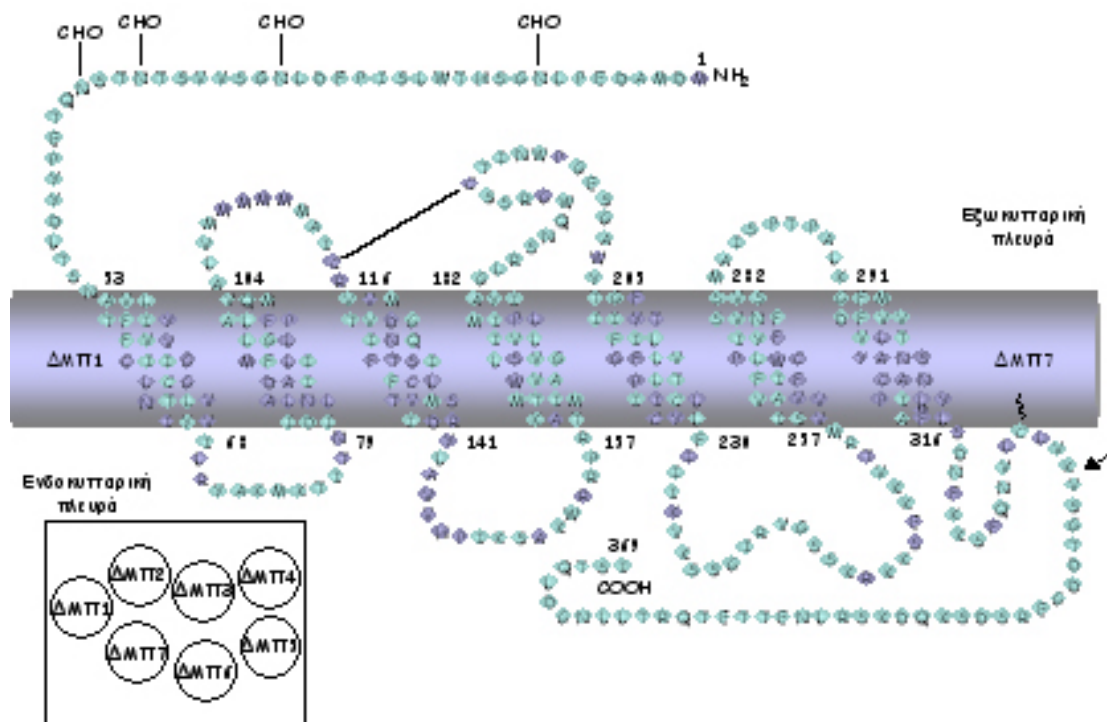
Ακριβώς 20 χρόνια μετά την ανακάλυψη της SST, επετεύχθη με μοριακή κλωνοποίηση η αποσαφήνιση της δομής των SSTR (Yamada et al, 1992, Patel, 1999). Η κλωνοποίηση των υποδοχέων της SST στις αρχές του 1990 αποτέλεσε σημαντικό βήμα στην αποσαφήνιση των σηματοδοτικών συστημάτων στα οποία μετέχει. Έκτοτε ακολούθησε σημαντικός αριθμός μελετών μέσω των οποίων γίνεται προσπάθεια αποσαφήνισης του ρόλου κάθε υποδοχέα στην μεταγωγή σήματος. Οι ερευνητές προσπάθησαν να βρουν την συσχέτιση ανάμεσα στους κλωνοποιημένους και φυσικούς υποδοχείς προκειμένου να ορίσουν τις εξειδικευμένες δράσεις κάθε ειδικού υποτύπου. Σήμερα έχουν γίνει γνωστά δεδομένα σχετικά με την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των SSTR στο ΚΝΣ (Braumeister&Meyerhof, 2000a, Kraus et al, 2000, Olias, 2004). Επόμενες μελέτες έχουν προσθέσει αρκετή γνώση όσο αφορά τις σηματοδοτικές ιδιότητες των διαφόρων υποτύπων υποδοχέων γεγονός το οποίο επέτρεψε τον εντοπισμό σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο της θέσης τους στο ΚΝΣ αρουραίου (Csaba&Dournaud, 2001). Επιπλέον η ανάπτυξη τα

τελευταία χρόνια ειδικών αντισωμάτων έναντι όλων των υποτύπων SSTR συνετέλεσε σημαντικά στην αποσαφήνιση των ιδιοτήτων τους.

Οι υποδοχείς αυτοί βρέθηκε να κωδικοποιούνται από πέντε διαφορετικά γονίδια, τα οποία στον άνθρωπο βρίσκονται σε πέντε διαφορετικά χρωμοσώματα και να συνιστούν μια καινούργια οικογένεια υποδοχέων, **τους σωματοστατινεργικούς υποδοχείς**. Το γεγονός αυτό είχε υποτεθεί προηγουμένως βάσει φαρμακολογικών και βιοχημικών μελετών (Thermos&Reisine, 1988, Reisine, 1995, Patel, 1999). Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται ως SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 και SSTR5 σύμφωνα με η σειρά με την οποία προσδιορίστηκαν (Olias, 2004).

Τα γονίδια των SSTR 1,3,4 και 5 στερούνται κλασικών ιντρονίων, ενώ το γονίδιο του SSTR2 φέρει ένα κρυφό ιντρόνιο στο 3' άκρο της κωδικοποιητικής αλληλουχίας το οποίο μέσω ματίσματος του mRNA, παρέχει δύο ισομορφές για τον SSTR2 υποδοχέα τους SSTR2A και SSTR2B. Ο SSTR2A είναι κατά 23 αμινοξέα μακρύτερος από τον SSTR2B (25 αμινοξέα στον SSTR2B και 38 αμινοξέα στον SSTR2A). Οι δύο ισομορφές διαφέρουν μόνο σε ότι αφορά την αμινοξική αλληλουχία στο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου (Vanetti et al, 1992, Florio et al, 1996).

Συμπερασματικά λοιπόν διαπιστώθηκε η ύπαρξη έξι συνολικά SSTR καθένας από τους οποίους φέρει επτά α διαμεμβρανικές έλικες και τρεις ενδοκυττάριους και εξωκυττάριους βρόγχους, δομή χαρακτηριστική για τους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein couple receptors, GPCRs). Τα γονίδια των SSTR κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες ποικίλουν σε μήκος και φέρουν από 356 έως 391 κατάλοιπα αμινοξέων. Η μεγαλύτερη ομολογία στην αλληλουχία αυτών των πρωτεϊνών παρατηρείται στις διαμεμβρανικές έλικες (55-70%) ενώ διαφέρουν κυρίως στο άμινο και κάρβοξυ-τελικό τμήμα (Reisine, 1995, Patel, 1995, 1999).



Σχήμα 3: Μοντέλο δομής των σωματοστατινεργικών υποδοχέων. Αλληλουχία του hSSTR2 υπότυπου. **CHO:** πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης, 1-7, **Ένθετο:** πιθανή κατανομή στον χώρο των διαμεμβρανικών περιοχών (ΔΜΠ1-7), (—): δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των Cys-115 και Cys-193, **DRY:** αλληλουχία Asp-Arg-Tyr στον τρίτο ενδοκυττάριο βρόγχο για σύζευξη με G-πρωτεΐνες, (●): διατηρημένα αμινοξέα μεταξύ των hSSTR, (▼): σημείο διαφορετικού ματίσματος για τους SSTR2A και 2B στο ποντίκι, (ζ) θέση πρόσδεσης με την κυτταρική μεμβράνη.

Όλοι οι SSTRs που έχουν κλωνοποιηθεί στον άνθρωπο φέρουν την τυπική μοριακή αρχιτεκτονική των GPCRs. Στην έβδομη διαμεμβρανική έλικα απαντάται η εξαιρετικά διατηρημένη αλληλουχία YANSCANPI/VLY, η οποία εμφανίζεται κοινή στον άνθρωπο και σε όλα τα υπόλοιπα είδη, και η οποία αποτελεί το σήμα κατατεθέν αυτής της οικογένειας υποδοχέων. Φέρουν επίσης την εξαιρετικά διατηρημένη αλληλουχία Asp-Arg-Tyr (DRY) στον 3^ο ενδοκυττάριο βρόγχο η οποία αποτελεί το σημείο σύνδεσης με τις G πρωτεΐνες (Patel et al, 1999). Οι πέντε υπότυποι SSTR στον άνθρωπο (human SSTRs, hSSTRs) φέρουν επίσης μια έως τέσσερις θέσεις γλυκοζυλίωσης στο αμινοτελικό τμήμα του 3^{ου} ενδοκυττάριου βρόγχου. Επίσης φέρουν και από τρεις έως οκτώ θέσεις αναγνώρισης για φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την κινάση II της καλμοδουλίνης στο κυτταροπλασματικό καρβοξυτελικό τμήμα του 2^{ου} και 3^{ου} βρόγχου. Οι hSSTRs 1,2,4 και 5 φέρουν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, 12 αμινοξέα κάτω από την 7^η διαμεμβρανική έλικα, το οποίο αποτελεί ενδεχομένως θέση για

ομοιοπολική σύνδεση με το παλμιτικό οξύ της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας έτσι στην δημιουργία του 4^{ου} κυτταροπλασματικού βρόγχου. Ο hSSTR3 στερείται αυτού του καταλοίπου και έτσι εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη κυτταροπλασματική ουρά συγκρινόμενος με τους υπολοίπους (Patel , 1999).

Οι πέντε υπότυποι SSTR παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό δομικής ομολογίας στα διάφορα είδη. Για παράδειγμα εμφανίζεται 94-99% ομοιότητα στην αλληλουχία ανάμεσα στον άνθρωπο και τον ποντικό για τον SSTR1, 93-96% ομοιότητα σε άνθρωπο, αρουραίο, χοίρο και βόδι για τον SSTR2 και 88% για τον SSTR4 σε άνθρωπο και αρουραίο (Patel, 1999). Από τις μέχρι τώρα γνωστές οικογένειες υποδοχέων, οι υποδοχείς οπιοειδών Δ τύπου εμφανίζουν δομική ομοιότητα κατά 37% με τους SSTRs ποντικού.

1.2.3 Εντοπισμός των SSTR στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ

Η κατανομή των SSTR έχει χαρακτηριστεί σε ιστούς ανθρώπου και τρωκτικών καθώς και σε κύτταρα όγκων, με τη χρήση διαφόρων τεχνικών συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού του κυτταροπλασματικού mRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR), της ανάλυσης κατά Northern (Northern blot) της τεχνικής προστασίας της RNAσης (RNA protection assay) και της in situ υβριδοποίησης (Bruno et al, 1993, Yamada et al, 1992, Kong et al, 1994, Reisine, 1995, Thoss et al, 1996, Patel, 1995, 1999). Η χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι κάθε υπότυπου SSTR τα τελευταία χρόνια, έχει ανοίξει νέους ορίζοντες όσο αφορά τον ευθύ εντοπισμό αυτών, με τη χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας. Μέσω αυτών των τεχνικών αποκαλύφθηκε ότι οι διάφοροι υπότυποι SSTR κατανέμονται ευρέως σε ολόκληρο το κεντρικό και το περιφερειακό νευρικό σύστημα κατά διαφορετικό αλλά πολλές φορές επικαλυπτόμενο τρόπο, ενώ φαίνεται να υπάρχει εκλεκτικότητα ανάλογα με το είδος και τον ιστό (Reisine, 1995, Patel, 1995, 1997, 1999). Στον αρουραίο το mRNA για τους SSTR1-5 εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό, το ραβδωτό σώμα, την αμυγδαλή, τον οσφρητικό φλοιό και την προ-οπτική περιοχή (Kong, 1994, Meyerhof, 1992, Yamada, 1992, Patel, 1999).

Η έκφραση των SSTR1,2,3,4 στον απιοειδή φλοιό ο οποίος είναι ο πρωτογενής οσφρητικός φλοιός των τρωκτικών, υποδεικνύει ότι η SST παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση και τροποποίηση της πρωτογενούς αισθητικής πληροφορίας και ότι σε

αυτήν τη δράση μετέχουν πολλοί από τους υποδοχείς της (Reisine, 1995, Florio et al, 1996). Στον υποθάλαμο ο SSTR1 εμφανίζεται να υπερέχει ενώ ακολουθούν κατά σειρά οι SSTR2,3,4 και 5 (Kumar&Patel, 1998). Το γεγονός ότι στον υποθάλαμο απαντώνται όλοι οι SSTRs, υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή της SST σε αυτόνομες και ενδοκρινικές λειτουργίες (Tannenbaum&Epelbaum, 2000).

Τα mRNAs των σωματοστατινεργικών υποδοχέων έχουν αναγνωριστεί και σε περιφερειακούς ιστούς. Στην υπόφυση εμφανίζονται όλοι οι SSTRs με τον SSTR2 να κυριαρχεί ακολουθούμενος από τους SSTR1 και 3, ενώ οι SSTR4 και SSTR5 απαντώνται σε μικρότερα ποσοστά (Bruno et al, 1993). Όλοι οι SSTRs έχουν εντοπιστεί στο στομάχι ανθρώπου (Le Rumancer et al, 1996). Στις νησίδες του παγκρέατος εντοπίζονται οι SSTR2 και SSTR5 όπου ο SSTR5 είναι υπεύθυνος για την αναστολή της ινσουλίνης και ο SSTR2 για την αναστολή της γλυκαγόνης (Low, 2004). Υψηλά επίπεδα SSTR3 εμφανίζονται στο σπλήνα και το ήπαρ, SSTR4 τους πνεύμονες, την καρδιά και τον πλακούντα. SSTR1,2 και 3 στα σπερματοκύτταρα και τα κύτταρα Sertoli των όρχεων (Bruno et al, 1993, Patel, 1995, Caron, 1997, Patel, 1999). mRNAs για τους SSTR1,2A,3 εκφράζονται σε φυσιολογικό θύμο αδένα ανθρώπου. Τέλος κύτταρα ανοσοποιητικού (μακροφάγα, T και B λεμφοκύτταρα) όπως και ενεργοποιημένα κύτταρα θύμου εκφράζουν επιλεκτικά SSTR2 σε ποντικό (Elliot et al, 1994, 1998, Patel, 1999).

1.2.4 Ενδοκυτταρικά εκτελεστικά συστήματα μεταγωγής σήματος

Οι σωματοστατινεργικοί υποδοχείς αλληλεπιδρούν με πολλαπλά ενδοκυτταρικά εκτελεστικά συστήματα του κυττάρου στόχου, μέσω της σύνδεσης τους με G πρωτεΐνες (Reisine&Bell, 1995, Florio et al, 1996, Schettini, 1996, Csaba et al, 2001). Οι G πρωτεΐνες είναι ετεροτριμερικά συστήματα πρωτεϊνικών υπομονάδων γνωστών ως α , β και γ υπομονάδες. Απουσία ενεργοποίησης η G πρωτεΐνη βρίσκεται στην ανενεργό μορφή της συνδεδεμένη με GDP. Δέσμευση της SST στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα της αλλαγής της στερεοδιάταξης αυτού και τότε το σύμπλοκο SST- SSTR δεσμεύεται με την G πρωτεΐνη. Η δέσμευση αυτή επάγει την απελευθέρωση του δεσμευμένου GDP και επιτρέπει την δέσμευση GTP σε αυτήν. Τότε η α υπομονάδα που φέρει GTP ($G\alpha$ -GTP) δίσταται από τις β και γ υπομονάδες. Τόσο οι

απελευθερωμένες β και γ υπομονάδες, όσο και η δεσμευμένη με GTP α υπομονάδα αλληλεπιδρούν με εκτελεστικά συστήματα του κυττάρου στόχου (Stryer, 1988).

Οι G πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες ή μη ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκίτη (pertussis toxin, PTX). Η PTX καταλύει την ADP-ριβοζυλίωση της πλευρικής αλυσίδας μιας ειδικής κυστεΐνης της α υπομονάδας των Gi (Giα) και Go (Goα) ανασταλτικών G πρωτεϊνών (Stryer, 1988, Schettini, 1996).

Πολλαπλές τεχνικές προσέγγισης όπως ανοσοαποτύπωση και ανοσοκαθίζηση με ειδικά αντισώματα έναντι διαφορετικών υπομονάδων G πρωτεϊνών με ολιγονουκλεοτίδια αντιορού έναντι των PTX-μη ευαίσθητων Ga υπομονάδων, αποδεικνύουν ότι οι SSTRs αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς τύπους G πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων : Gai₁, Gai₂, Gai₃, Gao_A, Gao_B, Gβ₁, Gβ₃₆, Gγ₂, Gγ₃ (Kleuss et al, 1991, 1992, 1993, Law et al, 1991, Law&Reisine, 1992, Degtiar et al, 1996, Csaba&Dournaud, 2001).

Η παρουσία πολλών υπότυπων SSTR σε διάφορους ιστούς και κυτταρικές σειρές, καθιστούσε εξαιρετικά δύσκολο να αποσαφηνιστεί ποιος υποδοχέας εμπλέκεται με κάθε εκτελεστικό σύστημα. Οι επιστήμονες προσπάθησαν να υπερπηδήσουν αυτό το πρόβλημα με την δημιουργία ανασυνδιασμένων υποδοχέων οι οποίοι εκφράζονταν σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές και την χρήση αγωνιστών και ανταγωνιστών για τον καθένα από αυτούς (Olias, 2004).

Μέσω της σύνδεσης τους με τις G πρωτεΐνες οι SSTRs ενεργοποιούν ένα μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών εκτελεστικών συστημάτων στα οποία περιλαμβάνονται : η αδενυλική κυκλάση (adenyl cyclase, AC), κανάλια ιόντων Ca⁺⁺ και K⁺, η αντλία Na/K⁺, η γουανυλική κυκλάση (guanyl cyclase, GC), η φωσφολιπάση C (phospholipase C, PLC) και η φωσφολιπάση A2, η MAP κινάση (mitogen-activated protein kinase ,MAPK), πρωτεϊνικές φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης (protein serine/threonine phosphatases, PPs) και φωσφοτυροσυλική φωσφατάση (protein tyrosine phosphatases, PTPs), (Patel, 1998, 1995, Reisine, 1995).

1.3 ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

1.3.1 Γενικά

Ο αμφιβληστροειδής είναι ένας λεπτότατος, διαφανής ιστός πάχους μισού περίπου χιλιοστού ο οποίος καλύπτει το εσωτερικό τμήμα του οφθαλμού. Αποτελεί το πιο σημαντικό τμήμα του ματιού στο οποίο πραγματοποιείται η μετατροπή των φωτεινών ερεθισμάτων σε ηλεκτρικά σήματα. Στη συνέχεια τα σήματα αυτά μέσω του οπτικού νεύρου μεταβιβάζονται στο έξω γονατώδες σώμα και από εκεί στον οπτικό φλοιό (Kahle, 1985, Tessier-Lavinge, 1991).

Ο ιστός αυτός αναπτύσσεται απευθείας από το νευρικό εξώδερμα, δηλαδή την εξειδικευμένη μοίρα του εξωδέρματος από την οποία αναπτύσσεται ο εγκέφαλος και γι' αυτό θεωρείται τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Duke-Elder, 1963, Mann, 1964, Dowling, 1987).

Παρόλο που αποτελεί το πιο σημαντικό τμήμα του οφθαλμού εμφανίζεται σχετικά απλός συγκρινόμενος με άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Περιλαμβάνει μόνο πέντε μεγάλες κατηγορίες νευρώνων, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους κατά ένα περίπλοκο τρόπο, αλλά με μια ανατομικά απλή στοιβαδωτή διάταξη. Οι νευρώνες αυτοί παρατάσσονται με τη μορφή οριζοντίων στοιβάδων και διαχωρίζονται από δυο ζώνες στις οποίες βρίσκονται οι συναπτικές συνδέσεις. Η απλότητα την οποία έχει ο αμφιβληστροειδής συγκρινόμενος με άλλες περιοχές του ΚΝΣ τον καθιστά πρότυπο μοντέλο μελέτης του. Η κυτταρική επικοινωνία ανάμεσα στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς αποτελεί τη βάση για τη σωστή όραση, ενώ εκφυλισμός και μεταβολικές αλλαγές οι οποίες αλλοιώνουν αυτή την επικοινωνία μπορούν να οδηγήσουν σε οπτική εξασθένηση ή ακόμα και τύφλωση (Brecha, 1983, Dowling, 1987, Pavlidis et al, 2000).

Ο αμφιβληστροειδής περιέχει αισθητικούς νευρώνες οι οποίοι αποκρίνονται στο φως και πολύπλοκα νευρωνικά κυκλώματα τα οποία δημιουργούν το πρώτο στάδιο διαμόρφωσης του ειδώλου. Τελικά ένα ηλεκτρικό σήμα μεταβιβάζεται διαμέσου του οπτικού νεύρου στον εγκέφαλο για περαιτέρω επεξεργασία και οπτική αντίληψη (Kolb, 2003).

Ενώ κάποιος θα περίμενε οι φωτοϋποδοχείς να βρίσκονται στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς, στην ζώνη που εκτείνεται προς το υαλώδες σώμα, τα αισθητικά αυτά κύτταρα είναι τοποθετημένα στο πίσω μέρος του αμφιβληστροειδούς. Για να

μπορέσει λοιπόν το φως να φτάσει τους φωτοϋποδοχείς χωρίς να απορροφηθεί ή να διαχυθεί σε μεγάλο βαθμό (γεγονός το οποίο θα παραμόρφωνε την εικόνα), οι εγγύς νευρικές ίνες είναι **αμύελες** και επομένως σχετικά διαφανείς (Kandel et al, 2000). Έτσι οι φωτεινές ακτίνες περνούν ολόκληρο τον αμφιβληστροειδή προκειμένου να συναντήσουν τα μόρια χρωστικής και να τα διεγείρουν. Αυτό συμβαίνει διότι οι μεμβράνες των φωτοϋποδοχέων που παράγουν τις χρωστικές πρέπει να βρίσκονται σε επαφή με **το μελάγχρουν επιθήλιο** (retinal pigment epithelium, RPE) του ματιού το οποίο εξασφαλίζει μια σταθερή ροή ενός ζωτικού μορίου της **ρετινάλης** ή βιταμίνης A (Kolb, 2003). Η ρετινάλη αποτελεί την φωτοαπορροφητική ουσία των φωτοϋποδοχέων η οποία συνδεόμενη με τη πρωτεΐνη οψίνη σχηματίζει την **ροδοψίνη**. Η ενεργοποίηση της ροδοψίνης αρχίζει με την απορρόφηση φωτός το οποίο προκαλεί την αλλαγή της ρετινάλης από την 11 cis στην all trans μορφή. Ως αποτέλεσμα αυτής της αλλαγής, η ρετινάλη δεν εφαρμόζει πλέον στη θέση πρόσδεσης της οψίνης. Γι' αυτό, η οψίνη μετατρέπεται σε μια ημισταθερή μορφή την μεταροδοψίνη II η οποία είναι ασταθής και διασπάται σε οψίνη και all trans ρετινάλη (βιταμίνη A). Η όλο trans ρετινάλη μεταφέρεται στη συνέχεια στα κύτταρα του μελάγχρουν επιθηλίου όπου ανάγεται σε όλο trans ρετινόλη. Έτσι η ρετινάλη ανακυκλώνεται στο μελάγχρουν επιθήλιο (Kandel et al, 2000).

Το μελάγχρουν επιθήλιο είναι τοποθετημένο στο πίσω μέρος του αμφιβληστροειδούς και είναι πολύ σκοτεινό εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης μελανίνης που φέρουν τα κύτταρα του. Οι χρωστικές του απορροφούν την περίσσεια των φωτονίων εμποδίζοντας την αντανάκλαση τους πίσω στους φωτοϋποδοχείς γεγονός που θα αλλοίωνε την ποιότητα της εικόνας. Επίσης προστατεύουν τα κύτταρα από υπερβολική έκθεση σε φωτεινή ακτινοβολία, ρυθμίζουν την μεταφορά θρεπτικών συστατικών στους φωτοϋποδοχείς και την φαγοκυττάρωση των εξωτερικών τμημάτων των ραβδοφόρων κύτταρων (Tessier-Lavigne, 1991).

1.3.2 Αμφιβληστροειδής και περιβάλλον

Σε όλα τα είδη ο αμφιβληστροειδής περιέχει τουλάχιστον δυο τύπους φωτοϋποδοχέων τα **ραβδιοφόρα και τα κωνιοφόρα κύτταρα**. Τα κωνιοφόρα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την όραση στο φως της μέρας και σε έντονα χρωματισμένα ερεθίσματα. Τα ραβδιοφόρα κύτταρα διεκπεραιώνουν την όραση την

νύχτα, λειτουργούν στο αμυδρό φως της αυγής και του λυκόφωτος και γενικότερα σε ερεθίσματα τα οποία είναι αδύναμα να διεγείρουν τα κωνιοφόρα κύτταρα (Kolb, 2003).

Στα περισσότερα θηλαστικά οι αμφιβληστροειδείς παρουσιάζουν μια υπεροχή ραβδίων ενώ τα κωνία εμφανίζονται συγκεντρωμένα σε εξειδικευμένες περιοχές. Τα πρωτεύοντα, όπως γεράκια και αετοί, έχουν το **κεντρικό βοθρίο** μια πολύ πλούσια σε κωνία περιοχή χωρίς καθόλου ραβδία στην οποία εστιάζονται τα είδωλα. Το κεντρικό βοθρίο αποτελεί το κέντρο του κεντρικού βόθρου όπου τα κυτταρικά σώματα των εγγύς νευρώνων του αμφιβληστροειδούς έχουν μετατοπισθεί προς τα πλάγια, επιτρέποντας στους φωτοϋποδοχείς της περιοχής να δεχθούν την οπτική εικόνα με την ελάχιστη δυνατή παραμόρφωση (Kolb, 2003). Γι αυτό βολβοί των ματιών μας κινούνται συνεχώς ώστε οι ενδιαφέρουσες εικόνες να προβάλλονται στον κεντρικό βόθρο (Kandel et al, 2000).

1.3.3 Ανατομία και φυσιολογία αμφιβληστροειδούς

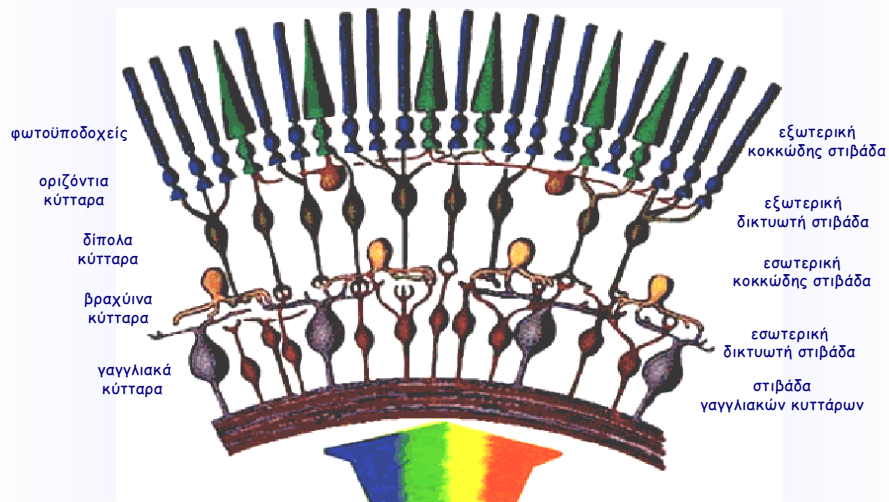
Η κατανόηση της ανατομίας του αμφιβληστροειδούς των πρωτευόντων θηλαστικών είναι απαραίτητη προκειμένου να κατανοήσουμε τη δράση του. Οι τρεις νευρωνικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς περιέχουν τρεις κύριες λειτουργικές κατηγορίες νευρώνων : τους φωτοϋποδοχείς (ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα) οι οποίοι απλώνονται στην πίσω πλευρά του οφθαλμού στην **εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα** (outer nuclear layer, ONL). Η δεύτερη από τις τρεις ζώνες ονομάζεται **εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα** (inner nuclear layer, INL) και περιλαμβάνει από ένα έως τέσσερις τύπους οριζοντίων κυττάρων, 11 τύπους δίπολων κυττάρων και 22 με 30 τύπους βραχύνων κυττάρων (οριζόντια, δίπολα και βραχύινα κύτταρα αποτελούν τους διάμεσους νευρώνες). Οι αριθμοί αυτοί ποικίλουν ανάλογα με το είδος. Η επιφανειακή ζώνη περιλαμβάνει 20 τύπους γαγγλιακών κυττάρων και αποτελεί τη **στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων** (ganglion cell layer, GCL). Όσες από τα γαγγλιακά κύτταρα ταξιδεύουν ως τον εγκέφαλο διαμέσου περισσότερων από ένα εκατομμύριο οπτικών νευρικών ινών. Τα διαστήματα που χωρίζουν αυτές τις τρεις ζώνες είναι ανατομικά διακριτά. Η περιοχή η οποία περιέχει τις συναπτικές συνδέσεις των φωτοϋποδοχέων με τα δίπολα και τους δενδρίτες των οριζοντίων κυττάρων είναι γνωστή ως **εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα** (outer plexiform layer, OPL) και η

περιοχή όπου δίπολα και βραχύινα κύτταρα συνδέονται με τα γαγγλιακά κύτταρα αποτελεί την **εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα** (inner plexiform layer IPL) (Σχήμα 4) (Kolb, 2003).

Κάποιες εξαιρέσεις στην κυτταρική οργάνωση του αμφιβληστροειδούς μπορεί να συμβούν περιστασιακά όπως η εμφάνιση των οριζοντίων και δίπολων κυττάρων στην ONL, των γαγγλιακών κυττάρων στην INL και των βραχύνων κυττάρων στην GCL. Τέτοια κύτταρα αναφέρονται ως μετατοπισμένα. Τα μετατοπισμένα βραχύινα κύτταρα στην GCL αποτελούν ένα γενικό και σταθερό χαρακτηριστικό των περισσότερων αν όχι όλων των αμφιβληστροειδών (Dowling, 1987).

Ο κύριος τύπος στηρικτικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών είναι τα κύτταρα Muller τα οποία είναι νευρογλοιακά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα εκτείνονται κατακόρυφα διαμέσου του αμφιβληστροειδούς από τη βάση του εσωτερικού τμήματος των φωτοϋποδοχέων μέχρι την εσωτερική επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς (Dowling 1987, Stevens&Lowe, 1998).

Δεκάδες ανατομικών μελετών προσπαθούν να διερευνήσουν τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς. Τεχνικές απεικόνισης ειδώλου από την τεχνική χρώσης Golgi η οποία χρησιμοποιήθηκε ένα αιώνα πριν, μέχρι την χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και την χρώση με αντισώματα, έχουν αποκαλύψει το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς αλλά και το πώς τα κύτταρα αυτά συνδέονται για να δημιουργήσουν συνάψεις. Τεχνικές απεικόνισης ειδώλου έχουν αποκαλύψει ηλεκτρικές συνδέσεις μεταξύ κυττάρων και την ταυτότητα και θέση των νευροδιαβιβαστών, υποδοχέων και μεταφορέων. Έτσι σήμερα γνωρίζουμε ότι η οπτική πληροφορία μεταδίδεται με το νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό οξύ από κατακόρυφα μονοπάτια διαμέσου του αμφιβληστροειδούς – από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα και από εκεί στα γαγγλιακά κύτταρα – **κάθετο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος**. Τα οριζόντια και βραχύινα κύτταρα στέλνουν σήματα μέσω μιας ποικιλίας διεγερτικών και ανασταλτικών αμινοξέων (π.χ. γλυκίνη), πεπτιδίων (π.χ. σωματοστατίνη), κατεχολαμινών (π.χ. ντοπαμίνη) και μονοξειδίου του αζώτου (NO) – **οριζόντιο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος** (Kolb, 2003). Η οριζόντια οδός επηρεάζει την μεταβίβαση της πληροφορίας στην κάθετη οδό. Τελικά τα σήματα από οριζόντια και κάθετη οδό μεταβιβάζονται στον εγκέφαλο με το οπτικό νεύρο, το οποίο σχηματίζεται από τους νευράξονες των των γαγγλιακών κυττάρων



Σχήμα 4 : Σχηματική οργάνωση του αμφιβληστροειδούς

1.4 ΟΙ ΝΕΥΡΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ SST, DA ΚΑΙ ΝΟ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

1.4.1 SST και αμφιβληστροειδής

Ανοσοδραστική και βιολογικά ενεργή SST εντοπίστηκε στον αμφιβληστροειδή αρουραίου για πρώτη φορά στη δεκαετία του '70 και στη συνέχεια αναγνωρίστηκε και στον αμφιβληστροειδή άλλων ειδών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Larsen et al, 1995). Η παρουσία της στον αμφιβληστροειδή επιβεβαιώθηκε με τεχνικές mRNA, ραδιοανοσοπροσδιορισμού και ανοσοϊστοχημείας (Thermos, 2003). Η SST εντοπίστηκε πρωταρχικά σε ευρέως πεδίου βραχύινα κύτταρα που δίνουν αποφυάδες οι οποίες διακλαδίζονται στην IPL, σε κύτταρα στη GCL και σε νευρώνες στην INL κάποιος από τους οποίους πιθανώς αποτελούν ενδοπλεγματοειδή κύτταρα (Thermos, 2003). Σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί ανοσοδραστική SST εντοπίστηκε στο εσωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς (Larsen, 1995).

1.4.2 Ρόλος SST στον αμφιβληστροειδή

Η SST στον αμφιβληστροειδή φαίνεται να δρα ως νευροδιαβιβαστής, μιας και συντίθεται σ' αυτόν, αποθηκεύεται στους νευρώνες του και απελευθερώνεται με εκπολωτικά ερεθίσματα παρουσία Ca^{++} , καθώς και ως νευρορυθμιστής ή τροφικός παράγοντας (Thermos, 2003).

Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Zalutsky και Miller το 1990 (Zalutsky&Miller, 1990) αποκαλύπτει τη δράση της SST στα γαγγλιακά κύτταρα ως : 1) γενική διέγερση των κύτταρων αυτών τόσο σε ότι αφορά την διέγερση τους στο φως όσο και την αυθόρμητη δραστηριότητα τους 2) αύξηση του λόγου δραστηριότητα η οποία οφείλεται στο φως / αυθόρμητη δραστηριότητα 3) μετατόπιση της ισορροπίας κέντρο-περιφέρεια προς το κέντρο με αποτέλεσμα την διεύρυνση του υποδεκτικού πεδίου των κύτταρων αυτών.

Όσο αφορά τα δίπολα και βραχύινα κύτταρα, η SST αυξάνει την απάντηση στο φως, αυξάνοντας την μεμβρανική αντίσταση των κύτταρων αυτών, ενώ παράλληλα στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να προκαλεί σταδιακή υπερπόλωση τους

μέσω της δράσης της σε κανάλια ιόντων Ca^{++} , Na^+ και K^+ (Johnson et al, 1999, Fontanesi et al, 2001). Σε ότι αφορά τους φωτοϋποδοχείς η SST φαίνεται να επηρεάζει την απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος με τροποποίηση των ρευμάτων Ca^{++} και K^+ στον αμφιβληστροειδή σαλαμάνδρας (Akorian et al, 2000) ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει την δράση των οριζοντίων κυττάρων. Πρόσφατα ανακοινώθηκε η ρύθμιση του μονοξειδίου του αζώτου από τη SST (Vasilaki et al, 2002).

1.4.3 SSTRs στον αμφιβληστροειδή

Πριν από την κλωνοποίηση των υποδοχέων της SST, υπήρξαν φαρμακολογικές μελέτες οι οποίες υποδείκνυαν την παρουσία θέσεων δέσμευσης της στον αμφιβληστροειδή (Liarakis&Thermos, 1992, 1993). Ακολούθως η κλωνοποίηση των πέντε υποτύπων SSTR άνοιξε νέους ορίζοντες στη μελέτη της φυσιολογικής δράσης αυτών των υποδοχέων στους διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του αμφιβληστροειδούς. Οι Mori, Ahara και Shimizu με την τεχνική της αντίστροφης – αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR reverse transcription-polymerase chain reaction) σε οφθαλμικούς ιστούς αρουραίου αποκάλυψαν την ύπαρξη και των πέντε υποτύπων SSTR με τον SSTR2 να εμφανίζεται πολυπληθέστερος. Επακόλουθες μελέτες σε διάφορα είδη υποδεικνύουν την έκφραση όλων των SSTR στο ποντίκι, στον αρουραίο και στο κουνέλι με διαφορές μόνο στη ποσότητα κάθε υποδοχέα ανάλογα με το είδος (Cristiani et al, 2000, 2002, Thermos, 2003)

Στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή οι επιστήμονες συμφωνούν όσον αφορά την έκφραση των SSTR1, SSTR2/2A και SSTR3 ενώ υπάρχει διαφωνία όσον αφορά την παρουσία των SSTR4 και SSTR5. Πρόσφατα με την ανάπτυξη ειδικών αντισωμάτων έναντι κάθε υποτύπου υποδοχέα, οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές έχουν συνεισφέρει σημαντικά στον εντοπισμό καθενός από αυτούς στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς των διαφόρων ειδών και συνεπώς της λειτουργίας τους (Thermos, 2003).

SSTR1

Η χρήση από τους Helboe και Moller το 1999 ενός πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι των C-τελικών τμημάτων του ανθρώπινου SSTR1 (h SSTR1) απέδειξε ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (immunoreactivity,

IR) σε βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν SST στην INL, σε μετατοπισμένα βραχύινα κύτταρα στην GCL και σε περιορισμένο αριθμό γαγγλιακών κυττάρων, για τον SSTR1 (Thermos, 2003). Με την χρήση του ίδιου αντισώματος βρέθηκε SSTR1-IR σε βραχύινα κύτταρα που φέρουν ή όχι το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης (TH tyrosine hydroxylase, περιοριστικό ένζυμο της σύνθεσης κατεχολαμινών, μάρτυρας της ύπαρξης ντοπαμίνης) σε μετατοπισμένα βραχύινα κύτταρα στην GCL καθώς και σε πυκνές νευρικές ίνες στο S1 του IPL στον αμφιβληστροειδή κουνελιού (Cristiani et al, 2000, Thermos, 2003). Οι Helboe και Moller όπως και η Thermos δεν παρατήρησαν SSTR1-IR σε TH-βραχύινα κύτταρα ή στις αποφυάδες τους στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή SSTR1-IR εντοπίζεται σε μεμβράνες των εσώτερων και εξώτερων τμημάτων ραβδίων και κωνίων, σε μεμονωμένα κύτταρα της ONL, INL και GCL καθώς και στην IPL, RPE και σε γαγγλιακά κύτταρα (Thermos, 2003).

SSTR2A

Η υποψία για την παρουσία του SSTR2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή κουνελιού εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε μια φαρμακολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τη Vasilaki και τους συνεργάτες της το 1996 (Vasilaki et al, 2003). Επακόλουθες μελέτες, με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του C-τελικού τμήματος του SSTR2A υποδοχέα ποντικού, απέδειξαν τον εντοπισμό του SSTR2A κυρίως στην πλασματική μεμβράνη των δίπολων κυττάρων που σχετίζονται με τα ραβδία (rod bipolar cells, RBC) και σε μικρότερη έκταση σε ευρέως πεδίου βραχύινα κύτταρα στον αμφιβληστροειδή κουνελιού. Η χρώση ήταν εντονότερη στους άξονες των RBC και ασθενέστερη στα κυτταρικά σώματα και τους δενδρίτες. Όσο αφορά τα βραχύινα κύτταρα SSTR2-IR παρατηρήθηκε στα κυτταρικά σώματα που βρίσκονταν στην INL και IPL και κάποια από τα κύτταρα αυτά έφεραν το ένζυμο TH (Helboe&Moller, 1999).

Στον αρουραίο SSTR2A-IR εντοπίστηκε στα εξωτερικά τμήματα του αμφιβληστροειδή, σε κωνιοφόρα, οριζόντια και δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα κωνία (cone bipolar cells, CBC), ενώ στα εσώτερα τμήματα SSTR2A-IR εντοπίστηκε σε TH-βραχύινα κύτταρα (Johnson et al, 1999, Thermos, 2003). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο κουνέλι. Οι Helboe και Moller με τη χρήση ενός πολυκλωνικού αντισώματος έναντι

του C-τελικού τμήματος του ανθρώπινου SSTR2 υποδοχέα (human SSTRs, hSSTRs) παρατήρησαν ανοσοδραστικότητα σε βραχύινα κύτταρα μεγάλου μεγέθους στην INL τα οποία έφεραν το ένζυμο TH, στα εσωτερικά τμήματα των κωνίων και στις ίνες των κυττάρων Muller. Η Vasilaki και οι συνεργάτες της το 2001 ανέφεραν SSTR2A-IR σε RBC στον αμφιβληστροειδή κουνελιού και αρουραίου χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας 355-369 του SSTR2A, εντούτοις δεν παρατήρησαν συνεντοπισμό SSTR2A και TH σε κανένα από αυτά τα είδη (Vasilaki et al, 2001). Στο ποντίκι SSTR2A-IR εμφανίστηκε σε RBC, οριζόντια και βραχύινα κύτταρα που έφεραν TH και γλυκίνη (Cristiani et al, 2000), με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος προβάτου (Schindler et al, 1997, Thermos, 2003).

Σε οφθαλμικό ιστό ανθρώπου, χρώση εμφανίστηκε σε εσώτερα και εξώτερα τμήματα ραβδίων και κωνίων και μεμονωμένα κύτταρα της ONL, INL και GCL (Klisovic, 2001). Η μορφολογία των μεμονωμένων αυτών κυττάρων (βραχύνων, RBC, κλπ) στις επιμέρους ζώνες του αμφιβληστροειδούς, δεν προσδιορίστηκε. Επίσης εμφανίστηκε χρώση σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, των κυτταρικών μεμβρανών και σε κυτταρικά σώματα μεμονωμένων RPE κυττάρων καλλιέργειας. Για την ανωτέρω χρώση χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι των 45 αμινοτελικών αμινοξέων του SSTR2. Αυτή η αμινοξική αλληλουχία είναι η ίδια για τους SSTR2A/2B οπότε μπορεί να υποτεθεί η ύπαρξη και των δύο υποτύπων υποδοχέων στα ανωτέρω κύτταρα. Επίσης SSTR2A-IR αναφέρεται στον αμφιβληστροειδή ανθρώπου στην IPL και OPL όπως και το RPE (Van Hagen et al, 2000, Thermos, 2003).

Σε κατώτερα σπονδυλωτά SSTR2A-IR εμφανίστηκε σε εξωτερικά και εσωτερικά τμήματα του αμφιβληστροειδούς σαλαμάνδρας από τον Akopian και τους συνεργάτες του, με τη χρήση του ίδιου αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε από το Johnson και τους συνεργάτες του το 1999. Η χρώση παρατηρήθηκε σε ραβδία και κωνία των εσωτερικών τμημάτων και τις συναπτικές συνδέσεις. Επίσης SSTR2A-IR παρατηρήθηκε σε δίπολα και βραχύινα κύτταρα των κυτταρικών σωμάτων τη OPL και σε όλες της ζώνες των IPL και μια διάχυτη χρώση στην GCL. Στον αμφιβληστροειδή ενήλικού σαλαμάνδρας SSTR2A-IR παρατηρήθηκε στα RBC, στα εσωτερικά τμήματα των κωνίων και το συνδετικό κροσσό των ραβδίων (Grigoryan et al, 2003).

SSTR2B

Δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να υποστηρίζουν την παρουσία του SSTR2B στον αμφιβληστροειδή. Ερευνητές με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι των C-τελικών τμημάτων του SSTR2B υποδοχέα (αλληλουχία 329-343) έδειξαν SSTR2B-IR σε ραβδία και κωνία αρουραίου αλλά όχι κουνελιού (Vasilaki et al, 2001). Όμως άλλοι ερευνητές ανέφεραν την απουσία του SSTR2B στον αμφιβληστροειδή (Pertucci et al, 2001, Johnson et al, 1999).

SSTR3

Στον αμφιβληστροειδή θηλαστικών δεν έχει ανιχνευτεί SSTR3-IR. Ωστόσο έχει βρεθεί mRNA του SSTR3 στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Mori et al, 2001, Thermos, 2003). Σε κατώτερα σπονδυλωτά όπως η σαλαμάνδρα παρατηρήθηκε SSTR3-IR κυρίως σε εσωτέρα τμήματα των κωνίων και του συνδετικούς κροσσούς των ραβδίων (Grigoryan et al, 2003).

SSTR4

Πρόσφατα έχει ανιχνευτεί SSTR4-IR στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Συγκεκριμένα χρώση εμφανίζεται σε αποφυάδες πολλαπλών στρωμάτων της IPL καθώς και την κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα των κυτταρικών σωμάτων και σε μακριές αποφυάδες στην GCL. Στις ίνες του οπτικού νεύρου εμφανίζεται επιλεκτική χρώση για τον SSTR4. Μελέτες διπλής σήμανσης, αναφέρουν συνεντοπισμό SSTR4 και του μάρτυρα των γαγγλιακών κυττάρων MAP-1 A, σε κυτταρικά σώματα και αποφυάδες της IPL. Αυτός ο συνεντοπισμός υποδηλώνει την έκφραση του SSTR4 στα κυτταρικά σώματα, τους δενδρίτες και τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων αλλά όχι τις απολήξεις των βραχύνων κυττάρων στην IPL ή τα κυτταρικά σώματα μετατοπισμένων βραχύνων κυττάρων GCL (Vasilaki et al, 2001).

Στον αμφιβληστροειδή ποντικού SSTR4-IR εντοπίζεται στην GCL σε γαγγλιακά κύτταρα που φέρουν ή όχι την ασβεστοδεσμευτική πρωτεΐνη (calcium binding protein CaBP) (Cristiani et al, 2002, Thermos, 2003). Επίσης με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR υποστηρίζεται η παρουσία SSTR4 στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Mori et al, 1997).

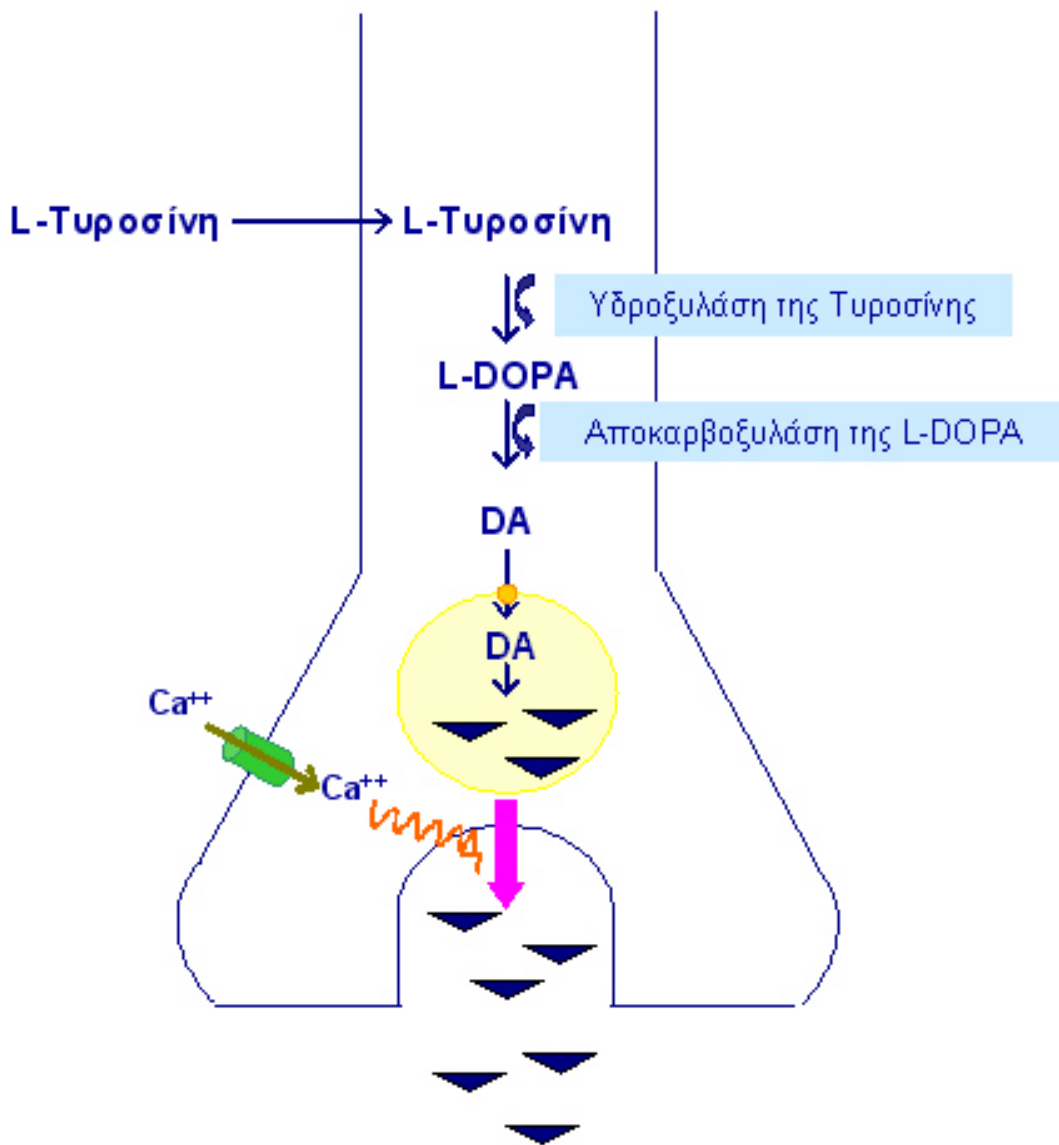
SSTR5

Δεν έχει αναφερθεί SSTR5-IR στον αμφιβληστροειδή, σε κανένα είδος παρότι με τη μέθοδο RT-PCR έχουν ανιχνευτεί χαμηλά επίπεδα mRNA του SSTR5 σε αρουραίο (Mori et al, 1997, Thermos, 2003), ποντίκι (Cristiani et al, 2002) και άνθρωπο (Klisovic, 2001, Thermos, 2003). Ωστόσο πρόσφατα αναφέρθηκε SSTR5-IR σε καλλιέργεια RPE κυττάρων ανθρώπου (Vasilaki, 2004, Thermos, 2003).

1.4.4.1 Ντοπαμίνη

Η ντοπαμίνη (dopamine, DA) απέκτησε σχετικά πρόσφατα τον τίτλο του νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ των θηλαστικών. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '50 θεωρούνταν αποκλειστικά ενδιάμεσο μόριο της βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών, νοραδρεναλίνης και αδρεναλίνης. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι η DA ανευρίσκεται στα βασικά γάγγλια όπου δρα ως νευροδιαβιβαστής, καθώς επίσης και των μυελό των επινεφριδίων. Η βιοσύνθεση της DA όπως και των άλλων κατεχολαμινών, αρχίζει από το αμινοξύ τυροσίνη, το οποίο πρέπει να μεταφερθεί διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο ντοπαμινεργικό νευρώνα. Το ρυθμοπεριοριστικό βήμα στη βιοσύνθεση αυτή αποτελεί η μετατροπή της L-τυροσίνης σε L-διδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA) με τη δράση του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης (TH). Στη συνέχεια η L-DOPA μετατρέπεται σε ντοπαμίνη με τη δράση της αποκαρβοξυλάσης των L-αρωματικών αμινοξέων (σχήμα 5), (Cooper et al, 1996).

Η έκλυση της DA από τις νευρωνικές απολήξεις, που εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου, θεωρείται ότι προκαλείται από την άφιξη στην απόληξη ενός δυναμικού ενέργειας. Η σύνθεση και απελευθέρωση της DA εμφανίζεται υψηλή κατά την διάρκεια της ημέρας και χαμηλότερη το βράδυ (Witkovsky, 2004).



Σχήμα 5 : Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης και απελευθέρωσης της ντοπαμίνης από τον ντοπαμινεργικό νευρώνα.

Με βάση βιοχημικά, φυσιολογικά και φαρμακολογικά δεδομένα, είναι αποδεδειγμένο σήμερα ότι η DA δρα σε δύο τουλάχιστον είδη υποδοχέων που ονομάζονται D1 και D2 υποδοχείς (Cooper et al, 1996). Δέσμευση της DA στους D1 υποδοχείς οδηγεί σε ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης μέσω ενεργοποίησης G πρωτεϊνών και επακόλουθη αύξηση του cAMP, ενώ ενεργοποίηση των D2 υποδοχέων, οι οποίοι αναφέρονται και ως αυτοϋποδοχείς, οδηγεί σε αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και μείωση του cAMP. Άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος τα οποία εμπλέκονται αποτελούν η φωσφολιπάση C και το αραχιδονικό οξύ. Οι D2

υποδοχείς εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια με την DA σε σχέση με τους D1 γεγονός που τους επιτρέπει να ενεργοποιούνται το βράδυ όταν η συγκέντρωση της DA εμφανίζεται χαμηλή (Witkovsky, 2004).

1.4.4.2 Ντοπαμίνη και αμφιβληστροειδής

Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν στο ότι η DA δρα ως νευροτροποποιητής στα κυκλώματα του αμφιβληστροειδούς. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες, στον αμφιβληστροειδή, αποτελούν μια μικρή ομάδα βραχύνων και ενδοπλεγματοειδών κυττάρων με μεγάλα κυτταρικά σώματα στα όρια των INL και IPL (Veruki&Wassle, 1996).

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες αποκαλύπτουν την παρουσία της υδροξυλάση της τυροσίνης (TH), του περιοριστικού ενζύμου σύνθεσης των κατεχολαμινών στις οποίες κατατάσσεται η ντοπαμίνη, σε A18 βραχύνια κύτταρα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα A18 βραχύνια κύτταρα αποτελούν ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Τα A18 είναι βραχύνια κύτταρα ευρέως πεδίου με εκτεταμένες δενδριτικές διακλαδώσεις. Φέρουν λεπτούς δενδρίτες και άξονες οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να εκτείνονται σε μεγάλες αποστάσεις της τάξεως των mm. Τα τελικά τμήματα αυτών των απολήξεων συνάπτονται στα κυτταρικά σώματα και τους δενδρίτες των βραχύνων κυττάρων AII, A8, A17 και ενδεχομένως και των A13 (Poucho, 1982, Voigt&Wassle, 1987, Kolb et al, 1990, 2002).

Τα A18 συνάπτονται επίσης με μεγάλο αριθμό βραχύνων κυττάρων τα οποία εμπλέκονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι των ραβδίων στην IPL. Επιπρόσθετα τα A18 δέχονται συνάψεις από πολλά άλλα βραχύνια κύτταρα και κάποιες από CBC, γεγονός το οποίο δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως, αλλά ενδέχεται ότι πρόκειται για μεγάλο μεγέθους CBC. Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί ότι οι νευράξονες των A18 βραχύνων κυττάρων περνούν από την S5 στοιβάδα της IPL και σχηματίζουν συνάψεις απευθείας με τους τελικούς άξονες των RBC. Πιστεύεται επίσης ότι τα ντοπαμινεργικά A18 επιδρούν στα AII βραχύνια κύτταρα των ραβδίων και προκαλούν αποσύζευξη των συνδέσεων από τα AII κατά μήκος του αμφιβληστροειδούς και ότι επίσης αποσυνδέουν τα AII από τα CBC της Sb στοιβάδας της IPL. Τα ντοπαμινεργικά βραχύνια κύτταρα πιστεύεται ότι εμπλέκονται στους κερκάρδιους κύκλους εναλλαγής από συνθήκες σκότους σε συνθήκες φωτός και

τροποποιούν την υποδεκτική κατάσταση ολόκληρου του αμφιβληστροειδούς (Kolb et al, 2002).

Σε κάποιες περιπτώσεις τα A18 δίνουν αποφυάδες οι οποίες φύονται από τα κυτταρικά τους σώματα ή το δίκτυο των δενδριτών τους από την IPL και εκτείνονται μέχρι την εξωτερική πλευρά της OPL. Σε αυτές τις ζώνες οι ντοπαμινεργικές απολήξεις μπορεί να είναι προσυναπτικές των οριζοντίων κυττάρων στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή. Η ανατομική αυτή κατανομή των ντοπαμινεργικών νευρώνων φαίνεται να ενισχύει την άποψη που υποστηρίζει τη δράση της DA ως τροποποιητικής ουσίας στον αμφιβληστροειδή, ικανής να επηρεάσει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό νευρώνων, παρά την δράση της ως νευροδιαβιβαστή ο οποίος εμπλέκεται στην μεταφορά της οπτικής πληροφορίας (Kolb et al, 2002).

Και οι δύο υποδοχείς της DA, D1 και D2 εμφανίζονται σε νευρώνες του εσώτερου και εξώτερου αμφιβληστροειδή αρκετών σπονδυλωτών. Πιστεύεται ότι οι D1 συνδέονται μερικώς με κύτταρα τα οποία συζεύγνυται σε χασματοσυνδέσεις, επειδή μια από τις γνωστές δράσεις της DA αποτελεί η ρύθμιση του cAMP στα κανάλια των χασματοσυνδέσεων (Lasater&Dowling, 1985). Οι χασματοσυνδέσεις είναι κυτταροπλασματικές γέφυρες μεταξύ γειτονικών κυττάρων οι οποίες δημιουργούνται από εξειδικευμένες πρωτεΐνες τις κονεξίνες, και επιτρέπουν την επικοινωνία αυτών των κυττάρων. Δέσμευση της DA στον D1 υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλική κυκλάσης μέσω G πρωτεϊνών και αύξηση των επιπέδων του cAMP. Η δράση του cAMP επιτυγχάνεται ενδεχομένως μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και της φωσφορυλίωσης διαφόρων πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων και η πρωτεΐνη των χασματοσυνδέσεων κονεξίνη (Piccolino, 1984). Οι D1 περιγράφονται επίσης σε οριζόντια κύτταρα στην OPL και κάποια βραχύινα κύτταρα της IPL. Επίσης φαίνεται να επιδρούν ισχυρά στα σώματα των γαγγλιακών κυττάρων, αν και τα ντοπαμινεργικά κύτταρα δεν φαίνεται να δημιουργούν άμεσες συνάψεις με αυτά. Οι D2 έχουν επίσης βρεθεί στον αμφιβληστροειδή να συνδέονται με τους φωτουποδοχείς της ONL, σε RPE κύτταρα και σε κύτταρα της IPL (Kolb et al 2002).

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι δύο τύπων οι τύπου 1 και οι τύπου 2. Οι νευρώνες τύπου 1 δίνουν απολήξεις στην OPL όπου συνάπτονται με GABAεργικά ενδοπλεγματοειδή κύτταρα. Το GABA και η DA συνεντοπίζονται σε A18 βραχύινα κύτταρα ενώ στον αμφιβληστροειδή γάτας και η σεροτονίνη συνεντοπίζεται σε αυτά τα κύτταρα (Wassle, 1987, Kolb et al, 2002).

Όσο αφορά τη δράση της DA στον αμφιβληστροειδή αυτή φαίνεται να προκαλεί :

- 1) αποσύζευξη των χασματοσυνδέσεων των οριζοντίων κυττάρων, προκαλώντας έτσι τη μείωση του υποδεκτικού τους πεδίου
- 2) επίδραση στους υποδοχείς γλουταμινικού των οριζοντίων κυττάρων εξασθενίζοντας έτσι την απόκριση των κυττάρων αυτών στο φως
- 3) στην IPL, κλείσιμο των χασματοσυνδέσεων του δικτύου των ΑΠ βραχύνων κυττάρων. Η αποσύζευξη των ΑΠ κυττάρων καθιστά το υποδεκτικό πεδίο των βραχύνων κυττάρων που σχετίζονται με τα ραβδία πολύ λιγότερο δεκτικό σε φωτεινές συνθήκες (Kolb, 2003)
- 4) πιθανή εμπλοκή στη μετάδοση του σήματος των οριζοντίων κυττάρων τόσο κατά την προσαρμογή στο σκοτάδι, όσο και κατά την προσαρμογή στο φως π.χ. στον αμφιβληστροειδή χελώνας, η προσαρμογή των οριζοντίων κυττάρων στο φως σταματά με ανταγωνιστές DA ενώ στον αμφιβληστροειδή των τελεόστεων η επίδραση φωτεινών ερεθισμάτων που αναβοσβήνουν, η οποία επίσης ελαττώνει το υποδεκτικό πεδίο των οριζοντίων κυττάρων, σταματά με τον ανταγωνιστή D2 υποδοχέων αλοπεριδόλη (Umino et al, 1991)

1.4.5. NO και αμφιβληστροειδής

Το μονοξειδίου του αζώτου (NO) σχηματίζεται από την οξείδωση πέντε ηλεκτρονίων του τελικού γουανυλικού αζώτου της L- αργινίνης, με την δράση του ενζύμου συνθάση του NO (nitric oxide synthase, NOS). Συμπαράγοντες σε αυτή την αναγωγική αντίδραση αποτελούν η καλμοδουλίνη, το φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), η BH₄ (5,6,7,8 τετραυδροβιοπτερίνη), φλαβίνες (φλάβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο, FAD) και αίμη. Η NOS περιέχει αίμη η οποία αντιδρά με το NO και δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 445nm, υποδεικνύοντας έτσι ότι η NOS παρουσιάζει ομολογία ως προς την κυτοχρωμική αναγωγή του P450. Το NO που παράγεται από την NOS φαίνεται να δεσμεύεται στην ομάδα αίμης της, με αποτέλεσμα την ρύθμιση της παραγωγής του με μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης (Goldstein et al, 1996).

Η NOS απαντάται σε τρεις ισομορφές : την νευρωνική (neuronal nNOS), την ενδοθηλιακή (endothelial eNOS) και την ανοσολογική (immunologic, iNOS). Η nNOS και eNOS παρουσιάζουν ομολογία μιας και ενεργοποιούνται με αύξηση των

επιπέδων του ενδοκυττάρου ασβεστίου-καλμοδουλίνης και παράγουν μεγάλες ποσότητες NO (της τάξεως των picomoles, μέσα σε λίγα λεπτά), ενώ η iNOS είναι ανεξάρτητη από το ασβέστιο και ενεργοποιείται από παράγοντες φλεγμονής, κυτοκίνες και λιποσακχαρίτες, ώστε να παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες NO (της τάξεως των nanomoles) για εκτεταμένη χρονική περίοδο που μπορεί να διαρκέσει για μέρες (Hardy et al, 2000).

Η NADPH διαφοράση αποτελεί ένα ιστοχημικό ενζυμικό σύστημα το οποίο ανάγει άλατα τετραζολίου παρουσία NADPH. Η αναγωγή του άλατος οδηγεί στην παραγωγή χρώματος το οποίο ανιχνεύεται εύκολα σε τομές ιστού. Έτσι στην ιστοχημεία η NADPH διαφοράση χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της παρουσίας NOS στον ιστό (Koistinaho&Sagar, 1995, Goldstein et al, 1996). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες υποδεικνύουν διάχυτή χρώση για την NADPH διαφοράση σε ολόκληρο το οπτικό σύστημα, αντικατοπτρίζοντας έτσι την ευρεία κατανομή της NOS σε αυτό. Στον αμφιβληστροειδή αρουραίου και ποντικού, η NOS έχει βρεθεί σε βραχύινα και γαγγλιακά κύτταρα, νευρικές ίνες της OPL και IPL, σε RPE κύτταρα καθώς και τους φωτοϋποδοχείς (Goldstein et al, 1996).

Ο δεύτερος αγγελιοφόρος **3', 5' κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP)** αποτελεί μόριο κλειδί στην μεταβίβαση της οπτικής πληροφορίας. Η παραγωγή του από το GTP καταλύεται από το ένζυμο γουανυλική κυκλάση (GC) το οποίο αποτελεί στόχο για το NO (Goldstein et al, 1996). Το NO φαίνεται να δεσμεύεται σε μία διαλυτή μορφή της GC (soluble GC, sGC), η οποία αποτελείται από δύο υπομονάδες κάθε μία από τις οποίες φέρει δυο ομάδες αίμης. Η αλληλεπίδραση του NO με αυτές τις ομάδες αίμης οδηγεί στην ενεργοποίηση της sGC και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων cGMP (Koistinaho&Sagar, 1995). Η ύπαρξη της sGC έχει επιβεβαιωθεί με βιοχημικές και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες, στους φωτοϋποδοχείς (Koistinaho&Sagar, 1995), αλλά και τους λείους μύες του αγγειακού τοιχώματος, όπου φαίνεται να προκαλεί αγγειοδιαστολή (Goldstein et al, 1996).

Κάποιες από τις πιθανές δράσεις του NO στον αμφιβληστροειδή αποτελούν: 1) η τροποποίηση της απόκρισης των φωτοϋποδοχέων στο φως 2) η ρύθμιση της συναπτικής μεταβίβασης από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα και οριζόντια κύτταρα. Αυτή η δράση πιθανόν ασκείται με επίδραση του NO στην GC ή σε άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες στόχους του αμφιβληστροειδούς 3) η τροποποίηση της απόκρισης στο φως των ON δίπολων κυττάρων 4) η επίδραση στις ηλεκτρικές συζεύξεις μεταξύ των

οριζοντίων κυττάρων 5) η εναλλαγή της ηλεκτρικής διεγερσιμότητας των γαγγλιακών κυττάρων. *Επίσης δεδομένου ότι η DA φέρεται να μειώνει την ηλεκτρική σύζευξη των οριζοντίων κυττάρων και το NO να μειώνει την απελευθέρωση της DA, εικάζεται ότι το NO επιδρά στις συνάψεις αυτές μέσω της δράσης του στην DA.*

1.4.6 Λειτουργικός ρόλος της SST στον αμφιβληστροειδή και αλληλεπιδράσεις της με την DA

Η παρουσία των SSTR σε φωτοϋποδοχείς, RBC, βραχύινα και γαγγλιακά κύτταρα υποδεικνύει ότι η SST, η οποία συντίθεται και απελευθερώνεται από μια υποκατηγορία βραχύνων κυττάρων, μπορεί να δρα σε απόσταση, παρακρινικά και είναι πιθανόν να επηρεάζει την απελευθέρωση γλουταμινικού το οποίο αποτελεί το βασικό νευροδιαβιβαστή σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς (Thermos, 2003). Ειδικότερα αναφέρεται ότι η SST τροποποιεί τασεοελεγχόμενα κανάλια ιόντων Ca^{++} και K^+ μέσω ενεργοποίησης των SSTR2A στους φωτοϋποδοχείς σαλαμάνδρας, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πιθανό ρόλο της SST στην ρύθμιση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού από τα κύτταρα αυτά (Akorian et al, 2000, Thermos, 2003). Μελέτες σε απομονωμένα RBC αμφιβληστροειδούς κουνελιού υποδεικνύουν ότι SST και οκτρεοτίδη τροποποιούν τασεοελεγχόμενα κανάλια ιόντων Ca^{++} εξαρτώμενα από K^+ μέσω της ενεργοποίησης των SSTR2A (Pertucci et al, 2001, Thermos, 2003). Η SST έχει επίσης δειχθεί να αναστέλλει την απελευθέρωση Ca^{++} σε RBC αρουραίου (Johnson, Caravelli&Brecha, 2001, Thermos, 2003). Ο SSTR2 φαίνεται να συζεύγνυται με την Go_a υπομονάδα η οποία εντοπίζεται στην IPL αμφιβληστροειδούς κουνελιού (Vasilaki et al, 2003). Αυτή η σχέση φαίνεται να συμβάλλει αποφασιστικά στην τροποποίηση από την SST των καναλιών ιόντων των RBC και την επακόλουθη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από τα κύτταρα αυτά. Μελέτες δείχνουν ότι οι SSTRs επιδρούν σε κανάλια ιόντων Ca^{++} μέσω της σύζευξης τους με την Go_{a2} υπομονάδα (Kleuss et al, 1992).

Η παρουσία των SSTR1 σε βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν SST εικάζει πιθανό ρόλο της SST στην απελευθέρωση της ίδιας της SST. Προκειμένου να εξεταστεί το κατά πόσο ο SSTR1 δρα ως αυτοϋποδοχέας πραγματοποιήθηκαν ex vivo μελέτες σε εμφυτεύματα αμφιβληστροειδούς αρουραίου μετρώντας την επίδραση του εκλεκτικού αγωνιστή των SSTR1 υποδοχέων, CH275 στην απελευθέρωση SST. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του SSTR1 μειώνει την απελευθέρωση της SST, προτείνοντας τον SSTR1 ως αυτοϋποδοχέα (Mastrodimou&Thermos, 2004).

Η παρουσία των SSTR1 και SSTR2 υποδοχέων σε βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν TH στον αμφιβληστροειδή αρουραίου, εικάζει πιθανό ρόλο της SST στην απελευθέρωση της DA.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως υπάρχει διαφωνία ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες ερευνητών σχετικά με την παρουσία (Helboe&Moller, 1999, Johnson et al, 1998, 1999, Cristiani et al, 2000) ή την απουσία (Johnson et al, 1998, Helboe&Moller, 1999, Vasilaki et al, 2001) συνεντοπισμού των SSTR1 και SSTR2A με την TH και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν την άμεση επίδραση της SST στην απελευθέρωση της DA στον αμφιβληστροειδή (Thermos, 2003).

Σκοπός και προοπτική της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης αφορά στην αποσαφήνιση του ρόλου της σωματοστατίνης ως ρυθμιστή της απελευθέρωσης ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε φαρμακολογική μελέτη για την απάντηση των παρακάτω ερωτημάτων :

- Ποια είναι η βασική απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.
- Ποια είναι η επίδραση της SST στην απελευθέρωση της DA και κατά πόσον εμπλέκεται ο SSTR1 ή/ και ο SSTR2 υποδοχέας σε αυτή τη δράση της.
- Ποια είναι η επίδραση του εκλεκτικού αγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων BIM-23014 στην απελευθέρωση της DA από τον αμφιβληστροειδή.
- Ποια είναι η επίδραση του εκλεκτικού αγωνιστή των SSTR1 υποδοχέων, L-797.591 στην απελευθέρωση της DA.
- Ποια είναι η επίδραση του εκλεκτικού αγωνιστή των SSTR3 υποδοχέων, L-796.778 στην απελευθέρωση της DA.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Πειραματόζωα : Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν θηλυκοί Sprague-Dawley αρουραίοι, βάρους 250-280 gr. Τα ζώα διατηρήθηκαν σε κλουβιά με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή, σε σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες (23-24 °C, 60-65% υγρασία). Ο κύκλος ημέρας / νύκτας ήταν 12 ώρες. Οι αρουραίοι θανατώνονται με εισπνοή αιθέρα (Sigma) κατά την παραμονή τους σε κλειστό θάλαμο για 10 περίπου λεπτά. Οι συνθήκες διαβίωσης των ζώων ήταν σύμφωνες με την ελληνική νομοθεσία (Π.Δ.160/91).

Απομόνωση και in vitro ιστοκαλλιέργεια αμφιβληστροειδή (explants) : Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι οφθαλμοί από δύο αρουραίους. Αρχικά αφαιρείται ο πρόσθιος πόλος, ο φακός και το υαλώδες σώμα και κατόπιν απομονώνεται ο αμφιβληστροειδής με μηχανική απόξεση. Οι ιστοί αμέσως μετά από την εξόρυξη τους, προκειμένου να διατηρηθούν ζωντανοί, τοποθετούνται σε πλάκα 24 οπών η οποία περιέχει 700μl θρεπτικό μέσο καλλιέργειας [Medium-199/25mM HEPES με Hank's salts, L-γλουταμίνη και L-αμινοξέα. (Gibco BRL, Life Technologies) στο οποίο έχει προστεθεί 1mg/ml βακιτρακίνη, 0,1mM PMSF και λευπεπτίνη 1μg/ml]. Ακολουθεί επώαση σε συνθήκες 95% αέρα και 5% CO₂ στους 37° C (επωαστήρας, Forma Sientific), υπό ανάδευση, αρχικά για μια ώρα προκειμένου να επιτευχθεί σταθερή βασική έκκριση ντοπαμίνης από τους ιστούς. Ακολούθως κάθε 20 λεπτά πραγματοποιείται συλλογή δείγματος από το υπερκείμενο της καλλιέργειας με μεταφορά των ιστών σε επόμενη θέση της πλάκας και αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με νέο. Συνολικά συλλέγονται 7 με 8 δείγματα σε κάθε πείραμα. Στο τέταρτο δείγμα της καλλιέργειας γίνεται προσθήκη στο θρεπτικό υλικό της ουσίας επίδρασης [σωματοστατίνη 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M, BIM-23014 (SSTR2 αγωνιστής), 10⁻⁴ και 10⁻⁵ M, CYN-154806 (SSTR2 ανταγωνιστής) 10⁻⁴ M-σωματοστατίνη 10⁻⁴ M, L-797.591 (SSTR1 αγωνιστής), 10⁻⁴ και 10⁻⁵ M), L-796.778 (SSTR3 αγωνιστής), 10⁻⁴ M], και ακολουθεί συλλογή άλλων 3 ή 4 δειγμάτων (οι δομές των παραπάνω αναλόγων αναγράφονται στο παράρτημα Α). Τα τρία πρώτα δείγματα σε κάθε πείραμα αποτελούν τη βασική έκκριση ντοπαμίνης με την οποία συγκρίνονται τα επόμενα.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα χωρίς την προσθήκη ουσίας επίδρασης προκειμένου να προσδιοριστεί η βασική απελευθέρωση ντοπαμίνης από τους ιστούς καθόλη την διάρκεια του πειράματος (βασική έκκριση). . Μετά το πέρας του κάθε πειράματος οι ιστοί μεταφέρονται σε 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος TRIS-HCl (0,5M) οι οποίοι κατόπιν θα χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης σε κάθε πείραμα με αντίδραση Bradford.

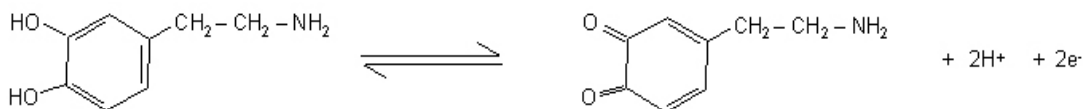
Απομόνωση ντοπαμίνης από τα δείγματα : Τα δείγματα από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αμέσως μετά από την συλλογή τους φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 12000 στροφές σε φυγόκεντρο erpendorf, στους 4°C (cold room) προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ιστού. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης (περίπου 650μl) μεταφέρεται σε σωληνάκι erpendorf το οποίο περιέχει 40mg ενεργοποιημένης με θειικά αλούμινας (Al_2O_3) και προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος TRIS-HCl (0,5M), pH 8.65. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 10000 στροφές στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και κατόπιν ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις του ιζήματος με απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες. Τέλος στο ίζημα της αλούμινας προστίθεται $HClO_4$ (0,1N, 400μl), το μίγμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται. Μετά από φυγοκέντρωση λαμβάνονται περίπου 350 μl δείγματος το οποίο τελικά φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι τη μέτρηση των επιπέδων ντοπαμίνης. Εξαιτίας του ότι η ντοπαμίνη είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητη όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται με την μικρότερη δυνατή έκθεση των δειγμάτων στο φως. Έτσι τα σωληνάκια τόσο κατά την διαδικασία παρασκευής όσο και κατά την φύλαξη τους καλύπτονται εξωτερικά με αλουμινόχαρτο

2.2.1 Ανάλυση επιπέδων ντοπαμίνης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ντοπαμίνης στα δείγματα πραγματοποιείται με τη μέθοδο της υγρή χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (EC Detector, INTRO, Antec Leyden).

Στις ηλεκτροχημικές ανιχνεύσεις παρακολουθείται η αντίδραση μιας ουσίας στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου. Κάθε ουσία χαρακτηρίζεται από μια σχέση ρεύματος-τάσης (βολταμογράφημα). Αυτό αποτελεί το χαρακτηριστικό της μεθόδου σε σχέση με άλλες όπου η ανίχνευση βασίζεται στις φυσικές ιδιότητες της ουσίας (π.χ. φασματομετρία μάζας : μοριακή μάζα). Στις ηλεκτροχημικά ενεργές ενώσεις, η τάση μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς (REF) και του ηλεκτροδίου εργασίας (WE) καθορίζει τη δραστηριότητα της ουσίας στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Η διαφορά τάσης παρέχει το επίπεδο ενέργειας που απαιτείται για να αρχίσει ή να διευρυνθεί η ηλεκτροχημική αντίδραση. Διαφορετικές ουσίες μπορεί να έχουν διαφορετικά δυναμικά οξείδωσης ή αναγωγής, πράγμα το οποίο χαρακτηρίζει την επιλεκτικότητα της μεθόδου.

Στο ηλεκτρόδιο εργασίας, στο ηλεκτροχημικό κελί ροής, η μεταφορά ηλεκτρονίων συμβαίνει λόγω οξειδωτικής ή αναγωγικής αντίδρασης. Στην παρούσα μελέτη κατά την αντίδραση που πραγματοποιείται στο ηλεκτροχημικό κελί ροής (VT03, electrochemical flow cell, Antec Leyden) η ντοπαμίνη οξειδώνεται προς κινίνη. Δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται προς το ηλεκτρόδιο εργασίας (ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, glassy carbon electrode) και δημιουργούν ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο ενισχύεται από τα κυκλώματα ελέγχου.



Το παραγόμενο ηλεκτρικό ρεύμα μετρείται μέσω του μετατροπέα ρεύματος-τάσης. Ο μετατροπέας είναι ελεγχόμενος από την επιλεγόμενη αντίσταση R όσον αφορά την ενίσχυση X100. Αμέσως μετά τον μετατροπέα ρεύματος-τάσης το σήμα περνά στην έξοδο προς τον ολοκληρωτή. Οι αλλαγές της τάσης οδηγούν στην εμφάνιση κορυφών στο γράφημα που λαμβάνεται.

2.2.2 Ανάλυση δειγμάτων

Το δείγμα (20 μl) εισάγεται στην συσκευή ανάλυσης HPLC κατά την έγχυση με σύριγγα (Hamilton 100μl) στο βρόγχο δείγματος. Με το άνοιγμα της χειρολαβής της

βαλβίδας η κινητή φάση ρέει διαμέσου του βρόγχου μεταφέροντας το δείγμα προς τη στήλη διαχωρισμού με μέγεθος σωματιδίων 5 μ m και διαστάσεις 250x4.6 mm (EC 25014.6, Nucleosil 100-5, C-18, Macherey-Nagel). Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίζεται σε 1.5 ml/min και το δυναμικό στο ηλεκτροχημικό κελί ροής μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς (Ag/AgCl) και του ηλεκτροδίου εργασίας (ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, glassy carbon electrode) ρυθμίστηκε στα +0,75mV, ενώ η θερμοκρασία στους 30 °C. Η σύσταση κινητής φάσης / λίτρο διαλύματος είναι η εξής : 25mM NaH₂PO₄ H₂O, 5mM NaCl, 0.274mM EDTA, 1.5mM επτανοσουλφονικό νάτριο (Heptane sulfonic acid, Sodium salt), 925 ml nano pure νερό και 7,5% μεθανόλη (CH₃OH). Το pH ρυθμίζεται στο 3.6 με H₃PO₄. Επειδή απαιτείται πολύ υψηλή καθαρότητα στην κινητή φάση, το διάλυμα διηθείται εις διπλούν σε φίλτρο filtropur V25, 0.2 μ m (Sarstedt). Τέλος η κινητή φάση απαερώνεται με την διαβίβαση ρεύματος ηλίου (He). Το χρωματογράφημα διαρκεί 30 λεπτά.

Οι κορυφές που λαμβάνονται ολοκληρώνονται και το εμβαδόν της κορυφής ποσοτικοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης η οποία κατασκευάζεται με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

2.2.3 Πρότυπα διαλύματα

Παρασκευάζονται πυκνά διαλύματα τα οποία περιέχουν ντοπαμίνη (DA ή 3-υδρόξυ τυραμίνη, Sigma), HVA (ομοβανιλικό οξύ, Sigma) και DOPAC (διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, Sigma) σε συγκέντρωση 1mg/ml σε διάλυμα HClO₄ (0,1M). στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις επιτυγχάνουμε συγκεντρώσεις 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 και 15,625 pgr ντοπαμίνης.

Τα ανωτέρω δείγματα εισάγονται στην συσκευή ανάλυσης HPLC και προσδιορίζουν το χρόνο στον οποίο εμφανίζεται κάθε ουσία στο γράφημα καθώς και το εμβαδόν κορυφής σε κάθε συγκέντρωση. Βάσει των δεδομένων που λαμβάνονται κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη από την οποία παίρνουμε μια εξίσωση της μορφής $y = ax$ όπου y : συγκέντρωση ουσίας που μετράμε στο άγνωστο δείγμα, a : ακέραιος αριθμός και x : το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στην ουσία .

2.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ιστού

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών σε κάθε πείραμα οι ιστοί που είχαν χρησιμοποιηθεί σε αυτό, αποψύχονται και ομογενοποιούνται. Ο προσδιορισμός αυτός γίνεται με αντίδραση Bradford. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη τεχνική, συζεύγνυται με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των υπολειμμάτων των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και τις χρωματίζει με έντονο μπλε χρώμα. Η σύνδεση πρωτεΐνης-χρωστικής πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (περίπου σε δύο λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα χρώματος – για περίπου μια ώρα – μετά την προσθήκη. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης, γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών.

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων προστίθενται σε σωληνάρια eppendorf (1.5 ml, εις διπλούν) διάλυμα αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA) 1mg/ml (0,5, 10, 20,30, 40, 50 μl) ή μεμβρανικών παρασκευασμάτων αμφιβληστροειδή 5 μl σε ρυθμιστικό διάλυμα, ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl και 800 μl αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue και έχουν τελικό όγκο 1 ml. Τα διαλύματα αναδύονται σε συσκευή vortex και 300 μl από κάθε ένα μεταφέρονται σε πλάκα elisa και φωτομετρούνται στα 600 nm .

Η ποσότητα πρωτεΐνης στα δείγματα αμφιβληστροειδή υπολογίστηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία προκύπτει από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης BSA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg πρωτεΐνης ανά 20 μl διαλύματος.

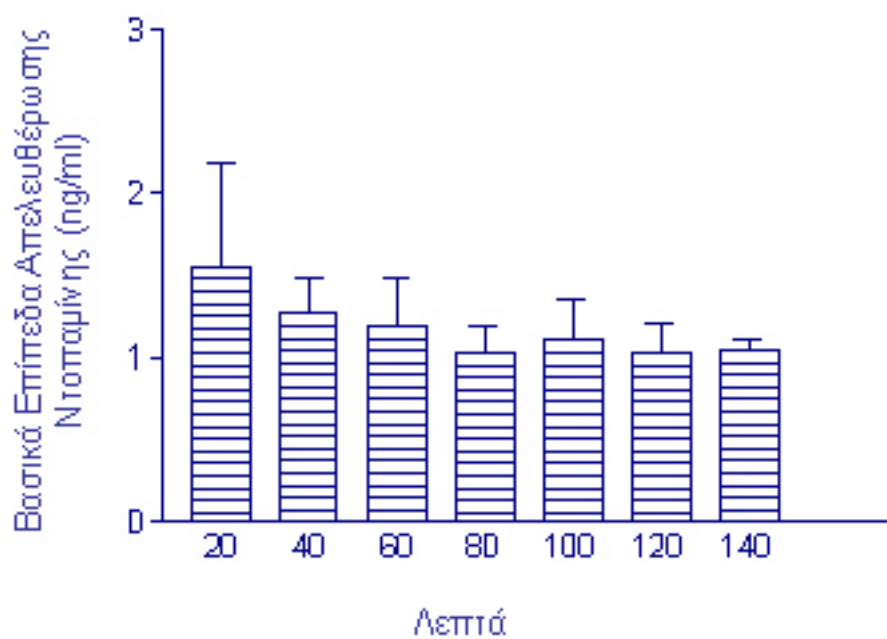
2.2.5 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Τα πειραματικά δεδομένα αξιολογήθηκαν στατιστικά με ανάλυση διασποράς (με έναν παράγοντα) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (One-way Analysis of Variance-ANOVA) και με την περαιτέρω δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων (post hoc analysis) κατά Dunnet. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν όπου οι τιμές $P < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βασική απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή

Αρχικά εξετάστηκε η βασική απελευθέρωση DA από τον ιστό. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της εκκλύμενης από τον ιστό DA κάθε 20 λεπτά και συνεχίστηκε μέχρι και τα 140 λεπτά. Η βασική απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή βρέθηκε να είναι της τάξεως των 1.17 ± 0.35 ng/ml. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνολικά δύο πειράματα (n=2) μέχρι και τα 140 λεπτά (σχήμα 6).

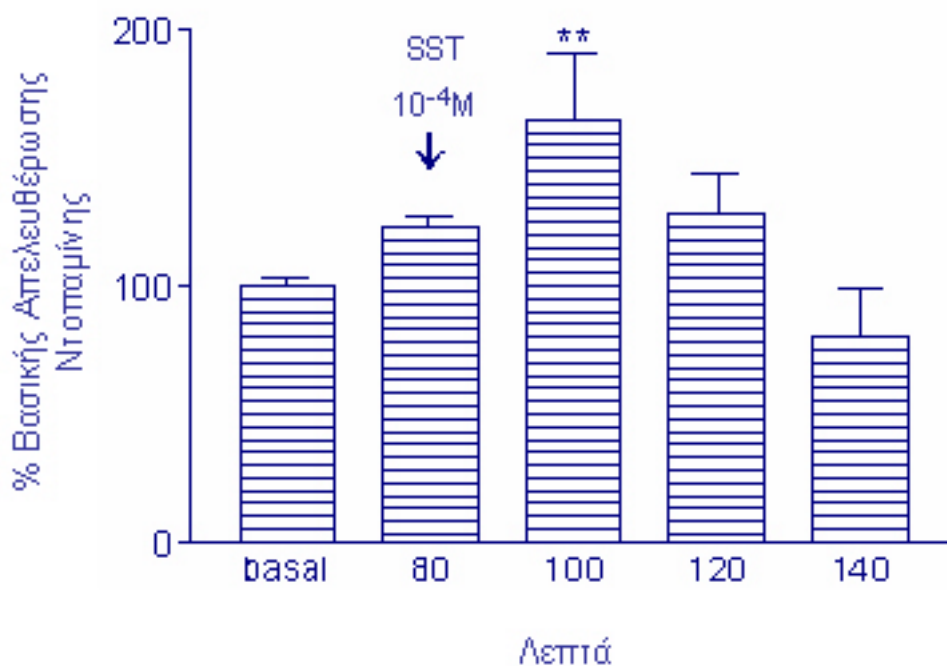


Σχήμα 6 : Βασική απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον αμφιβληστροειδή. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται κάθε 20 λεπτά.

3.2 Επίδραση SST στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή

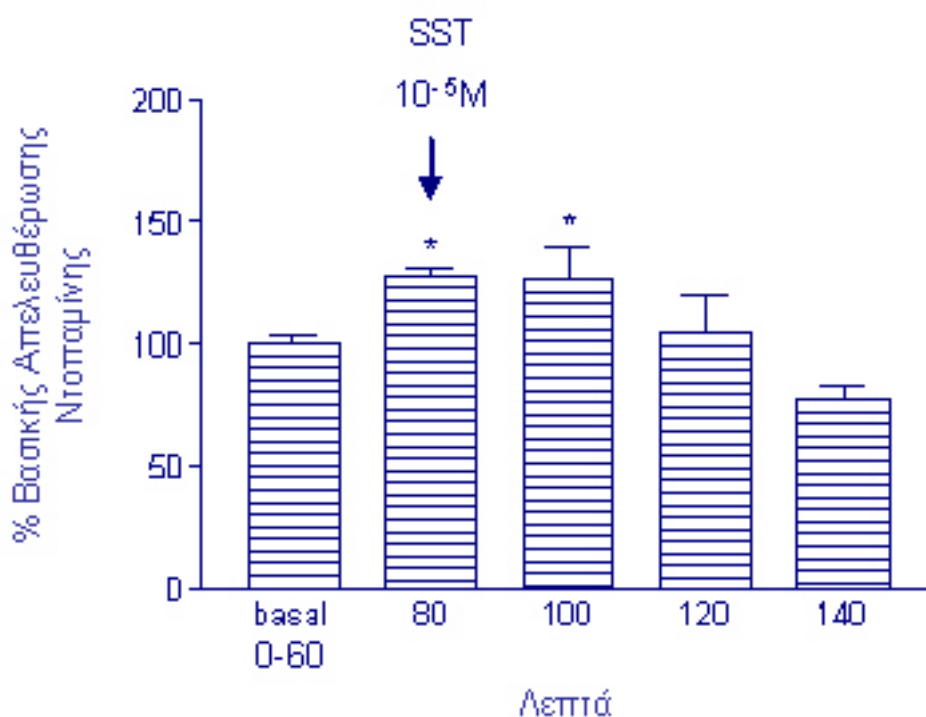
Για να εξετάσουμε την πιθανή επίδραση της SST στην απελευθέρωση DA από τον ιστό, πραγματοποιήθηκαν μελέτες συγκέντρωσης-απάντησης. Έτσι στο 4^ο δείγμα (80 min) στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας προστέθηκε SST στις συγκεντρώσεις των 10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6} M. Τα τρία πρώτα δείγματα αποτελούν τη βασική έκκριση DA με την οποία συγκρίνονται τα υπόλοιπα. Μετά την επίδραση συλλέγονται άλλα 4 δείγματα. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα σχήματα 7, 8 και 9.

Από το σχήμα 7 διαπιστώνουμε ότι η SST, στην συγκέντρωση 10^{-4} M, προκαλεί αύξηση στην απελευθέρωση DA της τάξεως των 165 ± 65 % και ότι η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνολικά πέντε πειράματα (n=5) μέχρι και τα 140 λεπτά.



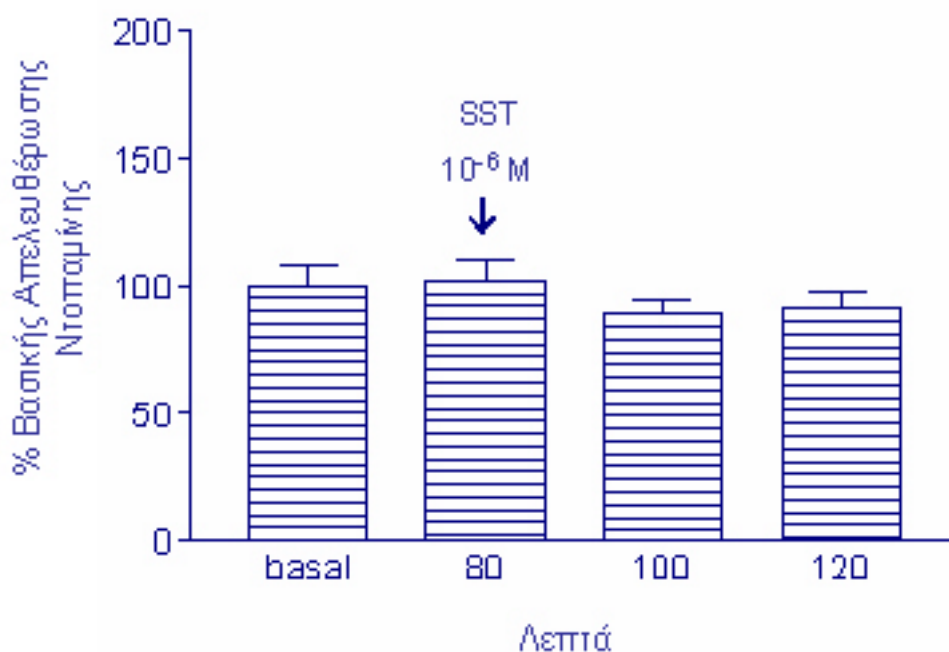
Σχήμα 7 : Επίδραση SST σε συγκέντρωση 10^{-4} M στην απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η SST αυξάνει τα επίπεδα ντοπαμίνης (165 ± 65 % της βασικής απελευθέρωσης) με στατιστικά σημαντικό τρόπο (** p < 0.01).

Στην συγκέντρωση των 10^{-5} M η SST προκαλεί επίσης αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA από τον ιστό. Η αύξηση αυτή είναι μικρότερη συγκρινόμενη με αυτή των 10^{-4} M εντούτοις είναι επίσης στατιστικά σημαντική. Η αύξηση είναι της τάξεως των $128,2 \pm 3,3$ % στα 80 και $126,6 \pm 14$ % στα 100 λεπτά. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνολικά τέσσερα πειράματα ($n=4$) μέχρι και τα 140 λεπτά.



Σχήμα 8 : Επίδραση SST σε συγκέντρωση 10^{-5} M στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η SST αυξάνει τα επίπεδα DA στα 80 λεπτά ($128,2 \pm 3,3$ %, βασικής απελευθέρωσης) και στα 100 λεπτά ($126,6 \pm 14$ %, βασικής απελευθέρωσης) με στατιστικά σημαντικό τρόπο (* $p < 0.05$).

Αντίθετα στην συγκέντρωση των 10^{-6} M η SST δεν φαίνεται να ασκεί δράση στην απελευθέρωση DA, μιας και τα επίπεδα της εμφανίζονται συγκρίσιμα με αυτά της βασικής έκκρισης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνολικά τρία πειράματα (n=3) μέχρι και τα 120 λεπτά.

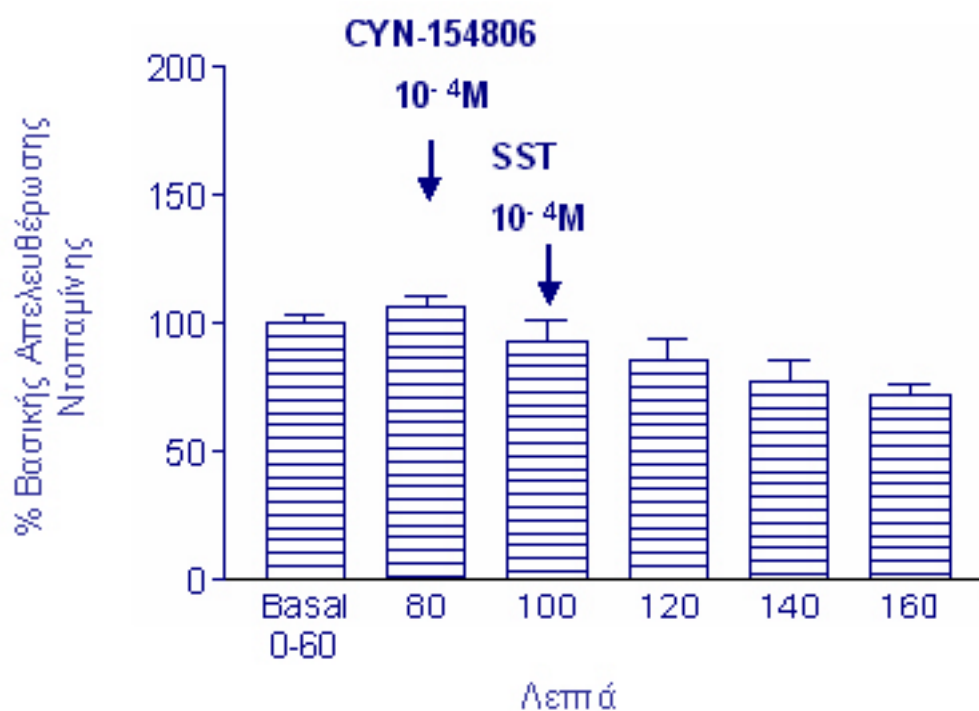


Σχήμα 9 : Επίδραση SST στην απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η SST σε συγκέντρωση 10^{-6} M δεν επηρεάζει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης.

Συνοψίζοντας λοιπόν τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι η SST προκαλεί αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο.

3.3 Επίδραση του SSTR2 ανταγωνιστή CYN-154806 στην προκαλούμενη από την SST αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA από τον αμφιβληστροειδή

Στόχος της επόμενης μελέτης ήταν να εξετάσουμε την πιθανή εμπλοκή του SSTR2 υποδοχέα στην προκαλούμενη από την SST αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA από τον αμφιβληστροειδή. Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επίδραση του ανταγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων CYN-154806 με την SST. Εδώ στο 4^ο δείγμα στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας (80 min) προστίθεται ο ανταγωνιστής CYN-154806 σε συγκέντρωση 10^{-4} M και στο αμέσως επόμενο δείγμα (5^ο, 100 min) προστίθεται SST 10^{-4} M. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνολικά πέντε πειράματα (n=5) μέχρι και τα 160 λεπτά και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο σχήμα 10.



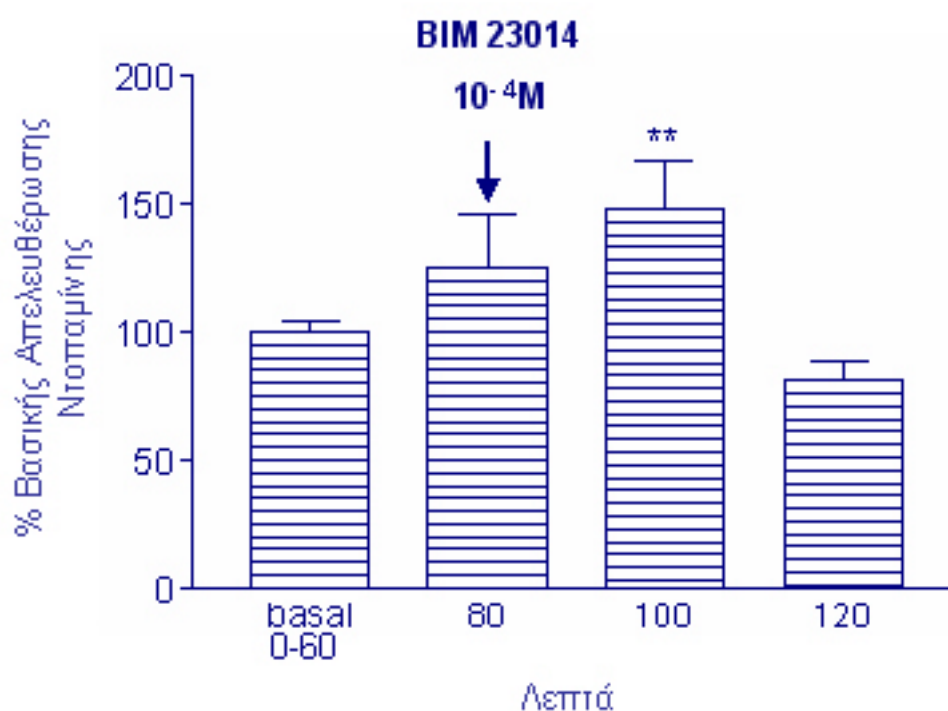
Σχήμα 10 : Επίδραση του ανταγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων CYN-54806 στη σωματοστατινο-εξαρτώμενη αύξηση της απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η χορήγηση SST μετά από επώαση των με εμφυτευμάτων αμφιβληστροειδούς με τον SSTR2 ανταγωνιστή προκάλεσε αναστολή της επαγόμενης από την SST αύξησης των επιπέδων ντοπαμίνης..

Από το σχήμα διαπιστώνουμε ότι η προσθήκη του ανταγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων ανέστειλε τη προκαλούμενη από την SST αύξηση στην απελευθέρωση DA. Αυτό υποδεικνύει πιθανή εμπλοκή του SSTR2 υποδοχέα σε αυτή τη δράση.

3.4 Επίδραση του SSTR2 αγωνιστή BIM-23014 στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.

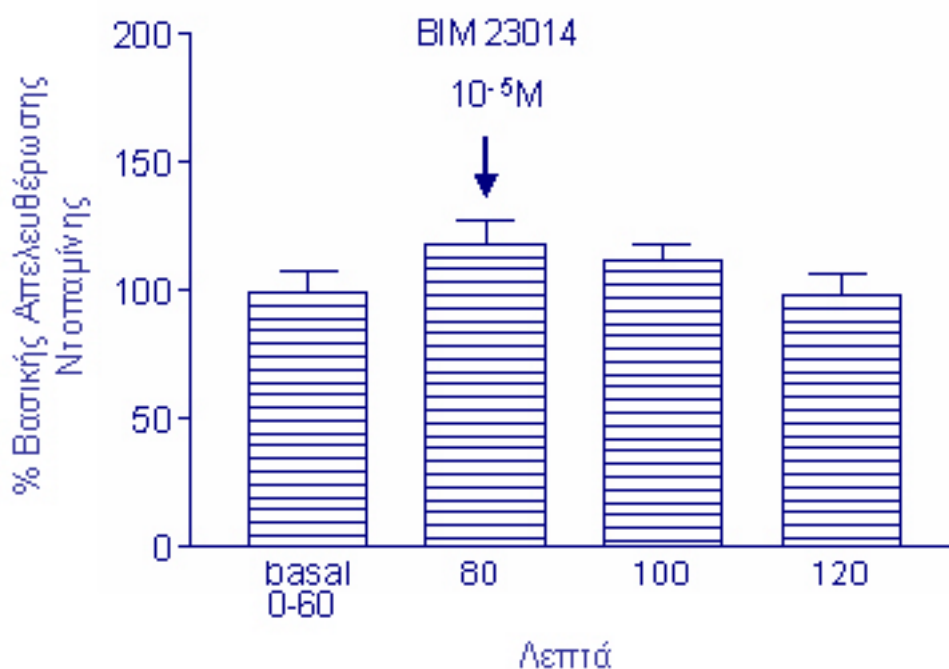
Προκειμένου να διαπιστώσουμε άμεσα την εμπλοκή του SSTR2 υποδοχέα στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή, εξετάζουμε την επίδραση του εκλεκτικού αγωνιστή των SSTR2 υποδοχέων BIM-23014 στις συγκεντρώσεις των 10^{-4} και 10^{-5} M. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα σχήματα 11 και 12.

Από το σχήμα 11 διαπιστώνουμε ότι ο αγωνιστής BIM-23014, στην συγκέντρωση 10^{-4} M, προκαλεί αύξηση στην απελευθέρωση DA της τάξεως των 139.5 ± 16 % και ότι η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα πειράματα (n=4) μέχρι και τα 120 λεπτά.



Σχήμα 11 : Επίδραση του SSTR2 αγωνιστή BIM-23014 σε συγκέντρωση 10^{-4} M στην απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το BIM-3014 αυξάνει τα επίπεδα απελευθέρωσης ντοπαμίνης ($139,5 \pm 16$ % βασικής απελευθέρωσης) με στατιστικά σημαντικό τρόπο (** p < 0.01).

Στην συγκέντρωση των 10^{-5} M ο αγωνιστής BIM-23014, προκάλεσε μικρή αύξηση στην απελευθέρωση της DA η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η αύξηση αυτή είναι μικρότερη σε συγκρινόμενη με αυτή της επίδρασης των 10^{-4} M. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνολικά τρία πειράματα (n=3).



Σχήμα 12 : Επίδραση του SSTR2 αγωνιστή BIM-23014 σε συγκέντρωση 10^{-5} M στην απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου.

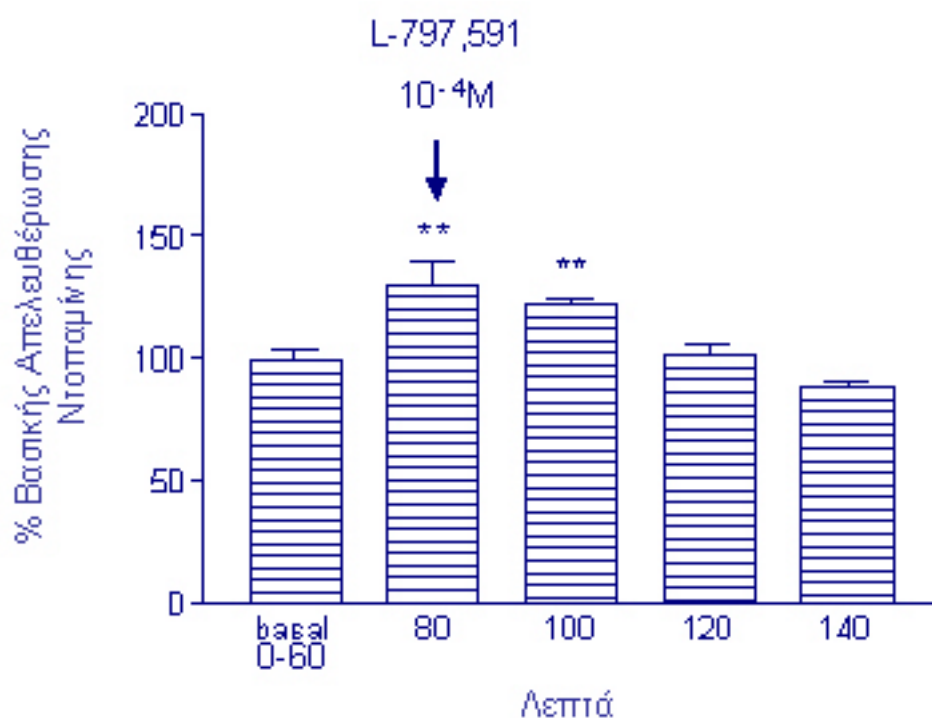
Τελικά διαπιστώνουμε ότι ο αγωνιστής των SSTR2 υποδοχέων BIM-23014 μιμείται τη δράση της SST και προκαλεί αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA από τον αμφιβληστροειδή κατά επίσης συγκεντρωσο- εξαρτώμενο τρόπο.

Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προκαλούμενη από την SST αύξηση στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή ασκείται μέσω της ενεργοποίησης του SSTR2 υποδοχέα

3.5 Επίδραση του SSTR1 αναλόγου L-797.591 στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.

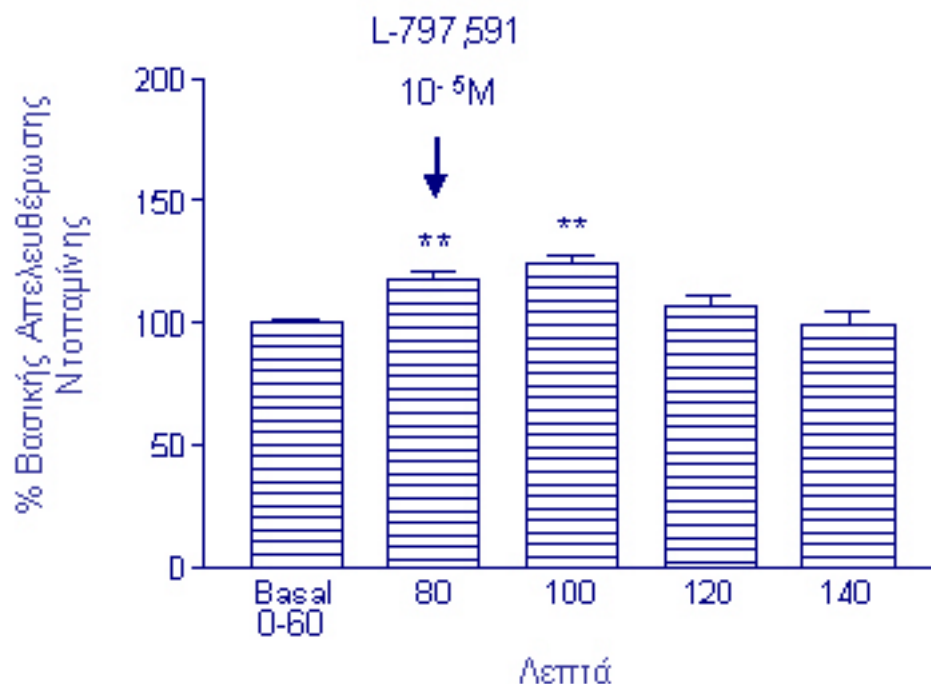
Προκειμένου να διαπιστώσουμε άμεσα την εμπλοκή και του SSTR1 υποδοχέα στην απελευθέρωση DA στον αμφιβληστροειδή εξετάζουμε την επίδραση του εκλεκτικού αναλόγου του L-797.591 στις συγκεντρώσεις των 10^{-4} και 10^{-5} M. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα σχήματα 13 και 14.

Από το σχήμα 13 διαπιστώνουμε ότι ο αγωνιστής L-797.591, στην συγκέντρωση 10^{-4} M, προκαλεί αύξηση στην απελευθέρωση DA της τάξεως των $118,54 \pm 3$ % και $130,3 \pm 10$ % της βασικής απελευθέρωσης στα 80 και 100 λεπτά αντίστοιχα. Η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τρία πειράματα (n=3) μέχρι και τα 140 λεπτά.



Σχήμα 13 : Επίδραση του SSTR1 αγωνιστή L-797.591 σε συγκέντρωση 10^{-4} M στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το SSTR1 ανάλογο προκαλεί αύξηση των επιπέδων απελευθέρωσης DA ($118,54 \pm 3$ % και $130,3 \pm 10$ % της βασικής απελευθέρωσης στα 80 και 100 λεπτά αντίστοιχα) με στατιστικά σημαντικό τρόπο (** p < 0.01).

Στην συγκέντρωση των 10^{-5} M ο αγωνιστής L-797.591, προκάλεσε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων DA της τάξεως των $118,5\pm 3$ % και 124.3 ± 4 % της βασικής απελευθέρωσης στα 80 και 100 λεπτά, αντίστοιχα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τρία πειράματα (n=3) μέχρι και τα 140 λεπτά.

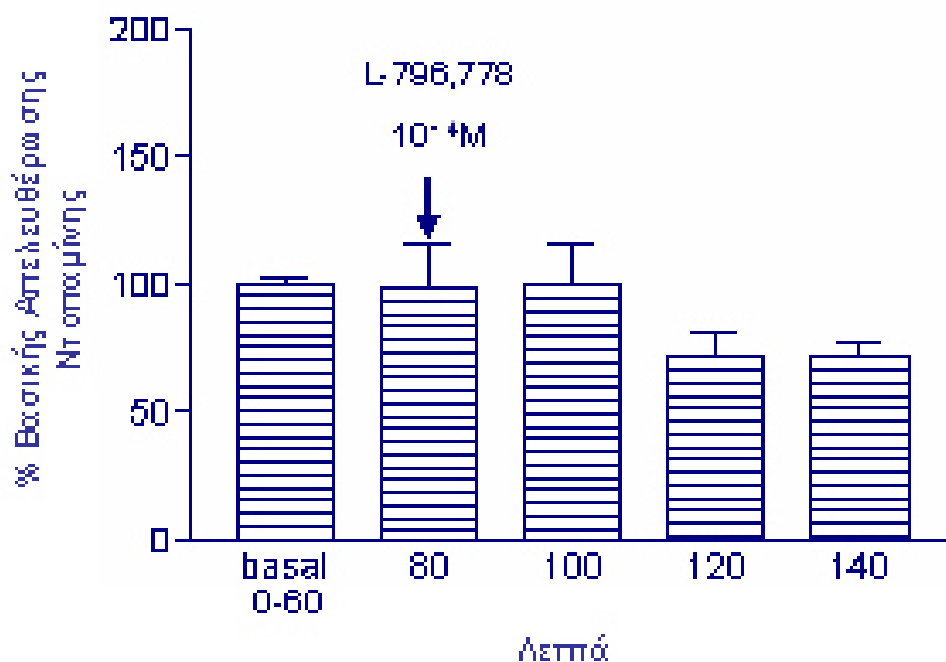


Σχήμα 14 : Επίδραση του SSTR1 αγωνιστή L-797,591 σε συγκέντρωση 10^{-5} M στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Τα επίπεδα απελευθέρωσης DA αυξήθηκαν με στατιστικά σημαντικό τρόπο ($118,5\pm 3$ % και 124.3 ± 4 % της βασικής απελευθέρωσης στα 80 και 100 λεπτά αντίστοιχα), (** p <0.01).

Τελικά διαπιστώνουμε ότι η προκαλούμενη αύξηση των επιπέδων DA, μετά από την επίδραση SST, ασκείται μέσω ενεργοποίησης τόσο των SSTR1 όσο και των SSTR2 υποδοχέων.

3.6 Επίδραση του SSTR3 αναλόγου L-796.778 στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.

Προκειμένου να πιστοποιήσουμε το ότι η δράση της SST στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή ασκείται εκλεκτικά και μόνο μέσω της ενεργοποίησης των SSTR1 και SSTR2 υποδοχέων, εξετάζουμε την δράση ενός SSTR3 αναλόγου του, L-796.778 σε συγκέντρωση 10^{-4} M, σε αυτήν. Κατά τη μελέτη πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα (n=3) και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο σχήμα 15



Σχήμα 15 : Επίδραση του SSTR3 αγωνιστή L-796.778 σε συγκέντρωση 10^{-4} M στην απελευθέρωση ντοπαμίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουαίου. Η επίδραση αυτή δεν επηρεάζει τα επίπεδα της εκκλύμενης από τον αμφιβληστροειδή ντοπαμίνης.

Από το διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι η προσθήκη του SSTR3 αγωνιστή L-796.778 δεν ασκεί καμία επίδραση στην απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σωματοστατίνη έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή πολλών ειδών. Παράγεται και απελευθερώνεται από μια υποκατηγορία βραχύνων κυττάρων στο εσωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς όπου δρα ως νευροδιαβιβαστής, νευρορυθμιστής αλλά και ως τροφικός παράγοντας (Thermos, 2003).

Η κλωνοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης (Yamada et al, 1992) συντέλεσε στη δημιουργία ειδικών εργαλείων, όπως αντισώματα και εκλεκτικά ανάλογα για τον κάθε υποδοχέα, τα οποία έπαιξαν και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαλεύκανση του ρόλου της σωματοστατίνης στις περιοχές έκφρασής της.

Πρόσφατα επιτεύχθηκε η χαρτογράφηση των υποδοχέων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή (Thermos, 2003). Ο εντοπισμός των SSTR1, SSTR2A, SSTR2B και SSTR4 υποδοχέων σε κύτταρα του αμφιβληστροειδούς όπως τα βραχύνια, δίπολα, φωτουποδοχείς και γαγγλιακά κύτταρα, αντίστοιχα, υποστηρίζει την υπόθεση ότι η SST ρυθμίζει διαφορικά τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς μέσω των διαφορετικών υποδοχέων της.

Επομένως, η SST μπορεί να δρα σε απόσταση με παρακρινικό τρόπο και να επηρεάζει την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος, του κύριου νευροδιαβιβαστή των κυκλωμάτων του αμφιβληστροειδούς, από τους φωτουποδοχείς και τα δίπολα κύτταρα μέσω των SSTR2 υποδοχέων, και από τα γαγγλιακά κύτταρα μέσω των SSTR4 υποδοχέων.

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η SST ρυθμίζει την απελευθέρωση της στον αμφιβληστροειδή μέσω του SSTR1 υποδοχέα (Mastrodimitrou & Thermos, 2004), ενώ η ενεργοποίηση των SSTR2 υποδοχέων είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του NO στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Vasilaki et al, 2002).

Διαφορετικές ερευνητικές ομάδες υποστηρίζουν την παρουσία (Jonhson et al, 1999, Helboe & Moller, 1999, Fontanesi et al, 2000, Cristiani et al 2002) ή την απουσία (Jonhson et al, 1998, Vasilaki et al, 2001) συνεντοπισμού των SSTR1 και SSTR2A υποδοχέων και της TH στα βραχύνια κύτταρα, ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί λειτουργικά δεδομένα που να υποστηρίζουν την άμεση ρύθμιση της απελευθέρωσης DA από την SST στον αμφιβληστροειδή. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο στην παρούσα μελέτη να εξεταστεί ο πιθανός ρόλος της SST στην απελευθέρωση της DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου.

Η ντοπαμίνη είναι ένας από τους κύριους νευροτροποποιητές της οπτικής διαδικασίας και των κυκλωμάτων του αμφιβληστροειδούς (Thermos, 2003). Στον αμφιβληστροειδή η DA απελευθερώνεται από μία ομάδα βραχύνων κυττάρων. Η δράση ασκείται μέσω ενεργοποίησης των ντοπαμινεργικών υποδοχέων (D1-D2) οι οποίοι εντοπίζονται σε κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Οι D1 υποδοχείς που δρουν διεγερτικά μέσω ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης και επακόλουθης αύξησης των επιπέδων του cAMP, βρίσκονται σε δίπολα, οριζόντια, βραχύινα και γαγγλιακά κύτταρα, ενώ ο D2 υποδοχέας έχει εντοπιστεί σε φωτοϋποδοχείς, ραβδία και κωνία καθώς και βραχύινα κύτταρα όπου δρα ως αυτοϋποδοχέας της ντοπαμίνης. Οι D2 υποδοχείς προκαλούν αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και μείωση των επιπέδων του cAMP.

Η εκτεταμένη παρουσία των ντοπαμινεργικών υποδοχέων συνηγορεί υπέρ του σημαντικού ρυθμιστικού ρόλου της DA στα κυκλώματα του αμφιβληστροειδούς. Η ντοπαμίνη επηρεάζει τη λειτουργία των αμφιβληστροειδικών κυττάρων και συμβάλλει στις διαδικασίες εκείνες που ευθύνονται για τη προσαρμογή του αμφιβληστροειδούς στις αλλαγές της έντασης του φωτός (Witonsky, 2004).

Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει ότι η SST ρυθμίζει την απελευθέρωση DA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου, καθώς προκαλεί αύξηση των επιπέδων της κατά έναν συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης του SSTR2 υποδοχέα δεδομένου ότι ο εκλεκτικός ανταγωνιστής των SSTR2 υποδοχέων CYN-154806 μειώνει την προκαλούμενη από την SST αύξηση των επιπέδων DA, ενώ ο SSTR2 εκλεκτικός αγωνιστής BIM-23014 μιμείται τη δράση της.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προγενέστερες μελέτες σε πυρήνες του εγκεφάλου πλούσιους σε ντοπαμίνη (ραβδωτό σώμα) όπου η SST έχει βρεθεί να αυξάνει την βασική αλλά και την επαγόμενη από το K^+ , απελευθέρωση DA από ιστικά παρασκευάσματα ραβδωτού σώματος αρουραίου (Chesselet&Reisine, 1982). Επίσης, σε *in vivo* πειράματα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων DA στο ραβδωτό σώμα κατά έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο μετά από ενδοεγκεφαλική χορήγηση SST στον πυρήνα αυτόν (Thermos et al, 1996). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την εμπλοκή των SSTR2 υποδοχέων στη ρύθμιση της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Hathway et al, 1998).

Επομένως, παρατηρείται ρύθμιση της DA από την SST όχι μόνο σε πυρήνες του ΚΝΣ αλλά και στον αμφιβληστροειδή ο οποίος θεωρείται μοντέλο του ΚΝΣ. Στον αμφιβληστροειδή, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν εκτός της εμπλοκής του SSTR2 και την εμπλοκή του SSTR1 στη ρύθμιση της απελευθέρωσης της DA. Αντίθετα, η ενεργοποίηση των υποδοχέων SSTR3, που δεν εντοπίζονται στον αμφιβληστροειδή αρουραίου, δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα απελευθέρωσης DA.

Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν τη ρύθμιση των επιπέδων DA και από άλλες νευροδιαβιβαστικές ουσίες και νευροτροποποιητές. Η ενεργοποίηση των γλουταμεργικών υποδοχέων (AMPA) που βρίσκονται στο βραχύνο κύτταρο που παράγει τυροσινική υδροξυλάση επάγει την απελευθέρωση της DA ενώ η γλυκίνη και το GABA (GABA-A υποδοχείς) μειώνουν τα επίπεδα της ντοπαμίνης (Witkovsky, 2004).

Το NO μειώνει την απελευθέρωση της DA στον αμφιβληστροειδή μέσω ενός cGMP-ανεξάρτητου μηχανισμού (Bugnon et al, 1994, Goldstein et al, 1996). Η SST αυξάνει τα επίπεδα του NO (Vasilaki et al, 2002) και της DA (αποτελέσματα παρούσας μελέτης) στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Τα τρία συστήματα NO, DA και SST αποτελούν κύρια ρυθμιστικά συστήματα στον αμφιβληστροειδή. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διαλεύκανση τόσο των μηχανισμών μέσω των οποίων η SST ρυθμίζει τα επίπεδα του NO και της DA όσο και των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Aquila MC. Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 : 782-786.
2. Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P : Somatostatin modulates voltage-gated K^+ , Ca^{++} currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci* 2000; 20 : 929-936.
3. Baumeister H, Meyerhof W : Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *J. Biol. Paris* 2000a; 94: 167-177.
4. Bersani M, Thim L, Baldissera FG, Holst JJ : Prosomatostatin1-64 is a major product of somatostatin gene expression in pancreas and gut. *J Biol Chem* 1989; 64 : 0633-0636.
5. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R : Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-79.
6. Brecha N, Vila A, Allen J : Somatostatin subtype receptor 4 expression in mouse and rat retina. [abstract] Annual Meeting Abstract and Program Planner. *A Res Vis ophthalmol* 2002, abstract 2768
7. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M : Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 11151-11155
8. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M : Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinol* 1993; 133: 2561-2567.
9. Bugnon O, Schaad NC, Schorderet M : Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. *Neuroreport* 1994; 5: 401-404.
10. Caron P, Buscail L, Beckers A, Esteve J-P, Igmout A, Hennen G, Susini C : Expression of somatostatin receptor SST4 in human placenta and absence of octreotide on human placenta growth hormone concentrations during pregnancy. *J Clin Endocr Metab* 1997; 82: 3771-3776.
11. Chesselet M-F, Reisine TD : Somatostatin regulates dopamine release in rat striatal slices and cat caudate nuclei. *J Neurosci* 1983; 232-236.

12. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH : Οι Βιοχημικές Βάσεις της Νευροφαρμακολογίας. Εκδόσεις Α Τσουκαλαδάκης Αθήνα 1997.
13. Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Pertucci C, Viollet C, Bagnoli P : Expression of somatostatin subtype 1 receptor in rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ; 41: 3191-9.
14. Cristiani R, Pertucci C, Dal Monde M, Bagnoli P : Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res* 2002; 936: 1-14.
15. Csaba Z, Dournaud P : Cellular Biology of Somatostatin receptors. *Neuropeptides* 2001; 35: 1-23.
16. Crooks J, Kolb H : Localization of GABA, Glycine, Glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina. *J Comp Neurol* 1992; 305: 287-302.
17. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Scheithar P, Danielson PE, Degtiar VE, Witting B, Schultz G, Kalkbrenner F : A specific G_(o) heterotrimer couples somatostatin receptors to voltage-gated calcium channels in RINm5F cells. *FEBS Lett* 1996 ; 380: 137-141.
18. Dowling JE, The retina: An Approachable Part of the Brain 1987. Cambridge, Mass : Belknap Press.
19. Duke-Elder S : System of Ophthalmology : Normal and Abnormal Development 1963. London, Kimpton.
20. Elliot DE, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV : Prosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J Immunol* 1994: 153: 1180-86.
21. Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C : The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol* 1994; 8 : 25-44.
22. Finley JCW, Maderdruf JF, Roger LJ, Perrutcz P. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neurosci* 1981; 6 : 2173-2192.
23. Florio T, Rim C, Herberger R, Loda M, Strock PJS : The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO 1 cells. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1289-97.
24. Florio T, Thellung S, Scettini G : Intracellular transduction mechanisms couple to brain somatostatin receptors. *Pharmacol Res* 1996; 33: 297-305.

25. Fontanesi G, Gargini C, Bagnoli P : Postnatal development of somatostatin 2A (sst2A) receptors expression in the rabbit retina. *Dev Brain Res* 2000; 123: 67-80.
26. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S : Nitric oxide; A review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* 1996; 36: 2979-94.
27. Grigoryan EN, Vasilaki A, Mastrodimou N, Thermos K : Somatostatin receptors immunoreactivity in the of the adult newt (Pleurodeles waltii Michan). *Neurosci Lett* 2003; 337: 143-6.
28. Hardy P, Durmont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma Dr, Chemtob S : Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the development ocular vasculature : a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 489-509.
29. Hathway, GJ, Humphrey PP, Kendrick KM : Evidence that somatostatin sst2 receptors mediate striatal DA release. *Br J Pharmacol* 1999; 128:1346-1352.
30. Helboe L, Moller M : Immunochemical localization of somatostatin receptor subtype sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 ; 40 : 2376-82.
31. Johnson J, Rickman DW, Brecha NC : Somatostatin and somatostatin subtype 2A expression in mammalian retina. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 103-11.
32. Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh J, Brecha NC : Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neurosci* 1999; 94: 675-683.
33. Johnson J, Wong H, Walsh J, Brecha NC : Expression of somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 1998; 393: 93-101.
34. Kandel ER, Scharz JH, Jessel TM : Νευροεπιστήμες και συμπεριφορά. 2^η έκδοση, Ηράκλειο Κρήτης 2000, ΠΕΚ.
35. Kahle M : Νευρικό σύστημα και αισθητήρια όργανα. Αθήνα 1985. Εκδόσεις Λίτσας.
36. Kleuss C, Heschefeler J, Ewel C, Rosenthal W, Scultz G, Witting B : Assigment of G protein subtype to specific receptors inhibition of calcium currents. *Nature* 1991; 353: 43-48.
37. Klisovic DD, O' Dorisio MS, Katz SE, Sall JW, Balster D, O' Dorisio TM, Craig E, Lubow M : Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues : RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42: 2193-201.
38. Koistinaho S, Sagar SM : NADPH-diaphorase-reactive neurones in the retina. *Progress in Retinal Eye Res* 1995; 15: 69-87.

39. Kolb H : How retina works. *American Scientist* 2003; 91: 28-35.
40. Kolb H, Cuenca N, Wang HH, Dekorver L : The synaptic organization of dopaminergic amarine cells in the cat retina. *J Neurocytol* 1990; 19: 343-366.
41. Kolb H, Cuenca N, Dekorver L : Posembedding immunocytochemistry for GABA and glycine reveals the synaptic relationships of dopaminergic amarine cells in the cat retina. *J Comp Neurol* 1991 ; 310 : 267-84.
42. Kolb H, Fernandez E, Nelson R : Webvision : The organization of the retina and visual system. 2002 <http://webvision.med.utah.edu>
43. Kong H, De Paoli AM, Breder CD, Yasuda K, Bell GI, Reisine T : Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSSTR2 and SSTR3 in adult rat brain : Analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry. *Neurosci* 1994; 59 (1): 175-184.
44. Krauss J, Woltje M, Schonwetter N, Holt V : Gene structure and regulation of somatostatin receptor type 2. *J Physiol Paris* 2000 ; 94: 199-204.
45. Krulich L, Dharival AP, McCann SM : Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinol* 1968; 83: 783-90.
46. Kumar U, Ong W-Y, Patel SC, Patel YC : Cellural expression of the five somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) in rat hypothalamus : A comparative immunohistochemical analysis. Program Annual Meeting US Endocrine Society, San Diego 1999.
47. Larsen JN : Somatostatin in retina. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 1995; 218: 1-24.
48. Lasater EM, Dowling JE : Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Pro Natl Aad Sci USA* 1985; 3025-9.
49. Law SF, Manning D, Reisine T : Indentification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J Biol Chem* 1991; 266: 17885-17897.
50. Le Romancer M, Cherifi Y, Levasseur S, Laigneau JP, Penranzi G, Jois P, Lewin MJ, Reyl-Desmars F : Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae. *Life Sci* 1996; 58: 1091-1098.
51. Liapakis G, Politou E, Thermos K : Solubilization of active somatostatin receptors from rabbit retina. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 1821-8.

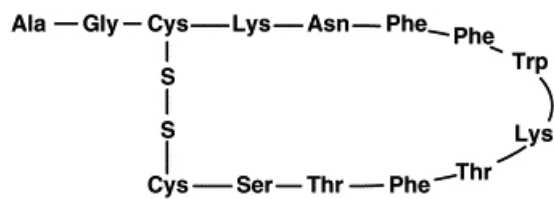
52. Liapakis G, Thermos K : Characterization of [¹²⁵ I] Tyr¹¹-Somatostatin binding sites in the rabbit retina. *Neuropeptides* 1992; 13-9.
53. Low M : The somatostatin neuroendocrine system : Physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. *Best Practise&Research Clinical Endocrin Metab* 2004 ; 607-622
54. Mann IC : The development of the human eye. London: British Medical Association 1964.
55. Mastrodimou N, Thermos K : The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosc Lett* 2004: 356: 13-9-6.
56. Meyerhof W, Wulsen I, Sconrock C, Fehr I, Ricthter I : Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and a comparison of its expression pattern with that of somatostatin-14 receptor in the rat brain. *Proc Natl Aad Sci USA* 1992; 89: 10267-10271.
57. Mori M, Ahara M, Shimizu T : Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye : SSTR4 is intensely in iris/ciliary body. *Neurosc Lett* 1997; 223: 185-188.
58. Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W : Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 2004; 89: 1057-1091.
- 59, Patel YC: Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-98.
60. Patel YC, Galanopoulou AS, Rabbani SN, Liu JL, Ravazzola M, Amherdt M : Somatostatin-14 and somatostatin-28, and prosomatostatin [1-10] are independendly and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islet somatostatin tumor cells (1027B2) receptor in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 131: 183-194.
61. Patel YC, O'Neil W : Peptides derived from cleavage of prosomatostatin at carboxyl- and amino-terminal segments. Characterization of tissue and secreted forms in the rat. *J Biol Chem* 1998; 263: 745-751.
62. Patel YC, Srikant C: Subtype selectivity of peptide analogues for all five cloned human somatostatin receptors (hSSTRs1-5). *Endocrinol* 1994; 135: 2814-7.
63. Patel YC, Zingg HH, Srikant C : Somatostatin-14 like immunoreactive forms in the rat : chraracterization, distribution and biosynthesis. *Adv Exp Med Biol* 1985; 188: 71-87.

64. Pavlidis M, Fischer D, Thanos S : Photoreceptors degeneration in the RCS rat attenuates dendritic transport and axonal degeneration of ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2318-2328.
65. Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P : Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit via sst2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 363: 680-94.
66. Piccolino M, Neyton Jgerschenfeld HM : Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate in horizontal cells of turtle retina. *J Neurosci* 1984; 4; 2477-2488.
67. Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A : N-terminally extended somatostatin : the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 1980; 138:55-8.
68. Pourcho RG : Dopaminergic amacrine cells in the cat retina. *Brain Res* 1982; 252:101-9.
69. Rabbani SN, Patel YC : Peptides derived by processing of rat somatostatin near the amino-terminus : characterization, tissue distribution, and release. *Endocrinol* 1990; 126:2054-61.
70. Reichlin S : Somatostatin. *N Engl J Med* 1983; 309: 1495-501.
71. Reisine T, Bell G : Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrine Rev* 1995; 16:427-42.
72. Ribalet B, Eddlestone GT : Characterization of G protein of a somatostatin receptor to a K⁺ ATP channel in insulin-secreting mammalian HIT and RIN cell lines. *J Physiol* 1995; 485: 73-76.
73. Schonbrunn A, Tashjian AH : Characterization of functional receptors for somatostatin in pituitary cells in culture. *J Biol Chem* 1978; 253: 6473-6483.
74. Schindler S, Graha P, Mullenburger G, Arendt J : Adenosarcoma and other uterine sarcomas. A Review. *Bull Sci Med Grand Duche Luxemb* 1997; 134(2): 27-30
75. Shen LP, Rutter WJ : Sequence of human somatostatin I gene. *Science* 1984; 224: 168-171.
76. Stevens A, Lowe J : Ιστολογία του ανθρώπου, 2^η έκδοση, Αθήνα 1998, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
77. Stryer L : Βιοχημεία, 3^η έκδοση, Ηράκλειο 1997, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Κρήτης.

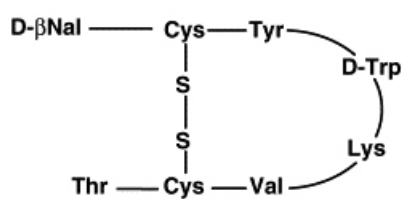
78. Tannenbaum GS, Epelbaum J : Somatostatin-In: Handbook of Physiology Vol V, Section 7: The Endocrine System, Hormonal Control of Growth . (JL Kostyo, VOL. Ed, HM, Goodman, Section Ed.). Oxford University Press NY, Oxford 2000 p: 221-265.
79. Thermos K : Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res* 2003; 43: 1805-15.
80. Thermos K, He HT, Wang H-C, Margolis N, Reisine T : Biochemical properties of brain somatostatin receptors. *Neurosci* 1989; 131-141.
81. Thermos K, Radke J, Kastellakis A, Anagnostakis K, Spyraiki C : Dopamine-Somatostatin interactions in rat striatum : an in vivo microdialysis study. *Synapse* 1996; 22:209-16.
82. Thermos K, Reisine T : Somatostatin receptor subtypes in the clonal anterior pituitary cell lines AtT-20 and GH3. *Mol Pharmacol* 1998; 33:370-7.
83. Tessier-Lavigne M : Phototransduction and information processing in the retina. In: principles of Neuronal Science Ed Kandel, ER Schwartz JH, Jessel TM, Prentice-Hall International Inc, 3th edition 1991.
84. Thoss VS, Perez J, Probat A, Hoyer D : Expression of five somatostatin receptors mRNAs in the human brain and pituitary. *Arch Pharmacol* 1996; 411-419.
85. Umino O, Lee Y, Dowling JE : Effects of light stimuli on the release of dopamine from interplexiform cells in the white perch retina. *Vis Neurosci* 1991; 7: 451-458.
86. Van Hagen PM, Baarsma GS, Mooy CM, Ercoskan EM, Ter Avest E, Hofland LJ, Lammberts SW, Kuijpers RW : Somatostatin and somatostatin receptors subtypes in retinal diseases. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: S43-51.
87. Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Holt V : Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor subtypes (SSTR2B). *FEBS Lett* 1992; 311: 290-4.
88. Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K : NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptors subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 2001; 42 : 1600-1609.
89. Vasilaki A, Georgoussi Z, Thermos K : Somatostatin receptors (sst2) are coupled to Go and modulate GTPase activity in the rabbit retina. *J Neurochem* 2003; 84: 625-32.

90. Vasilaki A, Mouratidou M, Schultz S, Thermos K : Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rabbit retina. *Neuropharmacol* 2002; 43:899-909.
91. Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Hoyer D, Tsilimbaris M, Veruki M, Wassle H : Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in the rat retina. *Eur J Neurosc* 1996; 2286-97.
92. Voigt T, Wassle H : Dopaminergic innervation of AII amacrine cells in mammalian retina. *J Neurosci* 1987; 7: 4115-128.
93. Witkovsky P : Dopamine and retinal function. *D Ophthalmol* 2004; 108: 17-40
94. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager H, Bell G, Seino S : Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastro-intestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad of USA* 1992; 89: 251-255.
95. Zalutsky RA, Miller RF : The physiology of somatostatin in the rabbit retina. *J Neurosci* 1990; 10: 383-93.

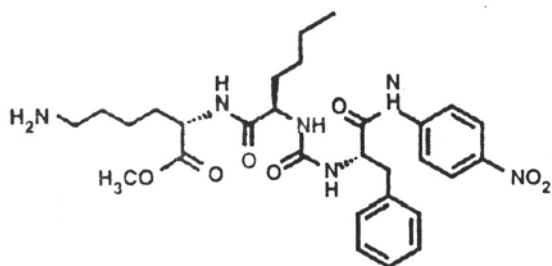
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α



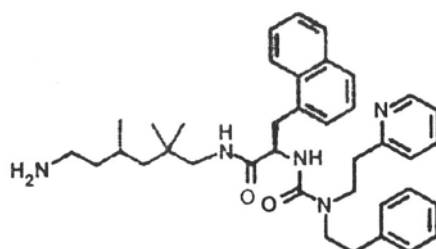
Σωματοστατίνη



BIM 23014



L-796,778



L-797,591

(Ac — 4NO₂-Phe-c-(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-D-Tyr-NH₂)

CYN-154806