ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΚΟΡΤΙΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΙΚΗ ΜΑΣΤΡΟΔΗΜΟΥ ΧΗΜΙΚΟΣ

HPAKAEIO 2011

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Καθηγητής Οφθαλμολογίας Ιωάννης Παλλήκαρης
 (Επιβλέπων Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Κυριακή Θερμού
 (Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Ο Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης
 (Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Ο Καθηγητής Φαρμακολογίας Αχιλλέας Γραβάνης
 (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Καθηγητής Φαρμακολογίας Νικόλαος Σακελλαρίδης
 (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)
- Ο Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Άννα Βασιλάκη (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)
- Ο Καθηγητής Νευρολογίας Ανδρέας Πλαϊτάκης
 (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Στη μαμά μου,

που ήταν η πρώτη που πίστεψε σε μένα...

...στην αδερφή μου Σεμέλη και στον Κώστα,

που ήταν πάντοτε δίπλα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της καθηγήτριας Φαρμακολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Θερμού Κυριακής. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ολόψυχα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή που εμφανίστηκα στο γραφείο της ως προπτυχιακή φοιτήτρια, για την απεριόριστη επιστημονική της συμβολή που πάντα απλόχερα και ακούραστα μου παρείχε, για την ενθάρρυνσή της και την ηθική της συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια. Με έμαθε να είμαι μια σωστή επαγγελματίας και μου έδειξε πώς είναι ένας άνθρωπος που πραγματικά αγαπά και κοπιάζει για τη δουλειά του, αφού αποτελεί ένα περίτρανο παράδειγμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: τον κ. Ι. Παλλήκαρη, τον κ. Μ. Τσιλιμπάρη, τον κ. Α. Γραβάνη, τον κ. Α. Πλαϊτάκη, τον κ. Ν. Σακελλαρίδη και ιδιαίτερα την κ. Άννα Βασιλάκη μια και ήταν εκείνη που με εκπαίδευσε στις τεχνικές του εργαστηρίου, με στήριξε στα πρώτα αλλά και στα μετέπειτα βήματά μου και με καθοδηγούσε σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλους τους συναδέλφους που πέρασαν όλα αυτά τα χρόνια (κι ήταν πραγματικά πολλοί) από το εργαστήριο αλλά και από άλλα εργαστήρια που συνέβαλαν με κάθε τρόπο, μικρότερο ή μεγαλύτερο, στην πραγματοποίηση της διατριβής μου. Όμως, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στη Φωτεινή Κιαγιαδάκη, τόσο για την εκτέλεση κάποιων πειραμάτων της διατριβής μου αλλά και για την άψογη συνεργασία μας. Πραγματικά δε χρειαζόταν να πω πολλά για να με καταλάβει σε όλα τα επίπεδα. Για το ιδιαίτερα καλό κλίμα συνεργασίας, υποστήριξης και ευχάριστης ατμόσφαιρας, τόσο μέσα στο εργαστήριο, αλλά και με τους περισσότερους και έξω από αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω: τη Δέσποινα Παπασάββα, τη Στέλλα Γιακουμάκη, την Αντωνέλλα Μαραζιώτη, την Έφη Καραγιάννη, τη Θέκλα

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Ανδρέα Καστελλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχοφυσιολογίας του Τμήματος Ψυχολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις εύστοχες πάντα παρατηρήσεις του στις εβδομαδιαίες συναντήσεις μας καθώς και την κ. Μαίρη Παπαδοκωστάκη.

Ένα ακόμα μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στους εκτός εργαστηρίου φίλους μου που φρόντιζαν να περνάω ευχάριστα και ξέγνοιαστα τον ελεύθερό μου χρόνο. Ιδιαίτερα η Άννα Μουσογιάννη, η Λένα Λατσούδη, ο Μάκης Σενίκ, η Κλαίρη Γκιόκα και ο Σπύρος Περδικάκης ήταν κοντά μου, ειδικά τον τελευταίο καιρό, με μεγάλη υπομονή, συμπαράσταση και κατανόηση.

Τελευταίες άφησα τις θερμότερες ευχαριστίες μου για τους δικούς μου ανθρώπους. Ευχαριστώ πολύ την αδερφή μου Σεμέλη, για την υπομονή της, την ηθική της υποστήριξη και τη βοήθειά της ανά πάσα στιγμή. Το πιο γλυκό μου ευχαριστώ χρωστώ στο σύντροφο της ζωής μου Κώστα Νικολόπουλο, που με αγάπη και κυρίως υπομονή είναι δίπλα μου στηρίζοντάς με σε κάθε μου προσπάθεια, αλλά και στο Χρήστο και στη Σοφία που απλά κάνουν τη ζωή μου ομορφότερη. Τέλος, το ευχαριστώ είναι πολύ μικρό για τη μαμά μου, Σοφία Ανδριανάκη. Ήταν αυτή που με στήριξε ηθικά και υλικά, που με δίδαξε τις αξίες της ζωής, που μου έμαθε να παλεύω γι'αυτό που θέλω με σεβασμό απέναντι στους άλλους, αλλά και απέναντι στον εαυτό μου. Πάντα ένιωθα πολύ δυνατή γνωρίζοντας ότι υπάρχει κάποιος που πιστεύει πραγματικά σε μένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕ	Σ	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜ	ENA	ix
ΣΥΝΤΜΗΣΕ	Σ	xiii
1. ΕΙΣΑΓΩ	ΩΓΗ	1
1.1 A	ΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ	1
1.1.1	Δομή του αμφιβληστροειδή	1
1.1.2	Οπτική επεξεργασία	5
1.2 П	ΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ	10
1.2.1	Αμφιβληστροειδική ισχαιμία	
1.2.2	Νεοαγγείωση	13
1.2.3	Απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή	13
1.2.4	Αμφιβληστροειδοπάθεια προωρότητας	14
1.2.5	Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια	15
1.2.6	Θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών	16
1.3 П	ΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ	18
1.4 Σ	ΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ	19
1.4.1	Ανακάλυψη της σωματοστατίνης	19
1.4.2	Βιοσύνθεση της σωματοστατίνης	20
1.4.3	Περιοχἑς ἑκφρασης και απελευθἑρωσης σωματοστατίνης	21
1.4.4	Δράσεις της σωματοστατίνης	22
1.4.5	Υποδοχείς σωματοστατίνης	23
1.4.6	Κλωνοποίηση σωματοστατινεργικών υποδοχέων	23
1.4.7	Κατανομή σωματοστατινεργικών υποδοχέων	
1.4.8	Δημιουργία σωματοστατινεργικών αναλόγων	27
1.4.9	Εκτελεστικά συστήματα	
1.4.10	Εντοπισμός της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή	
1.4.11	Υποδοχείς σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή	
1.4.12	Ρόλος της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή	34
1.5 K	ΟΡΤΙΣΤΑΤΙΝΗ	36

1.5.1	Ανακάλυψη της κορτιστατίνης
1.5.2	Περιοχές έκφρασης και απελευθέρωσης κορτιστατίνης
1.5.3	Δράσεις της κορτιστατίνης
1.5.4	Υποδοχείς κορτιστατίνης39
1.6 E	ΛΕΥΘΕΡΗ ΡΙΖΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ – ΝΟ·
1.6.1	ΝΟ και αμφιβληστροειδής41
1.6.2	ΝΟ· και σωματοστατίνη42
1.7 F	ΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΕΣ 43
1.7.1	Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια43
1.7.2	Νεοαγγείωση44
1.7.3	Η σωματοστατίνη ως νευροπροστατευτικός παραγόντας44
1.7.3 2. Σκοπ	Η σωματοστατινή ως νευροπροστατευτικός παράγοντας
1.7.3 2. Σκοπ 3. ΜεΘα	Η σωματοστατινή ως νευροπροστατευτικός παράγοντας
 1.7.3 2. ΣΚΟΠ 3. ΜΕΘΟ 3.1 Λ 	Η Ο ΦΙματοστατίνη ως νευροπροστατεύτικος παραγοντάς
 1.7.3 2. ΣΚΟΠ 3. ΜΕΘΟ 3.1 Λ ΑΜΦΙΒΛ 	Η Οωματοστατίνη ως νευροπροστατεύτικος παραγοντάς
 1.7.3 2. ΣΚΟΠ 3. ΜΕΘΟ 3.1 Λ ΑΜΦΙΒΛ 3.1.1 	H σωματοστατίνη ως νευροπροστατεύτικος παραγοντάς
 1.7.3 2. ΣΚΟΠ 3. ΜΕΘΟ 3.1 Λ ΑΜΦΙΒΛ 3.1.1 3.1.2 	H σωματοστατίνη ως νευροπροστατεύτικος παραγοντάς
 1.7.3 2. ΣΚΟΠ 3. ΜΕΘΟ 3.1 Λ ΑΜΦΙΒΛ 3.1.1 3.1.2 σωμο 	Η σωματοστατίνη ως νευροπροστατεύτικος παραγοντας
 1.7.3 2. ΣΚΟΠ 3.1 / ΑΜΦΙΒ/ 3.1.1 3.1.2 σωμα 3.1.3 	Η σωματοστατίνη ως νευροπροστατεύτικος παραγοντας

3.2 P	ΟΛΟΣ ΤΗΣ CGMP	. 51
3.2.1	Επίδραση σωματοστατίνης και αναλόγων στα επίπεδα cGMP στ	ov
αμφιβ	βληστροειδή	.51
3.2.2	Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της κυκλικής GMP	54
3.2.3	Ρόλος της τυροσινοφωσφατάσης SHP-1	56
3.3 A	ΙΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟ	. 59
3.3.1	Διεγερτοτοξικότητα	
3.3.2	Χημική ισχαιμία	
3.3.3	Μελέτες βιωσιμότητας ιστού	60

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ	. 60
3.4.1 Μελέτες ανοσοφθορισμού με αντίσωμα ενάντια στην	
ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT)	60
3.4.2 Μελέτες φθορισμού με χρώση TUNEL	61
3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓ	ΩN
ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	. 61
3.5.1 Φαρμακολογική επίδραση σωματοστατίνης	62
3.5.2 Φαρμακολογικές επιδράσεις με σωματοστατινεργικά ανάλογα	62
3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩ	2N
ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝ	IHΣ
ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	. 63
3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΣΟ ΕΠΩΑΣΗΣ	. 64
3.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ	. 65
3.8.1 Επίδραση του SIN-1/L-κυστεΐνη στη Χημική Ισχαιμία	66
3.8.2 Επίδραση του SIN-1	66
3.8.3 Επίδραση του αναστολέα της συνθάσης της NO· στη	
νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014	66
3.8.4 Επίδραση των αναστολέων της γουανυλικής κυκλάσης στη	
νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014	67
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
4.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SST1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ	
ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ	. 69
4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ cGi	MP
ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ	. 73
4.2.1 Ρόλος της cGMP	73
4.2.2 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της κυκλικής GMP	78
4.2.3 Ρόλος της τυροσινοφωσφατάσης SHP-1	80
4.3 ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟ	. 81
4.3.1 Διεγερτοτοξικότητα	81
4.3.2 Χημική ισχαιμία	82
4.3.3 Μελἑτες βιωσιμότητας ιστού	84

4.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	ΙΑΛΟΓΩΝ 86
4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	4ΣΗΣ ΤΩΝ)ΣΤΑΤΙΝΗΣ 4 87
 4.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ 4.6.1 Επίδραση του SIN-1/L-κυστεΐνη στη Χημική Ισχαιμία	94 101 102 στη 104 τη 106
 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 5.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SST1 ΚΑΙ SST2 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ 5.1.1 Λειτουργική χαρτογράφηση των sst2 υποδοχέων 5.1.2 Λειτουργική χαρτογράφηση των sst1 υποδοχέων 5.2 ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΑ Ν ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟ 	109 110 110 114 ИОNTEЛА 116
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ	131
 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΗ 	133 135
9. SUMMARY	139
11. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	143
12. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	187

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AchE: Acetylcholinesterase ACTH: Adrenocorticotropic Hormone AMPA: a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid ATP: Adenosine-5'-triphosphate **bNOs:** brain Nitric Oxide synthase BSA: Bovine Serum Albumin cGMP: cyclic Guanosine Monophosphate ChAT: Choline Acetyl Transerase **CST:** Cortistatin DME: Diabetic Macular Edema DR: Diabetic Retinopathy EDRF: Endothelial-Derived Relaxation Factor ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay FDA: Food and Drug Administration GABA: y-Aminobutyric acid GDP: Guanosine Diphosphate GH: Growth Hormone GTP: Guanosine-5'-triphosphate HRP: Horseradish Peroxidase IBMX: 3 - Isobutyl-1-methylxanthine IGF-I: Insulin-like Growth Factor-I. KA: Kainic Acid MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate NDS: Normal Donkey Serum NGS: Normal Goat Serum NMDA: N-Methyl-D-Aspartate NMMA: NG-Methyl-L-Arginine NOS: Nitric Oxide Synthase ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1 PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis PB: Phosphate Buffer

PBS: Phosphate Buffer Saline PDR: Proliferative Diabetic Retinopathy PKC: Protein Kinase C PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride RIA: RadioImmuno Assay RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction SDS: Sodium Dodecyl Sulfate sGC: soluble Guanylate Cyclase SNP: Sodium NitroPrusside SRIF: Somatotropin Release Inhibitory Factor **TBS: T**ris **B**uffer **S**aline TCA: TrichloroAcetic Acid TH: Tyrosine Hydroxylase TSH: Thyrotrophin-stimulating Hormone TUNEL: Terminal UTP Nick-End Labeling VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor ΓΚ: Γαγγλιακή στιβάδα **ΕσΔ:** Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα XI: Χημική Ισχαιμία

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

Ο αμφιβληστροειδής είναι ένας λεπτός ιστός στο πίσω μέρος του ματιού, ο οποίος αποτελείται από φωτοευαίσθητα νευρικά κύτταρα και ίνες. Το πάχος του κυμαίνεται από 0,5 χιλιοστά στο κέντρο, μέχρι 0,1 με 0,2 χιλιοστά στην περιφέρεια. Αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα του ματιού αφού σ' αυτόν πραγματοποιείται η μετατροπή των φωτεινών ερεθισμάτων σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία μέσω του οπτικού νεύρου, μεταβιβάζονται σε ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου για περαιτέρω επεξεργασία.

Ο αμφιβληστροειδής αναπτύσσεται απευθείας από το νευρικό εξώδερμα, δηλαδή την εξειδικευμένη μοίρα του εξωδέρματος από την οποία αναπτύσσεται ο εγκέφαλος και η συναπτική του οργάνωση είναι όμοια με εκείνην άλλων δομών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πρόκειται για ένα απλό μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος, αφού αποτελείται μόνο από πέντε μεγάλες κατηγορίες νευρώνων. Οι νευρώνες συνδέονται μεταξύ τους κατά ένα περίπλοκο τρόπο, αλλά με μια ανατομικά απλή στιβαδωτή διάταξη. Η απλότητά του αυτή σε σχέση με άλλες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος τον καθιστά πρότυπο για την κατανόηση του τρόπου επεξεργασίας των πληροφοριών από τα σύνθετα νευρωνικά κυκλώματα του εγκεφάλου.

1.1.1 Δομή του αμφιβληστροειδή

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από δύο πέταλα, το μελάγχρουν επιθήλιο προς τα έξω και τον κατεξοχήν αμφιβληστροειδή προς τα μέσα. Το μελάγχρουν επιθήλιο αποτελείται από μια σειρά κυβοειδών κυττάρων, που επικάθονται στη μεμβράνη του Bruch με την οποία συνδέονται σταθερά. Αντίθετα, η σύνδεση με τον υπόλοιπο αμφιβληστροειδή είναι χαλαρή και η αποκόλλησή του εύκολη.

Ο κατεξοχήν αμφιβληστροειδής εκτείνεται από την πριονωτή περιφέρεια που σχηματίζουν οι αποφύσεις των φωτοϋποδοχέων μέχρι την έξοδο του οπτικού νεύρου. Στον αμφιβληστροειδή υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι νευρικών κυττάρων: από έξω, οι φωτοϋποδοχείς οι οποίοι είναι τα φωτοευαίσθητα κύτταρα του αμφιβληστροειδή, και προς τα μέσα, τα δίπολα κύτταρα και τα γαγγλιακά κύτταρα των οποίων οι φυγόκεντρες ίνες σχηματίζουν το οπτικό νεύρο το οποίο καταλήγει στα έξω γονατώδη σώματα. Μεταξύ των παραπάνω κυττάρων υπάρχουν δύο ακόμα τύποι νευρώνων, τα οριζόντια και τα βραχύινα κύτταρα (Εικόνα 1).



Τροποποιημένο από Cajal

Εικόνα – 1: Φ: Στιβάδα των κατεξοχήν φωτοϋποδοχέων, ΕξΚ: εξωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕξΔ: εξωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΕσΚ: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, Γ: Στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Την ΕξΚ αποτελούν τα κύρια τμήματα των φωτοϋποδοχέων, την ΕσΚ τα δίπολα κύτταρα και την Γ τα γαγγλιακά κύτταρα. Εκτός από τις τρεις αυτές στιβάδες που αποτελούνται από τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων, σχηματίζονται και δύο στιβάδες συνάψεων. Στην ΕξΔ εντοπίζονται οι αποφύσεις των φωτοϋποδοχέων, των δίπολων κυττάρων και των οριζόντιων κυττάρων, ενώ στην ΕσΔ εντοπίζονται οι αποφύσεις των δίπολων, των βραχύινων και γαγγλιακών κυττάρων. Οι φωτοϋποδοχείς, γνωστοί και ως οπτικά κύτταρα, εμφανίζουν δύο τμήματα. Το εξωτερικό κύριο τμήμα, το οποίο ανάλογα με το σχήμα του δίνει και το όνομα στο κύτταρο (ραβδιοφόρο ή κωνιοφόρο), και το εσωτερικό τμήμα, όπου βρίσκεται ο πυρήνας του κυττάρου. Τα εξωτερικά κύρια τμήματα των οπτικών κυττάρων σχηματίζουν τη στιβάδα των κατεξοχήν φωτοϋποδοχέων, ενώ τα εσωτερικά τμήματα την εξωτερική κοκκώδη στιβάδα.

Τα δίπολα κύτταρα εντοπίζονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα. Φέρουν εσωτερικές και εξωτερικές αποφύσεις με τις οποίες ενώνονται με παρόμοιες αποφύσεις των οπτικών και γαγγλιακών κυττάρων στην εξωτερική και εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, αντίστοιχα.

Τα γαγγλιακά κύτταρα βρίσκονται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Μαζί με τα δίπολα και τους φωτοϋποδοχείς συμμετέχουν στη δημιουργία του κάθετου μονοπατιού μετάδοσης της οπτικής πληροφορίας (κάθετο μονοπάτι μεταβίβασης του σήματος). Οι νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν το οπτικό νεύρο, μέσω του οποίου καταλήγουν σε διάφορες περιοχές του διεγκεφάλου και του μέσου εγκεφάλου (Εικόνα -2).

Όπως προαναφέρθηκε, στους νευρώνες του αμφιβληστροειδή συγκαταλέγονται και δύο ακόμη τύποι νευρώνων, τα οριζόντια και τα βραχύινα κύτταρα. Τα οριζόντια κύτταρα τροποποιούν τη μετάδοση της οπτικής πληροφορίας μεταξύ φωτοϋποδοχέων - δίπολων κυττάρων, ενώ τα βραχύινα κύτταρα μεταξύ δίπολων - γαγγλιακών κυττάρων, δημιουργώντας έτσι το οριζόντιο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος. Οι αποφύσεις των οριζόντιων κυττάρων εντοπίζονται στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα, των βραχύινων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα.

Εκτός από τα νευρικά κύτταρα στον κατεξοχήν αμφιβληστροειδή υπάρχουν και ερειστικά στοιχεία κύτταρα, στα οποία συγκαταλέγονται τα κύτταρα Müller, τα αστεροειδή νευρογλοιακά και μικρονευρογλοιακά κύτταρα.

Μακροσκοπικά, ο αμφιβληστροειδής εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές περιοχές: την ωχρά κηλίδα, το βοθρίο και την οπτική θηλή.

Η ωχρά κηλίδα αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεύοντων θηλαστικών. Πρόκειται για μια κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδή, διαμέτρου περίπου 5 χιλιοστών η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση

των λεπτομερειών του σημείου στο χώρο στο οποίο εστιάζουμε την προσοχή μας.

Το βοθρίο βρίσκεται στην κεντρική περιοχή της ωχράς κηλίδας, έχει διάμετρο 1,5 χιλιοστών και αποτελείται αποκλειστικά από κωνιοφόρα κύτταρα. Η κεντρική του περιοχή αποτελεί το κεντρικό βοθρίο με πάχος 0,15 χιλιοστά. Το κεντρικό βοθρίο, παρουσιάζει μέγιστη ικανότητα ευκρίνειας λόγω της υψηλής πυκνότητας κωνιοφόρων κυττάρων που εμφανίζει.

Η θηλή του οπτικού νεύρου αποτελεί την περιοχή από την οποία οι ίνες του οπτικού νεύρου εγκαταλείπουν τον αμφιβληστροειδή. Η θηλή δεν περιέχει φωτοϋποδοχείς και γι' αυτό δημιουργεί ένα τυφλό σημείο στο οπτικό μας πεδίο.



Τροποποιημένο από Neuroscience, 2001

Εικόνα – 2: Κεντρικές προβολές των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδή. Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδή καταλήγουν στο έξω γονατώδες σώμα στον θάλαμο, το άνω διδύμιο, την προτετραδυμική περιοχή καθώς επίσης και στον υποθάλαμο. Οι νευρώνες των κυττάρων του έξω γονατώδους σώματος, όπως αυτοί των υπόλοιπων πυρήνων του θαλάμου, στέλνουν προβολές προς τον πρωτογενή οπτικό (ή ραβδωτό) φλοιό. Το μονοπάπι αυτό μεταφέρει πληροφορίες οι οποίες αποτελούν ουσιαστικά αυτό που αποκαλούμε όραση. Η προτετραδυμική περιοχή η οποία εντοπίζεται μεταξύ θαλάμου και μεσεγκεφάλου, είναι ιδιαίτερα σημαντική ως κέντρο ρύθμισης του αντανακλαστικού της κόρης. Στον τρίτο πυρήνα, στο άνω διδύμιο γίνεται ο συντονισμός των κινήσεων κεφαλής και ματιών. Τέλος, ο υπερχιασματικός πυρήνας του υποθαλάμου, επιτρέπει την επίδραση του κύκλου ημέρας/νύκτας σε ένα μεγάλο αριθμό σπλαχνικών λειτουργιών (π.χ. κιρκάδιος ρυθμός παραγωγής ορμονών).

1.1.2 Οπτική επεξεργασία

Κάθε άνθρωπος είναι εφοδιασμένος με ένα οπτικό σύστημα για τη λήψη, τη μεταφορά και την αναγνώριση των οπτικών πληροφοριών του περιβάλλοντος κόσμου. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η οπτική πληροφορία μεταφέρεται από τους οφθαλμούς μέσω του οπτικού νεύρου στο έξω γονατώδες σώμα και από εκεί στον οπτικό φλοιό του (Εικόνα - 2).

Για να πραγματοποιηθεί η οπτική επεξεργασία, το φως αρχικά περνά από τον κερατοειδή χιτώνα και τον κρυσταλλοειδή φακό των οφθαλμών και στη συνέχεια εστιάζεται στον αμφιβληστροειδή όπου απορροφάται από τους φωτοαισθητηριακούς υποδοχείς των ραβδιοφόρων και κωνιοφόρων κυττάρων (Εικόνα - 3). Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας είναι σε θέση να αποφύγει την παραμόρφωση που υφίσταται η εικόνα μέσω μιας σειράς μηχανισμών τους οποίους διαθέτει: i) Οι στιβάδες του αμφιβληστροειδή είναι αμύελες και σχετικά διαφανείς με αποτέλεσμα το φως να φθάνει στους φωτοϋποδοχείς χωρίς να απορροφάται ή να διαχέεται σε μεγάλο βαθμό, ii) το φως το οποίο δε δεσμεύεται από τον αμφιβληστροειδή απορροφάται από τη μελανίνη που περιέχουν τα κύπαρα του μελάγχρουν επιθηλίου και *iii)* τα κυπαρικά σώματα των εγγύς νευρώνων του αμφιβληστροειδή στο βοθρίο μετατοπίζονται προς τα πλάγια έτσι ώστε να μπορέσουν οι φωτοϋποδοχείς να δεχθούν την εικόνα με ακόμη μικρότερη παραμόρφωση. Η μετατόπιση αυτή είναι μέγιστη στο κεντρικό βοθρίο.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο αμφιβληστροειδής του ανθρώπου έχει δύο είδη φωτοϋποδοχέων, τα κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα κύτταρα. Τα κωνιοφόρα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την όραση κατά τη διάρκεια της ημέρας αλλά και για τη διάκριση των χρωμάτων. Η διάκριση των χρωμάτων είναι εφικτή λόγω της ύπαρξης τριών τύπων κωνιοφόρων κυττάρων καθένας από τους οποίους περιέχει μια ξεχωριστή οπτική χρωστική ευαίσθητη σε ένα διαφορετικό τμήμα του φάσματος. Η συγκέντρωση των κωνιοφόρων κυττάρων, όπως προαναφέρθηκε, είναι αυξημένη στο βοθρίο και η αναλογία, κωνιοφόρα / δίπολα κύτταρα στο σημείο αυτό είναι μικρή. Ειδικά στο κεντρικό βοθρίο δεν υπάρχει καθόλου σύγκλιση, αφού κάθε δίπολο κύτταρο δέχεται πληροφορίες από ένα κωνιοφόρο κύτταρο.



Τροποποιημένο από Kandel και συν, 1995



Τα ραβδιοφόρα κύτταρα διεκπεραιώνουν την όραση στο σκοτάδι. Λειτουργούν δηλαδή στο αμυδρό φως της αυγής και του λυκόφωτος, καθώς και τη νύχτα, όταν τα περισσότερα ερεθίσματα είναι πολύ αδύνατα για να διεγείρουν τα κωνιοφόρα κύτταρα. Τα ραβδιοφόρα κύτταρα είναι είκοσι περίπου φορές περισσότερα από τα κωνιοφόρα. Το σύστημά τους είναι συγκλίνον, μια και πολλά ραβδιοφόρα κύτταρα συνάπτονται με το ίδιο δίπολο κύτταρο. Έτσι ενισχύονται τα σήματα, δυναμώνοντας την προκαλούμενη από το φως απόκριση των εγγύς κυττάρων του αμφιβληστροειδή και αυξάνοντας την ικανότητα του εγκεφάλου να ανιχνεύει αμυδρό φως, σε βάρος φυσικά της ευκρίνειας.

Στο εξωτερικό τμήμα των ραβδιοφόρων και κωνιοφόρων κυττάρων εντοπίζονται οι οπτικές χρωστικές. Οι χρωστικές αυτές απορροφούν το φως προκαλώντας έναν "καταρράκτη" γεγονότων τα οποία οδηγούν σε αλλαγή της ροής ιόντων διαμέσου της κυτταρικής τους μεμβράνης και κατά συνέπεια, σε αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης. Μόριο κλειδί σε αυτές τις αλλαγές αποτελεί το νουκλεοτίδιο 3', 5'-κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP). Η cGMP ελέγχει τη ροή ιόντων, ανοίγοντας έναν ειδικό τύπο διαύλων ιόντων, οι οποίοι επιτρέπουν την εισροή ρεύματος στο κύτταρο, προκαλούμενου κυρίως

από Να⁺. Η συγκέντρωση της cGMP είναι σχετικά μεγάλη στο σκοτάδι, προκαλώντας το άνοιγμα των διαύλων που ελέγχει, με αποτέλεσμα να διατηρείται το κύτταρο σε κατάσταση σχετικής εκπόλωσης. Το φως ενεργοποιεί τις οπτικές χρωστικές, οι οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν τη φωσφοδιεστεράση της cGMP. Το ένζυμο αυτό, ελαττώνει τη συγκέντρωση της cGMP στο κυτταρόπλασμα με συνέπεια το κλείσιμο των ελεγχόμενων από την cGMP διαύλων. Έτσι προκαλείται η υπερπόλωση του φωτοϋποδοχέα.

Τα γαγγλιακά κύτταρα, σε αντίθεση με τους φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι αποκρίνονται στο φως με βαθμιαίες αλλαγές του δυναμικού μεμβράνης διαβιβάζουν τις πληροφορίες ως σειρές δυναμικών ενέργειας. Καθώς οι οπτικές πληροφορίες μεταφέρονται από τους φωτοϋποδοχείς στα γαγγλιακά κύτταρα, διαχωρίζονται σε παράλληλες οδούς φωτεινού κέντρου και σκοτεινού κέντρου. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται ανάλογα με την απόκριση των γαγγλιακών κυττάρων σε μια μικρή κηλίδα που φωτίζει το κέντρο του υποδεκτικού τους πεδίου.

Τα γαγγλιακά κύτταρα φωτεινού κέντρου διεγείρονται όταν το φως κατευθύνεται προς το κέντρο του υποδεκτικού τους πεδίου και αναστέλλονται όταν το φως ερεθίζει την περιφέρεια του πεδίου. Τα γαγγλιακά κύτταρα σκοτεινού κέντρου εμφανίζουν τις αντίθετες αποκρίσεις: αναστέλλονται όταν το φως ερεθίζει το κέντρο του υποδεκτικού πεδίου και διεγείρονται όταν το φως ερεθίζει το κέντρο του υποδεκτικού πεδίου και διεγείρονται όταν το φως ερεθίζει την περιφέρεια τους. Τα γαγγλιακά κύτταρα το φως ερεθίζει την περιφέρεια του πεδίου και διεγείρονται όταν το φως ερεθίζει το κέντρο του υποδεκτικού πεδίου και διεγείρονται όταν το φως ερεθίζει το κέντρο του υποδεκτικού πεδίου και διεγείρονται όταν το φως ερεθίζει τα κέντρο του υποδεκτικού πεδίου και διεγείρονται όταν το φως ερεθίζει την περιφέρεια του πεδίου τους. Τα γαγγλιακά κύτταρα των δύο ειδών υπάρχουν σε ίσους σχεδόν αριθμούς και κάθε φωτοϋποδοχέας στέλνει ώσεις στα κύτταρα και των δύο ειδών. Οι μετασχηματισμοί αυτοί του οπτικού σήματος βοηθούν τα ανώτερα κέντρα στην ανίχνευση ασθενών αντιθέσεων και ταχέων αλλαγών στην ένταση του φωτός. Τα γαγγλιακά κύτταρα είναι εξειδικευμένα στην επεξεργασία διαφόρων χαρακτηριστικών της εικόνας, όπως είναι η κίνηση, οι μικρές λεπτομέρειες στον χώρο ή στο χρώμα.

Οι οπτικές πληροφορίες μεταδίδονται από τα κωνιοφόρα στα γαγγλιακά κύτταρα κατά μήκος δύο τύπων οδών του αμφιβληστροειδή. Τα κωνιοφόρα κύτταρα στο κέντρο του υποδεκτικού πεδίου ενός γαγγλιακού κυττάρου πραγματοποιούν άμεσες συνδέσεις με δίπολα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια συνάπτονται άμεσα με γαγγλιακά κύτταρα. Οι συνδέσεις αυτές είναι γνωστές ως άμεσες ή κατακόρυφες. Σήματα από τα κωνιοφόρα κύτταρα της περιφέρειας του υποδεκτικού πεδίου του γαγγλιακού κυττάρου μεταδίδονται

επίσης στο γαγγλιακό κύτταρο μέσω δίπολων κυττάρων, αλλά μόνο έμμεσα, μέσω οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων. Οι έμμεσες αυτές οδοί ονομάζονται πλάγιες οδοί. Τα οριζόντια κύτταρα μεταδίδουν πληροφορίες από απομακρυσμένα μεταξύ τους κωνιοφόρα κύτταρα σε δίπολα, ενώ ορισμένοι τύποι βραχύινων κυττάρων μεταφέρουν πληροφορίες από απομακρυσμένα δίπολα κύτταρα σε γαγγλιακά κύτταρα.

Όπως τα γαγγλιακά κύτταρα, έτσι και τα δίπολα κύτταρα έχουν υποδεκτικό πεδίο με ανταγωνιστική δράση κέντρου-περιφέρειας και διακρίνονται σε κύτταρα φωτεινού κέντρου και σε κύτταρα σκοτεινού κέντρου. Όταν ενεργοποιούνται κωνιοφόρα κύτταρα του κέντρου του υποδεκτικού πεδίου, εκπολώνονται τα δίπολα κύτταρα φωτεινού κέντρου, ενώ υπερπολώνονται τα κύτταρα σκοτεινού κέντρου. Όταν ενεργοποιούνται κωνιοφόρα κύτταρα στην περιφέρεια του υποδεκτικού πεδίου ενός δίπολου κυττάρου, η απόκριση των δίπολων κυττάρων είναι αντίθετη από εκείνη που προκαλείται με φωτισμό του κέντρου (Εικόνα 4).

Ο αμφιβληστροειδής μεταφέροντας τις οπτικές πληροφορίες μέσω των αμέσων και έμμεσων οδών, επιτυγχάνει την ολοκληρωμένη και επαρκή μεταφορά των μηνυμάτων στον εγκέφαλο ώστε να μπορούμε να ''βλέπουμε''.



Εικόνα - 4: Ένα κωνιοφόρο κύπαρο συνάπτεται με δύο δίπολα κύπαρα, που το καθένα πραγματοποιεί μια διεγερτική σύναψη με ένα γαγγλιακό κύπαρο του ίδιου τύπου. Όταν το κωνιοφόρο κύπαρο υπερπολώνεται από το φωτισμό του κέντρου του υποδεκτικού πεδίου και ελαττώνεται η απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή, το δίπολο κύπαρο φωτεινού κέντρου διεγείρεται και εν συνεχεία εκπολώνει το γαγγλιακό κύπαρο φωτεινού κέντρου, ενώ το δίπολο κύπαρο σκοτεινού κέντρου αναστέλλεται και με τη σειρά του υπερπολώνει το γαγγλιακό κύπαρο στην περιφέρεια του υποδεκτικού πεδίου που υπερπολώνει το γαγγλιακό κύπαρο στην περιφέρεια του υποδεκτικού πεδίου του υπερπολώνει το γαγγλιακό κύπαρο στην περιφέρεια του υποδεκτικού πεδίου του δίποπου κυττάρου υπερπολώνει το κύπαρο αυτό, το οποίο με τη σειρά του υπερπολώνει το μετασυναπτικό οριζόντιο κύπαρο, με αποτέλεσμα τη μείωση της απελευθέρωσης του ανασταλτικού διαβιβαστή από το οριζόντιο κύπαρο στα μετασυναπτικά κωνιοφόρα κύπαρο του κέντρου υπερπολώνεται κι έτσι έχουμε το αντίθετο αποτέλεσμα φωτισμού στο κέντρου οτο κότησρο φωτεινού κέντρου του υποδεκτικού διαβιβαστή από το οριζόντιο κύτταρο στα μετασυναπτικά κύπαρο του μερησλώνει και την εκπόλωση αυτών. Το δίπολο κύτταρο στο κέντρου του υποδεκτικού πεδίου και την εκπόλωση αυτών. Το δίπολο κύτταρο στο κέντρου του υποδεκτικού πεδίου και την εκπόλωση αυτών.

1.2 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

Ο αμφιβληστροειδής είναι ένας λεπτός χιτώνας που είναι αρκετά ευαίσθητος και μπορεί να υποστεί πληθώρα παθήσεων. Οι παθήσεις του αμφιβληστροειδή μπορούν να παρουσιαστούν κατά τη γέννηση ενός ατόμου αλλά και σε μεγαλύτερη ηλικία. Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία, το εξοίδημα της ωχράς κηλίδας και η νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδή, είναι τρεις σημαντικές παθολογικοί παράμετροι ασθενειών όπως το γλαύκωμα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, απόφραξη ŋ тων αμφιβληστροειδικών αγγείων/φλεβών, η φλεγμονή της ίριδας και η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Στο κεφάλαιο αυτό, θα γίνει μια σύντομη ανασκόπηση των παραμέτρων που συμβάλουν στην εμφάνιση των παθήσεων του αμφιβληστροειδή καθώς επίσης και ορισμένων από αυτές τις ασθένειες.

1.2.1 Αμφιβληστροειδική ισχαιμία

Η ισχαιμία είναι η παθολογική κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται ανεπαρκής ροή αίματος προς κάποιο ιστό, που έχει σα συνέπεια τη μη ικανοποίηση των ενεργειακών απαιτήσεων των κυττάρων. Η ισχαιμία στερεί έναν ιστό από τρία στοιχεία: το οξυγόνο, τα μεταβολικά υποστρώματα και την απομάκρυνση βιολογικών παραπροϊόντων – τοξικών ουσιών.

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία είναι η πιο κοινή αιτία της οπτικής εξασθένισης και τύφλωσης. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι βλάβες κατά την αμφιβληστροειδική ισχαιμία περιλαμβάνουν νευρωνική εκπόλωση, αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλουταμινικού οξέος (διεγερτοτοξικότητα) και άλλων νευροδιαβιβαστών καθώς επίσης και οξειδωτικό στρες, εισροή ιόντων ασβεστίου, νατρίου και νερού. Τα παραπάνω γεγονότα έχουν σαν αποτέλεσμα την εξοίδηση και τελική νέκρωση των κυττάρων του αμφιβληστροειδή, καθώς επίσης και την επαγωγή μηχανισμών απόπτωσης σε αυτά (Εικόνα 5). Η ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή έχει μελετηθεί ευρέως λόγω του προτεινόμενου ρόλου της στο γλαύκωμα, στη διαβητική αμφιβληστροειδική και χοριοειδική αγγειακή απόφραξη (Osborne και συν. 1999, 2004). Ο αμφιβληστροειδής έχει

διπλή τροφοδοσία αίματος αντανακλώντας την εμβρυολογική του προέλευση και το δικαιολογημένο συνυπολογισμό του ως μια ξεχωριστή συνιστώσα του κεντρικού νευρικού συστήματος.



Τροποποίηση από Osborne και συν., 2004

Εικόνα - 5: Ο καταρράκτης των γεγονότων που σχετίζονται με την εμφάνιση αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.

Πιο συγκεκριμένα, κατά την αμφιβληστροειδική ισχαιμία παρατηρείται απώλεια οξυγόνου και γλυκόζης και επομένως μείωση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ATP ([ATP]i) αλλά και των αποθεμάτων του. Η ενεργειακή αυτή ανεπάρκεια του ιστού προκαλεί μια ακολουθία πολύπλοκων βιοχημικών αντιδράσεων, προξενώντας μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές οι οποίες οφείλονται σε δραστικές μεταβολές στη μετακίνηση ιόντων και στα επίπεδα μεταβολιτών και νευροδιαβιβαστών. Ειδικότερα, η μείωση [ATP]; αναστέλλει τη δράση της αντλίας Να+/Κ+ ΑΤΡάσης οπότε διαταράσσεται η ισορροπία του μεμβρανικού δυναμικού και τα ιόντα νατρίου εισέρχονται σταδιακά στο κύτταρο εκπολώνοντάς το. Η εκπόλωση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος, στην αύξηση της συγκέντρωσής του στο νευρώνα και στην ενεργοποίηση των ιονοτροπικών υποδοχέων του (NMDA/AMPA/KA). Οι NMDA υποδοχείς ενεργοποιούνται και αυξάνεται η εισροή ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, όπως ενεργοποιούνται και οι ΑΜΡΑ/ΚΑ υποδοχείς οδηγώντας σε εισροή ιόντων ασβεστίου, νατρίου και χλωρίου (Lipton και συν., 1999).

Υπάρχουν πολλοί ερευνητές που ασχολούνται με την αποσαφήνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου οδηγούμαστε στον κυτταρικό θάνατο κατά την ισχαιμία. Πολλές από τις μελέτες εστιάζονται στο ρόλο του γλουταμινικού και του ασπαρτικού οξέος, των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται εξωκυττάρια κατά την ισχαιμία (Drejer και συν., 1985, Hagberg και συν., 1985, Dávalos και συν., 1997). Εκτός όμως από την απελευθέρωση του γλουταμινικού, κατά την αμφιβληστροειδική ισχαιμία απελευθερώνεται γλυκίνη, ντοπαμίνη, αδενοσίνη ακετυλοχολίνη, καθώς каі κύριος ανασταλτικός 0 νευροδιαβιβαστής GABA. Η απελευθέρωση των μορίων αυτών οδηγεί στην ενεργοποίηση των υποδοχέων τους, συνεισφέροντας έτσι στο κυτταρικό θάνατο ή την επιβίωση των αμφιβληστροειδικών νευρώνων (Neal και συν., 1994, Roth каі συν., 1996, Perlman каї συν., 1996, Napper каї Kalloniatis, 1999).

Τέλος, μια σειρά από μελέτες απέδειξαν ότι οι νευρώνες του έσω αμφιβληστροειδή φαίνεται ότι είναι πιο ευαίσθητοι στην ισχαιμία και αυτό οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι στα κύτταρα αυτά εκφράζονται υψηλά επίπεδα ιονοτροπικών γλουταμινικών υποδοχέων, η υπερδιέργεση των οποίων οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Brandstatter και συν., 1994).

1.2.2 Νεοαγγείωση

Η νεοαγγείωση είναι η ανάπτυξη νεόπλαστων αγγείων τα οποία προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των φλεβιδίων, που στην αρχή εξαπλώνονται ενδοαμφιβληστροειδικά. Κύρια αιτία της νεοαγγείωσης αποτελεί η ισχαιμία (Cohen και συν., 1977, Εικόνα 5).

Η αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση εμφανίζεται πιο συχνά στο σημείο επαφής του αμφιβληστροειδή που αιματώνεται φυσιολογικά, με αυτό που δεν αγγειώνεται επαρκώς. Το υαλοειδές προσφέρεται σαν στήριγμα για την επέκταση της νεοαγγείωσης μέσα στην υαλοειδική κοιλότητα. Τα νέα αγγεία είναι εύθραυστα, με τάση να αιμορραγούν προκαλώντας ποικίλης έκτασης αιμορραγίες στο υαλοειδές, γεγονός που αποτελεί απειλή για την όραση του ασθενούς. Ο ιστός αυτός επίσης έχει την προδιάθεση να υφίσταται ίνωση, προκαλώντας άλλες απειλητικές για την όραση επιπλοκές, όπως εκτόπιση της ωχράς κηλίδας λόγω έλξης, οίδημα της ωχράς, ελκτική καθώς και ρηγματογενή αποκόλληση του αμφιβληστροειδή.

Σε καταστάσεις ισχαιμίας αυξάνεται η απελευθέρωση διαφόρων αυξητικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης (insulin-like growth factor-I, IGF-I), οι οποίοι συντελούν στην ανάπτυξη νέων αγγείων. (Merimee και συν., 1983, Hyer και συν., 1989, Dills και συν., 1991, Paques και συν., 1997, Cai και Boulton, 2002)

1.2.3 Απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή

Η πάθηση αυτή χαρακτηρίζεται από απότομη και συχνά πλήρη απώλεια της όρασης από το ένα μάτι. Δε συνοδεύεται από πόνο και το οίδημα που προκαλείται στον αμφιβληστροειδή εντοπίζεται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Η πρόγνωση είναι βαριά και η νόσος καταλήγει σε τύφλωση.

Η απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή συχνά δημιουργείται από εμβολικά στοιχεία της συστηματικής κυκλοφορίας που βρίσκονται μακριά από το αγγειακό δίκτυο του αμφιβληστροειδή. Την πιο

συνηθισμένη αιτία αποτελούν οι αθηρωματικές πλάκες της κοινής καρωτίδας. Σπανιότερα, οι θρόμβοι προέρχονται από τις βαλβίδες της καρδιάς.

Σε μερικές περιπτώσεις η απόφραξη περιορίζεται σε κάποιο κλάδο της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή. Περισσότερο επιρρεπής είναι ο άνω κροταφικός κλάδος, η απόφραξη του οποίου έχει άμεση επίδραση στην ωχρά κηλίδα και κατά συνέπεια στην κεντρική όραση. Όπως είναι αναμενόμενο, κατά την απόφραξη κλάδου της κεντρικής αρτηρίας χάνεται τμήμα του οπτικού πεδίου αντίστοιχα προς την περιοχή που αρδεύεται από το αγγείο που αποφράσσεται. Έτσι, η πρόγνωση της απόφραξης του κλάδου ευνόητα είναι καλύτερη από αυτή της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή.

1.2.4 Αμφιβληστροειδοπάθεια προωρότητας

Είναι επίκτητη ανωμαλία και παρατηρείται σε πρόωρα νεογνά με βάρος γέννησης, κάτω από 1500γρ. Το αγγειακό δίκτυο του αμφιβληστροειδή δεν έχει πλήρως αναπτυχθεί, ακόμη και στα τελειόμηνα νεογνά. Τα πρόωρα νεογνά τοποθετούνται σε θερμοκοιτίδα γιατί έχουν άμεση ανάγκη οξυγόνου για να ζήσουν. Εάν μέσα στην θερμοκοιτίδα η πίεση του αρτηριακού οξυγόνου βρίσκεται συνεχώς στο επίπεδο των 90mmHg, ή υπερβεί την τιμή αυτή, τότε έχουμε σύσπαση των αγγείων του αμφιβληστροειδή (ιδιαίτερα αυτών στην περιφέρεια που δεν έχουν ακόμα πλήρως αναπτυχθεί). Η αγγειοσύσπαση δημιουργεί σοβαρό πρόβλημα ανοξαιμίας στον αμφιβληστροειδή που με τη σειρά της οδηγεί στη δημιουργία παθολογικής νεοαγγείωσης. Η νεοαγγείωση αυτή είναι δυνατό να επεκταθεί και στο υαλοειδές. Επιπρόσθετα, αναπτύσσεται ινώδης συνδετικός ιστός που έλκει με τη σειρά του τα παθολογικά νεοαγγεία προξενώντας αιμορραγίες και αποκόλληση του αμφιβληστροειδή.

Αυτή τη στιγμή, δεν υπάρχει κατάλληλη θεραπεία για την αντιμετώπιση της ανάπτυξης αμφιβληστροειδοπάθειας προωρότητας. Η προσπάθεια αντιμετώπισης της ασθένειας έγκειται αποκλειστικά στην πρόληψη με μέτρηση σε τακτά χρονικά διαστήματα των επιπέδων του αρτηριακού οξυγόνου.

1.2.5 Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (diabetic retinopathy, DR) είναι συχνά εμφανιζόμενη επιπλοκή της νόσου του διαβήτη (diabetes mellitus), επηρεάζει τα αγγεία του αμφιβληστροειδή και αποτελεί σημαντική αιτία τύφλωσης στην παραγωγική ηλικία ανθρώπων σε βιομηχανοποιημένες χώρες. Εμφανίζεται στο 90% των ατόμων με διαβήτη τύπου Ι (ινσουλινο-εξαρτώμενος) και στο 65% των ατόμων με διαβήτη τύπου ΙΙ (μη εξαρτώμενος από ινσουλίνη). Οι πιθανότητες ανάπτυξης της DR σε κάποιον είναι μεγαλύτερες όσο πιο μεγάλο είναι το διάστημα που αυτός έχει διαβήτη. Η νόσος μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια: μη πολλαπλασιαστική (ή μη παραγωγική) DR και πολλαπλασιαστική (ή παραγωγική) DR.

Η μη πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από μικροανευρύσματα και μικρές αιμορραγίες, που αν δεν επηρεάσουν την ωχρά κηλίδα δεν προκαλούν βλάβες στην όραση.

Η πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου, από την άλλη, είναι αποτέλεσμα μιας πιο εκτεταμένης ισχαιμικής κατάστασης και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων στην επιφάνεια του ιστού ή του οπτικού δίσκου και αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες. Τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία μπορούν να αιμορραγήσουν και να εμφανιστεί αιμορραγία στο υαλώδες σώμα, ακολούθως να εμφανιστεί ίνωση (σχηματισμός υπερβολικού ινώδους συνδετικού ιστού) και αποκόλληση του αμφιβληστροειδή. Το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας (diabetic macular edema, DME) είναι, επίσης, ένα επακόλουθο σύμπτωμα του διαβήτη και χαρακτηρίζεται από αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και εναπόθεση σκληρών υπολειμμάτων στο κέντρο του αμφιβληστροειδή. Το DME είναι κύρια αιτία απώλειας της όρασης στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Cuilla και συν., 2003, Porta & Allione, 2004, Pemp & Schmetterer, 2008, Aiello, 2008).

Πέρα από τις παρατηρούμενες αγγειακές αλλαγές στην περίπτωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι πρόκειται για μια νευροεκφυλιστική νόσο του οφθαλμού (για ανασκόπηση βλ. Barber, 2003), που εκδηλώνει λειτουργικές αλλαγές στην όραση πριν και ανεξάρτητα από τον ανώμαλο σχηματισμό νέων αγγείων (Lieth και συν., 2000). Αυτές οι αλλαγές έχουν άμεσες συνέπειες στους

νευρώνες του αμφιβληστροειδή και καταλήγουν σε απόπτωση. Η ομάδα του Barber το 1998 χρησιμοποιώντας το μοντέλο της στρεπτοζοτοκίνης για επαγωγή διαβήτη τύπου Ι σε αρουραίους παρατήρησε αύξηση στα αποπτωτικά νευρικά και/ή γλοιακά κύτταρα, αλλά όχι και αλλαγές σε επίπεδο αγγειακών κυττάρων (Barber και συν., 1998). Επίσης, στην ίδια μελέτη σε αμφιβληστροειδείς διαβητικών ασθενών παρατήρησαν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα δεν περιορίζονταν μόνο στις περιοχές με αγγειακές βλάβες. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα αυτά έδειξαν ότι η αμφιβληστροειδική απόπτωση είναι μια γενικευμένη απόκριση των νευρώνων του ιστού στην περίπτωση του διαβήτη.

1.2.6 Θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών

Οι σπουδαιότερες θεραπείες για τις αμφιβληστροειδικές αγγειογενετικές παθήσεις έχουν εστιαστεί στην αντιμετώπιση της ανώμαλης ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων. Αυτές οι θεραπείες είναι μη ειδικές, περιλαμβάνουν την επέμβαση με laser και διακρίνονται στην εστιασμένη και σκεδασμένη "φωτοθρόμβωση" (photocoagulation). Η εστιασμένη φωτοθρόμβωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή των διαρρεόντων αιμοφόρων αγγείων, ενώ η σκεδασμένη φωτοθρόμβωση για τον έλεγχο της ανάπτυξης μη φυσιολογικών αγγείων. Η θεραπεία με laser φωτοθρόμβωση εφαρμόζεται μόνη της ή σε συνδυασμό με την verteporfin, μια φωτοευαίσθητη πορφυρίνη.

Τα τελευταία πέντε χρόνια, νέα φάρμακα με στόχο το σύστημα του VEGF δοκιμάζονται σε ασθενείς για την αντιμετώπιση αμφιβληστροειδοπαθειών. Ο ισχαιμικός ιστός απελευθερώνει αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι ευθύνονται για την δημιουργία νέων αγγείων. Δύο φάρμακα, το ranibizumab (Lucentis) και το pegaptanib (Macugen) έχουν λάβει έγκριση για την κυκλοφόρηση και χρήση τους στη θεραπεία της γεροντικής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων στις ΗΠΑ (FDA, Food and Drug Administration). Αυτά τα φάρμακα εμποδίζουν την αγγειογένεση όταν χορηγούνται ενδοφθάλμια. Το ranibizumab είναι ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει και προσδένεται στον VEGF-A (Ferrara και συν., 2006) ενώ το pegaptanib είναι ένα τροποποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο που προσδένεται σε

μια ειδική ισομορφή του VEGF, την VEGF165, η οποία εμπλέκεται στην οφθαλμική νεοαγγείωση κι έτσι εμποδίζει την ανάπτυξη νέων αγγείων (Ng και συν., 2006).

Παρόλο που οι νέες anti-VEGF προσεγγίσεις είναι ελπιδοφόρες γιατί τα θεραπευτικά αποτελέσματα είναι θεαματικά, κλινικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη για τη μελέτη της αποτελεσματικότητάς τους στην αντιμετώπιση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Επιπλέον, τα φάρμακα αυτά δεν στερούνται παρενέργειες όπως η αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης, η αιμορραγία του επιπεφυκότα, ο πόνος και η ενδοφθάλμια φλεγμονή, η ενδοφθαλμίτιδα, η αποκόλληση του αμφιβληστροειδή και ο τραυματικός καταρράκτης. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η αναστολή της δημιουργίας νέων αγγείων είναι αναστρέψιμη με τη διακοπή της ενδοφθάλμιας χορήγησης των anti-VEGF φαρμάκων (Vasilaki και Thermos, 2009). Τέλος, είναι γνωστό ότι η απελευθέρωση του VEGF από το μελάγχρουν επιθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του ιδίως αμφιβληστροειδή, τη διατήρηση του χοριοειδικού πλέγματος και την προστασία έναντι της ισχαιμικών προσβολών (Nishijima και συν., 2007). Κατά συνέπεια, η ανάσχεση της φυσιολογικής απελευθέρωσης του VEGF από το μελάγχρουν επιθήλιο με τη χρήση αντι-VEGF παραγόντων μπορεί - σε βάθος χρόνου - να έχει ανεπιθύμητες (και για την ώρα άγνωστες) συνέπειες (Feigl, 2009).

Παρότι η νεοαγγείωση αντιμετωπίζεται με τη βοήθεια των παραπάνω αντιαγγειογενετικών παραγόντων, δεν υπάρχει θεραπεία για την αντιμετώπιση της εκφύλισης των νευρώνων του αμφιβληστροειδή. Είναι προφανές ότι, για την αποκατάσταση της οπτικής οξύτητας των ασθενών θα πρέπει να αντιμετωπιστούν τόσο τα συμπτώματα της νεοαγγείωσης όσο και της νευροεκφύλισης. Απαιτούνται κατά συνέπεια νευροπροστατευτικά φάρμακα γιια τη μελέτη και την ανακάλυψη των οποίων είναι απαραίτητα αξιόπιστα πειραματικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών και νέοι θεραπευτικοί στόχοι.

1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ

Σε αναζήτηση ενός κατάλληλου μοντέλου, που να προσομοιάζει την αμφιβληστροειδική ισχαιμία του ανθρώπου, το τελευταίο μισό του 20^{ου} αιώνα έως και σήμερα, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός *in vivo* και ex vivo πειραματικών μοντέλων σε θηλαστικά. Η αναζήτηση αυτή είναι αρκετά δύσκολη εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας που εμφανίζει το αμφιβληστροειδικό αγγειακό μοτίβο, στα διάφορα είδη. Καθένα από τα κοινά μικρά εργαστηριακά θηλαστικά, (αρουραίος, κουνέλι, ινδικό χοιρίδιο) έχει διαφορετική αγγειακή τροφοδοσία. Ωστόσο, η αγγειακή τροφοδοσία του αρουραίου είναι πιο κοντά σε αυτή του ανθρώπου, με αποτέλεσμα τη χρήση αρουραίων για την ανάπτυξη μοντέλων αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.

Ένα από τα πρώτα μοντέλα *in vivo* που αναπτύχθηκαν ήταν αυτό της αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης από τους Smith και Baird το 1952, το οποίο περιέγραψαν αναλυτικότερα ο Buchi και οι συνεργάτες του το 1991. Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει την τοποθέτηση βελόνας στον πρόσθιο θάλαμο, η οποία είναι συνδεδεμένη με μια μικρή δεξαμενή ορού, ανυψωμένη σε κατάλληλο ύψος έτσι ώστε να ασκεί πίεση 110mmHg, δηλαδή πίεση μεγαλύτερη από αυτή που φυσιολογικά υπάρχει στο μάτι. Ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας είναι επίσης τα μοντέλα της αγγειακής επίδεσης του οπτικού νεύρου, των οπίσθιων βλεφαριδωτών αγγείων ή των κεντρικών αρτηριών, όπως φαίνονται και στον πίνακα 1.

Πειραματική Μέθοδος	Βαθμός Ισχαιμίας	Σχετιζόμενες Ανθρώπινες Ασθένειες	Επιλεκτικές Αναφορές
Υψηλή ενδοφθάλμια πίεση	Ολοκληρωτική	απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή	Smith και Baird, 1952, Buchi και συν., 1991
Επίδεση οπτικού νεύρου	Ολοκληρωτική	απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή	Stefansson каї συν., 1988
Επίδεση οφθαλμικών αγγείων	Ολοκληρωτική	απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή	Otori και συν., 1997 Vidal-Sanz και συν., 2001
Αμφίπλευρη απόφραξη της κοινής καρωτίδας	Μερική	απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή	Osborne каї συν. 1992
Φωτοδυναμική αποκόλληση	Μερική	απόφραξη κλάδου της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή	Mosinger και Onley 1991, Daugeliene και συν., 2000

Πίνακας – 1: Μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας σε ζώα και σχετιζόμενες με αυτά ανθρώπινες ασθένειες.

Τροποποίηση από Osbornne και συν., 2004

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση των αμφιβληστροειδοπαθειών (Osborne και συν., 2004). Η παρούσα διατριβή θα εστιάσει στην πιθανή νευροπροστατευτική δράση της του νευροπεπτιδίου σωματοστατίνη.

1.4 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ

Η σωματοστατίνη-14 (SRIF-14, Somatotropin Release Inhibitory Factor-14 είναι ένα κυκλικό δεκατεραπεπτίδιο που ανακαλύφθηκε στον υποθάλαμο από τον Brazeau και τους συνεργάτες του το 1973. Η σωματοστατίνη-28 (SRIF-28) η οποία αποτελείται από 28 αμινοξέα, εκτείνεται προς το αμινο-τελικό άκρο της σωματοστατίνης-14, και μεταβολίζεται στη σωματοστατίνη-14, ανακαλύφθηκε λίγο αργότερα στα σπλάχνα (Pradayrol και συν., 1980). Οι δύο αυτές ορμόνες είναι βιολογικά ενεργές. Παράγονται σε διάφορες ποσότητες από διαφορετικά κύτταρα και δρουν είτε τοπικά σε γειτονικά κύτταρα, είτε πιο εκτεταμένα μέσω της κυκλοφορίας για να ρυθμίσουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η κυτταρική έκκριση, η νευροδιαβίβαση, η συσταλτικότητα των λείων μυών των αγγείων, η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Τα δύο αυτά πεπτίδια δρουν ως νευροδιαβιβαστές, αυτοκρινικοί ή παρακρινικοί ρυθμιστές και φαίνεται να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία διαφόρων νόσων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington, η νόσος του Parkinson και η επιληψία (Epelbaum, 1986, Reichlin, 1987, Patel, 1990, Timmers кан συν., 1996, Eve кан συν., 1997, van de Nes και συν., 2002).

1.4.1 Ανακάλυψη της σωματοστατίνης

Η σωματοστατίνη (SRIF) ανακαλύφθηκε κατά την προσπάθεια της ομάδας του Krulich να απομονώσει τα υποθαλαμικά εκείνα παρασκευάσματα που ήταν υπεύθυνα για την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης (GH). Στα πλαίσια αυτών των ερευνών, εντόπισαν μια ουσία, χαμηλού μοριακού βάρους, η οποία ήταν ικανή να αναστείλει την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης

(Krulich και συν., 1968). Η απομόνωση και ταυτοποίηση του μορίου έγινε ωστόσο το 1973 από τον Brazeau και τους συνεργάτες του οι οποίοι ανίχνευσαν το κυκλικό δεκατετραπεπτίδιο SRIF-14 σε καλλιέργειες κυττάρων αδενοϋπόφυσης αρουραίου (Brazeau et al., 1973).

1.4.2 Βιοσύνθεση της σωματοστατίνης

Η σωματοστατίνη προέρχεται από ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο 116 αμινοξέων, την προ-προσωματοστατίνη (prepro-SRIF), το οποίο με ταχεία πρωτεολυτική διάσπαση παράγει την προορμόνη προσωματοστατίνη (pro-SRIF). Στα θηλαστικά η προσωματοστατίνη βάρους 10kDa, αποτελείται από 92 αμινοξέα και φέρει τρεις χαρακτηριστικές θέσεις πρωτεόλυσης, μια διβασική (αργινίνης - λυσίνης, Arg – Lys) και μια μονοβασική (αργινίνης, Arg) στο κάρβοξυ-τελικό άκρο καθώς και μια μονοβασική θέση (λυσίνης, Lys) στο αμινο-τελικό άκρο. Από την πέψη της προορμόνης στη διβασική θέση Arg-Lys προκύπτει η σωματοστατίνη-14 και η σωματοστατίνη-28[1-76] (8kDa), ενώ από την πέψη της στη μονοβασική θέση Arg προκύπτει η σωματοστατίνη-28 και η προσωματοστατίνη[1-63] (7kDa, Εικόνα 6). Τέλος, από την πέψη της προσωματοστατίνης στη μονοβασική θέση πρωτεόλυσης Lys προκύπτει η προσωματοστατίνη[1-10] ή αντρίνη (Goodman και συν., 1983, Benoit και συν., 1987, Patel and O'Neil, 1988, Rabbani and Patel, 1990).

Όπως προαναφέρθηκε, στους ιστούς των θηλαστικών υπάρχουν διάφορες αναλογίες των μορφών της σωματοστατίνης. Τα μόρια αυτά απελευθερώνονται από τα σωματοστατινεργικά κύτταρα, αλλά μόνο η σωματοστατίνη-14 και η σωματοστατίνη-28 έχουν βιολογική δραστικότητα. Η σωματοστατίνη-14 επικρατεί στους νευρικούς ιστούς, ενώ στο πάγκρεας, στο στομάχι και στα περιφεριακά νεύρα είναι ουσιαστικά η μόνη μορφή. Η σωματοστατίνη-28 αποτελεί το 20-30% της συνολικής ανοσοεντοπιζόμενης της σωματοστατίνης στον εγκέφαλο και την κυρίαρχη μορφή στο έντερο (Patel και συν., 1981).

Στα θηλαστικά οι μορφές της σωματοστατίνης προέρχονται όλες από ένα γονίδιο, σε αντίθεση με τα ψάρια όπου υπάρχουν δύο διαφορετικά γονίδια σωματοστατίνης τα οποία εκφράζονται σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς
κυττάρων και κωδικοποιούν δύο προϊόντα ανάλογα της σωματοστατίνης-14 και της σωματοστατίνης-28. Η σωματοστατίνη-14 παρουσιάζεται πανομοιότυπη σε ψάρια και θηλαστικά ενώ η σωματοστατίνη-28 φέρει ομολογία μόνο κατά 40-60% ανάμεσα σε αυτά τα είδη (Patel, 1999).



Εικόνα - 6: Σχηματική αναπαράσταση της προσωματοστατίνης και των προϊόντων της στα θηλαστικά.

1.4.3 Περιοχές έκφρασης και απελευθέρωσης σωματοστατίνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σωματοστατίνη-14 και η σωματοστατίνη-28 παράγονται κυρίως από νευρώνες και εκκριτικά κύτταρα του κεντρικού αλλά και περιφερικού κεντρικού συστήματος, καθώς και από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η σωματοστατίνη εκφράζεται επίσης και σε άλλα ενδοκρινή ή εξωκρινή κύτταρα, στο θυρεοειδή, στα επινεφρίδια, στον πλακούντα, στο νεφρό, σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και στον αμφιβληστροειδή (Reichlin 1983, Aguila 1994, Epelbaum και συν., 1994, Elliott και συν., 1998, Tannenbaum & Epelbaum, 2000). Οι δύο αυτές μορφές εντοπίζονται επίσης στο αίμα οι οποίες απενεργοποιούνται ταχέως στο συκώτι και τα νεφρά (Patel και συν., 1981, Shoelson και συν., 1986).

Η απελευθέρωση της σωματοστατίνης από τους νευρώνες και τα εκκριτικά κύτταρα συνήθως εξαρτάται από τη μεμβρανική εκπόλωση ή την

αύξηση του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και διεγείρεται από ιόντα, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και θρεπτικά συστατικά (Patel, 1999).

1.4.4 Δράσεις της σωματοστατίνης

Η πολλαπλή κατανομή της σωματοστατίνης υποδεικνύει το ευρύ φάσμα δράσης της εκτός την ικανότητά της να αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση. Το πεπτίδιο αυτό δρα σε πολλαπλούς στόχους όπως ο εγκέφαλος, τα σπλάχνα, το ενδοκρινές και εξωκρινές πάγκρεας, τα επινεφρίδια, ο θυρεοειδής και τα νεφρά. Οι δράσεις της είναι κυρίως ανασταλτικές ενώ έχει αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες και είναι μία από τις κύριες νευροδιαβιβαστικές ουσίες στον εγκέφαλο και τα περιφερικά νευρικά κύτταρα (Patel και συν., 1999).

Αναλυτικότερα, σωματοστατίνη, στον εγκέφαλο η ως νευροδιαβιβαστική ουσία, φαίνεται να εμπλέκεται σε διάφορες συμπεριφορικές λειτουργίες όπως η γνώση, η μάθηση, η πείνα, ο κορεσμός, ο ύπνος και η αναλγησία (Reichlin, 1983, Patel, 1999). Επιπλέον, το πεπτίδιο αυτό, αναστέλλει εκτός από την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH) και αυτή της διεγερτικής θυρεοειδικής ορμόνης (TSH), ενώ δρα κατασταλτικά στην αύξηση των επιπέδων της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) στη νόσο του Addison και σε όγκους που παράγουν ΑCTH. Όπως προαναφέρθηκε, η σωματοστατίνη φαίνεται επίσης ότι εμπλέκεται σε διάφορες νευρολογικές νόσους όπως η νόσος του Alzheimer (Craft και συν., 1999, Davis και συν., 1999, van de Nes και συν., 2002), του Parkinson (Eve και συν., 1997), του Huntington (Norris και συν., 1996, Timmers και συν., 1996) και η επιληψία.

Στο γαστρενερικό σωλήνα η σωματοστατίνη αναστέλλει όλες τις σπλαχνικές ορμόνες και τις εξωκρινείς εκκρίσεις όπως το γαστρικό υγρό, την πεψίνη, τη χολή και μειώνει τη γαστρική κένωση και τη συστολή της χοληδόχου κύστης.

Στο θυρεοειδή αδένα, το μόριο αυτό αναστέλλει την επαγόμενη από την TSH απελευθέρωση θυροξίνης (Τ4) και τριιωδοθυρονίνης (Τ3) που διεγείρεται από την TSH, ενώ στα επινεφρίδια αναστέλλει την επαγόμενη από την αγγειστενσίνη και την ακετυλοχολίνη έκκριση αλδοστερόνης και κατεχολαμινών (Patel, 1999).

Οι δράσεις αυτές της σωματοστατίνης επιτυγχάνονται μέσω της αλληλεπίδρασης με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς οι οποίοι απαντώνται σε διαφορετικές αναλογίες στους ιστούς στόχους της (Srikant and Patel, 1986, Patel και συν., 1990, Olias και συν., 2004).

1.4.5 Υποδοχείς σωματοστατίνης

Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης αναγνωρίστηκαν αρχικά σε κυτταρικές σειρές υποφυσιακών κυττάρων (Schonbrunn and Tashjian,1978, Thermos και Reisine, 1988) και στη συνέχεια έγιναν πολλές προσπάθειες να απομονωθούν είτε από περιφερικά όργανα όπως το πάγκρεας (Sakamoto και συν., 1984, Srikant and Patel, 1986a, Susini και συν., 1986, Knuhtsen και συν., 1990, Thermos και συν., 1990), το φλοιό των επινεφριδίων (Srikant and Patel, 1986β), το στομάχι (Reyl-Desmars και συν., 1989) και την υπόφυση (Lewis and Williams, 1987, Bruno και Berelowitz, 1989, Murthy και συν., 1989), ή από τον εγκέφαλο (He και συν., 1989, Kimura, 1989, Thermos και συν., 1989).

1.4.6 Κλωνοποίηση σωματοστατινεργικών υποδοχέων

Η ταυτοποίηση των υποδοχέων της σωματοστατίνης, σχεδόν 20 χρόνια μετά την ανακάλυψη του πεπτιδίου, ήταν ένα μεγάλο βήμα για την περαιτέρω μελέτη των δράσεων και των λειτουργιών του μορίου. Διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν πέντε διαφορετικοί υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης, οι sst1, sst2, sst3, sst4 και sst5 (Bruno και συν., 1992, Meyerhof και συν., 1992, O'Carroll και συν., 1992, Yamada και συν., 1992). Στα θηλαστικά, όλοι οι σωματοστατινεργικοί υποδοχείς κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια σε ξεχωριστά χρωμοσώματα. Υπάρχουν δύο μορφές του sst2 υποδοχέα, οι sst2 και sst2 οι οποίες προέρχονται από το ίδιο γονίδιο ως συνέπεια εναλλακτικού ματίσματος (Baumeister και Meyerhof, 2000). Οι υπότυποι των υποδοχέων της

σωματοστατίνης ακολουθούν την τυπική μοριακή αρχιτεκτονική των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτείνες (G protein couple receptor, GPCR), δηλαδή αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές με τρεις ενδοκυττάριους και εξωκυττάριους βρόγχους, με την αλληλουχία DRY (Asp-Arg-Tyr) στην τρίτη διαμεμβρανική περιοχή για τη σύζευξή τους με τις Gπρωτεΐνες και τέσσερις θέσεις γλυκοζυλίωσης στο αμινο-τελικό άκρο. Σημαντική είναι και η διατήρηση της αλληλουχίας YANSCANPI/VLY στην έβδομη περιοχή διαμεμβρανική η οποία θεωρείται n "υπογραφή" των σωματοστατινεργικών υποδοχέων στα θηλαστικά (Olias και συν., 2004). Τα γονίδια των σωματοστατινεργικών υποδοχέων 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 στα άμινο- και κάρβοξυ-τελικά άκρα τους (Reisine and Bell, 1995, Patel και συν., 1995, Patel, 1999).

Με βάση τη δομή και το φαρμακολογικό τους προφίλ, οι υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης χωρίζονται σε δύο ομάδες: την SRIF1 και την SRIF2. Η ομάδα SRIF1 περιλαμβάνει τους υπότυπους sst₂, sst₃ και sst₅ και η ομάδα SRIF2 τους sst₁ και sst₄. Το φυλογενετικό δέντρο που βασίζεται στην αλληλουχία των αμινοξέων των υποδοχέων της σωματοστατίνης παρουσιάζεται στην εικόνα 7. Οι υποδοχείς της SRIF1 αλλά όχι της SRIF2 δεσμεύονται άμεσα στα κλασσικά οκταπεπτιδικά ή εξαπεπτιδικά ανάλογα οκτρεοτίδη, λανρεοτίδη, σεγλιτίδη και βαπρεοτίδη (βλ.1.4.6).

Οι πέντε υπότυποι σωματοστατίνης παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό δομικής ομολογίας στα διάφορα είδη. Στον άνθρωπο δεν υπάρχουν πολλές πιθανότητες για την ανακάλυψη νέων σωματοστατινεργικών υποδοχέων σε αντίθεση με τα μη-θηλαστικά όπου τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί περισσότερα από πέντε γονίδια έκφρασής τους. Στον τετραπλοειδή τελεόστεο για παράδειγμα, Carassius auratus, κλωνοποιήθηκαν δύο γονίδια για τον sst₁, ένα για τον sst₂, δύο για τον sst₃ και τρία για τον sst₅ (Lin και συν., 1999, 2000α, 2000β, 2002, Lin και Peter, 2003). Στα ασπόνδυλα, δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα κάποιος σωματοστατινεργικός υποδοχέας, ενώ στα έντομα το γονίδιο που είχε απομονωθεί με αλληλουχία παρόμοια με αυτή των υποδοχέων της

σωματοστατίνης αποδείχθηκε υποδοχέας για αλλατοστατινεργικά πεπτίδια (Birgül και συν., 1999, Auerswald και συν., 2001, Kreienkamp, 2002).



Τροποποίηση από Olias και συν., 2004

Εικόνα – 7: Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στην αλληλουχία των αμινοξέων των υποδοχέων σωματοστατίνης στα σπονδυλωτά. π: προγονικό.

1.4.7 Κατανομή σωματοστατινεργικών υποδοχέων

Η κυτταρική ἐκφραση των υποδοχέων της σωματοστατίνης ἐχει αναγνωριστεί σε ιστούς τρωκτικών και ανθρώπων αλλά και σε διάφορους όγκους και κυτταρικές σειρές όγκων με τη χρήση ποικίλων τεχνικών όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR), η *in situ* υβριδοποίηση, η ανάλυση κατά Nothern και η ανάλυση της προστασίας της ριβονουκλεάσης (Bruno και συν., 1993, Kong και συν., 1994, Reisine και Bell, 1995, Patel και συν., 1995, Thoss και συν., 1996). Η ανάπτυξη αντισωμάτων τα τελευταία χρόνια άνοιξε το δρόμο για τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των σωματοστατινεργικών υποδοχέων. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν ένα πολύπλοκο μοτίβο κατανομής των υποδοχέων της σωματοστατίνης σε όλο το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, το οποίο αν και είναι επικαλυπτόμενο, παρουσιάζει εκλεκτικότητα ανάλογα με τον υπότυπο, τον ιστό και το είδος (Patel και συν., 1995, Reisine και Bell, 1995, Patel, 1997).

Στον αρουραίο, та mRNA тων sst₁-sst₅ υπότυπων тων σωματοστατινεργικών υποδοχέων εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό, το ραβδωτό σώμα, τον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή, τον οσφρητικό βολβό και την προ-οπτική περιοχή (Bruno και συν. 1993). Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες στον εγκέφαλο αρουραίου διακρίνονται οι sst1, sst2 και sst3 σωματοστατινεργικοί υποδοχείς. Ο sst1 εντοπίζεται στις στιβάδες 2, 3, 5 και 6 του εγκεφαλικού φλοιού, στον ιππόκαμπο, στον υποθάλαμο και στο μέσο εγκέφαλο (Hervieu και Emson, 1998), ενώ ο sst2 εμφανίζει μεγάλη έκφραση στο οσφρητικό φύμα, στον απιοειδή φλοιό, στις στιβάδες 2, 3, 5 και 6 του εγκεφαλικού φλοιού, στα βασικά γάγγλια, στον ιππόκαμπο, στην αμυγδαλή, στο εγκεφαλικό στέλεχος και στον προμήκη μυελό (Dournaud και συν., 1996). Ο sst3 είναι ο επικρατέστερος υπότυπος στις στιβάδες 5 και 6 του εγκεφαλικού φλοιού και στην κοκκώδη στιβάδα της παρεγκεφαλίδας (Kumar και συν., 1996). Στον υποθάλαμο του apoupaiou εντοπίζονται ανοσοϊστοχημικά όλοι υπότυποι OI тων σωματοστατινεργικών υποδοχέων (Helboe και συν., 1998, Kumar και συν., 1999), υποδηλώνοντας μια πιθανή συμμετοχή της σωματοστατίνης σε αυτόνομες και ενδοκρινικές λειτουργίες (Tannenbaum & Epelbaum, 2000), με τον sst1 va είναι αυτός που επικρατεί και τους sst2, sst3, sst4 και sst5 va εκφράζονται σε μικρότερες ποσότητες (Kumar και συν., 1999).

Το mRNA όλων των σωματοστατινεργικών υποδοχέων έχει επίσης εντοπιστεί και σε περιφερειακούς ιστούς του αρουραίου, όπως στο στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τον ειλεό, το κόλον και την αορτή (Krempels και συν., 1997, Khare και συν., 1999).

Στο ανθρώπινο στομάχι, εμφανίζεται έκφραση των mRNA όλων των υποτύπων της σωματοστατίνης, ενώ στο φυσιολογικό θύμο αδένα αυτό των sst1, sst2A και sst3 (Le Romancer και συν., 1996, Ferone και συν., 1999). Υψηλή συγκέντρωση των sst2 υποδοχέων απαντάται στα επινεφρίδια, με τους sst1 και τους sst3 να εμφανίζονται σε μικρότερες ποσότητες (Bruno και συν., 1993, Patel και συν., 1995). Ο sst3 εντοπίζεται επίσης στο συκώτι και στη σπλήνα, ο sst4 στην καρδιά, στους πνεύμονες και στον πλακούντα, ενώ οι sst1, sst2 και sst3 στα σπερματοκύτταρα και στα κύτταρα Sertoli των όρχεων (Bruno και συν., 1993, Caron και συν., 1997, Patel και συν., 1995, Rohrer και συν., 1993, Zhu και συν., 1998). Ο sst2 εμφανίζεται επίσης σε ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως μακροφάγα, T και B λεμφοκύτταρα, αλλά και σε κύτταρα του θύμου στο ποντίκι (Elliott και συν., 1994, 1998).

Σε κυτταρικές σειρές όγκων το mRNA του sst₂ υποτύπου της σωματοστατίνης είναι αυτό που εντοπίζεται σε υψηλή συχνότητα, ενώ ακολουθούν κατά σειρά οι sst₁, sst₃ και sst₄. Η έκφραση του sst₅ φαίνεται να παρουσιάζει μια εξειδίκευση για τους όγκους, αφού σε κάποιους όγκους εκφράζεται, όπως σε αυτό του μαστού, ενώ σε κάποιους άλλους να απουσιάζουν (Reisine και Bell, 1995, Patel, 1997, 1999).

1.4.8 Δημιουργία σωματοστατινεργικών αναλόγων

Οι ποικίλες δράσεις της σωματοστατίνης-14 και σωματοστατίνης-28 επιτυγχάνονται μέσω της δέσμευσής τους στους σωματοστατινεργικούς υποδοχείς με συγγένεια της τάξης των nM. Εξαιτίας της έλλειψης εκλεκτικότητας των πεπτιδίων αυτών για κάποιο συγκεκριμένο υπότυπο των υποδοχέων τους και του μικρού χρόνου ημιζωής τους, έγιναν πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη σωματοστατινεργικών αναλόγων με αυξημένη σταθερότητα και με την ικανότητα να δεσμεύονται εκλεκτικά σε κάθε ένα από τους υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης (Πίνακας-2). Κατά τις μελέτες αυτές έγινε

φανερό ότι το μοτίβο FWKT (7-10) της σωματοστατίνης ήταν κρίσιμης σημασίας για τη δέσμευσή της με τους υποδοχείς, με τα δύο κεντρικά αμινοξέα να παίζουν το κυριότερο ρόλο (Patel, 1999). Διατηρώντας λοιπόν σταθερά τα αμινοξέα αυτά και μεταβάλλοντας τα υπόλοιπα δημιουργήθηκαν διάφορα σωματοστατινεργικά ανάλογα όπως η οκτρεοτίδη (SMS201-995), η λανρεοτίδη (BIM23014) και η βαπρεοτίδη (RC-160), εκλεκτικά για τους υποδοχείς της ομάδας SRIF1 (Lamberts και συν., 2002). Το πρώτο εκλεκτικό ανάλογο για τους υποδοχείς της ομάδας SRIF2, το CH275 συντέθηκε στα μέσα της περασμένης δεκαετίας (Liapakis και συν., 1996). Τα τελευταία χρόνια έχουν κάνει επίσης την εμφάνισή τους αρκετοί πεπτιδικοί ή μη αγωνιστές, εκλεκτικοί για τους διάφορους υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης, αλλά και σωματοστατινεργικοί ανταγωνιστές, όπως το CYN154806, το NVP-SRA880, το BIM23627, το BIM23454, το sst3-ODN-8 και το BIM23056 (Bass και συν., 1996, Wilkinson και συν., 1996, Reubi και συν. 2000, Hoyer και συν., 2002, Tulipano και συν., 2002).

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
Octreotide (SMS 201-995)	290-1140	0,28-2,1	4,4-38	>1000	0,77-32
Lanreotide (BIM 23014)	500-2330	0,5-1,8	43-107	66-2100	0,6-14
Vapreotide (RC-160)	481->1000	5,4	31	45-351	0,7-7,5
BIM 23244	>1000	0,3	133	>1000	0,7
Seglitide (MK-678)	>10000	0,05-1,5	27-230	127-4949	0,06-232
BIM 23052	6,3-100	10-13,5	2,1-5,6	16-141	1,2-18
BIM 23056	110->1000	132->1000	10,8-177	17-234	5,7-158
L-362,855	830->1000	1,0-2,0	5,1-6,2	63->1000	0,002-63
BIM 23268	18,4	15,1	61,6	16,3	0,37
CYN 154806	1200	3,6	150	650	2
CH 275	1,8-4,9	740->1000	12->1000	4,3-874	980->1000
NNC 26-9100	5000	3300	6800	100	4100
L-054,264	1740	1,6	2950	2000	4470
L-054,522	2392	0,01	31	81	163
L-363,301	>1000	5,1	129	>1000	25
L-797,591	1,4-3,5	1875	2240	170	3600
L-779,976	2760	0,05	729	310	4260
L-796,778	1255	>10000	24	8650	1200
L-803,087	199	4720	1280	0,7	3880
L-817.818	3,3	52	64	82	0.4

Πίνακας- 2: Συγγένεια σωματοστατινεργικών αναλόγων με τους υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης (τιμές IC₅₀ ή Kισε nM).

Τροποποίηση από Olias και συν., 2004

1.4.9 Εκτελεστικά συστήματα

Οι σωματοστατινεργικοί υποδοχείς ρυθμίζουν μια πληθώρα συστημάτων μεταγωγής σήματος μέσω της ενεργοποίησης ευαίσθητων ή μη στην τοξίνη του κοκίτη G πρωτεϊνών (Meyerhof 1998, Csada and Dournard, 2001). Όπως είναι γνωστό, η G πρωτεΐνη είναι μια περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από μια υπομονάδα α (45kd), μια β (35kd) και μια γ (7kd) (Gilman, 1987). Η πρωτεΐνη αυτή μεταπίπτει μεταξύ μιας στερεοδιάταξης που δεσμεύει GDP και μιας που δεσμεύει GTP. Το σύμπλοκο σωματοστατίνης υποδοχέας δεσμεύεται με την G πρωτεΐνη, επάγει την απελευθέρωση του δεσμευμένου GDP και επιτρέπει τη δέσμευση GTP. Η υπομονάδα α που φέρει GTP διίσταται από την υπομονάδα βγ οι οποίες στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με διάφορα εκτελεστικά συστήματα του κυπάρου στόχου (Stryer, 1988).

Η αδενυλική κυκλάση ήταν ένα από τα πρώτα εκτελεστικά συστήματα που φάνηκε να επηρεάζονται και να αναστέλλονται από την ενεργοποίηση των σωματοστατινεργικών υποδοχέων (Mahy και συν., 1988, Tallent & Reisine, 1992, Patel και συν., 1994). Επιπλέον, η σωματοστατίνη μέσω της δέσμευσής της στους υποδοχείς της, είναι δυνατό να αυξήσει (Wang και συν., 1989, de Weille και συν., 1989, White και συν., 1991, Sims και συν., 1991), ή να μειώσει (Karschin και συν., 1994, Karschin, 1995) την αγωγιμότητα διαφόρων τύπων διαύλων ιόντων καλίου. Αλλαγές στην αγωγιμότητα των κυττάρων μπορούν επίσης να επέλθουν εξαιτίας της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης Α2 (Schweitzer και συν., 1990, Lammers και συν., 1996) ή τη διέγερση της φωσφολιπάσης C από τη σωματοστατίνη (Csada and Dournaud, 2001, Rosskopf και συν., 2003). Επιπλέον, μείωση της αγωγιμότητας διαύλων ασβεστίου έχει επίσης παρατηρηθεί μετά από ενεργοποίηση διαφόρων υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης σε πολυάριθμες κυτταρικές σειρές (Csada and Dournaud, 2001). Παράλληλα, η ενεργοποίηση των σωματοστατινεργικών υποδοχέων είναι δυνατό va οδηγήσει στην ενεργοποίηση της φωσφατάσης της τυροσίνης (Buscail και συν., 1994, Florio και συν., 1994, Reardon και συν., 1997), στην αναστολή (Dent και συν., 1997, Cattaneo και συν., 1999, Douziech και συν., 1999, Florio και συν., 2001, 2003) ή τη διέγερση (Florio και συν., 1999) της μιτωτικής πρωτεϊνικής κινάσης (mitogenactivated protein kinase, MAPK), ή ακόμα στην ενεργοποίηση του ανταλλάκτη Na⁺/H⁺ (Barber και συν., 1989, Hou και συν., 1994, Lin και συν., 2003).

1.4.10 Εντοπισμός της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή

Ανοσοδραστική και βιολογικά ενεργή σωματοστατίνη ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Rorstad και συν., 1979, Shapiro και συν., 1979, Kirsch and Leonhardt, 1979), αργότερα το πεπτίδιο εντοπίστηκε και σε άλλα είδη (Rorstad και συν., 1980, Sagar και συν., 1982, Tornqvist και συν., 1982, Sagar and Marshall, 1988). Πιο πρόσφατα η παρουσία της ανιχνεύτηκε με τεχνικές *in situ* υβριδισμού, ραδιοανοσοανάλυσης (RIA) και RT-PCR (Larsen και συν., 1990, Yamaguchi και συν., 1990, Thermos, 2003).

Η ανοσοδραστικότητα της σωματοστατίνης εντοπίζεται σε έναν σποραδικά κατανεμημένο πληθυσμό βραχύινων και μετατοπισμένων βραχύινων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή ποντικιού, αρουραίου (Sagar και συν., 1985, Larsen και συν., 1990), ινδικού χοιρίδιου (Tornqvist και συν., 1982, Spira και συν., 1984) και ανθρώπου (Tornqvist και Ehinger, 1988). Στον αμφιβληστροειδή κουνελιού, γάτας και πρωτευόντων θηλαστικών η πλειοψηφία των κυπάρων στα οποία εντοπίζεται η σωματοστατίνη είναι έκτοπα βραχύινα κύτταρα (Sagar, 1987, Marshak, 1989, Rickman και συν., 1996). Ένα μικρό ποσοστό γαγγλιακών κυττάρων φαίνεται ότι περιέχουν επίσης σωματοστατίνη στον αμφιβληστροειδή του πιθήκου *Tupaia belangeri* (Engelmann και Peichl, 1996) και της γάτας (White και Chalupa, 1991). Επίσης, σωματοστατίνη εντοπίστηκε σε γαγγλιακά κύτταρα που παρουσιάζονται προσωρινά κατά την αναπτυξιακή φάση – τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση των νεογνών - σε αμφιβληστροειδή αρουραίου (Fontanesi και συν., 1997, Xiang και συν., 2001).

1.4.11 Υποδοχείς σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή

Αρχικά, πριν ακόμα κλωνοποιηθούν οι σωματοστατινεργικοί υποδοχείς, υπήρχαν φαρμακολογικές μελέτες που φανέρωναν την παρουσία θέσεων

δέσμευσης της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή (Kossut και συν., 1989, Liapakis και συν., 1993). Με την κλωνοποίηση όμως των υποδοχέων της σωματοστατίνης δόθηκε η ευκαιρία στους ερευνητές να μελετήσουν τη φυσιολογική δράση των υποδοχέων αυτών στα διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου και του αμφιβληστροειδή. Με την τεχνική της αντίστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη του mRNA όλων των σωματοστατινεργικών υποδοχέων σε αμφιβληστροειδή αρουραίου (Mori και συν., 1997). Στον αμφιβληστροειδή αρουραίου και ποντικιού το mRNA των sst2 και sst4 υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης φαίνεται ότι υπάρχει σε αφθονία (Mori και συν., 1997, Cristiani και συν., 2002), σε αντίθεση με τον αμφιβληστροειδή κουνελιού όπου το mRNA του sst1 υπότυπου βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα, με το mRNA του sst2 υπότυπου να ακολουθεί και με τα επίπεδα των sst3, sst4 και sst₅ υποτύπων να είναι πολύ χαμηλά (Cristiani και συν., 2000). Γενικά, το mRNA όλων των υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή αρουραίου, ποντικιού και κουνελιού. Όσον αφορά τον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή, υπάρχει συμφωνία στην ύπαρξη των mRNA των sst1, sst2 και sst3 υποτύπων, ενώ για τους sst4 και sst5 υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις που πιθανότατα οφείλονται σε τεχνικούς λόγους.

Η πρόσφατη ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι όλων των υποτύπων των σωματοστατινεργικών υποδοχέων είχε σαν αποτέλεσμα τη λεπτομερή χαρτογράφηση της έκφρασης των υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή διαφόρων ειδών, όπως αναφέρεται και παρακάτω.

ssti

Η ανοσοδραστικότητα του sst1 υπότυπου εντοπίζεται σε βραχύινα κύτταρα της εσωτερικής πυρηνικής στιβάδας που εκφράζουν σωματοστατίνη, σε εκτοπισμένα βραχύινα κύτταρα της γαγγλιακής στιβάδας και σε ένα μικρό αριθμό γαγγλιακών κυττάρων, καθώς και σε αποφύσεις κυττάρων κατά μήκος όλης της εσωτερικής δικτυωτής στιβάδας, σε αιμοφόρα αγγεία και στο μελάγχρουν επιθήλιο αρουραίου (Helboe και συν., 1997, Vasilaki και συν., 2002). Στο κουνέλι, ο sst1 υπότυπος εντοπίζεται σε βραχύινα κύτταρα που φέρουν ή όχι το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης, καθώς επίσης και σε εκτοπισμένα βραχύινα κύτταρα και στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων

(Cristiani και συν., 2000). Στον άνθρωπο ο υπότυπος αυτός εκφράζεται στο μελάγχρουν επιθήλιο, σε μεμβράνες των εξωτερικών και εσωτερικών τμημάτων των ραβδιοφόρων και των κωνιοφόρων κυττάρων, όπως επίσης και σε μεμονωμένα κύτταρα στην εξωτερική και εσωτερική πυρηνική στιβάδα αλλά και στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Van Hagen και συν., 2000, Klisovic και συν., 2001).

sst_{2A}

Η ἐκφραση του sst_{2A} υπότυπου των υποδοχέων της σωματοστατίνης με ανοσοϊστοχημικές μελέτες στο κουνέλι εντοπίζεται σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα (Johnson και συν., 1998, Vasilaki και συν., 2001) και σποραδικά σε ευρέως πεδίου βραχύινα κύτταρα στα όρια της εσωτερικής πυρηνικής και δικτυωτής στιβάδας (Johnson και συν., 1998). Σε αναπτυξιακές μελέτες, ο sst_{2A} εντοπίστηκε επίσης σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα και σε βραχύινα κύτταρα κάποια από τα οποία έφεραν το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης (Fontanesi και συν., 2000), ενώ τέλος εντοπίστηκε σε απομονωμένα δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα (Petrucci και συν., 2001).

Στον αρουραίο sst_{2A} ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται σε κωνιοφόρα και οριζόντια κύτταρα, καθώς επίσης και σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται τόσο με ραβδιοφόρα όσο και με κωνιοφόρα κύτταρα και σε μεσαίου και μεγάλου μεγέθους βραχύινα κύτταρα που περιέχουν την υδροξυλάση της τυροσίνης (Johnson και συν., 1999). Σε άλλες μελέτες, με διαφορετικά αντισώματα, οι sst_{2A} υπότυποι εντοπίστηκαν σε μεγάλου μεγέθους βραχύινα κύτταρα της εσωτερικής πυρηνικής στιβάδας που περιέχουν υδροξυλάση της τυροσίνης, στα εσωτερικά τμήματα των κωνιοφόρων κυττάρων και σε ίνες κυττάρων Müller (Helboe και Møller, 1999), όπως και σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα (Vasilaki και συν., 2001).

Στο ποντίκι sst24 ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται επίσης σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα, αλλά και σε οριζόντια κύτταρα και βραχύινα κύτταρα που περιέχουν υδροξυλάση της τυροσίνης και γλυκίνη (Cristiani και συν., 2002).

Στον άνθρωπο sst₂ ανοσοδραστικότητα παρουσιάζεται στην εσωτερική και εξωτερική πυρηνική αλλά και τη δικτυωτή στιβάδα, όπως και το μελάγχρουν

επιθήλιο (van Hagen και συν., 2000). Επίσης, η sst₂ ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται στα εσωτερικά και εξωτερικά τμήματα των ραβδιοφόρων και κωνιοφόρων κυττάρων, σε μεμονωμένα κύτταρα στην εξωτερική και εσωτερική πυρηνική στιβάδα, αλλά και στη γαγγλιακή στιβάδα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη μεμονωμένων κυττάρων σε καλλιέργεια από μελάγχρουν επιθήλιο (Klisovic και συν., 2001). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω μελέτη έχει μια αμινοξική αλληλουχία που είναι η ίδια και για τους sst_{2A} αλλά και για τους sst_{2B} οπότε μπορεί να υποτεθεί η ύπαρξη και των δύο υποτύπων υποδοχέων στα παραπάνω κύτταρα.

Στα κατώτερα σπονδυλωτά ο sst₂ υπότυπος εντοπίζεται στα κωνιοφόρα και ραβδιοφόρα κύτταρα, στα δίπολα και στα βραχύινα κύτταρα στην εξωτερική και εσωτερική δικτυωτή στιβάδα και διάχυτα στη γαγγλιακή στιβάδα αμφιβληστροειδή σαλαμάνδρας (Akopian και συν., 2000), ενώ στην αμφίβια σαλαμάνδρα εμφανίζεται στα δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα, στα εσωτερικά τμήματα των κωνιοφόρων και το συνδετικό κροσσό των ραβδίων (Grigoryan και συν, 2003).

sst_{2B}

Αντίθετα με τον sst_{2A} υπότυπο των σωματοστατινεργικών υποδοχέων δεν υπάρχουν πολλές αναφορές για τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό του sst_{2B} υπότυπου. Μόνο σε φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδή αρουραίου έχει εντοπιστεί (Vasilaki και συν., 2001), καθώς επίσης και σε καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπινου μελάγχρουν επιθηλίου (Vasilaki και συν., 2004).

sst3

Στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών δεν έχει εντοπιστεί ο sst³ υπότυπος παρόλη την ύπαρξη του αγγελιοφόρου RNA στον αρουραίο και τον άνθρωπο (Mori και συν., 1997, van Hagen και συν., 2000). Σε κατώτερα όμως σπονδυλωτά όπως η αμφίβια σαλαμάνδρα παρατηρήθηκε sst³ ανοσοδραστικότητα κυρίως στα εσωτερικά τμήματα των κωνιοφόρων και τους συνδετικούς κροσσούς των ραβδιοφόρων (Grigoryan και συν, 2003).

sst4

Η ἐκφραση του sst4 υπότυπου στον αμφιβληστροειδή αρουραίου εμφανίζεται στα κυτταρικά σώματα, τους δενδρίτες και τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων (Vasilaki και συν., 2002), ενώ στο ποντίκι εντοπίζεται σε κύτταρα της γαγγλιακής στιβάδας που φέρουν ή όχι την ασβεστοδεσμευτική πρωτεΐνη (Cristiani και συν., 2002). Επίσης, σε αμφιβληστροειδή αρουραίου και ποντικιού εντοπίζεται σε πολλαπλές διαστρωματώσεις των γαγγλιακών κυττάρων και σε αποφύσεις σε όλες τις υποστιβάδες της εσωτερικής δικτυωτής στιβάδας (Brecha και συν., 2002).

sst5

Η ανοσοδραστικότητα του sst₅ υπότυπου έχει εντοπισθεί μόνο σε καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπινου μελάγχρουν επιθηλίου (Vasilaki και συν., 2004) παρόλο που το mRNA του υπότυπου αυτού φαίνεται να εκφράζεται, έστω και σε χαμηλά επίπεδα, στον αμφιβληστροειδή αρουραίου και ποντικιού (Mori και συν., 1997, Cristiani και συν., 2002). Πρόσφατα, οι Ke και Zhong εντόπισαν την έκφραση του sst₅ υποτύπου σε χολινεργικά, ντοπαμινεργικά και GABAεργικά βραχύινα κύτταρα στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Ke και Zhong, 2007).

1.4.12 Ρόλος της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή

Η σωματοστατίνη στον αμφιβληστροειδή φαίνεται να δρα σαν νευροδιαβιβαστής, νευροτροποιητής ή τροφικός παράγοντας. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η σωματοστατίνη επηρεάζει την κυτταρική δραστηριότητα και τη νευρωνική απελευθέρωση στους φωτοϋποδοχείς αλλά και στον έσω αμφιβληστροειδή ρυθμίζοντας τα κανάλια ιόντων καλίου και ασβεστίου (Akopian και συν., 2000, Ayoub και Matthews, 1992, Johnson και συν., 2001). Η δράση αυτή της σωματοστατίνης έχει διαπιστωθεί σε απομονωμένα δίπολα κύτταρα και διαμεσολαβείται από τους sst₂ υποδοχέων (Petrucci και συν., 2001), οι οποίοι παρουσιάζονται επίσης υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, σε

αμφιβληστροειδή με έλλειψη sst₂ υποδοχέων η σωματοστατίνη και ο αγωνιστής έναντι των sst₂ υποδοχέων οκτρεοτίδη, δεν επηρέασαν την απελευθέρωση του γλουταμινικού (Dal Monte και συν., 2003a). Αντίθετα, σε αμφιβληστροειδή ποντικιών με έλλειψη των sst₁ υποδοχέων, όπου υπερεκφράζονται οι sst₂ υποδοχείς, παρατηρήθηκε αύξηση της αναστολής της επαγόμενης από τη σωματοστατίνη απελευθέρωσης του γλουταμινικού (Bigiani και συν., 2004).

Επίσης βρέθηκε ότι η σωματοστατίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει διεγερτικές δράσεις στα γαγγλιακά κύτταρα, ενώ επηρεάζει τη δραστηριότητα των δίπολων και βραχύινων κυττάρων και του δικτύου των οριζόντιων κυττάρων (Zalutsky και Miller, 1990).

Το σωματοστατινεργικό σύστημα παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού των ραβδιοφόρων κυττάρων, αλληλεπιδρώντας με άλλους νευροτροποποιητές κατά τη διαδικασία προσαρμογής στο φωτός. Μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της εξωκυττάριας ντοπαμίνης αυξάνονται στον αμφιβληστροειδή καθώς αυξάνεται η ένταση του φωτός (Djamgoz και Wagner, 1992, Boelen και συν., 1998) και ρυθμίζονται μέσω της αλληλεπίδρασης της σωματοστατίνης και της ουσίας P (Casini και συν., 2002). Τόσο οι υποδοχείς σωματοστατίνης όσο και της ουσίας Ρ εκφράζονται σε βραχύινα κύτταρα που περιέχουν ντοπαμίνη (Casini και συν., 1997, 2002, Helboe каі Møller, 1999, Johnson каі συν., 1999, Cristiani каі συν., 2000, 2002, Catalani και συν., 2004). Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η σωματοστατίνη μέσω ενεργοποίησης των sst1 και sst2 υποδοχέων αυξάνει τα επίπεδα της ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Κουνίαι και συν., 2006). Με δεδομένο ότι η σωματοστατίνη δρα στον αμφιβληστροειδή του κοτόπουλου ως σήμα σκότους (Ishimoto και συν., 1986, Yang και συν., 1997) και ότι η ουσία Ρ προκαλεί απελευθέρωση της ντοπαμίνης (Casini και συν., 2004) πιθανότατα δρώντας ως σήμα φωτός, μπορούμε να εικάσουμε ότι η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων αυτών θα μπορούσε να ρυθμίσει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης και κατά συνέπεια την προσαρμογή στο φως.

1.5 ΚΟΡΤΙΣΤΑΤΙΝΗ

Η κορτιστατίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο συγγενές με τη σωματοστατίνη. Το πεπτίδιο αυτό ανακαλύφθηκε και ονομάστηκε έτσι τόσο λόγω της ευρείας κατανομής του στον εγκεφαλικό φλοιό, όσο και της ικανότητάς του να καταστέλλει τη δραστηριότητα σε αυτόν (de Lecea και συν., 1996). Παρόλο που η κορτιστατίνη-14 μοιράζεται τα έντεκα από τα δεκατέσσερα αμινοξέα με τη σωματοστατίνη-14, η νουκλεοτιδική της αλληλουχία και ο χρωμοσωμικός της εντοπισμός υποδηλώνουν ότι είναι το προϊόν ενός ξεχωριστού γονιδίου. Η κορτιστατίνη δεσμεύεται σε όλους τους υπότυπους των σωματοστατινεργικών υποδοχέων και μιμείται πολλές από τις φαρμακολογικές και λειτουργικές ιδιότητες της σωματοστατίνης (Siehler και συν., 1998).

1.5.1 Ανακάλυψη της κορτιστατίνης

Μόλις το 1996 η ομάδα του de Lecea κατάφερε να απομονώσει το cDNA που κωδικοποιεί έva πολυπεπτίδιο 112 αμινοξἑων, тην προπροκορτιστατίνη (preproCST) από τον εγκέφαλο αρουραίο (de Lecea και συν., 1996). Η προπροκορτιστατίνη η οποία έχει εντυπωσιακή ομοιότητα με την προπροσωματοστατίνη στο καρβοξυ-τελικό άκρο της και μεταβολίζεται στην προορμόνη προκορτιστατίνη (proCST). Η προκορτιστατίνη του αρουραίου και του ανθρώπου έχει τρεις διβασικές χαρακτηριστικές θέσεις πρωτεόλυσης, ενώ του ποντικού δύο, μία διβασική και μία μονοβασική. Από την πέψη των προορμονών αυτών προκύπτουν οι: κορτιστατίνη-17 (rCST-17), κορτιστατίνη-31(rCST-31), кортиотатivn-29(rCST-29) как кортиотаtivn-14(rCST-14) уна точ ароираю, кортиотатіvn-44(mCST-44) как кортиотатіvn-14(mCST-14) ука то ποντίκι, κορτιστατίνη-21 (hCST-21), κορτιστατίνη-31 (hCST-31), κορτιστατίνη-29(hCST-29) και κορτιστατίνη-17(hCST-17) για τον άνθρωπο (de Lecea και συν., 1996, Fukusumi και συν., 1997) (Εικόνα 8).



Τροποποίηση από Spier and de Lecea, 2000

Εικόνα – 8: Σχηματική αναπαράσταση της προ-κορτιστατίνης και των προϊόντων της στα θηλαστικά.

Οι παραπάνω μορφές περιλαμβάνουν το τετραμερές FWKT το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση της σωματοστατίνης στους υποδοχείς της (Siehler και συν., 1998), καθώς και κυστεΐνες που επιτρέπουν στο πεπτίδιο να κυκλοποιείται (Εικόνα 9).

Παρόλο που οι ομοιότητες με τη σωματοστατίνη είναι φανερές, το νέο αυτό πεπτίδιο είναι ξεχωριστό από τη σωματοστατίνη, αφού α) η σειρά των πεπτιδίων στα δεκατετραμερή τους πεπτίδια διαφέρουν κατά ένα κατάλοιπο μια και το πεπτίδιο της κορτιστατίνης ξεκινά από το κατάλοιπο 2 της σωματοστατίνης, β) οι αλληλουχίες των cDNA των δύο πεπτιδίων δεν παρουσιάζουν ομολογία με εξαίρεση την περιοχή που κωδικοποιεί τα δεκατετραμερή, και γ) στο ποντίκι, το γονίδιο της κορτιστατίνης εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 4, ενώ της σωματοστατίνης στο χρωμόσωμα 16 (de Lecea και συν., 1997).



Τροποποίηση από Spier and de Lecea, 2000

Εικόνα – 9: Σχηματική αναπαράσταση της σωματοστατίνης και της κορτιστατίνης των θηλαστικών. Οι κυστέινες επιτρέπουν στα μόρια να κυκλοποιούνται, ενώ η κοινή θέση δέσμευσης των πεπτιδίων οριοθετείται από το πορτοκαλί περίγραμμα.

1.5.2 Περιοχές έκφρασης και απελευθέρωσης κορτιστατίνης

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, το mRNA της κορτιστατίνης εντοπίζεται με in situ υβριδοποίηση στον εγκεφαλικό φλοιό και στον ιππόκαμπο (de Lecea και συν., 1996), σε πολύ μικρές ποσότητες στο ραβδωτό και στον οσφρητικό βολβό αρουραίου, ενώ μόνο στον εγκέφαλο ποντικού εντοπίζεται σε μικρότερες ποσότητες στην αμυγδαλή και στον υποθάλαμο, σε αντίθεση με τη σωματοστατίνη που εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στις δύο αυτές περιοχές (Spier και de Lecea, 2000). Μελέτες συνεντοπισμού έδειξαν ότι η κορτιστατίνη εκφράζεται αποκλειστικά σε GABAεργικούς ενδονευρώνες, διαφορετικούς από αυτούς στους οποίους εκφράζεται η σωματοστατίνη, καθώς και σε κύτταρα θετικά στις ασβεστο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες καλβιδίνη και παραλβουμίνη, του φλοιού και του ιππόκαμπου (de Lecea και συν., 1997).

Το mRNA της κορτιστατίνης εκφράζεται επίσης και σε περιφερικούς ιστούς όπως το πάγκρεας, ο γαστρεντερικός σωλήνας, το συκώτι, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι πνεύμονες και ο θυρεοειδής αδένας (Dalm και συν., 2004).

1.5.3 Δράσεις της κορτιστατίνης

Η κορτιστατίνη φαίνεται να αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της διαδικασίας του ύπνου, μια και η έκφραση του mRNA της ακολουθεί ένα κιρκάδιο ρυθμό και αυξάνεται κατά την απώλεια του ύπνου. Παράλληλα, το πεπτίδιο αυτό ανταγωνίζεται τις δράσεις της ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο και στο φλοιό και σχετίζεται με την κινητική συμπεριφορά (de Lecea και συν., 1996). Η κορτιστατίνη φαίνεται επίσης να εμπλέκεται σε διαδικασίες μνήμης τόσο σε ποντίκια όσο και σε αρουραίους, επιδεινώνοντας τη μνήμη μέσω απορρύθμισης του σχηματισμού του cAMP σε νευρώνες του ιππόκαμπου (Flood και συν., 1997, Sánchez-Alavez και συν., 2000). Πρόσφατες μελέτες προσδίδουν στην κορτιστατίνη ένα νευροπροστατευτικό ρόλο από την προκαλούμενη με το καϊνικό οξύ διεγερτοξικότητα σε εγκέφαλο αρουραίου (Braun και συν., 1998), καθώς και ένα ρόλο ρυθμιστή, μια και φαίνεται να αναστέλλει τη βασική έκκριση της ινσουλίνης (Broglio και συν., 2002).

1.5.4 Υποδοχείς κορτιστατίνης

Όπως προαναφέρθηκε, η κορτιστατίνη δεσμεύεται σε όλους τους υπότυπους των σωματοστατινεργικών υποδοχέων. Ωστόσο, οι διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες της κορτιστατίνης σε σχέση με αυτές της σωματοστατίνης, υποδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη εκλεκτικών για την κορτιστατίνη υποδοχέων (Spier and de Lecea, 2000). Πράγματι, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας υποδοχέας που ονομάζεται MrgX2 (Mas related gene X2) και έχει υψηλή συγγένεια για την κορτιστατίνη-14 *in vitro* (Robas και συν., 2003). Ο MrgX2 ανήκει στους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες και αποτελεί μέλος μιας οικογένειας κωδικευμένων αλληλουχιών που σχετίζονται με το Mas1 ογκογονίδιο (Dong και συν., 2001).

Ο MrgX2 εντοπίστηκε σε διάφορες ποσότητες στο νωτιαίο μυελό, σε κάποιους νευρώνες του ιππόκαμπου, στον υποθάλαμο, στο θυρεοειδή, στην υπόφυση, στο πάγκρεας, στους πνεύμονες, στους όρχεις, στις ωοθήκες και

στο γαστρεντερικό σωλήνα αλλά όχι στον εγκεφαλικό φλοιό όπου εκφράζεται κυρίως η κορτιστατίνη (Robas και συν., 2003, Allia και συν., 2005).

Ο MrgX2 δεν ενεργοποιείται μόνο από την κορτιστατίνη αλλά και από δυο ακόμη πεπτίδια τα PAMP-12 και PAMP-20 (proadrenomedullin N-terminal peptides) (Kamohara και συν., 2005). Η κορτιστατίνη και τα PAMP πιθανότατα δεσμεύονται στον MrgX2 στην ίδια θέση λόγω ενός κοινού δομικού μοτίβου και είναι δυνατό να δεσμεύονται ανταγωνιστικά το ένα σε σχέση με το άλλο (Nothacker και συν., 2005). Πάντως, κανένα από τα παραπάνω δεν ενεργοποιεί τον υποδοχέα *in vivo*.

1.6 ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΡΙΖΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ - ΝΟ

Η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (ΝΟ) είναι ένα αέριο, με χρόνο ημιζωής μερικών δευτερολέπτων, το οποίο διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη. Αρχικά, η ΝΟ αναγνωρίστηκε ως ο παραγόμενος από το ενδοθήλιο παράγοντας χάλασης (Endothelial-Derived Relaxation Factor, EDRF) των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, αλλά είναι πλέον γνωστό ότι δρα σαν αγγελιοφόρο μόριο σε διάφορα συστήματα (Furchgott και Zawadzki, 1980, Palmer και συν., 1987, Goldstein και συν., 1996). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η NO· δρα ως νευροδιαβιβαστής/νευροτροποποιητής (Bredt και Snyder, 1992), ενώ παράγεται τόσο σε νευρικά όσο και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ενδοθηλικά κύτταρα από το ένζυμο της συνθάσης της ΝΟ· με οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη παρουσία καλμοδουλίνης, της ανηγμένης μορφής του φωσφορικού νικοτιναμιδοαδενινο-δινουκλεοτιδίου (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate NADPH), 5,6,7,8 τετραυδροβιοπτερίνη (BH4), φλάβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD), φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FMN) και τετραϋδροβιοπτερίνης (Marletta, 1994, Dawson каі Snyder, 1994, Еіко́va 10).

Υπάρχουν τρεις ισομορφές της συνθάση της ΝΟ, ανάλογα με τον ιστό έκφρασής τους. Από αυτές, η νευρωνική (nNOS) και η ενδοθηλιακή (eNOS) ενεργοποιούνται με αύξηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας ασβέστιοκαλμοδουλίνης και παράγουν ΝΟ σε συγκέντρωση της τάξης των picomolar μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά, ενώ η ανοσολογική (iNOS) η οποία είναι

ανεξάρτητη του ασβεστίου και ενεργοποιείται παρουσία παραγόντων φλεγμονής όπως οι κυτοκίνες και οι λιποπολυσακχαρίτες παράγοντας NO σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (τάξη nanomolar) που μπορεί να παραμείνουν υψηλά ως και για αρκετές ημέρες (Hardy και συν., 2000).



Τροποποίηση από Dawson και Snyder, 1994

Εικόνα – 10: Η βιοσύνθεση της ΝΟ· από την αργινίνη συντελείται σε δύο στάδια. Η οξείδωση της L-αργινίνης σε Ν^ω-ύδροξυ-L-αργινίνη αποτελεί το πρώτο στάδιο, ενώ η μετατροπή της σε Lκιτρουλίνη και ΝΟ· αποτελεί το δεύτερο.

1.6.1 ΝΟ και αμφιβληστροειδής

Με τη χρήση της ιστοχημικής χρώσης της NADPH-διαφοράσης, η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της παρουσίας όλων των ισομορφών της συνθάσης της NO· στον ιστό, πιστοποιήθηκε η παρουσία της NOS σε όλο το οπτικό σύστημα (Vincent και Hope, 1992). Η NOS έχει εντοπιστεί σε όλους τους τύπους νευρώνων του αμφιβληστροειδή (βραχύινα, δίπολα, οριζόντια φωτοϋποδοχείς και γαγγλιακά κύτταρα), σε νευρικές ίνες της εξωτερικής και εσωτερικής δικτυωτής στιβάδας του καθώς επίσης και στο μελάγχρουν επιθήλιο και τον χοριοειδή χιτώνα (Bredt και συν., 1990, Goureau και συν., 1993, Yamamoto και συν., 1993, Koistinaho και συν., 1993, Hardy και συν., 2000, Haverkamp και συν., 2000). Σε ότι αφορά τις διάφορες ισομορφές του ενζύμου, η νευρωνική NOS συντίθεται από μια πλειάδα νευρώνων, η ενδοθηλιακή NOS σε αγγεία και η ανοσολογική σε χαμηλά επίπεδα σε κύτταρα Müller και στο μελάγχρουν επιθήλιο (López-Costa και συν., 1997, Shin και συν., 1999, Cheon και συν., 2003).

Η ΝΟ· δεσμεύεται σε μία διαλυτή μορφή της γουανυλικής κυκλάσης (sGC), η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή cGMP στα δίπολα κύτταρα. Η δέσμευση της NO. στην sGC οδηγεί στην ενεργοποίηση της τελευταίας με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της cGMP, μορίου κλειδιού στη μεταβίβαση της οπτικής πληροφορίας (Shiells & Falk, 1992, Ahmad και Barnstable, 1993, Koistinaho & Sagar, 1995, Blute και συν., 1998). Η cGMP με τη σειρά της, ρυθμίζει τις χασματοσυνδέσεις μεταξύ των δίπολων κυττάρων φωτεινού πεδίου που σχετίζονται με τα κωνιοφόρα κύτταρα και των All βραχύινων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή κουνελιού αλλά και τις χασματοσυνδέσεις μεταξύ των οριζόντιων κυττάρων (De Vries και Swartz, 1989, Mills και Massey, 1995, Xin και Bloomfield, 1999). Η NO·επηρεάζει πιθανόν και τη συναπτική μεταβίβαση από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα κύτταρα σκοτεινού κέντρου που σχετίζονται με τα κωνιοφόρα κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη ντοπαμίνη (Maguire και Werblin, 1994), η απελευθέρωση της οποίας φαίνεται να ρυθμίζεται από την NO. (Bugnon και συν., 1994, Djamgoz каι συν., 1995).

1.6.2 ΝΟ και σωματοστατίνη

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η NOS φαίνεται να συνυπάρχει στον αμφιβληστροειδή με τους sst₂ σωματοστατινεργικούς υποδοχείς, αφού η χρώση της NADPH-διαφοράσης συνεντοπίστηκε με τους sst_{2A} υποδοχείς στα δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα του κουνελιού και του αρουραίου, αλλά και με τους sst_{2B} στους φωτοϋποδοχείς αρουραίου (Vasilaki και συν., 2001). Επιπλέον, η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα των μεταβολιτών της NO· μέσω των sst₂ σωματοστατινεργικών υποδοχέων τόσο στον αμφιβληστροειδή όσο και σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων μελάγχρουν επιθηλίου (Vasilaki και συν., 2002, 2004), και φαίνεται να παίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της NO·/cGMP.

1.7 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΕΣ

Σύμφωνα με τα ως τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι διάφορα σωματοστατινεργικά ανάλογα έχουν πιθανή θεραπευτική δράση κατά της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, της εξοίδησης της ωχράς κηλίδας και της νεοαγείωσης του αμφιβληστροειδή οι οποίες αποτελούν σημαντικές κλινικές παραμέτρους ασθενειών όπως η διαβητική αμφιβληστοειδοπάθεια, η απόφραξη της αμφιβληστροειδικής αρτηρίας, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και το γλαύκωμα.

1.7.1 Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Στις αρχές της δεκαετίας του '90 τα ανάλογα της σωματοστατίνης χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τη χρήση της φωτοπηξίας σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροπάθειας. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα προέκυψαν από κλινικές μελέτες οι οποίες εστιάστηκαν στη χρήση σωματοστατινεργικών αναλόγων για τη θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και πιο συγκεκριμένα της πολλαπλασιαστικής διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας [Proliferative Diabetic Retinopathy (PDR)] (Kirkegaard και συν., 1990, McCombe και συν., 1991). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών σε συνδυασμό τόσο με την έκφραση των sst2A υποδοχέων στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία (van Hagen και συν., 2000), όσο και με μελέτες οι οποίες υπέδειξαν ότι, η αμφιβληστροειδική φωτοπηξία σε ασθενείς με πολλαπλασιαστική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια δεν ήταν αρκετή για την ενδοφθάλμια μείωση των αυξητικών παραγόντων τύπου-ινσουλίνης [insulinlike growth factors' (IGFs)] που προέρχονται από την κυκλοφορία (Spranger και συν., 2000, 2001), υποδηλώνουν ότι τα σωματοστατινεργικά ανάλογα μπορεί να έχουν τόσο άμεση δράση στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και έμμεση, μέσω της μείωσης της αυξητικής ορμόνης. Κατά συνέπεια, η αμφιβληστροειδική φωτοπηξία θα μπορούσε να συνδυαστεί με σωματοστατινεργικά φάρμακα για την αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης, την πρόληψη περαιτέρω έκπτωσης της οπτικής οξύτητας σε ασθενείς με πολλαπλασιαστικής διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Το

σωματοστατινεργικό ανάλογο οκτρεοτίδη, προκάλεσε επιβράδυνση της εξέλιξης της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Pawlikowski και Melen-Mucha, 2003, Gargiulo και συν., 2004).

1.7.2 Νεοαγγείωση

Μελέτες σε ζώα και χρήση του μοντέλου της επαγόμενης από την ισχαιμία νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδή νεογνών, συνηγορούν υπέρ της έμμεσης ανασταλτικής δράσης του σωματοστατινεργικού αναλόγου ΜΚ678 στα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης με συνεπακόλουθη μείωση της σύνθεσης των IGF-I (Smith και συν., 1997). Σε παρόμοιες έρευνες, ανάλογα αποτελέσματα έδωσαν και δύο ακόμα σωματοστατινεργικά ανάλογα, η οκτρεοτίδη και το Wox4D (Higgins και συν., 2002). Επιπλέον, σε πρόσφατες κλινικές μελέτες η χρήση σωματοστατινεργικών αναλόγων κρίθηκε αναγκαία για την αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδή, μια και οι ουσίες αυτές φαίνεται ότι αναστέλλουν την έκκριση του VEGF και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (Grant και συν., 1993, Danesi και συν., 1997, Lawnicka και συν., 2000, García de la Torre και συν., 2002).

1.7.3 Η σωματοστατίνη ως νευροπροστατευτικός παράγοντας

Στο τέλος της δεκαετίας του 90, μελέτες στον εγκέφαλο υποστήριξαν ότι η σωματοστατίνη και τα εκλεκτικά για τον sst2 υπότυπό της ανάλογα προστάτευσαν νετρώνες του εγκεφαλικού φλοιού από διεγερτοτοξικότητα οφειλόμενη στα διεγερτικά αμινοξέα NMDA και καϊνικό οξύ (Forloni και συν., 1997, Braun και συν., 1998). Επίσης, η σωματοστατίνη και το sst_{2/5} ανάλογό της οκτρεοτίδη, προστάτεψαν νευρώνες του αμφιβληστροειδή σε μοντέλο αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης (Celiker και lihan, 2002). Οι μελέτες αυτές συνηγορούν υπέρ νευροπροστατευτικής δράσης της тων σωματοστατινεργικών αναλόγων στο κεντρικό νευρικό σύστημα και δίνουν το έναυσμα για την πραγματοποίηση επιπλέον μελετών με στόχο τη διαλεύκανση των μηχανισμών που υποστηρίζουν τη δράση τους ως νευροπροστατευτικά και τη χρησιμότητά τους σε νόσους του αμφιβληστροειδή.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα παραπάνω δεδομένα, κυρίως από μελέτες στον εγκέφαλο αλλά και τον αμφιβληστροειδή, υποστηρίζουν ότι η σωματοστατίνη και τα εκλεκτικά για τους υποδοχείς της ανάλογα παρουσιάζουν το φαρμακολογικό προφίλ ενός νευροπροστατευτικού φαρμάκου που δυνητικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη θεραπευτική αγωγή ασθενών που πάσχουν από σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν α) να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της σωματοστατίνης και της κορτιστατίνης στον αμφιβληστροειδή και β) να εξεταστεί η πιθανή νευροπροστατευτική τους δράση στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία.

Οι κύριοι στόχοι που τέθηκαν ήταν οι εξής:

- Ο προσδιορισμός του ρόλου των υποδοχεών sst1 και sst2 της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή
- Ο Η δημιουργία μοντέλου αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας σε αρουραίο
- Ο Η διερεύνηση της πιθανής δράσης της σωματοστατίνης, των εκλεκτικών για τους διάφορους υπότυπους των υποδοχέων της αναλόγων και της κορτιστατίνης ως νευροπροστατευτικά στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία
- Ο Η μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην πιθανή
 νευροπροστατευτική δράση των σωματοστατινεργικών αναλόγων

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι θηλυκοί Sprague Dawley αρουραίοι, βάρους 250-300 γρ. Τα ζώα διατηρήθηκαν σε κλουβιά με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Τηρήθηκε κύκλος ημέρας-νύχτας 12 ωρών.

Τα πειραματόζωα θανατώθηκαν με εισπνοή διαιθυλαιθέρα κατά την παραμονή τους σε κλειστό θάλαμο για 10 περίπου λεπτά. Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματόζωων ήταν σύμφωνες με την ελληνική νομοθεσία (Π.Δ.160/91).

Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την Sigma - Aldrich. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν υλικά από άλλες εταιρίες, αναγράφεται στις παρενθέσεις δίπλα τους.

3.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SST1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Για τη διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου των ssti υποδοχέων πραγματοποιήθηκαν μελέτες προσδιορισμού των επιπέδων σωματοστατίνης σε ex vivo ιστοκαλλιέργειες αμφιβληστροειδή αρουραίου.

Οι οφθαλμοί αμέσως μετά την εξαγωγή τους από το ζώο τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό (M-199, Gibco) το οποίο περιείχε βακιτρακίνη 1mg/ml. Ο πρόσθιος πόλος τους απομακρύνθηκε, ενώ από τον οπίσθιο πόλο, ο αμφιβληστροειδής αποχωρίστηκε από τον σκληρό χιτώνα μετά από απόξεσή του με σπάτουλα.

3.1.1 Μελέτη της νευρωνικής απελευθέρωσης της σωματοστατίνης

Για να εξεταστεί αν η απελευθέρωση της σωματοστατίνης είναι νευρωνικής μορφής, μελετήθηκε η κάλιο- και ασβέστιο- εξαρτημένη απελευθέρωσή της. Κάθε αμφιβληστροειδής τοποθετήθηκε σε θρεπτικό υλικό (500μl) στους 37°C για 1 ώρα σε 5% CO₂/95% αέρα. Στη συνέχεια ο ιστός επωάστηκε για δεύτερη φορά σε θρεπτικό υλικό (500μl) (δείγματα μάρτυρες) ή σε θρεπτικό υλικό (500μl) παρουσία KCI (50, 100mM) ή EGTA (10mM) στους 37°C για 1 ώρα σε 5% CO₂/95% αέρα.

3.1.2 Μελέτη της ενεργοποίησης του υποδοχέα sst1 στην απελευθέρωση σωματοστατίνης

Για να διερευνηθεί ο ρόλος του sst1 υπότυπου ως αυτοϋποδοχέα απαιτούνται λειτουργικές μελέτες που να δείχνουν ότι η ενεργοποίησή του μειώνει τα επίπεδα της σωματοστατίνης. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε ο sst1 εκλεκτικός αγωνιστής CH 275.

Οι αμφιβληστροειδείς επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό (500μl) που περιείχε το CH 275 (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M) στους 37°C για 1 ώρα σε 5% CO₂/95% αέρα.

Για να διαπιστωθεί η φαρμακολογική εκλεκτικότητα του αναλόγου, έγινε επώαση του ιστού σε θρεπτικό υλικό (500μl) που περιείχε τον sst1 ανταγωνιστή, NVP-SRA 880 (10-5M) και έπειτα σε θρεπτικό υλικό (500μl) που περιείχε CH 275 (10-5M). Επίσης ιστός επωάστηκε σε θρεπτικό υλικό (500μl) που περιείχε μόνο NVP-SRA 880 (10-5M). O sst2 εκλεκτικός αγωνιστής MK 678 (10-5, 10-6, 10-7M) χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβωθεί αν η ενεργοποίηση του sst2 υποδοχέα επηρεάζει την απελευθέρωση της σωματοστατίνης. Όλες οι επωάσεις έγιναν στους 37°C για 1 ώρα σε 5% CO₂/95% αέρα, ενώ το CH 275, το NVP-SRA 880 και το MK 678 ήταν μια συνεισφορά του Dr Hoyer.

Μετά το τέλος των επωάσεων έγινε συλλογή του θρεπτικού υλικού που περιείχε τους αμφιβληστροειδείς. Το θρεπτικό υλικό φυγοκεντρήθηκε (Biofuge

15, Heraeus, Sepatech) για 15 λεπτά στις 12000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης απορρίφθηκε και στο ίζημα προστέθηκε οξικό οξύ (2Ν, 300μl) και εμβυθίστηκε για 10 λεπτά σε νερό στους 100°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα ηχοβολήθηκαν, κρατήθηκαν 50μl από το καθένα στους -20°C για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και τα υπόλοιπα φυλάχτηκαν στους -80°C για 24-48 ώρες. Έπειτα τα δείγματα αποψύχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 13000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C. Το υπερκείμενο του κάθε δείγματος μοιράστηκε σε διπλέτες των 100μl, λυοφιλοποιήθηκε και φυλάχτηκε στους -80°C μέχρι τον προσδιορισμό των επιπέδων σωματοστατίνης με ραδιοανοσολογική τεχνική (RIA).

3.1.3 Προσδιορισμός επιπέδων σωματοστατίνης με ραδιοανοσολογική τεχνική (RadioImmunoAssay)

Η τεχνική της ραδιοανοσοανάλυσης βασίζεται στην αντίδραση:

 $[S] + [S^*] + [Ab] \leftrightarrow AbS] + [AbS^*] + [S'] + [S^{*'}]$

- [S]: Συγκέντρωση ελεύθερης σωματοστατίνης
- [S*]: Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης πριν την αντίδραση
- [Ab]: Συγκέντρωση ελεύθερου αντισώματος πριν την αντίδραση
- [AbS]: Συγκέντρωση συμπλόκου αντισώματος-μη ραδιοσημασμένης ουσίας
- [AbS*]: Συγκέντρωση συμπλόκου αντισώματος-ραδιοσημασμένης ουσίας
- [S']: Συγκέντρωση ελεύθερης μη ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης μετά την αντίδραση
- [S*']: Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης μετά την αντίδραση

Μετά την αντίδραση, προστίθεται διάλυμα ενεργού άνθρακα/δεξτράνης (Pharmacia), οπότε γίνεται κατακρήμνιση της ελεύθερης ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης S*' και διαχωρισμός της από αυτή που έχει προσδεθεί στο αντίσωμα της σωματοστατίνης AbS*, η οποία και μετριέται σε μετρητή γακτινοβολίας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κρούσεων, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου αντισώματοςραδιοσημασμένης σωματοστατίνης, τόσο μικρότερη η συγκέντρωση του συμπλόκου αντισώματος-σωματοστατίνης και επομένως τόσο μικρότερη η αρχική συγκέντρωση της σωματοστατίνης. Έτσι προσδιορίζεται έμμεσα η αρχική συγκέντρωση της σωματοστατίνης.

Για τις μελέτες αυτές κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με χρήση διαλυμάτων σωματοστατίνης σε R.I.A. buffer I (0,15M NaCl, 0,1% ζελατίνη, 0,1% BSA, 0,02% βακιτρακίνη, 0,02% NaN₃ / 0,1 M NaNa₂) (NaNa₂: Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄) και σε συγκεντρώσεις: 200pgr/100μl, 150pgr/100μl, 100pgr/100μl, 50 pgr/100μl, 25 pgr/100μl, 12,5pgr/100μl, 6,25pgr/100μl, 3,125pgr/100μl, 1,56pgr/100μl, 0,78pgr/100μl και 0pgr/100μl.

σωληνάρια πολυστυρενίου 55Χ12 χιλιοστών, Σε ΣI3 διπλούν, προστέθηκαν100μΙ από τα παραπάνω δείγματα της πρότυπης καμπύλης ή δείγμα που επαναδιαλυτοποιήθηκε με 100μl R.I.A. buffer I. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μΙ διαλύματος ραδιενεργής σωματοστατίνης [125]-Tyr11-SRIF-14 (Amersham) που περιείχαν περίπου 20000 κρούσεις ανά λεπτό(cpm), 100μl αντισώματος σωματοστατίνης (συνεισφορά του Dr Sperk) σε συγκέντρωση 1/3000 και R.I.A. buffer Ι έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υγρού επώασης να είναι 500μl. Το μίγμα επωάστηκε για 24 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε δείγμα από 900μΙ διαλύματος 2,5% ενεργού άνθρακα/0,25% δεξτράνης σε R.I.A. buffer II (0,15M NaCl, 0,1% BSA, 0,02% βακιτρακίνη, 0,02% NaN₃ / 0,1 M NaNa₂), φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στους 4°C στις 3000 στροφές ανά λεπτό. 700μΙ από το υπερκείμενο του κάθε δείγματος μετρήθηκε σε μετρητή γακτινοβολίας (LKB-Wallak MiniGamma 1275, απόδοσης 75%).

Η ανάλυση των μετρήσεων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος GraphPad Prism 2.01. Σχεδιάστηκαν σιγμοειδείς καμπύλες με συντεταγμένες: στον άξονα των x, τις λογαριθμικές τιμές των συγκεντρώσεων της μη ραδιοσημασμένης ουσίας (log [M], λογάριθμος της συγκέντρωσης σε molar) και στον άξονα των y, τις τιμές των κρούσεων ανά λεπτό του συμπλόκου του αντισώματος με τη ραδιοσημασμένη σωματοστατίνη.

3.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ cGMP

3.2.1 Επίδραση σωματοστατίνης και αναλόγων στα επίπεδα cGMP στον αμφιβληστροειδή

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της σωματοστατίνης, αναλόγων της, αλλά και της ΝΟ· στα επίπεδα της cGMP διενεργήθηκαν μελέτες προσδιορισμού των επιπέδων της cGMP με την τεχνική της ενζυμικής ανοσοανάλυσης (ELISA). Η μέθοδος βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της ελεύθερης cGMP και ενός συμπλόκου cGMP – ακετυλοχολινεστεράσης (cGMP-AchE), που ονομάζεται cGMP tracer, για περιορισμένο αριθμό θέσεων αντισώματος κουνελιού που είναι ειδικό για τη cGMP (Εικόνα 11).

Σε επιστρωμένη πλάκα με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικιού ενάντια σε κουνέλι (A) προστίθενται σταθερή ποσότητα cGMP-AchE και αντισώματος ανεπτυγμένου σε κουνέλι ενάντια στη cGMP, καθώς και δείγμα γνωστής και άγνωστης συγκέντρωσης cGMP (B), οπότε να λαμβάνει χώρα η αντίδραση:

cGMP-AchE + Avriowua + cGMP-->Avriowua-cGMP-AchE + Avriowua-cGMP

Τα σύμπλοκα αυτά προσδένονται στο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικιού με το οποίο είναι επιστρωμένη η πλάκα. Ξεπλένουμε ώστε να απομακρυνθούν όλα τα αδέσμευτα αντιδραστήρια (Γ) και προσθέτουμε αντιδραστήριο Ellman's το οποίο καταλύεται από την AchE και δίνει ένα προϊόν με διακριτό κίτρινο χρώμα (Δ) που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 412nm.



Εικόνα – 11: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της ενζυμικής ανοσοανάλυσης. μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια σε κουνέλι ανεπτυγμένο σε ποντίκι. GMP ανεπτυγμένο σε κουνέλι • : cGMP. • :σύμπλοκο AchE – cGMP.

Μετά την θανάτωση των ζώων αφαιρέθηκαν τα μάτια και τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (0,1M PBS) που περιείχε φαινυλμεθυλσουλφονυλφλορίδιο (PMSF, 0,1mM) και λευπεπτίνη (1µg/ml) (αναστολείς πρωτεασών), καθώς και 3-ισοβουτυλ-1-μεθυλξανθίνη (IBMX, 1mM), του μη ειδικού αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης – Διάλυμα Ι. Απομακρύνθηκε ο πρόσθιος πόλος των ματιών, ο φακός και το υαλώδες. Ο αμφιβληστροειδής αποκολλήθηκε μηχανικά και τοποθετήθηκε σε διάλυμα Ι, ενώ ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε υδατόλουτρο στους 25°C υπό ήπια ανάδευση.

3.2.1.1 Μελέτη της δράσης της αργινίνης και των σωματοστατινεργικών αναλόγων στα επίπεδα της cGMP

Για να εξεταστεί η δράση της αργινίνης και των σωματοστατινεργικών αναλόγων στα επίπεδα της cGMP, οι ιστοί επωάστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C υπό ήπια ανάδευση με Διάλυμα Ι που περιείχε αργινίνη (250μΜ), ή σωματοστατίνη (0,01-10μΜ), ή τον sst₂ εκλεκτικό αγωνιστή BIM23014 (0,01-10μΜ), ή το sst₃ εκλεκτικό αγωνιστή L-796,778 (10μΜ, Merck), ή σωματοστατίνη (0,1μΜ) σε συνδυασμό με το sst₂ ανταγωνιστή CYN154806 (1μΜ). Μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα του μη εκλεκτικού αναστολέα της συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου NMMA (250μΜ), να αναστέλλει την επίδραση της σωματοστατίνης (0,1μΜ) στα επίπεδα της ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε μόνο τους αναστολείς πρωτεασών και της φωσφοδιεστεράσης.

Ακολούθησε συλλογή των ιστών σε PB (50mM, 300µl) ομογενοποίηση των ιστών, ενώ από το ομογενοποίημα κρατήθηκαν 50µl στους -20°C για να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη τριχλωρο-οξικού οξέος (TCA, 10% κ.ο.) και φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C. Στο υπερκείμενο έγιναν πέντε εκχυλίσεις με πενταπλάσιο όγκο αιθέρα, ενώ τα ίχνη αυτού απομακρύνθηκαν με θέρμανση των δειγμάτων σε νερό (70°C) για πέντε περίπου λεπτά. Τα δείγματα φυλάχτηκαν στους -80°C.

Για τις μετρήσεις των επιπέδων της cGMP με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το κιτ ACE™ EIAs (Cayman Chemical) και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της εταιρίας.

3.2.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του ομογενοποιήματος, το οποίο προκύπτει κατά τη διαδικασία λήψης των μεμβρανικών παρασκευασμάτων αμφιβληστροειδή, προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η χρωστική Coomanssie Blue G-250 (Merck), που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη τεχνική, συζεύγνυται με τις πρωτονιωμένες αμινοομάδες των υπολειμμάτων των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γεγονός που προκαλεί την μετατροπή του μέγιστου απορρόφησης της από τα 465 στα 595nm. Η σύνδεση πρωτεΐνης-χρωστικής πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (περίπου σε δύο λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα του χρώματος - για περίπου μια ώρα - μετά την προσθήκη της χρωστικής. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης, γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεΐνών.

Σε σωληνάρια ependorff (1.5ml, εις διπλούν) προστέθηκαν 200μl δειγμάτων γνωστών ποσοτήτων αλβουμίνης ορού βοδιού Β.S.A. (0, 5, 10, 20, 30, 40 και 50 μg) ή ομογενοποιημάτων αμφιβληστροειδή σε ρυθμιστικό διάλυμα-l και 800μl διαλύματος Bradford (0,01% κ.β. Coomanssie Blue G-250, 5% κ.ο. 95% αιθανόλη, 10% κ.ο. 85% φωσφορικό οξύ). Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα δείγματα αμφιβληστροειδή υπολογίστηκε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία προκύπτει από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης B.S.A.. Η ελάχιστη διακριτική ικανότητα της μεθόδου ήταν 5μg/ml. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μg πρωτεΐνης ανά ml διαλύματος.

3.2.2 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της κυκλικής GMP

Μετά την θανάτωση των ζώων αφαιρέθηκαν τα μάτια και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό (Dulbecco's Eagles Medium, Gibco BRL) το οποίο περιείχε PMSF (0,1mM) και λευπεπτίνη (1µg/ml), καθώς και IBMX (1mM) – διάλυμα Ι. Έπειτα αφαιρέθηκε ο πρόσθιος πόλος, ενώ ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, το μελάγχρουν επιθήλιο και ο σκληρός χιτώνας ξεπλύθηκαν καλά σε διάλυμα Ι για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C υπό ήπια ανάδευση.

Οι ιστοί επωάστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C υπό ήπια ανάδευση με διάλυμα Ι ή με διάλυμα Ι που περιείχε το sst₂ εκλεκτικό ανάλογο L-779,976 (Merck, 10μM) ή νιτροπρουσίδιο του νατρίου (Sodium NitroPrusside, SNP, 1mM).

Μετά τις φαρμακολογικές επιδράσεις OI οπίσθιοι πόλοι μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφολμαδεΰδης σε PB (0,1M) για 1 ώρα στους 4°C και έπειτα επωάστηκαν σε διάλυμα 30% σουκρόζης / PB (0,1M) για 16-18 ώρες στους 4°C για κρυοπροστασία. Ακολούθησε ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθισή τους σε ισοπεντάνιο για 1 λεπτό στους -45°C και φύλαξή τους στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Στη συνέχεια κόπηκαν κάθετες τομές πάχους 10 μm σε κρυοστάτη (Leica CM 1850) στους -25°C, τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες και η συλλογή γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε η μια τομή να απέχει από τη διπλανή 100μm. Οι τομές φυλάχτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Οι τομές παίρνονταν κοντά στο οπτικό νεύρο, ενώ εννιά τομές τοποθετούνταν σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Για την ανοσοϊστοχημική σήμανση των τομών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου φθορισμού, κατά τον οποίο, οι τομές επωάζονται με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα και έπειτα με κατάλληλα φθορίζοντα δεύτερα αντισώματα.

Για τη μελέτη της ανοσοδραστικότητας της cGMP χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ανεπτυγμένο σε πρόβατο ενάντια στη cGMP σε συγκέντρωση 1:1000 (προσφορά του Dr de Vente), ενώ το δεύτερο αντίσωμα ήταν αντίσωμα αίγας ή γαϊδουριού κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών προβάτου, συνδεδεμένο με ερυθρό του Τέξας (Jackson ImmunoResearch

Laboratories,Inc.) ή φλουορεσκεΐνη (Molecular Probes) σε συγκέντρωση 1:100 ή 1:300 αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης μελέτες συνεντοπισμού ώστε να χαρακτηριστεί ο τύπος των κυττάρων που παρουσιάζουν cGMP ανοσοδραστικότητα. Χρησιμοποιήθηκε και το μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεϊνική κινάση C (PKC) για τη σήμανση των δίπολων κυττάρων που συνάπτονται με τα ραβδιοφόρα, σε συγκέντρωση 1:50 (Leinco Technologies Inc.), ενώ το δεύτερο αντίσωμα ήταν αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού, συνδεδεμένο με ροδαμίνη (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) σε συγκέντρωση 1:100.

Αρχικά οι τομές ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris-HCl, 0,1M και NaCl, 0,9%, pH=7,4). Στη συνέχεια επωάστηκαν σε διάλυμα 3,3% φυσιολογικού ορού αίγας ή γαΐδουριού (NGS ή NDS) / TBS (0,1M) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση του δεύτερου αντισώματος. Οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επωάστηκαν με διάλυμα που περιείχε το πρώτο αντίσωμα έναντι της cGMP για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό περιείχε 0,5% NGS ή NDS και 0,3% Triton X-100 σε TBS (0,1M). Έπειτα, οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επωάστηκαν με διάλυμα του φθορίζοντος δευτέρου αντισώματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium, Vector Laboratories) και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

Στις μελέτες συνεντοπισμού, ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία χωρίς να γίνει η κάλυψη των τομών. Οι τομές ξεπλύθηκαν ξανά και επωάστηκαν με διάλυμα που περιείχε το πρώτο αντίσωμα έναντι της PKC για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για την επώαση με το δεύτερο αντίσωμα και την κάλυψη. Τελικά, οι τομές εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο συνεστίασης.

3.2.2.1 Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

Η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιήθηκε με την εμβύθισή τους σε μίγμα 0,5 κ.β. ζελατίνης (~300 bloom, Merck) και 0,05 κ.β. θειϊκού χρωμιούχου καλίου (K[Cr(SO₆H₄)(H₂O)]*6H₂O, AlCrO₃, Merck) σε θερμοκρασία 62°C και στέγνωμα στους 30°C για 16-18 ώρες.

3.2.2.2 Μικροσκοπία

Τα παρασκευάσματα των ανοσοϊστοχημικών και ιστοχημικών μελετών παρατηρήθηκαν σε συμβατικό μικροσκόπιο [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0,75] και μικροσκόπιο συνεστίασης [συνεστιακό μικροσκόπιο laser, Leica DM RE (Leica), (He/Ne laser) με φακό HP Plan APO x 20/0,70 και ελαιοκαταδυτικό φακό Plan Fluotar x 40/1,00]. Η ρύθμιση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Adobe Photoshop 5.0.

3.2.3 Ρόλος της τυροσινοφωσφατάσης SHP-1

3.2.3.1 Εντοπισμός της τυροσινοφωσφατάσης SHP-1 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης

Παρασκευή μεμβρανικών παρασκευασμάτων

Φυσιολογικοί ενήλικες αρουραίοι Sprague-Dawley θανατώθηκαν με εισπνοή διαιθυλαιθέρα και απομονώθηκαν τόσο οι αμφιβληστροειδείς όσο και ο εγκεφαλικός φλοιός. Ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια ομογενοποιητή (Ultra-Turrax;IKA Works) σε Tris-Cl pH 7,4. Το ομογενοποίημα του κάθε ιστού φυγοκεντρήθηκε σε 1000xg για 10min και το παραγόμενο υπερκείμενο φυλάχθηκε. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε και ξαναφυγοκεντρήθηκε. Κατόπιν, το παραγόμενο αυτό δεύτερο υπερκείμενο ενώθηκε με το προηγούμενο και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 11000xg για 20min. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris και φυγοκεντρήθηκε στα 27000xg για 10min. Τελικά, το
ίζημα επαναδιαλύθηκε σε lysis buffer (10mM Tris-HCI, pH 7.4, 250 mM σουκρόζη, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1% Triton, 2µg/mL λευπεπτίνη, 2µg/mL απροτινίνη). Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 4°C. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (βλέπε παράγραφο 3.2.1.2).

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένες θετικά ή αρνητικά εξαιτίας των θετικά ή αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων τους. Όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο μετακινούνται προς τον θετικό ή αρνητικό πόλο ανάλογα με το φορτίο τους. Ο βαθμός μετακίνησης τους εξαρτάται από την πυκνότητα του φορτίου της κάθε πρωτεΐνης, δηλαδή, το λόγο "φορτίο/μάζα". Η τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεΐνών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο ονομάζεται ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση των μεμβρανικών παρασκευασμάτων αμφιβληστροειδή και φλοιού αρουραίου έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, (SDS-PAGE, SDSpolyacrylamide gel electrophoresis) σύμφωνα με τον Laemmli (1970). Ως μέσο υποστήριξης χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (10%) όπου, κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με τον λογάριθμο της μάζας τους.

Τα μεμβρανικά παρασκεύασματα αμφιβληστροειδή και εγκεφαλικού φλοιού αρουραίου (60μg) (θετικός μάρτυρας) πρώτα διαλύθηκαν σε διάλυμα (sample buffer: 0,1M Tris-Cl, 4% SDS, 0,2% μπλε βρωμοφαινόλης, 20% γλυκερόλη) δωδεκυλοθεϊκού varpiou (SDS, Sodium Dodesyl Sulphate), ενός απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης ενώ τα ανιόντα του δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών γεγονός που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Τα παρασκευάσματα έβρασαν σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 100°C για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος επιστίβαξης Н ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με, αρχικά,

57

σταθερή τάση 80V και κατόπιν 110V, μετά το πέρασμα του μετώπου των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

Τεχνική ανοσοαποτύπωσης (Western blot)

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου μεταφέρθηκαν με αποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose membranes 0,45μm, Sigma) με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Έπειτα, προστέθηκε αντίσωμα ειδικό για την SHP-1 (1:500, Chemicon International).

Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύθηκε με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο αντίσωμα το οποίο ήταν συναρμοσμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση ραπανιού (HRP: horseradish peroxidase) [πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικιού συζευγμένο με HRP, (Chemicon)]. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ανιχνεύθηκε με την τεχνική της χημειοφωταύγειας και την προσθήκη, ως υπόστρωμα του ενζύμου, λουμινόλης (luminol, Chemiluminescence Chemicon) γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός το οποίο αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ (ECL, Hyperfilm, Amersham).

3.2.3.2 Μελέτη της επίδρασης του ανταγωνιστή της SHP-1 στα επίπεδα της cGMP

Για να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή της SHP-1 στις δράσεις της σωματοστατίνης στα επίπεδα της cGMP, ο ιστός προετοιμάστηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1. Οι ιστοί επωάστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C υπό ήπια ανάδευση με Διάλυμα Ι που περιείχε σωματοστατίνη (0,1μM) και ορθοβαναδικό νάτριο (1μM), το οποίο αποτελεί τον ανταγωνιστή της SHP-1. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1.1.

3.3 ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟ

Για την πρόκληση ισχαιμίας χρησιμοποιήθηκαν δυο μοντέλα, αυτό της διεγερτοτοξικότητας και αυτό της χημικής ισχαιμίας

Μετά την θανάτωση των ζώων αφαιρέθηκαν τα μάτια και τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών οξέων pH=7.4 (PB: NaH₂PO₄ / K₂HPO₄)(0.1M), απομακρύνθηκε ο πρόσθιος πόλος, ενώ ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, το μελάγχρουν επιθήλιο και ο σκληρός χιτώνας ξεπλύθηκαν καλά σε PBS (0,1M) για 15 λεπτά στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5%CO₂ /95% αἑρα υπό ήπια ανάδευση.

3.3.1 Διεγερτοτοξικότητα

Για την πρόκληση ισχαιμίας οι ιστοί επωάστηκαν σε PBS (0,1M) που περιείχε γλουταμινικό οξύ (1, 3 mM), ή RS-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazolepropionic acid (AMPA, Tocris) (1, 3 mM), ή N-methyl-D-aspartic acid (NMDA, Tocris) (0,5, 1,5, 3 mM), ή καϊνικό οξύ (1, 2, 4 mM) για μία ώρα στους 37°C, σε 5% CO₂/95% αἑρα, υπό ήπια ανάδευση. Οι ιστοί στη συνέχεια ξεπλύθηκαν σε PBS για 15 λεπτά.

3.3.2 Χημική ισχαιμία

Για την πρόκληση ισχαιμίας με το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας, οι ιστοί επωάστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση με PBS (0,1M) που περιείχε:

Ιωδο-οξικό οξύ	Κυανιούχο νάτριο
(mM)	(mM)
0,5	2,5
5	25
50	250
100	500

σε διάφορους χρόνους: 15, 30, 45, 60 ή 120 λεπτά, καθώς και με PBS (0,1M) στους ίδιους χρόνους για τους αντίστοιχους μάρτυρες.

3.3.3 Μελέτες βιωσιμότητας ιστού

Για την εξέταση της βιωσιμότητας των ιστών κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, οι ιστοί επωάστηκαν για 2, 6, 12 ή 24 ώρες με PBS (0,1M) στους 37°C, σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση και τελικά ξεπλύθηκαν σε PBS (0,1M) για 15λεπτά.

Μετά τις παραπάνω επιδράσεις, οι οπίσθιοι πόλοι μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφολμαδεΰδης σε PB (0,1M) για 1 ώρα στους 4°C και έπειτα επωάστηκαν σε διάλυμα 30% σουκρόζης / PB (0,1M) για 16-18 ώρες στους 4°C για κρυοπροστασία. Ακολούθησε ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθισή τους σε ισοπεντάνιο για 1 λεπτό στους -45°C και φύλαξή τους στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Στη συνέχεια κόπηκαν κάθετες τομές πάχους 10 μm σε κρυοστάτη (Leica CM 1850) στους -25°C, τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες και η συλλογή γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε η μια τομή να απέχει από τη διπλανή 100μm. Οι τομές φυλάχτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Οι τομές παίρνονταν κοντά στο οπτικό νεύρο, ενώ εννιά τομές τοποθετούνταν σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ

3.4.1 Μελέτες ανοσοφθορισμού με αντίσωμα ενάντια στην ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT)

Για την ανοσοϊστοχημική σήμανση των τομών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου φθορισμού, κατά τον οποίο, οι τομές επωάζονται με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα και έπειτα με κατάλληλα φθορίζοντα δεύτερα αντισώματα.

Το πρώτο αντισώμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διαπίστωση της επίτευξης της ισχαιμίας, ήταν μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην ακέτυλο-τρανσφεράση της χολίνης (ChAT), για τη σήμανση των χολινεργικών κυττάρων, σε συγκέντρωση 1:100 (Bio Trend, Γερμανία). Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού, συνδεδεμένο συνδεδεμένο με ροδαμίνη (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) ή φλουορεσκεΐνη (Molecular Probes) σε συγκέντρωση 1:100 ή 1:300 αντίστοιχα.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.

3.4.2 Μελέτες φθορισμού με χρώση TUNEL

Για τη σήμανση των αποπτωτικών κυττάρων στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες βιωσιμότητας του ιστού, καθώς και σε αυτές που είχαν επωαστεί με το μίγμα χημικής ισχαιμίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TUNEL (Terminal UTP Nick-End Labeling). Η μέθοδος στηρίζεται στην *in situ* ενζυμική σήμανση των τελικών θραυσμάτων του DNA των αποπτωτικών κυττάρων με TMR-dUTP μέσω της τελικής δεοξυνουκλεοτυδικής τρανσφεράσης (TDT). Στις έρευνές μας χρησιμοποιήθηκε το TUNEL assay της Roche και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της εταιρίας.

3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Για να διερευνηθεί η ενδεχόμενη προστατευτική δράση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της κατά τη χημική ισχαιμία, έγιναν μελέτες αρχικά με τη χρήση σωματοστατίνης σε διάφορους χρόνους επώασης και σχημάτων σε σχέση με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας.

3.5.1 Φαρμακολογική επίδραση σωματοστατίνης

Οι ιστοί επωάστηκαν στους 37°C σε 5% CO2/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση με PBS (0,1M) που περιείχε το μίγμα της χημικής ισχαιμίας (5mM ιωδο-οξικό οξύ/25mM κυανιούχου νατρίου, Χ. Ι.) παρουσία σωματοστατίνης ταυτόχρονα, πριν ή μετά από την επώαση με το μίγμα αυτό, όπως φαίνεται και στον ακόλουθο πίνακα:

μM	Χρόνος επώασης πριν την επώαση με το μίγμα Χ.Ι. (λεπτἁ)	Χρόνος επώασης παράλληλα με το μίγμα Χ.Ι. (λεπτά)	Χρόνος επώασης μετά την επώαση με το μίγμα Χ.Ι. (λεπτά)
10	30	2 x 30	-
10	-	2 x 30	-
10	-	2 x 30	2 x 30
100	-	2 x 30	-
1	-	2 x 30	2 x 30
1	_	2 x 30	4 x 30
1	-	-	2 x 30

3.5.2 Φαρμακολογικές επιδράσεις με σωματοστατινεργικά ανάλογα

Οι ιστοί επωάστηκαν εκτός της σωματοστατίνης και με άλλα ανάλογα, εκλεκτικά για τους υποδοχείς της σωματοστατίνης όπως με το BIM23014 (0,1, 1 ή 10 μM) και το MK678 (0,1, 1 ή 10 μM) (sst₂ εκλεκτικά ανάλογα), την κορτιστατίνη (0,1, 1 ή 10 μM), το L-803,087 (1μM)(sst₄ εκλεκτικό ανάλογο) και το L-817,818 (1μM)(sst₅ εκλεκτικό ανάλογο).

Οι επιδράσεις έγιναν σε PBS (0,1M) που περιείχε το μίγμα της χημικής ισχαιμίας (5mM ιωδο-οξικό οξύ/25mM κυανιούχου νατρίου) παρουσία των σωματοστατινεργικών αναλόγων για 2 x 30 λεπτά και στη συνέχεια σε PBS (0,1M) που περιείχε μόνο το ανάλογο αυτό για 2 x 30 λεπτά στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση.

Σε κάθε ένα από τα παραπάνω πειράματα, υπήρχε πάντα ένας ιστός που επωαζόταν για 2 Χ 30 λεπτά με PBS (0,1M) που περιείχε το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα με 0,1M PBS ως μάρτυρας για τη χημική ισχαιμία. Επίσης υπήρχε και ένας ιστός που επωαζόταν για όλη τη χρονική διάρκεια των επωάσεων με PBS (0,1M) ως μάρτυρας φυσιολογικού ιστού.

Μετά το τέλος των επιδράσεων, οι οπίσθιοι πόλοι μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφολμαδεΰδης σε PB (0,1M) για 1 ώρα στους 4°C και έπειτα επωάστηκαν σε διάλυμα 30% σουκρόζης / PB (0,1M) για 16-18 ώρες στους 4°C για κρυοπροστασία. Ακολούθησε ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθισή τους σε ισοπεντάνιο για 1 λεπτό στους -45°C και φύλαξή τους στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Στη συνέχεια κόπηκαν κάθετες τομές πάχους 10 μm σε κρυοστάτη (Leica CM 1850) στους -25°C, τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες και η συλλογή γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε η μια τομή να απέχει από τη διπλανή 100μm. Οι τομές φυλάχτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Οι τομές παίρνονταν κοντά στο οπτικό νεύρο, ενώ εννιά τομές τοποθετούνταν σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.

3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Για τον προσδιορισμό της νευροπροστασίας έγιναν μελέτες ανοσοφθορισμού με αντίσωμα ενάντια στην ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.4.1.

Κατά τη χρώση αυτή, έγινε καταμέτρηση του αριθμού των χολινεργικών κυττάρων στους ιστούς μετά από τις διάφορες επιδράσεις. Η κάθε τομή προς καταμέτρηση τοποθετούνταν στο κέντρο του οπτικού πεδίου του HP Plan APO x 20/0,70 φακού. Η περιοχή στην οποία γινόταν η καταμέτρηση ήταν πάντα κοντά στο οπτικό νεύρο. Για τις μετρήσεις εξετάστηκαν 21 τομές από πέντε διαφορετικούς αμφιβληστροειδείς στους ιστούς μάρτυρες, 13 τομές από τέσσερις αμφιβληστροειδείς που είχαν επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και BIM23014 (1μM), 9 τομές από τρεις αμφιβληστροειδείς με MK678 (1μM) και 12 τομές από τέσσερις αμφιβληστροειδείς με κορτιστατίνη (1μM). Μελετήθηκαν επίσης οι πιθανές διαφορές στην έκφραση των διαφόρων τύπων κυττάρων έπειτα από επίδραση του μίγματος της χημικής ισχαιμίας τόσο χωρίς όσο και με την επίδραση σωματοστατινεργικών αναλόγων.

Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα, ανεπτυγμένα σε κουνέλι, πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια:

- στην υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) για τη σήμανση των ντοπαμινεργικών κυττάρων, σε συγκέντρωση 1:1000 (Chemicon International)
- στη νευρωνική μορφή της συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (bNOs), σε συγκέντρωση 1:3000

καθώς και τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα ανεπτυγμένα σε ποντίκι ενάντια:

- στην πρωτεϊνική κινάση C (PKC) για τη σήμανση των δίπολων κυττάρων που συνάπτονται με τα ραβδιοφόρα, σε συγκέντρωση 1:50 (Leinco Technologies Inc.)
- στην πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους-1^A (MAP-1^A)
 για τη σήμανση των γαγγλιακών κυττάρων, σε συγκέντρωση 1:100

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2. Για τα πολυκλωνικά αντισώματα το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη (Vector Laboratories) σε συγκέντρωση 1:150. Για τα μονοκλωνικά αντισώματα το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού, συνδεδεμένο με ροδαμίνη (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) σε συγκέντρωση 1:100 ή με φλουορεσκεΐνη (Molecular Probes) σε συγκέντρωση 1:300.

3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΣΟ ΕΠΩΑΣΗΣ

Οι ιστοί προετοιμάστηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.3 και επωάστηκαν σε PBS (0,1M, 800μl) που περιείχε ιωδοοξικό οξύ (5 mM),

64

κυανιούχο νάτριο (25mM) και σωματοστατίνη (1μM) στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα (2X30λεπτά).

Μετά τις επωάσεις έγινε συλλογή του μέσου επώασης που περιείχε τους αμφιβληστροειδείς και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12000rpm στους 4°C. Στο κάθε υπερκείμενο προστέθηκαν 91μl οξικού οξέος (2N). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C και ηχοβολήθηκαν. Από το κάθε ομογενοποίημα κρατήθηκαν 50μl στους -20°C για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών (Bradford, 1976) (βλέπε παράγραφο 3.2.1.2) και τα υπόλοιπα φυλάχτηκαν στους -80°C για 24-48 ώρες. Έπειτα τα δείγματα ξεπαγώθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 13000rpm στους 4°C. Από το υπερκείμενο φτιάχτηκαν τριπλέτες των 100μl από το κάθε δείγμα, λυοφιλοποιήθηκαν και φυλάχτηκαν στους -80°C μέχρι τη μέτρησή τους με ραδιοανοσολογική τεχνική (RIA) (βλέπε παράγραφο 3.1.3.).

3.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Για την εξέταση του μηχανισμού νευροπροστασίας, οι ιστοί προετοιμάστηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.3 και επωάστηκαν με PBS (0,1M) που περιείχε ιωδοοξικό οξύ (5mM) και κυανιούχου νατρίου (25mM) παρουσία:

- αργινίνης (0,05, 0,125, 0,25, 0,5, 1 ή 2 mM) η οποία αποτελεί το υπόστρωμα για την παραγωγή της NO

- νιτροπρουσίδιου του νατρίου (SNP, 0,25, 0,5, 1, 2 ή 4 mM) το οποίο απελευθερώνει NO[.]

spermine NONOate (Tocris) (1, 5 ή 10 μM) το οποίο απελευθερώνει NO· αργά
SIN-1 (Tocris) (0,1, 0,3 ή 1mM) το οποίο απελευθερώνει NO· και υπεροξείδιο.
Μεταβολίζεται σε δύο στάδια, αρχικά σε SIN-1A και στη συνέχεια σε NO· και SIN-1C (Feelisch και συν., 1989, Singh και συν., 1998)

- 8-Br-cGMP (Tocris) (0,1, 0,5 ή 1mM) το οποίο είναι ένα ανάλογο της cGMP που διαπερνά ευκολότερα τις μεμβράνες για 1 ώρα (2x30λεπτά) στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια έγινε επώαση για 1 ώρα (2x30λεπτά) με PBS παρουσία της αργινίνης ή νιτροπρουσίδιου του νατρίου ή του NONOate ή του SIN-1 ή της 8-Br-cGMP στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

3.8.1 Επίδραση του SIN-1/L-κυστεΐνη στη Χημική Ισχαιμία

Για να ελέγξουμε αν η πιθανή προστατευτική δράση του SIN-1 κατά τη χημική ισχαιμία οφείλεται στο περοξυνιτρώδες, εξετάσαμε αν η L-κυστεΐνη, η ουσία που απομακρύνει το ανεπιθύμητο περοξυνιτρώδες, θα αναστείλει τις δράσεις του. Οι ιστοί επωάστηκαν με PBS (0,1M) που περιείχε ιωδοοξικό οξύ (5mM) και κυανιούχου νατρίου (25mM) παρουσία SIN-1 (0,1mM) και Lκυστεΐνης (5mM) για 1 ώρα (2x30λεπτά) στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια έγινε επώαση για 1 ώρα (2x30λεπτά) με PBS παρουσία του SIN-1 και L-κυστεΐνης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

3.8.2 Επίδραση του SIN-1

Για να εξεταστεί η επίδραση του SIN-1 στον αμφιβληστροειδή, οι ιστοί επωάστηκαν με PBS (0,1M) ή με PBS που περιείχε SIN-1 (0,1, 0,3, 1 ή 3mM) για 2 ώρες (4x30λεπτά) στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση.

3.8.3 Επίδραση του αναστολέα της συνθάσης της ΝΟ· στη νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014

Για να διαπιστωθεί αν η πιθανή νευροπροστατευτική δράση του BIM231014 οφείλεται στην ΝΟ· χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της συνθάσης της ΝΟ·, ΝΜΜΑ. Οι ιστοί επωάστηκαν με PBS (0,1M) που περιείχε ιωδοοξικό οξύ (5mM) και κυανιούχου νατρίου (25mM) παρουσία BIM23014 (1μM) και ΝΜΜΑ (0,5mM) για 1 ώρα (2x30λεπτά) στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια έγινε επώαση για 1 ώρα (2x30λεπτά) με PBS παρουσία του BIM23014 και του NMMA στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

3.8.4 Επίδραση των αναστολέων της γουανυλικής κυκλάσης στη νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014

Εξετάστηκε επίσης η επίδραση εκλεκτικών αναστολέων της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης, ODQ (Tocris) και NS2028 στη δράση του sst₂ σωματοστατινεργικού αναλόγου BIM23014 κατά τη χημική ισχαιμία. Ο ODQ είναι ο αναστολέας που χρησιμοποιείται συνήθως, όμως στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε και ο NS2028 εξαιτίας της καλύτερης δραστικότητας και εκλεκτικότητάς του. Οι ιστοί επωάστηκαν με PBS (0,1M) που περιείχε ιωδοοξικό οξύ (5mM) και κυανιούχου νατρίου (25mM) παρουσία BIM23014 (1μM) και ODQ (100μM) ή NS2028 (50μM) για 1 ώρα (2x30λεπτά) στους 37°C σε 5% CO₂/95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια έγινε επώαση για 1 ώρα (2x30λεπτά) με PBS παρουσία του BIM23014 και του ODQ ή του NS2028 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Σε κάθε ένα από τα παραπάνω πειράματα, υπήρχε πάντα ένας ιστός που επωαζόταν για 2 X 30 λεπτά με PBS (0,1M) που περιείχε το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα με 0,1M PBS ως μάρτυρας για τη χημική ισχαιμία. Επίσης υπήρχε και ένας ιστός που επωαζόταν για όλη τη χρονική διάρκεια των επωάσεων με PBS (0,1M) ως μάρτυρας φυσιολογικού ιστού.

Μετά το τέλος των επιδράσεων, οι οπίσθιοι πόλοι μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφολμαδεΰδης σε PB (0,1M) για 1 ώρα στους 4°C και έπειτα επωάστηκαν σε διάλυμα 30%σουκρόζης / PB (0,1M) για 16-18 ώρες στους 4°C για κρυοπροστασία. Ακολούθησε ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθισή τους σε ισοπεντάνιο για 1 λεπτό στους -45°C και φύλαξή τους στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Στη συνέχεια κόπηκαν κάθετες τομές πάχους 10 μm σε κρυοστάτη (Leica CM 1850) στους -25°C, τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες και η συλλογή γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε η μια

67

τομή να απέχει από τη διπλανή 100μm. Οι τομές φυλάχτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Οι τομές παίρνονταν κοντά στο οπτικό νεύρο, ενώ εννιά τομές τοποθετούνταν σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Ακολούθησαν μελέτες ανοσοφθορισμού με τη χρήση του αντισώματος έναντι της ChAT, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.4.1. Σε κάποιες επιλεγμένες τομές πραγματοποιήθηκαν μελέτες και με τη μέθοδο TUNEL (3.4.2).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν α) η περαιτέρω μελέτη του ρόλου της σωματοστατίνης και της κορτιστατίνης στον αμφιβληστροειδή με τη βοήθεια εκελκτικών αναλόγων για τους διάφορους υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης και β) η πιθανή νευροπροστατευτική τους δράση στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία.

Σχετικά με τον πρώτο στόχο, στον αμφιβληστροειδή έχουν εντοπιστεί ανοσοϊστοχημικά οι υποδοχείς σωματοστατίνης sst1, sst2, sst4 και τελευταία ο sst5. Ο sst2 υποδοχέας είναι ο επικρατέστερος σωματοστατινεργικός υποδοχέας στον ιστό και ο ρόλος του έχει μελετηθεί περισσότερο από όλους τους άλλους υπότυπους. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την πληρέστερη διαλεύκανση του ρόλου του. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παράγραφο 4.2 συνεισφέρουν στα ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα και συμβάλλουν στην αναγνώριση του μηχανισμού μέσου του οποίου επιτυγχάνεται η νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης (βλέπε παράγραφο 4.3).

Στην παρούσα μελέτη, επιλέξαμε να μελετήσουμε κυρίως τον ρόλο του ssti υποδοχέα γιατί βιβλιογραφικά ανοσοϊστοχημικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι o ssti υποδοχέας είναι o αυτοϋποδοχέας της σωματοστατίνης. Για να εξακριβωθεί o ρόλος του ssti ως αυτοϋποδοχέας, απαιτούνται λειτουργικές μελέτες που να δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του μειώνει τα επίπεδα της σωματοστατίνης. Τα αποτελέσματα των μελετών που στόχο είχαν την εξακρίβωση του ρόλου του ssti υποδοχέα ως αυτοϋποδοχέα παρουσιάζονται στην παρακάτω παράγραφο (4.1).

4.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SST1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Για τη μελέτη του λειτουργικού ρόλου του sst₁, αρχικά πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τον προσδιορισμό της νευρωνικής απελευθέρωσης της σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή. Τα επίπεδα της σωματοστατίνης μετρήθηκαν με ραδιοανοσολογική μέθοδο στον ιστό (pgr SRIF) και εκφράστηκαν ως προς μgr της πρωτεΐνης που περιείχε ο κάθε αμφιβληστροειδής. Στη συνέχεια εκφράστηκαν ως το επί τοις εκατό (%) της βασικής απελευθέρωσης.

Τα επίπεδα της σωματοστατίνης μετρήθηκαν στα 1,815 ± 0,206 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης (n=23). Η επώαση του ιστού με 50mM KCl δεν επηρέασε την απελευθέρωση της σωματοστατίνης. Κατά την προσθήκη όμως 100mM KCl τα επίπεδα της σωματοστατίνης αυξήθηκαν με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο (p<0,05 t-τεστ με μονόπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων) στα 151,2 ± 20,0% (n=4), ενώ τα επίπεδα της σωματοστατίνης απουσία ιόντων ασβεστίου (10mM EGTA) είχαν μείωση που ήταν στατιστικά σημαντική (p<0,005 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων) στα 31,2 ± 6,7% (n=4), Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι η απελευθέρωση της σωματοστατίνης είναι νευρωνικής φύσης (κάλιο και ασβέστιο εξαρτώμενη απελευθέρωση) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Νευρωνική απελευθέρωση της σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου: επίδραση της παρουσίας KCI (A) και της ἑλλειψης ιόντων ασβεστίου (B, 10mM EGTA). Η απελευθέρωση της σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή αυξήθηκε παρουσία KCI (100mM, n=4) και μειώθηκε παρουσία EGTA (10mM, n=4), * p<0,05 t-τεστ με μονόπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων, ** p<0,005 t-τεστ με αμφίπλευρο ἑλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων.

Η επίδραση του ssti αγωνιστή CH275 με τον αμφιβληστροειδή είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απελευθέρωσης της σωματοστατίνης από τον ιστό κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο, δίνοντας στατιστικά σημαντική μείωση 59,84% (p<0,0001 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων) στη συγκέντρωση 10-5M και 47,93% (p<0,005 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων) στη συγκέντρωση 10-6M, αφού τα επίπεδα που μετρήθηκαν ήταν 0,729 ± 0,128 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης (n=13) και 0,945 ± 0,160 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης (n=9), αντίστοιχα, σε σχέση με τα βασικά που ήταν 1,815 ± 0,206 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης (n=23). Στη χαμηλότερη συγκέντρωση 10-7M η μείωση δεν ήταν σημαντική αφού τα επίπεδα ήταν 1,704 ± 0,285 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης (n=10)(Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Επίδραση του εκλεκτικού sst1 αγωνιστή CH-275 στην απελευθέρωση σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το CH-275 μείωσε τηναπελευθέρωση της σωματοστατίνης με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (n=9-23), ** p<0,005 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων, *** p<0,0001 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων.



Σχήμα 3: Επίδραση του sst1 ανταγωνιστή NVP-SRA 880 στην απελευθέρωση σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το NVP-SRA 880 (n=8) δεν επηρέασε από μόνο του την απελευθέρωση της σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή, ενώ όταν προηγήθηκε της επίδρασης του sst1 αγωνιστή CH-275 ανέστρεψε την από το CH-275 (n=8) προκαλούμενη μείωση της απελευθέρωσης σωματοστατίνης από τον ιστό. *συγκρινόμενο με το μάρτυρα, # συγκρινόμενο με το CH-275, p<0,05 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων, *** p<0,0001 t-τεστ με αμφίπλευρο έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων.

Η μείωση της απελευθέρωσης της σωματοστατίνης ανεστράφη όταν προηγήθηκε της χορήγησης του CH-275 η επώαση του ιστού με τον ssti ανταγωνιστή NVP-SRA 880. Συγκεκριμένα, σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα της απελευθερούμενης σωματοστατίνης ήταν 1,096± 0,217 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης(n=8), ενώ μόνο υπό την επίδραση του ανταγωνιστή (απουσία αγωνιστή) τα επίπεδα ήταν 1,707 ± 0,092 pgr σωματοστατίνης / μgr πρωτεΐνης(n=8)(Σχήμα 3).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, ο sst₂ αγωνιστής MK678 (n=4) δεν επηρέασε τα βασικά επίπεδα απελευθέρωσης της σωματοστατίνης από τον ιστό (n=11) σε καμία από τις συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Επίδραση του sst2 αγωνιστή ΜΚ-678 στην απελευθέρωση σωματοστατίνης από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το ΜΚ-678 δεν επηρέασε την απελευθέρωση της σωματοστατίνης από τον ιστό (n=4).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν για πρώτη φορά ότι ο sstı υποδοχέας δρα ως αυτοϋποδοχέας της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή και πιθανά ρυθμίζει τη σύνθεση και απελευθέρωσή της.

4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ cGMP ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

4.2.1 Ρόλος της cGMP

Η cGMP είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της φυσιολογίας διαφόρων συστημάτων συμπεριλαμβανομένου και του αμφιβληστροειδή. Επηρεάζει διαύλους ιόντων και τροποποιεί την κυτταρική λειτουργία. Τα επίπεδα τη cGMP αυξάνονται μετά από ενεργοποίηση της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης από την ελεύθερη ρίζα του αζώτου (NO·). Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, έγινε γνωστό ότι η ενεργοποίηση του sst₂ υποδοχέα αυξάνει τα επίπεδα της NO· στον αμφιβληστροειδή (Vasilaki και συν., 2002, 2004).

Στόχος των ερευνών μας ήταν η μελέτη της δράσης της σωματοστατίνης στα επίπεδα της cGMP στον αμφιβληστροειδή.

73

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ELISA για την μέτρηση των επιπέδων cGMP μετά από ποικίλους φαρμακολογικούς χειρισμούς.

Επώαση του ιστού με σωματοστατίνη αύξησε τα επίπεδα της cGMP με τρόπο εξαρτώμενο από την συγκέντρωσή της. Στη μικρότερη συγκέντρωση (0,01μM, n=7) η σωματοστατίνη αύξησε τα επίπεδα της cGMP σε σχέση με τα βασικά (n=16, 100 ± 7,6%,) στα 146,1 ± 25,4%, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 0,1μM, 1μM και 10μM προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 290,1 ± 24,6% (n=10), 227,0 ± 34,1% (n=10) και 271,8 ± 25,7% (n=13), αντίστοιχα (p<0,01 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett) (Σχήμα 5).

Επώαση του ιστού με σωματοστατίνη (0,1μΜ) παρουσία του εκλεκτικού ανταγωνιστή έναντι των sst₂ υποδοχέων CYN-154806 (1μΜ, n=8) είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά των επιπέδων cGMP στα βασικά επίπεδα, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η αύξηση των επιπέδων της cGMP οφείλεται στην ενεργοποίηση του sst₂ υποδοχέα (Σχήμα 6).



Σχήμα 5: Επίδραση της σωματοστατίνης στα επίπεδα cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η σωματοστατίνη επηρεάζει τα επίπεδα cGMP στον ιστό κατά ένα συγκεντρωσοεξαρτώμενο τρόπο (n=7-16), ** p<0.01 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett.



Σχήμα 6: Αναστροφή της δράσης της σωματοστατίνης (0,1μΜ, n=10) στα επίπεδα της cGMP του αμφιβληστροειδή αροραίου από τον εκλεκτικό ανταγωνιστή των sst2 σωματοστατινεργικών υποδοχέων, CYN-154806 (1μΜ, n=8), ** p<0.01 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett.

Για περαιτέρω μελέτη του ρόλου του sst₂ υποδοχέα στη ρύθμιση των επιπέδων της cGMP, μελετήθηκε η επίδραση του εκλεκτικού για τον sst₂ αγωνιστή BIM23014. Το ανάλογο αυτό μιμήθηκε τη δράση της σωματοστατίνης αφού αύξησε τα επίπεδα της cGMP στον ιστό σε σχέση με τα βασικά (n=16) κατά 184,3 ± 30,6% (n=6), 185,3 ± 34,6% (n=9), 147,3 ± 34,1% (n=9) και 251,8 ± 53,3% (n=10) σε συγκέντρωση 0,01μM, 0,1μM, 1μM και 10μM, αντίστοιχα. Η αύξηση των επιπέδων της cGMP που προκάλεσε το BIM23014 ήταν στατιστικά σημαντική στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 10μM (p<0,01 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett, Σχήμα 7).

Αντίθετα, ο εκλεκτικός αγωνιστής για τον sst₃ υπότυπο (L-796-778) δεν είχε καμία δράση, αφού σε συγκέντρωση 10μM (n=5) δεν επηρέασε τα βασικά επίπεδα της cGMP (n=16, Σχήμα 8). Ο sst₃ υπότυπος δεν έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή, και τα ευρύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Επομένως, τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση των επιπέδων της cGMP οφείλεται στην ενεργοποίηση των sst₂ υποδοχέων.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η εμπλοκή της ΝΟ· στην αύξηση των επιπέδων της cGMP που προκλήθηκε από την σωματοστατίνη. Αρχικά διερευνήθηκε η δράση της αργινίνης, που αποτελεί πρόδρομο ουσία στην συνθετική πορεία της ΝΟ·, στα επίπεδα της cGMP. Η αργινίνη (250μM, n=5) αύξησε τα επίπεδα της cGMP κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο 134,5±17,0% (p<0,05 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Newman-Keuls). Για τη μελέτη της εμπλοκής της ΝΟ· στη δράση της σωματοστατίνης, ο αμφιβληστροειδής επωάστηκε παρουσία της σωματοστατίνης (0,1μM) και του μη ειδικού αναστολέα της συνθάσης της NO·, NMMA (250μM, n=8). Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η αναστολή της NOS μείωσε την αύξηση των επιπέδων της cGMP που προκλήθηκε από τη σωματοστατίνη στα βασικά επίπεδα (Σχήμα 9).

Συμπερασματικά, η σωματοστατίνη μέσω ενεργοποίησης των sst₂ υποδοχέων αυξάνει τα επίπεδα της NO[,] και στη συνέχεια της cGMP.



Σχήμα 7: Επίδραση του sst2 αγωνιστή BIM23014 στα επίπεδα της cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το BIM23014 αύξησε τα επίπεδα της cGMP κατά συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο(n=6-16), ** p<0.01 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett.



Σχήμα 8: Επίδραση του sst₃ αγωνιστή L-796,778 (10μM) στα επίπεδα της cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Τα επίπεδα της cGMP δεν επηρεάστηκαν από την επίδραση του sst₃ εκλεκτικού αναλόγου L-796,778 (10μM) στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (n=5).



Σχήμα 9: Επίδραση των επιπέδων της ΝΟ· στην επαγόμενη από τη σωματοστατίνη αύξηση των επιπέδων cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η αργινίνη (250μM, n=5) αύξησε τα επίπεδα της cGMP στον ιστό. Ο μη εκλεκτικός αναστολέας της συνθάσης της ΝΟ· ΝΜΜΑ (250μM, n=8) παρουσία της σωματοστατίνης (0,1μM, n=10) ανέστειλε την από τη σωματοστατίνη προκαλούμενη αύξηση, * p<0,05 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Newman-Keuls, *** p<0,001 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Newman-Keuls.

4.2.2 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της κυκλικής GMP

ΑνοσοΪστοχημικές μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη της cGMP σε κύτταρα του αμφιβληστροειδή (Johansson και συν., 2000). Για να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της σωματοστατίνης στα επίπεδα της cGMP πραγματοποιήθηκαν ανοσοΐστοχημικές μελέτες σε τομές αμφιβληστροειδή.

Η ανίχνευση της cGMP ανοσοδραστικότητας στο φυσιολογικό αμφιβληστροειδή ή στον αμφιβληστροειδή που είχε υποστεί την επίδραση sst₂ σωματοστατινεργικού αναλόγου, δεν έγινε εφικτή. Ωστόσο, επώαση του ιστού με το δότη της NO· SNP (1mM) αύξησε τα επίπεδα της cGMP, με αποτέλεσμα η cGMP ανοσοδραστικότητα να είναι εμφανής σε σώματα, άξονες και απολήξεις δίπολων κυττάρων, Μελέτες συνεντοπισμού της cGMP με το δείκτη των δίπολων κυττάρων που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα, PKC, απέδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά είναι δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα τα κύτταρα δηλαδή που εκφράζουν τους sst₂ υποδοχείς. (Σχήμα 10).

Η ενεργοποίηση των sst2 υποδοχέων και η περαιτέρω αύξηση των επιπέδων της cGMP δεν ήταν επαρκής για να αυξηθεί η cGMP ανοσοδραστικότητα.



Σχήμα 10: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου έπειτα από διέγερση με SNP (1mM). cGMP ανοσοδραστικότητα παρατηρήθηκε σε δίπολα κύτταρα (Α). Τα δίπολα αυτά κύτταρα σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα αφού η PKC ανοσοδραστικότητα (Β) που εντοπίζεται σε αυτό τον τύπο κυττάρων συνεντοπίζεται με αυτή της cGMP (Γ). ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα.

4.2.3 Ρόλος της τυροσινοφωσφατάσης SHP-1

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την εμπλοκή της τυροσινοφωσφατάσης SHP-1 στο μηχανισμό κατά τον οποίο η cGMP δρα νευροπροστατευτικά στον αμφιβληστροειδή, μελετήσαμε την παρουσία της SHP-1 στον ιστό καθώς επίσης και το ρόλο της στην επαγόμενη από τη σωματοστατίνη αύξηση της cGMP. Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, και με ιστό μάρτυρα τον εγκεφαλικό φλοιό (Horvat και συν., 2001), διαπιστώσαμε ότι, η SHP-1 εντοπίζεται στον αμφιβληστροειδή (Σχήμα 11).





Ταυτόχρονη χορήγηση του ανταγωνιστή της SHP-1 ορθοβαναδικού νατρίου και σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή οδηγεί στη μείωση της επαγόμενης από τη σωματοστατίνη αύξησης των επιπέδων της cGMP (Σχήμα 12) γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη στον ιστό ενός μηχανισμού δράσης της σωματοστατίνης στον οποίο εμπλέκεται η τυροσινο-φωσφατάση SHP-1.



Σχήμα 12: Επίδραση του ανταγωνιστής της SHP-1 ορθοβαναδικό νάτριο στην επαγόμενη από τη σωματοστατίνη αύξηση των επιπέδων cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το ορθοβαναδικό νάτριο (1μΜ) μείωσε την επαγόμενη από τη σωματοστατίνη (SRIF, 0,1μΜ) αύξηση των επιπέδων της cGMP στον ιστό. *, # p<0,05 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett, ** p<0,01 κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett (* σε σχέση με τον μάρτυρα, # σε σχέση με τη σωματοστατίνη).

Ο δεύτερος και κύριος ερευνητικός στόχος της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν η δημιουργία μοντέλων ισχαιμίας του αμφιβληστροειδή και η μελέτη του νευροπροστατευτικού ρόλου της σωματοστατίνης. Οι μελέτες μας εστιάστηκαν στη δημιουργία δύο μοντέλων ισχαιμίας αυτού της διεγερτοτοξικότητας και εκείνου της χημικής ισχαιμίας.

4.3 ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟ

4.3.1 Διεγερτοτοξικότητα

Για την πρόκληση διεγερτοτοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα διεγερτικά αμινοξέα: καϊνικό οξύ (1, 2, 4mM), NMDA (0,5, 1,5, 3mM), AMPA (1, 3mM) και γλουταμινικό οξύ (1, 3mM). Η ανίχνευση πιθανής νευροτοξικής βλάβης στον ιστό μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά με τη χρήση εκλεκτικού αντισώματος ενάντια στην ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (**Ch**oline **A**cetylo**T**ransfarase, ChAT), η δραστηριότητα της οποίας φαίνεται να μειώνεται στον αμφιβληστροειδή με την

επίδραση διεγερτικών αμινοξέων και ισχαιμικής προσβολής του ιστού (Siliprandi και συν., 1992, Osborne και συν., 1995, Kapin και συν., 1999).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 13, τα τρία διεγερτικά αμινοξέα δεν κατάφεραν να επιφέρουν εξάληψη της ChAT ανοσοδραστικότητας κάτω από τις παρούσες συνθήκες. Παρόλο που φαίνεται να μειώνεται η ChAT ανοσοδραστικότητα σε σχέση με τον ιστό μάρτυρα στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, το σήμα δεν εξαλείφθηκε (Σχήμα 13). Παράλληλα, εστιάσαμε στη δημιουργία του μοντέλου χημικής ισχαιμίας.

4.3.2 Χημική ισχαιμία

Για την πρόκληση χημικής ισχαιμίας χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο από τη βιβλιογραφία στο οποίο οι χημικές ουσίες κυανιούχο νάτριο και ιωδοοξικό οξύ προκάλεσαν ισχαιμία σε φέτες ιππόκαμπου (Reiner et al., 1990). Οι ουσίες αυτές μιμούνται την ανοξία και την υπογλυκαιμία που παρατηρούνται σε περιπτώσεις ισχαίμιας. Το κυανιούχο νάτριο αναστέλλει την οξειδάση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c, ενώ το ιωοδοοξικό οξύ αναστέλει το γλυκολυτικό ένζυμο της 3-φωσφογλυκεραλδεϋδικής αφυδρογωνάσης.

Πραγματοποιήθηκαν πιλοτικές μελέτες για την ανεύρεση των κατάλληλων συνθηκών για την πρόκληση ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Χρησιμοποιήθηκε η ChAT ανοσοδραστικότητα για την ανίχνευση χολινεργικών κυττάρων στον ιστό μάρτυρα και στον ισχαιμικό ιστό.

Σύμφωνα με τη ChAT ανοσοδραστικότητα, η επώαση του ιστού με 5, 50, 100 mM και 25, 250, 500 mM ιωδο-οξικό οξύ και κυανιούχο νάτριο, αντίστοιχα για 60 και 120 λεπτά προκαλεί αμφιβληστροειδική ισχαιμία. Στις περαιτέρω μελέτες μας χρησιμοποιήθηκαν τα 5mM ιωδο-οξικού οξέος και 25mM κυανιούχου νατρίου για 60 λεπτά ως οι ιδανικές συνθήκες για την πρόκληση χημικής ισχαιμίας (Σχήμα 14).

Η επίτευξη της ισχαιμίας επιβεβαιώθηκε επίσης και από τη χρώση TUNEL, η οποία χρησιμοποιήθηκε στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (5mM ιωδο-οξικό οξύ και 25mM κυανιούχο νάτριο) για 60 λεπτά (Σχήμα 15). Στον ιστό μάρτυρα δεν παρατηρήθηκαν αποπτωτικά κύτταρα. Αντίθετα, στον ιστό που είχε υποστεί χημική ισχαιμία, η παρουσία των αποπτωτικών κυττάρων ήταν ορατή σε όλες σχεδόν τις στιβάδες, εκτός από τη γαγγλιακή.

Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι το μοντέλο της ex vivo χημικής ισχαιμίας είναι κατάλληλο για τη μελέτη της νευροπροστατετυτικής / αντιαποπτωτικής δράσης των σωματοστατινεργικών αναλόγων. Στη συνέχεια, όλες οι μελέτες της παρούσας διατριβής εστίασαν στη χρήση του μοντέλου αυτού.



Σχήμα 13: Εχ νίνο επίδραση των διεγερτικών αμινοξέων NMDA, AMPA, καϊνικό και γλουταμινικό οξύ στον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν την ακετυλο τρανσφεράση της χολίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Στον ιστό μάρτυρα (Α), η ChAT ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται σε βραχύινα της εσωτερικής κοκκώδους και γαγγλιακής στιβάδας, καθώς και σε αποφύσεις κυττάρων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα. Η χρώση μειώθηκε αλλά παρέμεινε στα κύτταρα του ιστού που είχαν επωαστεί με καϊνικό οξύ (4mM, B), NMDA (3mM, Γ), AMPA (3mM, Δ), γλουταμινικό οξύ (3mM, Ε). ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 14: Επίδραση της εχ νίνο χημικής ισχαιμίας στον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν την ακετυλο τρανσφεράση της χολίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η ChAT ανοσοδραστικότητα σε ιστό που έχει επωαστεί με PBS (A), εντοπίζεται σε βραχύινα κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους (ΕσΚ) και γαγγλιακής στιβάδας (ΓΚ), καθώς και σε αποφύσεις κυττάρων της εσωτερικής δικτυωτής στιβάδας (ΕσΔ). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που είχε επωαστεί με το μίγμα χημικής ισχαιμίας (5mM ιωδοοξικό οξύ/25 mM κυανιούχου νατρίου) για 60 λεπτά (B) ή παρουσία μόνο του δεύτερου αντισώματος (Γ). Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 15: Επίδραση της ex vivo χημικής ισχαιμίας στον απόπτωση των κυττάρων του αμφιβληστροειδή αρουραίου. Εντοπισμός των αποπτωτικών κυττάρων μέσω της χρώσης TUNEL σε ιστό μάρτυρα (A) και σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (B). ΓΚ: Γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.

4.3.3 Μελέτες βιωσιμότητας ιστού

Ο ιστός ἐπειτα από 2 ώρες επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσίασε ἐντονη ChAT ανοσοδραστικότητα τόσο σε χολινεργικά κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους και γαγγλιακής στιβάδας, όσο και σε αποφύσεις των χολινεργικών κυττάρων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα σε όλο το μήκος του αμφιβληστροειδή. Μετά από 6 ώρες δεν παρατηρήθηκε χρώση στις αποφύσεις, ενώ ο αριθμός των χολινεργικών κυττάρων που εντοπίστηκαν είναι σημαντικά μικρότερος. Στις 12 και 24 ώρες επώασης σε ρυθμιστικό διάλυμα η χρώση έχει εξαλειφθεί πλήρως, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι ο ιστός μας δεν είναι πλέον λειτουργικός (Σχήμα 16).

Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και με τη χρώση TUNEL που χρησιμοποιήθηκε στους ίδιους ιστούς. Στις 2 ώρες δεν παρατηρήθηκε χρώση και επομένως δεν υπήρχαν νεκρά κύτταρα στον ιστό. Αντίθετα, στις 6 ώρες νεκρά κύτταρα άρχισαν να εμφανίζονται, ενώ στις 12 και 24 ώρες υπήρχαν σχεδόν σε όλο τον ιστό (Σχήμα 17).



Σχήμα 16: Επίδραση του χρόνου ex vivo επώασης του ιστού στην ChAT ανοσοδραστικότητα. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της ChAT ανοσοδραστικότητας σε αμφιβληστροειδή αρουραίου σε ιστό που έχει επωαστεί ρυθμιστικό διάλυμα για 2 ώρες (Α), 6 ώρες (Β), 12 ώρες (Γ) και για 24 ώρες (Δ). ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 17: Επίδραση του χρόνου ex vivo επώασης του ιστού στη βιωσιμότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της χρώσης TUNEL σε αμφιβληστροειδή αρουραίου σε ιστό που έχει επωαστεί ρυθμιστικό διάλυμα για 2 ώρες (Α), 6 ώρες (Β), 12 ώρες (Γ) και για 24 ώρες (Δ). ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.

4.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Μία από τις βασικές επιδιώξεις της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη των πιθανών νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων της σωματοστατίνης σε συνθήκες χημικής ισχαιμίας, δεδομένης της νευροπροστατευτικής δράσης της ουσίας αυτής στην επαγόμενη από το NMDA νευροτοξικότητα στον εγκεφαλικό φλοιό και στο μοντέλο απόφραξης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (Forloni και συν., 1997, Rauca και συν., 1999).

Η σωματοστατίνη όμως δεν προστάτευσε τον αμφιβληστροειδή υπό τις συνθήκες του πειράματός μας. Θέλοντας να εξακριβώσουμε την αιτία αυτού του αρνητικού αποτελέσματος μετρήσαμε με ραδιοανοσολογική τεχνική (RIA) τα επίπεδα της σωματοστατίνης στο μέσο επώασης μαζί με το μίγμα χημικής ισχαιμίας. Διαπιστώσαμε ότι η σωματοστατίνη μεταβολίζεται υπό τις συνθήκες της χημικής ισχαιμίας, δεδομένου ότι από 1μΜ σωματοστατίνης παρέμενε 277<u>+</u> 33nM μετά από 30 λεπτά. Στο γρήγορο αυτό ρυθμό μεταβολισμού της σωματοστατίνης αποδόθηκε και η έλλειψη προστατευτικής δράσης.

4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες νευροπροστασίας σωματοστατινεργικά ανάλογα τα οποία είναι σταθερότερα από την ίδια τη σωματοστατίνη, όπως τα sst₂ ανάλογα BIM23014 και MK678, αλλά και η κορτιστατίνη. Το BIM23014 αποτέλεσε το ανάλογο εκείνο με το οποίο έγιναν οι μελέτες σε διαφορετικές συνθήκες ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες όπου θα μπορούσε να προστατευτεί ο ιστός.

Το sst₂ ανάλογο BIM23014 ήταν τελικά ικανό να προστατέψει από τη χημική ισχαιμία όταν ο ιστός επωάστηκε για 1 ώρα (2X30 λεπτά) με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και το BIM23014 σε συγκέντρωση 1μΜ και στη συνέχεια για μια ακόμη ώρα (2X30 λεπτά) μόνο με το ανάλογο αυτό στην ίδια συγκέντρωση. Οι συνθήκες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τις επιδράσεις στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις και ανάλογα.

Ο sst₂ εκλεκτικός αγωνιστής BIM23014 προστάτευσε τον ιστό κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο, αφού σε συγκέντρωση 0,1μΜ δεν επανάφερε την ChAT ανοσοδραστικότητα, ενώ στις συγκεντρώσεις 1μΜ και 10μΜ είχαμε επαναφορά του σήματος τόσο σε βραχύινα κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους και γαγγλιακής στιβάδας όσο και στις αποφύσεις των βραχύινων κυττάρων της εσωτερικής δικτυωτής στιβάδας σε όλο το μήκος του αμφιβληστροειδή (Σχήμα 18).

Το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και μετά από τη χρήση ενός άλλου sst2 εκλεκτικού αγωνιστή, του ΜΚ678 (Σχήμα 19).

Η κορτιστατίνη προστάτευσε και αυτή τα χολινεργικά κύτταρα της εσωτερικής δικτυωτής και γαγγλιακής στιβάδας κατά τον ίδιο συγκεντρωσοεξαρτώμενο με τα sst₂ εκλεκτικά ανάλογα (Σχήμα 20).

87

Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές τόσο τα sst₂ σωματοστατινεργικά ανάλογα όσο και η κορτιστατίνη, επιτυγχάνουν βέλτιστη νευροπροστασία του αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία σε συγκέντρωση 1μΜ. Οι ιστοί της παραπάνω συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν για τις περαιτέρω ανοσοϊστοχημικές μελέτες που αφορούσαν τους διάφορους τύπους κυττάρων του αμφιβληστροειδή καθώς και για την καταμέτρηση των χολινεργικών κυττάρων.



Σχήμα 18: Δράση του sst₂ αναλόγου BIM23014 κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το BIM23014 δεν προστάτευσε τον ιστό όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,1μM (n=3, A) αφού δεν παρατηρείται ChAT ανοσοδραστικότητα. Σε συγκεντρώσεις 1μM(n=5, B) και 10μM (n=3, Γ) το σήμα επανέρχεται. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 19: Δράση του sst₂ αναλόγου ΜΚ678 κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το ΜΚ678 δεν προστάτευσε τον ιστό όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,1μM (n=3, A) αφού δεν παρατηρείται ChAT ανοσοδραστικότητα. Σε συγκεντρώσεις 1μM(n=4, B) και 10μM (n=4, Γ) το σήμα επανέρχεται, κυρίως στα βραχύινα κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 20: Δράση της κορτιστατίνης κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η κορτιστατίνη δεν προστάτευσε τον ιστό όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,1μM (n=3, A) αφού δεν παρατηρείται ChAT ανοσοδραστικότητα. Σε συγκεντρώσεις 1μM(n=5, B) και 10μM (n=3, Γ) το σήμα επανέρχεται. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.

φαίνεται παραπάνω φωτογραφίες Όπως Kai από TIC ŋ νευροπροστασία σε συγκέντρωση 1μΜ των διαφόρων ουσιών που μελετήθηκαν δεν ήταν ούτε πλήρης αλλά και ούτε η ίδια και στις δυο στιβάδες για τα διαφορετικά ανάλογα. Για να υπολογιστεί και ποσοτικά η ποιοτική αυτή εκτίμηση, έγινε η καταμέτρηση των κυττάρων που εκφράζουν ChAT ανοσοδραστικότητα και τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον πίνακα-3. Η κορτιστατίνη και το ΒΙΜ23014 φαίνεται να προστατεύουν τα κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους και της γαγγλιακής στιβάδας εξίσου, με ποσοστό που φτάνει περίπου το 58% για την κορτιστατίνη και το 75% για το ΒΙΜ23014 των κυττάρων που καταμετρούνται στον ιστό μάρτυρα. Το ΜΚ678 φαίνεται να δείχνει μια εκλεκτικότητα, προστατεύοντας σε μεγαλύτερο ποσοστό τα κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας, περίπου 72%, σε αντίθεση με τα κύτταρα της γαγγλιακής στιβάδας όπου φαίνεται να τα προστατεύει σε ποσοστό μόλις 24%.

Πίνακας-3: Ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν ChAT ανοσοδραστικότητα εκφρασμένος ως προς τον % αριθμό κυττάρων του ιστού που είχε επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα κατά τη διάρκεια του πειράματος (n=21). Κορτιστατίνη (n=12), BIM23014 (n=13) και MK678 (n=9). ΕσΚ: Εσωτερική Κοκκώδους στιβάδα, ΓΚ: Γαγγλική στιβάδα.

	% κυττάρων στον ιστό μάρτυρα			
επιδραση νευροπροστασίας	ΕσΚ	ГК	Αμφιβληστροειδής	
Κορτιστατίνη	58,6 ± 11,5	58,1 ± 5,8	58,3 ± 3,9	
BIM23014	77,8 ± 4,9	73,9 ± 7,7	75,9 ± 4,9	
MK678	72,4 ± 5,2	24,1 ± 4,2	49,4 ± 4,6	

Κάποιοι τύποι κυττάρων του αμφιβληστροειδή, όπως τα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία και τα βραχύινα που παράγουν υδροξυλάση της τυροσίνης και νευρωνική συνθάση του ΝΟ· φαίνεται ότι επηρεάζονται από τη χημική ισχαιμία. Στις περιπτώσεις αυτές, η ανοσοδραστικότητα των αντίστοιχων κυτταρικών δεικτών εξαλείφθηκε κάτω από τις συνθήκες της χημικής ισχαιμίας, ενώ παρέμεινε έπειτα από την επίδραση των νευροπροστατευτικών ουσιών (Σχήματα 21, 22, 23).



Σχήμα 21: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της PKC μετά από χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η PKC εντοπίζεται στα κυτταρικά σώματα, τους άξονες και τις απολήξεις των δίπολων κυττάρων που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα κύτταρα σε ιστό μάρτυρα (n=5, A). Καμία χρώση δεν παρατηρείται στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (n=5, B) ή επωάστηκε παρουσία μόνο δεύτερου αντισώματος (Γ). Η κορτιστατίνη (1μΜ, n=4, Δ), το BIM23014 (1μΜ, n=3, Ε) και το MK678 (1μΜ, n=3, Ζ) επαναφέρουν την PKC ανοσοδραστικότητα παρουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας. ΕξΔ: Εξωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 22: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της TH μετά από χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η TH εντοπίζεται στα κυτταρικά σώματα και τις αποφύσεις των βραχύινων κυττάρων της εσωτερικής κοκκώδους και δικτυωτής στιβάδας σε ιστό μάρτυρα (n=5, A). Καμία χρώση δεν παρατηρείται στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (n=5, B) ή επωάστηκε παρουσία μόνο δεύτερου αντισώματος (Γ). Η κορτιστατίνη (1μM, n=3, Δ), το BIM23014 (1μM, n=3, Ε) και το MK678 (1μM, n=3, Ζ) επαναφέρουν την TH ανοσοδραστικότητα παρουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.


Σχήμα 23: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της bNOs μετά από χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η bNOs εντοπίζεται στα κυπαρικά σώματα και τις αποφύσεις των βραχύινων κυπάρων της εσωτερικής κοκκώδους και δικτυωτής στιβάδας σε ιστό μάρτυρα (n=5, A). Καμία χρώση δεν παρατηρείται στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (n=5, B) ή επωάστηκε παρουσία μόνο δεύτερου αντισώματος (Γ). Η κορτιστατίνη (1μΜ, n=3, Δ), το BIM23014 (1μΜ, n=3, Ε) και το MK678 (1μΜ, n=3, Ζ) επαναφέρουν την bNOs ανοσοδραστικότητα παρουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.

Αντίθετα, τα γαγγλιακά κύτταρα δεν φάνηκαν να επηρεάζονται από τη χημική ισχαιμία (Σχήμα 24). Ως εκ τούτου, ανάλογα του sst4 υποδοχέα ο οποίος εντοπίζεται στα γαγγλιακά κύτταρα δεν επέφεραν καμία προστασία κατά τη συγχορήγησή τους με το μίγμα της Χ. Ι.

Δεδομένης της νευροπροστατευτικής δράσης των sst₂ αναλόγων μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της χημικής ισχαιμίας στην έκφραση του sst_{2A} υποδοχέα. Καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε.



Σχήμα 24: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της ΜΑΡ1_Α μετά από χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η ΜΑΡ1_Α εντοπίζεται στα κύτταρα της γαγγλιακής στιβάδας σε ιστό μάρτυρα (Α). Δεν παρατηρούνται μεταβολές στη χρώση του ιστού που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β) παρουσία κορτιστατίνης (1μΜ, Γ), BIM23014 (1μΜ, Δ) ή MK678 (1μΜ, Ε) επαναφέρουν την TH ανοσοδραστικότητα παρουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας. ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

Απώτερος στόχος της παρούσας μελέτη ήταν η διαλεύκανση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα σωματοστατινεργικά ανάλογα διεκπεραιώνουν τις νευροπροστατευτικές τους δράσεις.

4.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Μελέτες σε τομές εγκεφαλικού φλοιού έδειξαν ότι η σωματοστατίνη και το ανάλογό της οκτρεοτίδη προστατεύει τον φλοιό από NMDA διεγερτοτοξικότητα μέσω ενός cGMP-εξαρτώμενου μονοπατιού (Forloni et al., 1997). Επιπρόσθετα, από τις μελέτες του εργαστηρίου μας γνωρίζαμε ότι η σωματοστατίνη ρυθμίζει τα επίπεδα της NO· (Vasilaki et al 2002) και της cGMP (παρούσα μελέτη) μέσω των sst₂ υποδοχέων. Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα σωματοστατινεργικά ανάλογα παρέχουν προστασία μέσω ενός NO·/ cGMP εξαρτώμενου μηχανισμού.

Προκειμένου να ερευνήσουμε αυτήν την υπόθεση μελετήσαμε αρχικά τον προστατευτικό ρόλο της NO· και της cGMP στον αμφιβληστροειδή χρησιμοποιώντας μόρια που αυξάνουν τα επίπεδα της NO· καθώς και το ανάλογο της cGMP 8-βρωμο cGMP. Για την αύξηση των επιπέδων της ΝΟ· χρησιμοποιήθηκε αρχικά η αργινίνη, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα για την παραγωγή της ΝΟ· και ο δότης της ΝΟ· SNP. Στα πειράματα αυτά, οι ιστοί επωάστηκαν με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία ποικίλλων συγκεντρώσεων των παραπάνω ουσιών. Στα Σχήματα 25 και 26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών αυτών. Οι ουσίες αυτές δεν φαίνεται να είναι ικανές να προστατέψουν τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία δεδομένου ότι δεν παρατηρήσαμε αναστολή της επαγόμενης από την ισχαιμία μείωση της ChAT ανοσοδραστικότητας.







Σχήμα 25: Δράση της αργινίνης κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός ChAT ανοσοδραστικότητας σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β) ή έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία αργινίνης 0,05mM (Γ), 0,25mM (Δ) ή 2mM (Ε), n=3. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: Γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.



Σχήμα 26: Δράση του SNP κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός ChAT ανοσοδραστικότητας σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β) ή έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία SNP 0,5mM (Γ), 1mM (Δ), 2mM (Ε) ή 4mM (Ζ), n=3. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: Γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 40μm.

Αντίθετα, το SIN-1 που απελευθερώνει NO· και η 8-Br-cGMP που είναι ένα ανάλογο της cGMP περισσότερο διαπερατό στις μεμβράνες, ήταν ικανά να επαναφέρουν τη χρώση των χολινεργικών κυττάρων που είχε εξαλειφθεί κατά τη χημική ισχαιμία (Σχήμα 27, 28). Το ΝΟΝΟαte που απελευθερώνει ΝΟ· αργά επανέφερε μερικώς τη χρώση των χολινεργικών κυττάρων (Σχήμα 29). Η προστασία που παρέχουν αυτά τα ανάλογα είναι συγκέντρωσο-εξαρτώμενη. Πιο συγκεκριμένα, το SIN-1 όταν συγχορηγείται με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας σε συγκέντρωση 0,1mM, φαίνεται ότι προστατεύει τον ιστό από αυτή. Σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις (0,3 και 1mM), η προστασία φθίνει σαν αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων της ΝΟ·. Το 8-Br-cGMP παρέχει τη μέγιστη προστασία όταν χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0,5mM, ενώ σε μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις (0,1 και 1mM) δεν προκαλεί ικανοποιητική προστασία από τη χημική ισχαιμία. Το ΝΟΝΟαte δρα προστατευτικά κυρίως στη συγκέντρωση 5μM χωρίς όμως να παρατηρούμε πλήρη προστασία από τη χημική ισχαιμία.



Σχήμα 27: Δράση του SIN-1 κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός ChAT ανοσοδραστικότητας σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β). Η χρώση επαναφέρεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία SIN-1 0,1mM (Γ), ενώ αρχίζει να φθίνει εντυπωσιακά ο αριθμός των κυττάρων στον ιστό στις συγκεντρώσεις 0,3mM (Δ) και 1mM (Ε), n=3. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.



Σχήμα 28: Δράση της 8-Br-cGMP -1 κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός ChAT ανοσοδραστικότητας σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β). Η χρώση επαναφέρεται μερικώς στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία 8-Br-cGMP 0,1mM (Γ) και 1mM (Ε), ενώ σε συγκέντρωση 0,5mM (Δ) η επαναφορά είναι σχεδόν πλήρης, n=3. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και κατά τη σήμανση με TUNEL των αποπτωτικών κυττάρων (Σχήμα 30). Στον ιστό μάρτυρα δεν εμφανίζονται αποπτωτικά κύτταρα, όπως και στον ιστό που έχει προστατευτεί από τη χημική ισχαιμία (SIN-1 0,1mM και 8-Br-cGMP 0,5mM), ενώ μικρός αριθμός αποπτωτικών κυττάρων εμφανίζεται στον ιστό που έχει προστατευτεί μερικώς (NONOate 5μM). Η σήμανση πολλών αποπτωτικών κυττάρων είναι εμφανής στους ιστούς που είχαν υποστεί χημική ισχαιμία, καθώς επίσης και στους ιστούς όπου οι ουσίες SIN-1 (1mM), NONOate (1μM) και 8-Br-cGMP (0,1mM) δε στάθηκαν ικανές να τον προστατέψουν.



Σχήμα 29: Δράση του NONOate κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός ChAT ανοσοδραστικότητας σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β). Η χρώση επαναφέρεται ελάχιστα στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία NONOate 1μΜ (Γ) και 10μΜ (Ε), ενώ σε συγκέντρωση 5μΜ (Δ) παρατηρήθηκε η μέγιστη επαναφορά που όμως δεν ήταν πλήρης, n=3. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.



Σχήμα 30: Αντιαποπτωτική δράση των 8-Br-cGMP, SIN-1 και NONOate κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Σήμανση με TUNEL αποπτωτικών κυττάρων. Στον ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α) δεν εμφανίζονται αποπτωτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β). Απουσία αποπτωτικών κυττάρων παρατηρείται στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία 8-Br-cGMP 0,5mM (Γ) ή SIN-1 0,1mM (Ε) και λίγα αποπτωτικά κύτταρα σε αυτόν που έχει επωαστεί με ΝΟΝΟαte 5μM (Θ), εξαιτίας της προστασίας που του παρέχουν. Σε συγκεντρώσεις 8-Br-cGMP 0,1mM (Δ) ή SIN-1 1mM (Ζ) ή NONOate 1μM (Η) παρουσία του μίγματος χημικής ισχαμίας εμφανίζονται αποπτωτικά κύπαρα και καμία προστασία δεν παρέχεται στον ιστό. ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

4.6.1 Επίδραση του SIN-1/L-κυστεΐνη στη Χημική Ισχαιμία

Όπως προαναφέρθηκε το SIN-1 μεταβολίζεται σε περοξυνιτρώδες το οποίο μπορεί να δρα νευροπροστατευτικά. Για να ελεγχθεί λοιπόν αν η προστατευτική δράση του SIN-1 οφείλεται στο περοξυνιτρώδες, εξετάστηκε το κατά πόσο η L-κυστεΐνη, η ουσία που απομακρύνει το ανεπιθύμητο περοξυνιτρώδες, αναστέλλει τις προστατευτικές δράσεις του SIN-1 στη χημική ισχαιμία. Η L-κυστεΐνη μείωσε μερικώς τη προστατευτική δράση του SIN-1, όπως φαίνεται και στο σχήμα 31, αφού υπήρχε σήμανση κάποιων χολινεργικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τη χρώση TUNEL (Σχήμα 32).



Σχήμα 31: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός ChAT ανοσοδραστικότητας σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β). Η χρώση επαναφέρεται στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία SIN-1 0,1mM (Γ), ενώ παρουσία και της L-κυστεΐνης 5mM (Δ), παρατηρείται χρώση λίγων χολινεργικών κυττάρων. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.



Σχήμα 32: Σήμανση με TUNEL αποπτωτικών κυττάρων. Στον ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α) δεν εμφανίζονται αποπτωτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (Β). Απουσία αποπτωτικών κυττάρων παρατηρείται στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία SIN-1 0,1mM (Γ), ενώ παρουσία SIN-1 0,1mM/L-κυστεΐνης 5mM (Δ), παρατηρούνται αρκετά αποπτωτικά κύτταρα που μαρτυρούν τη μερική προστασία του ιστού. ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

4.6.2 Επίδραση του SIN-1

Μετά από την επιτυχή προσπάθεια νευροπροστασίας με την παροχή κατάλληλων συγκεντρώσεων της ΝΟ· μέσω χορήγησης του SIN-1, μελετήσαμε την επίδραση του αναλόγου αυτού σε υγιείς ιστούς, για να εξακριβώσουμε εάν το SIN-1 σε κάποιες συγκεντρώσεις μπορεί να δρα και τοξικά. Οι ιστοί που επωάστηκαν με SIN-1 σε συγκεντρώσεις 0,1 και 1mM φάνηκαν να μην επηρεάζουν τον ιστό στην έκφραση των χολινεργικών κυπάρων. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 3mM, ο ιστός παρουσίασε μεγάλη μείωση της

έκφρασης των χολινεργικών κυττάρων, όπως και πλήθος αποπτωτικών κυττάρων, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι παρήχθησαν υψηλές συγκεντρώσεις της NO-, τοξικές για τον ιστό (Σχήμα 33, 34).



Σχήμα 33: Συγκριτική δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων SIN-1 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημική χρώση για την ChAT σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Στον ιστό που έχει επωαστεί με SIN-1 0,1mM (Β) ή SIN-1 1mM (Γ) δεν εμφανίζεται απώλεια των χολινεργικών κυττάρων, όπως συμβαίνει στον ιστό που έχει επωαστεί με SIN-1 3mM (Δ), n=2. ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.



Σχήμα 34: Αντιαποπτωτική δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων SIN-1 κατά τη χημική ισχαιμία σε αμφιβληστροειδή αρουραίου. Σήμανση με TUNEL αποπτωτικών κυττάρων. Στον ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α) ή με τη χαμηλή συγκέντρωση SIN-1 0,1mM (Β) δεν εμφανίζονται αποπτωτικά κύτταρα. Στον ιστό που έχει επωαστεί με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση SIN-1 3mM (Γ) παρουσιάζονται αποπτωτικά κύτταρα. ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

4.6.3 Επίδραση του αναστολέα της συνθάσης της ΝΟ· ΝΜΜΑ στη νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014

Ta παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της νευροπροστατευτικής δράσης της NO και της cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το ερώτημα που αφορά τον αρχικό μας στόχο είναι: Το σηματοδοτικό μονοπάτι NO/ cGMP εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές σωματοστατίνης μέσω υποδοχέων δράσεις της των sst₂ στον αμφιβληστροειδή; Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα, εξετάστηκε αν η αναστολή της συνθάσης της ΝΟ· και ως εκ τούτου η μείωση των επιπέδων της NO· είναι ικανή να αναστρέψει την προστατευτική δράση του sst2 αγωνιστή BIM23014. Το NMMA, ο αναστολέας όλων των ισομορφών της συνθάσης της ΝΟ, ανέστειλε την προστατευτική δράση του ΒΙΜ23014, αφού δεν παρουσιάστηκε χρώση χολινεργικών κυττάρων κατά την επώαση του ιστού με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας παρουσία BIM23014 1μM και NMMA 0,5mM (Σχήμα 35).



Σχήμα 35: Επίδραση του αναστολέα της συνθάσης της ΝΟ· ΝΜΜΑ στη νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014 κατά τη χημική ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημική χρώση για την ChAT σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας (Β). Το σήμα επαναφέρεται στον ιστό που έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και ΒΙΜ23014 1μΜ (Γ), ενώ εξαφανίζεται όταν έχει επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας/ΒΙΜ23014 1μΜ/ΝΜΜΑ 5mM (Δ). ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

4.6.4 Επίδραση των αναστολέων της γουανυλικής κυκλάσης στη νευροπροστατευτική δράση του ΒΙΜ23014

Για να αποδειχθεί ότι η νευροπροστασία που παρέχουν τα sst2 ανάλογα, μέσω της αύξησης των επιπέδων της ΝΟ-, διαμεσολαβείται από την αύξηση των επιπέδων της cGMP λόγω ενεργοποίησης της γουανυλικής κυκλάσης από την ΝΟ-, χρησιμοποιήσαμε τον ειδικό αναστολέα της γουανυλικής κυκλάσης που χρησιμοποιείται ευρέως τον ODQ, αλλά και τον NS2028 για την καλύτερη δραστικότητά του. Όταν οι αναστολείς ODQ και NS2028 συγχορηγήθηκαν με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και το sst2 ανάλογο BIM23014, δεν παρουσιάστηκε νευροπροστασία αφού δεν παρατηρήθηκε χρώση χολινεργικών κυττάρων στους ιστούς (Σχήμα 36). Με τη χρώση TUNEL επιβεβαιώθηκε το αποτέλεσμα αυτό, αφού στον ιστό που επωάστηκε με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας, το BIM23014 και τον αναστολέα ODQ παρατηρήθηκε η ύπαρξη πολλών αποπτωτικών κυττάρων όπως και στον ιστό που επωάστηκε μόνο με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας (Σχήμα 37). Αντίθετα στους ιστούς που επωάστηκαν με PBS ή με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και BIM23014 καμία χρώση TUNEL δεν ήταν ορατή.



Σχήμα 36: Αναστολή της νευροπροστατευτικής δράσης του sst₂ αγωνιστή BIM23014 από τους αναστολείς της γουανυλικής κυκλάσης ODQ και NS2028 κατά τη χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημική χρώση για την ChAT σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α). Καμία χρώση δεν παρατηρείται κατά την επώαση με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας (Β), παρουσία BIM23014 1μM/ODQ 100μM (Δ) ή BIM23014 1μM/NS2028 50μM (Ε). Επναφορά του σήματος παρατηρείται κατά την επώαση με το μίγμα X.I. και BIM23014 1μM (Γ). ΕσΚ: Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, ΕσΔ: Εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.



Σχήμα 37: Αναστολή της αντιαποπτωτικής δράσης του sst₂ αγωνιστή BIM23014 από τον αναστολέα της γουανυλικής κυκλάσης ODQ ατά τη χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. TUNEL σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (Α), με το μίγμα Χ.Ι. (Β) παρουσία BIM23014 1μM (Γ) ή BIM23014 1μM /ODQ 100μM (Δ). ΓΚ: γαγγλιακή στιβάδα. Κλίμακα: 50μm.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SST1 ΚΑΙ SST2 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Όπως είναι γνωστό, η σωματοστατίνη (SRIF) ανακαλύφθηκε το 1968 και χαρακτηρίστηκε ως η υποθαλαμική εκείνη ουσία η οποία ήταν ικανή να αναστείλει την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση (Krulich και συν., 1968). Η απομόνωση και ταυτοποίησή της σωματοστατίνης ως πεπτίδιο έγινε λίγα χρόνια αργότερα από τον Brazeau και τους συνεργάτες του οι οποίοι ανίχνευσαν το κυκλικό δεκατετραπεπτίδιο SRIF-14 σε καλλιέργειες κυττάρων αδενοϋπόφυσης αρουραίου (Brazeau et al., 1973). Οι δράσεις αυτές διαμεσολαβούνται από υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεϊνες (Kossut και συν., 1990, Vasilaki και συν., 2003). Έχουν κλωνοποιηθεί πέντε διαφορετικοί υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης, oi sst₁, sst₂ (sst_{2A} και sst_{2B}), sst₃, sst4 και sst5 (Bruno και συν., 1992, Meyerhof και συν., 1992, O'Carroll και συν., 1992, Yamada και συν., 1992). Η κλωνοποίηση αυτή οδήγησε στη μελέτη τους σε μοριακό επίπεδο και στη δημιουργία κυτταρικών σειρών οι οποίες εκφράζουν σταθερά τους διάφορους υπότυπους. Στον αμφιβληστροειδή η σωματοστατίνη εντοπίζεται σε βραχύινα κύτταρα της έσω πυρηνικής στιβάδας και σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα της στιβάδας των γαγγλιακών κυττάρων του και φαίνεται να δρα ως νευροδιαβιβαστής, νευροτροποιητής ή τροφικός παράγοντας (Shapiro και συν., 1979, Sagar και συν., 1982, Zalutsky και Miller, 1990, Akopian και συν., 2000). Στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών εντοπίζεται η ύπαρξη του mRNA όλων των σωματοστατινεργικών υποδοχέων (Mori και συν., 1997), ενώ ανοσοϊστοχημικά εκφράζονται οι sst1, sst2, sst4 και sst5 (Cristiani και συν., 2000, Johnson και συν., 1998, Vasilaki και συν., 2001, Vasilaki και συν., 2002, Brecha και συν., 2002, Ke και Zhong, 2007, Kiagiadaki και συν., 2010).

Η σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού σταθερών σωματοστατινεργικών αγωνιστών και πρόσφατα ανταγωνιστών (Bell & Reisine, 1993, Patel & Srikant, 1994, Rohrer και συν., 1998, Reubi και συν., 2000, Hoyer και συν., 2002, Tulipano και συν., 2002) συνετέλεσε στην πραγματοποίηση μελετών που οδήγησαν στη λειτουργική χαρτογράφηση των υποδοχέων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Έμφαση δόθηκε στη διασαφήνιση του λειτουργικού ρόλου των sst₂ και sst₁ σωματοστατινεργικών υποδοχέων οι οποίοι αποτελούν μαζί με τον sst₄ τους σημαντικότερου υποδοχείς στον ιστό.

5.1.1 Λειτουργική χαρτογράφηση των sst2 υποδοχέων

Στον αρουραίο, η sst_{2A}-ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται στα κωνιοφόρα και οριζόντια κύτταρα, στα δίπολα κύτταρα που σχετίζονται τόσο με ραβδιοφόρα όσο και με κωνιοφόρα κύτταρα, σε μεσαίου και μεγάλου μεγέθους βραχύινα κύτταρα που περιέχουν την υδροξυλάση της τυροσίνης καθώς και σε ίνες κυττάρων Müller (Johnson και συν., 1999, Helboe και Møller, 1999, Vasilaki και συν., 2001). Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμό του sst_{2B} υπότυπου παρατηρείται μόνο σε φωτοϋποδοχείς (Vasilaki και συν., 2001).

Η σωματοστατίνη επηρεάζει την κυτταρική δραστηριότητα και τη νευρωνική απελευθέρωση στους φωτοϋποδοχείς αλλά και στον έσω αμφιβληστροειδή ρυθμίζοντας ιοντικούς διαύλους καλίου και ασβεστίου (Akopian kai ouv., 2000, Ayoub kai Matthews, 1992, Johnson kai ouv., 2001). Σε απομονωμένα δίπολα κύτταρα έχει διαπιστωθεί ότι η δράση αυτή της σωματοστατίνης διαμεσολαβείται από τους sst2 υποδοχέων (Petrucci και συν., 2001), οι οποίοι φαίνεται να είναι επίσης υπεύθυνοι και για τη ρύθμιση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος από τα κύτταρα αυτά. Επίσης βρέθηκε ότι η σωματοστατίνη και το sst2 ανάλογό της, οκτρεοτίδη, έχουν διεγερτικές δράσεις στα γαγγλιακά κύτταρα, ενώ επηρεάζουν και τη δραστηριότητα των δίπολων και βραχύινων κυττάρων και αυτή του δικτύου των οριζόντιων κυττάρων (Zalutsky και Miller, 1990). Το σωματοστατινεργικό σύστημα φαίνεται επίσης ότι παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού тων ραβδιοφόρων κυττάρων, αλληλεπιδρώντας Jμ άλλους νευροτροποποιητές κατά τη διαδικασία προσαρμογής στο φως. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της εξωκυττάριας ντοπαμίνης αυξάνονται στον αμφιβληστροειδή καθώς αυξάνεται η ένταση του φωτός (Djamgoz και Wagner, 1992, Boelen και συν., 1998), ενώ πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό

μας έδειξαν ότι η σωματοστατίνη μέσω ενεργοποίησης των sst2 υποδοχέων αυξάνει τα επίπεδα της ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Kouvidi και συν., 2006).

Άλλες μελέτες του εργαστηρίου μας, έδειξαν ότι οι sst₂A και sst₂B σωματοστατινεργικοί υποδοχείς συνεντοπίζονται με το ένζυμο NADPHδιαφοράση (Vasilaki και συν., 2001) το οποίο αποτελεί δείκτη της ύπαρξης της συνθάσης της NO. Όπως είναι γνωστό, η συνθάση της NO οξειδώνει την Lαργινίνη και απελευθερώνει NO· και κιτρουλίνη. Στη συνέχεια, όπως έχει περιγραφεί σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η NO· ενεργοποιεί μια διαλυτή γουανυλική κυκλάση η οποία μετατρέπει τη GTP σε cGMP (Moncada και συν., 1988, Knowles και συν., 1989). Με δεδομένο ότι παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της NO· μετά από ενεργοποίηση των sst₂ υποδοχέων (Vasilaki και συν., 2002), στην παρούσα μελέτη εστιάσαμε στη διασαφήνιση της δράσης της σωματοστατίνης στα επίπεδα της cGMP καθώς και τους μηχανισμούς που διέπουν τη διαδικασία αυτή.

Η cGMP μέσω της ενεργοποίησης της PKG ρυθμίζει τη λειτουργία διαύλων ιόντων. Προκειμένου να μελετήσουμε την πιθανή εμπλοκή της cGMP δράσεις της σωματοστατίνης εξετάσαμε την επίδραση της στις σωματοστατίνης και των sst2 σωματοστατινεργικών αναλόγων στα επίπεδα της cGMP στον αμφιβληστροειδή. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ELISA για τη μέτρηση των επιπέδων cGMP μετά από φαρμακολογική επίδραση στον αμφιβληστροειδή και διαπιστώθηκε ότι: η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0,01μΜ, 0,1μΜ, 1μΜ και 10μΜ) σωματοστατίνης σε απομονωμένο αμφιβληστροειδή αρουραίου αύξησε τα επίπεδα της cGMP με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο. Στη συγκέντρωση των 0,1µM η σωματοστατίνη αύξησε τα επίπεδα της cGMP κατά το μεγαλύτερο ποσοστό (290,1 ± 24,6%) σε σχέση με τα βασικά επίπεδα. Η αύξηση των επιπέδων της cGMP από τη σωματοστατίνη φαίνεται ότι πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης των sst2 σωματοστατινεργικών υποδοχέων, μια και ο sst2 ανταγωνιστής CYN-154806 (1μΜ), συγχορηγούμενος με τη σωματοστατίνη (0,1μΜ), μπόρεσε να αναστείλει την προκαλούμενη από αυτή αύξηση των επιπέδων της cGMP. Επιπρόσθετα, η χρήση του sst2 εκλεκτικού αγωνιστή BIM23014 στις ίδιες συγκεντρώσεις (0,1-10μM) επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα

αυτό μια και ο αγωνιστής αυτός προκάλεσε όπως και η σωματοστατίνη αύξηση των επιπέδων της cGMP. Εντούτοις, η μεγαλύτερη αύξηση (251,8 ± 53,3%) των επιπέδων της cGMP από το BIM23014 πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση της υψηλότερης συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε (10μΜ). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας σύμφωνα με την οποία το BIM23014 ήταν ικανό να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της NO· στον αμφιβληστροειδή αρουραίου στην ίδια και όχι σε μικρότερη από αυτή συγκέντρωση (Vasilaki και συν., 2002). Στις μικρότερες συγκεντρώσεις είναι πιθανό να μην υπήρχε μεγάλη διεισδυτικότητα του αναλόγου στον ιστό κι έτσι να μην υπήρχε μεγάλη διεισδυτικότητα του αναλόγου στον ιστό κι έτσι να μην ήταν ικανό να δράσει. Τέλος, στις μελέτες αυτές χρησημοποιήθηκε το sst₃ ανάλογο L-796,778 ως αρνητικός μάρτυρας μια και οι sst₃ σωματοστατινεργικοί υποδοχείς δεν εκφράζονται στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών (Thermos, 2003). Όπως ήταν αναμενόμενο, το ανάλογο αυτό δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της cGMP.

Για να επιβεβαιωθεί η εμπλοκή της συνθάσης της ΝΟ· και κατά συνέπεια της ΝΟ·, στην προκαλούμενη από τη σωματοστατίνη αύξηση των επιπέδων της cGMP, χρησιμοποιήθηκε ο μη εκλεκτικός ανταγωνιστής της συνθάσης της ΝΟ·, ΝΜΜΑ. Χορήγηση σωματοστατίνης παρουσία του ανταγωνιστή (250μΜ) παρεμπόδισε την προκαλούμενη από τη σωματοστατίνη αύξηση των επιπέδων cGMP γεγονός που υποδηλώνει ότι αναστολή της σύνθεσης της ΝΟ· παρεμποδίζει τη δράση της σωματοστατίνης στα επίπεδα της cGMP. Επιπλέον, χορήγηση αργινίνης (250μΜ) στον ιστό, η οποία όπως προαναφέρθηκε αποτελεί πρόδρομο μόριο της ΝΟ·, μιμήθηκε τη δράση της σωματοστατίνης, αυξάνοντας τα επίπεδα της κυκλικής GMP. Οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν ότι η δράση της σωματοστατίνης στα επίπεδα cGMP σχετίζεται με την ενεργοποίηση της συνθάσης της ΝΟ· και την παραγωγή ΝΟ·.

Επιπλέον, με δεδομένο ότι, στον αμφιβληστροειδή αρουραίου τόσο οι sst2 υποδοχείς (Johnson και συν., 1999) όσο και η διαλυτή μορφή της γουανυλικής κυκλάσης (Ahmad και Barnstable, 1993) εντοπίζονται σε δίπολα κύτταρα εξετάσαμε την επίδραση της σωματοστατίνης στα επίπεδα της cGMP σε κυτταρικό επίπεδο ανοσοϊστοχημικά. Γνωρίζοντας ότι η cGMP μεταβολίζεται σε GMP, χρησιμοποιήθηκε ο μη εκλεκτικός αναστολέας των φωσφοδιεστερασών, IBMX για την αποτελεσματικότερη ανίχνευση της cGMP.

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμιά ανοσοδραστικότητα στους ιστούς που είχαν υποστεί την επίδραση ή όχι του ΙΒΜΧ. Όμως, η επώαση του ιστού με το δότη της NO- νιτροπρουσσιδίου (SNP) αύξησε τα επίπεδα της cGMP. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε cGMP-ανοσοδραστικότητα στα δίπολα κύτταρα ανάλογη με αυτή που διαπίστωσε ο Johansson και οι συνεργάτες του (2000). Η χορήγηση σωματοστατίνης αλλά και του sst2 αναλόγου L-779,976 δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα μια και όπως στους ιστούς μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε καθόλου cGMP-ανοσοδραστικότητα στον αμφιβληστροειδή. Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι, ο τίτλος του αντι-cGMP αντισώματος που χρησιμοποιήσαμε δεν ήταν αρκετά υψηλός με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευση τόσο της βασικής όσο και της επαγόμενης από τα σωματοστατινεργικά ανάλογα αύξησης των επιπέδων της cGMP στον ιστό. Με το συγκεκριμένο αντίσωμα ήταν εφικτή η ανίχνευση της επαγόμενης από το νιτροπρουσσίδιο αύξησης της cGMP-ανοσοδραστικότητας πιθανά γιατί, το νιτροπρουσσίδιο προκαλεί εξεσημασμένη αύξηση της ΝΟ· ικανή να οδηγήσει σε ανοσοϊστοχημικά ανιχνεύσιμα επίπεδα cGMP.

Η σωματοστατίνη έχει βρεθεί ότι αποτελεί πολύ σημαντικό ρυθμιστή των ιοντικών διαύλων καλίου και ασβεστίου δρώντας μέσω των sst₂ υποδοχέων της σε αμφιβληστροειδή σαλαμάνδρας και κουνελιού (Akopian και συν., 2000, Petrucci και συν., 2001), ρυθμίζοντας ενδεχομένως και την απελευθέρωση του γλουταμικού οξέος. Στις δράσεις αυτές της σωματοστατίνης είναι πιθανό να εμπλέκεται ένα cGMP-εξαρτώμενο μονοπάτι πρωτεϊνικής κινάσης (Meriney και συν., 1994). Επίσης, η σωματοστατίνη μέσω ενεργοποίησης των sst₂ υποδοχέων προκαλεί τη δραστηριοποίηση της τυροσινο-φωσφατάσης SHP-1, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της νευρωνικής μορφής της συνθάσης της ΝΟ· (nNOs) (Lopez και συν., 2001). Η nNOs αποτελεί το υπόστρωμα για την τυροσινοφωσφατάση SHP-1, η οποία αποφωσφορυλιώνει τη nNOS, αυξάνει την παραγωγή της NO· και επομένως και τα επίπεδα της cGMP.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την παρουσία ή όχι ενός ανάλογου sst2/SHP-1/NOS/cGMP μονοπατιού στον αμφιβληστροειδή, μελετήσαμε την παρουσία της SHP-1 στον ιστό καθώς επίσης και το ρόλο του στην επαγόμενη από τη σωματοστατίνη αύξηση της cGMP. Διαπιστώσαμε ότι, η SHP-1 εντοπίζεται στον αμφιβληστροειδή, καθώς επίσης και ότι ταυτόχρονη χορήγηση του ανταγωνιστή της SHP-1 ορθοβαναδικό νάτριο και

σωματοστατίνης οδηγεί στη μείωση των επαγόμενων από τη σωματοστατίνη επιπέδων της cGMP γεγονός που (i) υποδεικνύει την ύπαρξη στον ιστό ενός μηχανισμού δράσης της σωματοστατίνης στον οποίο εμπλέκεται η τυροσινοφωσφατάση SHP-1 και (ii) ενισχύει την άποψη ότι η SHP-1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της συνθάσης της NO· από τη σωματοστατίνη.

Η σωματοστατίνη, όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, είναι ένα ανασταλτικό πεπτίδιο. Ωστόσο, μέσω των παραπάνω μηχανισμών αναδείχθηκαν και οι διεγερτικές της δράσεις ως προς την αύξηση των επιπέδων της NO· και της cGMP.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδηλώνουν ότι η σωματοστατίνη διεκπεραιώνει τις φυσιολογικές δράσεις στον αμφιβληστροειδή μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τους sst₂ υποδοχείς, την SHP-1, την NO· και την cGMP (SRIF / sst₂ / SHP-1 / NO· / cGMP). Η ρύθμιση των επιπέδων της cGMP από τη σωματοστατίνη είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία του αμφιβληστροειδή μια και όπως είναι γνωστό η cGMP παίζει αξιόλογο ρόλο στη ρύθμιση ιοντικών διαύλων (Wei και συν., 1998), στη διαμόρφωση των χασματοσυνδέσμων μεταξύ των οριζόντιων κυττάρων (DeVries και Schwartz, 1989) καθώς επίσης και στη διαμόρφωση των χασματοσυνδέσμων ανάμεσα στα βραχύινα κύτταρα και στα δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα κωνιοφόρα (Mills και Massey,1995).

5.1.2 Λειτουργική χαρτογράφηση των sst1 υποδοχέων

Επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διαλεύκανση του λειτουργικού ρόλου του sst1 σωματοστατινεργικού υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η ανοσοδραστικότητα του sst1 υπότυπου εντοπίζεται σε κύτταρα του αμφιβληστροειδή αρουραίου, κουνελιού και ανθρώπου (Cristiani και συν., 2000, Klisovic και συν., 2001, Vasilaki και συν., 2002), μεταξύ των οποίων και βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν σωματοστατίνη (Cristiani και συν., 2000, Helboe και Möller, 1999). Ο συνεντοπισμός του sst1 υποδοχέα και της σωματοστατίνης στα βραχύινα κύτταρα προτείνει ένα ρόλο αυτοϋποδοχέα για τον sst1. Ο άμεσος τρόπος εξακρίβωσης του εκλεκτικού ρόλου του sst1 ως αυτοϋποδοχέα είναι η μελέτη της

επίδρασης εκλεκτικού sst1 αγωνιστή στα επίπεδα της σωματοστατίνης, μια και η ενεργοποίηση ενός αυτοϋποδοχέα ρυθμίζει αρνητικά την περαιτέρω απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Πριν όμως μελετηθεί ο ρόλος της του sst ως αυτοϋποδοχέας ήταν απαραίτητο να εξακριβώσουμε τη νευρωνική απελευθέρωση της σωματοστατίνης, κάτι που δεν είχε μελετηθεί πρωτύτερα στον αμφιβληστροειδή. Τα επίπεδα της σωματοστατίνης μετρήθηκαν στα 1,815 ± 0,206 pgr/μgr πρωτείνης. Η επώαση του ιστού με ιόντα καλίου (100mM KCI) συνέβαλε στην απελευθέρωση της σωματοστατίνης και στην αύξηση των επιπέδων της. Η μικρότερη συγκέντρωση του ΚCI που χρησιμοποιήθηκε (50mM), δεν επηρέασε την απελευθέρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Αυτό είναι σε συμφωνία με άλλες έρευνες όπου η συγκέντρωση αυτή δεν επηρεάζει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμινικό, το ασπαρτικό και το GABA (Neal και συν., 1994). Επιπλέον, η απουσία ιόντων ασβεστίου μείωσαν τα επίπεδα της σωματοστατίνης. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν ότι η απελευθέρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή είναι κάλιο- και ασβέστιοεξαρτώμενη, και άρα νευρωνική.

Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι ο εκλεκτικός αγωνιστής για τον sst σωματοστατινεργικό υποδοχέα CH275 ρύθμισε την απελευθέρωση της σωματοστατίνης μειώνοντας τα επίπεδά της στις συγκεντρώσεις 10-5 και 10-6 Μ. Η αναγκαιότητα χρήσης τόσο υψηλών συγκεντρώσεων, οφείλεται πιθανότητα στη μικρή διεισδυτικότητα του αναλόγου στον ιστό, ή ακόμα και στο μικρό αριθμό των βραχύινων κυττάρων τα οποία εκφράζουν τον sst υποδοχέα. Χορήγηση του sst1 ανταγωνιστή NVP-SRA 880 πριν τη χορήγηση του CH275, ανέστρεψε τη δράση του αγωνιστή γεγονός που αποδεικνύει τη φαρμακολογική εκλεκτικότητα του αγωνιστή. Κατά την επίδραση μόνο του ανταγωνιστή στον αμφιβληστροειδή θα αναμέναμε την επαγωγή της απελευθέρωση της σωματοστατίνης εξαιτίας της παρεμπόδισης των sst υποδοχέων που δρουν ανασταλτικά. Σύμφωνα με τις μελέτες μας η απελευθέρωση της σωματοστατίνης δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη χορήγηση του sst1 ανταγωνιστή, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες, στις οποίες η χορήγηση ειδικού ανταγωνιστή του αυτοϋποδοχέα της σεροτονίνης δεν οδήγησε σε αύξηση της απελευθέρωσης του νευροδιαβιβαστή (de Groote και συν., 2002). Παρουσία όμως KCl, ο

ανταγωνιστής των ssti σωματοστατινεργικών υποδοχέων αύξησε τα επίπεδα της σωματοστατίνης σε σχέση με εκείνα παρουσία μόνο του KCI. Επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο ssti υποδοχέας δρα σαν αυτοϋποδοχέας, όπως προτείνεται σε προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές μελέτες τόσο στον αμφιβληστροειδή (Helboe και Møller, 1999, Cristiani και συν., 2000, Dal Monte και συν., 2003β) όσο και στον εγκέφαλο (Helboe και συν., 1998, Schulz και συν., 2000), και επιβεβαιώνεται άμεσα σε μελέτες μικροδιαπίδυσης στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος αρουραίου (Vasilaki και συν., 2004) αλλά και σε μεταγενέστερες μελέτες σε κυτταρική σειρά παγκρέατος (Roosterman και συν., 2007).

Η χορήγηση του sst₂ εκλεκτικού αναλόγου ΜΚ678, δεν επηρεάζει την απελευθέρωση της ενδογενούς σωματοστατίνης, γεγονός που επαληθεύει το μη συνεντοπισμό του sst₂ υποδοχέα της σωματοστατίνης σε κύτταρα που περιέχουν σωματοστατίνη (Thermos, 2003) και τον εκλεκτικό ρόλο του sst₁ ως αυτοϋποδοχέα του νευροπεπτιδίου.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, η μελέτη αυτή απέδειξε τη νευρωνική απελευθέρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή και ήταν η πρώτη που ανέδειξε την ύπαρξη ενός αυτοϋποδοχέα πεπτιδίου στον ιστό.

5.2 ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟ

Η ανεύρεση νευροπροστατευτικών παραγόντων για τη θεραπεία αμφιβληστροειδοπαθειών, αποτελεί τα τελευταία χρόνια το στόχο έντονης ερευνητικής προσπάθειας. Έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη νεοαγγείωση και τη νευροεκφύλιση του αμφιβληστροειδούς οι οποίες αποτελούν κοινό τόπο ασθενειών όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας και οι αμφιβληστροειδικές αρτηριακές/φλεβικές αποφράξεις και αγγειίτιδες. Η ερευνητική αυτή προσπάθεια έχει οδηγήσει την ανάπτυξη επεμβατικών μεθόδων και φαρμακολογικών σκευασμάτων χρήσιμων για την αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδή εντούτοις, δεν έχει ακόμα επιτύχει την

ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών για την αντιμετώπιση της εκφύλισης του αμφιβληστροειδή. Η κύρια θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και της γεροντικής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας παραμένει ακόμη και σήμερα η φωτοπηξία με laser μόνη ή σε συνδυασμό με συστηματική χορήγηση φωτοευαίσθητων πορφυρινών (φωτοδυναμική θεραπεία, MPS 1991, 1994α, 1994β). Τα τελευταία πέντε χρόνια εγκρίθηκε από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) η χρήση αντι-VEGF παραγόντων (Cunningham και συν., 2005, Ferrara και συν., 2006, 2007, Brown και συν., 2006, Rosenfeld και συν., 2005, 2006α, 2006β, Schmidt-Erfurth και συν., 2006, The Macugen Diabetic Retinopathy Study Group 2005, 2006, Avery και συν., 2006). Τα αποτελέσματα των αντι-VEGF φαρμάκων είναι θεαματικά και έχουν δώσει ελπίδες σε ασθενείς. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά δεν στερούνται παρενεργειών και δεν αντιμετωπίζουν την εκφύλιση του αμφιβληστροειδή.

Για την πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών, η θεραπεία θα πρέπει να στοχεύει όχι μόνο στη νεοαγγείωση αλλά και στον κυτταρικό θάνατο. Τα φάρμακα τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να μειώνουν τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος, να αναστέλλουν τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς, να μειώνουν τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου, να αναστέλλουν τον προκαλούμενο από την ισχαιμία αποπτωτικό θάνατο (Εικόνα – 12).

Η σωματοστατατίνη ήταν γνωστή για τις αντινεοαγγειακές της δράσεις. λόγω της αρνητικής ρύθμισης που προκαλεί στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης. Τα sst2 εκλεκτικά σωματοστατινεργικά ανάλογα αναστέλλουν τη νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδή μέσω μείωσης των επιπέδων της GH και του IGF (Grant και συν., 1986, Smith και συν., 1997, Higgins και συν., 2002). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν επίσης ότι η σωματοστατίνη ρυθμίζει αρνητικά και τα επίπεδα του VEGF (Dal Monte και συν., 2007). Αντιαγγειογενετική δραστικότητα διαθέτουν επίσης και τα μη πεπτιδικά σωματοστατινεργικά ανάλογα NISAs (non peptide imidazolidin-2,4-dione SRIF receptor agonists) μετά τη συστημική χορήγησή τους σε συγκεντρώσεις της τάξης των μΜ στο μοντέλο της επαγόμενης από το οξυγόνο αμφιβληστροειδοπάθειας νεογνών και στο μοντέλο της επαγόμενης από το laser χοριοειδούς νεοαγγείωσης, σε ποντίκια (Palii και συν., 2008).

Εκτός από τις αντινεοαγγειακές της δράσεις, η σωματοστατίνη έχει πιθανά και νευροπροστατευτική δράση. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μελέτες στον εγκέφαλο οι οποίες υποστηρίζουν ότι η σωματοστατίνη και τα εκλεκτικά για τον sst2 υποδοχέα ανάλογά της προστάτευσαν νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού από διεγερτοτοξικότητα οφειλόμενη στα διεγερτικά αμινοξέα NMDA και καινικό οξύ (Forloni και συν., 1997, Braun και συν., 1998). Στην εργασία του Forloni και συν. (1997) διαπιστώθηκε ότι η προστασία των νευρώνων του φλοιού από το sst2 σωματοστατινεργικό ανάλογο ήταν εξαρτώμενη από την cGMP. Επομένως, η νευροπροστασία αυτή μπορεί να οφείλεται στις δράσεις της σωματοστατίνης στα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου μια και ενεργοποίηση των sst2 και sst5 υποδοχέων οδήγησε σε αναστολή των ρευμάτων ασβεστίου μέσω ανασταλτικής ρύθμισης διαύλων ασβεστίου (Tallent και συν., 1996), διαμεσολαβούμενης από ένα cGMPευαίσθητο μηχανισμό (Meriney και συν., 1994). Επιπλέον, το γεγονός ότι η σωματοστατίνη και το sst_{2/5} ανάλογό της οκτρεοτίδη έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την προστασία των αμφιβληστροειδικών νευρώνων και την αποφυγή του οιδήματος μετά από την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης και την επαναιμάτωση του αμφιβληστροειδή χοίρων (Celiker και lihan, 2002) ενισχύει την άποψη ότι η σωματοστατίνη διαθέτει νευροπροστατευτικές δράσεις στον ιστό επιπρόσθετες των αντιαγγειογενετικών της.

Ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ταυτοποίηση της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης και των αναλόγων της σε διαφορετικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, αυτά της διεγερτοτοξικότητας και της χημικής ισχαιμίας.

Η χρήση του μοντέλου με επίδραση διεγερτικών αμινοξέων δεν κατέστη δυνατή μια και κάτω από τις δικές μας συνθήκες (συγκεντρώσεις διεγερτικών αμινοξέων έως 4mM) δεν ήταν δυνατό να προκληθεί κυτταρικός θάνατος σε τέτοιο υψηλό βαθμό ώστε να είναι εύκολα διακριτή η νευροπροστατευτική δράση των προς μελέτη ουσιών. Ίσως απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της τάξης των 100mM και πάνω. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια της μελέτης, εστιάσαμε τις προσπάθειες μας στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας μιας και οι πρώτες πιλοτικές μελέτες έδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα ως προς την πρόκληση του κυτταρικού θανάτου.

Το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε τομές ιπποκάμπου (Reiner και συν., 1990) κι αργότερα σε πρωτογενείς καλλιέργειες αμφιβληστροειδικών κυττάρων κοτόπουλου (Ferreira και συν., 1997), και αφορά τη χρήση κυανιούχου νατρίου και ιωδοοξικού οξέος. Το κυανιούχο νάτριο αποτελεί τον αναστολέα της οξειδάσης του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c, παρεμποδίζει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και μιμείται την ανοξία. Το ιωδοοξικό οξύ απ'την πλευρά του, είναι ο αναστολέας της 3φωσφογλυκεραλδεϋδικής αφυδρογωνάσης η οποία αποτελεί το ένζυμο της γλυκόλυσης και οδηγεί σε υπογλυκαιμία. Τα δύο αυτά γεγονότα, ανοξία και υπογλυκαιμία, παρατηρούνται σε καταστάσεις ισχαιμίας.

Κατά την προσαρμογή του μοντέλου αυτού στον αμφιβληστροειδή αρουραίου πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες πιλοτικές μελέτες για την εύρεση των πιο αποτελεσματικών συνθηκών για την επίτευξη της χημικής ισχαιμίας. Απαιτήθηκε επώαση του ιστού για τουλάχιστον μία ώρα στο μίγμα της χημικής ισχαιμίας (κυανιούχο νάτριο 25mM / ιωδοοξικό οξύ 5mM) και σε συνθήκες 5%CO2/95%αέρα στους 37°C ώστε να παρατηρηθεί ισχαιμία και να επηρεαστούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί των αμφιβληστροειδικών κυττάρων χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι δεικτών αμφιβληστροειδικών κυττάρων. Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες φάνηκε ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί που επηρεάζονται, εντοπίζονται κυρίως στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα και πρόκειται για βραχύινα κύτταρα που περιέχουν ακετυλοτρανφεράση της υδροξυλάση της τυροσίνης (ντοπαμινεργικά) και χολίνης (χολινεργικά), συνθάση της ΝΟ καθώς και για δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα. Επιπρόσθετα επηρεάζονται επίσης και έκτοπα βραχύινα χολινεργικά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται στη γαγγλιακή στιβάδα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση της TUNEL όπου σημειώθηκε εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος μετά την εφαρμογή χημικής ισχαιμίας.

Η χρονική διάρκεια της επώασης του ιστού μας (60 λεπτά) αλλά και οι συγκεντρώσεις του κυανιούχου νατρίου και του ιωδοοξικού οξέος (25mM/5mM) για την επίτευξη της ισχαιμίας ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές της ομάδας του Ferreira (1997) (20 λεπτά και 2,5mM/0,5mM, αντίστοιχα) στις πρωτογενείς καλλιέργειες αμφιβληστροειδικών κυττάρων κοτόπουλου. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότητα στο ότι η πρόσβαση των ουσιών είναι

πολύ πιο εύκολη σε κύπαρα απ'ότι σ'έναν ιστό και επομένως χρειάζεται λιγότερος χρόνος για να δράσουν. Ο χρόνος που απαιτήθηκε στα πειράματά μας για την επίτευξη της ισχαιμίας και για τον εκφυλισμό των κυττάρων της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας, είναι σύμφωνος με μελέτη των lzumi και συν. (2003). Στην παραπάνω εργασία, η ισχαιμία προκλήθηκε με αφαίρεση γλυκόζης και αντικατάσταση του οξυγόνου με άζωτο για 60-90 λεπτά και παρατηρήθηκε έντονος εκφυλισμός των κυττάρων της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας. Η ευαισθησία των κυττάρων αυτών κατά την ισχαιμία αποδίδεται στην απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος και στην ενεργοποίηση των NMDA και των μη-NMDA υποδοχέων του. Στην ίδια μελέτη δε γίνεται καμιά αναφορά σε μορφολογικές αλλαγές στα γαγγλιακά κύπαρα, γεγονός που συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην ανοσοδραστικότητα του δείκτη των γαγγλιακών κυττάρων MAP_{1A}μετά την εφαρμογή χημικής ισχαιμίας.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι ο αριθμός των γαγγλιακών κυττάρων είναι δυνατό να επηρεαστεί από την ισχαιμία που προκαλείται με αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης, αλλά το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται ότι σχετίζεται άμεσα με τη χρονική διάρκεια αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης καθώς επίσης και στην επαναιμάτωση του ιστού που ακολουθεί (Sellés-Navarro και συν., 1996).

Στο μοντέλο χημικής ισχαιμίας το οποίο αναπτύχθηκε παρέχονται πληροφορίες για τις πρώιμες αλλαγές που προκαλούνται στη φυσιολογία και λειτουργία του αμφιβληστροειδή κατά την πρόκληση της ισχαιμίας και όχι σε αυτές που παρατηρούνται σε χρόνιες καταστάσεις. Το γεγονός ότι κατά τη χημική ισχαιμία η εκφύλιση εστιάζεται σε κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας, συνάδει με τα αποτελέσματα και άλλων εργασιών στις οποίες επίσης οι βλάβες που προκαλούνται από την ισχαιμία στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα και στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα ήταν σημαντικότερες. Για παράδειγμα, οι Dijk και Kamphuis (2004) έδειξαν ότι έπειτα από αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδα.

Κατά τη χαρτογράφηση των σωματοστατινεργικών υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή αρουραίου, ο sst2A υπότυπος εντοπίστηκε σε διάφορους

πληθυσμούς κυττάρων, κυρίως σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα αλλά και σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα κωνιοφόρα, σε κωνιοφόρους φωτοϋποδοχείς, σε οριζόντια κύτταρα και σε βραχύινα κύτταρα που περιέχουν το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης, ενώ ο sst_{2B} στους φωτοϋποδοχείς (Thermos, 2003). Επιπλέον, επειδή σύμφωνα με RT-PCR μελέτες ο sst₂ υπότυπος της σωματοστατίνης είναι και ο επικρατέστερος στο μάτι (Mori και συν., 1997) δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη χρήση των sst₂ εκλεκτικών αγωνιστών ως νευροπροστατευτικά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η νευροπροστασία που παρείχαν στα χολινεργικά κύτταρα οι εκλεκτικοί αγωνιστές BIM23014 και MK678 ήταν 76% και 49%, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη χρήση της κορτιστατίνης - ένα νευροπεπτίδιο το οποίο έχει υψηλή συγγένεια για όλους τους υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης (Siehler και συν., 1998) η οποία προσέφερε κατά 58% προστασία στα χολινεργικά κύπαρα. Το BIM23014 και η κορτιστατίνη παρείχαν προστασία τόσο στα χολινεργικά κύπαρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας (78% και 59%, αντίστοιχα) όσο και σε αυτά της γαγγλιακής στιβάδας (74% και 58%, αντίστοιχα). Αντίθετα, ο δεύτερος sst₂ αγωνιστής που χρησιμοποιήθηκε MK678, προστάτευσε εκλεκτικά τα χολινεργικά κύπαρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας στιβάδας περιορίστηκε μόλις στο 24% αυτών. Η διαφορά της αποτελεσματικότητας των sst₂ αναλόγων μπορεί να έγκειται σε διαφορετικές απορροφήσεις των φαρμάκων από τον αμφιβληστροειδή εξαιτίας της διαφορετικής τους δομής.

Στα πειράματά μας η νευροπροστασία που παρείχαν και οι τρεις ουσίες (BIM23014, MK678 και κορτιστατίνη) ήταν συγκεντρωσο-εξαρτώμενη. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη στην οποία ο Rauca και οι συνεργάτες του, (1999) έδειξαν ότι η σωματοστατίνη, η οκτρεοτίδη και η κορτιστατίνη ήταν αποτελεσματικές με ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο κατά των βλαβών που προκαλεί η εστιακή ισχαιμία μετά από αποκλεισμό της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας. Η μελέτη αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα μας όχι μόνο σε ότι αφορά τη συγκεντρωσο-εξαρτώμενη δράση των σωματοστατινεργικών αναλόγων αλλά και στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των ουσιών με τις οποίες επιτυγχάνεται η νευροπροστασία ήταν στο ίδιο εύρος. Τα αποτελέσματά μας είναι επίσης σε συμφωνία με *in viv*ο

μελέτες που δείχνουν ότι τα σωματοστατινεργικά ανάλογα εμποδίζουν την αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση σε μοντέλο αμφιβληστροπάθειας προκαλούμενη από υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου σε ποντίκι (Smith και συν., 1997, Higgins και συν., 2002).

Ωστόσο, στο μοντέλο μας, η ίδια η σωματοστατίνη δεν ήταν ικανή να προστατέψει τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία πιθανότατα εξαιτίας της αποικοδόμησής της. Πράγματι, αποδείξαμε ότι, στις συνθήκες της παρούσας μελέτης τα επίπεδα της σωματοστατίνης στο μίγμα της χημικής ισχαιμίας μειώνονται δραματικά στο χρόνο μια και μετά από προσθήκη 1μΜ σωματοστατίνης μετρήθηκαν μόλις στα 277±33nM πεπτιδίου, 30 λεπτά μετά την έναρξη της ισχαιμίας. Αυτό οφείλεται πιθανά στο γρήγορο μεταβολισμό της σωματοστατίνης μια και ο χρόνος ημιζωής της είναι μικρότερος των 3 λεπτών. Η αδυναμία αυτή δράσης της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή *in vitro* έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες και μάλιστα με χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων του πεπτιδίου (Vasilaki και συν., 2002).

Σε αντίθεση με τους sst2 εκλεκτικούς αγωνιστές, η χορήγηση sst4 και sst5 εκλεκτικών αναλόγων (L803,087 και L-817,818, αντίστοιχα) δεν ήταν αποτελεσματική στην προστασία του αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία. Όσον αφορά το sst4 ανάλογο, κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο, μια και οι sst4 υποδοχείς της σωματοστατίνης εντοπίζονται μόνο σε γαγγλιακά κύτταρα τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, δεν επηρεάζονται στο μοντέλο μας. Αντίθετα, οι sst₅ υποδοχείς εντοπίζονται σε σωματοστατινεργικά, χολινεργικά Kai ντοπαμινεργικά βραχύινα κύτταρα στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Κε και Zhong, 2007) και επομένως είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η σωματοστατίνη θα μπορούσε να δράσει νευροπροστατευτικά μέσω των sst₅ υποδοχέων της σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους. Πράγματι, η νευροπροσατευτική δράση της σωματοστατίνης μετά από ενεργοποίηση των ssts υποδοχέων της αποδείχθηκε από την τελευταία in vivo μελέτη του εργαστηρίου μας στην οποία παρατηρήθηκε νευροπροστασία έναντι της προκαλούμενης από το ΑΜΡΑ νευροτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή αρουραίου in vivo (Kiagiadaki και συν., 2010). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι, στην παρούσα μελέτη το ssts εκλεκτικό ανάλογο L-817,818, χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1μΜ, (βέλτιστη συγκέντρωση δράσης των sst2 αναλόγων) ενώ στην εργασία της Kiagiadaki και των συνεργατών της (2010), το ανάλογο αυτό, παρέχει μερική νευροπροστασία σε συγκέντρωση 100μΜ. Επιπλέον, σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι, στα δύο αυτά μοντέλα (in vitro χημική ισχαιμία και in vivo διεγερτοτοξικότα) οι μηχανισμοί που οδηγούν στη νευροτοξικότητα είναι διαφορετικοί. Επιπρόσθετα, δε γνωρίζουμε πόσο λειτουργικοί είναι οι ssts υποδοχείς μετά από την πρόκληση χημικής ισχαιμίας αλλά και κατά πόσο υπάρχει πρόσδεση του ssts αγωνιστή, L-817,818 και στους sst1 αυτοϋποδοχείς (ki=3,3nM, πίνακας 2) η οποία θα οδηγούσε σε αναίρεση της πιθανής ssts νευροπροστατευτικής του δράσης.

Συγκεντρωτικά, από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, μπορούμε να συμπεράνουμε την εκλεκτική νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης μετά από ενεργοποίηση των sst₂ υποδοχέων της και την αδυναμία επίτευξης νευροπροστασίας κατά της χημικής ισχαιμίας με τη χρήση sst₅ αναλόγων τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις που αυτά χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα σωματοστατινεργικά ανάλογα αποτρέπουν τις βλάβες που προκαλούνται από τη χημική ισχαιμία δεν είναι γνωστοί. Όπως προαναφέρθηκε, η κύρια αιτία του κυτταρικού θανάτου φαίνεται να είναι η αύξηση των επιπέδων του γλουταμινικού οξέος, η επακόλουθη διέγερση των ιονοτροπικών υποδοχέων και η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου η οποία οδηγεί είτε σε παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε/και σε καταστροφή του μιτοχονδρίου, είτε στην επαγωγή ενζύμων που οδηγούν στην απόπτωση (Osborne και συν., 2004, εικόνα-12). Η σωματοστατίνη αναστέλλει τη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου (Tallent και συν., 1996) και ως εκ τούτου μπορεί να αποτελέσει νευροπροστατευτικό μόριο. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να ισχύει για τη νευροπροστασία που παρέχουν τα sst2 σωματοστατινεργικά ανάλογα στα δίπολα κύτταρα και τα βραχύινα ντοπαμινεργικά κύτταρα, δεδομένου ότι ο sst2 σωματοστατινεργικός υποδοχέας εκφράζεται στα κύτταρα αυτά (Helboe και συν., 1999, Johnson και συν., 1998, Vasilaki και συν., 2001). Δεν εξηγεί όμως τις νευροπροστατευτικές δράσεις στα κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τους sst2 υποδοχείς, όπως για παράδειγμα σε άλλες κατηγορίες βραχύινων κυττάρων. Άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν ότι η σωματοστατίνη μειώνει τα ρεύματα ασβεστίου μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την κυκλική GMP (Meriney και συν., 1994). Στον εγκέφαλο, η κυκλική GMP έχει εμπλακεί στις προστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης κατά το νευρωνικό θάνατο που προκαλείται από το διεγερτικό αμινοξύ NMDA σε καλλιέργειες κυττάρων εγκεφαλικού φλοιού (Forloni και συν., 1997). Επομένως, η κυκλική GMP μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό παίκτη στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης.



Τροποποίηση από Osborne και συν., 2004

Εικόνα - 12: Ο καταρράκτης των γεγονότων που σχετίζονται με την εμφάνιση αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.

Όπως προαναφέρθηκε, μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα της ΝΟ (Vasilaki και συν., 2002) και της κυκλικής GMP σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή αρουραίου μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει sst₂/SHP-1/NO/cGMP (παρούσα μελέτη). Μπορούμε λοιπόν να οδηγηθούμε στην υπόθεση ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι NO/κυκλική GMP μπορεί να στοχεύει τη σύνθεση της κυκλικής GMP στο ίδιο κύτταρο που εκφράζονται οι sst₂ σωματοστατινεργικοί υποδοχείς ή σε γειτονικά κύτταρα, μια και η NO είναι αέριο, και με τον τρόπο αυτό να εμπλέκεται στη νευροπροστατευτική δράση των σωματοστατινεργικών αναλόγων.

Θέσαμε λοιπόν το εξής ερώτημα: εμπλέκονται οι ΝΟ· και η cGMP στις προστατευτικές δράσεις των sst2 αναλόγων της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή;

Για να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα έπρεπε πρώτα να μελετήσουμε τις πιθανές νευροπροστατευτικές δράσεις της ίδιας της ΝΟ. Πραγματοποιήσαμε μελέτες οι οποίες βασίστηκαν στη χρήση αργινίνης και των δοτών του μονοξειδίου του αζώτου SNP, SIN-1 και NONOate δεδομένου ότι η ΝΟ· ως αέριο δεν μπορεί να χορηγηθεί κατά την πειραματική διαδικασία. Χρησιμοποιήσαμε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων της αργινίνης (0,05, 0,125, 0,25, 0,5, 1 και 2mM) και του δότη της NO·SNP (0,25, 0,5, 1, 2 και 4mM) ώστε να επιτύχουμε την κατάλληλη συγκέντρωση ΝΟ· η οποία θα έχει ευεργετική και όχι τοξική δράση στον ιστό κατά την πρόκληση χημικής ισχαιμίας. Καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δε στάθηκε ικανή να προστατέψει τον αμφιβληστροειδή. Παρά ταύτα, δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε αν χρησιμοποιήσαμε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις των ουσιών από αυτές που απαιτούνται για την επίτευξη νευροπροστασίας μια και δεν ήμασταν σε θέση να ξέρουμε τα ακριβή επίπεδα της ΝΟ· στο ιστό. Επιπλέον, ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να λάβουμε υπόψη στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας, είναι η χρήση του NaCN. Το NaCN είναι αναστολέας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και χρησιμοποιήθηκε για την ικανότητά του να προξενεί υποξία. Η υποξία έχει άμεση επίδραση στον μεταφορέα αργινίνης (Block και συν., 1995, Zharikov και Block, 2000) και έχει δειχτεί ότι η υποξία αναστέλλει την επαναπρόσληψη αργινίνης επηρεάζοντας ενδεχομένως την παραγωγή της ΝΟ. Η έλλειψη της δράσης του SNP μπορεί να οφείλεται στην απότομη και ταχύτατη απελευθέρωση της ΝΟ, η οποία επαυξάνει τις τοξικές δράσεις του NaCN. Εναλλακτικά, ο σχηματισμός της NO· από το SNP, το οποίο συνοδεύεται από το σχηματισμό του κυανιδίου (CN·), μπορεί να ανασταλεί με την εξωγενή προσθήκη κυανιδίου (Yamamoto και Bing, 2000, Bates και συν.,1991).

Σύμφωνα με τις μελέτες μας και σε αντίθεση με την αργινίνη και το SNP, το NONOate, το οποίο είναι ένας αργός δότης της NO, ήταν ικανό να προστατέψει τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία, αν και όχι ολοκληρωτικά. Το μόριο αυτό είναι σταθερό σε υψηλό pH και ο χρόνος ημιζωής του μπορεί να είναι από μερικά λεπτά έως και αρκετές μέρες ανάλογα με τη δομή τους (Hrabie και συν., 1993). Το spermine NONOate το οποίο χρησιμοποιήσαμε έχει χρόνο ημιζωής 39 λεπτά στους 37°C και pH=7,4. Είναι πιθανό κατά την πειραματική διαδικασία το pH να μειώθηκε και το NONOate να αποσυντέθηκε χωρίς να παράγει ικανά επίπεδα NO· καθ' όλη τη διάρκεια επώασης ή για μέρος του χρόνου αυτού παρέχοντας έτσι μόνο μερική προστασία.

Σε ότι αφορά στο SIN-1, ο δότης αυτός της NO· προστάτεψε τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο και προσέφερε τη μέγιστη προστασία στα χολινεργικά κύτταρα στη συγκέντρωση των 0,1mM. Στην συγκέντρωση των 1mM δεν παρατηρήθηκε καμιά προστασία. Το SIN-1 είναι ενεργός αλλά ασταθής μεταβολίτης της μολσιδομίνης (Yamamoto και Bing, 2000, Feelisch και Noack, 1987). Μεταβολίζεται σε δύο στάδια, αρχικά σε SIN-1A και στη συνέχεια σε NO· και SIN-1C, σε O2- και περοξυνιτρώδες, όπως φαίνεται και στην εικόνα-13 (Feelisch και Noack, 1987, Schrammel και συν, 1998). Παρότι το περοξυνιτρώδες αποτελεί τοξικό μεταβολικό προϊόν της ΝΟ, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά (García-Nogales και συν., 2003). Για να ελέγξουμε αν η προστατευτική δράση του SIN-1 οφείλεται στο περοξυνιτρώδες, εξετάσαμε αν η L-κυστείνη, (ουσία η οποία απομακρύνει το περοξυνιτρώδες), αναστέλλει την ευεργετική δράση του SIN-1. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η L-κυστεΐνη μείωσε μερικώς τη νευροπροστατευτική δράση του SIN-1, οδηγώντας μας έτσι στο συμπέρασμα ότι ένας μηχανισμός αύξησης της ΝΟ· και του περοξυνιτρώδους συμπεριλαμβάνεται στους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς δράσεις του SIN-1.



Εικόνα-13: Το SIN-1 μεταβολίζεται σε SIN-1Α. Παρουσία οξυγόνου παράγεται Ο2⁻⁻ και η ασταθής ρίζα SIN-1.⁺ η οποία μεταβολίζεται γρήγορα σε ΝΟ· και SIN-1C. Η ΝΟ· και η Ο2⁻⁻ αντιδρούν και παράγουν το περοξυνιτρώδες.

Προκειμένου να εξετάσουμε τις πιθανές τοξικές δράσεις του SIN-1 στον αμφιβληστροειδή, επωάσαμε τον φυσιολογικό ιστό παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων SIN-1 και απουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,1, 0,3 και 1mM) του SIN-1 - που χρησιμοποιήθηκαν και στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας - δεν επηρεάστηκε η ανοσοδραστικότητα του ChAT ή του TUNEL. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 3mM παρατηρήθηκε μείωση των χολινεργικών κυττάρων και αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι το SIN-1 σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρα ως νευροπροστατευτικό κατά της χημικής ισχαιμίας, ενώ σε υψηλές δόσεις έχει τοξική δράση στον ιστό η οποία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Με βάση τα αποτελέσματα μας, είναι αδύνατο να κάνουμε οποιαδήποτε εκτίμηση για τις προκύπτουσες από το SIN-1 συγκεντρώσεις της ΝΟ· μια και αυτές μπορούν να εξαρτώνται όχι μόνο από την αρχική συγκέντρωση του SIN-1, αλλά και από το μοντέλο, τον ιστό ή τον τρόπο χορήγησης της ουσίας. Για παράδειγμα, σε πρόσφατη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο της NO· και η τεχνική της in vivo μικροδιαπίδυσης, η χορηγήση 1mM SIN-1 δεν ήταν ικανή να αυξήσει τα επίπεδα της NO· στο ραβδωτό αρουραίου (Rocchitta και συν., 2004).

Σε ότι αφορά το μηχανισμό δράσης του SIN-1, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία οι οποίες προτείνουν ότι το SIN-1 έχει μια άμεση διεγερτική δράση στη διαλυτή γουανυλική κυκλάση (Schrammel και συν, 1998, Kukovetz και Holzmann, 1985, Trakranrungsie και Will, 2001). Έτσι, ένας επιπλέον μηχανισμός ο οποίος μπορεί να προταθεί για τη νευροπροστατευτική δράση του SIN-1 που παρατηρήσαμε μετά από χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων της ουσίας μπορεί να αφορά την αύξηση της κυκλικής GMP. Επιπρόσθετα, όπως προκύπτει και από τα πειράματά μας με την L-κυστεΐνη είναι πιθανό ότι το περοξυνιτρώδες εμπλέκεται σε ένα μηχανισμό που δικαιολογεί εν μέρη τη νευροπροστατευτική δράση του SIN-1. Το αν οι τοξικές δράσεις του SIN-1 οφείλονται σε εξεσημασμένη παραγωγή περοξυνιτρώδους, το οποίο είναι γνωστό ότι προκαλεί τοξικότητα (Estévez και συν., 1995, Villa και συν., 1994), δεν μπορεί να επαληθευτεί από τα πειράματά μας. Εντούτοις, τόσο η NO· όσο και το περοξυνιτρώδες, είναι δύο μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να ενεργοποιήσουν τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση και να αυξήσουν τα επίπεδα της κυκλικής GMP, η οποία με τη σειρά της μπορεί να δράσει νευροποροστατευτικά (Schrammel και συν., 1998, McDonald και Murad, 1996).

Για να επιβεβαιωθεί η εμπλοκή της κυκλικής GMP στην προστασία του αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία πραγματοποιήθηκε απευθείας χορήγηση της 8-Br-cGMP, ενός αναλόγου της κυκλικής GMP με υψηλή διαπερατότητα στην κυτταρική μεμβράνη. Το ανάλογο αυτό προστάτεψε τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο, παρέχοντας τη μέγιστη προστασία στη συγκέντρωση των 0,5mM. Η μερική προστασία που προσέφερε στα πειράματα μας η 8-Br-cGMP στη συγκέντρωση του 1mM έχει επίσης παρατηρηθεί σε μελέτη στην οποία προκλήθηκε κυτταρικός θάνατος σε αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή με χρήση ανισομυκίνης (Guimarães και συν., 2001).

Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει το συμπέρασμα ότι προκειμένου να επιτευχθεί νευροπροστασία του αμφιβληστροειδή κατά τη χημική ισχαιμία είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση ενός μηχανισμού στον οποίο εμπλέκεται η κυκλική GMP. Όπως έχουμε αναφέρει και πρωτύτερα, η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα της NO· (Vasilaki και συν., 2001) και της κυκλικής GMP στον αμφιβληστροειδή μέσω των sst₂ σωματοστατινεργικών υποδοχέων και επιπλέον τα sst₂ ανάλογα, το SIN-1 και η 8-Br-cGMP προστατεύουν από τη χημική ισχαιμία τον αμφιβληστροειδή. Επιπλέον, στον εγκέφαλο, η σωματοστατίνη λειτουργεί νευροπροστατευτικά μέσω ενός μηχανισμού που περιελάμβανε την κυκλική GMP (Forloni και συν., 1997). Η NO· από την πλευρά της, αποτελεί ένα
πολύ σημαντικό μόριο στη ρύθμιση της λειτουργίας του αμφιβληστροειδή λόγω του διττού της ρόλου (Lipton και συν., 1993). Το μόριο αυτό είναι ικανό τόσο να προάγει όσο και να αναστέλλει την οφθαλμική νεοαγγείωση. Η φαρμακολογική αναστολή της συνθάσης της ΝΟ- μειώνει τη χοριοειδική νεοαγγείωση και την επαγόμενη από το VEGF νεοαγγείωση, αλλά δε μειώνει την επαγόμενη από την ισχαιμία αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση. Οι μελέτες αυτές, σε συνδυασμό με γενετικές προσεγγίσεις - χρήση γονιδιακά τροποποιημένων ποντικιών με έλλειψη μίας ή όλων των ισομορφών της συνθάσης της ΝΟ- - υποδηλώνουν ότι η επαγωγική και/ή η νευρωνική συνθάση της ΝΟ που βρίσκεται σε νευρικά κύτταρα γειτονικά των ενδοθήλιων κυττάρων, έχουν αντινεοαγγειογενετική δράση κατά την ισχαιμία (Ando και συν., 2002β). Επίσης, στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή αρουραίου, έχει δειχτεί ότι η αργινίνη και ο δότης της NO. S:-nitroso-acetylpenicillamine (SNAP) εμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την πρωτεϊνική σύνθεση του αναστολέα ανισομυκίνη. Η αντιαποπτωτική αυτή δράση διαμεσολαβείται κατά ένα μέρος από τη cGMP (Guimarães και συν., 2001). Έτσι, για να ελέγξουμε αν ένας μηχανισμός αύξησης της NO και της κυκλική GMP μετά από ενεργοποίηση των sst2 υποδοχέων είναι υπεύθυνος για τη νευροπροστασία των sst2 σωματοστατινεργικών αναλόγων στον αμφιβληστροειδή, εξετάσαμε αν η αναστολή της συνθάσης της ΝΟ και της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης είναι ικανή να αναστρέψει την προστατευτική δράση του sst2 αγωνιστή BIM23014. Διαπιστώσαμε ότι, ο αναστολέας της NOS NMMA και οι αναστολείς της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης ODQ και NS2028 ανέστειλαν την προστατευτική δράση του ΒΙΜ23014 γεγονός που αποδεικνύει την εμπλοκή της ΝΟ, της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης και της κυκλικής GMP στη επαγόμενη από το ΒΙΜ23014 νευροπροστασία. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της σπουδαιότητας της κυκλικής GMP, μετρήθηκαν τα επίπεδα της κυκλικής GMP στον αμφιβληστροειδή κατά τη χημική ισχαιμία, παρουσίας ή μη του BIM23014 ή του BIM23014 και του NS2028. Ωστόσο, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα της κυκλικής GMP, ενδεχομένως για τεχνικούς λόγους.

Το επακόλουθο σήμα μέσω του οποίου η κυκλική GMP παρέχει προστασία μπορεί να περιλαμβάνει τη ρύθμιση των καναλιών ασβεστίου (Meriney και συν., 1994) με αποτέλεσμα τη μείωση των τοξικών υψηλών

επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου που προκαλούνται από την ισχαιμία καθώς και τη μείωση νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμινικό οξύ (Osborne και συν., 2004). Παρόλο που δεν υπάρχουν σχετικές αναφορές στο αμφιβληστροειδικό κύκλωμα για να υποστηριχτεί αυτή η εικασία, έχει δειχτεί ότι η NO· και το κυκλικό GMP διαμεσολαβούν στην αναστολή των καναλιών ασβεστίου σε αμφιβληστροειδικά περιαγγειακά κύτταρα και μειώνει την εισροή ασβεστίου (Sakagami και συν., 2001).

Επιπρόσθετα, έχει δειχτεί ότι το περοξυνιτρώδες ενεργοποιεί τασοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (VDCCs) και επηρεάζει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Ohkuma και συν., 2001, 1995). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η ΝΟ·, η κυκλική GMP και το SIN-1 μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση του GABA στον αμφιβληστροειδή χελώνας (Yu και Eldred, 2005). Ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές όπως το GABA είναι πιθανό ότι αντενεργούν στην νευροτοξική δράση του γλουταμικού οξέος σε αμφιβληστροειδικούς νευρώνες κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας Kai προστατεύουν κατά αυτό τον τρόπο τον ιστό (Osborne και συν., 2004). Πράγματι, το GABA έχει προταθεί ως νευροπροστατευτικό σε οξεία εγκεφαλική ισχαιμική συμφόρηση (Green και συν., 2000). Επομένως, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η ΝΟ·, η κυκλική GMP και το SIN-1 να αυξάνουν την απελευθέρωση του GABA στον αμφιβληστροειδή αρουραίου και να βοηθούν στη νευροπροστασία στη χημική ισχαιμία. Παρόλ' αυτά, η εικασία αυτή θα πρέπει να επαληθευτεί.

Γεγονός όμως είναι, ότι κατά τη χημική ισχαιμία τα sst2 ανάλογα και η κορτιστατίνη ενεργοποιούν τους sst2 σωματοστατινεργικούς υποδοχείς μέσω της δέσμευσής τους σε αυτούς, αυξάνουν την παραγωγή της NO· η οποία προσδένεται στη διαλυτή γουανυλική κυκλάση, αυξάνοντας τα επίπεδα της cGMP η οποία δρα νευροπροστατευτικά.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας τα αποτελέσματα πολλών μελετών οδήγησαν στη λειτουργική χαρτογράφηση των υποδοχέων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών και προσέφεραν σημαντικά στοιχεία σχετικά με το ρόλο της σωματοστατίνης στα κυκλώματα και τη φυσιολογία του αμφιβληστροειδή. Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής συνέβαλαν με νέα στοιχεία στη λειτουργική χαρτογράφηση του sst1 υποδοχέα και εμπλούτισαν τα υπάρχοντα στοιχεία σχετικά με το ρόλο του sst2 υποδοχέα στον ιστό.

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση των σωματοστατινεργικών αναλόγων ως νευροπροστατευτικά μόρια στην αντιμετώπιση της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας. Το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας που αναπτύξαμε ήταν αποτελεσματικό στη μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναλόγων της σωματοστατίνης και μελλοντικά χρήσιμο στη μελέτη άλλων φαρμακευτικών στόχων ως νευροπροστατευτικά.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνηγορούν υπέρ της νευροπροστατευτικής δράσης των σωματοστατινεργικών αναλόγων. Η δημοσίευσή αυτών αποτέλεσε την πρώτη εργασία σχετικά με τις αντιισχαιμικές δράσεις των μορίων αυτών οι οποίες σε συνδυασμό με τις αντινεοαγγειακές τους δράσεις παρέχουν τα θεραπευτικά χαρακτηριστικά για την αξιοποίησή τους στην αντιμετώπιση σοβαρών παθήσεων του αμφιβληστροειδή που οδηγούν σε τύφλωση.

Τα ευρήματά μας σχετικά με το μηχανισμό δράσης μέσω του οποίου τα σωματοστατινεργικά ανάλογα προσφέρουν προστασία στον αμφιβληστροειδή καινοτόμα εivaı γιατί συνηγορούν υπέρ της νευροπροστατευτικής δράσης του μονοπατιού NO/cGMP και της εμπλοκής του στις δράσεις της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή ενώ επίσης υποστηρίζουν το διττό ρόλο της ΝΟ ως τοξικό και νευροπροστατευτικό μόριο στον ιστό.

7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η περαιτέρω διερεύνηση των μονοπατιών που συμμετέχουν στις αποπτωτικές ή νεκρωτικές διαδικασίες (π.χ. κασπάσες ή άλλες πρωτεΐνες) θα συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών νευροπροστασίας.

Η επιπλέον μελέτη του μονοπατιού NO/cGMP και των υποστρωμάτων που αυτό επηρεάζει (π.χ. AMPA και NMDA υποδοχείς γλουταμινικού οξέος, δίαυλοι ιόντων ασβεστίου) και που εμπλέκονται στις προστατευτικές του δράσεις θα συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της νευροβιολογίας του συστήματος.

Η περαιτέρω μελέτη νέων αναλόγων της σωματοστατίνης με καλύτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά (μεγάλο χρόνο ημιζωής, καλύτερη απορρόφηση) θα οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων ικανών να χρησιμοποιηθούν σε in vivo βασικές και κλινικές μελέτες.

8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανεύρεση νευροπροστατευτικών παραγόντων για τη θεραπεία αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, αποτελεί τα τελευταία χρόνια το στόχο προσπάθειας. ερευνητικής Ισχαιμικές καταστάσεις έντονης тου αμφιβληστροειδή οδηγούν σε νεοαγγείωση και σε εκφύλιση των αμφιβληστροειδικών νευρώνων. Παρότι σήμερα υπάρχουν επεμβατικές μέθοδοι και φαρμακολογικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδή εντούτοις, δεν υπάρχει ακόμη κατάλληλη θεραπεία για την αντιμετώπιση της εκφύλισής του. Για την πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών και τη συντήρηση της οπτικής οξύτητας, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση τόσο της νεοαγγείωσης όσο και του κυτταρικού θανάτου.

Η σωματοστατίνη αποτελεί ένα κυκλικό νευροπεπτίδιο με ποικίλες δράσεις στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα που ανακαλύφθηκε από τον Brazeau το 1973, ως ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση. 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 έχει επιτευχθεί η λειτουργική χαρτογράφηση των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTR1-5), ο ρόλος της παραμένει αδιευκρίνιστος. Λόγω της ανασταλτικής της δράσης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης και άλλων αυξητικών παραγόντων, αρκετές μελέτες εστίασαν στις αντινεοαγγειακές της δράσεις και προτείνουν ότι η σωματοστατίνη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αμφιβληστροειδικής νεοαγγείωσης. Επίσης, μελέτες στον εγκέφαλο υποστηρίζουν ότι η σωματοστατίνη και τα sst_{2/5} ανάλογά της προστατεύουν από νευρωνικό θάνατο που προκαλείται από το διεγερτικό αμινοξύ NMDA μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκεται η κυκλική GMP.

Με σκοπό τη μελέτη του νευροπροστατευτικού ρόλου της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία

εκτελέστηκε η παρούσα διατριβή με τους εξής στόχους: α) τη διασαφήνιση του λειτουργικού ρόλου των sst1 και sst2 σωματοστατινεργικών υποδοχέων, β) τη δημιουργία μοντέλου αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, γ) την ταυτοποίηση της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης και των αναλόγων της σε αυτό, και δ) τη μελέτη του μηχανισμού μέσω του οποίου τα σωματοστατινεργικά ανάλογα προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής απέδειξαν ότι η ενεργοποίηση των sst₂ υποδοχέων οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων της cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου μέσω της αύξησης της NO. Επίσης αποδείξαμε ότι η απελευθέρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου είναι νευρωνικής φύσης, κάλιο και ασβέστο-εξαρτώμενη. Η απελευθέρωση αυτή ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση του sst₁ υποδοχέα ο οποίος αποτελεί τον αυτοϋποδοχέα της σωματοστατίνης. Τα αποτελέσματα αυτά ανέδειξαν για πρώτη φορά την ύπαρξη ενός αυτοϋποδοχέα πεπτιδίου στον αμφιβληστροειδή.

Mε στόχο τη μελέτη του νευροπροστατευτικού ρόλου της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία αναπτύξαμε το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε τομές ιππόκαμπου και σε πρωτογενείς καλλιέργειες αμφιβληστροειδικών κυττάρων κοτόπουλου, και περιλαμβάνει τη χρήση κυανιούχου νατρίου και ιωδο-οξικού οξέος, ουσίες οι οποίες μιμούνται συνθήκες ανοξίας και υπογλυκαιμίας. Επώαση του αμφιβληστροειδή για μία ώρα στο μίγμα της χημικής ισχαιμίας (κυανιούχο νάτριο 25mM / ιωδοοξικό οξύ 5mM) και σε συνθήκες 5%CO2/95%αέρα στους 37°C οδήγησε σε μείωση των βραχύινων κυττάρων που περιέχουν ακετυλοτρανφεράση της χολίνης (χολινεργικά), υδροξυλάση της τυροσίνης (ντοπαμινεργικά) και συνθάση της ΝΟ καθώς και σε δίπολα κύτταρα που σχετίζονται με τα ραβδιοφόρα, όπως προσδιορίστηκε με μελέτες ανοσοϊστοχημείας. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση της TUNEL όπου σημειώθηκε εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος μετά την εφαρμογή χημικής ισχαιμίας. Η επώαση της σωματοστατίνης παρουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας δεν προστάτευσε τον αμφιβληστροειδή. Αποδείχθηκε με μελέτες ραδιο-ανοσο-ανάλυσης (RIA) ότι η σωματοστατίνη μεταβολίζεται υπό

τις συνθήκες της χημικής ισχαιμίας και στο μεταβολισμό αυτό οφείλεται η έλλειψη της προστατευτικής της δράσης. Ωστόσο, η χρήση των εκλεκτικών αγωνιστών του sst₂ υπότυπου BIM23014 και MK678 καθώς και της κορτιστατίνης παρείχε νευροπροστασία στον ιστό.

Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα σωματοστατινεργικά ανάλογα προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία μελετήθηκε η εμπλοκή του ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού NO·/cGMP. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μελέτες στον εγκέφαλο υποστηρίζουν ότι η cGMP εμπλέκεται στις προστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης κατά το νευρωνικό θάνατο που προκαλείται από το διεγερτικό αμινοξύ NMDA. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αλλά και προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου σχετικά με την αύξηση των επιπέδων cGMP και της NO, αντίστοιχα, στον αμφιβληστροειδή μετά από ενεργοποίηση του sst₂ υποδοχέα, μας οδήγησαν αρχικά στη μελέτη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης της ΝΟ· στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας. Οι δότες της NO, NONOate και SIN-1 προστάτεψαν τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση της 8-Br-cGMP, ενός ανάλογου της cGMP με υψηλή διαπερατότητα στην κυτταρική μεμβράνη. Η αναστολή της συνθάσης της ΝΟ· και της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης ανέστρεψαν την προστατευτική δράση του sst2 αγωνιστή BIM23014.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν νέους ρόλους για τους υποδοχείς sst₂ και sst₁ στον αμφιβληστροειδή. Υποστηρίζουν ότι το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας προσφέρεται για τη μελέτη νέων προστατευτικών στόχων тην αντιμετώπιση αμφιβληστροειδοπαθειών. Ta γIα σωματοστατινεργικά sst2 ανάλογα προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία μέσω της εμπλοκής του σηματοδοτικού μονοπατιού NO/cGMP. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή, καθώς επίσης και για τη μελέτη νέων αναλόγων της σωματοστατίνης με καλύτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για την ανάπτυξη φαρμάκων ικανών να χρησιμοποιηθούν σε in vivo βασικές Kai κλινικές μελέτες αμφιβληστροειδοπαθειών.

9. SUMMARY

The discovery of neuroprotective agents for the treatment of retinal disorders, such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration, remains an important target for investigation. Retinal ischemia leads to neovascularization and neurodegeneration of retinal neurons. Over the years, therapies for ischemic neovascular diseases have been focused on the regulation of the aberrant proliferation of blood vessels and involve laser treatment (photocoagulation) and most recently the use of drugs that target the VEGF system. However, there are no therapeutics that target the neurodegenerative component. For the more efficacious treatment of ischemic retinopathies and the preservation of vision, both the vascular and neural elements of the retina must be treated.

Somatostatin is a cyclic neuropeptide with diverse actions in the central and peripheral nervous system. It was discovered by Brazeau in 1973, as the main inhibitor of growth hormone release from the pituitary. In the retina, somatostatin is localized primarily in amacrine cells with processes that ramify in the inner plexiform layer and in displaced amacrine cells in the ganglion cell layer. Although the functional mapping of somatostatin receptors (sst₁₋₅) in the retina has been established, its role must be further studied. Due to its inhibitory actions on the secretion of growth hormone, as well as other growth factors important players in the neovascularization process, somatostatin's actions as an antivascular agent were investigated. The results from these studies support that somatostatin can be a potential treatment for ocular neovascularization. In addition, studies in brain suggest that somatostatin and its sst_{2/5} analogues afford neuroprotection against NMDA excitoxicity via a mechanism involving cGMP.

The main aim of this thesis was to investigate the neuroprotective role of somatostatin and its analogues against retinal ischemia. The following specific objectives were posed: a) to study the functional role of sst1 and sst2 somatostatin receptors, b) to establish a retinal model of ischemia, c) to ascertain the neuroprotective actions of somatostatin and its analogues in this model, and d) to elucidate the mechanism involved in the neuroprotection.

The results of this thesis suggest that activation of sst₂ receptors regulates cGMP levels in the rat retina by increasing NO, suggesting an important role of the sst₂ receptor in the regulation of NO/cGMP signaling. In addition, we demonstrate that somatostatin release is potassium and calcium-dependent, thus neuronally released in rat retina. This release is regulated in a negative manner by the activation of the sst₁ receptor, suggesting an autoreceptor role for somatostatin. These results revealed for the first time the existence of a peptide autoreceptor in the retina.

In order to investigate the neuroprotective role of somatostatin and its analogues in retinal ischemia, we developed the model of chemical ischemia in the rat retina. This model was first used in hippocampal slices. It includes the use of sodium cyanide and iodo-acetic acid, substances that mimic conditions of anoxia and hypoglycemia. Incubation of the retina for one hour in a mixture of chemical ischemia (sodium cyanide 25mM / iodoacetic acid 5mM) in conditions of 5% CO₂/95% air at 37°C resulted in an attenuation of the number of amacrine cells containing cholineacetyltransfarase (cholinergic), tyrosine hydroxylase (dopaminergic) and NO synthase and rod-bipolar cells, as determined by immunohistochemical studies. These results were confirmed by TUNEL assays depicting extensive cell death in the chemical ischemia treated samples. Co-incubation of somatostatin and the chemical ischemia mixture did not protect the retina. However, it was demonstrated with radio-immuno-analysis (RIA) studies that under the conditions of chemical ischemia somatostatin was strongly metabolized. However, the use of selective agonists of the sst2 subtype BIM23014 and MK678 as well as cortistatin provided neuroprotection to the retina in a concentration dependent manner.

To study the mechanism via which somatostatin analogues protect the retina from chemical ischemia, we investigated the involvement of intracellular signaling pathway NO- / cGMP. As mentioned above, studies in brain suggest that cGMP is involved in the neuroprotective actions of somatostatin against NMDA excitotoxicity. Results from the present thesis as well as from previous studies of our laboratory suggested an increase in cGMP

and NO levels, respectively, after sst₂ receptor activation in the retina. These results prompted us to initially study the possible neuroprotective action of NO in the model of chemical ischemia and subsequently investigate whether this mechanism is involved in the retinal neuroprotection afforded by the somatostatinergic analogs.

NO donors, NONOate and SIN-1 protected the retina from chemical ischemia in a concentration-dependent manner. Similar results were observed using the 8-Br-cGMP, an analogue of cGMP with high membrane permeability. The blockade of NO synthase and soluble guanylate cyclase, the enzymes that catalyze the synthesis of nitric oxide and cGMP, respectively, reversed the neuroprotective effects of the sst₂ agonist BIM23014.

The results of this study suggest new roles for sst₂ and sst₁ receptors in the retina. They support that the model of chemical ischemia could be adapted to the retina and will be useful in the study of new neuroprotective targets of retinal disease. The sst₂ somatostatin analogues provide retinal neuroprotection via a mechanism involving the signaling pathway NO- / cGMP.

The present data support future studies to probe further the downstream mechanisms of somatostatin's neuroprotection. In addition, the data support the study of the neuroprotective properties of new somatostatin analogues with a better pharmacokinetic profile (longer half life, better bioavailability) and greater efficacy that may be effective in in vivo preclinical and clinical studies and be beneficial as therapeutics in retinal disease.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguila 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 U S A*. 1994; 91(2): 782-6.

Ahmad I and Barnstable CJ. Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. *Exp Eye Res.* 1993; 56(1): 51-62.

Aiello LP. Targeting intraocular neovascularization and edema--one drop at a time. *N Engl J Med*. 2008; 359(9): 967-9.

Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P. Somatostatin modulates voltage-gated K(+) and Ca(2+) currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci.* 2000; 20(3): 929-36.

Allia E, Tarabra E, Volante M, Cerrato M, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *J Pathol.* 2005; 207(3): 336-45.

Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P, Campochiaro PA. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol*. 2002β; 191(1): 116-24.

Ando A, Yang A, Nambu H, Campochiaro PA. Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol Pharmacol.* 2002a; 62(3): 539-44.

Auerswald L, Birgül N, Gäde G, Kreienkamp HJ, Richter D. Structural, functional, and evolutionary characterization of novel members of the allatostatin receptor family from insects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282(4): 904-9.

Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ, Wendel R, Patel A. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the

treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2006; 113: 1695-1715.

Ayoub GS, Matthews G. Substance P modulates calcium current in retinal bipolar neurons. *Vis Neurosci.* 1992; 8(6): 539-44.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*. 1998; 102(4): 783-91.

Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(2): 283-90. Review.

Barber DL, McGuire ME, Ganz MB. Beta-adrenergic and somatostatin receptors regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem.* 1989; 264(35): 21038-42.

Bass RT, Buckwalter BL, Patel BP, Pausch MH, Price LA, Strnad J, Hadcock JR. Identification and characterization of novel somatostatin antagonists. *Mol Pharmacol.* 1996; 50(4): 709-15.

Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42 Suppl: \$157-65.

Baumeister H and Meyerhof W. Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *J Physiol Paris*. 2000; 94(3-4): 167-77. Review.

Bell GI and Reisine T. Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci.* 1993; 16(1): 34-8. Review.

Benoit R, Ling N, Esch F. A new prosomatostatin-derived peptide reveals a pattern for prohormone cleavage at monobasic sites. *Science*. 1987; 238(4830): 1126-9.

Bigiani A, Petrucci C, Ghiaroni V, Dal Monte M, Cozzi A, Kreienkamp HJ, Richter D, Bagnoli P. Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. *Brain Res.* 2004; 1025(1-2): 177-85.

Birgül N, Weise C, Kreienkamp HJ, Richter D. Reverse physiology in drosophila: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J.* 1999; 18(21): 5892-900.

Block ER, Herrera H, Couch M. Hypoxia inhibits L-arginine uptake by pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol*. 1995; 269(5 Pt 1): L574-80.

Blute TA, Velasco P, Eldred WD. Functional localization of soluble guanylate cyclase in turtle retina: modulation of cGMP by nitric oxide donors. *Vis Neurosci.* 1998; 15(3): 485-98.

Boelen MK, Boelen MG, Marshak DW. Light-stimulated release of dopamine from the primate retina is blocked by 1-2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB). *Vis Neurosci.* 1998; 15(1): 97-103.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

Brandstätter JH, Hartveit E, Sassoè-Pognetto M, Wässle H. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci.* 1994; 6(7): 1100-12.

Braun H, Schulz S, Becker A, Schröder H, Höllt V. Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Res.* 1998; 803(1-2): 54-60.

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(68): 77-9.

Brecha N, Vila A, Allen J. Somatostatin subtype receptor 4 expression in mouse and rat retina. [abstract]. Annual Meeting Abstract and Program Planner [on CD-ROM]. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2002. Abstract 2768.

Bredt DS and Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992; 8(1): 3-11. Review.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990; 347(6295): 768-70.

Broglio F, Koetsveld Pv P, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Van Der Lely AJ, Ghigo E. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(10): 4829-32.

Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S; ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006; 355(14): 1432-44.

Bruno JF, Berelowitz M. Covalent labeling of the somatostatin receptor in rat anterior pituitary membranes. *Endocrinology*. 1989; 124(2): 831-7.

Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(23): 11151-5.

Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology*. 1993; 133(6): 2561-7.

Büchi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica*. 1991; 203(3):138-47.

Bugnon O, Schaad NC, Schorderet M. Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. *Neuroreport*. 1994; 5(4): 401-4.

Buscail L, Delesque N, Estève JP, Saint-Laurent N, Prats H, Clerc P, Robberecht P, Bell GI, Liebow C, Schally AV, et al. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(6): 2315-9.

Cai J and Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)*. 2002; 16(3): 242-60.

Cajal, S.R. The Structure of the Retina. (Transl. Thorpe SA, Glickstein M), Thomas, Springfield, II., 1972.

Caron P, Buscail L, Beckers A, Estève JP, Igout A, Hennen G, Susini C.Expression of somatostatin receptor SST4 in human placenta and absence of octreotide effect on human placental growth hormone concentration during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(11): 3771-6.

Casini G, Dal Monte M, Fornai F, Bosco L, Willems D, Yang Q, Zhou ZJ, Bagnoli P. Neurokinin 1 receptor expression and substance P physiological actions are developmentally regulated in the rabbit retina. *Neuroscience*. 2004; 124(1): 147-60.

Casini G, Rickman DW, Sternini C, Brecha NC. Neurokinin 1 receptor expression in the rat retina. *J Comp Neurol.* 1997; 389(3): 496-507.

Casini G, Sabatini A, Catalani E, Willems D, Bosco L, Brecha NC. Expression of the neurokinin 1 receptor in the rabbit retina. *Neuroscience*. 2002; 115(4): 1309-21.

Catalani E, Gangitano C, Bosco L, Casini G. Expression of the neurokinin 1 receptor in the mouse retina. *Neuroscience*. 2004; 128(3): 519-30.

Cattaneo MG, Scita G, Vicentini LM. Somatostatin inhibits PDGF-stimulated Ras activation in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett*. 1999; 459(1): 64-8. Celiker U and lihan N. Nitric oxide and octreotide in retinal ischemiareperfusion injury. *Doc Ophthalmol*. 2002; 105(3): 327-38.

Cheon EW, Park CH, Kang SS, Cho GJ, Yoo JM, Song JK, Choi WS. Change in endothelial nitric oxide synthase in the rat retina following transient ischemia. *Neuroreport.* 2003; 14(3): 329-33.

Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care*. 2003; 26(9): 2653-64. Review.

Cohen BE, May JW Jr, Daly JS, Young HH. Successful clinical replantation of an amputated penis by microneurovascular repair. Case report. *Plast Reconstr Surg.* 1977; 59(2): 276-80.

Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC. Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. Arch Gen Psychiatry. 1999; 56(12): 1135-40.

Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(10): 3191-9.

Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res.* 2002; 936(1-2): 1-14.

Csaba Z and Dournaud P. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*. 2001; 35(1): 1-23. Review.

Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, Aiello LP, Bressler NM, D'Amico DJ, Goldbaum M, Guyer DR, Katz B, Patel, M, Schwartz SD. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2005; 112: 1747-1757.

Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(8): 3480-9.

Dal Monte M, Petrucci C, Cozzi A, Allen JP, Bagnoli P. Somatostatin inhibits potassium-evoked glutamate release by activation of the sst(2) somatostatin receptor in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003a; 367(2): 188-92.

Dal Monte M, Petrucci C, Vasilaki A, Cervia D, Grouselle D, Epelbaum J, Kreienkamp HJ, Richter D, Hoyer D, Bagnoli P. Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology*. 2003β; 45(8): 1080-92.

Dalm VA, Van Hagen PM, de Krijger RR, Kros JM, Van Koetsveld PM, Van Der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin Endocrinol* (Oxf). 2004; 60(5): 625-9.

Danesi R, Agen C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, Basolo F, Campagni A, Tacca MD. Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995). *Clin Cancer Res.* 1997; 3(2): 265-72.

Dávalos A, Castillo J, Serena J, Noya M. Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997; 28(4): 708-10.

Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V. Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. Arch Gen Psychiatry. 1999; 56(11): 981-7.

Dawson TM and Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci.* 1994; 14(9): 5147-59. Review.

de Groote L, Olivier B, Westenberg HG. Extracellular serotonin in the prefrontal cortex is limited through terminal 5-HT(1B) autoreceptors: a microdialysis study in knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002; 162(4): 419-24.

de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 1996; 381(6579): 242-5.

de Lecea L, Ruiz-Lozano P, Danielson PE, Peelle-Kirley J, Foye PE, Frankel WN, Sutcliffe JG. Cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin. *Genomics*. 1997; 42(3): 499-506.

de Weille JR, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M. Regulation of ATPsensitive K+ channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(8): 2971-5.

Dent P, Wang Y, Gu YZ, Wood SL, Reardon DB, Mangues R, Pellicer A, Schonbrunn A, Sturgill TW. S49 cells endogenously express subtype 2 somatostatin receptors which couple to increase protein tyrosine phosphatase activity in membranes and down-regulate Raf-1 activity in situ. *Cell Signal.* 1997; 9(7): 539-49.

DeVries SH, Schwartz EA. Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J Physiol.* 1989; 414: 351-75.

Dijk F and Kamphuis W. Ischemia-induced alterations of AMPA-type glutamate receptor subunit. Expression patterns in the rat retina--an immunocytochemical study. *Brain Res.* 2004; 997(2): 207-21.

Dills DG, Moss SE, Klein R, Klein BE. Association of elevated IGF-I levels with increased retinopathy in late-onset diabetes. *Diabetes*. 1991; 40(12): 1725-30.

Djamgoz MB, Cunningham JR, Davenport SL, Neal MJ. Nitric oxide inhibits depolarization-induced release of endogenous dopamine in the rabbit retina. *Neurosci Lett.* 1995; 198(1): 33-6.

Djamgoz MB, Wagner HJ. Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem Int*. 1992; 20(2): 139-91. Review.

Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell.* 2001; 106(5): 619-32.

Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, Tannenbaum GS, Beaudet A. Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci.* 1996; 16(14): 4468-78.

Douziech N, Calvo E, Coulombe Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA, Lajas A, Morisset J. Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology*. 1999; 140(2): 765-77.

Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A. Cellular origin of ischemiainduced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem*. 1985; 45(1): 145-51.

Elliott DE, Blum AM, Li J, Metwali A, Weinstock JV. Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J Immunol.* 1998; 160(8): 3997-4003.

Elliott DE, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV. T lymphocytes isolated from the hepatic granulomas of schistosome-infected mice express somatostatin receptor subtype II (SSTR2) messenger RNA. J Immunol. 1994; 153(3): 1180-6.

Engelmann R and Peichl L. Unique distribution of somatostatinimmunoreactive cells in the retina of the tree shrew (Tupaia belangeri). *Eur J Neurosci.* 1996; 8(1): 220-8.

Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C. The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol*. 1994; 8(1-2): 25-44. Review.

Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol.* 1986; 27(1): 63-100. Review.

Estévez AG, Radi R, Barbeito L, Shin JT, Thompson JA, Beckman JS. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. *J Neurochem*. 1995; 65(4): 1543-50.

Eve DJ, Nisbet AP, Kingsbury AE, Temlett J, Marsden CD, Foster OJ. Selective increase in somatostatin mRNA expression in human basal ganglia in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; 50(1-2): 59-70.

Feelisch M and Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol.* 1987; 139(1): 19-30.

Ferone D, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Zuijderwijk J, Mooy DM, Lichtenauer-Kaligis EG, Colao A, Bogers AJ, Lombardi G, Lamberts SW, Hofland LJ. In vitro characterization of somatostatin receptors in the human thymus and effects of somatostatin and octreotide on cultured thymic epithelial cells. *Endocrinology*. 1999; 140(1): 373-80.

Ferrara DC, Koizumi H, Spaide RF. Early bevacizumab treatment of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol.* 2007; 144(6): 864-71.

Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2006; 26(8): 859-70. Review.

Ferreira IL, Duarte CB, Carvalho AP. 'Chemical ischemia' in cultured retina cells: the role of excitatory amino acid receptors and of energy levels on cell death. *Brain Res.* 1997; 768(1-2): 157-66.

Flood JF, Uezu K, Morley JE. The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res.* 1997; 775(1-2): 250-2.

Florio T, Arena S, Thellung S, Iuliano R, Corsaro A, Massa A, Pattarozzi A, Bajetto A, Trapasso F, Fusco A, Schettini G. The activation of the phosphotyrosine phosphatase eta (r-PTP eta) is responsible for the somatostatin inhibition of PC Cl3 thyroid cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(10): 1838-52.

Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, Culler MD, Pfeffer U, Noonan DM, Schettini G, Albini A. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology*. 2003; 144(4): 1574-84.

Florio T, Rim C, Hershberger RE, Loda M, Stork PJ. The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(10): 1289-97.

Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJ. Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol.* 1999; 13(1): 24-37.

Fontanesi G, Casini G, Thanos S, Bagnoli P. Transient somatostatinimmunoreactive ganglion cells in the developing rat retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997; 103(2): 119-25.

Fontanesi G, Gargini C, Bagnoli P. Postnatal development of somatostatin 2A (sst2A) receptors expression in the rabbit retina. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000; 123(1): 67-80.

Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiesa R, Vezzani A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. J Neurochem. 1997; 68(1): 319-27.

Friebe A and Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Circ Res. 2003; 93(2): 96-105. Review. Fukusumi S, Kitada C, Takekawa S, Kizawa H, Sakamoto J, Miyamoto M, Hinuma S, Kitano K, Fujino M. Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 232(1): 157-63.

Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288(5789): 373-6.

García de la Torre N, Wass JA, Turner HE. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 57(4): 425-41.

García-Nogales P, Almeida A, Bolaños JP. Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J Biol Chem.* 2003; 278(2): 864-74.

Gargiulo P, Giusti C, Pietrobono D, La Torre D, Diacono D, Tamburrano G. Diabetes mellitus and retinopathy. *Dig Liver Dis*. 2004; 36 Suppl 1: \$101-5.

Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem. 1987; 56: 615-49. Review.

Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.* 1996; 36(18): 2979-94. Review.

Goodman RH, Aron DC, Roos BA. Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J Biol Chem*. 1983; 258(9): 5570-3.

Goureau O, Lepoivre M, Becquet F, Courtois Y. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor beta in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(9): 4276-80.

Grant MB, Caballero S, Millard WJ. Inhibition of IGF-I and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue,

octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regul Pept*. 1993; 48(1-2): 267-78.

Grant MB, Schmetz I, Russell B, Harwood HJ Jr, Silverstein J, Merimee TJ. Changes in insulin-like growth factors I and II and their binding protein after a single intramuscular injection of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 63(4): 981-4.

Green AR, Hainsworth AH, Jackson DM. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology*. 2000; 39(9): 1483-94. Review.

Grigoryan EN, Vasilaki A, Mastrodimou N, Thermos K. Somatostatin receptor immunoreactivity in the eye of the adult newt (Pleurodeles waltlii Michan). *Neurosci Lett.* 2003; 337(3): 143-6.

Guimarães C, Assreuy J, Linden R. Paracrine neuroprotective effect of nitric oxide in the developing retina. *J Neurochem*. 2001; 76(4): 1233-41.

Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nyström B, Jacobson I, Hamberger A. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1985; 5(3): 413-9.

Hardy P, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovasc Res.* 2000; 47(3): 489-509. Review.

Haverkamp S, Kolb H, Cuenca N. Morphological and neurochemical diversity of neuronal nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the turtle retina. *Cell Tissue Res.* 2000; 302(1): 11-9.

He HT, Johnson K, Thermos K, Reisine T. Purification of a putative brain somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(5): 1480-4.

Helboe L and Møller M. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40(10): 2376-82.

Helboe L, Hay- Schmidt A, Stidsen CE, Møller M. Immunohistochemical localization of the somatostatin receptor subtype 2 (sst2) in the central nervous system of the golden hamster (Mesocricetus auratus). J Comp Neurol. 1999; 405(2): 247-61.

Helboe L, Møller M, Nørregaard L, Schiødt M, Stidsen CE. Development of selective antibodies against the human somatostatin receptor subtypes sst1sst5. Brain Res Mol Brain Res. 1997; 49(1-2): 82-8.

Helboe L, Stidsen CE, Moller M. Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst1 in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus. *J Neurosci.* 1998; 18(13): 4938-45.

Hervieu G and Emson PC. The localization of somatostatin receptor 1 (sst1) immunoreactivity in the rat brain using an N-terminal specific antibody. *Neuroscience*. 1998; 85(4): 1263-84.

Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2002; 74(5): 553-9.

Horvat A, Schwaiger F, Hager G, Brocker F, Streif R, Knyazev P, Ullrich A, Kreutzberg GW. A novel role for protein tyrosine phosphatase shp1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. J Neurosci. 2001; 21(3): 865-74.

Hou C, Gilbert RL, Barber DL. Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2. *J Biol Chem.* 1994; 269(14): 10357-62.

Hoyer D, Dixon K, Gentsch C, και συν. NVP-SRA880, a somatostatin sst1 receptor antagonist promotes social interactions, reduces aggressive behaviour and stimulates learning. *Pharmacologist* 44, A254, 2002.

Hrabie JA, Klose JR, Wink DA, Keefer LK. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. J. Org. Chem., 1993; 58 (6), 1472–1476.

Ishimoto I, Millar T, Chubb IW, Morgan IG. Somatostatin-immunoreactive amacrine cells of chicken retina: retinal mosaic, ultrastructural features, and light-driven variations in peptide metabolism. *Neuroscience*. 1986; 17(4): 1217-33.

Izumi Y, Benz AM, Kurby CO, Labruyere J, Zorumski CF, Price MT, Olney JW. An ex vivo rat retinal preparation for excitotoxicity studies. *J Neurosci Methods*. 1995; 60(1-2): 219-25.

Izumi Y, Hammerman SB, Kirby CO, Benz AM, Olney JW, Zorumski CF. Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. *Vis Neurosci.* 2003; 20(2): 97-107.

Johansson K, Bruun A, deVente J, Ehinger B. Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(1): 305-13.

Johnson J, Caravelli ML, Brecha NC. Somatostatin inhibits calcium influx into rat rod bipolar cell axonal terminals. *Vis Neurosci.* 2001; 18(1): 101-8.

Johnson J, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 1998; 393(1): 93-101.

Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience*. 1999; 94(3): 675-83.

Kamohara M, Matsuo A, Takasaki J, Kohda M, Matsumoto M, Matsumoto S, Soga T, Hiyama H, Kobori M, Katou M. Identification of MrgX2 as a human Gprotein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 330(4): 1146-52.

Kapin MA, Doshi R, Scatton B, DeSantis LM, Chandler ML. Neuroprotective effects of eliprodil in retinal excitotoxicity and ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40: 1177–1182.

Karschin A, Wischmeyer E, Davidson N, Lester HA. Fast inhibition of inwardly rectifying K+ channels by multiple neurotransmitter receptors in oligodendroglia. *Eur J Neurosci.* 1994; 6(11): 1756-64.

Karschin A. Molecular single-cell analysis identifies somatostatin type 1 (sst1) receptors to block inwardly rectifying K+ channels in rat brain oligodendrocytes. *Neuroreport.* 1995; 7(1): 121-4.

Ke JB and Zhong YM. Expression of somatostatin receptor subtype 5 in rat retinal amacrine cells. *Neuroscience*. 2007; 144(3): 1025-32.

Khare S, Kumar U, Sasi R, Puebla L, Calderon L, Lemstrom K, Hayry P, Patel AY. Differential regulation of somatostatin receptor types 1-5 in rat aorta after angioplasty. *FASEB J*. 1999; 13(2): 387-94.

Kiagiadaki F, Savvaki M, Thermos K. Activation of somatostatin receptor (sst 5) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology*. 2010; 58(1): 297-303.

Kimura N. Developmental change and molecular properties of somatostatin receptors in the rat cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 160(1): 72-8.

Kirkegaard C, Nørgaard K, Snorgaard O, Bek T, Larsen M, Lund-Andersen H. Effect of one year continuous subcutaneous infusion of a somatostatin analogue, octreotide, on early retinopathy, metabolic control and thyroid function in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* (Copenh). 1990; 122(6): 766-72.

Kirsch B, Leonhardt H. Demonstration of a somatostatin-like activity in retinal cells of the rat. *Cell Tissue Res.* 1979; 204(1): 127-40.

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(10): 2193-201. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(13): 5159-62.

Knuhtsen S, Esteve JP, Cambillau C, Colas B, Susini C, Vaysse N. Solubilization and characterization of active somatostatin receptors from rat pancreas. *J Biol Chem.* 1990; 265(2): 1129-33.

Koistinaho J, Sagar SM. Light-induced c-fos expression in amacrine cells in the rabbit retina. Brain Res Mol Brain Res. 1995; 29(1): 53-63.

Koistinaho J, Swanson RA, de Vente J, Sagar SM. NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase)-reactive amacrine cells of rabbit retina: putative target cells and stimulation by light. *Neuroscience*. 1993; 57(3): 587-97.

Kong H, DePaoli AM, Breder CD, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in adult rat brain: analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 1994; 59(1): 175-84.

Kossut M, Aldrich LB, Yamada T, Pinto LH. The binding of somatostatin to the mouse retina is altered by the pearl mutation. *Brain Res.* 1990; 522(2): 235-40.

Kossut M, Yamada T, Aldrich LB, Pinto LH. Localization and characterization of somatostatin binding sites in the mouse retina. *Brain Res.* 1989; 476(1): 78-84.

Kouvidi E, Papadopoulou-Daifoti Z, Thermos K. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci Lett.* 2006; 391(3): 82-6.

Kreienkamp HJ. Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2(5): 581-6. Review.

Krempels K, Hunyady B, O'Carroll AM, Mezey E. Distribution of somatostatin receptor messenger RNAs in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1997; 112(6): 1948-60.

Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*. 1968; 83(4): 783-90.

Kukovetz WR and Holzmann S. Mechanism of vasodilation by molsidomine. Am Heart J. 1985; 109(3 Pt 2): 637-40.

Kumar U, Patel SC, Patel YC. Immunohistochemical distribution of the five somatostatin receptor (SSTR) subtypes in rat cerebral cortex. *Program Annual Meeting Society For Neuroscience*, November 16-21, 1996.

Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC. Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes*. 1999; 48(1): 77-85.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.

Lamberts SW, van der Lely AJ, Hofland LJ. New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? *Eur J Endocrinol.* 2002; 146(5): 701-5. Review.

Lammers CH, Schweitzer P, Facchinetti P, Arrang JM, Madamba SG, Siggins GR, Piomelli D. Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. J Neurochem. 1996; 66(1): 147-52.

Larsen JN, Bersani M, Olcese J, Holst JJ, Møller M. Somatostatin and prosomatostatin in the retina of the rat: an immunohistochemical, in-situ hybridization, and chromatographic study. *Vis Neurosci.* 1990; 5(5): 441-52.

Lawnicka H, Stepień H, Wyczółkowska J, Kolago B, Kunert-Radek J, Komorowski J. Effect of somatostatin and octreotide on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion from murine endothelial cell line (HECa10) culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 268(2): 567-71. Le Romancer M, Cherifi Y, Levasseur S, Laigneau JP, Peranzi G, Jais P, Lewin MJ, Reyl-Desmars F. Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae. *Life Sci.* 1996; 58(13): 1091-8.

Lewis LD, Williams JA. Structural characterization of the somatostatin receptor in rat anterior pituitary membranes. *Endocrinology*. 1987; 121(2): 486-92.

Liapakis G and Thermos K. Characterization of [1251]Tyr11-somatostatin binding sites in the rabbit retina. *Neuropeptides*. 1992; 21(1): 13-9.

Liapakis G, Hoeger C, Rivier J, Reisine T. Development of a selective agonist at the somatostatin receptor subtype sstr1. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 276(3): 1089-94.

Liapakis G, Politou E, Thermos K. Solubilization of active somatostatin receptors from rabbit retina. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45(9): 1821-8.

Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA; Penn State Retina Research Group. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2000; 28(1): 3-8. Review.

Lin CY, Varma MG, Joubel A, Madabushi S, Lichtarge O, Barber DL. Conserved motifs in somatostatin, D2-dopamine, and alpha 2B-adrenergic receptors for inhibiting the Na-H exchanger, NHE1. *J Biol Chem.* 2003; 278(17): 15128-35.

Lin X and Peter RE. Somatostatin-like receptors in goldfish: cloning of four new receptors. *Peptides*. 2003; 24(1): 53-63.

Lin X, Janovick JA, Brothers S, Conn PM, Peter RE. Molecular cloning and expression of two type one somatostatin receptors in goldfish brain. *Endocrinology*. 1999; 140(11): 5211-9.

Lin X, Janovick JA, Cardenas R, Conn PM, Peter RE. Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Mol Cell Endocrinol.* 2000a; 166(2): 75-87.

Lin X, Nunn C, Hoyer D, Rivier J, Peter RE. Identification and characterization of a type five-like somatostatin receptor in goldfish pituitary. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 189(1-2): 105-16.

Lin X, Otto CJ, Cardenas R, Peter RE. Somatostatin family of peptides and its receptors in fish. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000β; 78(12): 1053-66.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364(6438): 626-32.

Lipton SA, Rayudu PV, Choi YB, Sucher NJ, Chen HS. Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res.* 1998; 118: 73-82. Review.

Lopez F, Ferjoux G, Cordelier P, Saint-Laurent N, Estève JP, Vaysse N, Buscail L, Susini C. Neuronal nitric oxide synthase: a substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. *FASEB J*. 2001; 15(12): 2300-2.

López-Costa JJ, Goldstein J, Saavedra JP. Neuronal and macrophagic nitric oxide synthase isoforms distribution in normal rat retina. *Neurosci Lett.* 1997; 232(3): 155-8.

Maguire G and Werblin F. Dopamine enhances a glutamate-gated ionic current in OFF bipolar cells of the tiger salamander retina. *J Neurosci.* 1994; 14(10): 6094-101.

Mahy N, Woolkalis M, Thermos K, Carlson K, Manning D, Reisine T. Pertussis toxin modifies the characteristics of both the inhibitory GTP binding proteins and the somatostatin receptor in anterior pituitary tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 246(2): 779-85.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994; 78(6): 927-30. Review.

Marshak DW. Peptidergic neurons of the macaque monkey retina. *Neurosci Res Suppl.* 1989; 10: S117-30.

McCombe M, Lightman S, Eckland DJ, Hamilton AM, Lightman SL. Effect of a long-acting somatostatin analogue (BIM23014) on proliferative diabetic retinopathy: a pilot study. Eye (Lond). 1991;5 (Pt 5):569-75.

McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. Proc Soc Exp Biol Med. 1996; 211(1): 1-6. Review.

Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med.* 1983; 309(9): 527-30.

Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca2+ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*. 1994; 369(6478): 336-9.

Meyerhof W, Wulfsen I, Schönrock C, Fehr S, Richter D. Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a somatostatin-14 receptor in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(21): 10267-71.

Meyerhof W. The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1998; 133: 55-108. Review.

Mills SL and Massey SC. Differential properties of two gap junctional pathways made by All amacrine cells. *Nature*. 1995; 377(6551): 734-7.

Moncada S, Radomski MW, Palmer RM.Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37(13): 2495-501. Review.

Mori M, Aihara M, Shimizu T. Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. *Neurosci Lett*. 1997; 223(3): 185-8. MPS. Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy Five-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol.* 1991; 109: 1109-1114.

MPS. Macular Photocoagulation Study Group. Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol.* 1994*β*; 112: 500-509.

MPS. Macular Photocoagulation Study Group. Visual outcome after laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascularization secondary to agerelated macular degeneration. The influence of initial lesion size and initial visual acuity. *Arch Ophthalmol.* 1994a; 112: 480-488.

Murthy KK, Srikant CB, Patel YC. Evidence for multiple protein constituents of the somatostatin receptor in pituitary tumor cells: affinity cross-linking and molecular characterization. *Endocrinology*. 1989; 125(2): 948-56.

Napper GA and Kalloniatis M. Neurochemical changes following postmortem ischemia in the rat retina. *Vis Neurosci.* 1999; 16(6): 1169-80.

Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Hogg J Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem*. 1994; 62(3): 1025-33.

Ng YS, Krilleke D, Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res.* 2006; 312(5): 527-37. Review.

Norris PJ, Waldvogel HJ, Faull RL, Love DR, Emson PC. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience*. 1996; 72(4): 1037-47.

Nothacker HP, Wang Z, Zeng H, Mahata SK, O'Connor DT, Civelli O. Proadrenomedullin N-terminal peptide and cortistatin activation of MrgX2 receptor is based on a common structural motif. *Eur J Pharmacol.* 2005; 519(1-2): 191-3.
O'Carroll AM, Lolait SJ, König M, Mahan LC. Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. Mol Pharmacol. 1992; 42(6): 939-46.

Ohkuma S, Katsura M, Guo JL, Hasegawa T, Kuriyama K. Involvement of peroxynitrite in N-methyl-D-aspartate- and sodium nitroprusside-induced release of acetylcholine from mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 31(1-2): 185-93.

Ohkuma S, Katsura M, Higo A, Shirotani K, Hara A, Tarumi C, Ohgi T. Peroxynitrite affects Ca2+ influx through voltage-dependent calcium channels. J Neurochem. 2001; 76(2): 341-50.

Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. J Neurochem. 2004; 89(5): 1057-91. Review.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23(1): 91-147. Review.

Osborne NN, Larsen A, Barnett NL. Influence of Excitatory Amino Acids and Ischemia on Rat Retinal Choline Acetyltransferase-Containing Cells. *Invest Ophthalmol Visl Sci.* 1995; 36 (8): 1692-1700.

Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, Nash MS. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1999; 43 Suppl 1: S102-28. Review.

Palii SS, Afzal A, Shaw LC, Pan H, Caballero S, Miller RC, Jurczyk S, Reubi JC, Tan Y, Hochhaus G, Edelhauser H, Geroski D, Shapiro G, Grant MB. Nonpeptide somatostatin receptor agonists specifically targeting ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. *Invest Ophth Vis Sci*. 2008; 49: 5094-5102. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 ; 327(6122): 524-6.

Paques M, Massin P, Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy. Diabetes Metab. 1997; 23(2): 125-30. Review.

Patel YC and 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.* 1988; 263(2): 745-51.

Patel YC and Srikant CB. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology*. 1994; 135(6): 2814-7.

Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci.* 1995; 57(13): 1249-65. Review.

Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198(2): 605-12.

Patel YC, Murthy KK, Escher EE, Banville D, Spiess J, Srikant CB. Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins. *Metabolism.* 1990; 39(9 Suppl 2): 63-9.

Patel YC, Wheatley T, Ning C. Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and nonneural tissues and portal plasma of the rat. *Endocrinology*. 1981; 109(6): 1943-9.

Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. J Endocrinol Invest. 1997; 20(6): 348-67. Review.

Patel YC. Soamtostatin. In: Becker K. Principles and practise of endocrinology and metabolism. *Lippincott*, Philadelphia, 1990: 1297-1301.

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. Front Neuroendocrinol. 1999; 20(3): 157-98. Review.

Pawlikowski M and Melen-Mucha G. Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogs. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003; 24(1-2): 21-7. Review.

Pemp B and Schmetterer L. Ocular blood flow in diabetes and age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol.* 2008; 43(3): 295-301. Review.

Perlman JI, McCole SM, Pulluru P, Chang CJ, Lam TT, Tso MO. Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Curr Eye Res.* 1996; 15(6): 589-96.

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 retina via sst2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001; 363(6): 680-94.

Porta M and Allione A. Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacol Ther.* 2004; 103(2): 167-77. Review.

Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett*. 1980; 109(1): 55-8.

Rabbani SN and Patel YC. Peptides derived by processing of rat prosomatostatin near the amino-terminus: characterization, tissue distribution, and release. *Endocrinology*. 1990; 126(4): 2054-61.

Rauca C, Schäfer K, Höllt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360(6): 633-8.

Reardon DB, Dent P, Wood SL, Kong T, Sturgill TW. Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine

phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. *Mol Endocrinol.* 1997; 11(8): 1062-9.

Reichlin S. Somatostatin basic and clinical status. Plenum, New York, 1987.

Reichlin S. Somatostatin. N Engl J Med. 1983; 309(24): 1495-501, 1556-63. Review.

Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci Lett.* 1990; 119(2): 175-8.

Reisine T and Bell Gl. Molecular biology of somatostatin receptors. Endocr Rev. 1995; 16(4): 427-42. Review.

Reubi JC, Schaer JC, Wenger S, Hoeger C, Erchegyi J, Waser B, Rivier J. SST3selective potent peptidic somatostatin receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(25): 13973-8.

Reyl-Desmars F, Le Roux S, Linard C, Benkouka F, Lewin MJ. Solubilization and immunopurification of a somatostatin receptor from the human gastric tumoral cell line HGT-1. *J Biol Chem.* 1989; 264(31): 18789-95.

Rickman DW, Blanks JC, Brecha NC. Somatostatin-immunoreactive neurons in the adult rabbit retina. *J Comp Neurol*. 1996; 365(3): 491-503.

Robas N, Mead E, Fidock M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem*. 2003; 278(45): 44400-4.

Rocchitta G, Migheli R, Mura MP, Esposito G, Desole MS, Miele E, Miele M, Serra PA. Signalling pathways in the nitric oxide donor-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: evidence that exogenous nitric oxide promotes Ca2+ entry through store-operated channels. *Brain Res.* 2004; 1023(2): 243-52.

Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schüle R. Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(9): 4196-200.

Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen DM, Xiong Y, Hayes EC, Parmar RM, Foor F, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai SJ, Blake A, Chan WW, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapman KT, Schaeffer JM. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science*. 1998; 282(5389): 737-40.

Roosterman D, Kreuzer OJ, Brune N, Cottrell GS, Bunnett NW, Meyerhof W, Steinhoff M. Agonist-induced endocytosis of rat somatostatin receptor 1. Endocrinology. 2007; 148(3): 1050-8.

Rorstad OP, Brownstein MJ, Martin JB. Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in rat retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(6): 3019-23.

Rorstad OP, Senterman MK, Hoyte KM, Martin JB. Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in the human retina. *Brain Res.* 1980; 199(2): 488-92.

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY; MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006a; 355: 1419-1431.

Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Srg Lasers Imaging*. 2005; 36: 336-339.

Rosenfeld PJ, Rich RM, Lalwani GA. Ranibizumab: phase III clinical trial results. Ophthalmol Clin North Am. 2006β; 19: 361-372. Rosskopf D, Schürks M, Manthey I, Joisten M, Busch S, Siffert W. Signal transduction of somatostatin in human B lymphoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284(1): C179-90.

Roth S, Osinski JV, Park SS, ostwald P, Moshfeghi AA. Measurement of purine nucleoside concentration in the intact rat retina. *J Neurosci Methods*. 1996; 68(1): 87-90.

Sagar SM and Marshall PE. Somatostatin-like immunoreactive material in associational ganglion cells of human retina. *Neuroscience*. 1988; 27(2): 507-16.

Sagar SM, Marshall PE, Landis DM. Immunoreactive somatostatin in the rat retina: light microscopic immunocytochemistry and chromatographic characterization. *Brain Res.* 1985; 336(2): 235-42.

Sagar SM, Rorstad OP, Landis DM, Arnold MA, Martin JB. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina. *Brain Res.* 1982; 244(1): 91-9.

Sagar SM. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina: immunohistochemical staining using monoclonal antibodies. *J Comp Neurol*. 1987; 266(2): 291-9.

Sakagami K, Kawamura H, Wu DM, Puro DG. Nitric oxide/cGMP-induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvasc Res.* 2001; 62(2): 196-203.

Sakamoto C, Goldfine ID, Williams JA. The somatostatin receptor on isolated pancreatic acinar cell plasma membranes. Identification of subunit structure and direct regulation by cholecystokinin. *J Biol Chem.* 1984; 259(15): 9623-7.

Sánchez-Alavez M, Gómez-Chavarín M, Navarro L, Jiménez-Anguiano A, Murillo-Rodríguez E, Prado-Alcalá RA, Drucker-Colin R, Prospéro-García O. Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res.* 2000; 858(1): 78-83. Schmidt-Erfurth U, Michels S, Augustin A. Perspectives on verteporfin therapy combined with intravitreal corticosteroids. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124(4): 561-3. Review.

Schonbrunn A and Tashjian H Jr. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem*. 1978 ; 253(18): 6473-83.

Schrammel A, Pfeiffer S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholinosydnonimine involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol.* 1998; 54(1): 207-12.

Schulz S, Händel M, Schreff M, Schmidt H, Höllt V. Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris*. 2000; 94(3-4): 259-64.

Schweitzer P, Madamba S, Siggins GR. Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature*. 1990; 346(6283): 464-7.

Sellés-Navarro I, Villegas-Pérez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gómez JM, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37(10): 2002-14.

Shapiro B, Kronheim S, Pimstone B. The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metab Res.* 1979; 11(1): 79-80.

Shiells R and Falk G. Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. *Neuroreport.* 1992; 3(10): 845-8.

Shin DH, Lee HY, Kim HJ, Lee E, Lee KH, Lee WJ, Cho SS, Baik SH. In situ localization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett.* 1999; 270(1): 53-5.

Shoelson SE, Polonsky KS, Nakabayashi T, Jaspan JB, Tager HS. Circulating forms of somatostatinlike immunoreactivity in human plasma. *Am J Physiol.* 1986; 250(4 Pt 1): E428-34.

Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. [1251]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1998; 357(5): 483-9.

Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis. Neurosci.* 1992; 8: 567–573.

Sims SM, Lussier BT, Kraicer J. Somatostatin activates an inwardly rectifying K+ conductance in freshly dispersed rat somatotrophs. *J Physiol.* 1991; 441: 615-37.

Smith GG and Baird CD. Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure. *Am J Ophthalmol.* 1952; 35(5:2): 133-6.

Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science*. 1997; 276(5319): 1706-9.

Spier AD and de Lecea L. Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33(2-3): 228-41. Review.

Spira AW, Shimizu Y, Rorstad OP. Localization, chromatographic characterization, and development of somatostatin-like immunoreactivity in the guinea pig retina. *J Neurosci*. 1984; 4(12): 3069-79.

Spranger J, Bühnen J, Jansen V, Krieg M, Meyer-Schwickerath R, Blum WF, Schatz H, Pfeiffer AF. Systemic levels contribute significantly to increased intraocular IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 [correction of IFG-BP3] in proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res.* 2000; 32(5): 196-200. Spranger J, Möhlig M, Osterhoff M, Bühnen J, Blum WF, Pfeiffer AF. Retinal photocoagulation does not influence intraocular levels of IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 in proliferative diabetic retinopathy-evidence for combined treatment of PDR with somatostatin analogues and retinal photocoagulation? *Horm Metab Res.* 2001; 33(5): 312-6.

Srikant CB and Patel YC. Chemical cross-linking of somatostatin receptors in rat adrenal cortex. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986β; 139(2): 757-62.

Srikant CB and Patel YC. Somatostatin receptors on rat pancreatic acinar cells. Pharmacological and structural characterization and demonstration of down-regulation in streptozotocin diabetes. *J Biol Chem.* 1986a; 261(17): 7690-6.

Stryer L. Molecular basis of visual excitation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1988; 53 Pt 1: 283-94. Review.

Susini C, Bailey A, Szecowka J, Williams JA. Characterization of covalently cross-linked pancreatic somatostatin receptors. *J Biol Chem.* 1986; 261(35): 16738-43.

Tallent M and Reisine T. Gi alpha 1 selectively couples somatostatin receptors to adenylyl cyclase in pituitary-derived AtT-20 cells. *Mol Pharmacol.* 1992; 41(3): 452-5.

Tallent M, Liapakis G, O'Carroll AM, Lolait SJ, Dichter M, Reisine T. Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca2+ current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience*. 1996; 71(4):1073-81.

Tannenbaum GS and Epelbaum J. Somatostatin. In: Handbook of physiology -Section 7: The endocrine system. Vol. V: Hormonal control of growth. Goodman HM and Kostyo JL (Eds.). 2000. (pp. 221-265). NY, Oxford: Oxford University Press.

The Macugen Diabetic Retinopathy Study Group. A phase II randomized, double-masked, trial of pegaptanib, an antivascular endothelial growth

factor aptamer, for diabetic macular edema. Ophthalmology. 2005; 112: 1747-57.

The Macugen Diabetic Retinopathy Study Group. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology*. 2006; 113: 23-28.

Thermos K and Reisine T. Somatostatin receptor subtypes in the clonal anterior pituitary cell lines AtT-20 and GH3. *Mol Pharmacol.* 1988 ; 33(4): 370-7.

Thermos K, He HT, Wang HL, Margolis N, Reisine T. Biochemical properties of brain somatostatin receptors. *Neuroscience*. 1989; 31(1): 131-41.

Thermos K, Meglasson MD, Nelson J, Lounsbury KM, Reisine T. Pancreatic betacell somatostatin receptors. *Am J Physiol.* 1990; 259(2 Pt 1): E216-24.

Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res.* 2003; 43(17): 1805-15. Review.

Thoss VS, Pérez J, Probst A, Hoyer D. Expression of five somatostatin receptor mRNAs in the human brain and pituitary. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996; 354(4): 411-9.

Timmers HJ, Swaab DF, van de Nes JA, Kremer HP. Somatostatin 1-12 immunoreactivity is decreased in the hypothalamic lateral tuberal nucleus of Huntington's disease patients. *Brain Res.* 1996; 728(2): 141-8.

Tornqvist K and Ehinger B. Peptide immunoreactive neurons in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29(5): 680-6.

Tornqvist K, Uddman R, Sundler F, Ehinger B. Somatostatin and VIP neurons in the retina of different species. *Histochemistry*. 1982; 76(2): 137-52.

Trakranrungsie N and Will JA. Comparative vasodilation of peroxynitrite and 3morpholinosydnonimine. *Life Sci.* 2001; 69(20):2349-59. Tulipano G, Soldi D, Bagnasco M, Culler MD, Taylor JE, Cocchi D, Giustina A. Characterization of new selective somatostatin receptor subtype-2 (sst2) antagonists, BIM-23627 and BIM-23454. Effects of BIM-23627 on GH release in anesthetized male rats after short-term high-dose dexamethasone treatment. *Endocrinology*. 2002; 143(4): 1218-24.

van de Nes JA, Sandmann-Keil D, Braak H. Interstitial cells subjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes. Acta Neuropathol. 2002; 104(4): 351-6.

van Hagen PM, Baarsma GS, Mooy CM, Ercoskan EM, ter Averst E, Hofland LJ, Lamberts SW, Kuijpers RW. Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol.* 2000; 143 Suppl 1: S43-51. Review.

Vasilaki A and Thermos K. Somatostatin analogues as therapeutics in retinal disease. *Pharmacol Ther.* 2009; 122(3): 324-33. Review.

Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(7): 1600-9.

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(4): 625-32.

Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology*. 2002; 43(5): 899-909.

Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Hoyer D, Tsilimbaris M, Kouroumalis E, Pallikaris I, Thermos K. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(5): 1499-506.

Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(26): 12383-7.

Vincent SR and Hope BT. Neurons that say NO. Trends Neurosci. 1992; 15(3): 108-13. Review.

Wang HL, Bogen C, Reisine T, Dichter M. Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(23): 9616-20.

Wei JY, Roy DS, Leconte L, Barnstable CJ. Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1998; 56(1): 37-64. Review.

White CA and Chalupa LM. Subgroup of alpha ganglion cells in the adult cat retina is immunoreactive for somatostatin. *J Comp Neurol*. 1991; 304(1): 1-13.

White RE, Schonbrunn A, Armstrong DL. Somatostatin stimulates Ca(²⁺)activated K⁺ channels through protein dephosphorylation. *Nature*. 1991; 351(6327): 570-3.

Wilkinson GF, Thurlow RJ, Sellers LA, Coote JE, Feniuk W, Humphrey PP. Potent antagonism by BIM-23056 at the human recombinant somatostatin sst5 receptor. *Br J Pharmacol.* 1996; 118(3): 445-7.

Xiang Z, Jiang L, Kang Z. Transient expression of somatostatin mRNA in developing ganglion cell layers of rat retina. Brain Res Dev Brain Res. 2001; 128(1): 25-33.

Xin D and Bloomfield SA. Comparison of the responses of All amacrine cells in the dark- and light-adapted rabbit retina. *Vis Neurosci.* 1999; 16(4): 653-65.

Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(1): 251-5.

Yamaguchi K, Gaur VP, Spira AW, Turner JE. Cellular localization of somatostatin mRNA in rat retina. *Neuropeptides*. 1990; 17(1): 13-6.

Yamamoto R, Bredt DS, Snyder SH, Stone RA. The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience*. 1993; 54(1): 189-200.

Yamamoto T and Bing RJ. Nitric oxide donors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000; 225(3): 200-6. Review.

Yang DS, Boelen MK, Morgan IG. Development of the enkephalin-, neurotensin- and somatostatin-like (ENSLI) amacrine cells in the chicken retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997; 101(1-2): 57-65.

Yu D, Eldred WD. Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. *J Comp Neurol*. 2005; 483(3): 278-91.

Zalutsky RA and Miller RF. The physiology of somatostatin in the rabbit retina. J Neurosci. 1990; 10(2): 383-93.

Zharikov SI and Block ER. Association of L-arginine transporters with fodrin: implications for hypoxic inhibition of arginine uptake. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278(1): L111-7.

Zhu LJ, Krempels K, Bardin CW, O'Carroll AM, Mezey E. The localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, and 3 in rat testis. *Endocrinology*. 1998; 139(1): 350-7.

11. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ονοματεπώνυμο	Μαστροδήμου Νίκη		
Ημερομηνία γἑννησης	20 Maΐou, 1976		
Τόπος γἑννησης	Αθήνα, Αττικής		
Εθνικότητα	Ελληνική		
Οικ. Κατἁσταση	Έγγαμη, 2 παιδιά		
Διεὑθυνση κατοικίας	Νικολάου Λεμονάκη 34, 71410, Ηράκλειο Κρήτης Τηλ.: 2810-326061		
Διεὑθυνση εργασίας	Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 711 10, Ηράκλειο Κρήτης Τηλ. : 2810-39 45 23 και 2810-39 45 32 Fax: 2810-39 45 30 E-mail : <u>mastrodhmou@med.uoc.gr</u> <u>mastrodhmou@yahoo.com</u>		

<u>ΣΠΟΥΔΕΣ</u>

Ιούλιος 2000-σήμερα	Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Τίτλος Διατριβής: Μελέτη του Ρόλου της Σωματοστατίνης και Κορτιστατίνης στον Αμφιβληστροειδή και στην Ισχαιμική Αμφιβληστροειδοπάθεια. (Επιβλέποντες Καθηγητές: Κ. Θερμού, Ι. Παλλήκαρης)
1999	Πτυχίο Τμήματος Χημείας , Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
1999	Διπλωματική Εργασία Θέμα: Μελέτη του ρόλου της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή. Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπουσα: Κ. Θερμού, Αναπλ. Καθ. Φαρμακολογίας)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΒΡΑΒΕΙΑ

2004	Υποτροφία Μανασάκη από το Τμήμα Ιατρικής
------	--

Πανεπιστημίου Κρήτης

2003	 1° βραβείο για την καλύτερη παρουσίαση προφορικής ανακοίνωσης στο International Workshop in Neuroscience (September 23-25) 'Ischemia/Hypoxia in the Brain: Experimental Methods and Basic Mechanisms', Bucharest, Romania. Organized by the Physiological Society (U.K.), the International Brain Research Organization (IBRO) and the Rumanian Neuroscience Society
1995	Βραβείο Βροντουλάκη Μεγαλύτερη Βαθμολογία στις Εισαγωγικές Εξετάσεις ανάμεσα στους εισαχθέντες σε Τμήματα Χημείας από το Νομό Χανίων

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (Lower Certificate) Γαλλικά

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- 1/4/2000-30/9/2000 Ερευνητικό Πρόγραμμα: Κ.Α.:1173 «Μελέτη του ρόλου της σωματοστατίνης στα νευρωνικά κυκλώματα του αμφιβληστροειδή – προεκτάσεις στην παθοφυσιολογία αμφιβληστροπαθειών» Επιστημονική υπεύθυνη: Κ. Θερμού.
- 1/10/2000-31/3/2002 και Ερευνητικό Πρόγραμμα: K.A.:1354 «Somatostatin and its
- 1/1/2003-31/12/2003 Receptors in Brain Function and Dysfunction» Επιστημονική υπεύθυνη: Κ. Θερμού.
- 1/6/2002-31/12/2002 Ερευνητικό Πρόγραμμα: Κ.Α.:1618 «Μελέτη του σωματοστατίνης ρόλου της ως νευροπροστατευτικό στην ισχαιμική αμφιβληστροπάθεια: Αλληλεπιδράσεις тων συστημάτων σωματοστατίνης, μονοξειδίου του και γλουταμινικού αζώτου οξέος στον αμφιβληστροειδή» Επιστημονική υπεύθυνη: Κ. Θερμού.
- 1/7/2005-21/2/2006 Ερευνητικό Πρόγραμμα: Κ.Α.:1793 «Σύνθεση νέων αναλόγων κανναβινοειδών με πιθανή αναλγητική, ψυχοκινητική και ψυχοτροπική δράση που δεν

ακολουθείται από συμπεριφορά κατάχρησης» Επιστημονική υπεύθυνη: Κ. Θερμού.

ΑΛΛΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ

Χρήση Η/Υ

Χρήση στατιστικού προγράμματος (Prism)

Χρήση προγράμματος επεξεργασίας εικόνας (Adobe Photoshop)

Kάτοχος του **ECDL Core** (European Computer Driving Licence) για τις ενότητες:

- 1. Επεξεργασία Κειμένου (Word)
- 2. Υπολογιστικά Φύλλα (Excel)
- 3. Παρουσιάσεις (Powerpoint)
- 4. Πληροφορίες & Επικοινωνίες (Internet & Outlook)
- 5. Βασικές Έννοιες Πληροφορικής
- 6. Χρήση Υπολογιστή και Διαχείριση Αρχείων
- 7. Βάσεις Δεδομένων (Access)

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- 2000-σήμερα Ελληνική Εταιρεία για τις Νευροεπιστήμες IBRO & FENS
- 2002-σήμερα Ένωση Ελλήνων Χημικών
- 2003-σήμερα Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Mastrodimou N**, Kiagiadaki F, Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection against retinal ischemia. Invest Ophthalmol Vis Sci.49(1):342-9, 2008.

2. Xidakis C, **Mastrodimou N**, Notas G, Renieri E, Kolios G, Kouroumalis E, Thermos K.

RT-PCR and immunocytochemistry studies support the presence of somatostatin, cortistatin and somatostatin receptor subtypes in rat Kupffer cells. Regul Pept.143(1-3):76-82, 2007.

3. **Mastrodimou N**, Vasilaki A, Papadioti A, Low MJ, Hoyer D, Thermos K. Somatostatin receptors in wildtype and somatostatin deficient mice and their

involvement in nitric oxide physiology in the retina. Neuropeptides. 40(5):365-73, 2006.

4. **Mastrodimou N**, Kiagiadaki F, Hodjarova M, Karagianni E, Thermos K. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. Regul Pept. 133(1-3):41-6, 2005.

5. **Mastrodimou N**, Lambrou GN, Thermos K. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 371(1):44-53, 2005.

6. Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, **Mastrodimou N**, Hoyer D, Tsilimbaris M, Kouroumalis E, Pallikaris I, Thermos K. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(5):1499-506, 2004

7. Notas G, Kolios G, **Mastrodimou N**, Kampa M, Vasilaki A, Xidakis C, Castanas E, Thermos K, Kouroumalis E. Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors. J Hepatol. 40(5):792-8, 2004.

8. **Mastrodimou N**, Thermos K. The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. Neurosci Lett. 356(1):13-6, 2004.

9. Grigoryan EN, Vasilaki A, **Mastrodimou N**, Thermos K. Somatostatin receptor immunoreactivity in the eye of the adult newt (Pleurodeles waltlii Michan). Neurosci Lett. 337(3):143-6, 2003.

<u>ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ</u>

- 1. Kokona D., **Mastrodimou N.**, Pediaditakis S., Charalampopoulos I., Schmid HA., Thermos K. Pasireotide (SOM230) protects the retina from ischemia induced retinopathies. EVER, Crete / Greece, 455, p231, 2011.
- Thermos K., Mastrodimou N., Kokona D., Schmid H.A., Kiagiadaki F. Somatostatin analogues as therapeutics in ischemia induced retinopathies. Summer Neuropeptide Conference and The European Neuropeptide Club (ENC) Meeting, May 22 - 25, Boston, Massachusetts / USA, 2011.
- Thermos K., Giannogonas P., Koulakis E., Kokona D., Mastrodimou N., Kiagiadaki F., Charalampopoulos I., Gravanis A. Immunohistochemistry and western blot methodologies to evaluate neuroprotective agents in models of retinopathies. EVER, Crete / Greece, 4412, p148, 2010.
- 4. Thermos K., Giannogonas P., **Mastrodimou N.**, Charalampopoulos I. & Gravanis A. Neurosteroids Protect the Retina in a Rat Model of Chemical

Ischemia. 7th Forum of European Neuroscience, Amsterdam / The Netherlands, July 3-7, 2010.

- Giannogonas P., Mastrodimou N., Charalampopoulos I., Gravanis A., Thermos K. The neurosteroid DHEA protects the retina against chemical ischemia. 6th Panhellenic Congress of Pharmacology, Heraklion. Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition 24 (2), pp. 143, 2010.
- Thermos K., Kiagiadaki F. and Mastrodimou N. Nitric oxide and cGMP protect the retina from ischemia and mediate somatostatin's neuroprotective effects. EVER, Portoroz / Slovenia, Sept 30 - Oct 3, 2325, p58, 2009.
- Mastrodimou N. and Thermos K. Study of the neuroprotective effect of NO donors and 8-Br-cGMP in retinal ischemia and as players in somatostatin's actions. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Melbourne, Australia, 2007.
- 8. **Mastrodimou N.**, Thermos K. Effect of SIN-1 and 8-Br-cGMP in chemical ischemia in rat retina. 8th Pharmacology Symposium, Athens. Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakokinetikes, 25 (1), pp. 80-81, 2007.
- Thermos K., Mastrodimou N., Papazoglou M., Antoniou K., Panagis G., Vlachou S., Nahmias V., Menissiou A., Gianni M., Kondylis M.P., Papahatjis D., Spyraki C. 8th Pharmacology Symposium, Athens. Pharmacological and behavioral characterization of novel ligands for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakonetikes ,25 (1), pp. 44-45, 2007.
- Thermos K., Mastrodimou N., Papazoglou M., Antoniou K., Panagis G., Vlachou S., Nahmias V, Menissiou A., Gianni M., Kondylis M. P., Papahatjis D., Spyraki C. Pharmacological and behavioural characterization of novel ligands for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. 36th Annual Meeting, Neuroscience 2006, Atlanta / USA, October 14-18, 2006.
- Mastrodimou N. and Thermos K. Effect of SIN-1 and 8-Br-cGMP in chemical ischemia in rat retina. 20th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, Heraklion, p. 83-85. 2006.
- Panagis G., Antoniou K., Papazoglou M., Mastrodimou N., Polissidou A., Vlachou S., Nahmias V., Kondylis M. P., Thermos K., Papahatjis D., Daifoti-Papadopoulou Z. and Spyraki C. Pharmacological profile of DPG-4 a new ligand for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna / Austria, July 8-12, 2006.
- Antoniou K., Panagis G., Thermos K., Papazoglou M., Mastrodimou N., Polissidis A., Vlachou S., Nahmias V., Menissiou A., Gianni M., Kondylis M. P., Papahatjis D., Daifoti-Papadopoulou Z. and Spyraki C. Pharmacological characterization of novel ligands for CB1 and CB2

cannabinoid receptors. IUPHAR 2006 International conference, Beijing / China, July 2-7, 2006.

- Antoniou K., Panagis G., Thermos K., Papazoglou M., Mastrodimou N., Polissidis A., Vlachou S., Nahmias V., Menissiou A., Gianni M., Kondylis M. P., Papahatjis D., Daifoti-Papadopoulou Z. and Spyraki C. Pharmacological profile of DPG-4 a new ligand for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. 16th Annual Symposium On The Cannabinoids, Tihany / Hungary, June 24-28, 2006.
- Thermos, K., Papazoglou, M., Antoniou, K., Mastrodimou, N., Panagis, G., Vlachou, S., Renieri, E., Nahmias, V., Menisiou, A., Gianni, M., Kondylis, M.P., Daifoti-Papadopoulou, Z., Papahatjis, D., Spyraki, C. Pharmacological characterization of novel ligands for CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors. 4th Panhellenic Congress of Pharmacology, Patras. Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition, 20(2), 335, 2006.
- 16. Panagis, G., Antoniou, K., Thermos, K., Papazoglou, M., Mastrodimou, N., Polissidis, A., Vlachou, S., Nahmias, V., Kondylis, M.P., Papahatjis, D., Daifoti-Papadopoulou, Z., Spyraki, C. Pharmacological profile of DPG-4, a new ligand for CB1 and CB2 cannabinoid Receptors. 4th Panhellenic Congress of Pharmacology, Patras. Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition 20(2), 263, 2006.
- 17. Kouvidi E., **Mastrodimou N.**, Kiagiadaki F., Thermos K. SRIF modulates dopamine and cGMP levels in rat retina. 35th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, D.C., November 2005.
- 18. **Mastrodimou N.**, Kiagiadaki F., Thermos K. Somatostatin modulates cGMP levels in rat retina. Hellenic Society Neuroscience, Patras, September 2005.
- 19. Μαστροδήμου Ν., Hodjarova Μ., Καραγιάννη Ε., Κιαγιαδάκη Φ., Παπάζογλου Μ., Θερμού Κ. Η σωματοστατίνη ρυθμίζει τα επίπεδα του cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. 7ⁿ Επιστημονική Ημερίδα Φαρμακολογίας, Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής, Τόμος 23, σ.78-79, 2005.
- Mastrodimou N., Thermos K. Somatostatin receptors protect the retina from ischemic damage: Models of ischemic retinopathies and therapy. 7th Pharmacology Symposium, Athens. Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakokinetikes, 23 (1), pp. 76-77, 2005.
- Niki Mastrodimou and Kyriaki Thermos. Protective effects of somatostatin analogs against chemically induced ischemia in rat retina: role of somatostatin in the treatment of retinopathies. 5ο Συνέδριο -Medicinal Chemistry-Drug Discovery and Design, Patras, 2004
- 22. Notas G., Xidakis C., **Mastrodimou N.**, Manousou P., Valatas V., Kolios G., Thermos K., Kouroumalis E. Proinflammatory cytokines modulate the

expression and distribution of somatostatin receptors on HepG2 hepatocellular carcinoma cells. GUT 53 (suppl I) A182 SEP 2004.

- Notas G., Kampa M., Kolios G., Mastrodimou N., Vasilaki A., Xidakis C., Thermos K., Castanas E., Kouroumalis E. Opioids bind to Somatostatin Receptors on HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells and Inhibit Cellular Proliferation via a Protein Tyrosine Phosphatases dependent pathway. GUT 53 (suppl I) A182 SEP 2004.
- Manousou P., Notas G., Xidakis C., Valatas V., Vasilaki A., Mastrodimou N., Kolios G., Thermos K., Kouroumalis E. Somatostatin Receptors and Somatostatinergic peptides expressed by Kupffer cells. Regulatory Peptides 122, p29, 2004.
- 25. **Mastrodimou N.**, Thermos K. Effect of Somatostatin Analogs on Chemically Induced Ischemia in Rat Retina. 3rd Panhellenic Congress of Pharmacology, 14-15 February, 2004, Thessaloniki. Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition 18 (1), pp. 140-141, 2004.
- Notas G., Kolios G., Mastrodimou N., Kampa M., Vasilaki A., Xidakis C., Castanas E., Thermos K. and Kouroumalis E. Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of Somatostatin receptors. Gut 52 (Suppl VI) A72, 2003.
- Mastrodimou N., Lambrou G. and Thermos K. Effect of somatostatin, cortistatin and sst₂ agonists on chemically induced ischemia in rat retina. 1st International Conference of the National Neuroscience Society of Romania, 91, 2003.
- Mastrodimou N., Lambrou G. and Thermos K. Effect of somatostatin, cortistatin and sst₂ agonists on chemically induced ischemia in rat retina. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, Czech Republic, 4114, 2003.
- 29. Vasilaki A., Grigoryan E.N., **Mastrodimou N.** and Thermos K. Somatostatin receptor (sst3) immunoreactivity in the eye of the adult newt Proc. Soc. Neurosci., 26: 347, 2000.
- Vasilaki A., Giakoumaki S., Mastrodimou N., Gardette R., Epelbaum J. and Thermos K. NADPH-diaphorase colocalizes with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the rat and rabbit retina. Eur. J. Neurosci, 12 (supplement 11), 466, 2000.
- Mastrodimou N., Vasilaki A., Nifli P., de Lecea L. and Thermos K. Downregulation of somatostatin receptors (sst2A and sst2B) in retinas of mice overexpressing cortistatin: an immunohistochemical study. Hellenic Society for Neurosci 15th Annual Meeting, Patras, 2000.

<u>ΤΕΧΝΙΚΕΣ</u>

Ανοσοϊστοχημεία Ιστοχημεία Χρώση ιστών Χρήση μικροσκοπίου Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS, αγαρόζης) Ανοσοαποτύπωση (Western blot) Ραδιοανοσοανάλυση (RIA) Μελέτες Δέσμευσης (Radioligand Binding Assays) Ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA) Απομόνωση DNA Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) Πρωτογενείς καλλιέργειες αμφιβληστροειδή *In vivo & ex vivo* μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας Κυτταροκαλλιέργιες

12. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Neuroscience Letters 356 (2004) 13-16

Neuroscience Letters

www.elsevier.com/locate/neulet

The somatostatin receptor (sst_1) modulates the release of somatostatin in rat retina

Niki Mastrodimou, Kyriaki Thermos*

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110, Greece Received 1 August 2003; received in revised form 10 October 2003; accepted 3 November 2003

Abstract

The aim of this study was to examine the ability of somatostatin receptor (sst_1) to regulate the release of somatostatin in rat retina. Immunohistochemistry studies were performed to locate the somatostatin neurons, and radioligand binding to ascertain the presence of sst_1. The neuronal release of somatostatin was examined ex vivo in rat retinal explants in the presence of KCl (50 and 100 mM), and absence of Ca⁺⁺ (EGTA; 10 mM). Somatostatin levels, quantified by radioimmunoassay, were increased in the presence of KCl (100 mM, 151%) and attenuated in the absence of Ca⁺⁺ (31%). CH275 (sst_1 agonist) reduced the somatostatin levels in a concentration-dependent manner (10^{-5} – 10^{-7} M), and this effect was reversed by NVP-SRA 880 (sst_1 antagonist; 10^{-5} M). MK678 (sst_2 agonist; 10^{-5} M) had no effect. These data suggest an autoreceptor role for sst_1 in retina.

© 2003 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Neuropeptide release; Autoreceptor; Somatostatin ligands

Somatostatin (somatotropin release inhibitory factor, SRIF) is present in amacrine, ganglion, and interplexiform cells in retinas of many species and believed to function as a neurotransmitter, neuromodulator or trophic factor [for a review see ref. [15]. Its actions are mediated by specific receptors as substantiated by pharmacological [10,17] and reverse transcriptase-polymerase chain reaction studies [11].

Recent immunohistochemical studies have permitted the mapping of the six SRIF receptor subtypes (sst_{1-5} ; for classification and nomenclature see ref. [7]) in retinal circuitry [15]. Their function in the retina is still under investigation, yet the sst_2 receptor has been shown to regulate nitric oxide [16,18] and glutamate release [2].

Helboe and Moller [6] first reported sst₁ immunoreactivity in displaced amacrine cells in the ganglion cell layer, in a small number of ganglion cells and in SRIF expressing amacrine cells located in the inner nuclear layer (INL). This latter finding suggested that the sst₁ receptor might function as an autoreceptor.

The aim of the present study was to address this issue directly by performing functional studies to examine the release of somatostatin and its modulation by the selective sst₁ agonist CH275 in rat retinal explants.

Male and female Sprague–Dawley rats weighing 250– 300 g were housed two to three animals per cage with free access to food and water. A 12-h light-dark cycle was maintained. Euthanasia was performed with ether inhalation. All procedures performed on the animals were in accordance with Greek National Laws (Animal Act, PD 160/91). Female rats were employed for the immunohistochemistry and release studies, while male and female rats for the binding studies.

Immunohistochemistry studies were performed to examine the localization of SRIF in rat retinas. Sections (10 μ m) were incubated with a rabbit polyclonal antibody raised against somatostatin (1/1000; kindly provided by Prof. G. Sperk) followed by incubation with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (H + L) (Vector Laboratories, USA, 1:150) [16,18]. Immunoreactivity was examined with Leica DM RE, He/Ne laser scanning confocal microscope and the images were processed using Adobe Photoshop (version 6.0). Retinal membranes were employed in radioligand binding assays [17] in order to assess the ability of SRIF and CH275 to inhibit the specific [¹²⁵I]-Tyr¹¹-somatostatin binding.

For the release studies retinas were mechanically

^{*} Corresponding author. Tel.: +30-2810-394-533; fax: +30-2810-394-530.

E-mail address: thermos@med.uoc.gr (K. Thermos).

^{0304-3940/03/\$ -} see front matter @ 2003 Published by Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.neulet.2003.11.020

detached from the rest of the eyecup and incubated with continuous shaking in 500 µl medium per retina in a culture incubator at 37 °C (95% O₂, 5% CO₂) two times for 60 min [18]. The first incubation was performed for the stabilization of the SRIF release and the medium was discarded. In the second incubation, KCl (50, 100 mM), EGTA (10 mM), sst analogues CH-275 (sst₁) (10⁻⁵-10⁻⁷ M), MK-678 (sst₂) $(10^{-5} - 10^{-7} \text{ M})$, and the sst₁ antagonist NVP-SRA 880 (10^{-5} M) [8] were added to the retinal explants and incubated for 60 min further. To examine the selectivity of the sst₁ effect, retinal explants were incubated for 60 min with NVP-SRA 880 (10^{-5} M) prior to the addition of CH275 (10^{-5} M) . Subsequent to the last incubation, the whole mixture (medium and tissue) was centrifuged for 15 min at 12,000 rpm, at 4 °C and the sample prepared for quantification of somatostatin levels using radioimmunoassay [14]. Results are given as mean \pm SEM and *n* is the number of values. The statistical difference between groups was assessed by Student's unpaired t-test using the GraphPad Prism software (version 2.01).

SRIF immunoreactivity was observed in amacrine, displaced amacrine cells and processes of the IPL and the retinal pigment epithelium (RPE) (Fig. 1). SRIF and CH275 inhibited the specific [125 I]-Tyr 11 -somatostatin binding in a concentration dependent manner with an IC₅₀ value of 7 and 0.22 nM, respectively (Fig. 2). The sst₁ binding sites represented approximately 40% of the total binding sites.

Basal somatostatin levels in retinal explants were found to be $1.8 \pm 0.2 \text{ pg/}\mu\text{g}$ of protein (n = 23). An increase in somatostatin release (151.2%) was observed in the presence of KCl (100 mM) (Fig. 3A), while KCl (50 mM) had no statistically significant effect (data not shown). The absence of Ca⁺⁺ resulted in an attenuation of somatostatin levels (31%) (Fig. 3B).

CH275 attenuated the somatostatin levels in a concentration dependent manner (40% at 10^{-5} M; Fig. 4A). The sst₁ specific antagonist, NVP-SRA 880 (10^{-5} M) reversed partially but in a statistically significant manner the agonist effect when administered prior to CH275 (10^{-5} M), yet had no effect when administered alone (Fig. 4B). The sst₂



Fig. 1. SRIF immunoreactivity in the rat retina. SRIF immunoreactivity is present in amacrine cells in the inner nuclear layer (INL), in displaced amacrine cells in the ganglion cell layer (GCL), on processes lengthening through out the inner plexiform layer (IPL) and in the retinal pigment epithelium (RPE). ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer. Scale bar: $50 \ \mu$ M.



Fig. 2. Inhibition of specific $[^{125}I]$ Tyr¹¹-somatostatin binding to rat retinal membranes. SRIF and CH275 inhibited the specific binding in a concentration dependent manner (n = 2).

selective agonist MK678 had no statistically significant influence on somatostatin levels (Fig. 4C).

The present study attempted to provide functional evidence for the role of the sst_1 somatostatin receptor subtype in the retina. sst_1 immunoreactivity was known to be present in a number of retinal neurons in rat, rabbit and human retina [1,9,18], including SRIF [1,6] and tyrosine hydroxylase (TH)-expressing amacrine cells [1].

In the present study, the radioligand binding data support the presence of the sst₁ subtype in rat retina, which represents approximately 40% of the total somatostatin binding sites. These results are in agreement with data previously shown in rabbit retina [17] and are consistent with the presence of sst₂ and sst₄ receptors in rat retina [11,18].

The colocalization of sst_1 and SRIF in amacrine cells allude to an autoreceptor role for the sst_1 receptor [1,6]. In the present study, the presence of somatostatin was found in retinal neurons and RPE (Fig. 1), in agreement with previous reports [6,15]. However, we were unable to locate sst_1 immunoreactivity in amacrine cells (SRIF or THimmunoreactive) [18]. We cannot explain the discrepancy pertaining to our data and those of previously mentioned studies [1,6]. To this end, in the present work we performed direct pharmacological studies examining the effect of selective SRIF agonists on the release of somatostatin.

Somatostatin was neuronally released as ascertained by the effects of KCl (100 mM) and EGTA on the basal levels of somatostatin. The use of a smaller concentration of KCl (50 mM) had no effect on SRIF levels. This result is in agreement with data in rat retina showing that 50 mM KCl does not affect the release of a number of neurotransmitters such as glutamate, GABA and aspartate, in contrast to what was observed in cerebrocortical slices where a 10-fold increase was observed [12].

The selective sst₁ agonist CH275 modulated somatostatin release by reducing its levels at the concentrations of 10^{-5} and 10^{-6} M. The use of such high concentrations of ligands to obtain a functional response may be due to poor



Fig. 3. Effect of KCl and Ca⁺⁺ on SRIF release. SRIF levels were increased in the presence of KCl (100 mM; n = 4) (A); and decreased in the presence of EGTA (10 mM; n = 4) (B), *P < 0.05 unpaired one tailed *t*-test, **P < 0.005 unpaired two tailed *t*-test.

access of the compounds [18], in conjunction to the small number of amacrine cells containing the sst_1 subtype. However, the reversal of the CH275 effect by the sst_1 antagonist provided the pharmacological relevance of the agonist effect.

NVP-SRA 880 was found to have high affinity for human, rat and mouse sst_1 and to be a selective sst_1 antagonist in forskolin-stimulated cAMP and GTP γ S binding studies [8]. NVP-SRA 880 alone did not influence the somatostatin levels, even though an increase was expected. There are reports, however, showing no increase in neurotransmitter release after administration of the specific autoreceptor antagonist [4]. NVP-SRA 880 (10⁻⁵ M) coadministered with KCl (50 mM) did increase SRIF levels as compared to the KCl effect alone (data not shown).

The sst_2 receptor subtype has been localized in most retinal cell types [15], yet never on the SRIF containing neurons. Our results showing MK678 not able to regulate the release of SRIF substantiates the immunohistochemical data.

sst₁, sst₂, sst₄ receptors are primarily present in the mammalian retina. While limited data do exist to support a function for the sst₂ receptor [2,16,18], the function of sst₁ and sst₄ (present in ganglion cells [18] remains to be

elucidated. Immunohistochemical studies have supported an autoreceptor role for the sst_1 receptor in retina [1,6] and brain [5,13] and most recent studies showed that SRIF levels were significantly increased in retinas of sst_1 KO mice [3].

The present data provide for the first time evidence for the neuronal release of SRIF in the rat retina and a functional role for the sst_1 receptor, as the autoreceptor modulating SRIF levels. It remains to be elucidated whether sst_1 is a synthesis or release modulating receptor.



Fig. 4. Effect of selective SRIF receptor ligands on somatostatin levels in rat retinal explants. CH275 (sst₁ agonist) decreased the somatostatin levels in a concentration-dependent manner, (n = 9-13) (A). The sst₁ antagonist NVP-SRA 880 reversed this effect (n = 8) (B). NVP-SRA 880 alone (n = 8) (B); and MK678 (sst₂ agonist, n = 4) (C) had no statistically significant influence on somatostatin release. * compared to control or # compared to CH275 effect, P < 0.05 unpaired two tailed *t*-test. **P < 0.005, ***P < 0.0001 unpaired two-tailed *t*-test.

Acknowledgements

Supported by the Ministry of Education (EPEAEK 'Neurosciences', 'Natural Products') and an EC contract (QLG3-CT-1999-00908). The authors like to thank Drs J. Epelbaum and A. Vasilaki for valuable comments, D. Hoyer for providing NVP-SRA 880, and Ms D. Papasava for excellent technical assistance.

References

- R. Cristiani, G. Fontanesi, G. Casini, C. Petrucci, C. Viollet, P. Bagnoli, Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41 (2000) 3191–3199.
- [2] M. Dal Monte, C. Petrucci, A. Cozzi, J.P. Allen, P. Bagnoli, Somatostatin inhibits potassium-evoked glutamate release by activation of the sst₂ somatostatin receptor in the mouse retina, Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 367 (2003) 188–192.
- [3] M. Dal Monte, C. Petrucci, A. Vasilaki, D. Cervia, D. Grouselle, J. Epelbaum, H.-J. Kreienkamp, D. Richter, D. Hoyer, P. Bagnoli, Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina, Neuropharmacology 45 (2003) 1080–1092.
- [4] L. De Groote, B. Olivier, H.G.M. Westenberg, Extracellular serotonin in the prefrontal cortex is limited through terminal 5-HT_{1B} autoreceptors: a microdialysis study in knockout mice, Psychopharmacology 162 (2002) 419–424.
- [5] L. Helboe, C.E. Stidsen, M. Moller, Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst₁ in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus, J. Neurosci. 18 (1998) 4938–4945.
- [6] L. Helboe, M. Moller, Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst₁ and sst₂ in the rat retina, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40 (1999) 2376–2382.
- [7] D. Hoyer, G.I. Bell, M. Berelowitz, J. Epelbaum, W. Feniuk, P.P. Humprey, A.M. O'Carroll, Y.C. Patel, A. Schonbrunn, J.E. Taylor, T.

Reisine, Classification and nomenclature of somatostatin receptors, Trends Pharmacol. Sci. 16 (1995) 86–88.

- [8] D. Hoyer, K. Dixon, C. Gentsch, A. Vassout, A. Enz, A. Jaton, C. Nunn, P. Schoeffter, P. Neumann, T. Troxler, P. Pfaeffli, NVP-SRA880, a somatostatin sst₁ receptor antagonist promotes social interactions, reduces aggressive behaviour and stimulates learning, Pharmacologist 44, 2 (Suppl. 1) (2002) A254.
- [9] D.D. Klisovic, M.S. O'Dorisio, S.E. Katz, J.W. Sall, D. Balster, T.M. O'Dorisio, E. Craig, M. Lubow, Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42 (2001) 2193–2201.
- [10] M. Kossut, T. Yamada, L.B. Aldrich, L.H. Pinto, Localization and characterization of somatostatin binding sites in the mouse retina, Brain Res. 476 (1990) 78–84.
- [11] M. Mori, M. Ahara, T. Shimizu, Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body, Neurosci. Lett. 223 (1997) 185–188.
- [12] M.J. Neal, J.R. Cunningham, P.H. Hutson, J. Hogg, Effects of ischaemia on neurotransmitter release from isolated retina, J. Neurochem. 62 (1994) 1025–1033.
- [13] S. Schulz, M. Handel, M. Schreff, H. Schmidt, V. Höllt, Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies, J. Physiol. (Paris) 94 (2000) 259–264.
- [14] S. Sperk, R. Widmann, Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid, J. Neurochem. 45 (1985) 1441–1447.
- [15] K. Thermos, Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review, Vis. Res. 43 (2003) 1805–1815.
- [16] A. Vasilaki, R. Gardette, J. Epelbaum, K. Thermos, NADPHdiaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42 (2001) 1600–1609.
- [17] A. Vasilaki, Z. Georgoussi, K. Thermos, Somatostatin receptor (sst₂) are coupled to G_o and modulate GTPase activity in the rabbit retina, J. Neurochem. 84 (2003) 625–632.
- [18] A. Vasilaki, M. Mouratidou, S. Schulz, K. Thermos, Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst₂ receptors in the rat retina, Neuropharmacology 43 (2002) 899–909.

ORIGINAL ARTICLE

Niki Mastrodimou · George N. Lambrou · Kyriaki Thermos

Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina

Received: 12 August 2004 / Accepted: 29 November 2004 / Published online: 12 January 2005 © Springer-Verlag 2005

Abstract This study investigated the neuroprotective effect of somatostatin, cortistatin and agonists at somatostatin₂ (sst₂) receptors in retinal explants subjected to chemical ischaemia. Eyecups of female Sprague-Dawley rats (250-300 g) were immersed in PBS buffer or PBS containing iodoacetic acid (IAA; 0.5, 5, 50, 100 mM) and sodium cyanide (NaCN; 2.5, 25, 250, 500 mM) (chemical ischaemia solution) for 15, 30, 45, 60, 120 min (pilot study). Subsequently, eyecups were incubated with (1) PBS, (2) chemical ischaemia solution (5 mM IAA/25 mM NaCN) or (3) somatostatin, cortistatin, BIM23014 or MK678 $(0.1, 1, 10 \mu M)$ together with the chemical ischaemia solution for 60 min, followed by a second 60-min incubation in PBS (control and ischaemia groups) or ligands in PBS (neuroprotection groups). The evecups were subsequently fixed and sectioned for immunohistochemistry. Treatment of the eyecups with IAA/NaCN (5/25 mM) for 60 min abolished choline acetyltransferase (ChAT), tyrosine hydroxylase and brain nitric oxide synthase immunoreactivity in the inner nuclear, inner plexiform and ganglion cell layers. It also abolished protein kinase C immunoreactivity in rod bipolar cells and terminals, but did not damage ganglion cells labelled for microtubuleassociated protein-1. TUNEL staining provided evidence of cell death in the ischaemic retina. Cortistatin, BIM23014 and MK678 attenuated the retinal damage caused by the chemical ischaemia in a concentration dependent manner. The ligands afforded approximately 58, 76 and 49% neuroprotection, respectively, of the ChAT immunoreactive cells. These results demonstrate that somatostatin analogues

N. Mastrodimou · K. Thermos (⊠) Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, 71110, Greece e-mail: thermos@med.uoc.gr Fax: +30-2810-394530

G. N. Lambrou Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel, Switzerland can protect the retina from ischaemic damage. The chemical ischaemia model is presently employed for the elucidation of the mechanisms involved in the neuroprotection.

Keywords Ischaemia \cdot Neuroprotection \cdot Cortistatin \cdot sst₂ analogues \cdot Retinal markers \cdot Immunoreactivity

Introduction

The neuropeptide somatostatin (Brazeau et al. 1973) is found in the retina (Shapiro et al. 1979). Recent immunohistochemistry studies have shown the presence of specific receptor subtypes, ssts (Hoyer et al. 1995) in retinal neurons and the retinal pigment epithelium (RPE) (for a recent review, see Thermos 2003). Specifically, sst_{2A} receptors are localized in rod bipolar, amacrine and photoreceptor cells (Helboe and Moller 1999; Johnson et al. 1998, 1999; Vasilaki et al. 2001; Petrucci et al. 2001), while sst_{2B} receptors are localized in photoreceptors and the RPE (Vasilaki et al. 2001, 2004). In addition, sst_1 and sst_4 receptors are present in amacrine (Cristiani et al. 2000) and ganglion cells (Vasilaki et al. 2002; Cristiani et al. 2002), respectively.

Retinal ischaemia is the underlying cause of many ocular diseases and leads to neuronal damage and blindness. Somatostatin has been shown to have neuroprotective effects in different paradigms of neurotoxicity in the central nervous system, such as NMDA-induced neurotoxicity in cortical cultures (Forloni et al. 1997) and middle cerebral artery occlusion (Rauca et al. 1999). The recently discovered novel neuropeptide cortistatin (de Lecea et al. 1996), which resembles somatostatin structurally and binds to somatostatin receptors (Siehler et al. 1998), also protects against kainate-induced neurotoxicity (Braun et al. 1998) and ischaemic neuronal damage following middle cerebral artery occlusion (Rauca et al. 1999).

The importance of somatostatin ligands in the inhibition of ischaemia-induced neovascularization, one of the major causes of retinal diseases that result in visual loss, has been investigated. Somatostatin and its sst₂ agonists inhibit the ischaemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy (Smith et al. 1997; Higgins et al. 2002). However, the effect of somatostatin in other models of ischaemia underlying the pathophysiology of different retinal diseases, as well as the mechanisms involved, have not been studied adequately.

The aim of the present study was to employ an in vitro pharmacological model of ischaemia, namely chemical ischaemia, known to be useful in the understanding of the early events underlying ischaemia, and to investigate the putative neuroprotective effects of somatostatinergic agents.

Methods

Animals

Female Sprague-Dawley rats (250–300 g) were housed two to three animals per cage with free access to food and water. A 12-h light-dark cycle was maintained. Rats were euthanized by ether inhalation. All the procedures involving animals were in accordance with Greek national law (Animal Act, P.D. 160/91).

Viability of retinal explants

Eyecups were immersed in PBS buffer for 2, 6, 12 or 24 h and incubated at 37°C and 5% $CO_2/95\%$ air, as in the chemical ischaemia studies. At the end of the incubation period the eye cups were prepared for immunohistochemistry and terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) assays (see sections below).

Chemical ischaemia

In a pilot study, eyecups were immersed in PBS buffer alone or in PBS containing iodoacetic acid (IAA; 0.5, 5, 50, 100 mM) and sodium cyanide (NaCN; 2.5, 25, 250, 500 mM) (chemical ischaemia solution) for 15, 30, 45, 60, 120 min. Subsequently, eyecups were incubated with (1) PBS, (2) chemical ischaemia solution (5 mM IAA/25 mM NaCN) or (3) somatostatin (1, 10 μ M) cortistatin, BIM23014 or MK678 (0.1, 1, 10 μ M) together with the chemical ischaemia solution for 60 min (2×30 min), followed by 2×30-min incubation in PBS (control and ischaemia groups) or somatostatin ligands in PBS (neuroprotection groups). The selective sst₄ and sst₅ analogues L-809,087 and L817,818 (Rohrer et al. 1998), respectively, were also tested for their possible neuroprotective abilities under the same conditions as for the other ligands. All incubations were performed at 37°C and 5% CO₂/95% air.

Retinas were cultured in PBS, since culture medium with serum protects chick retinal neurons against cell toxicity generated by excitatory amino acids and chemical ischaemia (Ferreira et al. 1998). Immunohistochemical studies

Tissue preparation

After completion of the chemical ischaemia protocol, the eye cups were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 1 h at 4°C. After fixation, eyecups were rinsed in PB and incubated in 30% sucrose overnight, at 4°C for cryoprotection. Tissues were frozen in isopentane at -45°C for 1 min and kept at -80°C until further use. Eyecups were sectioned vertically into 10-µm slices using a cryostat, the sections thaw-mounted on gelatine-coated slides and stored at -20°C. Slices were cut near the optic nerve, every 100 µm. Nine slices were put on every slide.

Immunohistochemistry

A mouse monoclonal antibody raised against choline acetyltransferase (ChAT, 1:100, Biotrend, Cologne, Germany), and a rabbit polyclonal antibody raised against tyrosine hydroxylase (TH, 1:1,000, Chemicon, Temecula, Calif., USA) were employed as markers for acetylcholine- and dopamine-containing amacrine cells, respectively. Mouse monoclonal antibodies were used for protein kinase C (PKC, 1:50, Leinco Technologies, St. Louis, Mo., USA), and for microtubuleassociated protein-1 (MAP₁, 1:100, Sigma, St. Louis, MO, USA) as markers for rod bipolar cells and ganglion cells, respectively. A rabbit polyclonal antibody raised against brain nitric oxide synthase (bNOs, 1:3,000, Sigma) was also employed.

Crvostat sections were incubated in 0.1 M TRISbuffered saline (TBS), pH 7.4 containing 3.3% normal goat serum for 30 min, washed in 0.1 M TBS and incubated with the primary antibodies in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1 h with the appropriate secondary antibody, rhodamine; tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat affinity purified goat antimouse IgG (H+L) (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa., USA) or Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (H+L) (1:200, Molecular Probes, Eugene, Ore., USA) for the monoclonal antibodies and fluorescein; fluoroscein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:150, Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA) for the polyclonal antibodies. Finally, the sections were washed and cover-slipped with mounting medium (Vector). Negative controls were included by omitting the primary antibody.

Microscopy

Images were taken with a Leica DM RE laser-scanning microscope (He/Ne laser) with HP Plan APO $\times 20/0.70$. Optic sections were taken with a *z*-axis resolution of 1.1 µm through the immunolabelled cells. Light and contrast

Table 1 Effect of chemical ischaemia (iodoacetic acetic acid IAA,sodium cyanide NaCN) on choline acetyltransferase immunoreac-tivity (ChAT-IR) in rat retina (+ ChAT immunoreactivity observed,- ChAT immunoreactivity not observed)

IAA (mM)	NaCN (mM)	Time (min)	ChAT-IR
0.5	2.5	15, 30, 45, 60	+
5	25	60, 120	_
50	250	60, 120	_
100	500	60, 120	_

in the images were adjusted using appropriate software (Photoshop v. 5.0, Adobe, San Jose, Calif., USA).

Quantification

For quantification studies, each section studied was centered in the optic field of the HP Plan APO $\times 20/0.70$ lens. ChAT immunoreactive cells were counted in the area around the optic nerve. For the control studies 21 sections were examined from five different experiments (retinas). The number of sections employed for the neuroprotection groups was as follows: BIM23014 group, 13 sections from four different retinas; MK678 group, 9 sections from three different retinas, cortistatin group, 12 sections from four different retinas. The n values presented in the Results section represent the number of retinas studied.

TUNEL staining

To determine cell loss, enzymatic in situ labelling of apoptosis induced DNA strand breaks was performed using the TUNEL assay (Roche, Germany).

Radioimmunoassay

Somatostatin levels were determined in medium obtained from samples incubated for 30 min in the presence of the chemical ischaemia solution containing somatostatin 1 μ M. The samples were centrifuged for 15 min at 12,000 rpm, at 4°C. Acetic acid (2N) was added to the supernatant, the mixture boiled for 10 min, lyophilized and kept at -80°C. The assay mixture contained the somatostatin antiserum (kindly provided by Prof. G. Sperk) at a final dilution of 1:30,000, [¹²⁵I]-Tyr¹¹-somatostatin (20,000 cpm) and somatostatin standards (0–200 pg/100 μ l) or samples in a final assay volume of 0.5 ml, according to Sperk and Widmann (1985). Samples were incubated at 4°C for 24 h. Bound and free peptide were separated by addition of



Fig. 1a–e Choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity and TUNEL stain in rat retina. **a** Control retinas showing ChAT immunoreactivity in amacrine cells in the inner nuclear (*INL*) and ganglion cell (*GCL*) layers and processes in the inner plexiform

layer (*IPL*) (n=12). **b**, **c** No immunoreactivity is seen in ischaemic retinas (n=12, **b**) or in the presence of the secondary antibody alone (**c**). No TUNEL staining is seen in control retinas (**d**), but is abundant in the ischaemic retina (**e**). *Scale bars*, 40 µm

900-µl aliquots of a mixture containing 2.5% charcoal and 0.25% dextran T70 and subsequent centrifugation.

Results

To assess retinal ischaemia, a pilot study was performed using different concentrations and times of incubation of the eyecups with IAA/NaCN (Table 1). Incubation of the eyecups with IAA/NaCN (0.5/2.5 mM) had no effect, whereas treatment with IAA (5, 50, 100 mM)/NaCN (25,

Fig. 2 Viability of rat retinal tissue. ChAT immunoreactivity is seen in amacrine cells in the INL and GCL and processes in the IPL of retinas incubated for 2 h with PBS. The immunoreactivity is decreased at 6 h and absent at 12 and 24 h. TUNEL staining (for apoptosis) appeared at 6 h and was maximal at 12 and 24 h. The experiments were performed twice. *Scale bars* 40 µm

250, 500 mM) for 60 or 120 min abolished ChAT immunoreactivity. Therefore, a solution with the lowest concentrations of the two chemicals that elicited retinal damage, namely 5 mM IAA/25 mM NaCN, was used to induce chemical ischaemia in subsequent experiments. The working protocol involved incubation of the eyecups with PBS for a total of 120 min (4×30 min) (control group), the chemical solution (5 mM IAA/25 mM NaCN) for 60 min (2×30 min) followed by a 60-min (2×30 min) incubation with PBS (ischaemia group) or incubation with somatostatin (1, 10 μ M), cortistatin, BIM23014 or MK678 (0.1,



1, 10 μ M) with the chemical ischaemia solution for 60 min (2×30 min), followed by 2×30-min incubation of the ligands in PBS (neuroprotection groups).

A representative picture of ChAT immunoreactivity in sections of retinas from control and chemical ischaemia groups (n=12) is shown in Fig. 1. ChAT immunoreactivity is seen in amacrine cells in two layers of the retina, the



Fig. 3 Concentration-dependent attenuation of chemically induced ischaemic damage to ChAT immunoreactive neurons by somatostatin receptor agonists. ChAT immunoreactivity is seen in amacrine cells in the INL and GCL and processes in IPL in retina incubated

with cortistatin 1 μ M (*n*=5) or 10 μ M (*n*=3), BIM 23014 1 μ M (*n*=5) or 10 μ M (*n*=3) or MK678 1 μ M (*n*=4) or 10 μ M (*n*=4) in the presence of the ischaemia mixture. *Scale bars* 40 μ m

Table 2 Number of ChAT immunoreactive cells observed in the neuroprotection groups expressed as a percentage of the value in the control group. (*INL* inner nuclear layer, *GCL* ganglion cell layer)

Neuroprotection group	% of control		Total
	INL	GCL	-
Cortistatin	58.6±11.5	58.1±5.8	58.3±3.9
BIM 23014	77.8±4.9	73.9±7.7	75.9±4.9
MK 678	72.4±5.2	24.1±4.2	49.4±4.6

inner nuclear (INL) and the ganglion cell (GCL) layers, and in processes in the inner plexiform layer (IPL). ChAT immunoreactivity was not observed in retinas subjected to chemical ischaemia (Fig. 1b), nor after incuabtions with the second antibody alone (Fig. 1c). TUNEL staining substantiated the cell death produced by the ischaemic solution (Fig. 1e).

ChAT immunoreactivity and TUNEL staining were employed to examine cell viability of retinal explants over a 24-h period. Both markers showed cell viability to be maximal at 2 h, decreased at 6 h and absent at 12 and 24 h (Fig. 2). All subsequent observations were therefore made after 2 h.

To examine the possible neuroprotective effect of somatostatin, cortistatin and analogues, different paradigms were employed. The somatostatin ligands afforded neuroprotection when they were incubated with the eye cup in the presence of the ischaemia solution for 2×30 min, with two subsequent 30-min additions in the absence of the ischaemia solution. The total 60-min incubation was divided into 2×30 -min incubations, with addition of new peptide for the second 30-min period, to limit the degradation of the peptides. No neuroprotective effect was observed when the analogues were incubated with the eye cups after the chemical ischaemia reaction had been established.

When the retina was incubated with somatostatin (1 or 10 μ M) in the presence of the ischaemia solution and subsequently for 2×30 min (*n*=2) no protection was found. Somatostatin levels were measured in samples to which 1 μ M somatostatin had been added in the presence of the ischaemia solution, and found to be reduced to 277 ±33 nM (*n*=3). These results suggested that somatostatin was degraded under the experimental conditions.

To examine the putative neuroprotective effect of cortistatin and the sst₂ analogues BIM23014 and MK678, a concentration/response relation was constructed (Fig. 3). The effect of cortistatin [0.1 μ M (*n*=4), 1 μ M (*n*=5), 10 μ M (*n*=3)], BIM23014 [0.1 μ M (*n*=3), 1 μ M (*n*=5), 10 μ M (*n*=3)], and MK678 [0.1 μ M (*n*=3), 1 μ M (*n*=4), 10 μ M (*n*=4)] is shown in Fig. 3. The three ligands reversed the ischaemic damage concentration dependently. The data obtained from



Fig. 4a–f Effect of somatostatin receptor agonists on chemically induced ischaemic damage to tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive neurons. **a** Control retina showing TH immunoreactivity in amacrine cells and processes in the IPL (n=5). **b**, **c** No immunoreactivity is seen in ischaemic retina (n=5, **b**) or in the presence of

the secondary antibody alone (c). d-f Cortistatin (n=3, d), BIM 23014 (n=3, e) and MK678 (n=3, f) in the presence of the ischaemia solution prevent the loss of TH immunoreactive neurons. *Scale bars* 40 μ m

the smaller concentration of the ligands that afforded neuroprotection $(1 \ \mu M)$ were employed for quantification purposes.

ChAT immunoreactivity was present in amacrine cells in the INL and GCL and in the processes in the IPL. The numbers of cells immunostained in the control and neuroprotection group (cortistatin, BIM23014 and MK678) were determined and are presented in Table 2.

CHAT-immunoreactive cells were counted in the GCL and INL of control (PBS) and neuroprotection groups. In the control group a mean of 10.6 ± 0.8 and 11.7 ± 0.8 cells/ field were counted in the GCL and INL, respectively. BIM23014 protected 74 and 78%, MK678 protected 24 and 72% and cortistatin 58 and 59% of the cells in the GCL and INL, respectively, compared with cells in the same layers of the control sections (PBS group). The total immunostained cells in the control group were 22.3 ± 1.2 . BIM23014, MK678 and cortistatin protected 76, 49 and 58% of these cells, respectively.

When present in the incubation under the same conditions as for cortistatin and the sst_2 ligands, sst_4 - and sst_5 selective ligands (1 μ M) did not attenuate the effects of chemical ischaemia (data not shown).

In addition to ChAT, other retinal markers were also examined to establish the viability of the ischaemic retina as well as the neuroprotective properties of the somatostatin agents. Concentration/response curves were constructed for the three ligands and TH-, bNOS-, and PKC-immunoreactivities. The curves for all markers examined were similar to that shown in Fig. 3 for ChAT immunoreactivity (data not shown). The data presented below depict the effect of the somatostatin receptor ligands at 1 μ M.

TH immunoreactivity data are presented in Fig. 4. TH immunoreactive amacrine cells and processes were distributed throughout the IPL (n=5) (Fig. 4a). No cells or processes were visible in the ischaemic retina (n=5) (Fig. 4b), nor was immunoreactivity observed in the presence of the second antibody alone (Fig. 4c). Cortistatin (n=3) and the sst₂ agonists BIM23014 (n=3) and MK678 (n=3) prevented the ischaemic effects in cells and processes (Fig. 4d–f).

bNOs immunoreactivity is shown in Fig. 5. It is present in amacrine cells in the INL and processes (n=5) (Fig. 5a), while no cells or processes are visible in the tissue treated with the chemical ischaemia solution (n=5) (Fig. 5b), nor was immunoreactivity observed in the presence of the second antibody alone (Fig. 5c). Treatment with cortistatin (n=3) or sst₂ receptor agonist (BIM23014, n=3; MK678, n=3) prevented the disappearance of bNOs immunoreactivity, which remained at control levels (Fig. 5d–f).



Fig. 5a–f Effect of somatostatin receptor agonists on chemically induced ischaemic damage to brain NO synthase (bNOS) immunoreactive neurons. **a** Control retina showing bNOS immunoreactivity in amacrine cells and processes in the IPL (n=5). **b**, **c** No immunoreactivity is seen in ischaemic retina (n=5, **b**) or in the

presence of the secondary antibody alone (c). Cortistatin (n=3, d), BIM 23014 (n=3, e) and MK678 (n=3, f) prevented the loss of bNOS immunoreactive neurons in the presence of the ischaemia solution. *Scale bars* 40 μ m



Fig. 6 Effect of somatostatin receptor agonists on chemically induced ischaemic damage to PKC immunoreactive neurons. **a** Control retina showing PKC immunoreactivity in rod bipolar cells in the outer plexiform layer (*OPL*) with axons extending towards the IPL (n=5). **b**, **c** No immunoreactivity is seen in ischaemic retina (n=5, **b**)

Figure 6 depicts the PKC immunoreactivity data in control, ischaemic, and cortistatin- and sst₂ ligand-treated retinas. PKC immunoreactivity is present in rod bipolar cells in the INL with axons extending towards the IPL (n=5) (Fig. 6a). The ischaemic retina is depicted in Fig. 6b and shows virtually no PKC immunoreactivity. In the cortistatin (n=4) and sst₂ receptor ligand- (BIM23014, n=3; MK678, n=3) treated retinas, PKC immunoreactivity is visible in the cell bodies, some axons and terminals of rod bipolar cells (Fig. 6d–f). MAP₁ immunoreactivity labelling of ganglion cells and processes in the GCL was not affected by the ischaemic damage (data not shown).

Discussion

To study the possible neuroprotective effects of somatostatin on ischaemia-induced retinal neurotoxicity, an in vitro pharmacological model of chemical ischaemia was used, first employed in hippocampal slices (Reiner et al. 1990). Chemical ischaemia involves the blockade of oxidative phosphorylation and glycolysis and is believed to be useful in the understanding of the early events underlying the pathophysiology of ischaemia. Incubation of the rat eye cup with the chemical ischaemia solution for 60 min affected several retinal cell populations, including

or in the presence of the secondary alone (c). Cortistatin (n=4, d), BIM 23014 (n=3, e) and MK678 (n=3, f) prevented the loss of PKC immunoreactivity in cell bodies of rod bipolar cells, terminals and some axons in the presence of the ischaemia solution. *Scale bars*, 40 μ m

cholinergic, rod bipolar, and TH- and NOS-positive cells. In addition, TUNEL staining revealed increased apoptosis in the ischaemic retina.

The present results are in agreement with other data showing that simulated retinal ischaemia (removal of glucose and N₂ replacement of 95% O₂) for 60 or 90 min, but not less, results in the degeneration of INL neurons (Izumi et al. 2003). The vulnerability of these neurons to the ischaemic insult was attributed to the release of glutamate and the activation of both NMDA- and non-NMDA receptors. In the chemical ischaemia paradigm the ganglion cells were not affected, as shown by MAP₁ immunoreactivity. In the paradigm of simulated ischaemia (Izumi et al. 2003), which most resembles the present chemical ischaemia model, major morphological changes are observed in the INL and IPL of the retina. In that study no mention was made of changes in the morphology of the GCL. This finding may be attributed to the fact that our model provides information reflecting the immediate changes caused by ischaemia. It has been shown that the number of retinal ganglion cells lost after high-pressure-induced ischaemia is related directly to the duration of the insult (Selles-Navarro et al. 1996). The present data are in agreement with studies that have employed other paradigms of ischaemia and have shown that IPL and INL damage is most prominent (Izumi et al. 1995; Cheon et al. 2002). These

results suggest that the model of chemical ischaemia may be useful in the elucidation of the actions of pharmacological agents on the prevention of early ischaemic retinal damage.

The viability of the retinal explants was assessed over 24 h. ChAT immunoreactivity and TUNEL staining showed that cells were maximally viable at 2 h, less so at 6 h and not viable at 12 and 24 h. All subsequent neuroprotection experiments were thus performed only at 2 h. The data at 6 h suggested that at this time the detection of the less abundant cells (TH- and bNOS-positive) in the control group was questionable.

Somatostatin receptor subtypes have been mapped in the rat retina and sst_{2A} receptors have been localized in different cell types, primarily in rod but also cone bipolar cells, cone photoreceptors, horizontal cells and TH-positive amacrine cells. The sst_{2B} isoform has been localized in photoreceptors (for a review, see Thermos 2003), while RT-PCR studies in rat ocular tissue found the sst₂ subtype to predominate (Mori et al. 1997). In view of this evidence, emphasis was given to the study of the sst₂-selective agonists BIM23014 and MK678 as neuroprotectants. The present data support a neuroprotection role for these agents against chemical ischaemia in rat retina, for they protected 76 and 49% of ChAT immunoreactive cells, respectively. Similar results were obtained with cortistatin (58% protection), a neuropeptide that binds with high affinity to all ssts (Siehler et al. 1998). In mouse hypothalamic neurons it has been shown to affect glutamate sensitivity through its interaction with the sst₂ receptor subtype (Vasilaki et al. 1999). A similar percentage of ChAT immunoreactive cells in the two retinal layers (INL and GCL) were protected by BIM23014 (78, 74%) and cortistatin (59, 58%). However, MK678 appeared to discriminate (INL, 72%; GCL 24%), thus giving a smaller overall neuroprotection. This difference between the sst₂-selective analogs cannot be easily explained, but may be due to the absorption properties of the drug or to a technical artefact.

The three agents afforded neuroprotection in a concentration dependent manner. These data are in agreement with a previous study showing that somatostatin, octreotide and cortistatin result in dose-dependent neuroprotection against lesions induced by focal ischaemia (Rauca et al. 1999). The protection observed by these investigators was in the same range as in the present study. The present results are also in agreement with studies showing that somatostatin analogues inhibit retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy (Smith et al. 1997; Higgins et al. 2002).

Somatostatin did not afford any neuroprotection due to its degradation, and subsequent poor access to the retina. The latter has also been reported in previous studies with higher concentrations of the ligand (Vasilaki et al. 2002). The sst₄- and sst₅-selective agents, as expected, afforded no neuroprotection of ChAT immunoreactivity. These agents were used as controls, since the sst₄ receptors are localized only on ganglion cells, and sst₅ receptors have not been localized in the retina (Thermos 2003). These results support further the selective neuroprotective effects of the sst₂ ligands.

The mechanisms by which somatostatin analogues prevent the damage produced by chemical ischaemia or other neurotoxic insults are not known. However, somatostatin's ability to inhibit voltage-gated Ca²⁺ channels may be responsible for the lowering of the intracellular $[Ca^{2+}]$ (Tallent et al. 1996), responsible for the toxic effects. The rise in intracellular calcium levels resulting from ischaemia-induced activation of voltage-gated calcium channels and ionotropic glutamate receptors is believed to be the underlying cause of cell death (Osborne et al. 2004). The involvement of calcium in our paradigm needs to be substantiated by measurements of calcium levels, yet this mechanism would appear to offer a reasonable explanation for the neuroprotection observed by the sst₂ ligands in PKC and TH-containing neurons. Other reports have shown that sst₂ receptors are localized in PKC and THcontaining neurons (Helboe et al. 1999; Johnson et al. 1998; Vasilaki et al. 2001). The neuroprotection afforded to the ChAT and bNOS neurons may be due to other indirect mechanisms that have to be elucidated further. A possible player in this process may be cGMP. Meriney et al. (1994) have reported that somatostatin inhibits neuronal Ca²⁺ current via a cGMP-dependent protein kinase, while Forloni et al. (1997) have reported that somatostatin reduces NMDA-induced neuronal death by a cGMPdependent mechanism. Studies in our laboratory have shown that somatostatin increases nitric oxide levels in rat retina by an sst₂-mediated mechanism (Vasilaki et al. 2002) and we have preliminary data to support the suggestion that somatostatin and sst₂ receptor agonists increase cGMP levels in rat retinal explants (Mastrodimou et al., unpublished data). Therefore, one can conjecture that NO may trigger the synthesis of cGMP in neighboring cells, not containing somatostatin receptors, and provide neuroprotection via the mechanisms just described.

Very interesting findings that are not easy to reconcile with the neuroprotective role of somatostatin relate to its pro-apoptotic effects. Activation of sst_2 receptors in HL-60 cells reportedly promote cell death (Teijeiro et al. 2002). In addition, expression of sst_2 receptors in BxPC-3 cells stimulates apoptosis through the activation of tyrosinephosphatase SHP-1, and sensitizes the cells to apoptosis induced by TNF (Guillermet et al. 2003). This may be a characteristic of non-neuronal cells and remains to be observed in neuronal systems.

In summary, the present study established that the chemical ischaemia model could be adapted to the retina. Chemical ischaemia resulted in the cell loss of different retinal neurons, a process that was prevented by sst_2 -selective somatostatin analogues and cortistatin. Further studies are in progress to elucidate the mechanisms involved in the neuroprotection.
Acknowledgements The authors thank Dr. de Lecea for cortistatin and Merck Research Laboratories (Rahway, N.J., USA) for MK678. This study was supported by grants to K.T. from the Ministry of Education (EPEAEK-Neuroscience/Chemistry), an EC Contract (QLG3-CT-1999-00908) and a grant from Novartis (Basel).

References

- Braun H, Schulz S, Becker A, Schroder H, Hollt V (1998) Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. Brain Res 803:54–60
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 179:77–79
- Cheon EW, Kim YH, Cho YY, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Yoo JM, Song JK, Choi WS (2002) Betaxolol, a β 1-adrenoceptor antagonist, protects a transient ischemic injury of the retina. Exp Eye Res 75:591–601
- Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P (2000) Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. Investig Ophthalmol Vis Sci 41:3191–3199
- Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P (2002) Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. Brain Res 936:1–14
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. Nature 381:242–245
- Ferreira IL, Duarte ČB, Neves AR, Čarvalho AP (1998) Culture medium components modulate retina cell damage induced by glutamate, kainate or "chemical ischemia". Neurochem Int 32:387–396
- Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiessa R, Vezzani A (1997) Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDAinduced neuronal death: role of cyclic GMP. J Neurochem 68:319–327
- Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C (2003) Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 100:155–160
- Helboe L, Moller M (1999) Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. Investig Ophthalmol Vis Sci 40:2376–2382
- Higgins RD, Yan Y, Schrier BK (2002) Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularisation. Exp Eye Res 74:553–559
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, Reisine T (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. Trends Pharmacol Sci 16:86–88
- Izumi Y, Benz AM, Kurby CO, Labruyere J, Zorumski CF, Price MT, Olney JW (1995) An ex vivo rat retinal preparation for excitotoxicity studies. J Neurosci Methods 60:219–225
- Izumi Y, Hammerman SB, Kirby CO, Benz AM, Olney JW, Zorumski CF (2003) Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. Vis Neurosci 20:97–107
- Johnson J, Wong H, Walsh JH, Brecha NC (1998) Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. J Comp Neurol 393:93–101
- Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC (1999) Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. Neuroscience 94:675–683
- Meriney SD, Gray DB, Pilar GR (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMPdependent protein kinase. Nature 369:336–339

- Mori M, Ahara M, Shimizu T (1997) Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. Neurosci Lett 223:185–188
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. Prog Retin Eye Res 23:91–147
- Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P (2001) Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 363:680–694
- Rauca C, Schafer K, Hollt V (1999) Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 360:633–638
- Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ (1990) A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. Neurosci Lett 119:175– 178
- Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen D-M, Xiong Y, Hayes EC, Parmar RM, Foor F, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai S-J, Blake A, Chan WWS, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapman KT, Schaeffer JM (1998) Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. Science 282:737–740
- Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. Investig Ophthalmol Vis Sci 37:2002–2014
- Shapiro B, Kronheim S, Pinistone B (1979) The presence of immunoreactive somatostatin in the rat retina. Horm Metab Res 11:79–80
- Siehler S, Seuwen K, Hoyer D (1998) [¹²⁵I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 357:483–489
- Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM (1997) Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. Science 276:1706–1709
- Sperk S, Widmann R (1985) Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. J Neurochem 45:1441–1447
- Tallent M, Liapakis G, O'Carroll A-M, Lolait SJ, Dichter M, Reisine T (1996) Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca²⁺ current in the pituitary cell line AtT-20. Neuroscience 71:1073–1081
- Teijeiro R, Rios R, Costoya JA, Castro R, Bello JL, Devesa J, Arce VM (2002) Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. Cell Physiol Biochem 12:31–38
- Thermos K (2003) Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. Vis Res 43:1805–1815
- Vasilaki A, Lanneau C, Dournaud P, De Lecea L, Gardette R, Epelbaum J (1999) Cortistatin affects glutamate sensitivity in mouse hypothalamic neurons through activation of sst2 somatostatin receptor subtype. Neuroscience 88:359–364
- Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K (2001) NADPHdiaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst_{2A} and sst_{2B} in the retina. Investig Ophthalmol Vis Sci 42:1600-1609
- Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K (2002) Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst₂ receptors in the rat retina. Neuropharmacology 43:899–909
- Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Hoyer D, Tsilimbaris M, Kouroumalis E, Pallikaris I, Thermos K (2004) Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. Investig Ophthalmol Vis Sci 45:1499–1506



Available online at www.sciencedirect.com



Regulatory Peptides 133 (2006) 41-46

REGULATORY PEPTIDES

www.elsevier.com/locate/regpep

Somatostatin receptors (sst₂) regulate cGMP production in rat retina

Niki Mastrodimou^a, Foteini Kiagiadaki^a, Mira Hodjarova^{a,b}, Efthimia Karagianni^a, Kyriaki Thermos^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology, Department Basic Sciences, University of Crete, Faculty of Medicine, Heraklion, Crete, Greece ^b Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Kralova, Czech Republic

> Received 11 May 2005; accepted 8 September 2005 Available online 8 November 2005

Abstract

The present study investigated the effect of somatostatin in the regulation of cGMP levels in rat retina and the mechanisms involved in this process. Isolated rat retinas were treated alone or in the presence of somatostatin $(0.01-10 \ \mu\text{M})$, BIM23014 (sst₂ agonist, $0.01-10 \ \mu\text{M}$), L-796,778 (sst₃ agonist, $10 \ \mu\text{M}$), somatostatin ($0.1 \ \mu\text{M}$) in combination with CYN154806 (sst₂ antagonist, $1 \ \mu\text{M}$), N^{G} -methyl-L-arginine acetate salt (NMMA, inhibitor of the nitric oxide synthase (NOS), 250 μ M), orthovanadate (inhibitor of tyrosine phosphatase, SHP-1, $1 \ \mu\text{M}$), and arginine alone (250 μ M). cGMP levels were quantified by ELISA. Immunohistochemistry studies were performed for the detection of cGMP and nNOS, while Western blot analysis was employed for the detection of SHP-1. Somatostatin increased cGMP levels in a concentration-dependent manner. This increase was inhibited by CYN154806. BIM23014 increased cGMP levels only at the concentration of 10 μ M, while L-796,778 had no effect. NMMA blocked completely the somatostatin stimulated increase of cGMP levels and nNOS was detected in rat retina. cGMP immunoreactivity was observed primarily in bipolar cells only of nitroprusside-treated retinas. SHP-1 inhibition by orthovanadate reduced the somatostatin effect in a statistically significant manner. These results suggest that a SRIF/SHP-1/NO/cGMP mechanism underlies the actions of somatostatin in the retina and in its influence of retinal circuitry.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Neuropeptide; Nitric oxide; nNOS; Tyrosine-phosphatase (SHP) immunohistochemistry

1. Introduction

The neuropeptide somatostatin (somatotropin release inhibitory factor, SRIF) mediates a diverse number of physiological actions in the peripheral and central nervous system [1,2]. Five SRIF receptor subtypes have been cloned, namely sst_{1-5} [3] and are responsible for SRIF's actions. The sst_2 receptor has been demonstrated in mouse and rat to exist as two splice variants, sst_{2A} and sst_{2B} [4,5].

In the eye, SRIF was initially detected in amacrine, ganglion, and interplexiform cells of the retina, and is believed to function as a neurotransmitter, neuromodulator or trophic factor [6–9]. These actions of SRIF are mediated by specific G-protein coupled receptors, as substantiated by pharmacological [10,11] and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) studies [12]. More recent studies employing immunohistochemistry techniques resulted in the identification and localization of the receptor subtypes in retinal cells of different species (for a review see Ref. [13]). The colocalization of sst_{2A} and sst_{2B} receptors with NADPH-diaphorase in rod bipolar and photoreceptors cells, respectively, was reported [14], while pharmacological studies showed that somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst_2 receptors in rat retina [15].

In the present study, further emphasis was given to the investigation of somatostatin–nitric oxide interactions by examining the effect of somatostatin and analogues on cGMP levels in rat retina. In addition, the involvement of nNOS and SHP-1 in somatostatin's actions was studied.

2. Methods

2.1. Animals

Female Sprague–Dawley rats weighing 250 to 350 g were housed two to three animals per cage with free access to food and water. A 12-h light–dark cycle was maintained. Euthanasia

^{*} Corresponding author. Tel.: +30 2810 394533; fax: +30 2810 394530. *E-mail address:* thermos@med.uoc.gr (K. Thermos).

was performed with ether inhalations. Housing conditions and all procedures performed on the animals were in accordance with Greek National Laws (Animal Act, P.D. 160/91) and with the ARVO Statement for the Use of Animals in Opthalmic and Vision Research.

2.2. Tissue preparation

After dissecting out the eyes, the anterior poles were cut away and the eyecups were immersed in 0.1 M phosphatebuffered saline (PBS) containing protease inhibitors leupeptin $(1 \mu g/ml)$ and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.1 mM).

Retinas were mechanically detached from the rest of the eyecup and incubated in PBS buffer containing protease inhibitors and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 1 mM) for 15 min in room temperature. The retinas are incubated in fresh buffer (500 µl) for 30 min in the absence or presence of somatostatin (0.01–10 µM), BIM23014 (0.01–10 µM), somatostatin (0.1 µM) in combination with CYN154806 (1 µM, kindly provided by Dr. D. Hoyer) or $N^{\rm G}$ -methyl-L-arginine acetate salt (NMMA, 250 µM) or orthovanadate (1 µM). Arginine (250 µM) and the sst₃ analog L-796,778 (10 µM; [16]) were also tested. Control samples contained PBS buffer with IBMX and protease inhibitors. One retina was used for each treatment.

2.3. ELISA assay

The samples were prepared for the ELISA assay according to Blute et al. [17]. Control or treated retinas were homogenized in Phosphate Buffer (PB, 50 mM), pH 6.5. Trichloroacetic acid (TCA, 10%) was added to the homogenates, the mixture was centrifuged at 15000 rpm for 10 min and the supernatants were removed. Water saturated ether was used to extract the TCA from the supernatant. Five volumes of ether to one volume of supernatant was used and the procedure was repeated five times. Trace amounts of ether were removed by heating the samples in a water bath (70 °C) for 5 min. The samples were frozen on dry ice and stored at -80 °C until further use. The samples were analyzed by using a commercial cGMP ELISA assay (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, MI). Protein concentration was determined according to Bradford [18].

2.4. Immunohistochemistry studies

Tissue preparation and immunohistochemistry was performed according to Mastrodimou et al. [19]. Cryostat sections of rat retina were incubated in 0.1 M Tris buffer saline; TBS, pH 7.4 containing 3.3% normal goat serum for 30 min, washed in 0.1 M TBS and incubated with the a rabbit polyclonal antibody raised against bNOs (1:3000, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1 h with a FITC-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (1:150, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

For the cGMP immunoreactivity studies, eyecups were initially treated with Eagle's medium (Gibco BRL, UK) containing protease inhibitors leupeptin (1 µg/ml) and PMSF (0.1 mM), and IBMX (1 mM) for 30 min at 37 °C in a water bath. Subsequently, the eyecups were treated in the above medium to which nitroprusside (1 mM) or somatostatin (10 μ M) or the sst₂ selective agonist L-779,976 (100 μ M) was added for 10 min at 37 °C. Control samples were treated only with protease inhibitors and IBMX (1 mM). Tissue preparation and immunohistochemistry was performed according to Mastrodimou et al. [19]. cGMP immunoreactivity was assayed using a sheep anti-formaldehyde-fixed cGMP antibody (1:500, kindly provided by Prof. Jan de Vente). Cryostat sections of rat retina were incubated in 0.1 M TBS, pH 7.4 containing 3.3% normal donkey serum for 30 min, washed in 0.1 M TBS and incubated with the primary antibody in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal donkey serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1 h with an Alexa Fluor 488 Donkey anti-Sheep IgG (H+L) (1:200, Molecular Probes, Inc., USA).

To examine whether cGMP immunoreactivity is localized in rod bipolar cells, colocalization studies were performed by treating the sections from tissues treated with SNP with the cGMP antibody and a mouse monoclonal antibody against Protein Kinase C (PKC; 1:50, Leinco Technologies, St. Louis, Missouri, USA) as a marker for rod bipolar cells, overnight. Subsequently, the sections were incubated with the secondary antibody for the cGMP antiserum, washed in TBS and incubated for 1 h with a TRITC-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (1:100, Jackson Lab. Inc., West Grove, USA).

Finally, the sections were washed and coverslipped with mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Negative controls were included by omitting the primary antibody.

Light microscopy images were taken with a Zeiss Axioskop with Plan-Neofluar $\times 40/0.75$. Confocal images were taken with a Leica DM RE laser-scanning microscope (He/Ne Laser) with HP Plan APO $\times 20/0.70$. Optic sections were taken with a *z*-axis resolution of 1.1 µm through the immunolabeled cells. Light and contrast adjustment of images were processed with the use of Adobe Photoshop software (version 5.0).

2.5. Western blot

Retinal or cortical membranes (60 µg) were analyzed by SDS/PAGE (10%). Proteins were transferred from the gel to nitrocellulose overnight at 4 °C, and the residual binding sites were blocked by incubating the membrane for 2 h in 5% (w/v) Milk and 0.1% (v/v) Tween-20. The blots were subsequently incubated with primary antibody SHP-1 (1:500, Chemicon International, Inc.) in 2.5% Milk in PBS+0.1% Tween-20 in the cold-room overnight. After being washed, the blots were incubated for 1 h at RT with peroxidase-conjugated anti-Mouse IgG made in 2.5% Milk in PBS+0.1% Tween-20. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence (Chemicon International, Temecula, CA).

2.6. Statistics

Mean and standard errors of the mean (S.E.M.) were calculated for each group. An analysis of variance was preformed using the GraphPad Prism software (version 2.01) to detect statistically significant differences among the groups.

3. Results

3.1. Effect of SRIF and selective analogues on cGMP levels

SRIF increased cGMP levels in rat retina in a concentrationdependent manner (n=7-16, Fig. 1A). Basal cGMP levels



Fig. 1. Effect of somatostatin and analogues on cGMP levels. (A) SRIF increased cGMP levels in rat retina in a concentration-dependent manner (n=7-16). (B) The effect of SRIF (0.1 μ M, n=10) was blocked by the sst₂ receptor antagonist CYN-154806 (1 μ M). (n=8, B). **p < 0.01 Dunnett's Multiple Comparison Test. (C) The sst₂ agonist BIM23014 increased cGMP levels in a concentration-dependent manner (n=6-16). **p < 0.01 Dunnett's Multiple Comparison Test.

were found to be 39.6 ± 3.1 pmol/mg protein (n=18). To assess further the sst₂ involvement in SRIF's actions, the ability of the selective sst₂ antagonist CYN-154806 (1 µM) to block the SRIF (0.1 µM)-induced increase of cGMP levels was examined. As shown in Fig. 1B, CYN-154806 blocked the SRIF-induced increase of cGMP levels (n=8). In addition, the sst₂ agonist BIM23014 mimicked the action of SRIF and increased in a statistically significant manner the cGMP levels only at the concentration of 10 µM (n=6-16, Fig. 1C). The sst₃ selective agonist L-796,778 (10 µM, n=5), however, was not able to increase cGMP levels in a statistically significant manner (data not shown).

3.2. Involvement of nitric oxide on somatostatin actions

Arginine (250 μ M) increased cGMP levels (control 36.3 pmol cGMP/mg protein, n=8, Arginine 53.4 pmol cGMP/mg protein, n=5, p < 0.05). Incubation of the retinal explants in the presence of SRIF (0.1 μ M) and the nonselective NOS inhibitor NMMA (250 μ M, n=8) (Fig. 2A) resulted in the blockade of the SRIF effect. Immunohistochemistry data support the presence of neuronal NOS (bNOS) in rat retina (Fig. 2B), while the second antibody employed alone and used as control showed no immunostain (Fig. 2C).

3.3. Involvement of SHP-1 on somatostatin actions

The mechanisms via which SRIF increases NO and subsequent cGMP levels have not been reported to date. SHP-1 may be involved in somatostatin's actions and thus its presence in rat retina was studied. As shown in Fig. 2D, SHP-1 is expressed in the retina (cortical tissue was employed as control [20]), while the SHP-1 antagonist orthovanadate (1 μ M) attenuated somatostatin's (0.1 μ M) mediated increase in cGMP levels in a statistically significant manner (n=3, Fig. 2A).

3.4. Immunohistochemical localization of cGMP

cGMP immunoreactivity was examined in control, IBMX and nitroprusside-treated eyecups (n=2). Immunoreactivity was observed only in the nitroprusside-treated retinas primarily in bipolar cells (rod and cone) (Fig. 3). Activation of the SRIF receptors either with SRIF or the sst₂ selective agonist L-779,976 had no effect on the cGMP immunostain and was comparable to the control or IMBX samples (data not shown).

4. Discussion

The present study focused on the elucidation of SRIF's actions on cGMP levels and the mechanisms involved. SRIF increased cGMP levels in a concentration-dependent manner via a sst₂ receptor mechanism. This was substantiated by the blocking effect of the sst₂ antagonist on SRIF's actions. The selective sst₂ agonist, BIM23014 also increased cGMP levels, but only at the higher concentration used (10 μ M). The present data complement previous evidence from our laboratory



Fig. 2. Effect of NMMA and orthovanadate on SRIF-induced increase of cGMP levels. bNOS immunoreactivity and immunobloting of SHP-1. (A) Effect of NMMA and orthovanadate on SRIF-induced increase of cGMP levels. Incubation of retinal explants in the presence of SRIF (0.1 μ M) and the nonselective NOS inhibitor NMMA (250 μ M, *n*=8) resulted in the blockade of the SRIF effect. The SHP-1 antagonist, orthovanadate (1 μ M), attenuated somatostatin's (0.1 μ M) mediated increase in cGMP levels in a statistically significant manner (*n*=3). **, #*p* <0.01 Dunnett's Multiple Comparison Test (* versus control, # versus SRIF). (B) bNOS immunoreactivity was localized in cell bodies in the inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL), as well as in processes in the inner plexiform layer (IPL). No staining was observed in absence of primary antibody (right panel). Scale bars: 20 μ m. (C) Immunobloting of SHP1. Retinal or cortical membranes (60 μ g) were analyzed by SDS/PAGE (10%) and immunoblotted with SHP-1 (50 kDa) antiserum as described in Methods.

showing that somatostatin and sst₂ specific ligands increase NO levels in retinal explants [15]. Specifically, the BIM23014 data are completely overlapping in the two studies, since only at the concentration of 10 μ M is the increase in both NO and cGMP levels observed. This was attributed to poor access of the agonist. The lack of effect of the sst₃ analog, which was employed as a control, was expected, since sst₃ receptors have not been reported in vertebrate retina [13].

Nitric oxide synthase (NOS) oxidizes the guanidine moiety of L-arginine to liberate NO and citrulline. Consequently, NO activates a soluble guanylate cyclase converting GTP to cGMP as reported in vascular endothelial cells and in the central nervous system [21,22].

In the retina, nNOS has been reported to be localized primarily in amacrine cells, but also in photoreceptors, horizontal, bipolar and ganglion cells [23], in agreement with previous data in our group pertaining to NADPH-diaphorase histostain in retina [14,15]. To substantiate the involvement of nitric oxide synthase in the somatostatin-mediated increase of cGMP levels, experiments focused on the ability of NMMA, a NOS antagonist, to block somatostatin's actions. NMMA fully blocked the somatostatin-mediated increase in cGMP levels, while arginine mimicked somatostatin's actions. This effect was mediated by the neuronal NOS as supported not only by the previous cited studies [23], but also by the present bNOS immunohistochemistry findings.

SRIF is synthesized in amacrine cells, but it has never been found to be colocalized with NADPH-diaphorase or nNOS [23,24]. In the rat, it activates sst_{2A} and sst_{2B} SRIF receptors found to be localized on rod and cone bipolar cells [25] and photoreceptors [14], respectively. SRIF activation of sst_2 receptors in the rat resulted in an increase in NO_x production [15].

To examine the effect of SRIF on cGMP levels at the cellular level cGMP immunoreactivity was performed. Bipolar cells of the rat retina express soluble guanylate cyclase [26]. While no immunoreactivity was observed in control or IBMX-treated tissue, incubation with the NO donor nitroprusside (1 mM) afforded cGMP immunoreactivity primarily in rod and cone bipolar cells. These results are in agreement with Johansson et al. [27]. Treatment with somatostatin or the more lipid soluble sst₂ analog L779,976 [16] did not result in any visible cGMP immunoreactivity. This finding may be due to the solubility or stability properties of somatostatin and its agonist. The addition of these agents to the eyecup and not directly to the retina ex vivo may affect their efficacy.



Fig. 3. cGMP immunoreactivity in rat retina. cGMP immunoreactivity in nitroprusside-treated eye cups was observed primarily in bipolar cells (A), PKC immunoreactivity was observed in rod bipolar cells (B). Double labeling of cGMP and PKC immunoreactivity was observed in a subpopulation of bipolar cells (yellow) (C). Scale bars: $20 \mu m$.

However, the biochemical data leave no doubt that SRIF via sst₂ activation increases cGMP levels. In retina, cGMP influences a series of biochemical substrates and it is an important regulator of cellular and retinal physiology. cGMP can modulate gap junctions between horizontal cells [28] and gap junctions between amacrine and rod bipolar cells [29]. There is a report however, stating that SRIF did not affect cGMP levels in a ciliary ganglion neuron preparation from chick embryos [30].

Meriney et al. [31] reported that besides the membraneassociated pathway involving GTP-binding proteins, a soluble pathway involving cGMP-dependent protein kinase modulates the somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current in chick ciliary ganglion neurons.

In the salamander retina, SRIF differentially modulated voltage-gated K^+ and Ca^{2+} currents in rod and cone photoreceptors, respectively, by its activation of sst₂ receptors and via a pertussis toxin-sensitive mechanism [9]. Also, in isolated rabbit rod bipolar cells that also contain the sst₂ receptor subtype, SRIF modulated K^+ and Ca^+ currents by inhibiting I_{BK} and L-type I_{Ca} channels [32]. In both paradigms, SRIF could be regulating glutamate release. It is therefore possible that a cGMP-dependent protein kinase pathway may also be involved in the effects of SRIF on ion channels and glutamate release in the retina as suggested by Meriney et al. [31] in chick ciliary ganglion neurons.

The question regarding the mechanism via which somatostatin activates the production of NO, which leads to increases in cGMP levels in the retina was addressed. It is well established that nitric oxide synthase in the brain is dependent on the free calcium ion concentrations [22], while somatostatin as mentioned above is known to inhibit intracellular calcium levels [31,33]. However, Lopez et al. [34] reported that somatostatin sst₂ receptor activation induces the activation of nNOS in vitro by a mechanism that involves tyrosine phosphatase SHP-1. nNOS was shown to be a substrate for SHP-1, which dephosphorylates nNOS, increases NO production and subsequent cGMP levels that lead to cell growth arrest. The present findings depicted the presence of SHP-1 in the retina, while the orthovanadate effects on the SRIF-mediated increase in cGMP levels suggested the involvement of SHP-1 in somatostatin's activation of NOS.

The NO/cGMP signal transduction system is of major importance in retinal physiology. Many studies have focused on this system [17,25,35-38], and on its regulation by other neurotransmitters present in the retina (glutamate, GABA) [17,38].

This is the first study, in the rat retina, showing that somatostatin can also modulate the NO/cGMP system. Furthermore, the present data suggest a SRIF/SHP-1/NO/ cGMP mechanism that may underlie somatostatin's actions, something that merits further investigation.

Acknowledgments

The authors thank Ms. M. Papazoglou for technical assistance, Dr. D. Hoyer (Novartis) for somatostatin ligands and Dr. J. de Vente for the cGMP antibody. This study was supported by grants from the Ministry of Education (EPEAEK-Neuroscience, Pythagoras), co-funded by the European Social Fund and National Resources. N.M. is a recipient of the Manasaki Scholarship. M.H. is a recipient of a Socrates Scholarship.

References

- Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science 1973;179:77–9.
- [2] Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. Prog Neurobiol 1986;27:63–100.
- [3] Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. Trends Pharmacol Sci 1995;16:86–8.
- [4] Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Hollt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). Fed Eur Biochem Soc Lett 1992;311:290-4.
- [5] Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, et al. Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(B) receptor splice variant. Br J Pharmacol 1998;25:209–17.
- [6] Shapiro B, Kronheim S, Pinistone B. The presence of immunoreactive somatostatin in the rat retina. Horm Metabol Res 1979;11:79–80.
- [7] Sagar SM, Rorstad OP, Landis DM, Arnold MA, Martin JB. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina. Brain Res 1982;244:91–9.
- [8] Zalutsky RA, Miller RF. The physiology of somatostatin in the rabbit retina. J Neurosci 1990;10:383–93.
- [9] Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P. Somatostatin modulates voltage-gated K⁺ and Ca⁺ currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. J Neurosci 2000;20:929–36.

- [10] Kossut M, Yamada T, Aldrich LB, Pinto LH. Localization and characterization of somatostatin binding sites in the mouse retina. Brain Res 1990;476:78–84.
- [11] Vasilaki A, Georgoussi Z, Thermos K. Somatostatin receptor (sst₂) are coupled to G_o and modulate GTPase activity in the rabbit retina. J Neurochem 2003;84:625–32.
- [12] Mori M, Ahara M, Shimizu T. Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. Neurosci Lett 1997;223:185–8.
- [13] Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. Vis Res 2003;43:1805–15.
- [14] Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:1600–9.
- [15] Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst_2 receptors in the rat retina. Neuropharmacology 2002;43:899–909.
- [16] Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, et al. Rapid identification of subtypeselective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. Science 1998;282:737–40.
- [17] Blute TA, De Grenier J, Eldred WD. Stimulation with N-methyl-Daspartate or kainic acid increase cyclic guanosine monophosphatase-like immunoreactivity in turtle retina: involvement of nitric oxide synthase. J Comp Neurol 1999;404:75–85.
- [18] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
- [19] Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2005;371:44–53.
- [20] Horvat A, Schwaiger F-W, Hager G, et al. A novel role for protein tyrosine phosphatase SHP1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. J Neurosci 2001;21:865–74.
- [21] Moncada S, Radomski MS, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. Biochem Pharmacol 1988;37:2495–501.
- [22] Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:5159–62.
- [23] Haverkamp S, Kolb H, Cuenca N. Morphological and neurochemical diversity of neuronal nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the turtle retina. Cell Tissue Res 2000;302:11–9.
- [24] Koistinaho J, Sagar SM. Light-induced c-fos expression in amacrine cells in the rabbit retina. Mol Brain Res 1995;29:53063.

- [25] Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. Neuroscience 1999; 94:675–83.
- [26] Ahmad I, Barnstable CJ. Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. Exp Eye Res 1993;56: 51–62.
- [27] Johansson K, Bruun A, de Vente J, Ehinger B. Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. Invest Opthalmol Vis Sci 2000;41:305–13.
- [28] DeVries SH, Schwartz EA. Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. J Physiol 1989;414:351–75.
- [29] Mills SL, Massey SC. Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. Nature 1995;377:734–7.
- [30] Gray DB, Polo-Parada L, Pilar GR, et al. A nitric oxide/cyclic GMPdependent protein kinase pathway alters transmitter release and inhibition by somatostatin at a site downstream of calcium entry. J Neurochem 1999; 72:1981–90.
- [31] Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca2+ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. Nature 1994;369:336–9.
- [32] 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 retina via sst2 receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2001;363:680–94.
- [33] Luini A, Lewis D, Guild S, Schoufield G, Weight FF. Somatostatin, an inhibitor of ACTH secretion, decreases cytosolic free calcium and voltagedependent calcium current in a pituitary cell line. J Neurosci 1986;6: 3128–32.
- [34] Lopez F, Ferjoux G, Cordelier P, et al. Neuronal nitric oxide synthase: a substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. FASEB J 2001;15:2300–2.
- [35] Haberecht MF, Schmidt HH, Mills SL, Massey SC, Nakane M, Redburn-Johnson DA. Localization of nitric oxide synthase, NADPH diaphorase and soluble guanylyl cyclase in adult rabbit retina. Vis Neurosci 1998;15: 881–90.
- [36] Blute TA, Velasco P, Eldred WD. Functional localization of soluble guanylate cyclase in the turtle retina: modulation of cGMP by nitric oxide donors. Vis Neurosci 1988;15:485–98.
- [37] Gotzes S, de Vente J, Muller F. Nitric oxide modulates cGMP levels in neurons of the inner and outer retina in opposite ways. Vis Neurosci 1998;15:945-55.
- [38] Yu D, Eldred WD. GABA(A) and GABA(C) receptor antagonists increase retinal cyclic GMP levels through nitric oxide synthase. Vis Neurosci 2003;20:627–37.

The Role of Nitric Oxide and cGMP in Somatostatin's Protection against Retinal Ischemia

Niki Mastrodimou, Foteini Kiagiadaki, and Kyriaki Thermos

PURPOSE. To investigate whether nitric oxide (NO) and/or cGMP protects the retina from chemical ischemia and underlie somatostatin's neuroprotective effects.

METHODS. Eyecups of female Sprague-Dawley rats were incubated with PBS or the chemical ischemia mixture [iodoacetic acid (5 mM)/sodium cyanate (25 mM)] in the absence or presence of (1) arginine (0.05-2.0 mM), the substrate of nitric oxide synthase (NOS); (2) the NO donors sodium nitroprusside (SNP; 0.25-4.0 mM), 3-morpholinosydnonimine (SIN-1; 0.1, 0.3, 1.0 mM), SIN-1 (0.1 mM)/L-cysteine (5 mM, peroxynitrite scavenger), and NONOate (1, 5, 10 μ M, slow NO releaser); (3) 8-Br-cGMP (0.1, 0.5, 1.0 mM); (4) BIM23014 (sst₂ receptor agonist; 1 μ M), alone or in the presence of (5) the NOS inhibitor N^{γ} -monomethyl-1-arginine (NMMA; 0.5 mM); or (6) the guanylyl cyclase inhibitors 1H-[1,2,4]oxadiazolol [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ;100 µM) and NS2028 (50 µM) for 60 minutes, at 5%CO₂/air in 37°C. The effect of SIN-1 (0.1, 0.3, 1.0, or 3.0 mM) on the retina was also examined. Subsequently, the eyecups were fixed and sectioned for choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity and TUNEL staining.

RESULTS. Arginine and SNP had no effect on the chemical ischemia-induced toxicity. SIN-1, NONOate, and 8-Br-cGMP produced a concentration-dependent protective effect, as shown by ChAT immunoreactivity. TUNEL staining also confirmed the neuroprotective effect of these agents. L-Cysteine partially reduced the SIN-1-induced protective effect. SIN-1 alone was toxic only at the highest concentration used (3 mM). NMMA, ODQ, and NS2028 reversed the protective effect of BIM23014.

CONCLUSIONS. The results suggest that a NO/peroxynitrite/ cGMP mechanism may be important in the protection of the retina from ischemic insult. Furthermore, the NO/sGC/cGMP pathway is involved in the neuroprotective effects of sst_2 ligands against retinal ischemia. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:342-349) DOI:10.1167/iovs.07-0341

The neuropeptide somatostatin¹ is found in the retina,² where it activates the somatostatin receptors³ (ssts) found in retinal neurons and the retinal pigment epithelium (RPE) (see review by Thermos⁴). Specifically, sst_{2A} receptors are localized in rod bipolar, amacrine, and photoreceptor neurons in the retina,⁵⁻⁹ whereas sst_{2B} receptors are localized in photoreceptors and the RPE.^{8,10} In addition, sst₁ and sst₄ receptors

From the Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

Supported by the European Social Fund and National Resources, Program Pythagoras (KT).

Submitted for publication March 21, 2007; revised August 7 and September 13, 2007; accepted November 12, 2007.

Disclosure: N. Mastrodimou, None; F. Kiagiadaki, None; K. Thermos, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "*advertise-ment*" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Kyriaki Thermos, Department of Basic Sciences, Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110, Greece; thermos@med.uoc.gr. were found to be present in amacrine¹¹ and ganglion cells,^{12,13} respectively.

Retinal ischemia is the underlying cause of many ocular diseases and leads to neuronal damage and blindness. The importance of somatostatin ligands in the inhibition of ischemia-induced neovascularization, one of the major causes of retinal diseases that results in visual loss has been investigated. Somatostatin and its sst₂ agonists inhibited the ischemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy.^{14,15}

In a recent study, an in vitro model¹⁶ of chemical ischemia was used in the retina.¹⁷ Chemical ischemia involves the blockade of oxidative phosphorylation and glycolysis and is believed to be useful in the understanding of the early events underlying the pathophysiology of ischemia. In this model, somatostatin analogues selective for the sst₂ subtype protect the retina from ischemic insult.¹⁷ The mechanisms by which the somatostatin analogues prevent the damage produced by chemical ischemia or other neurotoxic insults are not known. However, somatostatin's ability to inhibit voltage-gated Ca⁺² channels may be responsible for the lowering of the intracellular calcium ion concentrations,¹⁸ responsible for the toxic effects. The rise in intracellular calcium levels resulting from ischemia-induced activation of voltage-gated calcium channels and ionotropic glutamate receptors is believed to be the underlying cause of retinal cell death.¹⁹

A study by Mastrodimou et al.¹⁷ suggested that protein kinase C (PKC) and tyrosine hydroxylase (TH)-sst₂- containing neurons^{5-8,13,20,21} were protected from ischemic insult, possibly by sst₂ involvement in the attenuation of calcium levels. However, the neuroprotection afforded to the ChAT- and bNOS-containing neurons, which lack sst₂ receptors, could not be explained.

Somatostatin and the novel neuropeptide cortistatin,²² which resembles somatostatin structurally and binds to somatostatin receptors,²³ have been shown to have neuroprotective effects against different paradigms of neurotoxicity in the central nervous system, such as NMDA, and kainate-induced neurotoxicity^{24,25} and middle cerebral artery.²⁶ The somatostatin reduction of NMDA-induced neuronal death in cortical neurons was mediated by a cGMP-dependent mechanism.²⁴

Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} currents has been suggested to be mediated via a cGMP-dependent protein kinase.²⁷ Recent studies in our laboratory have shown that somatostatin increases NO¹² and cGMP levels in rat retinal explants²⁸ via an sst₂ mechanism. Therefore, one can conjecture that NO triggers the synthesis of cGMP in neighboring cells that do not contain somatostatin receptors and provides neuroprotection.

The purpose of the present study was to investigate whether NO and/or cGMP protects the retina from chemical ischemia insult and whether this effect represents a putative mechanism for somatostatin's neuroprotection of the retina.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Sprague-Dawley rats (250-300 g) were housed two to three animals per cage with free access to food and water. A 12-hour

light-dark cycle was maintained. Euthanasia was performed with ether inhalations. All procedures that were performed on the animals were in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and in compliance with Greek National Laws (Animal Act, P.D. 160/91).

Effect of Arginine, Nitroprusside, NONOate, SIN-1, or 8-Br-cGMP on Chemical Ischemia

After dissecting the eyes, the anterior poles were cut away, and the eyecups were immersed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). To produce chemical ischemia and study the possible protection by the different agents, we used the protocol previously used by Mastrodimou et al.¹⁷ Eyecups were incubated with (1) PBS, (2) a chemical ischemia mixture (5 mM IAA/25 mM NaCN), and (3) arginine, the NOS substrate (0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, or 2.0 mM), or the NO donors sodium nitroprusside (SNP; 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, or 4.0 mM), spermine NONOate (slow-release NO donor; 1, 5, or 10 µM), SIN-1 (0.1, 0.3, or 1 mM) or 8-Br-cGMP (0.1, 0.5, or 1 mM), together with the chemical ischemia mixture, for 60 minutes (two times for 30 minutes), followed by incubation two times for 30 minutes in PBS (control and ischemia groups) or arginine/nitroprusside/NONOate/SIN-1/8-Br-cGMP, respectively, in PBS (neuroprotection groups) at the concentrations used earlier. All incubations were performed at 37°C and 5% CO₂/95% air. These experiments were performed three times.

Effect of SIN-1/L-Cysteine on Chemical Ischemia

Eyecups were incubated in (1) PBS or in the presence of (2) chemical ischemia mixture, and (3) SIN-1 (0.1 mM)/L-Cysteine, a peroxynitrite scavenger (5 mM),²⁹ together with the chemical ischemia mixture for 60 minutes (two times for 30 minutes each), followed by incubation two times for 30 minutes each in PBS (control and ischemia groups) or SIN-1/L-cysteine in PBS (neuroprotection groups) at the concentrations used earlier. All incubations were performed at 37°C and 5% $CO_2/95\%$ air. These experiments were performed three times.

Effect of SIN-1 Alone

The effect of SIN-1 alone on the retina was also examined. The eyecups were incubated either in PBS or in PBS containing SIN-1 (0.1, 0.3, 1, or 3 mM) for 120 minutes (four times for 30 minutes each). The experiments were performed twice.

Effect of the NO Synthase Inhibitor NMMA on the BIM23014-Induced Neuroprotective Effect

Eyecups were incubated in the presence of the chemical ischemia mixture alone or in the presence of the somatostatin sst₂ analogue BIM23014 (1 μ M) and BIM23014 (1 μ M) plus N^{γ} -monomethyl-t-arginine (NMMA; 0.5 mM) for 60 minutes (two times for 30 minutes each), followed by incubation two times for 30 minutes each in BIM23014 (1 μ M) in the absence or presence of NMMA (0.5 mM), respectively. Control samples received PBS. These experiments were performed three times.

Effect of the Guanylate Cyclase Inhibitors ODQ and NS2028 on the BIM23014-Induced Neuroprotective Effect

Eyecups were incubated in the presence of the chemical ischemia mixture, alone or in the presence of (1) the somatostatin sst₂ analogue BIM23014 (1 μ M) and (2) BIM23014 (1 μ M) and ODQ (100 μ M) or NS2028 (50 μ M) for 60 minutes (two times for 30 minutes each), followed by incubation two times for 30 minutes each in BIM23014 (1 μ M), in the absence or presence of ODQ (100 μ M) or NS2028 (50 μ M) respectively. ODQ is the most widely used soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor, yet we also examined the effect of NS2028, chosen for its better potency and specificity.³⁰ Control samples received PBS. These experiments were performed three times.

Immunohistochemical Studies

Tissue Preparation. After completion of the chemical ischemia protocol, the eyecups were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 1 hour at 4°C. After fixation, eyecups were rinsed in PB and incubated in 30% sucrose overnight, at 4°C for cryoprotection. Tissues were frozen in isopentane at -45° C for 1 minute and kept at -80° C until further use. Eyecups were sectioned vertically at 10 μ m thickness using a cryostat, thaw mounted on slides (Superfrost; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and stored at -20° C. Slices were cut near the optic nerve, every 100 μ m. Nine slices were put on every slide.

ChAT Immunoreactivity. A mouse monoclonal antibody raised against ChAT (1:100; Biotrend, Cologne, Germany), was used as a marker for acetylcholine amacrine cells. Cryostat sections were incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer; TBS (pH 7.4), containing 3.3% normal goat serum for 30 minutes, washed in 0.1 M TBS and incubated with the primary antibodies in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 2 hours with the secondary antibody, Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG(H+L) (1:300; Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR) Finally, the sections were washed and coverslipped with mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

TUNEL Staining. To determine cell loss, enzymatic in situ labeling of apoptosis-induced DNA strand breaks was performed using the terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated TMR-dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (Roche, Mannheim, Germany).

Microscopy

Light microscopy images were taken with a microscope equipped with a $\times 20/0.50$ or $\times 40/0.75$ lens (Axioskop with a Plan-Neofluar lens; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany). Confocal images were taken with a laser-scanning microscope (model DM RE with a He/Ne Laser; Leica, Wetzlar, Germany; with HP Plan APO; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Optic sections were taken with a *z*-axis resolution of 1.1 μ m through the immunolabeled cells. Light and contrast adjustment of images were processed with image analysis software (Photoshop, ver. 7.0; Adobe Systems, San Jose, CA).

RESULTS

The chemical ischemia model was successful in producing cholinergic cell loss (Figs. 1A, 1B), as previously shown.¹⁷ To examine whether NO could provide neuroprotection against chemical ischemia in the retina, arginine, and NO donors were used in different concentrations. Neither arginine nor SNP protected the retina from the ischemic insult when these agents were co-incubated with the chemical ischemia mixture. In Figure 1, the effect of a low and a high concentration of arginine (0.05, 2.0 mM; Figs. 1C, 1D, respectively) and SNP (0.5, 4 mM; Fig. 1E, 1F, respectively) is shown, while similar results were obtained with the other concentrations used (data not shown).

The slow NO releaser NONOate afforded protection from chemical ischemia in a concentration-dependent manner (Figs. 2C-E). The concentration of 5 μ M (Fig. 2D) gave the best protection, yet it did not reach control levels. TUNEL staining (Figs. 2F-I) was in agreement with the ChAT immunoreactivity data depicting an attenuation of apoptotic cells in the presence of NONOate (5 μ M).

Similar results were also obtained in the presence of SIN-1 (Fig. 3). ChAT immunoreactivity was brought to control levels when SIN-1 (0.1 mM) was co-incubated with the chemical ischemia mixture. The protection was attenuated at higher concentrations of SIN-1 (0.3 and 1.0 mM) (Figs. 3C-E). To assess whether this effect is due to peroxynitrite, we incubated



FIGURE 1. Effect of Arg and SNP on the chemical ischemia (CI) induced damage of ChAT containing neurons in the retina. (A) ChAT immunoreactivity was localized in amacrine cells in the inner nuclear layer (INL), in displaced amacrine cells in the ganglion cell layer (GCL), and in processes in the inner plexiform layer (IPL) in retinas treated with PBS (control). No immunoreactivity was observed in retinas treated with the CI mixture (B) or with the CI mixture and Arg (0.05 mM, C; 2 mM, D), and SNP (0.5 mM, E; 4 mM, F). Bars, 40 µm.

SIN-1 in the presence of the chemical ischemia mixture and the peroxynitrite scavenger L-cysteine. As shown in Figure 3F, L-cysteine partially reduced the protective effect of SIN-1. The immunohistochemistry data were substantiated by TUNEL staining (Figs. 3G-J).

To examine whether SIN-1 alone is toxic to the retina, eyecups were incubated with SIN-1 at the concentrations of 0.1, 0.3, 1.0, and 3 mM, and for the total time used in the neuroprotection protocol (120 min). As shown in Figure 4, ChAT immunoreactivity was not affected at the concentrations used in the protection experiment (0.1, 0.3, and 1.0 mM). However, a decrease in cholinergic neurons, but not in the processes, became evident at the higher concentration of 3 mM. TUNEL immunostain also showed an increase in apoptotic cells in retinas treated with SIN-1 (3 mM; Fig. 4).

While arginine/nitroprusside at the concentrations used do not support a role for NO in the neuroprotection from chemical ischemia insults, the NONOate and SIN-1 data support NO/cGMP-mediated neuroprotection. To study the direct involvement of cGMP in the neuroprotection, the cell-permeable analogue of cGMP, 8-Br-cGMP was co-incubated with the chemical ischemia mixture. 8-Br-cGMP produced a concentration dependent protective effect. The concentration of 0.5 mM gave maximum protection, as shown by ChAT immunoreactivity (Fig. 5). The neuroprotective effect of 8-Br-cGMP was also observed with TUNEL staining (Fig. 5), substantiating the concentration-dependent protection.

To examine whether NOS and sGC are involved in somatostatin's sst₂-mediated neuroprotection of the retina, eyecups were incubated with the chemical ischemia mixture and the sst₂-selective analogue BIM23014, in the absence and presence of the NOS inhibitor NMMA and the soluble guanylate cyclase inhibitors ODQ and NS2028. If NO and cGMP are critical in neuroprotection, inhibition of the NOS and guanylate cyclase activity would reverse the protective effect of BIM23014. As shown in Figure 6, NMMA and the sGC inhibitors reversed the BIM23014-induced neuroprotection against chemical ischemia. The involvement of cGMP in the mediation of BIM23014's protective effects in the chemical ischemia model was also suggested by TUNEL staining. Retinas that were incubated with BIM23014 in the presence of ODQ were characterized by an increase in apoptotic cells, mimicking the retinas that received the chemical ischemia insult.

DISCUSSION

The major findings of this study are the following: (1) the slow NO donor NONOate, the NO/peroxynitrite donor SIN-1, and 8-Br-cGMP protected the retina from chemical ischemia and (2) a NO/sGC/cGMP pathway was involved in the neuroprotective effects of the sst₂ analogue BIM23014 in the same model.

Ischemia is the underlying cause of retinal neovascularization, the major cause of many ocular diseases that lead to blindness. Ischemia induces the activation of voltage-gated calcium channels and ionotropic glutamate receptors, which results in an increase in intracellular calcium levels and the subsequent formation of NO. These events are believed to be the underlying cause of cell death.¹⁹ The neuropeptide somatostatin and its sst₂-specific analogues inhibited ischemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy.^{14,15} Also, somatostatin depicted neuroprotective actions in different paradigms of neurotoxicity in the brain.^{24–26} In a recent study, a chemical model of ischemia, initially used in hippocampal slices,¹⁶ was used in the retina¹⁷ and found to be a good model for examining putative neuroprotective agents.

Incubation of the rat eyecup with the chemical ischemia mixture (IAA/NaCN) for 60 minutes affected several retinal cell populations, including cholinergic, rod bipolar and TH- and NOS-positive amacrine cells. However, the viability of photoreceptors and ganglion cells remained intact.¹⁷ These data are in agreement with other studies showing that incubation of specific retinal cell types to chemical (KCN) and environmental hypoxia has no effect on photoreceptors.³¹ Also, in a model of simulated ischemia, the removal of oxygen and N₂ replacement of 95% O₂ resulted in the degeneration of retinal neurons in the INL.³²

Somatostatin analogues specific for the sst₂ subtype were successful in reversing retinal cell death in this ischemia model.¹⁷ The mechanisms by which somatostatinergic ligands act as neuroprotectants is still under investigation. The ability of somatostatin and analogues to inhibit the release of growth factors such as GH and IGF have implicated somatostatin as an antiangiogenic agent.^{14,15} Somatostatin inhibits IGF-1-mediated induction of VEGF in hRPE cells,³³ and octreotide has been shown to prevent growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia.³⁴

Somatostatin is also known to inhibit voltage-gated calcium channels,¹⁸ and neuronal calcium currents, the latter via a mechanism involving a cGMP-dependent protein kinase.²⁷ cGMP was also important in somatostatin's protective actions



FIGURE 2. Effect of NONOate on the chemical ischemia (CI)-induced damage of ChAT-containing neurons and TUNEL staining in the retina. ChAT immunoreactivity was present or absent in (A) control and (B) CItreated retinas, respectively. In retinas treated with the CI mixture and NONOate (1 µM, C; 5 µM, D; 10 µM, E), a concentration-dependent recovery of ChAT immunoreactivity was observed. TUNEL staining depicted major cell loss in retinas treated with CI (G) compared with control retinas (F). NONOate (1 µM, H; 5 µM, I) reduced the apoptotic damage in a concentration-dependent manner compared with (G). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 50 µm.

against NMDA-induced neuronal death in cortical cultures.²⁴ The second-messenger cGMP is the product of the catalysis of GTP by the cytosolic enzyme sGC.^{35,36} sGC is the physiological target of NO and NO donors such as SIN-1.^{36,37} NO binds with high affinity to the heme iron of sGC which leads to its stimulation.³⁶

NO has been found to promote but also antagonize ocular neovascularization. Pharmacologic inhibition of NOS reduced choroidal neovascularization and VEGF-induced neovascularization but did not reduce ischemia-induced retinal neovascularization. These studies, complemented with a genetic approach—namely, the employment of mice lacking individual or all three NOS isoforms—suggest that iNOS and/or nNOS in cells adjacent to endothelial cells in the presence of retinal ischemia has an antiangiogenic effect.³⁸ Also, in the developing rat retina, it has been shown that arginine and the NO donor SNAP block cell death induced by the protein synthesis inhibitor anisomycin. The antiapoptotic effect is partially mediated by cGMP.³⁹

In the present study, a wide range of concentrations of arginine and the NO donor SNP were used to induce NO release that would be beneficial against chemical ischemia, but not toxic to the tissue. However, no protection was observed at any of the concentrations used. It may be that higher concentrations than the 2 mM arginine and 4 mM SNP, used in this study, are needed. Arginine at concentrations of 1, 3, and 10 mM and the NO donor SNAP (10 mM) protect the developing retina from anisomycin-induced cell death, suggesting a paracrine neuroprotective effect of nitric oxide.³⁹

NaCN, an inhibitor of oxidative phosphorylation, is used for its ability to produce hypoxia. One must take into consideration the known effects of hypoxia on the arginine transporter.^{40,41} It has been shown that hypoxia inhibits L-arginine uptake, an effect that would influence NO production. The lack of effect of SNP may be due to abrupt and rapid release of NO, which would enhance NaCN's toxic effects. Alternatively, the formation of NO by SNP, which is accompanied by cyanide (CN⁻) formation, may be inhibited by the exogenous cyanide.^{37,42}

The slow NO donor NONOate protected the retina from chemical ischemia, but it did not offer full protection under the experimental paradigm. SIN-1 protected the retina from chemical ischemia in a concentration-dependent manner and offered maximum retinal protection at a concentration of 0.1 mM. No protection was observed at the higher concentration of 1.0 mM. SIN-1, the vasoactive metabolite of molsidomine,^{37,43} is metabolized in two steps to SIN-1A and subsequently to NO and nitrite, nitrate, superoxide anions, and peroxynitrite.^{43,44}

To examine whether the SIN-1 neuroprotective effect is due to peroxynitrite,²⁹ we examined whether the peroxynitrite scavenger L-cysteine would reverse its actions. The data show that L-cysteine only partially decreased the neuroprotective effects, suggesting that an NO and a peroxynitrite mechanism may be involved in SIN's actions. The putative toxic effect of SIN-1 on the retina was also examined. Eyes cups were treated with PBS in the absence and presence of different concentrations of SIN-1. SIN-1 did not influence ChAT immunoreactivity or TUNEL staining in the retina when used at the concentra-



tions of 0.1, 0.3, and 1 mM, concentrations that were used for the protection study. However, at the higher concentration of 3 mM a reduction of cholinergic and an increase in apoptotic cells were evident.

It is obvious from these studies that SIN-1 at low concentrations (0.1 mM) provides protection against chemical ischemia, whereas at high concentrations (3 mM), it leads to cell

SIN+L-cysteine on the chemical ischemia(CI)-induced damage of ChAT containing neurons and TUNEL staining in the retina. ChAT immunoreactivity was present and absent in control (A) and CI-treated (B) retinas, respectively. In retinas treated with the CI mixture and SIN-1 (0.1 mM, C; 0.3 mM, D; 1 mM, E) a concentration-dependent recovery of ChAT immunoreactivity was observed. L-Cysteine (5 mM) partially reversed the protective effect of 0.1 mM SIN-1 (F). TUNEL staining in PBS (G), CI (H), CI/SIN (I), and CI/SIN/L-Cys (J). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 50 μm.

FIGURE 3. Effect of SIN-1 and

death (Fig. 3). It is impossible to make any suggestions as to the resultant concentrations of NO that may play a role in the actions of SIN-1. In a recent study in which an NO electrode and in vivo microdialysis were used, SIN-1 (1 mM) did not increase NO levels in the striatum.⁴⁵ There are reports suggesting that SIN-1 has a direct stimulant effect on the soluble guanylate cyclase.^{44,46,47} The present data suggest that at low



FIGURE 4. Effect of SIN-1 on ChAT immunoreactivity and TUNEL staining in the retina. Retinas were treated with (A) PBS, (B) 0.1 mM SIN-1, (C) 0.3 mM SIN-1, (D) 1 mM SIN-1, and (E) 3 mM SIN-1. Only at the highest concentration, SIN-1 (3 mM) alone produced loss of ChATstained cell bodies (E), and an increase in TUNEL staining (H). No TUNEL staining was observed in control retinas (F) and in retinas treated with the lower concentration of 0.1 mM SIN-1 (G). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 20 µm.



the chemical ischemia (CI)-induced damage of ChAT-containing neurons and TUNEL staining in the retina. ChAT immunoreactivity in control (A) and CI-treated (B) retinas. A concentration-dependent recovery of ChAT immunoreactivity was observed in the presence of the CI mixture and 8-Br-cGMP (0.1 mM, C; 0.5 mM, D; 1 mM, E). No TUNEL staining was observed in control retinas (F), whereas a major cell loss was found in retinas treated with CI (G). Retinas treated with CI and 8-Br-cGMP (0.5 mM, H; or 0.1 mM, I) displayed no cell death or minimal cell death, respectively. INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 50 µm.

concentrations, SIN-1 may promote neuroprotection via a cGMP mechanism, whereas at higher concentrations, it can be toxic. Whether the toxic effects are mediated by its metabolite peroxynitrite, known to induce toxicity in different paradigms,^{48,49} could not be ascertained by the present experiments. Instead, a peroxynitrite mechanism may be partially involved in the protective actions of SIN-1, as suggested by the experiments with the peroxynitrite scavenger L-cysteine. Both NO and peroxynitrite have the ability to activate a soluble guanylyl cyclase and increase cGMP levels that may be neuroprotective.44,50

The involvement of cGMP in the protection of the retina from chemical ischemia was substantiated by the direct use of 8-Br-cGMP. This cell-permeable analogue of cGMP protected the retina from chemical ischemia in a concentration-dependent manner with maximum protection at 0.5 mM and partial protection at 1 mM. 8-Br-cGMP (1 mM) was also shown to have a partial protective effect against anisomycin-induced cell death in the developing retina.³⁹

It is evident from the present study that a cGMP mechanism is involved in the protection of the retina from chemical ischemia. As stated earlier, somatostatin has been shown to increase NO and cGMP levels in the retina by activating the sst₂ receptor subtype,^{12,28} whereas sst₂ selective ligands were found to protect the retina from chemical ischemia,¹⁷ as SIN-1 and 8-Br-cGMP did in the present study. In paradigms of neurotoxicity in the brain, somatostatin was shown to have neuroprotective effects by a cGMP dependent mechanism.²⁴ To examine whether a NO/cGMP mechanism mediates the neuroprotection offered by the sst₂ receptor activation to the retina,¹⁷ we examined whether the inhibition of NOS and the soluble guanylyl cyclase was able to reverse the protective effect of the sst₂ agonist. NMMA and the two sGC inhibitors ODQ and NS 2028 reversed the protective effect of BIM23014, thus implicating NO/sGC and cGMP in the neuroprotection. To further ascertain the importance of cGMP, assays were performed to assess cGMP levels in retinas treated with PBS or chemical ischemia alone or in the presence of BIM23014 and BIM23014 plus NS 2028. However, no statistically significant differences in cGMP levels were observed, perhaps for technical reasons or because of the abundance of sGC in the vasculature. Under the experimental conditions used, the isolation of the latter may have yielded differences in cGMP levels.

The subsequent signaling by which cGMP offers protection may involve the regulation of calcium channels²⁷ and the reduction of the toxic high levels of intracellular calcium induced by ischemia.¹⁹ Although there are no relevant reports in retinal circuitry to support this conjecture, it has been shown that NO/cGMP mediates the inhibition of calcium channels in retinal pericytes and reduces calcium influx.51

In addition, it has been shown that peroxynitrite activates voltage-dependent calcium channels (VDCCs)⁵² and influences neurotransmitter release.53 Recent studies have indicated that NO, cGMP and SIN-1 can stimulate the release of GABA.54 Inhibitory neurotransmitters such as GABA could counteract the toxic influence of glutamate on retinal neurons during retinal ischemia and would be expected to provide protection.¹⁹ Actually, GABA has been suggested as a neuroprotective agent in brain acute ischemic stroke.55 Therefore, one cannot exclude the possibility that NO, cGMP, and SIN-1 increase GABA levels in rat retina and assist in the neuroprotection in

348 Mastrodimou et al.



FIGURE 6. Effect of ODQ, NS 2028, and NMMA on the neuroprotective actions of BIM23014. ChAT immunoreactivity is present in retinas treated with PBS (A) and BIM23014 in the presence of the CI mixture (C). It is absent in retinas treated with the CI mixture alone (B) or with the CI mixture and BIM23014/ ODQ (D), BIM23014/NS2028 (E), and BIM23014/NMMA (F). No TUNEL staining is observed in control retinas (G) and in retinas treated with BIM23014 (I), in contrast to retinas treated with CI mixture alone (H) or with BIM23014/ ODQ (J). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 20 µm.

the present paradigm. However, this conjecture must be substantiated.

In conclusion, the present study reports for the first time that NO/peroxynitrite and cGMP are important mediators in the protection of rat retina from chemical ischemia. Furthermore, the data support the involvement of the NO/sGC/cGMP signaling pathway in the neuroprotective effects bestowed on the retina by the sst₂ somatostatin ligands in the same model.

References

- 1. Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 1973;179:77-79.
- Shapiro B, Kronheim S, Pimstone B. The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metab Res.* 1979;11:79–80.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16: 86-88.
- 4. Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res.* 2003;43:1805–1815.
- Helboe L, Moller M. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2376–2382.
- Johnson J, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 1998;393:93-101.
- Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience*. 1999;94:675-683.

- 8. Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1600–1609.
- 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 retina via sst2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001;363:680-694.
- Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, et al. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1499-1506.
- Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3191–3199.
- Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology*. 2002;43:899–909.
- Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res.* 2002; 936:1-14.
- 14. Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science*. 1997;276:1706-1709.
- 15. Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularisation. *Exp Eye Res.* 2002;74:553–559.
- Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci Lett.* 1990;119:175-178.
- 17. Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiederbergs Arch Pharmacol.* 2005;371:44–53.

- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23:91–147.
- Kouvidi E, Papadopoulou-Daifoti Z, Thermos K. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci Lett.* 2006;391:82– 86.
- Fontanesi G, Gargini C, Bagnoli P. Postnatal development of somatostatin 2A(sst_{2A}) receptors expression in the rabbit retina. *Dev Brain Res.* 2000;123:67080.
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 1996;381:242-245.
- Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. [¹²⁵I]Tyr10-cortistatin 14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiederbergs Arch Pharmacol.* 1998;357:483–489.
- Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiessa R, Vezzani A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem.* 1997;68:319– 327.
- Braun H, Schulz S, Becher A, Schroder H, Hollt V. Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Res.* 1998;803:54–60.
- Rauca C, Schafer K, Hollt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;360:633-638.
- 27. Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*. 1994;369:336-339.
- Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Hodjarova M, Karagianni E, Thermos K. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. *Regul Pept.* 2006;133:41-46.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Navilliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Rad Biol Med.* 2001;30:463-488.
- Olesen S-P, Drejer J, Axelsson O, et al. Characterization of NS2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol.* 1998;123:299-309.
- Luo X, Lambrou GN, Sabel JA, Hicks D. Hypoglycemia induces general neuronal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2695-2705.
- Izumi Y, Benz AM, Kurby CO, et al. An ex vivo rat retinal preparation for excitotoxicity studies. *J Neurosci Methods*. 1995;60: 219–225.
- 33. Sall JW, Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE. Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004;79:465–476.
- Baldsiak-Figiel A, Lang GK, Kampmeier J, Lang GE. Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J Endocrinol.* 2004;180:417–424.
- Koesling D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 1991;5:2785–2791.
- Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003;93:96–105.

- Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide donors. Proc Soc Exp Biol Med. 2000;225:200-206.
- Ando A, Yang A, Nambu H, Campochiaro PA. Blockade of nitricoxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol Pharmacol.* 1992;62:539–544.
- 39. Guimaraes CA, Assreuy J, Linden R. Paracrine neuroprotective effect of nitric oxide in the developing retina. *J Neurochem*. 2001;76:1233-1241.
- Block ER, Herrera H, Couch M. Hypoxia inhibits L-arginine uptake by pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995;269: L574-580.
- 41. Zhakarikov SI, Block ER. Association of L-arginine transporters with fodrin; implication for hypoxic inhibition of arginine uptake. *Am J Physiol.* 2000;278:L111–L117.
- 42. Bates JN, Baker MT, Guerra R, Harrison DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(suppl):S157–S165.
- Feelisch M, Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol.* 1989;139:19–30.
- 44. Schrammel A, Pfeiffer S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholinosydnonimine involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol.* 1998;54:207–212.
- 45. Rocchitta G, Migheli R, Mura MP, et al. Signalling pathways in the nitric oxide donor-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: evidence that exogenous nitric oxide promotes Ca²⁺ entry through store-operated channels. *Brain Res.* 2004; 1023:243-252.
- Kukovetz WR, Holzmann S. Mechanism of vasodilation by molsidomine. Am Heart J. 1985;109:637–640.
- 47. Trakranrungsie N, Will JA. Comparative vasodilation of peroxynitrite and 3-morpholinosydnonimine. *Life Sci.* 2001;69:2349–2359.
- Estevez AG, Radj R, Barbeito I, Shin JT, Thompson J, Beckman JS. Peroxynitrite induces apoptosis in PC12 cells and alters responses to neurotrophic factors. *J Neurochem.* 1995;65:1543–1550.
- 49. Villa LM, Salas E, Darly-Usmar VM, Radomski MV, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci* USA. 1994;91:12383-12387.
- McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. Proc Soc Exp Biol Med. 1996;211:1-6.
- Sakagami K, Kawamura H, Wu DM, Puro DG. Nitric oxide/cGMPinduced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvasc Res.* 2001;62:196–203.
- 52. Ohkuma S, Katsura M, Higo A, et al. Peroxynitrite affects Ca²⁺ influx through voltage-dependent calcium channels. *J Neurochem*. 2001;76:341-350.
- Okhuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T, Kuriyama K. Nitric oxide-induced [3H]GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. *J Neurochem*. 1995;65:1109–1114.
- Yu D, Eldred WD. Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. *J Comp Neurol.* 2005;483:278-291.
- Green AR, Hainsworth AH, Jackson DM. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology*. 2000;39:1483–1494.