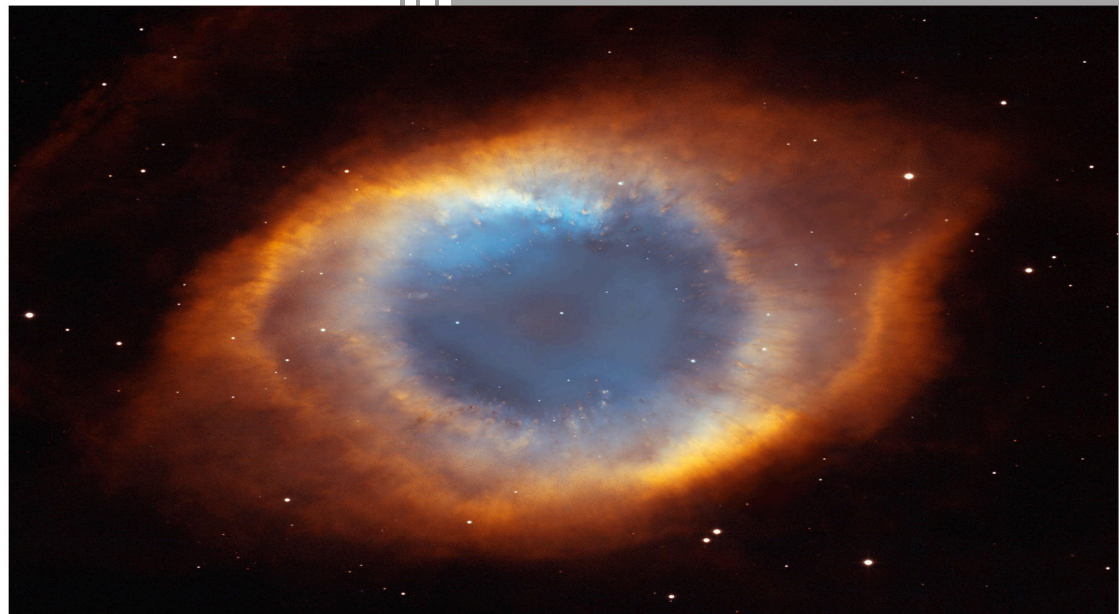




**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ  
ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ  
ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΟΝ  
ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ**



**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΓΙΑΝΝΟΓΚΩΝΑΣ**

**Βιολόγος**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

**Dr. ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008**

**Η διπλωματική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο:**

*Εργαστήριο Φαρμακολογίας,  
Τομέας Βασικών Επιστημών,  
Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης.*

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:**

*Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ακαδημαϊκός υπεύθυνος  
προγράμματος & Πρόεδρος Επιτροπής Ανταλλαγών Τμήμα Ιατρικής  
Dr. Κυριακή Θερμού*

**Μέλη τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης:**

*Καθηγητής Φαρμακολογίας Dr. Αχιλλέας Γραβάνης  
Αναπλ. Καθηγήτρια Νευροεπιστημών Dr. Δόμνα Καραγωγέως  
Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Dr. Κυριακή Θερμού*

*"... Βιώνουμε αυτές τις μυστηριώδεις συμπτώσεις και, παρ' όλο που δεν τις καταλαβαίνουμε ακόμα, γνωρίζουμε ότι είναι πραγματικές..."*

***Η Ουράνια Προφητεία, James Redfield.***

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Στα πλαίσια της εργαστηριακής μου απασχόλησης, για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής διατριβής, μου δόθηκε η ευκαιρία να έρθω σε επαφή με έναν ενδιαφέροντα ερευνητικό χώρο και με διάφορες μεθοδολογίες και τεχνικές, καθώς επίσης και να αποκτήσω σημαντική εξοικείωση με τον επιστημονικό τρόπο σκέψης. Θεωρώ, λοιπόν, ότι από αυτή μου την επαφή αποκόμισα όχι μόνο γνώσεις, αλλά και εμπειρίες, οι οποίες θα αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την οποιαδήποτε μελλοντική μου πορεία.

Τίποτα, όμως, από αυτά δεν θα ήταν δυνατό χωρίς την βοήθεια αρκετών ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Θέλω, αρχικά, να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Κυριακή Θερμού, η οποία όχι μόνο μου εμπιστεύθηκε μια θέση στο εργαστήριο, αλλά παρέβλεψε τυχόν αποτυχίες μου, επιδεικνύοντας κατανόηση σε όσα προβλήματα πιθανώς αντιμετώπισα, είτε αφορούσαν θέματα εντός είτε εκτός εργαστηρίου, καθόλη τη διάρκεια της απασχόλησής μου στο εργαστήριό της. Με τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της, με βοήθησε να ολοκληρώσω με επιτυχία αυτή τη μελέτη και να ασχοληθώ σοβαρά με εργαστηριακά θέματα.

Φυσικά, θέλω να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Κάλλια Απαζόγλου, Παναγιώτα Γεωργίου, Φωτεινή Κιαγιαδάκη, Νίκη Μαστροδήμου, Σεμέλη Μαστροδήμου, Ζήση Μπιμπισίδη, Αγγελική Σακελάρη, Μαριλένα Τσάλα και Kristina Volkova. Ευχαριστώ τη Νίκη και τη Γιώτα για την εκμάθηση των τεχνικών κατά το ξεκίνημα, καθώς και για την βοήθεια που μου παρείχαν κυρίως κατά την έναρξη της διεξαγωγής των πειραμάτων μου. Επίσης ευχαριστώ τη Φωτεινή για τη βοήθειά της, τις χρήσιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις της σε όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μου απασχόλησης, καθώς και για το γεγονός ότι δεν αρνήθηκε ποτέ είτε να με βοηθήσει είτε να απαντήσει στις συνεχόμενες ερωτήσεις μου ακόμα και αν δεν προλάβαινε να πάρει ανάσα λόγω φόρτου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους παραπάνω για το πολύ φιλικό και όμορφο περιβάλλον που δημιούργησαν από την αρχή της δουλειάς μου στο εργαστήριο.

Υπάρχουν και ορισμένοι άνθρωποι εκτός του εργαστηριακού χώρου, η βοήθεια των οποίων μου ήταν ανεκτίμητη κυρίως για τη στήριξη την οποία μου έδιναν σε κάθε στιγμή. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ απευθύνεται στους φίλους μου Κωνσταντίνο Αμπατζή, Γιάννη Βλατάκη, Ρίτσα Ιερωνυμάκη, Ειρήνη Καμηλέρη, Νίκο Κοϊνάκη, Νίκο Κωνσταντινίδη, Κώστα Νταντάμη, Μεθόδιο Ξημεράκη, Σταμάτη Παπαθανασίου, Μαράννια Σαριδάκη, Ιωάννα Τηνιακού και Γεωργία Τσικαλά οι οποίοι υπέμειναν όλες τις «ψυχολογικές φάσεις» που περνούσα κατά διαστήματα. Σε όλους χρωστάω ατελείωτη ευγνωμοσύνη που με άντεξαν και μου χάρισαν αξέχαστες και υπέροχες αναμνήσεις.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου, των οποίων η ανεκτίμητη βοήθεια (τόσο οικονομική όσο και ηθική), στήριξη και πίστη σε εμένα με βοήθησε να συνεχίσω.

Θα ήθελα, τέλος, να αποχαιρετίσω το Ηράκλειο, το οποίο με φιλοξένησε σχεδόν 8 χρόνια και μου έδωσε εμπειρίες και αναμνήσεις για πολλά περισσότερα χρόνια. Το ταξίδι φτάνει στο τέλος, ώρα να γυρίσουμε σπίτι...

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ .....	1
1.2 ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ .....	3
1.3. ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ .....	6
1.4. ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ .....	7
1.4.1. Φωτοϋποδοχείς.....	8
1.4.2. Γαγγλιακά κύτταρα .....	8
1.4.3. Αμακρινικά κύτταρα.....	9
1.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ .....	9
1.6. ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ .....	14
1.6.1 Νευροστεροειδή στον αμφιβληστροειδή .....	15
1.6.2 Νευροστεροειδή ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες .....	16
1.7. ΣΚΟΠΟΣ .....	19
<b>2. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>20</b>
2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ .....	20
2.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ .....	20
2.3. ΕΠΑΓΩΓΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ .....	20
2.4. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ .....	22
2.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΡΥΟΤΟΜΩΝ .....	22
2.6. ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ .....	22
2.7. TUNEL ASSAY (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red) .....	23
2.8. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΔΙΠΛΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ .....	24
2.9. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΚΙΝΑΣΩΝ (early apoptosis) ΜΕ WESTERN BLOT .....	24
2.10. BRADFORD ASSAY ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	25
2.11. WESTERN BLOT ANALYSIS .....	25
2.12. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΣΥΝΤΑΓΕΣ .....	26
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>28</b>
3.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ .....	28
3.2. TUNEL ANALYSIS .....	37
3.3. ΔΙΠΛΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (DOUBLE LABELLING) .....	39
3.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ .....	41
3.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ .....	41
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>45</b>
<b>5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>53</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>54</b>

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

---

<b>AIF</b> – Apoptosis Inducing Factor	<b>MEK</b> – MAP Kinase
<b>AION</b> – Anterior Ischemic Optic Neuropathy	<b>mRNA</b> – Messenger Ribonucleic Acid
<b>ALS</b> – Amyotrophic Lateral Sclerosis	<b>NFL</b> – Neurofilament
<b>AMD</b> – Age-related Macular Degeneration	<b>NF-κB</b> – Nuclear Factor-κB
<b>AMPA</b> – Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	<b>NGF</b> – Nerve Growth Factor
<b>APAF1</b> – Apoptosis Protease Activating Factor-1	<b>NGFR</b> – Nerve Growth Factor Receptor
<b>ApoE</b> – Apolipoprotein Epsilon	<b>NGS</b> – Normal Goat Serum
<b>APS</b> – Ammonium Persulfate	<b>NMDA</b> – N-methyl-D-aspartic acid
<b>ATP</b> – Adenosine Triphosphate	<b>NO</b> – Nitric Oxide
<b>BAX</b> – B-cell lymphoma 2-associated protein X	<b>NOS</b> – Nitric Oxide Synthase
<b>BCL2</b> – B-Cell Leukaemia/Lymphoma-2	<b>NT</b> – Neurotrophin
<b>BDNF</b> – Brain-derived neurotrophic factor	<b>OCT</b> – Optimal Cutting Temperature compound
<b>BH3</b> – BCL2 Homology domain 3	<b>ONL</b> – Outer Nuclear Layer
<b>BID</b> – BH3 Interacting agonist	<b>OPL</b> – Outer Plexiform Layer
<b>bNOS</b> – Brain-derived Nitric Oxide Synthase	<b>P450<sub>scc</sub></b> – cytochrome P450 cholesterol Side-Chain Cleavage
<b>BSA</b> – Bovine Serum Albumin	<b>p75<sup>NTR</sup></b> – Neurotrophin Receptor p75
<b>CaBP</b> – Calcium Binding Protein	<b>PARP1</b> – PolyADP-Ribose Polymerase-1
<b>cAMP</b> – Cyclic Adenosine Monophosphate	<b>PBS</b> – Phosphate Buffered Saline
<b>ChAT</b> – Choline Acetyltransferase	<b>PCD</b> – Programmed Cell Death
<b>CI</b> – Chemical Ischemia	<b>pCO<sub>2</sub></b> – Partial Pressure of Carbon Dioxide
<b>CREB</b> – cAMP Response Element Binding	<b>PFA</b> – Paraformaldehyde
<b>DAXX</b> – Death-Associated protein	<b>PI3K</b> – Phosphatidyl-inositol-3-kinase
<b>DHEA</b> – Dehydroepiandrosterone	<b>PKC</b> – Protein Kinase C
<b>DHEAS</b> – DHEA sulfate	<b>PMSF</b> – Phenylmethylsulphonyl Fluoride
<b>DNA</b> – Deoxyribonucleic Acid	<b>pO<sub>2</sub></b> – Partial Pressure of Oxygen
<b>EDTA</b> – Ethylenediaminetetraacetic acid	<b>PREG</b> – Pregnenolone
<b>eNOS</b> – endothelial NOS	<b>PREGS</b> – PREG sulfate
<b>ER</b> – Endoplasmic Reticulum	<b>PROG</b> – Progesterone
<b>ERG</b> – Electroretinogram	<b>RIP</b> – Receptor Interacting Protein
<b>Erk</b> – Extracellular signal-Regulated Kinases	<b>ROP</b> – Retinopathy Of Prematurity
<b>FADD</b> – FAS-Associated Death Domain	<b>RPE</b> – Retinal Pigment Epithelium
<b>FAS</b> – Apoptosis Antigen-1	<b>SDS</b> – Sodium Dodecyl Sulfate
<b>FASL</b> – Apoptosis Antigen-1 Ligand	<b>SMAC</b> – Second Mitochondrial Derived Activator of Caspases
<b>FLICE</b> – FADD-Like Interleukin-1β	<b>tBID</b> – Truncated BID
<b>GABA</b> – Gamma-Aminobutyric Acid	<b>TBS</b> – Tris Buffer Saline
<b>GCL</b> – Ganglion Cell Layer	<b>TBST</b> – Tris Buffer Saline Tween 20
<b>HTRA2</b> – High Temperature Requirement Serine Protease 2	<b>TEMED</b> – Tetramethylethylenediamin
<b>IAP</b> – Inhibitor of Apoptosis	<b>Thy-1 (CD90)</b> – Thymocyte antigen 1 (Cluster of Differentiation 90)
<b>INL</b> – Inner Nuclear Layer	<b>TNFR1</b> – Tumour Necrosis Factor-α Receptor 1
<b>iNOS</b> – immunologic NOS	<b>TNFα</b> – Tumour Necrosis Factor-α
IOP – Intraocular Pressure	<b>TRADD</b> – TNF-Receptor Death Domain
<b>IPC</b> – Ischemic Preconditioning	<b>TRAF2</b> – TNF-Associated Factor 2
<b>IPL</b> – Inner Plexiform Layer	<b>TrkA</b> – Tropomyosin-Related Kinase A
<b>JNK</b> – c-Jun-N-terminal Kinase	<b>TUNEL</b> – Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
<b>LDL</b> – Low Density Lipoprotein	
<b>MAP1</b> – Microtubule Associated Protein-1	

Η μετάφραση των εννοιών και όρων που εμφανίζονται, πραγματοποιήθηκε με βάση το **Konstantinidis G.** Elsevier's dictionary of medicine and biology: in English, Greek, German, Italian, and Latin. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2005.

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδή αποτελεί το κύριο αίτιο που οδηγεί σε μια ποικιλία κοινών *αμφιβληστροπαθειών*, όρος που αναφέρεται σε μια μορφή μη φλεγμονώδους βλάβης του αμφιβληστροειδή. Η ισχαιμία επέρχεται όταν η κυκλοφορία του αίματος δεν επαρκεί για να καλύψει τις μεταβολικές ανάγκες του αμφιβληστροειδή, οδηγώντας ενδεχομένως σε εξασθένηση της όρασης και τύφλωση εξαιτίας της επερχόμενης νευροεκφύλισης. Ασθένειες, όπως η γεροντική εκφύλιση της ωχράς (*age-related macular degeneration*), η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (*diabetic retinopathy*), το γλαύκωμα και η οπισθοφακική ινοπλασία (*retinopathy of prematurity - ROP*) χαρακτηρίζονται κλινικά από μη φυσιολογική αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς και εντάσσονται στο σύνολο των υποξικών ισχαιμικών διαταραχών του νευρικού ιστού. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία έναντι των παραπάνω ασθενειών. Η εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων είναι απαραίτητη για τη μείωση της οπτικής εξασθένησης.

Συνεχώς αυξανόμενος αριθμός μελετών καταδεικνύουν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες στεροειδών που συντίθενται στο νευρικό σύστημα και ονομάζονται *νευροστεροειδή*. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των πιθανών νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων του γνωστού νευροστεροειδούς *dehydroepiandrosterone (DHEA)* καθώς και δύο νέων *spiro-νευροστεροειδή (BNN-50 ή Tc50 και BNN-124 ή Tc124)* σε χημικά επαγόμενη αμφιβληστροειδική ισχαιμία.

---

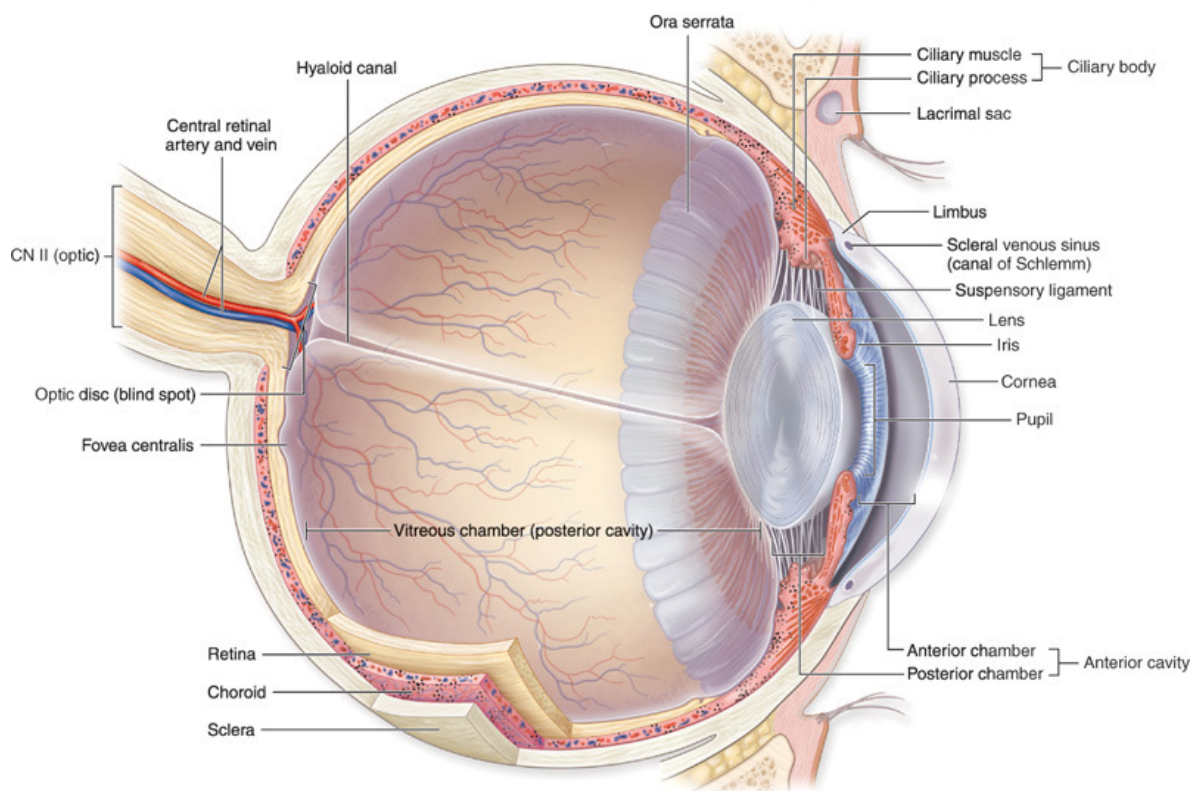
### **1.1. ANATOMIA**

Ο οφθαλμός είναι δομημένος με τρόπο ώστε να συλλέγει ακτίνες φωτός και να πραγματοποιεί τα αρχικά στάδια της επεξεργασίας των οπτικών ερεθισμάτων. Ο οφθαλμικός βολβός έχει σφαιρικό σχήμα, με μια εξωτερική στοιβάδα από πυκνό συνδετικό ιστό, που ονομάζεται *σκληρός χιτώνας (sclera)*, η οποία προστατεύει τις εσωτερικές στοιβάδες. Ο σκληρός χιτώνας είναι συνεχόμενος με την σκληρή μήνιγγα του εγκεφάλου. Εσωτερικά του σκληρού χιτώνα βρίσκεται ο *χοριοειδής χιτώνας (choroid)*, μια αγγειώδη στοιβάδα, ενώ εσωτερικότερα βρίσκεται ο *αμφιβληστροειδής χιτώνας (retina)*, ο οποίος περιέχει τους *φωτοϋποδοχείς (photoreceptors)*. Στο πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού, ο σκληρός χιτώνας φέρει ένα άνοιγμα για να διέρχεται το φως. Το άνοιγμα αυτό καλύπτεται από τον *κερατοειδή χιτώνα (cornea)*, ο οποίος είναι μία λεπτή, διαφανής στοιβάδα συνδετικού ιστού. Ο κερατοειδής χιτώνας δεν δέχεται αγγείωση, ενώ νευρώνεται από αμύελες ίνες, οι οποίες τον καθιστούν ευαίσθητο στην αφή. Τα πλευρικά όρια του κερατοειδούς συνδέονται με τον *επιπεφυκότα (conjunctiva)*, ένα είδος εξειδικευμένου επιθηλίου που καλύπτει το σκληρό χιτώνα. **[Εικόνα 1.1α]**

Στο πρόσθιο μέρος του οφθαλμού, ο χοριοειδής χιτώνας λεπταίνει και σχηματίζει δακτυλίους (το *ακτινωτό σώμα - ciliary body*), που περιέχουν λείες μυϊκές ίνες, οι οποίες ελέγχουν την κυρτότητα του οφθαλμού. Ο χοριοειδής χιτώνας σχηματίζει επίσης την *ίριδα (iris)*, έναν κυκλικό δίσκο με ένα κεντρικό

άνοιγμα που ονομάζεται *κόρη (pupil)*. Η ίριδα περιλαμβάνει κυκλικούς λείους μύες (*σφιγκτήρες μύες – sphincter pupillae*), ρυθμιζόμενους από το παρασυμπαθητικό τμήμα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Περιέχει επίσης λείους μύες σε ακτινωτή διάταξη (*διαστολείς μύες – dilator pupillae*), οι οποίοι συσπώμενοι ως απόκριση σε συμπαθητική διέγερση, διαστέλλουν την κόρη.

Το φως που εισέρχεται στον οφθαλμό, διαθλάται από τον *φακό (lens)*, μία διάφανη κρυσταλλική δομή που διατηρείται στη θέση της από *κρεμαστήρες συνδέσμους (suspensory ligaments)*. Το φως, μέσω του φακού, εστιάζεται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Μπροστά από τον φακό, πίσω από την κόρη βρίσκεται ο *πρόσθιος θάλαμος (anterior chamber)*, στον οποίο υπάρχει υδατοειδές υγρό, παρόμοιας σύστασης με το πλάσμα, αλλά περίπου με το 1% της πρωτεΐνης του. Στο πίσω μέρος του φακού βρίσκεται ο μεγαλύτερος *οπίσθιος θάλαμος (posterior chamber)*, ο οποίος περιέχει επίσης ένα υδατοειδές υγρό που ονομάζεται *υαλοειδές σώμα (vitreous body)*. Το υγρό απομακρύνεται από τον οφθαλμό μέσω του *αγωγού του Schlemm*, ενώ ό, τι εμποδίζει αυτή τη διαδικασία προκαλεί *γλαύκωμα (glaucoma)*, που μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση<sup>(29)</sup>.



**Εικόνα 1.1α:** Ανατομία του οφθαλμού.



## 1.2. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ

Παρά την περιφερειακή του θέση, ο αμφιβληστροειδής (το νευρικό δηλαδή τμήμα του οφθαλμού) ανήκει στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Κατά την ανάπτυξη, ο αμφιβληστροειδής σχηματίζεται ως μια εξωτερική αναδίπλωση του διεγκεφάλου, η οποία ονομάζεται *οφθαλμικό κυστίδιο (optic vesicle)*, το οποίο υφίσταται αναδίπλωση και σχηματίζει τον *οφθαλμικό κάλυκα (optic cup)*. Από το εσωτερικό τοίχωμα του οφθαλμικού κάλυκα προέρχεται ο αμφιβληστροειδής, ενώ το εσωτερικό τμήμα του σχηματίζει το *μελάγχρουν επιθήλιο (pigment epithelium)*. Το τελευταίο είναι μία λεπτή δομή που περιέχει μελανίνη και περιορίζει την σκέδαση του φωτός που εισέρχεται στον οφθαλμό. Επιπλέον παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των φωτοϋποδοχέων, ανανεώνοντας τις φωτοχρωστικές και φαγοκυτταρώνοντας τους δίσκους των φωτοϋποδοχέων, των οποίων το σθένος είναι σε μεγάλο βαθμό απαραίτητο για την όραση.

Ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από ένα σύνθετο δίκτυο νευρικών κυκλωμάτων που μετατρέπουν την διαβατιζόμενη ηλεκτρική δραστηριότητα των διεγερμένων από το φως φωτοϋποδοχέων σε δυναμικά ενέργειας, τα οποία φτάνουν στον εγκέφαλο μέσω αξόνων του οπτικού νεύρου. Παρόλο που φέρει τα ίδια λειτουργικά στοιχεία και νευροδιαβιβαστές που βρίσκονται σε άλλα μέρη του κεντρικού νευρικού συστήματος, ο αμφιβληστροειδής εμπεριέχει λιγότερες κατηγορίες νευρώνων, οι οποίοι είναι διαταγμένοι ώστε να καθίσταται ευκολότερη η διαλεύκανση του ρόλου τους σε σύγκριση με άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Υπάρχουν πέντε τύποι νευρώνων στον αμφιβληστροειδή: *φωτοϋποδοχείς, δίπολα κύτταρα (bipolar cells), γαγγλιακά κύτταρα (ganglion cells), οριζόντια κύτταρα (horizontal cells)* και *αμακρινικά κύτταρα (amacrine cells)* **[Εικόνα 1.2α]**. Τα κυτταρικά σώματα και οι αποφύσεις αυτών των νευρώνων διατάσσονται σε διακριτές στοιβάδες, με τα κυτταρικά σώματα να εντοπίζονται στην *εσωτερική πυρηνική στοιβάδα (inner nuclear layer – INL)*, την *εξωτερική πυρηνική στοιβάδα (outer nuclear layer – ONL)* και τη *γαγγλιακή στοιβάδα (ganglion cell layer – GCL)*, ενώ οι αποφύσεις και οι συναπτικές επαφές εντοπίζονται στην *εσωτερική δικτυωτή στοιβάδα (inner plexiform layer – IPL)* και την *εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα (outer plexiform layer – OPL)*.

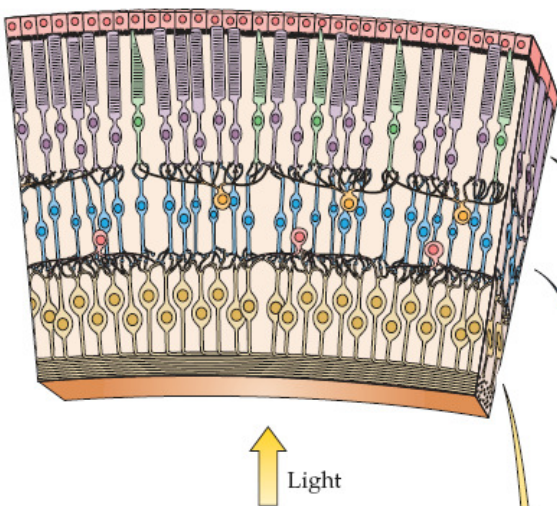
Υπάρχουν δύο τύποι φωτοϋποδοχέων στον αμφιβληστροειδή: τα *ραβδία (rods)* και τα *κονία (cones)*. Και οι δύο τύποι φέρουν εξωτερικά τμήματα από μεμβρανώδεις δίσκους που περιέχουν φωτοευαίσθητη χρωστική και βρίσκονται παρακείμενα του μελάγχρουν επιθηλίου, και ένα εσωτερικό τμήμα που περιέχει τον πυρήνα του κυττάρου απ' όπου ξεκινούν οι συναπτικές απολήξεις, οι οποίες συνδέονται με δίπολα και οριζόντια κύτταρα. Απορρόφηση φωτός από την φωτοχρωστική του εξωτερικού τμήματος των φωτοϋποδοχέων δίνει ένα σήμα για μια αλληλουχία γεγονότων που μεταβάλλουν το μεμβρανικό δυναμικό του υποδοχέα και κατ' επέκταση την ποσότητα του νευροδιαβιβαστή που απελευθερώνεται από την σύναψη του φωτοϋποδοχέα προς τα κύτταρα με τα οποία συνδέεται. Οι συνάψεις μεταξύ των απολήξεων των φωτοϋποδοχέων και

των δίπολων / οριζόντιων κυττάρων πραγματοποιούνται στην OPL. Συγκεκριμένα, τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων σχηματίζουν την ONL, ενώ τα κυτταρικά σώματα των δίπολων βρίσκονται στην INL. Οι βραχείς αξονικές απολήξεις των δίπολων κυττάρων δημιουργούν συναπτικές συνδέσεις στις δενδριτικές απολήξεις των γαγγλιακών κυττάρων στην IPL. Οι αρκετά μεγαλύτεροι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν το οπτικό νεύρο και μεταφέρουν πληροφορίες από την διέγερση του αμφιβληστροειδή στο υπόλοιπο κεντρικό νευρικό σύστημα.

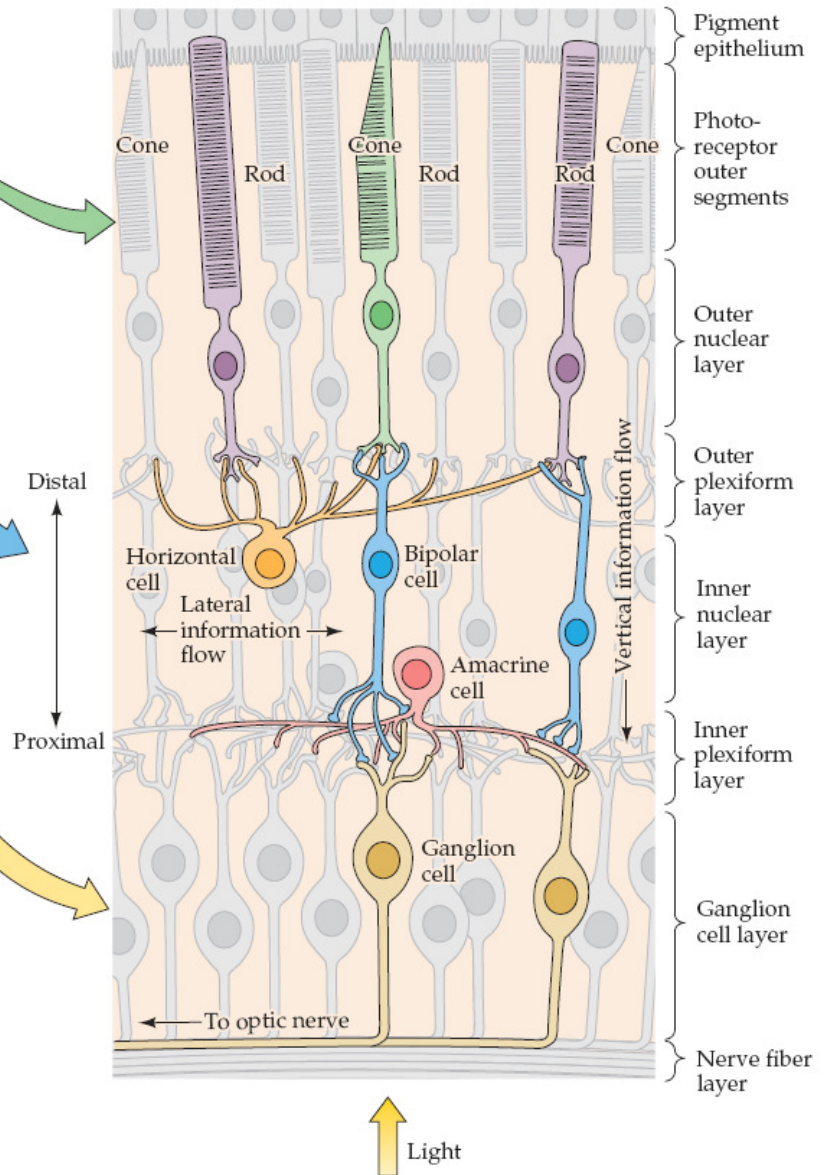
Οι άλλοι δύο νευρικοί τύποι του αμφιβληστροειδή, οριζόντια και δίπολα κύτταρα, έχουν τα κυτταρικά τους σώματα στην INL, ενώ οι απολήξεις τους περιορίζονται στην OPL και IPL αντίστοιχα. Οι απολήξεις των οριζόντιων κυττάρων καθιστούν δυνατές πλευρικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους φωτοϋποδοχείς και τα δίπολα κύτταρα, οι οποίες διατηρούν την ευαισθησία του οπτικού συστήματος στην αντίθεση φωτεινότητας σε ένα ευρύ φάσμα εντάσεων φωτός. Οι απολήξεις των αμακρινικών κυττάρων είναι μετασυναπτικές ως προς τα άκρα (*terminals*) των δίπολων κύτταρων και προσυναπτικές προς τους δενδρίτες των γαγγλιακών κυττάρων. Διαφορετικές κατηγορίες αμακρινικών κυττάρων θεωρούνται ότι φέρουν διακριτές συνεισφορές στην λειτουργία της όρασης.

Με μία γενικότερη παρατήρηση του οπτικού συστήματος, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η χωρική διάταξη των στοιβάδων του αμφιβληστροειδή καθιστά αρκετά δύσκολη την αποτελεσματικότητα των φωτεινών ερεθισμάτων. Φωτόνια απορροφούνται μόνο από τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων και μόνο μετά από το πέρασμα των ακτίνων μέσα από ένα περίπλοκο δίκτυο μη φωτοευαίσθητων στοιχείων και αγγείωσης. Ο λόγος αυτής της οργάνωσης έγκειται στη σχέση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, του μελάγχρου επιθηλίου και του υποκείμενου σκληρού χιτώνα. Το μελάγχρου επιθήλιο διαθέτει το σύνολο του βιοχημικού εξοπλισμού που είναι απαραίτητος για την ανανέωση των μορίων της φωτοχρωστικής μετά την έκθεσή τους σε φως. Επιπλέον, τα τριχοειδή που βρίσκονται στον υποκείμενο σκληρό χιτώνα αποτελούν την κύρια πηγή παροχής θρεπτικών συστατικών για τους φωτοϋποδοχείς. Οι παραπάνω λειτουργικές συσχετίσεις των επιμέρους τμημάτων του οπτικού συστήματος εξηγούν σε μεγάλο βαθμό το γεγονός ότι σε περίπτωση διαταραχής της σχέσης μεταξύ του μελάγχρου επιθηλίου και των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδή (π.χ. μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια – retinitis pigmentosa) επέρχονται σοβαρές συνέπειες για την όραση<sup>(76)</sup>.

(A)



(B)



**Εικόνα 1.2α:** Δομή του αμφιβληστροειδούς. (A) Εγκάρσια τομή αμφιβληστροειδούς όπου παρουσιάζονται συνολικά οι διαφορετικές κυτταρικές στοιβάδες. (B) Διάγραμμα του βασικού κυκλώματος του αμφιβληστροειδή. Μία αλυσίδα τριών νευρώνων – φωτοϋποδοχέας, δίπολο κύτταρο, γαγγλιακό κύτταρο – παρέχει την πιο άμεση διαδρομή για τη μεταφορά της οπτικής πληροφορίας στον εγκέφαλο. Τα οριζόντια και αμακρινικά κύτταρα μεσολαβούν σε πλευρικές αλληλεπιδράσεις στην OPL και IPL αντίστοιχα. Οι όροι εσωτερική και εξωτερική (στοιβάδα) αναφέρονται σε σχετικές αποστάσεις από το κέντρο του οφθαλμού.

### 1.3. ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

Με τον γενικό όρο *αμφιβληστροειδοπάθεια* περιγράφεται μια μορφή μη φλεγμονώδους βλάβης του αμφιβληστροειδούς του οφθαλμού. Συνηθέστερο αίτιο αυτής της κατάστασης αποτελεί η ελαττωματική κυκλοφορία του αίματος στον αμφιβληστροειδή, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε σε παθολογικά είτε σε γενετικά αίτια. Η κυκλοφορία του αίματος είναι υπεύθυνη για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στις διαφορετικές δομές του αμφιβληστροειδή χωρίς να επηρεάζει τη λειτουργία της όρασης. Για την επίτευξη αυτής της περίπλοκης διαδικασίας σε θηλαστικά, άνθρωπο και άλλα πρωτεύοντα, λαμβάνουν μέρος δύο διακριτά συστήματα αγγείωσης: η *αγγείωση του αμφιβληστροειδή (retinal vascularization)* και η *αγγείωση του σκληρού χιτώνα (uveal or choroidal vascularization)*<sup>(45)</sup>.

Η παρουσία μηχανισμών, οι οποίοι ρυθμίζουν την κυκλοφορία του αίματος στον αμφιβληστροειδή πιθανώς να αντικατοπτρίζουν σημαντικές στρατηγικές επιβίωσης για τον αμφιβληστροειδή, οι οποίες όμως δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές. Όπως στους περισσότερους ιστούς, η ρύθμιση της κυκλοφορίας είναι αρκετά περίπλοκη. Υπάρχει μια πλειάδα τοπικών και συστηματικών παραγόντων, που έχουν τη δυνατότητα επίδρασης. Τοπικοί φυσιολογικοί (π.χ. αυξομειώσεις στην πίεση διαπότισης – perfusion pressure) και μεταβολικοί παράγοντες (π.χ. μεταβολές στο  $pO_2$ ,  $pCO_2$  και pH) επιχειρούν να προσαρμόζουν τη ροή ανάλογα με τις τοπικές ανάγκες, ενώ οι συστηματικοί παράγοντες (ορμόνες της κυκλοφορίας και το αυτόνομο νευρικό σύστημα) ρυθμίζουν την κατανομή της ποσότητας του αίματος στα διαφορετικά αγγεία. Αν και ο οφθαλμός διαθέτει πλούσια αυτόνομη εννεύρωση, νευρικές απολήξεις εκτείνονται μόνο μέχρι τον *αγγειώδη χιτώνα (uvea)* και το εξωφθαλμικό τμήμα των αιμοφόρων αγγείων, ενώ το εσωφθαλμικό τμήμα τους δεν φέρει αδρενεργική, χολινεργική ή πεπτιδεργική εννεύρωση<sup>(20, 38, 52, 94)</sup>. Εφόσον, λοιπόν, ο αμφιβληστροειδικός ιστός στερείται αγγειώδους εννεύρωσης, ο αρτηριακός τόνος ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τοπικούς παράγοντες.

Οι διαφορετικοί τύποι αμφιβληστροπαθειών οφείλονται σε ποικιλία αιτιών. Ως συνηθέστερο παρουσιάζεται η διαταραχή της ροής αίματος στον αμφιβληστροειδή, προερχόμενη από φραγή ή ρήξη κάποιων αγγείων. Η κατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη οξυγόνου (*hypoxia*) ή σε μείωση της ροής αίματος στους παρακείμενους ιστούς (*ischemia*). Τα σύνδρομα ισχαιμίας (συνήθως κληρονομικά), οι δυστροφίες και οι καταστάσεις εκφύλισης του αμφιβληστροειδούς είναι γνωστό ότι οδηγούν σε απώλεια κυττάρων εντός του ιστού. Οι μελέτες, συχνά, εστιάζουν στο νευρωνικό θάνατο στο εσωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς, κυρίως ανάλογα με το εκάστοτε μοντέλο. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται επειδή θεωρείται ότι μιμείται την αμφιβληστροειδοπάθεια βασιζόμενη σε γλαύκωμα. Παρ' όλα αυτά επέρχονται σημαντικές φθορές και στις τάξεις άλλων κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς<sup>(62)</sup>.

#### **1.4. ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ**

Ο αμφιβληστροειδής, όπως κάθε νευρικός ιστός, απαιτεί συνεχή παροχή οξυγόνου και γλυκόζης, ώστε να διατηρήσει την φυσιολογική λειτουργία και βιωσιμότητά του. Διακοπή αυτής της παροχής για λίγα μόνο λεπτά είναι ικανή να ενεργοποιήσει έναν «καταρράκτη» γεγονότων, ο οποίος τελικά επιφέρει νευρωνικό θάνατο. Μετά την πρώτη αναφορά, ότι κατά την ισχαιμία σε ιππόκαμπο αρουραίου αυξάνεται η εξωκυτταρική συγκέντρωση του γλουταμινικού και του ασπαρτικού οξέος<sup>(5)</sup>, ακολούθησε μια πλειάδα μελετών, οι οποίες επιβεβαιώνουν και αναλύουν αυτό το φαινόμενο σε διαφορετικές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Η υπόθεση διεγερσιτοξικότητας του γλουταμινικού για τη βλάβη ισχαιμικών κυττάρων αναφέρει ότι η φθορά επέρχεται από την απελευθέρωση γλουταμινικού, κατά τη διάρκεια και μετά την ισχαιμία, από το ενδοκυτταρικό τμήμα προς τη συναπτική σχισμή. Υψηλή εξωκυτταρική συγκέντρωση γλουταμινικού ενεργοποιεί τους ιονοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμινικού, επάγοντας αύξηση της ροής ιόντων καλίου προς τους νευρώνες, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί αρκετές καταβολικές διεργασίες και επιφέρει νευρωνικό θάνατο. Θα πρέπει, όμως, να σημειωθεί ότι μια ανάλυση των υπάρχοντων δεδομένων σχετικά με την τοξικότητα του γλουταμινικού *in vitro* σε σύγκριση με τα δεδομένα για την *in vivo* απελευθέρωση γλουταμινικού, καθώς και την προστατευτική δράση ανταγωνιστών του γλουταμινικού, εγείρει αμφιβολίες σχετικά με τους μηχανισμούς νευροτοξικότητας<sup>(21)</sup>.

Η έννοια της ισχαιμίας-επαγόμενης διεγερσιτοξικότητας εστιάζει κυρίως στην υπερβολική απελευθέρωση γλουταμινικού από τις νευρικές απολήξεις, αλλά έρχεται σε αντίφαση με ορισμένα σημαντικά ευρήματα:

*i.* Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας παρατηρείται μαζική απελευθέρωση γλουταμινικού παρόμοιας ποσότητας τόσο σε ευπαθείς όσο και σε μη ευπαθείς περιοχές του εγκεφάλου<sup>(27)</sup>

*ii.* Ανασταλτικοί διαβιβαστές απελευθερώνονται σε ανάλογη έκταση όσο και οι διεγερτικοί<sup>(60)</sup>

*iii.* Ο νευρωνικός θάνατος μπορεί να επέλθει αρκετές ώρες μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο, ενώ η συσσώρευση γλουταμινικού και ασπαρτικού στο νευρωνικό μικροπεριβάλλον ανατρέπεται εντός λίγων λεπτών από την επαναιμάτωση<sup>(35)</sup>

*iv.* Μεταϊσχαιμική χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων του γλουταμινικού εμφανίζει νευροπροστασία<sup>(87)</sup>.

Όλες οι διαδικασίες νευρωνικής λειτουργίας, όπως εξωκύτωση, φωσφορύλιωση πρωτεϊνών και διατήρηση του μεμβρανικού δυναμικού, απαιτούν ATP άμεσα ή έμμεσα. Επιπλέον, θεωρείται ότι ενίσχυση της διεγερσιτοξικότητας λόγω ελαττωματικού μεταβολισμού πιθανώς αποτελεί ένα γενικότερο μηχανισμό νευρωνικού θανάτου σε νευρολογικές ασθένειες<sup>(28)</sup>. Αναστολή των εξαρτώμενων

από ενέργεια διαδικασιών οδηγεί σε μη φυσιολογική λειτουργία των συναπτικών κυστιδίων διαβιβαστών και των μεμβρανικών μηχανισμών επαναπρόσληψης, συντελώντας σε αύξηση των κυτταροπλασματικών και εξωκυττάριων επιπέδων των νευροδιαβιβαστών. Η διατηρούμενη ενεργοποίηση των υποδοχέων διεγερτικών αμινοξέων συμβάλλει στην συρροή  $Ca^{2+}$ , η οποία σε συνδυασμό με την μείωση των επιπέδων ATP, προάγει την καταστροφή των μιτοχονδρίων, την μεταβολή του κυτταροσκελετού και την αποικοδόμηση του DNA <sup>(21)</sup>.

Ισχαιμική φθορά του αμφιβληστροειδούς αποτελεί ένα από τα βασικά αίτια απώλειας ή διαταραχής της όρασης. Κατά την ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς παρατηρείται εξωκυτταρική συσσώρευση γλουταμινικού. Εκτός από αυτό, όμως, υπάρχουν αναφορές που καταδεικνύουν την απελευθέρωση του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA, καθώς και γλυκίνης, ντοπαμίνης, ακετυλοχολίνης και του νευρορυθμιστή αδενοσίνη <sup>(62)</sup>. Κατά την επαναιμάτωση, τα αυξημένα εξωκυτταρικά επίπεδα των νευροδιαβιβαστών θα ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς τους και θα συμβάλλουν με εξειδικευμένο τρόπο στην επιβίωση ή το θάνατο συγκεκριμένων νευρώνων. Ειδικότερα, σε κυτταρικό επίπεδο, η αμφιβληστροειδική ισχαιμία έχει διαφορετική επίδραση στους επιμέρους κυτταρικούς τύπους.

### **1.4.1. Φωτούποδοχείς**

---

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, βρίσκονται αρκετές αντιφατικές μεταξύ τους μελέτες σχετικά με την ευαισθησία των φωτούποδοχέων σε ισχαιμικά επεισόδια του αμφιβληστροειδούς. Κλινικές μελέτες σε ασθενείς με *αμφιβληστροειδική αγγειίτιδα (retinal vasculitis)* προτείνουν ότι ήπια ισχαιμία προκαλεί οξεία εκπόλωση των φωτούποδοχέων, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο <sup>(74)</sup>. Ηπιότερες, όμως, καταστάσεις ισχαιμίας, όπως μετά από φραγή των καρωτιδικών αρτηριών σε αρουραίους, έχουν δείχθει να επιφέρουν περισσότερο άμεσα αποτελέσματα στο εξωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς <sup>(67)</sup>. Υπάρχουν, επίσης, δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι αρχική ισχαιμική φθορά που οδηγεί σε απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων, προκαλεί απώλεια της αντίδρασης της κόρης του οφθαλμού και το γεγονός αυτό είναι υπεύθυνο για την εκφύλιση των φωτούποδοχέων· μια φυσιολογική επίπτωση των αυξημένων επιπέδων φωτός που εισέρχονται στον οφθαλμό <sup>(16, 83)</sup>. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι φωτούποδοχείς εμφανίζονται λιγότερο ευαίσθητοι στην ισχαιμία.

### **1.4.2. Γαγγλιακά κύτταρα**

---

Η ισχαιμία είναι ευρέως μελετημένη στον αμφιβληστροειδή, λόγω του ρόλου της σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, όπως γλαύκωμα, *anterior ischemic optic neuropathy (AION)*, φραγές των αμφιβληστροειδικών και χοριοειδικών αγγείων, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, *οπισθοφακική ινοπλασία (retinopathy of prematurity)* και *τραυματική οπτική νευροπάθεια (traumatic optic*

*neuropathy*). Όλες αυτές οι καταστάσεις, έχει δειχθεί ότι επιφέρουν λέπτυνση της στοιβάδας των νευρικών ινών σαν συνέπεια της απώλειας ή βλάβης των γαγγλιακών κυττάρων <sup>(68)</sup>. Σε πειραματικές μελέτες, όλες οι δοκιμασίες και μοντέλα που στηρίζονται σε αμφιβληστροειδική ισχαιμία καταλήγουν σε απώλεια γαγγλιακών κυττάρων. Μία μέθοδος για τον προσδιορισμό της απώλειας γαγγλιακών κυττάρων είναι η μέτρηση των επιπέδων mRNAs στον αμφιβληστροειδή, όπως της Thy-1, που είναι ειδικά για τα γαγγλιακά κύτταρα.

### **1.4.3. Αμακρινικά κύτταρα**

Τα αμακρινικά κύτταρα αποτελούν μία ακόμα ομάδα κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, ευπαθή στην ισχαιμία και τη διεγερσιτοξικότητα του γλουταμινικού. Καθώς τα αμακρινικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται, γίνονται σταδιακά περισσότερο ευαίσθητα στο γλουταμινικό ή από γλουταμινικό επαγόμενη ισχαιμία. Αγωνιστές των ιονοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού επάγουν μεταβολές στα αμακρινικά κύτταρα που περιέχουν GABA, σεροτονίνη ή ακετυλοχολίνη <sup>(62)</sup>. Παρόμοιες μεταβολές συμβαίνουν κατά τις περιπτώσεις ισχαιμίας / επαναιμάτωσης. Γενικότερα υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι μεταβολές που επέρχονται στους νευροδιαβιβαστές και συνδέονται με τα αμακρινικά κύτταρα μετά από τοξικότητα μέσω αγωνιστών του γλουταμινικού ή ισχαιμία, αποτελούν την αρχή προς τον κυτταρικό θάνατο <sup>(93)</sup>. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στον επαγόμενο από ισχαιμία θάνατο των αμακρινικών κυττάρων θεωρούνται ότι είναι παρόμοιοι με αυτούς που εμπλέκονται στον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων. Έχει, επίσης, δειχθεί ότι κατά την ισχαιμία σε αμακρινικά κύτταρα, επάγεται ενεργοποίηση των κασπασών 2 και 3, υποδηλώνοντας μια αποπτωτική (και όχι μόνο νεκρωτική) μορφή κυτταρικού θανάτου, παρόμοια με τα γαγγλιακά κύτταρα <sup>(82)</sup>. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι έχει παρατηρηθεί διαφορική επίδραση και ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης σε υπότυπους αμακρινικών κυττάρων που υπόκεινται σε ισχαιμία, γεγονός το οποίο οφείλεται πιθανώς στην διαφορετική σύσταση υποδοχέων<sup>(17)</sup>.

### **1.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ**

Τόσο η εξέλιξη όσο και η διατήρηση ενός οργανισμού προϋποθέτει όχι μόνο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την ελεγχόμενη επαγωγή και εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου. Η *απόπτωση* χρησιμοποιείται συχνά ως συνώνυμο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (*programmed cell death – PCD*). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όμως, αναφέρεται σε θάνατο σε μια συγκεκριμένη, γενετικά καθορισμένη περίοδο στον κύκλο ζωής ενός κυττάρου, ενώ η απόπτωση μπορεί να επαχθεί από ένα σύνολο εξωγενών ή ενδογενών ερεθισμάτων τυχαία κατά τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού. Και τα δύο αυτά

φαινόμενα, συχνά αλλά όχι πάντα, εξαρτώνται από την γονιδιακή έκφραση και υπηρετούν ένα σύνολο από εξειδικευμένες διεργασίες, ώστε να διατηρούν την ομοιόσταση ενός ιστού και να συμβάλλουν στην αναδιοργάνωσή του.

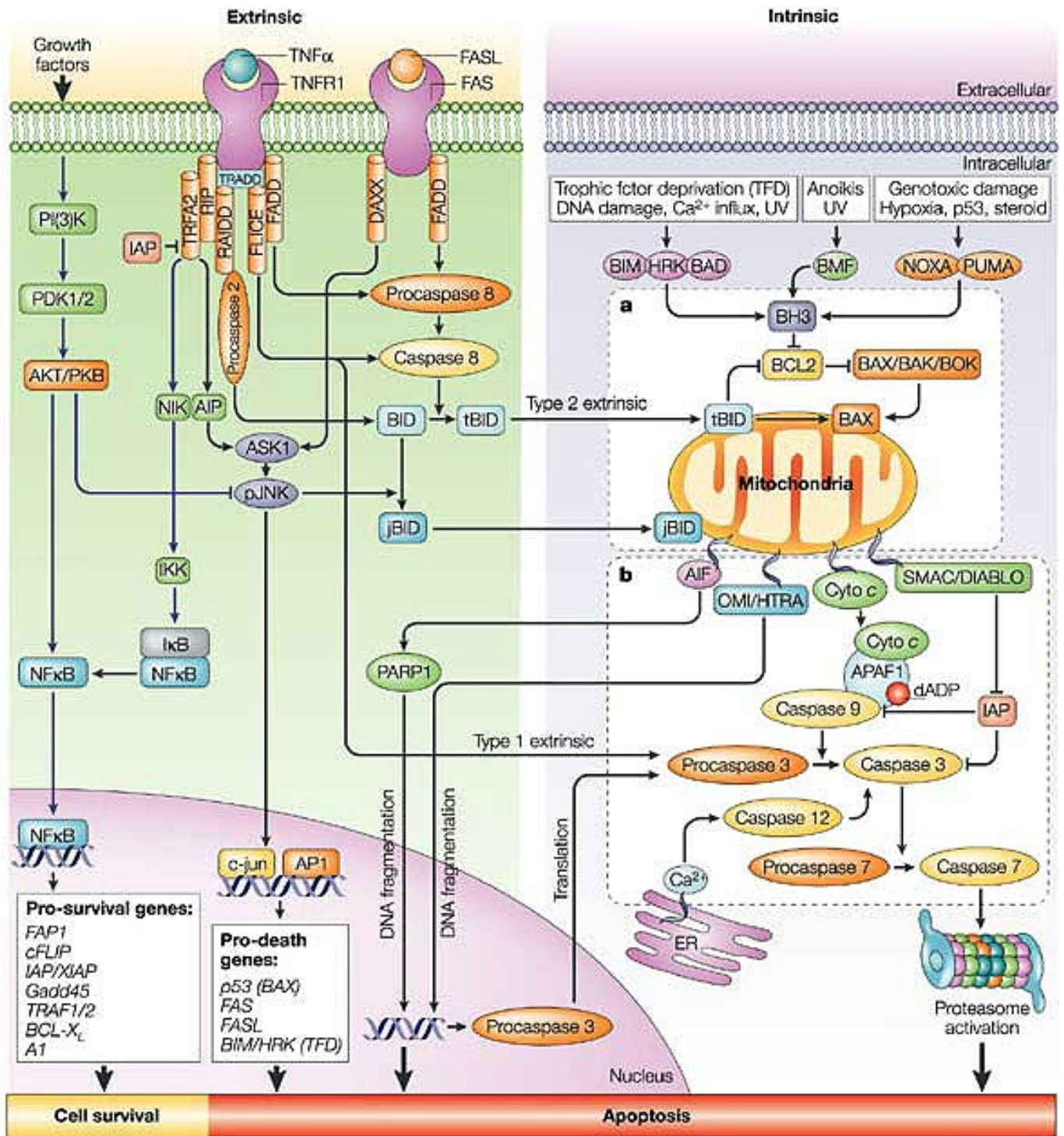
Η απόπτωση είναι δομικά και λειτουργικά διακριτή από τη *νέκρωση*. Ενώ η απόπτωση αναπαριστά ένα αυστηρά ελεγχόμενο και περίπλοκο σύστημα από δραστικά μονοπάτια που συγκλίνουν σε ένα κοινό πρόγραμμα θανάτου μεμονωμένων κυττάρων, η νέκρωση αναφέρεται σε μία μορφή τυχαίου κυτταρικού θανάτου που περιλαμβάνει τη φθορά μεγαλύτερων ομάδων κυττάρων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τη δημιουργία φυσαλίδων στη μεμβράνη και την αποσύνθεση των κυττάρων σε αποπτωτικά σωμάτια, τα οποία εγκολπώνονται από φαγοκύτταρα. Σημαντικές αλλαγές στη φυσιολογία περιλαμβάνουν διάσπαση του DNA των νουκλεοσωμάτων και έκθεση της φωσφατυδιλ-σερίνης στο εξωτερικό των κυτταρικών μεμβρανών. Στην κλασική θεώρηση του αποπτωτικού μονοπατιού, ρόλο βασικού τελεστή διαδραμάτιζαν οι ενδοπεπτιδάσες που κόβουν πρωτεΐνες σε κατάλοιπα ασπαρτικού (κασπάσες) και διασπούν ποικίλα ενδοκυτταρικά υποστρώματα <sup>(89)</sup>. Πρόσφατες μελέτες, όμως, καταλήγουν σε αρκετά ανεξάρτητα από κασπάσες αποπτωτικά μονοπάτια, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν επίσης κυτταρικά τμήματα, όπως μιτοχόνδρια, λυοσώματα, πρωτεασώματα ή αυτοφαγικά κενοτόπια. Οι παρατηρήσεις αυτές έθεσαν αμφισβήτηση ακόμα και για τον κλασικό διαχωρισμό των εννοιών της απόπτωσης και της νέκρωσης, δεδομένου ότι και στις δύο διαδικασίες μπορούν να λάβουν μέρος λυοσωμικές και κυτταρικές πρωτεάσες όπως κασπάσες <sup>(85)</sup>.

Η εκτενής ανάλυση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών που οδηγούν σε απόπτωση δεν ανταποκρίνεται άμεσα στο σκοπό της παρούσας μελέτης. Μια σύνοψη των σημαντικότερων διαδικασιών και μορίων που εμπλέκονται στα διαφορετικά αποπτωτικά μονοπάτια παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.5α**. Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στις δύο από τις σημαντικότερες κινάσες που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της κυτταρικής επιβίωσης και είναι η κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης 3 (Phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) και η πρωτεϊνική κινάση B (Protein Kinase B, PKB) ή κινάση Akt, οι οποίες αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία. Οι δύο αυτές κινάσες σερίνης / θρεονίνης είναι άμεσα αλληλοσυνδεδεμένες λειτουργικά αφού η PI3K αποτελεί τον ενεργοποιητή της PKB μέσω ενός καταρράκτη διαδοχικών φωσφορυλιώσεων. Επίσης είναι καλά τεκμηριωμένο πως η διαδοχή της φωσφορυλίωσης κι ενεργοποίησης των κινασών αυτών, είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης κυτταροπλασματικών υποδοχέων που προσδένουν αυξητικούς παράγοντες, ευνοώντας την κυτταρική επιβίωση. Μια άλλη κατηγορία εκ των σημαντικότερων κινασών που ρυθμίζουν βασικά κυτταρικά φαινόμενα όπως η επιβίωση, η διαφοροποίηση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι η κατηγορία των κινασών θρεονίνης / σερίνης με καλύτερα χαρακτηρισμένα μόρια τις κινάσες ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases 1/2 ή p42/44, κινάση που ρυθμίζεται από τον εξωκυττάριο χώρο) και MEK1/2 (Mitogen-activated protein Kinase Kinase, κινάση που ενεργοποιεί την μιτωτικά επαγόμενη κινάση), και οι οποίες ανήκουν



στην οικογένεια των MAPKs (Mitogen-Associated Protein Kinases, μιτωγονο-επαγόμενες πρωτεϊνικές κινάσες). Η διαδοχική φωσφορυλίωση της MEK από προηγούμενες κινάσες (και κυριότερα από το μονοπάτι Src-Raf-1) κι ακολούθως της ERK από την MEK, οδηγεί στην ενεργοποίηση των μορίων και τελικώς στην μεταγραφική ενεργοποίηση επιβιωτικών γονιδίων μέσω των κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων, υποστρωμάτων των ανωτέρω κινασών. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των mRNAs των PI3K και ERK από τα γοναδικά στεροειδή σε διάφορα κυτταρικά συστήματα, οδηγεί στην φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl<sup>(48)</sup>. Επίσης έχει περιγραφεί η άμεση επίδραση κινασών όπως η Akt στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης<sup>(24, 69)</sup>. Όσον αφορά στο μοριακό μηχανισμό της αντι-αποπτωτικής δράσης των νευροστεροειδών φαίνεται να επιτελείται κύρια μέσω των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL και της ενεργοποίησης δυο κύριων μεταγραφικών παραγόντων επιβίωσης, των NF-κΒ και CREB<sup>(11)</sup>.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η δράση της υπεργλυκαιμίας στον κυτταρικό θάνατο δεν μεσολαβείται από κασπάσες. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα γλυκόζης σε ένα *in vitro* μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί πρωταρχικό παθολογικό παράγοντα εξέλιξης της νόσου, οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο σε νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Ο παρατηρούμενος θάνατος είναι ανεξάρτητος από την ενεργοποίηση των κασπασών και πιθανώς μεσολαβείται από ενδονουκλεάσες όπως η AIF (*apoptosis – inducing factor*)<sup>(78)</sup>. Αντίθετα, εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς επαγόμενη από ακτινοβολία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο που μεσολαβείται από μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι κασπάσες 1, 3 και 7<sup>(73)</sup>. Από την άλλη πλευρά, η υπογλυκαιμία, που όπως αναφέρεται παρακάτω επάγεται στο μοντέλο χημικής ισχαιμίας της παρούσας μελέτης, θεωρείται ότι επιφέρει γενικευμένης μορφής κυτταρικό θάνατο. Ο δεύτερος παράγοντας του μοντέλου της χημικής ισχαιμίας, η υποξία, τείνει να επιφέρει πιο εξειδικευμένη βλάβη, διαταράσσοντας την πρόσληψη γλουταμινικού και πλήττοντας, στον αμφιβληστροειδή, κυρίως τον αριθμό και τη μορφολογία των γαγγλιακών κυττάρων<sup>(54)</sup>.



Nature Reviews | Neuroscience

**Εικόνα 1.5α:** Εξωγενή και ενδογενή σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης σε νευρώνες <sup>(4)</sup>. Οι μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν μονοπάτια απόπτωσης, ενώ οι μπλε γραμμές μονοπάτια επιβίωσης. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται από τα εξωκυτταρικά συνδεόμενα μόρια, TNFα (tumour necrosis factor-α) ή FAS (apoptosis antigen-1) ligand (FASL), στους αντίστοιχους υποδοχείς, TNFR1 και FAS. Η ενεργοποίηση του TNFR1 οδηγεί

στον σχηματισμό του TRADD-RIP-TRAF2 συμπλόκου (TNF-receptor death domain–receptor interacting protein–TNF-associated factor 2), που δρα μέσω του NF-κB (nuclear factor-κB) μονοπατιού επιβίωσης ή μέσω του JNK (c-Jun-N-terminal kinase) μονοπατιού απόπτωσης. Η RIP ενεργοποιεί την προκασπάση 2 και «κόβει» την BID(BH3 (BCL2 (B-cell leukaemia/lymphoma-2) homology domain 3)-interacting agonist). Το σύμπλοκο TRADD–FADD–FLICE (TNF-receptor death domain–FAS-associated death domain–FADD-like interleukin-1β) ενεργοποιεί την προκασπάση 8, εκκινώντας την απόπτωση μέσω της κασπάσης 3 ή την «κοπή» της BID σε tBID (truncated BID). Ο θάνατος μέσω της FAS συμβαίνει μέσω της FADD-μεσολαβούμενης ενεργοποίησης της προκασπάσης 8 ή μέσω της DAXX (death-associated protein)-μεσολαβούμενης ενεργοποίησης της JNK. Η JNK μετατρέπει την BID σε jBID, επιτρέποντας την μετατόπισή της προς τα μιτοχόνδρια και την απελευθέρωση του SMAC/DIABLO (second-mitochondrial-derived activator of caspases). Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι εκκινείται από τα μιτοχόνδρια από ποικίλα ερεθίσματα. **a** | Η διαπερατότητα της μεμβράνης μεσολαβείται από της BH3-only πρωτεΐνες, οι οποίες διαχωρίζουν και αναστέλλουν την καταστολή της BAX (B-cell lymphoma 2-associated protein X) από την BCL2, επιτρέποντας την μετατόπιση της μιτοχονδριακής BAX και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cyto c), του SMAC/DIABLO, AIF (apoptosis-inducing factor) και του HTRA2/OMI (high temperature requirement serine protease 2). **b** | το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με το APAF1 (apoptosis protease activating factor-1) για την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, σχηματίζοντας το apoptosome, το οποίο ενεργοποιεί τους downstream τελεστές, κασπάσες 3 και 7. Το SMAC/DIABLO απομονώνει και αναστέλλει τις IAP (inhibitor of apoptosis) πρωτεΐνες. Ο AIF προκαλεί την αποσύνθεση του DNA μέσω του PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1). ER (endoplasmic reticulum)-stress μεσολαβούμενη απόπτωση συμβαίνει μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών 12 και 3.

AIP1, ASK1-interacting protein 1  
 AKT/PKB, protein kinase B  
 AP1, activator protein-1  
 ASK1, apoptosis-signal-regulating kinase-1  
 BAD, BCL2-associated death protein  
 BAK, BCL2 agonist killer 1  
 BIM, BCL2-interacting mediator of cell death  
 BMF, BCL2 modifying factor  
 BOK, BCL2-related ovarian killer protein  
 HRK, 5/harakiri  
 IκB, inhibitory subunit of NF-κB  
 IKK, IκB kinase  
 NIK, NF-κB-inducing kinase

NOXA, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein (PMAIP1)  
 PDK1/2, 3-phospho-inoside dependent kinase 1/2  
 PI3K, phosphatidyl inositol-3-kinase  
 pJNK, c-Jun amino (N) terminal kinase  
 p53, tumour suppressor gene  
 PUMA, P53-upregulated modulator of apoptosis  
 RAIDD, RIP-associated ICH-1 homologous protein with a death domain  
 UV, ultraviolet light  
 XIAP, X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein.

### 1.6. ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Η ιδέα ότι υπάρχουν στεροειδή που συντίθενται στον εγκέφαλο *de novo* ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980 από παρατηρήσεις των Baulieu και συνεργατών του. Ανακάλυψαν ότι στεροειδή όπως η προγνενολόνη (*pregnenolone*), η DHEA και ο σουλφιδικός εστέρας της και λιπιδικόι εστέρες (*lipoidal esters*) εμφανίζονταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε ιστούς του νευρικού συστήματος παρά στο πλάσμα του αίματος. Επιπλέον, τα στεροειδή παρέμεναν στο νευρικό σύστημα ακόμα και μετά από γοναδεκτομή ή επινεφριδεκτομή. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι τα στεροειδή είτε συντίθενται *de novo* στο κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα είτε ότι πιθανώς συγκεντρώνονται στις δομές αυτές. Αυτά τα στεροειδή ονομάστηκαν *νευροστεροειδή* για να διαχωριστούν από τα στεροειδή που παράγονται από περισσότερο κλασικά στεροειδογενικά όργανα, όπως γονάδες, επινεφρίδια και πλακούντας. Με σκοπό να διαπιστωθεί αν πράγματι τα νευροστεροειδή συντίθενται από τον εγκέφαλο, ελέγχθηκε η παρουσία στο νευρικό σύστημα ενός συνόλου ενζύμων, τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην στεροειδογένεση σε άλλα όργανα <sup>(15)</sup>.

Ο όρος *νευροενεργά στεροειδή* (*neuroactive steroids*) αναφέρεται σε στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες δρουν σε νευρικό ιστό. Τα νευροενεργά στεροειδή έχουν την δυνατότητα να συντίθενται τόσο στο νευρικό σύστημα όσο και σε ενδοκρινείς αδένες <sup>(70)</sup>. Τα νευροστεροειδή, περιλαμβανομένων των *πρεγνενολόνη* (*pregnenolone* - PREG), *δεϋδροεπιανδροστερόνη* (*dehydroepiandrosterone* - DHEA), *προγεστερόνη* (*progesterone* - PROG) και τα παράγωγά τους, συντίθενται παρουσία στεροειδογενικών ενζύμων. Το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση των νευροστεροειδών είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε PREG. Η PREG μπορεί να μετατραπεί σε DHEA μέσω του κυτοχρώματος P450c17. Τόσο η PREG όσο και η DHEA είναι 3β-υδροξυ-Δ5-στεροειδή τα οποία βρίσκονται σε νευρικούς ιστούς μαζί με τους σουλφιδικούς εστέρες τους. Επιπλέον, η DHEA μπορεί να μετατραπεί σε ανδρογόνα με κατάλυση από τα ανάλογα ένζυμα <sup>(92)</sup>.

Τα νευροστεροειδή δρουν στο νευρικό σύστημα επιτελώντας αυτοκρινή ή παρακρινή ρύθμιση. Μπορούν να ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση με το να προσδένονται σε πυρηνικούς υποδοχείς ή να επηρεάζουν τη νευροδιαβίβαση μέσω δράσης σε μεμβρανικά κανάλια ιόντων ή άλλους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών. Η PROG, που παράγεται από κύτταρα Schwann σε απόκριση της διέγερσής τους από παρακείμενους νευρώνες, ρυθμίζει την σύνθεση της μυελίνης μέσω ενός πυρηνικού υποδοχέα της PROG. Μεταβολίτες της PROG (3α,5α/β-TH PROG, *allorpregnanolone*) αποτελούν θετικό αλλοστερικό ρυθμιστή των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων. Ενεργοποίηση των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων αυξάνει τη διάρκεια και τη συχνότητα του ανοίγματος των διαύλων καλίου, που οδηγεί σε εισροή ιόντων καλίου στο εσωτερικό των νευρώνων και συνεπώς την υπερπόλωση των μεμβρανών και την μείωση της ευαισθησίας των νευρώνων. Επιπλέον, η 3α,5α-TH PROG επιδρά στην νευρωνική ανάπτυξη, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση, επιφέρει την απόσυρση νευριτικών απολήξεων προτού αναπτύξουν συνδέσεις με

άλλους νευρώνες ή γλοία και προστατεύει σε συγκεκριμένες περιπτώσεις από τον νευρωνικό θάνατο. Οι σουλφιδικοί εστέρες των DHEA (DHEAS) και PREG (PREGS) εμφανίζουν ιδιότητες ανταγωνιστών των GABA <sup>(92)</sup>.

Τα νευροστεροειδή PREGS και DHEA, αλλά όχι το DHEAS, ενδυναμώνουν τη δράση του NMDA στην αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού καλίου, μηχανισμός ο οποίος μπορεί να ευθύνεται για την ανάπτυξη των νευραξόνων που επάγεται από DHEA. Η ρύθμιση της γλουταμινεργικής νευροδιαβίβασης μέσω NMDA από επιλεκτικούς προσδέτες των υποδοχέων σίγμα-1 παίζει σημαντικό ρόλο σε φαινόμενα νευροπροσαρμογής όπως μακροχρόνια ενδυνάμωση (long-term potentiation), μάθηση και μνήμη, οξύ νευρωνικό θάνατο και νευροεκφύλιση <sup>(59)</sup>.

### **1.6.1 Νευροστεροειδή στον αμφιβληστροειδή**

Η πλειοψηφία των συνάψεων του αμφιβληστροειδούς χρησιμοποιούν γλουταμινικό για μεταγωγή σήματος διαμέσου των στοιβάδων, GABA και γλυκίνη για την ακόλουθη αναστολή, ενώ ακετυλοχολίνη και ντοπαμίνη στα αμακρινικά κύτταρα και διάφορα νευροπεπίδια συνεργάζονται περαιτέρω στον έλεγχο του οπτικού μονοπατιού. Όπως και ο εγκέφαλος, ο αμφιβληστροειδής αποτελεί στόχο στεροειδών και κέντρο παραγωγής τους. Τα πρώτα δεδομένα που πρότειναν την ενδοκρινή επίδραση στη διαδικασία της όρασης, αφορούσαν στην δεκτικότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς προς την φθορά από φως ως επακόλουθο της σεξουαλικής ωρίμανσης τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά ζώα <sup>(61)</sup>. Μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη υποδοχέων στεροειδών ορμονών, στεροειδικών ενζύμων για το σχηματισμό *ex novo* στεροειδών ή νευροστεροειδών<sup>(32)</sup>, καθώς και την ανάμιξή τους στη φυσιολογία και την παθολογία της οπτικής λειτουργίας.

Στον αμφιβληστροειδή, η μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης συντίθεται στο νευρικό τμήμα και μεταφέρεται στις μεμβράνες των ραβδίων των φωτοϋποδοχέων, όπου είναι απαραίτητη για τη συνεχή ανανέωση κατά τη διάρκεια της ζωής. Η διαδικασία ανανέωσης περιλαμβάνει και το RPE, όπου η χοληστερόλη παρέχεται επιπλέον από μια εξωκυτταρική πηγή μέσω LDL υποδοχέων και της τοπικής σύνθεσης απολιποπρωτεΐνης E (*ApoE*). Η ApoE σχηματίζεται επίσης στα γαγγλιακά κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδούς, απορροφάται από τα γαγγλιακά κύτταρα, από όπου μπορεί να μεταφερθεί ταχέως στο οπτικό νεύρο και τον εγκέφαλο. Πρόσφατες παρατηρήσεις αναφέρουν ότι υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στο RPE επιφέρουν μεταβολές στην έκφραση της ApoE, γεγονός που σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης AMD (*age-related macular degeneration*) <sup>(31)</sup>.

Η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη φαίνεται να συμβαίνει στα γαγγλιακά κύτταρα και στην στοιβάδα INL των αμακρινικών κυττάρων, όπου εντοπίζεται το cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc). Η ενεργοποίηση της σύνθεσης της πρεγνενολόνης στον αμφιβληστροειδή πραγματοποιείται από GABA<sub>A</sub> υποδοχείς, οι οποίοι εντοπίζονται σε γαγγλιακά και αμακρινικά κύτταρα, όπου ασκούν έλεγχο για αποτέλεσμα των οπτικών

ερεθισμάτων σε περιοχές του εγκεφάλου. Η παραπάνω σύνθεση ρυθμίζεται επίσης από cAMP και υποδοχείς περιφερειακού τύπου βενζοδιαζεπίνης (peripheral-type benzodiazepine), τα οποία προωθούν τη μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια όπου πραγματοποιείται η σύνθεση. Έχουν αναγνωριστεί αρκετοί διαφορετικοί τύποι γαγγλιακών και αμακρινικών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, συνεπώς, είναι πιθανό ότι διακριτοί κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν το κυτόχρωμα P450scs αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς <sup>(31)</sup>.

### ***1.6.2 Νευροστεροειδή ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες***

---

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, ένας σημαντικός αριθμός δεδομένων στηρίζουν τις ενδεχόμενες νευροπροστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών, όπως DHEA, DHEAS, προγεστερόνη, τεστοστερόνη και οιστραδιόλη. Έχει δειχθεί ότι τα νευροστεροειδή πιθανώς αποτρέπουν τον νευρωνικό κυτταρικό θάνατο που πυροδοτείται από διαφορετικά ερεθίσματα, περιλαμβανομένης και της διεγερσιτοξικότητας, καθώς και ότι μεταβολές στο στεροειδικό περιβάλλον επηρεάζουν τη νευρωνική τύχη σε πολλές νευρολογικές και διανοητικές διαταραχές. Στον **Πίνακα 1.6.2a** συνοψίζονται οι παρατηρήσεις που έχουν γίνει σχετικά με τις νευροπροστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών <sup>(92)</sup>.

Η συνεισφορά των νευροστεροειδών στην επιβίωση των νευρώνων τελείται με διάφορους τρόπους. Μειωμένα επίπεδα DHEA κατά την πορεία της γήρανσης καθιστά τους νευρώνες περισσότερο επιρρεπείς σε φθορά. Στο περιφερειακό νευρικό σύστημα, η τοπική σύνθεση προγεστερόνης προάγει τον σχηματισμό της μυελίνης κατά τις διαδικασίες αναγέννησης σε τραυματισμένους περιφερειακούς νευρώνες <sup>(80)</sup>. Η προγεστερόνη και τα οιστρογόνα επηρεάζουν την έκβαση της ισχαιμίας και της τραυματικής βλάβης στον εγκέφαλο και περιορίζουν τις επιπτώσεις τους. Η τεστοστερόνη ως παράγοντας επιβίωσης σε κινητικούς νευρώνες μετά από κοπή των νευραξόνων τους, προάγει την αναγέννηση, ενώ τα οιστρογόνα αναστέλλουν ή καθυστερούν την εμφάνιση της ασθένειας Alzheimer και τη διανοητική υστέρηση <sup>(91)</sup>.

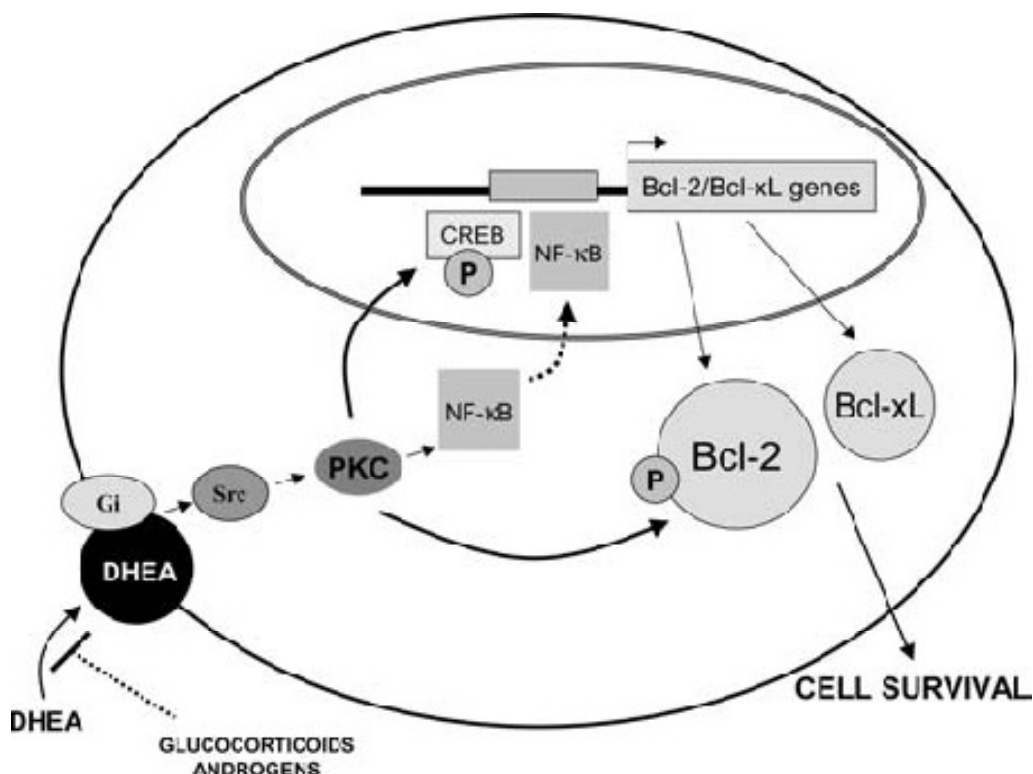
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Neurosteroid	Neuroprotective properties
DHEA	– protection of mouse striatal DA neurons against MPTP – protection of rat hippocampal hilar neurons against KA-induced death
7- $\alpha$ -hydroxy-DHEA	– antiglucocorticoid-mediated neuroprotection*
7- $\beta$ -hydroxy-DHEA	– antiglucocorticoid-mediated neuroprotection*
DHEAS	– protection of hippocampal neurons against glutamate-induced neurotoxicity* – partial neuroprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium-, colchicine-, glutamate- and NMDA-induced neurotoxicity* – protection of rat cultured cerebellar granule cells against oxygen and glucose deprivation* – neuroprotection in an animal model of reversible spinal cord ischemia (in rabbits)
7- $\alpha$ -hydroxy-EPIA	– protection against hypoxia-induced neuronal damage*
7- $\beta$ -hydroxy-EPIA	– protection against hypoxia-induced neuronal damage* – neuroprotection in rat model of global forebrain ischemia – neuroprotection in rat model of focal cerebral ischemia
PROG	– prevention of striatal depletion in C57B/6 mice evoked by MPTP – protection of rat hippocampal hilar neurons against KA-induced death – neuroprotection against glutamate-induced neurotoxicity* – neuroprotection in Wobbler mouse mutants presenting severe motoneuron degeneration and astrogliosis of the spinal cord – neuroprotection after experimental central and peripheral nervous system injury in rats
19-norprogesterone	– neuroprotection against glutamate-induced neurotoxicity*
allopregnanolone	– neuroprotection in NP-C mouse

### **Πίνακας 1.6.2α:** *Νευροπροστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών* <sup>(92)</sup>.

Παρόμοια δεδομένα παρατηρούνται σταδιακά για διάφορες μορφές πρωτογενούς ή δευτερογενούς εκφύλισης του αμφιβληστροειδούς. Τα οιστρογόνα θεωρούνται ότι συμμετέχουν σε οφθαλμικές ασθένειες που σχετίζονται με το φύλο και την ηλικία και αποτρέπουν την φθορά από ισχαιμία / επαναιμάτωση. Πρόσφατα δεδομένα παρέχουν στοιχεία για την ικανότητα των DHEA, DHEAS, προγεστερόνης, 17 $\beta$ -οιστραδιόλης και 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S (*pregnanolone sulphate*) να προστατεύουν τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς από διεγερσιοξικότητα. Ο κυτταρικός θάνατος σε αμφιβληστροειδή που εκτίθεται σε NMDA σε τοξική συγκέντρωση, μειώνεται από την χορήγηση προγεστερόνης και DHEA/DHEAS, ενώ αναστέλλεται πλήρως από 17 $\beta$ -οιστραδιόλης και 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S <sup>(31)</sup>. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη νευροπροστασία παραμένουν προς διευκρίνηση. Όλα αυτά τα νευροστεροειδή είναι γνωστό ότι κατέχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αν και η διαφορετική αποτελεσματικότητά τους αποτελεί πιθανώς ένδειξη για την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών. Εξαιρώντας το νευροστεροειδές 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S, το οποίο δρα σαν ανταγωνιστής των υποδοχέων του NMDA, τα παραπάνω νευροστεροειδή είναι γνωστό ότι δρουν μειώνοντας την ενεργότητα των υποδοχέων του γλουταμινικού, περιορίζοντας την ανοσολογική φλεγμονή, παρέχοντας νευροτροφικούς

παράγοντες, ενισχύοντας την συναπτογένεση και τη δενδριτική ανάπτυξη, μέσω τόσο γενωμικών όσο και μη γενωμικών οδών <sup>(91)</sup>. Η αντιγλυκοκορτικοειδική δράση, καθώς και η μετατροπή των DHEA/DHEAS σε οιστρογόνα και ανδρογόνα αποτελούν δυνητικές εναλλακτικές μεθόδους νευροπροστασίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, η πλήρης προστασία έναντι του κυτταρικού θανάτου στον αμφιβληστροειδή που παρατηρείται από χορήγηση 17β-οιστραδιόλης αλλά όχι από αναστολείς των κασπασών <sup>(31)</sup>. Ένα γενικό υποθετικό μοντέλο δράσης των νευροστεροειδών σε συνάρτηση με την νευροπροστασία φαίνεται στην **Εικόνα 1.6α**.



**Εικόνα 1.6α:** Υποθετικός μηχανισμός της νευροπροστατευτικής δράσης των νευροστεροειδών. Η DHEA προστατεύει από απόπτωση τα κύτταρα που προέρχονται από την *neural crest*, ελέγχοντας την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, τόσο σε μεταφραστικό όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Προσδένονται σε θέσεις δέσμευσης σχετιζόμενες με G πρωτεΐνες, ενεργοποιώντας downstream τις Src-PKC κινάσες, οι οποίες εν συνεχεία ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες CREB και NF-κB, διεγείροντας την έκφραση των αντιαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών. Τα γλυκοκορτικοειδή και τα ανδρογόνα δρουν ως ενδογενείς ανταγωνιστές της δράσης της DHEA, μέσω συναγωνισμού για τις μεμβρανικές θέσεις δέσμευσης σχετιζόμενες με G πρωτεΐνες <sup>(8)</sup>.



### **1.7. ΣΚΟΠΟΣ**

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έγινε μια προσπάθεια κατανόησης της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής δράσης των νευροστεροειδών, υπόθεση η οποία επαληθεύεται από έναν συνεχώς αυξανόμενο όγκο δεδομένων. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση της επίδρασης στον νευρωνικό θάνατο του ευρέως γνωστού νευροστεροειδούς DHEA, καθώς και δύο νέων συνθετικών νευροστεροειδών (BNN50 και BNN124).

Το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή που χρησιμοποιήθηκε αποτέλεσε κατάλληλο εργαλείο, καθώς η διαστρωματοποιημένη κατανομή των διαφορετικών κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς επέτρεψε σε μεγάλο βαθμό την περαιτέρω ανάλυση του νευροπροστατευτικού ρόλου σε επιμέρους κυτταρικούς τύπους, ώστε να ελεγχθεί σε συνάρτηση με τα χαρακτηριστικά του κάθε τύπου. Ένας δεύτερος στόχος της μελέτης υπήρξε και η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των νευροστεροειδών έναντι του νευρωνικού θανάτου. Η απόπτωση / νέκρωση και γενικότερα ο κυτταρικός θάνατος αποτελούν φαινόμενα εκτενώς μελετημένα, ενώ παράλληλα η ισχαιμία (ή η επαγωγή της σε πειραματικό επίπεδο) παρατηρείται συχνά σε μεγάλο φάσμα νευροεκφυλιστικών παθολογιών. Συνεπώς, καθίσταται εφικτή η γενίκευση των συμπερασμάτων της παρούσας μελέτης, ώστε να χρησιμοποιηθούν για μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Στη μελέτη αυτή, ως πειραματόζωο χρησιμοποιήθηκε ο αρουραίος (*Rattus rattus*). Ελέγχθηκε η νευροπροστατευτική δράση νευροστεροειδών, μέσω της παρατήρησης συγκεκριμένων δεικτών-μαρτύρων σε ένα μοντέλο χημικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή. Για κάθε υπό μελέτη νευροστεροειδές χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$ ). Οι *ex vivo* χειρισμοί κατά την πειραματική διαδικασία, περιλάμβαναν την απομόνωση των οφθαλμών μετά από θανάτωση των πειραματόζωων και αφαίρεση του πρόσθιου τμήματος, το οποίο περιλάμβανε τον κερατοειδή χιτώνα και τον φακό. Το εναπομένον οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού (*eye cup*), το οποίο αποτελείται από τον σκληρό, τον αμφιβληστροειδή και τον χοριοειδή χιτώνα, υπόκειται στο πρωτόκολλο χημικής ισχαιμίας. Σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν 3 πειραματόζωα (3 πειραματικά ζώα για κάθε μάρτυρα για κάθε συγκέντρωση κάθε νευροστεροειδούς και ανάλογα ζώα ελέγχου).

Μετά το πέρας της ισχαιμίας, οι ιστοί μονιμοποιούνται, κρυοπροστατεύονται και κόβονται σε τομές με χρήση κρυοτόμου. Τέλος, ακολουθεί ανοσοϊστοχημική αντίδραση για τους επιλεγμένους δείκτες και παρατήρηση των τομών.

### 2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες θηλυκοί Sprague – Dawley αρουραίοι, βάρους 250 – 300gr. Στα ζώα τηρείται ένας κύκλος 12 ωρών ημέρας – νύχτας και διατηρούνται σε κλουβιά ανά 2 – 3 με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Όλες οι διαδικασίες που περιελάμβαναν ζώα ήταν ακόλουθες με την εθνική Ελληνική νομοθεσία (Animal Act, P.D. 160/91).

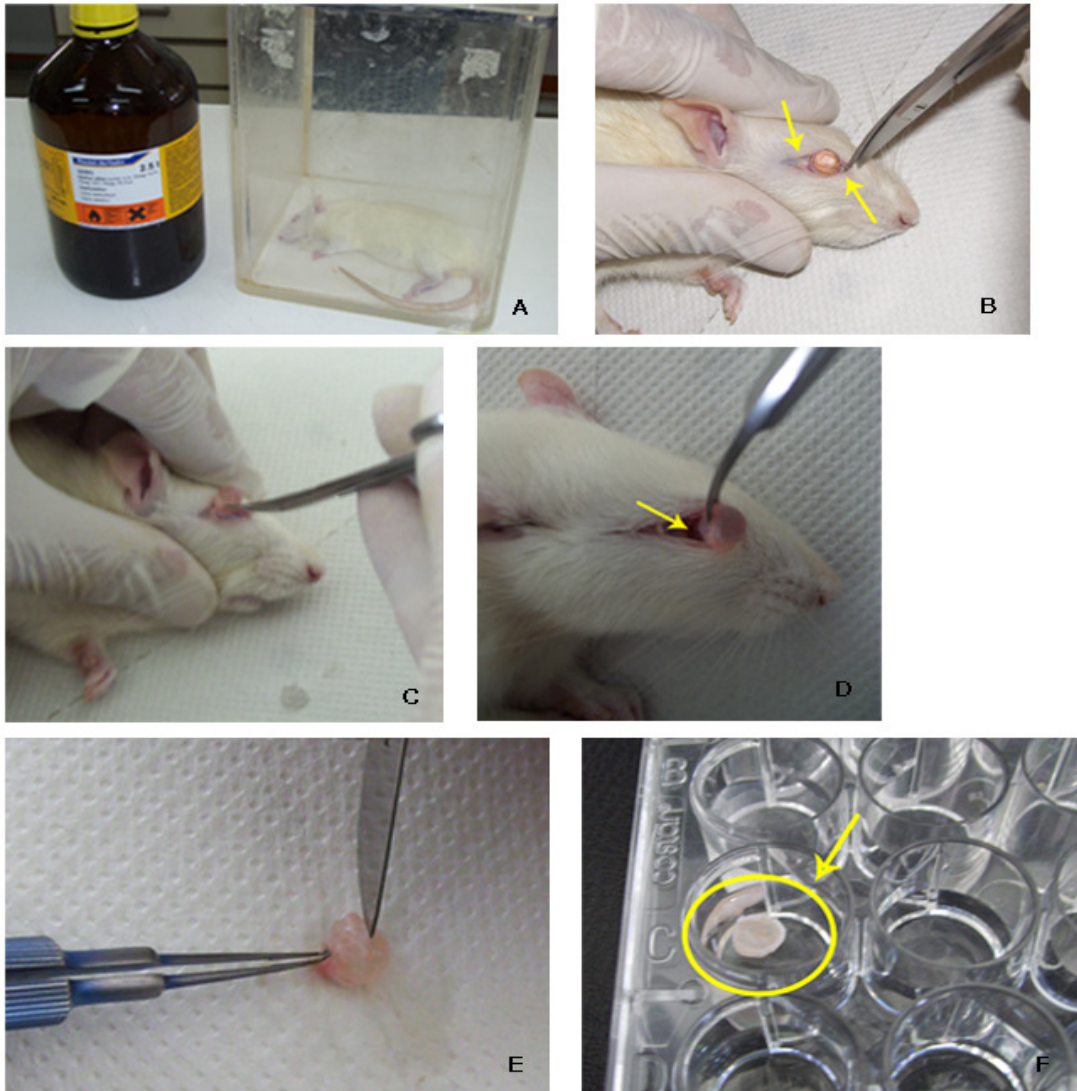
### 2.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ

Οι αρουραίοι θανατώνονται με εισπνοή διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια αφαιρούνται οι οφθαλμοί. Τοποθετούνται σε 0,1M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών οξέων  $\text{pH}=7,4$  (PB:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ ) και αφαιρείται ο πρόσθιος πόλος, ενώ ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, το μελάγχρουν επιθήλιο και ο σκληρός χιτώνας ξεπλένονται σε 0,1M PBS για 15 min στους  $37^\circ\text{C}$ , 95% αέρα / 5%  $\text{CO}_2$  (αναλυτικά η μέθοδος στην **Εικόνα 2.2α**).

### 2.3. ΕΠΑΓΩΓΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:  
Αρχικά οι ιστοί επωάζονται για 2 x 30min με: (α) 0,1M PBS, οι οποίοι θα αποτελέσουν τους ιστούς ελέγχου, (β) 0,1M PBS που περιέχει 5mM ιωδοξικού οξέος και 25mM κυανιδίου του νατρίου (μείγμα χημικής ισχαιμίας), οι οποίοι θα αποτελέσουν τους ιστούς που θα υποστούν την χημική ισχαιμία (ιστοί ελέγχου της χημικής ισχαιμίας) και (γ) 0,1M PBS που περιέχει το μείγμα της χημικής ισχαιμίας και τα νευροστεροειδή DHEA ή BNN50 ή BNN124 σε συγκέντρωση  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,

$10^{-10}M$ , οι οποίοι θα αποτελέσουν τους ιστούς όπου θα γίνει η προσπάθεια νευροπροστασίας (πειραματικοί ιστοί).



**Εικόνα 2.2α:** Αναλυτική μέθοδος αφαίρεσης οφθαλμών (A) Θανάτωση του ζώου με εισπνοή διαιθυλαιθέρα σε θάλαμο. (B) Άνοιγμα τομών επί του δέρματος εκατέρωθεν του οφθαλμού ώστε να διευκολυνθούν οι χειρισμοί. (C) Αφαίρεση των μυών που συγκρατούν τον οφθαλμό. (D) Κοπή του οπτικού νεύρου κοντά στο σημείο επαφής με τον οφθαλμό. (E) Μετά την απομόνωση του οφθαλμού, πραγματοποιείται τομή κάθετη προς τον άξονα που ορίζει το οπτικό νεύρο και αφαιρείται το πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού που περιλαμβάνει τον κερατοειδή χιτώνα και τον φακό. (F) Τα eyecups μεταφέρονται σε 24-well plates και ακολουθεί το πρωτόκολλο της χημικής ισχαιμίας (Ενότητα 2.3)

Το ιωδοοξικό οξύ και το κυανίδιο του νατρίου είναι γνωστό ότι μιμούνται τις ανοξικές και υπογλυκαιμικές συνθήκες, αντίστοιχα, που παρατηρούνται κατά την εμφάνιση ισχαιμίας, αναστέλλοντας ένζυμα που εμπλέκονται στη μεταβολική λειτουργία του κυττάρου. Στη συνέχεια οι ιστοί επωάζονται για 2 x 30min με: (α-β) 0,1M PBS και (γ) 0,1M PBS που περιέχει τα νευροστεροειδή DHEA ή BNN50 ή BNN124 σε συγκέντρωση  $10^{-6}M$ ,  $10^{-8}M$ ,  $10^{-10}M$ . Όλοι οι ιστοί ξεπλένονται με 0,1M PBS για 15min. Όλες οι επωάσεις πραγματοποιούνται στους  $37^{\circ}C$ , 95% αέρα / 5%  $CO_2$ , υπό ήπια ανάδευση.

---

### **2.4. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

Στη συνέχεια μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (PFA) 0,1M για 1h στους  $4^{\circ}C$  και έπειτα επωάζονται σε διάλυμα 30% σουκρόζης / 0,1M PB για 16 – 18h στους  $4^{\circ}C$  για κρυοπροστασία. Ακολουθεί ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθισή τους σε ισοπεντάνιο για 1min στους  $-45^{\circ}C$  και φύλαξή τους στους  $-80^{\circ}C$  μέχρι την κοπή τους.

---

### **2.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΡΥΟΤΟΜΩΝ**

Κατά την έναρξη της διεξαγωγής του πειράματος, ο ιστός τοποθετείται μέσα στον κρυοτόμο για περίπου 30min πριν ξεκινήσει το κόψιμο, ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία του με αυτή του θαλάμου ψύξης ( $-27^{\circ}C$ , θερμοκρασία στην οποία λαμβάνονται οι τομές). Οι ιστοί στερεώνεται σε ειδικές τράπεζες (stages) με τη βοήθεια κατάλληλου ψυκτικού υλικού (OCT) με το οποίο και καλύπτονται. Το ψυκτικό υλικό σταθεροποιεί τους ιστούς στη βάση και διευκολύνει το σωστό κόψιμο, αποτρέποντας τον πιθανό τραυματισμό τους από την άμεση επαφή με το μαχαίρι. Αφού στερεοποιηθεί το OCT, ο ιστός τοποθετείται στη θέση κοπής του κρυοτόμου. Αφήνεται να εξισορροπηθεί με την εκεί θερμοκρασία για περίπου 15min και στη συνέχεια ακολουθεί παρασκευή εγκάρσιων διατομών.

Το πάχος των τομών επιλέγεται να είναι 10 $\mu m$  και λαμβάνονται τα επίπεδα εκατέρωθεν του οπτικού νεύρου. Οι τομές συλλέγονται σε ζελατιναρισμένα πλακάκια, ώστε να μην ξεκολλήσουν οι τομές κατά την περαιτέρω επεξεργασία, και φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}C$  μέχρι τη χρήση τους.

---

### **2.6. ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ**

Για την ανοσοϊστοχημική σήμανση των τομών, χρησιμοποιείται η μέθοδος του έμμεσου φθορισμού, κατά τον οποίο οι τομές επωάζονται με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα και έπειτα με κατάλληλα δεύτερα αντισώματα. Το σύνολο των 1<sup>ωv</sup> αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Ab I</b>	<b>Host</b>	<b>Conc. (Ab I)</b>	<b>Ab II</b>	<b>Conc. (Ab II)</b>	<b>Cell type - Labeling</b>
<b><i>a - ChAT</i></b>	mouse	1 : 100	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Χολινεργικά αμακρινικά κύτταρα
<b><i>a - MAP1</i></b>	mouse	1 : 100	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Γαγγλιακά κύτταρα
<b><i>a - bNOS</i></b>	rabbit	1 : 2000	<i>a - rb IGG 546</i>	1 : 300	Αμακρινικά bNOS-θετικά κύτταρα
<b><i>a - recoverin</i></b>	rabbit	1 : 50	<i>a - rb IGG 546</i>	1 : 300	Φωτούποδοχείς
<b><i>a - PKC</i></b>	mouse	1 : 50	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Δίπολα κύτταρα
<b><i>a - CaBP</i></b>	mouse	1 : 800	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Οριζόντια και αμακρινικά κύτταρα
<b><i>a - Thy1</i></b>	mouse	1 : 10	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Γαγγλιακά κύτταρα
<b><i>a - NFL</i></b>	mouse	1 : 500	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Γαγγλιακά κύτταρα
<b><i>a - rhodopsin</i></b>	mouse	1 : 1000	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Φωτούποδοχείς
<b><i>a - trkA</i></b>	rabbit	1 : 100	<i>a - rb IGG 546</i>	1 : 300	Υποδοχέας TrkA
<b><i>a - p75</i></b>	mouse	1 : 500	<i>a - ms IGG 488</i>	1 : 400	Υποδοχέας p75 <sup>(NTR)</sup>

**Πίνακας 2.6α:** Συγκεντρωτικός πίνακας 1<sup>ov</sup> αντισωμάτων (Ab I). Στον πίνακα παρουσιάζονται επιπλέον οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν, τα αντίστοιχα 2<sup>o</sup> αντισώματα (Ab II) με τη συγκέντρωσή τους, καθώς και ο κυτταρικός τύπος που σημαίνεται.

Οι τομές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 45min και στη συνέχεια ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα 0,1M Tris Buffer Saline (TBS), pH=7,4. Ακολουθώς επωάζονται σε διάλυμα 3,3% φυσιολογικού ορού αίγας (NGS) / 0,1M TBS για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση του 2<sup>ou</sup> αντισώματος. Οι τομές ξεπλένονται τρεις φορές με TBS και επωάζονται με διάλυμα που περιέχει το 1<sup>o</sup> αντίσωμα για 16 - 18h σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,5% NGS και 0,3% Triton X-100 σε 0,1M TBS. Έπειτα, οι τομές ξεπλένονται τρεις φορές με TBS και επωάζονται με διάλυμα του φθορίζοντος 2<sup>ou</sup> αντισώματος για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, καλύπτονται με υλικό κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium, Vector Laboratories) και παρατηρούνται με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού.

## 2.7. TUNEL ASSAY (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red)

Για τη μελέτη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), πραγματοποιήθηκε χρώση TUNEL (deoxynucleotidyltransferase - mediated dUTP-biotin nick end labeling) σε τομές από ιστούς, οι οποίοι, μετά τους υπό μελέτη χειρισμούς, υπέστησαν μονιμοποίηση σε 4% PFA σε PB 0,2M για 1h και

κρυοπροστασία. Για τη χρώση TUNEL χρησιμοποιήθηκε σύστημα *in situ* ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου, TMR Red (Roche Diagnostics, Mannheim, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, οι τομές ξεπλένονται 2x PBS 0,1M σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται το διάλυμα αντίδρασης TUNEL, το οποίο περιέχει Διάλυμα Ενζύμου (Enzyme Solution) σε συγκέντρωση 1:10 σε Διάλυμα Σηματοδότησης (Label Solution). Οι τομές επώάζονται σε υγρό περιβάλλον σε θερμοκρασία 37°C για 1h. Μετά το πέρας της επώασης, οι τομές ξεπλένονται 3x PBS 0,1M σε θερμοκρασία δωματίου, καλύπτονται με χρήση καλυπτρίδας και mounting medium και παρατηρούνται με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού.

### **2.8. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΔΙΠΛΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ**

Για τα πειράματα διπλού φθορισμού, πραγματοποιήθηκε διαδοχική χρήση των πρωτοκόλλων που περιγράφηκαν στις ενότητες ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ και TUNEL ASSAY (*In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red*). Οι εικόνες που προέκυψαν από αυτή τη διαδικασία επεξεργάστηκαν με κατάλληλο λογισμικό (Adobe Photoshop CS3 v10).

### **2.9. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΚΙΝΑΣΩΝ (early apoptosis) ΜΕ WESTERN BLOT**

Αρχικά, τα eyecups απομονώνονται με την ίδια μέθοδο όπως στο πρωτόκολλο της ισχαιμίας. Η ενεργοποίηση των κινασών θα μελετηθεί σε τρεις διαφορετικούς χρόνους 5min, 10min και 20min. Για κάθε χρόνο υπάρχουν 5 συνθήκες:

- a. PBS (control)
- b. CI (chemical ischemia)
- c. CI / DHEA  $10^{-8}M$
- d. CI / BNN50  $10^{-8}M$
- e. CI / BNN124  $10^{-8}M$

Ξεκινώντας την προετοιμασία, οι ιστοί επώάζονται σε PBS 0.1M για 15min. Ακολουθεί επώαση των ιστών με τα ανάλογα για κάθε περίπτωση (a – e) διαλύματα για 5min, 10min ή 20min. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ακολουθεί επώαση μόνο με τα νευροστεροειδή όπως στο πρωτόκολλο της ισχαιμίας. Στη συνέχεια, οι ιστοί ξεπλένονται με PBS 0.1M για 15min. Όλες οι επώσεις πραγματοποιούνται στους 37°C, 95% αέρα / 5% CO<sub>2</sub>, υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθως, απομονώνονται οι αμφιβληστροειδείς και μεταφέρονται σε διάλυμα lysis buffer με PMSF (20:1), όπου ομογενοποιούνται με χρήση sonicator. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -80°C, ενώ ακολουθεί Bradford Assay για την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού διαλύματος και Western Blot Analysis.

### 2.10. BRADFORD ASSAY ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα:

*BSA(1mg/ml) standards:*

- 0 µg /µl + 800 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.
- 2 µg /µl + 798 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.
- 5 µg /µl + 795 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.
- 10 µg /µl + 790 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.
- 15 µg /µl + 785 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.
- 20 µg /µl + 780 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.

*Protein samples:*

- Blank: 2 µl lysis buffer + 798 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution
- 2 µl protein sample in lysis buffer + 798 µl H<sub>2</sub>O +200 µl Bradford solution.

Τα παραπάνω δείγματα μεταφέρονται σε 96-well plate και φωτομετρούνται. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για Western Blot Analysis προστίθεται ίση ποσότητα 2x sample buffer σε protein sample, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη που «φορτώνεται» στο gel θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 15µgr. Τα δείγματα βράζουν για 5min και επωάζονται σε πάγο μέχρι να «φορτωθούν».

### 2.11. WESTERN BLOT ANALYSIS

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων παρασκευάζονται αρχικά τα παρακάτω gel:

	<b>Separating gel (10%) (2gel)</b>	<b>Stacking gel (10%) (2gel)</b>
H <sub>2</sub> O for injection	7,4 ml	5,1 ml
30% Acrylamide	9 ml	3 ml
Separating buffer/Stacking buffer	5,6 ml	938 µl
10% APS (προστίθεται τελευταίο)	225 µl	75 µl
TEMED (προστίθεται τελευταίο)	9 µl	7,5 µl
SDS 10%	225 µl	75 µl

Μετά την προσθήκη των APS και TEMED ξεκινά ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (στερεοποιείται). Η διαδικασία πολυμερισμού διαρκεί περίπου 30min. Αφού τα δείγματα «φορτωθούν» στο gel πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση υπό τις παρακάτω συνθήκες:

100V, V συνεχής για 15min.

150V, V συνεχής για 1h.

Αφού διαχωριστούν οι πρωτεΐνες στο gel, μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό τις ακόλουθες συνθήκες: 350mA, A συνεχής για 60 min.

Κατά τη διαδικασία της μεταφοράς, η συσκευή καθώς και το transfer buffer πρέπει να παραμένουν σε χαμηλή θερμοκρασία.

Στη συνέχεια οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης μαζί με τις πρωτεΐνες υπόκεινται στη διαδικασία ανοσοεντοπισμού:

Αρχικά πραγματοποιείται *Blocking* για τον αποκλεισμό του μη ειδικού σήματος με 5% γάλα σε TBST pH=7,4 για 1h. Ακολουθούν πλυσίματα με TBST, 3x 15min. Για την εφαρμογή του πρώτου αντισώματος οι μεμβράνες επωάζονται με το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα σε κατάλληλες συγκεντρώσεις O/N στους 4<sup>ο</sup>C ή 2hrs σε RT υπό ήπια ανάδευση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ως πρώτα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τις πρωτεΐνες PI3K, Akt, MEK1/2 και ERK1/2 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA), καθώς και για τις αντίστοιχες φωσφορυλιωμένες μορφές τους, όπως επίσης και αντισώματα έναντι των υποδοχέων p75<sup>NTR</sup> (Cat.No. MAB365, Chemicon) και TrkA (CatNo. 2505, Cell Signaling), όλα σε συγκεντρώσεις 1:500. Οι μεμβράνες ξεπλένονται του επιπλέον 1<sup>ου</sup> αντισώματος με TBST για 3x 15min, ενώ ακολουθεί επώαση με το ανάλογο 2<sup>ο</sup> αντίσωμα για 1hr σε RT. Στη συνέχεια οι μεμβράνες ξεπλένονται με TBST για 3x 15min. Τέλος, οι μεμβράνες επωάζονται με Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και εκτίθενται σε film για περίπου 1min, τα οποία εμφανίζονται με τη χρήση εμφανιστικού μηχανήματος. Μετά την εμφάνιση, οι μεμβράνες υπόκεινται στη διαδικασία του stripping (επώαση στους 40<sup>ο</sup>C για 20min με stripping buffer 1x), ώστε να απομακρυνθούν τα αρχικά πρώτα αντισώματα και οι μεμβράνες να ξαναχρησιμοποιηθούν.

### 2.12. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΣΥΝΤΑΓΕΣ

*PB 0,2M*: 2,76gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 100ml (sol. A)

17,42gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 500ml (sol. B)

sol. A + sol. B → 600ml PB 0,2M

*PBS 0,1M*: 50ml PB 0,2M + 0,9gr NaCl + ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 100ml.

*TBS 0,1M*: 6,055gr Trizma Base + 4,5gr NaCl + ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 500ml + HCl με ταυτόχρονη ανάδευση και πεχαμέτρηση σε τελικό pH=7,4.

*PFA 4%*: (40ml ddH<sub>2</sub>O + 4gr PFA με ανάδευση στους 55<sup>ο</sup>C) + 4drops NaOH 4% + ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 50ml.

Προστίθενται επιπλέον 50ml PB 0,2M και το διάλυμα φιλτράρεται.

*Lysis Buffer (50ml)*: 500μl 1M Tris-Cl pH=7,4 + 12,5 ml 1M sucrose + 2,5ml 20mM EDTA + 2,5ml 20mM PMSF (last added) + 500μl Triton (100%) + 100μl leupeptin(1mg/ml) + 100 μg aprotinin.

Τελική συγκέντρωση που απαιτείται για το Lysis Buffer :



10mM Tris-HCl pH7,4 + 250mM sucrose + 1mM EDTA + 1mM PMSF + 1% Triton + 2µg/ml leupeptin + 2µg/ml aprotinin

*2x Sample Buffer:* 0,125M Tris-HCl + 4% (w/v) SDS + 4% (w/v) β-mercaptoethanol + 10% (w/v) glycerol + 0,02% (w/v) bromophenol blue.

*30% acrylamide:* 29gr acrylamide + 1gr of N-N'-methylenebisacrylamide σε τελικό όγκο 60ml ddH<sub>2</sub>O. Μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές, ο όγκος προσαρμόζεται στα 100ml με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O.

*Separating gel buffer (100ml):* 18,16gr Tris-Cl 1.5M pH=8,8

*Stacking gel buffer (100ml):* 12,11gr Tris-Cl 1M pH=6,8

*10% APS:* 1gr ammonium persulfate + ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 10ml. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C.

*Running Buffer 10x:* 0,25mM Tris-HCl + 1,92mM glycine + 1% SDS + ddH<sub>2</sub>O.

*TBS-T 10x (1lt):* 80gr NaCl + 24,2gr Tris + 10ml Tween-20.

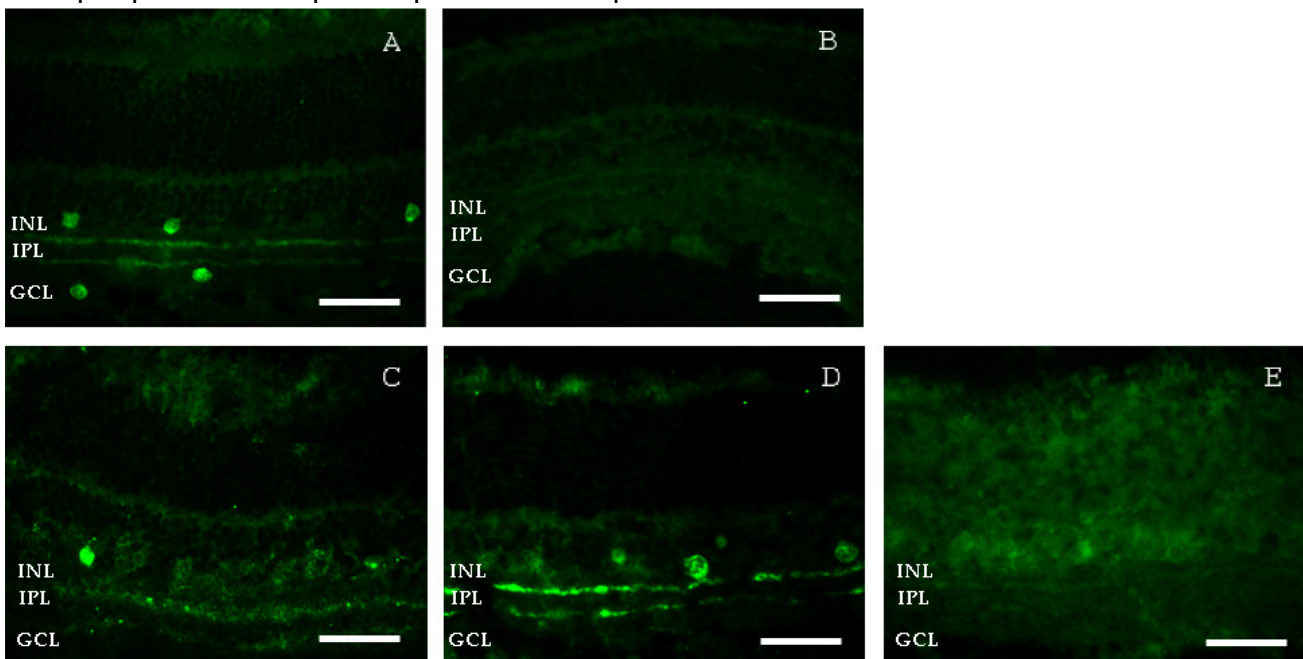
Το pH ρυθμίζεται στα 7,6 πριν την προσθήκη του Tween-20.

Κατά την πορεία συλλογής των αποτελεσμάτων, η μελέτη επικεντρώθηκε στη διαλεύκανση της νευροπροστατευτικής δράσης των νευροστεροειδών στο συγκεκριμένο μοντέλο. Εκτός από τους επιμέρους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, ως βασικά εργαλεία για την πιστοποίηση του νευρωνικού θανάτου στο μοντέλο χημικής ισχαιμίας αποτέλεσαν η ανοσοϊστοχημική αντίδραση της ChAT καθώς και η χρώση TUNEL.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειραματικές προσεγγίσεις για την αποσαφήνιση των κυτταρικών τύπων που πλήττονται από την χημική ισχαιμία (μελέτες διπλού φθορισμού), καθώς και τον μηχανισμό δράσης της (μελέτες κινάσων με Western Blot Analysis) οι οποίες όμως παρέμειναν σε πολύ πρώιμα στάδια. Ακολουθεί αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

### 3.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Το DHEA φαίνεται να προστατεύει από το νευρωνικό θάνατο σύμφωνα με τους περισσότερους δείκτες (ChAT, MAP1, bNOS, PKC) με συγκεντρωσ - εξαρτώμενο τρόπο. Στην **Εικόνα 3.1α** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της ChAT (Choline acetyltransferase). Το ένζυμο καταλύει τη σύνθεση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh) από χολίνη και acetyl-CoA σε χολινεργικούς νευρώνες. Αποτελεί εξειδικευμένος δείκτης χολινεργικών νευρώνων σε κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα. Εντοπίζεται σε αμακρινικά κύτταρα και processes στην IPL και GCL.

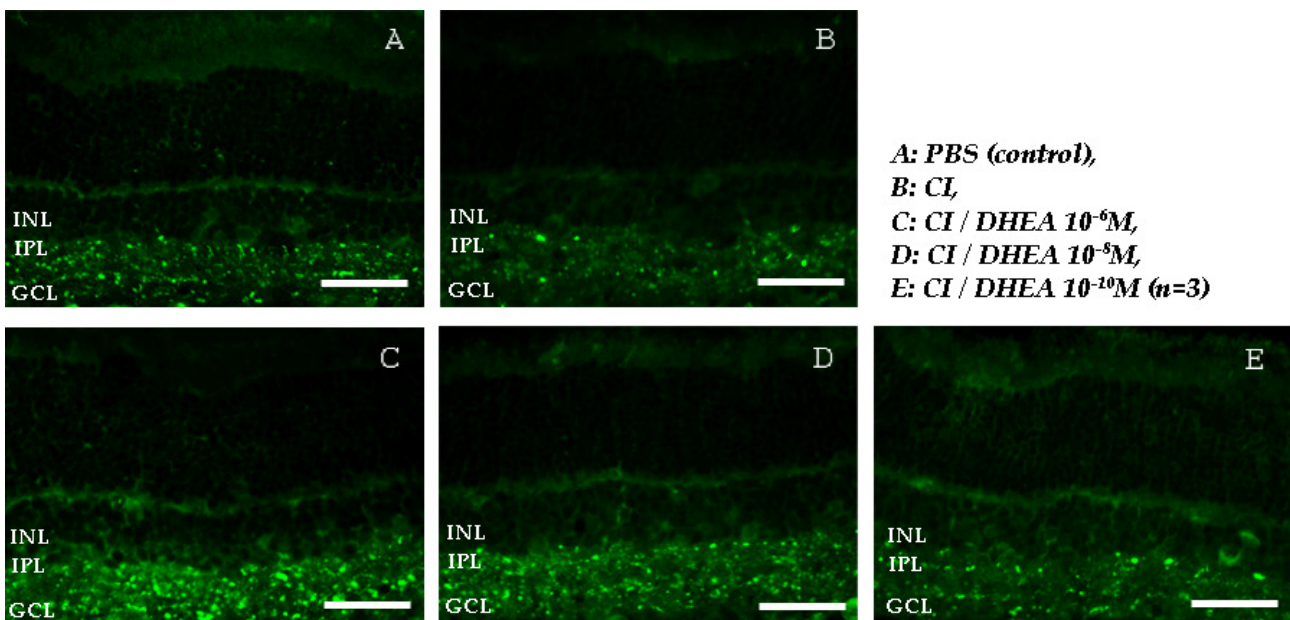


**Εικόνα 3.1α:** Ανοσοδραστικότητα της ChAT. A: PBS (control), B: CI, C: CI / DHEA  $10^{-6}M$ , D: CI / DHEA  $10^{-8}M$ , E: CI / DHEA  $10^{-10}M$  (n=3)

**Scale bar: 20µm**

Παρουσία του ισχαιμικού μίγματος ανοσοδραστικότητα της ChAT δεν είναι εμφανής (B). Η παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων DHEA προστάτευσε τα χολινεργικά κύτταρα από την ισχαιμική βλάβη με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα προστασίας παρατηρήθηκαν σε συγκέντρωση DHEA  $10^{-8}M$  (D).

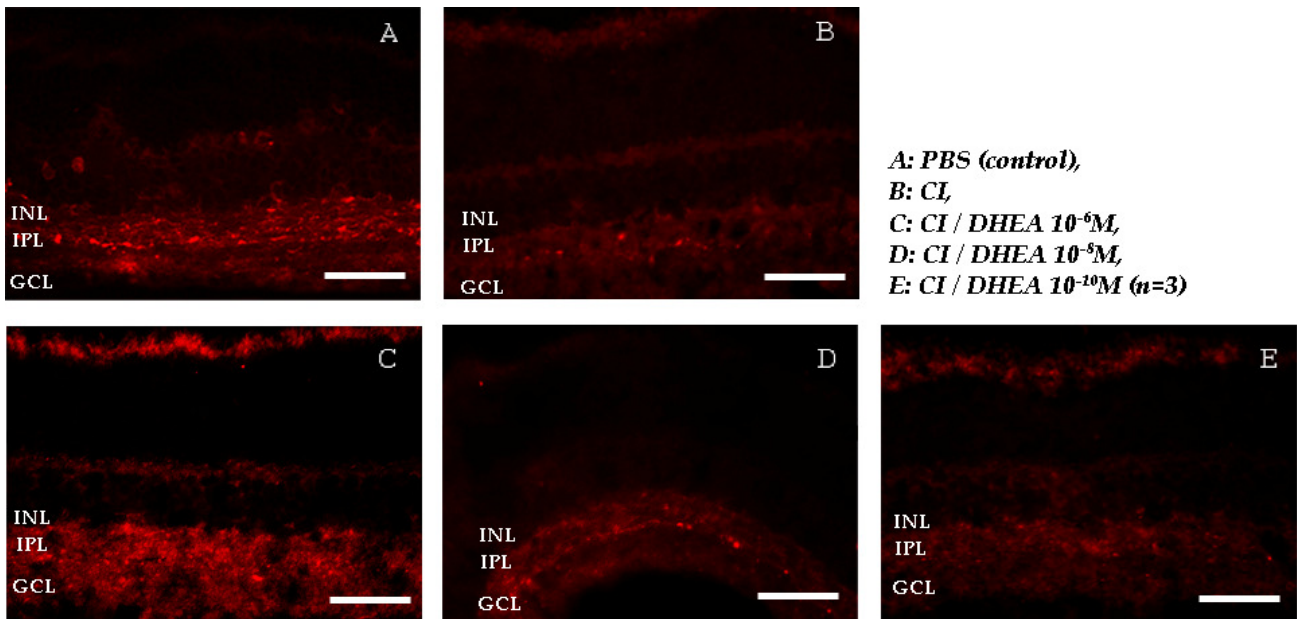
Στην **Εικόνα 3.1β** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της MAP1 (microtubule associated protein-1), η οποία μεσολαβεί στις φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροσωληνίσκων και στοιχείων του κυτταροσκελετού. Αποτελείται από μία υπομονάδα βαριάς αλυσίδας και από πολλαπλές υπομονάδες ελαφριών αλυσίδων, ενώ στον αμφιβληστροειδή εντοπίζεται σε γαγγλιακά κύτταρα των GCL και IPL. Η ένταση της ανοσοδραστικότητας της MAP1 στις διαφορετικές μεταχειρίσεις δεν εμφάνισε διαφορές ικανές, ώστε να θεωρηθεί ότι επηρεάζεται από την ισχαιμία / νευροπροστασία.



**Εικόνα 3.1β:** Ανοσοδραστικότητα της MAP1.

**Scale bar: 20μm**

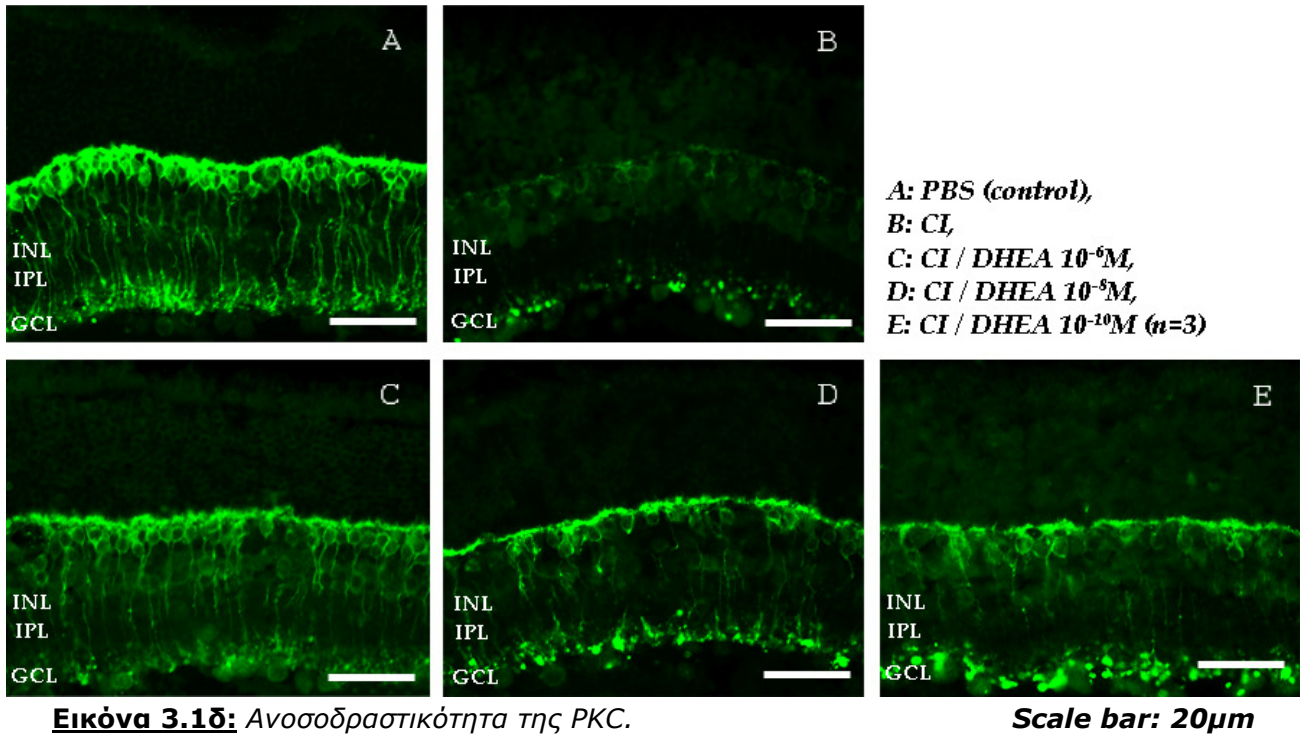
Στην **Εικόνα 3.1γ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της bNOS (nitric oxide synthase from brain), η οποία παράγει μονοξείδιο του αζώτου, ένα μηνυματοφόρο μόριο με ποικίλες λειτουργίες σε ολόκληρο τον οργανισμό. Στον εγκέφαλο και το περιφερειακό νευρικό σύστημα, το μονοξείδιο του αζώτου εμφανίζει ιδιότητες νευροδιαβιβαστή. Στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας η χαρακτηριστική χρώση bNOS-θετικών αμακρινικών κυττάρων που παρατηρείται στις GCL και IPL υπό συνθήκες control (A), περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό κατά την επαγωγή της χημικής ισχαιμίας (B). Ο αριθμός των bNOS-θετικών κυττάρων αυξάνεται, χωρίς να επανέρχεται σε επίπεδα control, με την παρουσία DEHA και περισσότερο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του νευροστεροειδούς (C-D).



**Εικόνα 3.1γ:** Ανοσοδραστικότητα της bNOS.

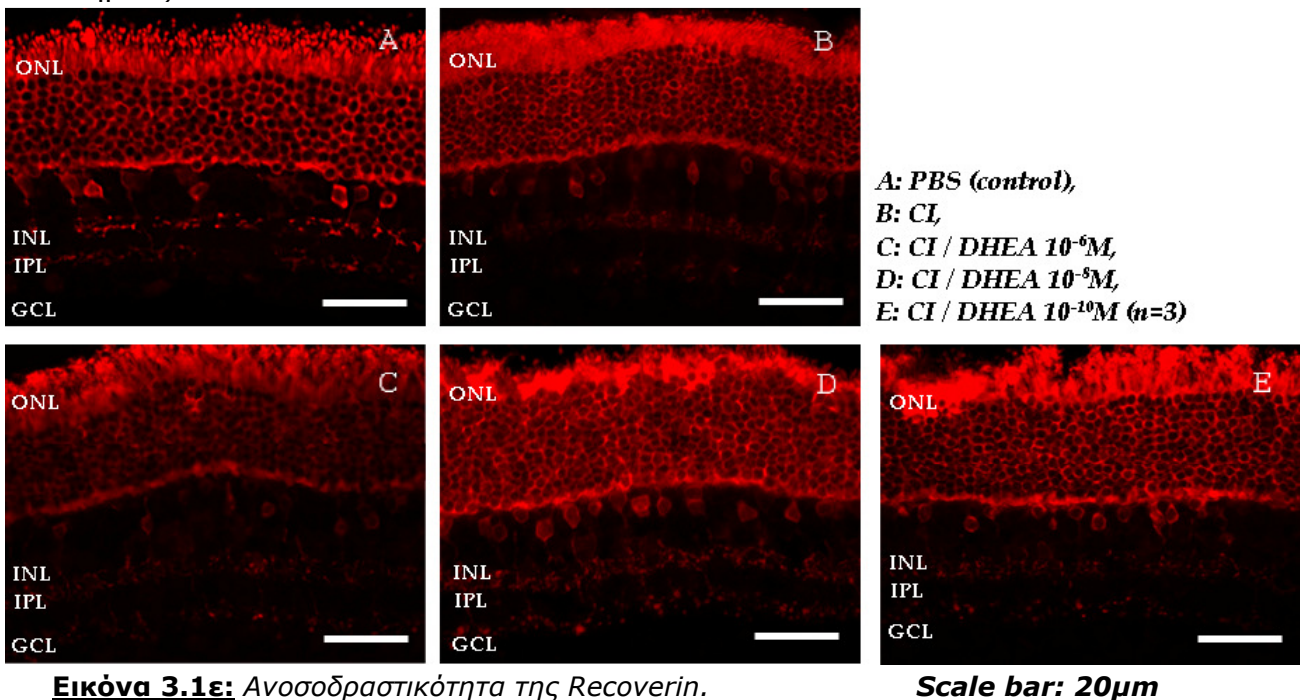
**Scale bar: 20μm**

Στην **Εικόνα 3.1δ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της PKC (protein kinase C). Ισομορφές της αποτελούν οι serine/threonine κινάσες, οι οποίες εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διεργασιών, όπως διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, γονιδιακή έκφραση, λειτουργία του εγκεφάλου και την οργάνωση του κυτταροσκελετού και των πρωτεϊνών του εξωκυτταρικού χώρου. Ο καθοριστικός ρόλος της κινάσης PKC στη μεταγωγή σημάτων ταυτίζεται στον αμφιβληστροειδή με την αντίστοιχη λειτουργία των δίπολων κυττάρων, τα οποία μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ φωτοϋποδοχέων και γαγγλιακών κυττάρων. Όπως φαίνεται από την ανοσοδραστικότητα της PKC, τα δίπολα πλήττονται ισχυρά από την χημική ισχαιμία. Η παρατηρούμενη επίδραση αναστρέφεται από την εφαρμογή του νευροστεροειδούς DHEA, το οποίο προστατεύει από την ισχαιμία με συγκεντρωσο – εξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, το μέγιστο επίπεδο νευροπροστασίας των δίπολων κυττάρων παρατηρείται σε συγκέντρωση DHEA  $10^{-6}M$  (C), ενώ μειώνεται με την μείωση της συγκέντρωσης του νευροστεροειδούς (D-E).



**Εικόνα 3.1δ:** Ανοσοδραστικότητα της PKC.

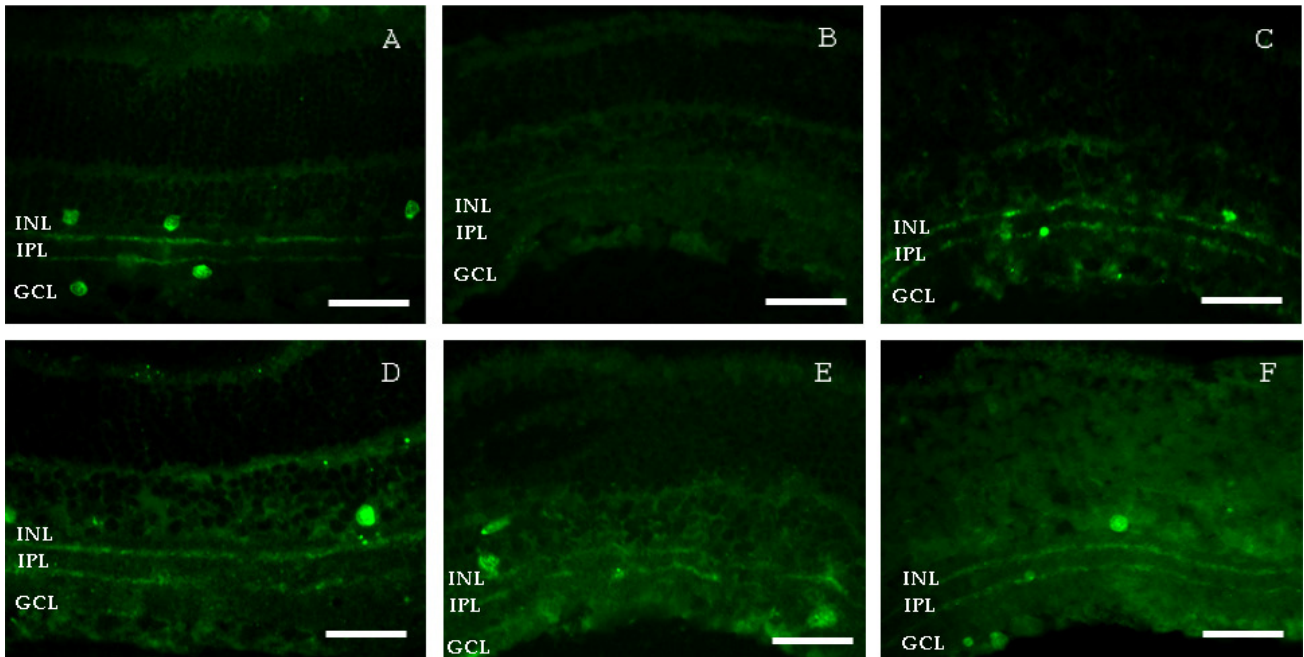
Στην **Εικόνα 3.1ε** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας Recoverin. Οι πρωτεΐνες που προσδέουν ασβέστιο θεωρείται ότι αποτελούν βοηθητικά μόρια για την μη φυσιολογική ανάπτυξη των όγκων. Η Recoverin είναι μια νευρολογικά σημαντική πρωτεΐνη που προσδένει ασβέστιο και συχνά εμπλέκεται στην παθολογία των όγκων. Στον αμφιβληστροειδή αποτελεί δείκτη των φωτοϋποδοχέων. Κατά τις συνθήκες χημικής ισχαιμίας / νευροπροστασίας η πρωτεΐνη Recoverin και κατ' επέκταση οι φωτοϋποδοχείς δεν φαίνονται να επηρεάζονται.



**Εικόνα 3.1ε:** Ανοσοδραστικότητα της Recoverin.

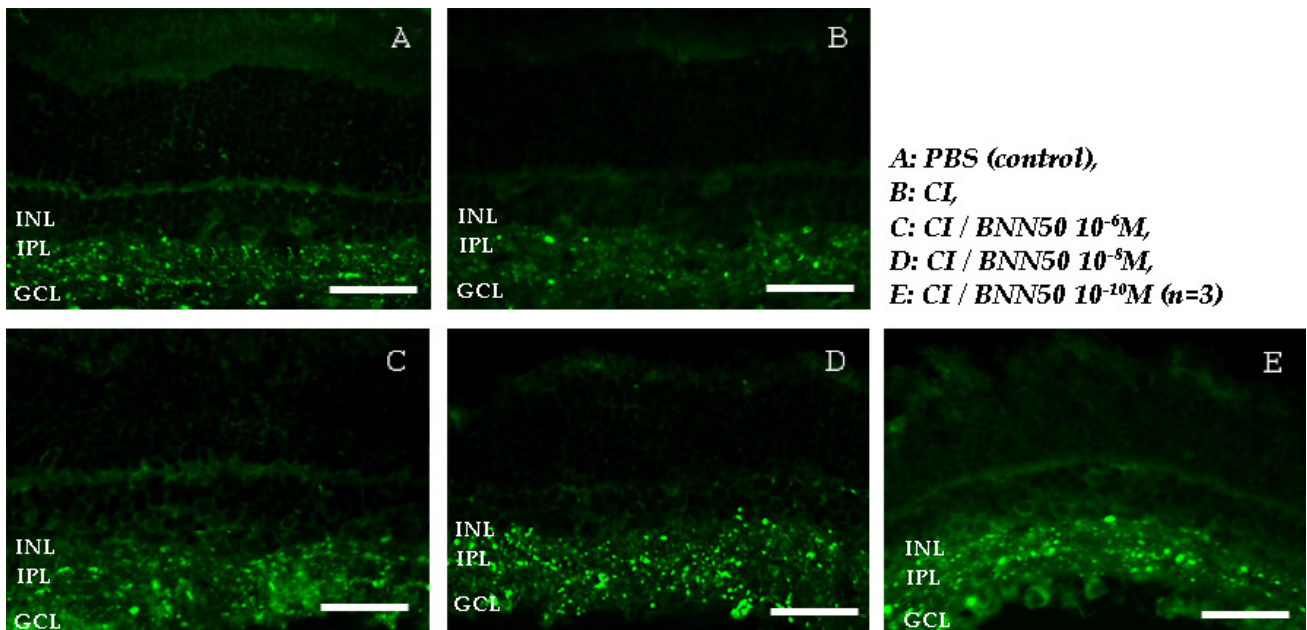
### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το νευροστεροειδές BNN50 αποδείχθηκε ιδιαίτερα δραστικό στην προστασία των κυτταρικών τύπων. Στην **Εικόνα 3.1στ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της ChAT. Η παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BNN50 προστάτευσε τα χολινεργικά κύτταρα από την ισχαιμική βλάβη όπως και στην περίπτωση του DHEA, επίδραση η οποία παρατηρήθηκε ακόμα και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση του νευροστεροειδούς (F).



**Εικόνα 3.1στ:** Ανοσοδραστικότητα της ChAT.

A: PBS (control), B: CI, C: CI / BNN50  $10^{-6}M$ , D: CI / BNN50  $10^{-8}M$ , E: CI / BNN50  $10^{-10}M$ , F: CI / BNN50  $10^{-12}M$  (n=3)  
**Scale bar: 20 $\mu$ m**

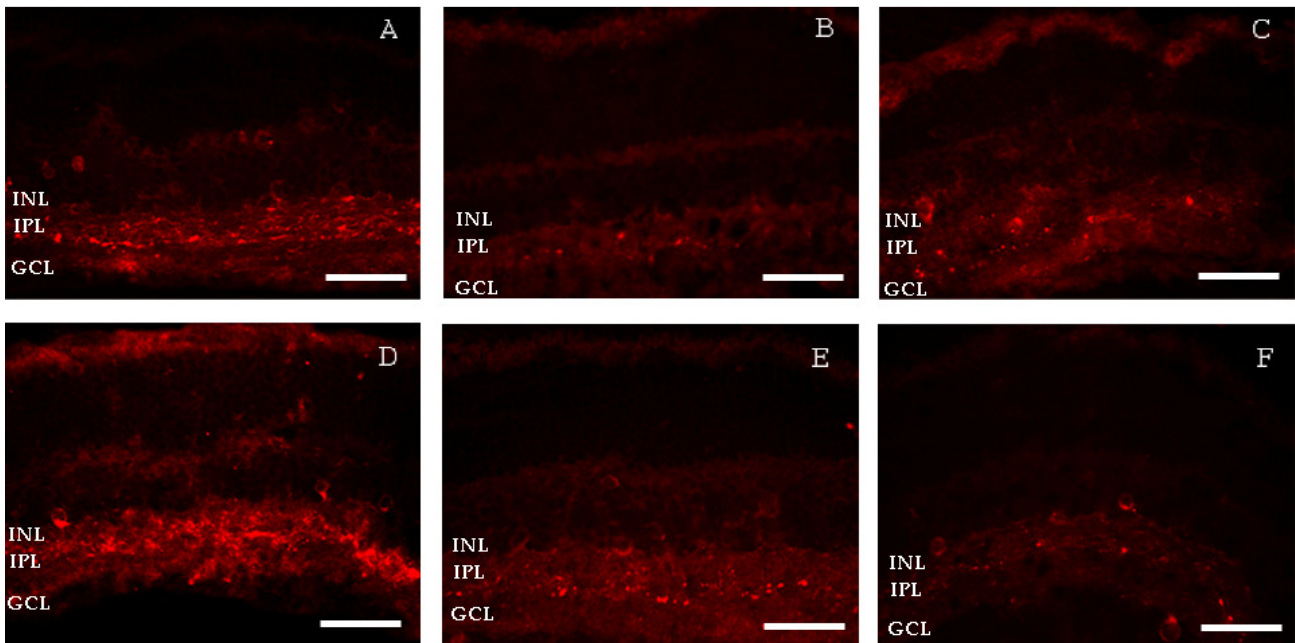


**Εικόνα 3.1ζ:** Ανοσοδραστικότητα της MAP1.

**Scale bar: 20 $\mu$ m**

Στην **Εικόνα 3.1ζ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της MAP1, όπου δεν παρατηρούνται έντονες μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων.

Στην **Εικόνα 3.1η** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της bNOS. Ο αριθμός των bNOS-θετικών κυττάρων μειώνεται σημαντικά σε συνθήκες ισχαιμίας, ενώ η επώαση με το νευροστεροειδές BNN50 επαναφέρει τον αριθμό τους κοντά στα επίπεδα ελέγχου, ανάλογα με τη συγκέντρωση του νευροστεροειδούς. Μέγιστη νευροπροστασία από το BNN50 παρατηρείται σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  (D).

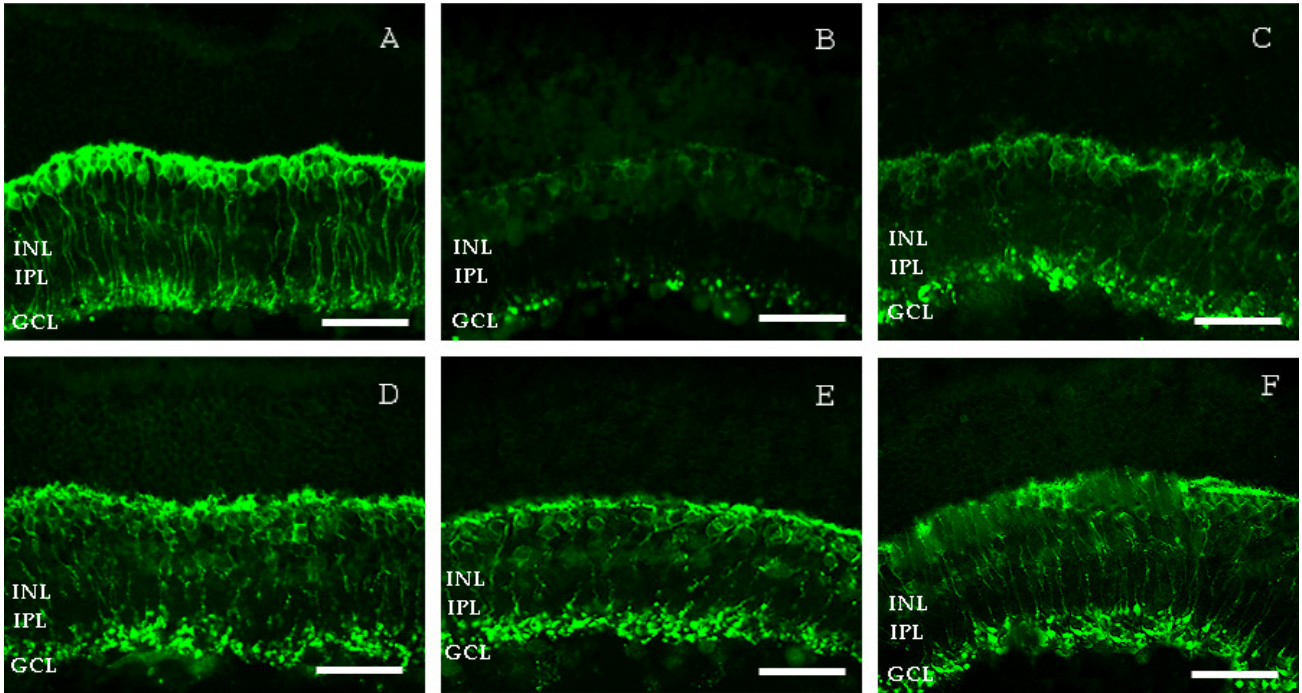


**Εικόνα 3.1η:** Ανοσοδραστικότητα της bNOS.

A: PBS (control), B: CI, C: CI / BNN50  $10^{-6}M$ , D: CI / BNN50  $10^{-8}M$ , E: CI / BNN50  $10^{-10}M$ , F: CI / BNN50  $10^{-12}M$  (n=3)

**Scale bar: 20μm**

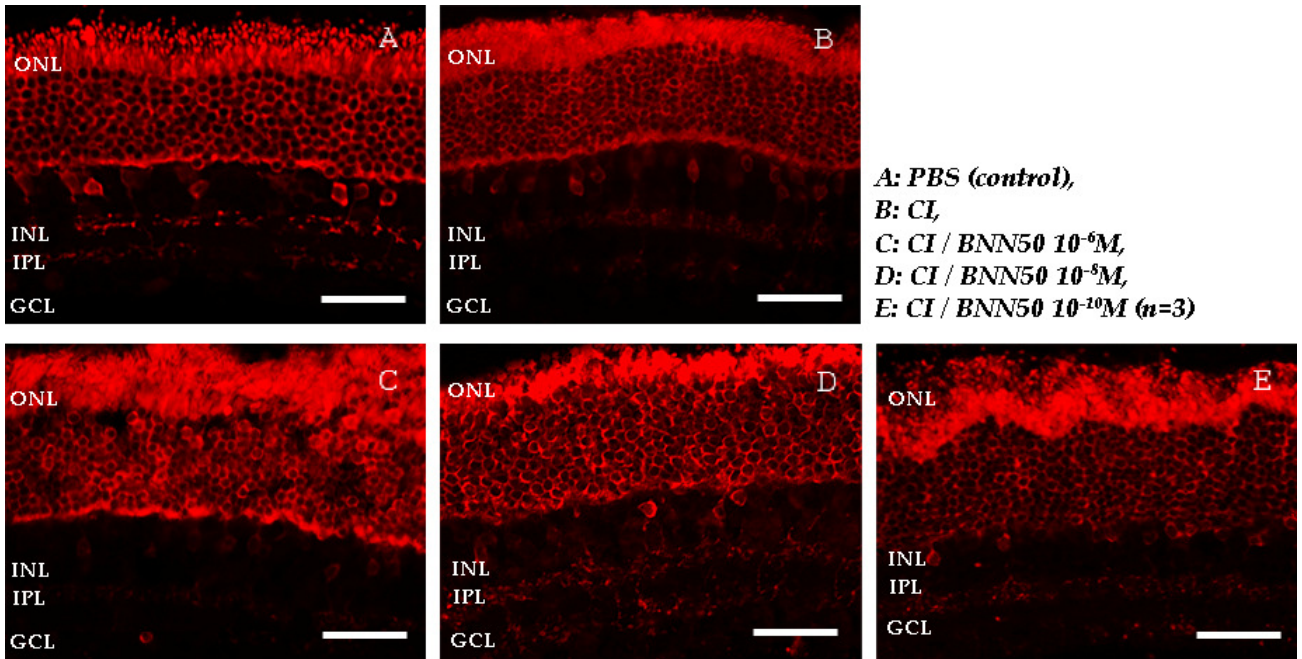
Στην **Εικόνα 3.1θ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της PKC. Το νευροστεροειδές BNN50 προστατεύει τα δίπολα κύτταρα από την επίδραση της χημικής ισχαιμίας σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (C-F).



**Εικόνα 3.10:** Ανοσοδραστικότητα της PKC.

A: PBS (control), B: CI, C: CI / BNN50  $10^{-6}M$ , D: CI / BNN50  $10^{-8}M$ , E: CI / BNN50  $10^{-10}M$ , F: CI / BNN50  $10^{-12}M$  (n=3)  
**Scale bar: 20 $\mu$ m**

Στην **Εικόνα 3.1i** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της πρωτεΐνης Recoverin. Και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην ανοσοδραστικότητα της Recoverin μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων.



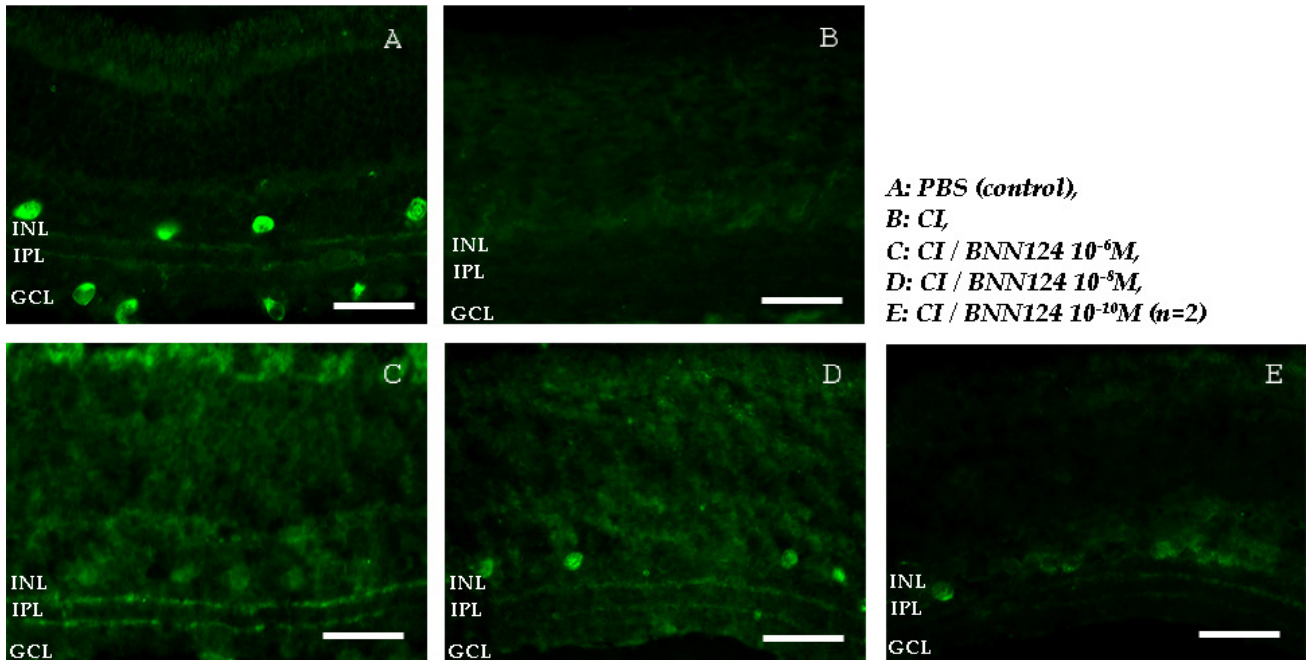
A: PBS (control),  
 B: CI,  
 C: CI / BNN50  $10^{-6}M$ ,  
 D: CI / BNN50  $10^{-8}M$ ,  
 E: CI / BNN50  $10^{-10}M$  (n=3)

**Εικόνα 3.1i:** Ανοσοδραστικότητα της Recoverin.

**Scale bar: 20 $\mu$ m**



Το νευροστεροειδές BNN124 παρουσίασε νευροπροστατευτική δράση έναντι της ισχαιμίας αλλά λιγότερο έντονη από τα DHEA και BNN50. Στην **Εικόνα 3.1κ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της ChAT. Το BNN124 προστάτευσε ικανοποιητικά τα χολινεργικά κύτταρα από την χημική ισχαιμία σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (C-D) ενώ σε χαμηλότερη, η επίδραση μειώνεται δραστικά (E).



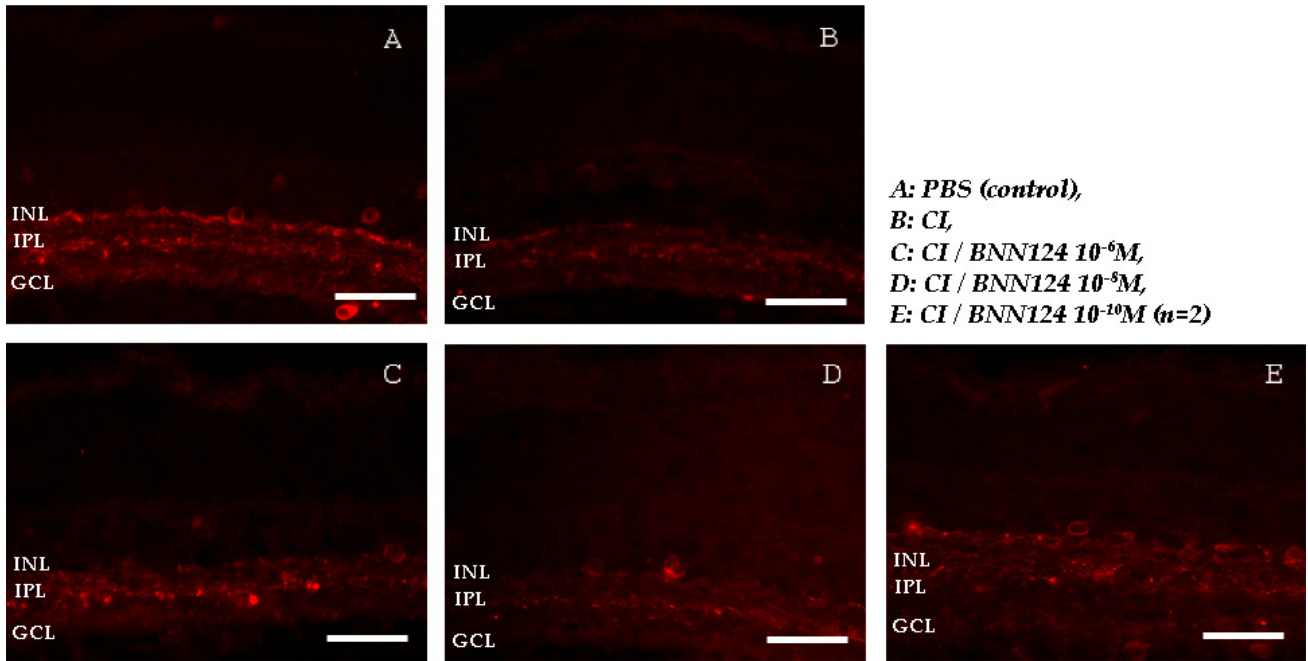
**Εικόνα 3.1κ:** Ανοσοδραστικότητα της ChAT.

**Scale bar: 20μm**

Στην **Εικόνα 3.1λ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της bNOS. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, ο αριθμός των bNOS-θετικών κυττάρων και των προεκβολών που παρατηρούνται στην IPL και GCL επανέρχεται κοντά σε επίπεδα ελέγχου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του νευροστεροειδούς BNN124 (C-D).

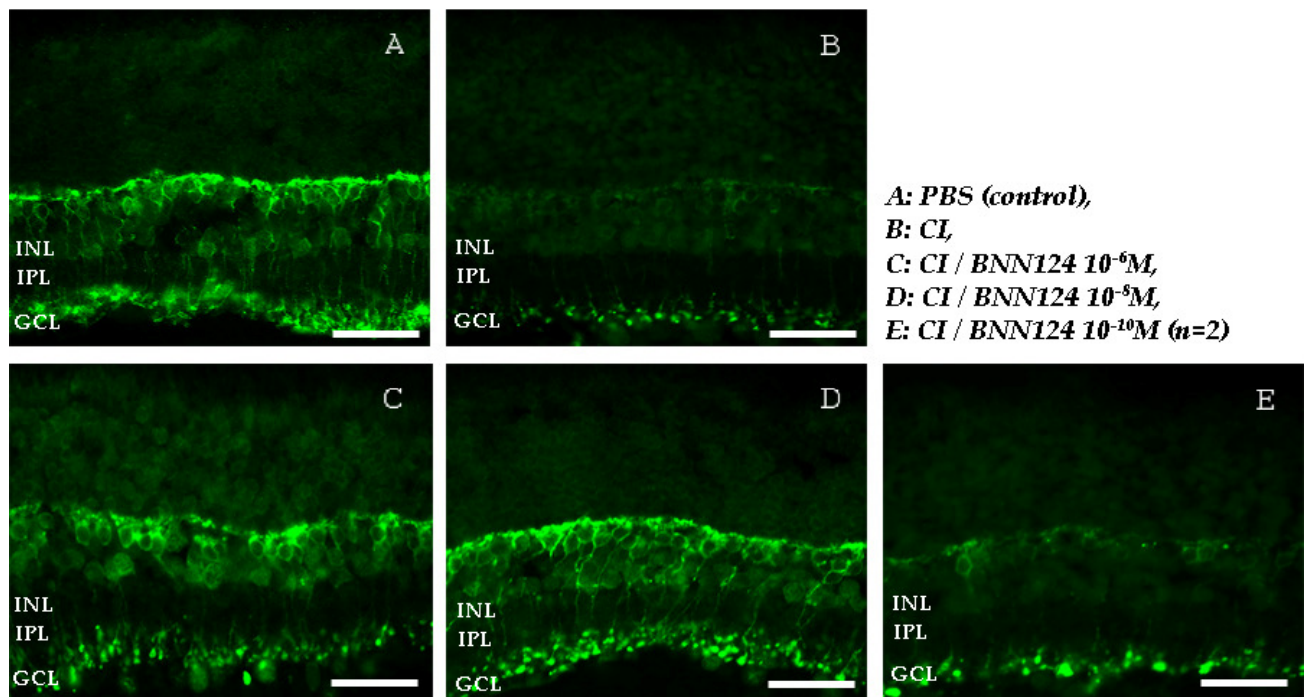
Στην **Εικόνα 3.1μ** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοδραστικότητας της PKC. Το νευροστεροειδές BNN124 προστάτευσε τα δίπολα κύτταρα από τις επιπτώσεις της χημικής ισχαιμίας, κυρίως σε συγκεντρώσεις  $10^{-6}M$  (C) και  $10^{-8}M$  (D).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 3.1λ:** Ανοσοδραστικότητα της bNOS.

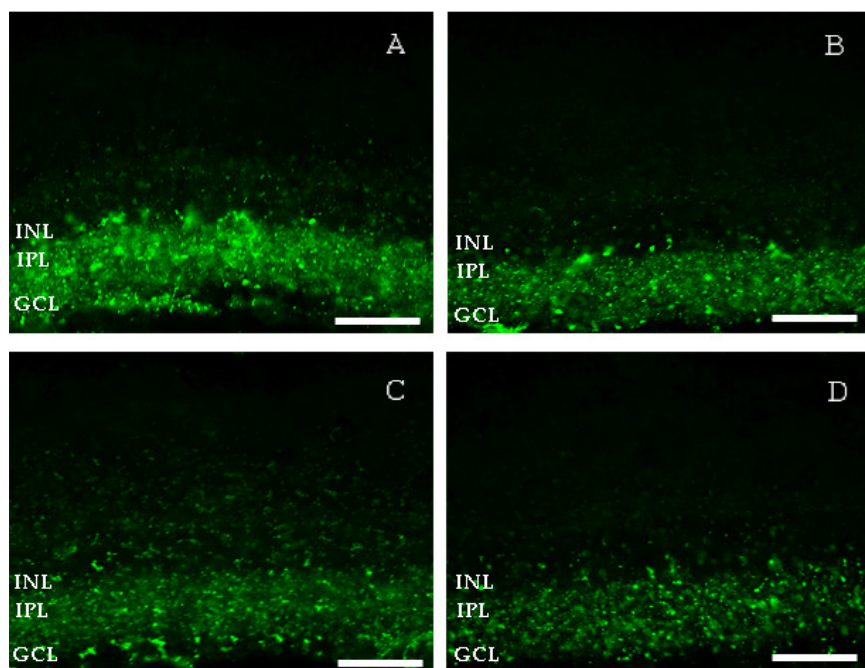
**Scale bar: 20µm**



**Εικόνα 3.1μ:** Ανοσοδραστικότητα της PKC.

**Scale bar: 20µm**

Επειδή στην ανοσοϊστοχημεία της MAP1 παρατηρήθηκαν ελάχιστες διαφορές μεταξύ των πειραματικών και των ζώνων ελέγχου, δοκιμάστηκε ένας δεύτερος δείκτης, με τον ίδιο κυτταρικό τύπο ως στόχο, για να ελεγχθεί το ενδεχόμενο να φανούν εντονότερες διαφορές. Ο δείκτης αυτός ήταν η Thy-1 (CD90), η οποία δεσμεύει μία GPI-συνδεδεμένη γλυκοπρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Εκφράζεται εκτός των άλλων και σε νευρικά κύτταρα και πιθανώς εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρων και προσδετών κατά τη συναπτογένεση και άλλες διεργασίες στον εγκέφαλο. Και σε αυτή την περίπτωση οι μεταβολές της ανοσοδραστικότητας της Thy-1 (**Εικόνα 3.1v**) δεν ήταν αρκετές ώστε να οδηγήσουν σε συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των διαφορετικών μεταχειρίσεων.



**Εικόνα 3.1v:** Ανοσοδραστικότητα της Thy-1.

A: PBS (control), B: CI, C: CI / BNN124  $10^{-6}M$ , D: CI / BNN124  $10^{-8}M$ , E: CI / BNN124  $10^{-10}M$  (n=1)

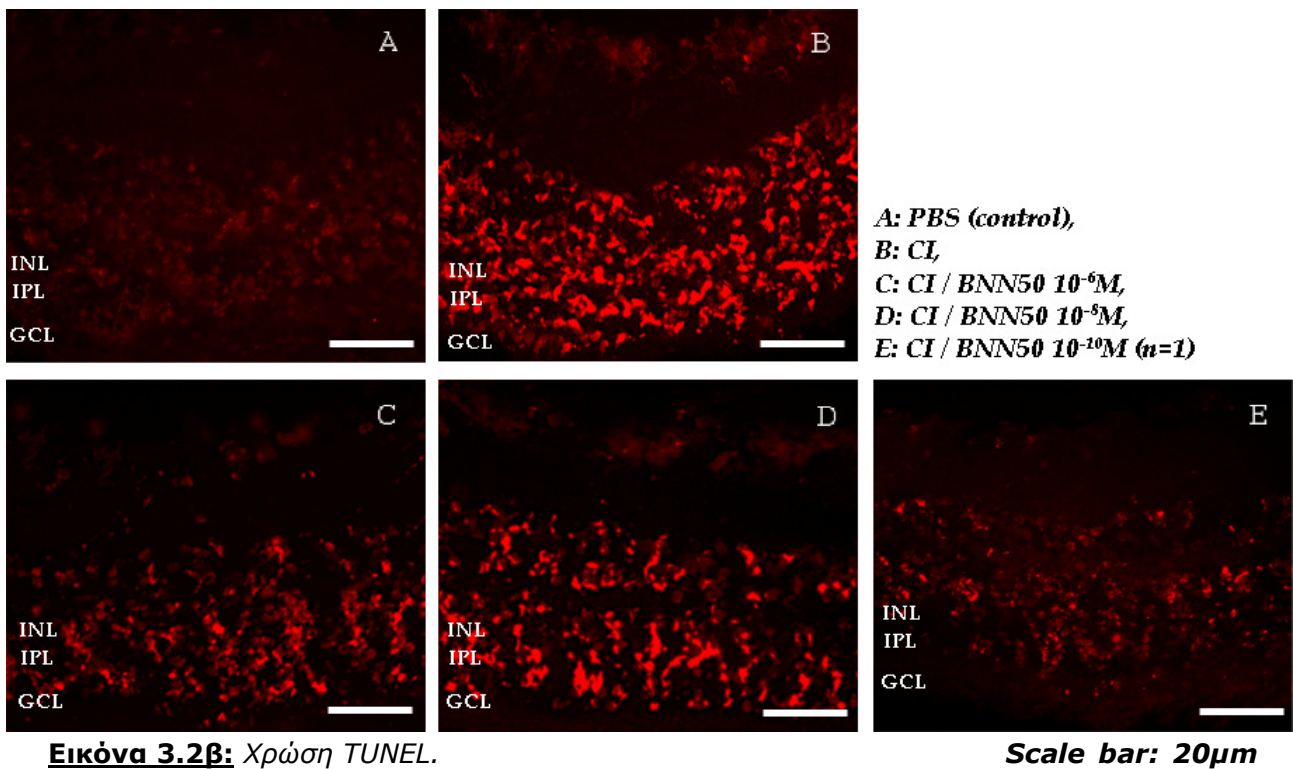
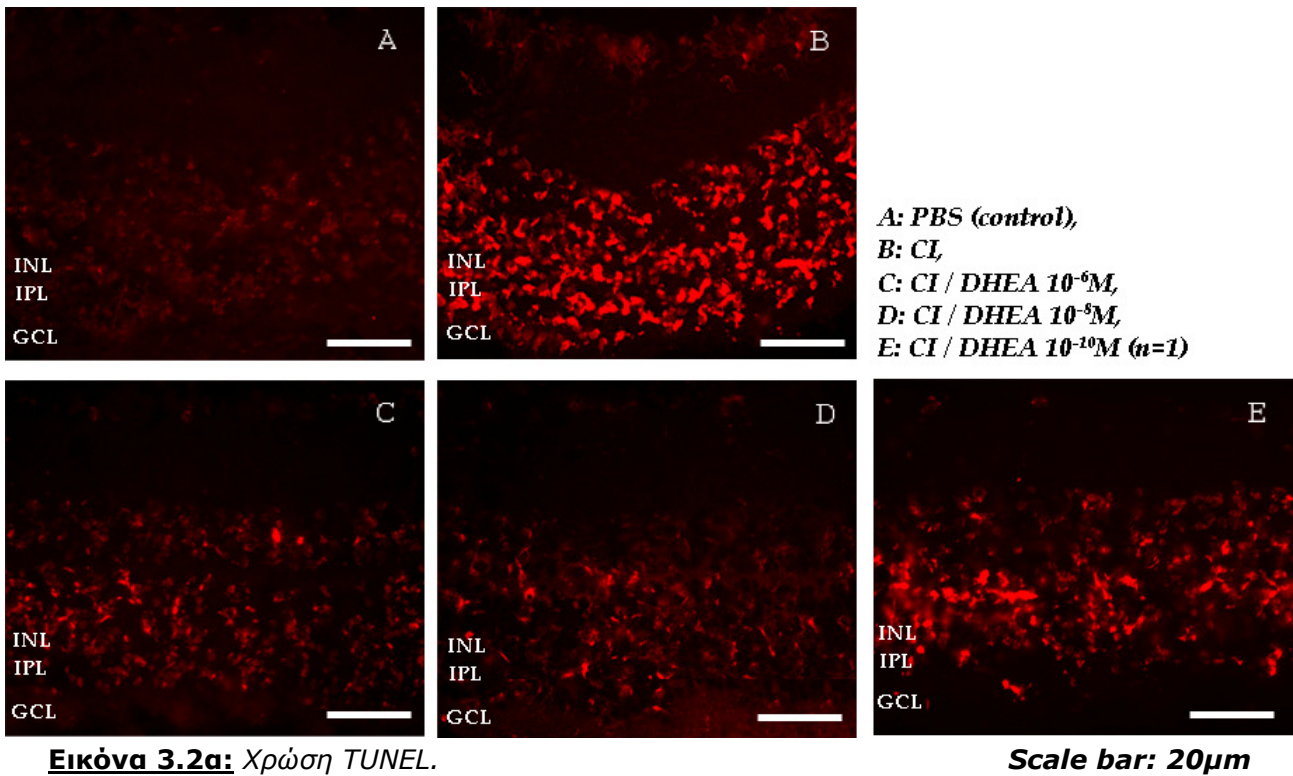
**Scale bar: 20μm**

### 3.2. TUNEL ANALYSIS

Η χρώση TUNEL (Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) υποστήριξε ακόμα περισσότερο την νευροπροστατευτική δράση των νευροστεροειδών. Αποτελεί μία κοινή μέθοδος εντοπισμού αποδιαταγμένου DNA λόγω αποπτωτικών μονοπατιών. Πιθανώς σηματοδοτεί και νεκρωτικά κύτταρα. Στις εικόνες **3.2α** και **3.2β** φαίνονται οι χρώσεις TUNEL για τα νευροστεροειδή DHEA και BNN50 αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση ο αριθμός των αποπτωτικών / νεκρωτικών κυττάρων μειώνεται θεαματικά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις DHEA (**Εικόνα 3.2α**: C-D). Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα από την δράση

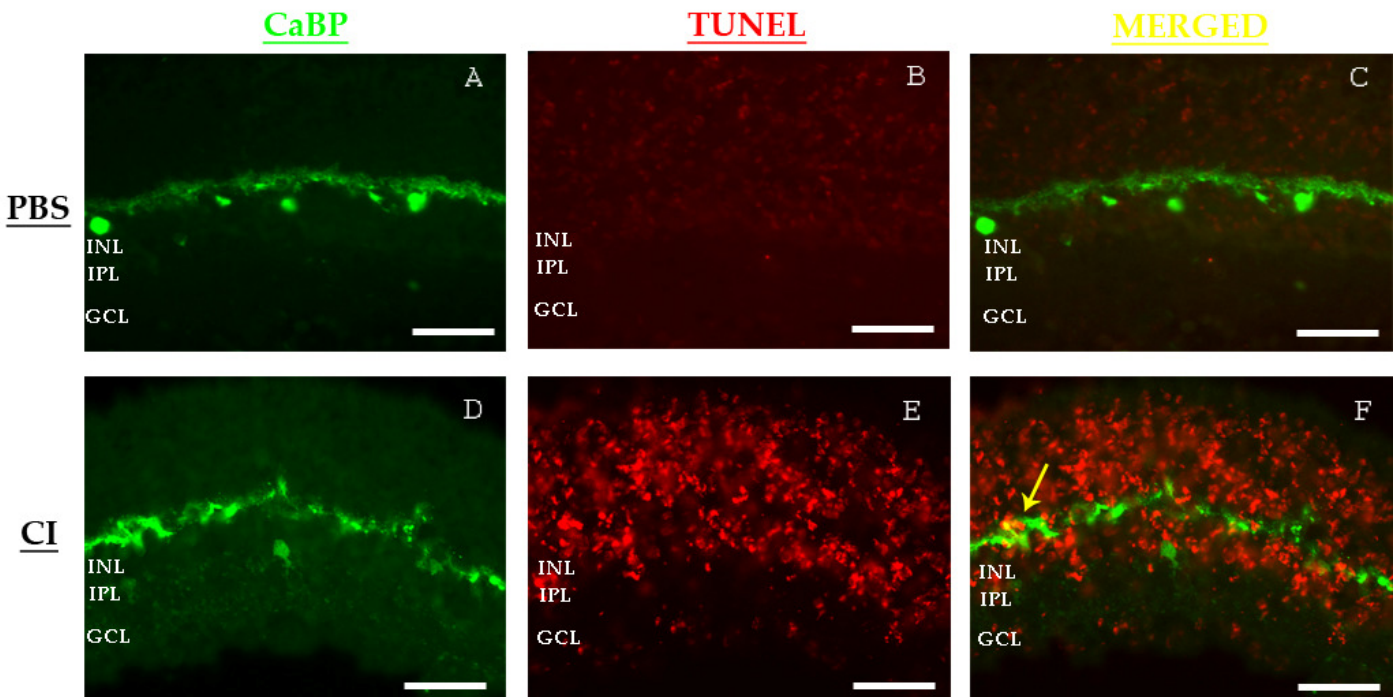
### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

του νευροστεροειδούς BNN50 ακόμα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση, της τάξεως των  $10^{-10}M$  (**Εικόνα 3.2β**: E).



### 3.3. ΔΙΠΛΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (DOUBLE LABELLING)

Σε μια προσπάθεια ταυτοποίησης των αποπτωτικών / νεκρωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες διπλού φθορισμού. Στην **Εικόνα 3.3α** φαίνονται τα αποτελέσματα διπλού φθορισμού με χρώση TUNEL (B,E) και το αντίσωμα για την πρωτεΐνη CaBP (A,D) σε ιστούς ελέγχου (A-C) και πειραματικούς ιστούς ισχαιμίας (D-F). Η CaBP ανήκει σε μία υποοικογένεια πρωτεϊνών που δεσμεύουν ασβέστιο, παρόμοιες με την καλμοδουλίνη. Εντοπίζεται αποκλειστικά στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο. Στον αμφιβληστροειδή, συγκεκριμένα, εκφράζεται μόνο από τα οριζόντια κύτταρα και χρησιμοποιήθηκε για πειράματα διπλού φθορισμού επειδή, όπως φαίνεται στις προηγούμενες εικόνες, η στοιβάδα των αποπτωτικών / νεκρωτικών κυττάρων εντοπίζεται σε παρόμοιο επίπεδο με τη στοιβάδα των οριζόντιων κυττάρων. Από τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκαν αποπτωτικά οριζόντια κύτταρα (F).

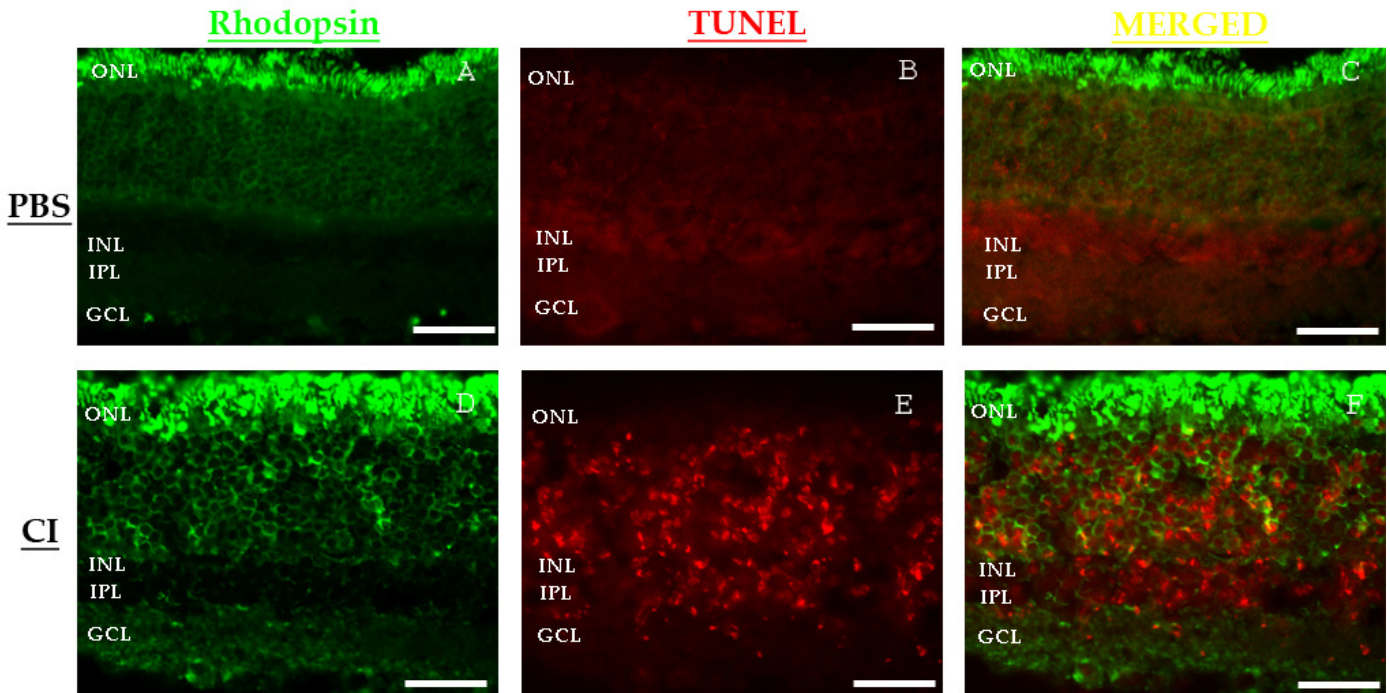


**Εικόνα 3.3α:** A: Ανοσοδραστικότητα της CaBP, B: Χρώση TUNEL, C: Συγχωνευμένες εικόνες, D: Ανοσοδραστικότητα της CaBP, E: Χρώση TUNEL, F: Συγχωνευμένες εικόνες (n=1).

**Scale bar: 20μm**

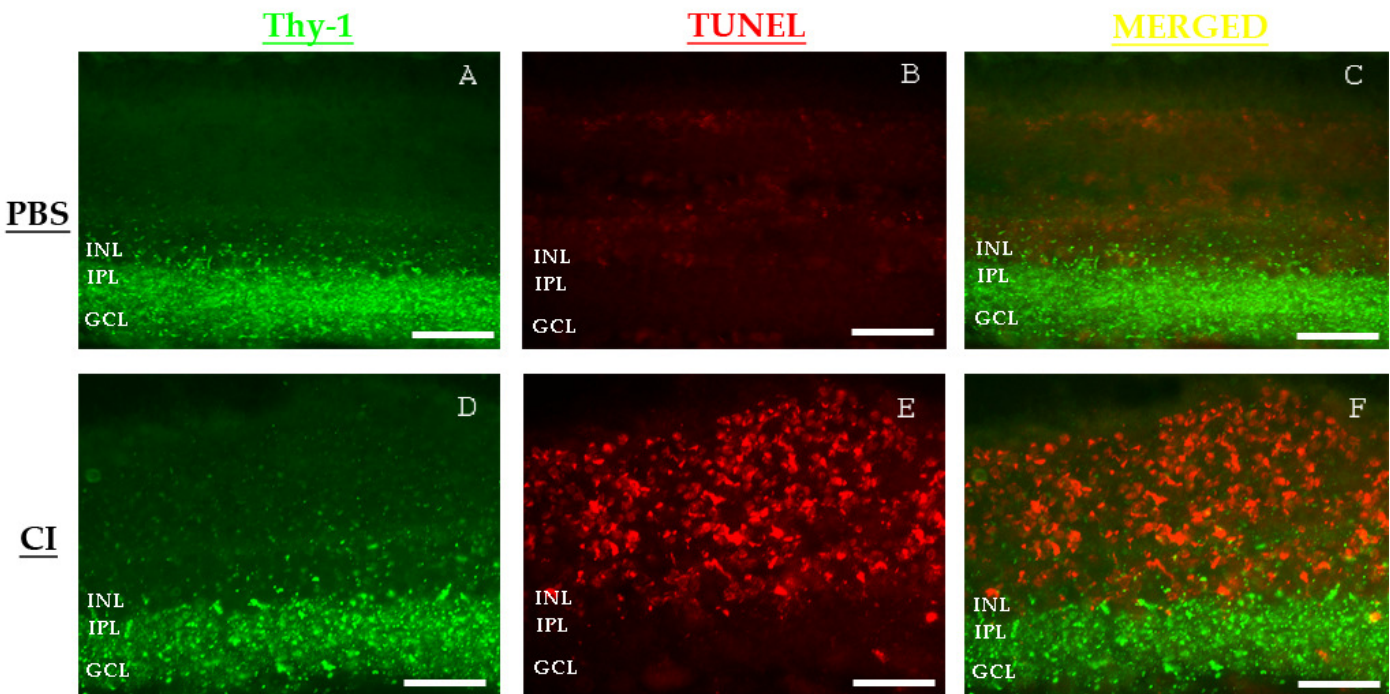
Στην **Εικόνα 3.3β** φαίνονται τα αποτελέσματα διπλού φθορισμού με χρώση TUNEL (B,E) και το αντίσωμα για την πρωτεΐνη ροδοψίνη (A,D) σε ιστούς ελέγχου (A-C) και πειραματικούς ιστούς ισχαιμίας (D-F). Η διαδικασία μετατροπής του φωτός σε ηλεκτροχημικό σήμα εκκινείται από την απορρόφηση φωτός από τη μεμβρανική πρωτεΐνη ροδοψίνη. Η ενεργοποιημένη ροδοψίνη ενεργοποιεί την τρανσδουκίνη, μια G πρωτεΐνη, ενώ απενεργοποιείται από την πρωτεΐνη αρρεστίνη. Στον αμφιβληστροειδή, η ροδοψίνη εντοπίζεται αποκλειστικά στο

εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων. Δεν εντοπίστηκαν διπλά σημασμένα κύτταρα.



**Εικόνα 3.3β:** A: Ανοσοδραστικότητα της Rhodopsin, B: Χρώση TUNEL, C: Συγχωνευμένες εικόνες, D: Ανοσοδραστικότητα της Rhodopsin, E: Χρώση TUNEL, F: Συγχωνευμένες εικόνες (n=1).

Scale bar: 20μm



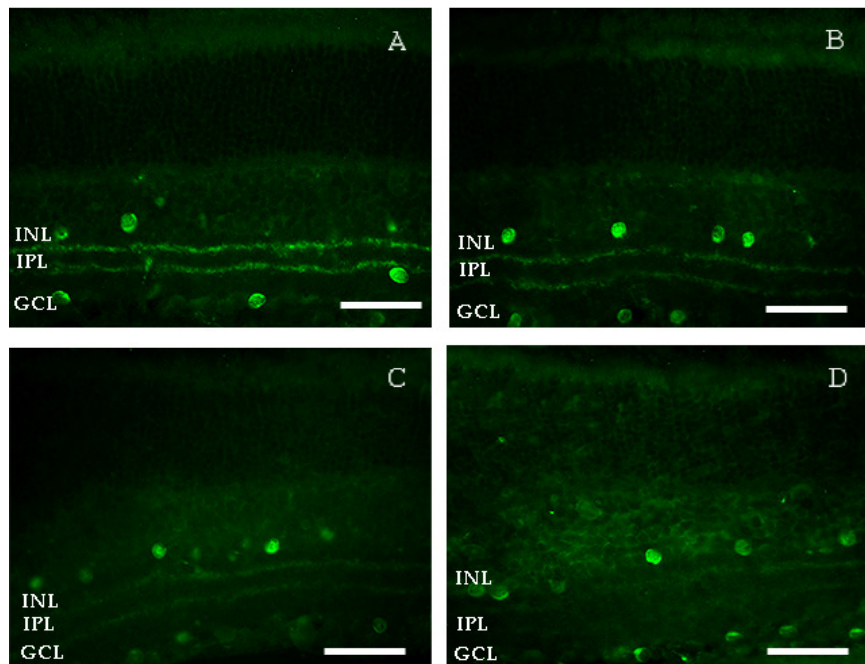
**Εικόνα 3.3γ:** A: Ανοσοδραστικότητα της Thy-1, B: Χρώση TUNEL, C: Συγχωνευμένες εικόνες, D: Ανοσοδραστικότητα της Thy-1, E: Χρώση TUNEL, F: Συγχωνευμένες εικόνες (n=1).

Scale bar: 20μm

Στην **Εικόνα 3.3γ** φαίνονται τα αποτελέσματα διπλού φθορισμού με χρώση TUNEL (B,E) και το αντίσωμα για την πρωτεΐνη Thy-1 (A,D) σε ιστούς ελέγχου (A-C) και πειραματικούς ιστούς ισχαιμίας (D-F). Δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός αποπτωτικών κυττάρων με κύτταρα που εκφράζουν την Thy-1.

### 3.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, ο παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος να οφείλεται σε τοξικότητα των νευροστεροειδών (είτε λόγω υψηλής συγκέντρωσης είτε λόγω δράσης), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία της ChAT, όπου οι πειραματικοί ιστοί επώαστηκαν για τους ίδιους χρόνους με νευροστεροειδή στην μέγιστη συγκέντρωση όπως στο πρωτόκολλο της ισχαιμίας αλλά απουσία του μείγματος ισχαιμίας (**Εικόνα 3.4α**). Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην ανοσοϊστοχημεία της ChAT μεταξύ των πειραματικών (B-D) και των ιστών ελέγχου(A).



**Εικόνα 3.4α:** Ανοσοδραστικότητα της ChAT.

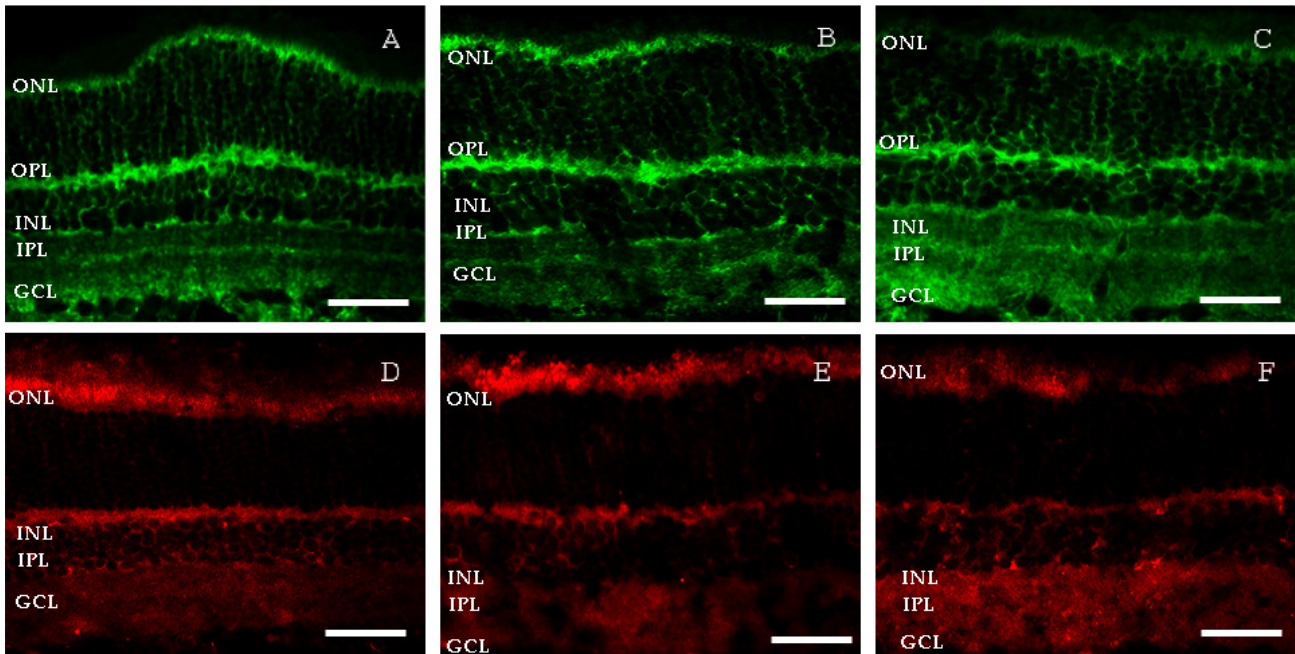
A: PBS (control), B: DHEA  $10^{-6}M$  C: BNN50  $10^{-6}M$ , D: BNN124  $10^{-6}M$ , (n=1)

**Scale bar: 20μm**

### 3.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

Ως πρώτοι υποψήφιοι υποδοχείς για το μηχανισμό προστατευτικής δράσης των νευροστεροειδών, θεωρήθηκαν (με βάση τη βιβλιογραφία) ο υποδοχέας των νευροτροφινών p75 και ο υποδοχέας TrkA. Ο NGFR p75 (Nerve Growth Factor Receptor - p75NTR) προσδένει NGF και άλλες νευροτροφίνες όπως BDNF, NT3,

NT4/5 με παρόμοια συγγένεια. Εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα Schwann και νευρώνες. Ο NGFR p75 είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση της νευρωνικής ανάπτυξης, μετανάστευσης, διαφοροποίησης και κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη του κεντρικού και περιφερειακού νευρικού συστήματος. Επειδή ο NGFR p75 στερείται καταλυτικής δραστηριότητας, έχει προταθεί ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TrkA σχηματίζοντας υψηλής συγγένειας θέσεις πρόσδεσης και ρυθμίζει τη σηματοδότηση μέσω του TrkA. Αυτοί οι υποδοχείς διαθέτουν μία ενδοκυτταρική περιοχή θανάτου (death domain) που συνδέεται με παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης ή ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Ο TrkA εμφανίζει υψηλή συγγένεια προς το νευρικό αυξητικό παράγοντα (nerve growth factor - NGF). Προσδένει NGF και αυτοφωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα τυροσίνης για να ενεργοποιήσει αρκετές downstream πρωτεΐνες - τελεστές. Στην **Εικόνα 3.5α** παρουσιάζεται η ανοσοδραστικότητα των p75 (A-C) και TrkA (D-F), όπου γίνεται εμφανές ότι οι υποδοχείς δεν επηρεάζονται ή καταστρέφονται από τις διαφορετικές μεταχειρίσεις.



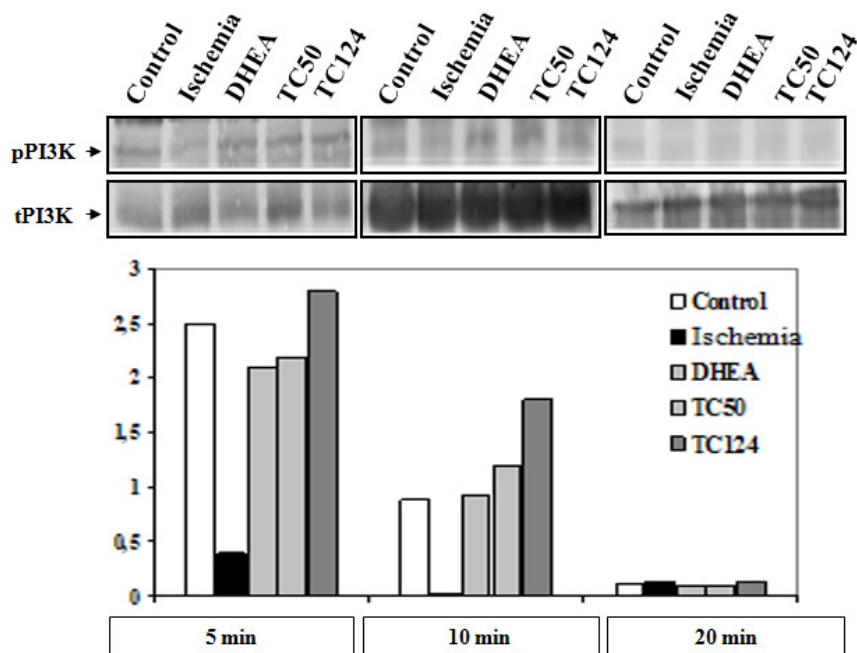
**Εικόνα 3.5α:** (A) - (C) Ανοσοϊστοχημεία με  $\alpha$ -p75, (D) - (F) Ανοσοϊστοχημεία με  $\alpha$ -TrkA.

A: PBS (control), B: CI, C: CI / DHEA  $10^{-8}M$ , D: PBS (control), E: CI, F: CI / DHEA  $10^{-8}M$  (n=1)  
**Scale bar: 20 $\mu$ m**

Στην **Εικόνα 3.5β** φαίνονται τα αποτελέσματα από Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη PI3K και την φωσφορυλιωμένη μορφή της (pPI3K) στις διαφορετικές μεταχειρίσεις, σε διαφορετικές χρονικές διάρκειες επαγωγής της χημικής ισχαιμίας. Το γράφημα αποτελεί την απεικόνιση της κανονικοποίησης της ενεργοποιημένης μορφής (pPI3K) σε συνάρτηση με την συνολική (tPI3K). Η PI3K φαίνεται να αναστέλλεται κατά την ισχαιμία, ενώ ενεργοποιείται στα πολύ πρώιμα

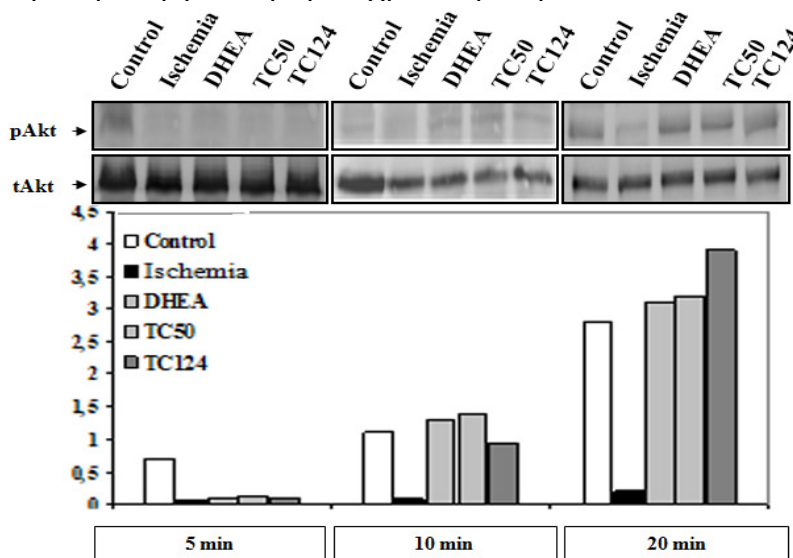


στάδια δράσης των νευροστεροειδών (5min και 10min) τείνοντας σε απενεργοποίηση με την πάροδο του χρόνου (20min).



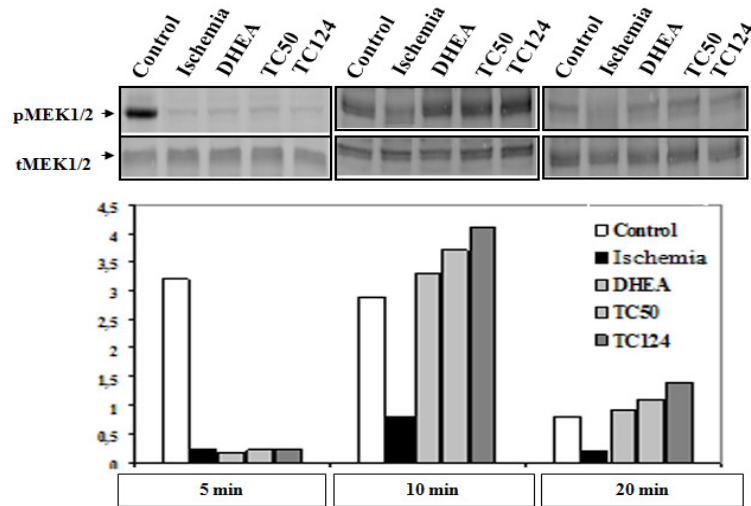
**Εικόνα 3.5β:** Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη pPI3K / tPI3K.

Στην **Εικόνα 3.5γ** φαίνονται τα αποτελέσματα από Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη Akt και την φωσφορυλιωμένη μορφή της (pAkt) στις διαφορετικές μεταχειρίσεις, σε διαφορετικές χρονικές διάρκειες επαγωγής της χημικής ισχαιμίας. Το γράφημα αποτελεί την απεικόνιση της κανονικοποίησης της ενεργοποιημένης μορφής (pAkt) σε συνάρτηση με την συνολική (tAkt). Η Akt φαίνεται να ακολουθεί αντίθετο πρότυπο ενεργοποίησης από την PI3K, εμφανίζοντας μέγιστη ενεργοποίηση σε χρονική διάρκεια 20min.



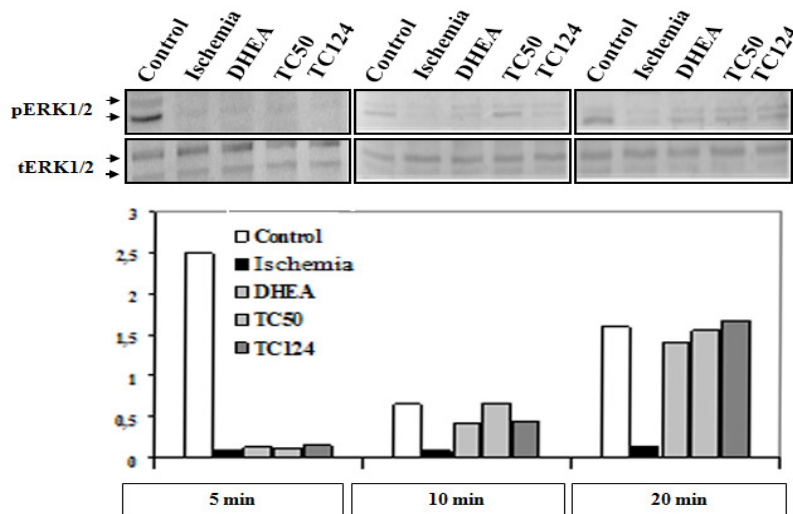
**Εικόνα 3.5γ:** Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη pAkt / tAkt.

Στην **Εικόνα 3.5δ** φαίνονται τα αποτελέσματα από Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη MEK1/2 και την φωσφορυλιωμένη μορφή της (pMEK1/2) στις διαφορετικές μεταχειρίσεις, σε διαφορετικές χρονικές διάρκειες επαγωγής της χημικής ισχαιμίας. Το γράφημα αποτελεί την απεικόνιση της κανονικοποίησης της ενεργοποιημένης μορφής (pMEK1/2) σε συνάρτηση με την συνολική (tMEK1/2). Τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης της MEK1/2 εμφανίζουν σχετική καθυστέρηση (10min), ενώ δεν φαίνεται να διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα.



**Εικόνα 3.5δ:** Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη pMEK1/2 / tMEK1/2.

Στην **Εικόνα 3.5ε** φαίνονται τα αποτελέσματα από Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη ERK1/2 και την φωσφορυλιωμένη μορφή της (pERK1/2) στις διαφορετικές μεταχειρίσεις, σε διαφορετικές χρονικές διάρκειες επαγωγής της χημικής ισχαιμίας. Το γράφημα αποτελεί την απεικόνιση της κανονικοποίησης της ενεργοποιημένης μορφής (pERK1/2) σε συνάρτηση με την συνολική (tERK1/2). Η έκφραση της ERK1/2 τείνει να αυξάνεται καθώς αυξάνεται η διάρκεια δράσης των νευροστεροειδών.



**Εικόνα 3.5ε:** Western Blot Analysis για την πρωτεΐνη pERK1/2 / tERK1/2.

Για τη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής δράσης των νευροστεροειδών σε από ισχαιμία επαγόμενη νευροτοξικότητα στον αμφιβληστροειδή, χρησιμοποιήθηκε ένα *in vitro* φαρμακολογικό μοντέλο χημικής ισχαιμίας, το οποίο εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε τομές από ιππόκαμπο<sup>(77)</sup>. Η χημική ισχαιμία περιλαμβάνει τον αποκλεισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της γλυκόλυσης και θεωρείται χρήσιμη για την κατανόηση πρώιμων γεγονότων στα πλαίσια της παθοφυσιολογίας της ισχαιμίας. Επώση των οφθαλμικών ιστών από αρουραίο με το μείγμα της χημικής ισχαιμίας για 1h επηρέασε αρκετούς κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς, συμπεριλαμβανομένων των χολινεργικών, των δίπολων κυττάρων και των NOS-θετικών κυττάρων. Επιπλέον, με τη χρώση TUNEL παρατηρήθηκε αυξημένος νευρωνικός θάνατος σε αμφιβληστροειδή με ισχαιμία.

Αναζητώντας, αρχικά σε κυτταρικό επίπεδο, την επίδραση του φαινομένου ισχαιμία / νευροπροστασία, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι φωτοϋποδοχείς εμφανίζονται ως ο λιγότερο ευπαθής κυτταρικός τύπος. Σε ανάλογα συμπεράσματα έχουν καταλήξει και άλλες μελέτες σχετικά με την επίδραση της ισχαιμίας στην βιωσιμότητα των φωτοϋποδοχέων. Σε ένα μοντέλο οξείας αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας σε αρουραίο με αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης (*intraocular pressure, IOP*) για 60min που ακολουθείται από 7 ημέρες επαναιμάτωσης, παρατηρήθηκε μείωση του εύρους των κυμάτων α στο ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (*electroretinogram, ERG*)<sup>(14)</sup>. Καθώς τα κύματα αυτά αποτελούν τη συνολική ηλεκτρική αντίδραση των φωτοϋποδοχέων, συμπεραίνεται ότι τα κύτταρα αυτά επηρεάζονται κατά τις συνθήκες ισχαιμίας. Επιμέρους μελέτες καταδεικνύουν αποπτωτικό θάνατο σε φωτοϋποδοχείς και επαγωγή της κασπάσης 3 στα κύτταρα αυτά μετά από μόλις 24h επαναιμάτωσης<sup>(82)</sup>. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η επίδραση της ισχαιμίας στους φωτοϋποδοχείς σε μοντέλο αρτηριακής ισχαιμίας / επαναιμάτωσης σε οφθαλμό γάτας, είναι αρκετά περιορισμένη σε σχέση με τους ενδότερους αμφιβληστροειδικούς νευρώνες<sup>(71)</sup>. Το μεγαλύτερο ποσοστό των υπάρχοντων βιβλιογραφικών αναφορών, παρουσιάζει τους φωτοϋποδοχείς είτε σχετικά ανεπηρέαστους σε διαφορετικά μοντέλα ισχαιμίας είτε να εμφανίζουν κυτταρικό θάνατο κυρίως μετά το πέρας της ισχαιμίας, κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Ένα πιθανό αίτιο για την σχετική ανθεκτικότητα των φωτοϋποδοχέων είναι η υψηλή συγκέντρωση μιτοχονδρίων στα εσωτερικά τμήματα, τα οποία φυσιολογικά διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα  $pO_2$  και συνεπώς έχουν αναπτύξει αντισταθμιστικούς μηχανισμούς. Επίσης, πιθανώς αντικατοπτρίζει τα αυξημένα επίπεδα νευροσφαιρινών (*neuroglobins*) που σχετίζονται με τους φωτοϋποδοχείς<sup>(79)</sup>. Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ευαισθησία των φωτοϋποδοχέων είναι και η λειτουργία του RPE, καθώς διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση και επιβίωση των φωτοϋποδοχέων. Τέλος, η ευαισθησία των φωτοϋποδοχέων στην ισχαιμία εξαρτάται και από το βαθμό φωτισμού – προσαρμογής. Οι προσαρμοσμένοι στο φως φωτοϋποδοχείς τείνουν να είναι λιγότερο ευαίσθητοι και να ανακάμπτουν ταχύτερα από την πειραματική ισχαιμία, καθώς η κατανάλωση οξυγόνου και οι

μεταβολικές τους ανάγκες, είναι μειωμένες σε σχέση με τους μη προσαρμοσμένους στο φως φωτοϋποδοχείς. Τα ραβδία εμφανίζονται περισσότερο ευαίσθητα από τα κονία, πιθανώς επειδή τα κονία είναι ικανά να εξομαλύνουν αποτελεσματικότερα μεταβολές των ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ).

Τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς παρουσιάζουν χρόνια εκπόλωση κατά τη διάρκεια ισχαιμικών επεισοδίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ισχαιμία προκαλεί γενικευμένη εκπόλωση των νευρώνων με συνέπεια την αύξηση της απελευθέρωσης γλουταμινικού και τη συνεπακόλουθη ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμινικού. Τα γαγγλιακά κύτταρα εκφράζουν τόσο καϊνικού τύπου<sup>(53)</sup> όσο και τύπου NMDA ιονοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμινικού<sup>(23)</sup> και συνεπώς τόσο το καϊνικό οξύ όσο και το NMDA μπορούν αρχικά να οδηγήσουν στην απώλεια αυτών των νευρώνων. Η τοξικότητα στον αμφιβληστροειδή μετά από επίδραση των παραπάνω αγωνιστών των υποδοχέων του γλουταμινικού μπορεί να επεκταθεί σε άλλους νευρώνες με αυξανόμενο χρόνο και δόση. Τα γαγγλιακά κύτταρα των βοθρίων του αμφιβληστροειδούς (*parvocellular foveal ganglion cells*) θεωρούνται περισσότερο ευπροσάρμοστα στην ισχαιμία, καθώς η κεντρική όραση δεν χάνεται πλήρως σε αρκετές περιπτώσεις διάχυτης εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. Αντιφατικά δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την υπόθεση ότι οι μεγαλοκυτταρικοί (*magnocellular*) νευρώνες είναι περισσότερο ευπαθείς από τους *parvocellular* νευρώνες στο γλαύκωμα<sup>(50, 68)</sup>. Έχει προταθεί ότι αυτή η διαφορά οφείλεται στη μεγαλύτερη πυκνότητα υποδοχέων του NMDA που παρατηρείται στους μεγαλοκυτταρικούς νευρώνες, οι οποίοι τείνουν να είναι περισσότερο ευάλωτοι από την τοξικότητα μέσω NMDA<sup>(84)</sup>. Σε συνάρτηση με τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης (τα οποία εξάγονται κυρίως από την ανοσοδραστικότητα της MAP1 και της Thy-1 για τα γαγγλιακά κύτταρα), θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οι περιορισμένες έως ανύπαρκτες διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, οφείλονται στον παράγοντα του χρόνου. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, τα γαγγλιακά κύτταρα οδηγούνται σε σταδιακή εκφύλιση (συγκεκριμένα *chronic depolarization*) υπό συνθήκες ισχαιμίας. Στο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, η ισχαιμία εφαρμόστηκε για συνολικά 60min, χρόνος ο οποίος ενδεχομένως δεν είναι αρκετός για να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μοντέλο αυτό της χημικής ισχαιμίας παρέχει πληροφορίες, οι οποίες αντικατοπτρίζουν της άμεσες μεταβολές που συμβαίνουν κατά την ισχαιμία. Έχει δειχθεί ότι το ποσοστό κυτταρικού θανάτου των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς μετά από επαγωγή ισχαιμίας μέσω αυξημένης πίεσης, είναι άμεσα εξαρτώμενο από τη διάρκεια της ισχαιμίας<sup>(81)</sup>. Επιπλέον, τα γαγγλιακά κύτταρα θεωρούνται περισσότερο ευπαθή σε κυτταρικό θάνατο κάτω από συνθήκες υποξίας ή ανοξίας και συγκεκριμένα μέσω αποπτωτικού παρά νεκρωτικού μονοπατιού<sup>(12)</sup>.

Μορφολογικά, βιοχημικά και ανοσοϊστοχημικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι τα αμακρινικά κύτταρα πλήττονται σαφώς από την ισχαιμία ή την διεγερσιοξικότητα, αλλά όχι όλα στην ίδια έκταση. Εστιάζοντας μόνο σε

GABAεργικά αμακρινικά κύτταρα, παρατηρούνται διαφορές στην ευαισθησία τους<sup>(64, 65)</sup>. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η ευαισθησία των αμακρινικών κυττάρων στην ισχαιμία εξαρτάται κυρίως από το σύνολο των υποδοχέων και / ή των καναλιών ιόντων που χρησιμοποιούν. Ο αριθμός και ο υπότυπος των υποδοχέων του γλουταμινικού που εκφράζονται στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στην ταχεία αύξηση του εξωκυτταρικού γλουταμινικού κατά την διάρκεια της ισχαιμίας. Επιπλέον, ποικίλει η έκφραση υποδοχέων που προάγουν την προστασία όπως οι πουρινεργικοί (purinergic)<sup>(51)</sup>, οι GABAεργικοί<sup>(81)</sup> ή οι γλυκενεργικοί (glycinergic)<sup>(30)</sup>. Το γεγονός ότι η έκφραση μεγάλου αριθμού ιονοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού επηρεάζει την βιωσιμότητα αυτών των νευρώνων<sup>(19)</sup>, καθώς και οι μεταβολές στο ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα που προκαλούνται από αγωνιστές του γλουταμινικού, υποστηρίζουν ότι τα αμακρινικά κύτταρα εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών τύπων υποδοχέων του γλουταμινικού σε σχέση με τους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς<sup>(66)</sup>. Η διαφορική επίδραση της ισχαιμίας στα αμακρινικά κύτταρα ανάλογα με τον επιμέρους κυτταρικούς τύπους που υποστηρίζεται από την βιβλιογραφία, ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, τα αμακρινικά κύτταρα αποτελούν στόχους της ισχαιμίας. Τα χολινεργικά αμακρινικά κύτταρα (ανοσοδραστικότητα ChAT και bNOS) επηρεάζονται άμεσα από την χημική ισχαιμία σε βαθμό που να μπορούν να θεωρηθούν δείκτες της σωστής επαγωγής της, ενώ τα bNOS-θετικά αμακρινικά κύτταρα πλήττονται λιγότερο αλλά παραμένουν αξιοσημείωτα ευάλωτα σε μεταβολές. Τόσο τα χολινεργικά αμακρινικά κύτταρα όσο και τα bNOS-θετικά εντοπίζονται κυρίως στην INL του αμφιβληστροειδούς. Προηγούμενες μελέτες σε μοντέλο επαγωγής χημικής ισχαιμίας (απομάκρυνση της γλυκόζης αντικατάσταση του N<sub>2</sub> με 95% O<sub>2</sub>) για 60 ή 90 min έδειξαν ότι οι νευρώνες της INL του αμφιβληστροειδούς οδηγούνται σε εκφύλιση<sup>(40)</sup>. Η ευπάθεια των νευρώνων αυτών αποδίδεται κυρίως στην απελευθέρωση γλουταμινικού και την ενεργοποίηση τόσο NMDA όσο και μη NMDA υποδοχέων, οι οποίοι αφθονούν σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους. Αξιοσημείωτο δεδομένο αποτελεί το γεγονός ότι η πρόσληψη Ca<sup>2+</sup> που ενεργοποιείται από καϊνικό οξύ, καθώς και οι επακόλουθες διεγερσιοξικές συνθήκες, μεσολαβούνται από AMPA υποδοχείς αλλά όχι υποδοχείς του καϊνικού οξέος σε amacrine-like νευρώνες<sup>(22)</sup>. Τέλος, οι παρούσες παρατηρήσεις συμφωνούν και με μελέτες όπου εφαρμόστηκαν διαφορετικά πρότυπα ισχαιμίας και καταλήγουν σε εντονότερη φθορά των στοιβάδων INL αλλά και IPL του αμφιβληστροειδούς<sup>(13, 39)</sup>.

Κατά την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί ένας μεγάλος αριθμός μελετών, οι οποίες επικεντρώνονται στην προσπάθεια αποσαφήνισης του ρόλου του NO στην παθογένεση της ισχαιμικής φθοράς στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή. Σε μοντέλα τοπικής ή γενικευμένης ισχαιμίας στον εγκέφαλο, όλες οι ισομορφές της (endothelial NOS – eNOS, inducible / immunologic NOS – iNOS, neuronal / brain NOS – bNOS) ενεργοποιούνται στην μεταϊσχαιμική περίοδο οδηγώντας σε επακόλουθη παραγωγή NO. Συγκεκριμένα η σύνθεση των bNOS και eNOS

αυξάνεται λίγο μετά την εκδήλωση της ισχαιμίας, ίσως λόγω της αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων  $Ca^{2+}$ , ενώ η επαγωγή της iNOS καθυστερεί για αρκετές ώρες<sup>(62)</sup>. Αυξήσεις στην έκφραση των ισομορφών της NOS έχουν καταγραφεί και στον μεταϊσχαιμικό αμφιβληστροειδή, αν και παρατηρούνται διακυμάνσεις μεταξύ των μελετών. Οι διαφορές που εντοπίζονται οφείλονται πιθανότατα στα διαφορετικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται, καθώς και στους διαφορετικούς χρόνους εφαρμογής της ισχαιμίας. Έχει παρατηρηθεί ότι μεταξύ διαφορετικών μοντέλων αμφιβληστροειδοπαθειών παρατηρούνται μεταβολές στο πρότυπο μεταγραφής γονιδίων (temporal profiling of the transcriptome) ως απόκριση στις ισχαιμικές συνθήκες που πιθανώς επάγονται<sup>(2, 43, 44, 86)</sup>. Αύξηση της έκφρασης bNOS έχουν παρατηρηθεί σε κύτταρα του εσωτερικού τμήματος του αμφιβληστροειδούς μετά από ισχαιμία επαγόμενη από IOP<sup>(13, 34)</sup> καθώς και στο μοντέλο ισχαιμίας μέσω φραγής δύο αγγείων<sup>(47)</sup>. Παρόλα αυτά στο μοντέλο ισχαιμίας μέσω φραγής του δεματίου του οπτικού νεύρου (optic nerve bundle occlusion)<sup>(36)</sup> αλλά και σε προηγούμενη εφαρμογή του ίδιου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη<sup>(56)</sup>, επαληθεύεται η μείωση των κυττάρων που εκφράζουν bNOS κατά τις συνθήκες ισχαιμίας, όπως προτείνεται από τα παρόντα αποτελέσματα. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι προς διερεύνηση παραμένει ακόμα και η συμβολή της ενεργοποίησης των NOS στην βιωσιμότητα ή μη των κυττάρων κατά την ισχαιμία. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν τα ωφέλιμα αποτελέσματα της παραγωγής NO ως προς την βιωσιμότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς κατά την ισχαιμία<sup>(56)</sup>, αλλά και μελέτες που αναφέρουν ακριβώς τις αντίθετες παρατηρήσεις<sup>(62)</sup>. Όσον αφορά στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα από την παρατήρηση των bNOS-θετικών κυττάρων, θα μπορούσαν να συνδυαστούν με τα συμπεράσματα της χρώσης με PKC. Ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων κατά την εφαρμογή της ισχαιμίας οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$ , παράγοντας ικανός να ενεργοποιήσει τις ισομορφές της NOS είτε απ' ευθείας είτε μέσω της ενεργοποίησης των ισομορφών της ασβεστιοεξαρτώμενης PKC<sup>(57, 75)</sup>. Συνεπώς η παρατηρούμενη μείωση των bNOS-θετικών κυττάρων δικαιολογείται και στηρίζεται μερικώς από την παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης της PKC κατά την χημική ισχαιμία. Η PKC στον αμφιβληστροειδή αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των δίπολων κυττάρων και βασικό στοιχείο για την διεκπεραίωση της λειτουργίας τους ως μεταγωγείς πληροφοριών και σημάτων μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων (ραβδία και κονία με γαγγλιακά κύτταρα). Η PKC έχει προηγουμένα συνδεθεί με τη νευροπροστασία και συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι διάφορες ισομορφές της (PKC-delta, PKC-varpsilon) εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση που οδηγεί στην προστασία από ischemic preconditioning (IPC) και επιπλέον ότι δρουν καθοδικά των μιτοχονδριακών KATP καναλιών (mKATP)<sup>(18)</sup>. Προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί για την κατανόηση του μηχανισμού νευροπροστατευτικής δράσης της PKC προτείνουν ότι η φωσφορυλίωσή της αυξάνει την οξυποίηση (acidification) των συναπτικών κυστιδίων στα δίπολα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και συνεπώς έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις του γλουταμινικού εντός των συναπτικών κυστιδίων<sup>(1)</sup>.

Ένας μεγάλος αριθμός υποστρωμάτων έχει ελεγχθεί για τη νευροπροστατευτική του δράση σε φθορά του αμφιβληστροειδούς (**Πίνακας 4α**). Τα νευροστεροειδή έχουν συνδεθεί στο παρελθόν με τη

Substances	Optic nerve injury	NMDA	Ischaemia
$\alpha_2$ -Adrenoceptor agonists	Protective	Unknown	Protective
BDNF	Protective	Protective	Protective
CNTF	Protective	Protective	Protective
bFGF	Protective	Unknown	Protective
Caspase-1 inhibitors	Not protective	Protective	Protective
Caspase-3 inhibitors	Protective	Unknown	Protective
NMDA antagonists	Protective	Protective	Protective

**Πίνακας 4α:** Επίδραση διαφορετικών υποστρωμάτων σε φθορά του αμφιβληστροειδούς που οφείλεται σε τραυματισμό του οπτικού νεύρου, τοξικότητα επαγόμενη από NMDA ή ισχαιμία<sup>(63)</sup>.

νευροπροστασία. Αν και πολλά νευροστεροειδή επηρεάζουν τη νευρωνική ανάπτυξη και τη μυελίνωση, η πλειοψηφία των δεδομένων προτείνει ότι η σημαντικότερη δράση των νευροστεροειδών είναι οι αντιαποπτωτικές τους ιδιότητες. Η απόπτωση αποτελεί το τελικό στάδιο σε αρκετές νευρολογικές ασθένειες περιλαμβανομένων των Alzheimer, Parkinson και Huntington, εγκεφαλικό και πολλαπλή και πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)<sup>(49)</sup>. Εναρκτήριοι παράγοντες, όπως διεγερσιτοξικότητα, οξειδωτικό stress, απομάκρυνση αυξητικών παραγόντων, κυτοκίνες και τοξίνες, συχνά αλληλεπιδρούν για να αναπτύξουν μηχανισμούς που συνδέονται με αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ή μια ανάμικτη μορφή νέκρωσης και απόπτωσης. Είναι γνωστό ότι μία προσβολή δεν επιφέρει μόνο αρνητικές αλλά και θετικές αποκρίσεις, ενεργοποιώντας τις νευρωνικές άμυνες. Ως αποτέλεσμα, κάποιοι νευρώνες ενδίδουν συντομότερα, ενώ άλλοι παραμένουν ανεπηρέαστοι<sup>(42, 95)</sup>. Στα πλαίσια αυτών των διεργασιών, το στεροειδικό περιβάλλον του κεντρικού νευρικού συστήματος θεωρείται πολύ σημαντικό, καθώς μεταβάλλεται ως λειτουργία του κύκλου ζωής και ως συστατικό κυκλωμάτων που ενεργοποιούνται από stress και ασθένειες, επιδρώντας στην ακεραιότητα, τη λειτουργικότητα και την ανθεκτικότητα του κεντρικού νευρικού συστήματος σε τοξικές επιθέσεις<sup>(26, 80)</sup>.

Τα στεροειδή DHEA και DHEAS επέφεραν νευροπροστασία σε πυραμιδικούς νευρώνες αλλά και σε γλοιακά κύτταρα τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συνθήκες σε δομές του ιπποκάμπου<sup>(46)</sup> και απομονωμένους αμφιβληστροειδείς<sup>(33)</sup>. Άλλοι σουλφιδικοί εστέρες νευροστεροειδών, όπως της αλοπρεγνανολόνης, έχουν αναφερθεί να φέρουν ενδεχόμενες νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε δομές του ιπποκάμπου που πλήττονται από αγωνιστές των NMDA υποδοχέων<sup>(88)</sup>. Οι αναφορές για αυτές τις ιδιότητες των νευροστεροειδών συμφωνούν με τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης και αντιστοιχίζονται άμεσα με τις παρατηρήσεις για την επίδραση της DHEA στην χημική ισχαιμία. Σχετικά με τη λειτουργία των δύο νέων νευροστεροειδών, BNN50 και BNN124, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές εφόσον αποτελούν νέες συνθετικές ουσίες. Δεδομένου,

όμως, ότι η δράση των δύο νευροστεροειδών, όπως φαίνεται μέσα από το μοντέλο χημικής ισχαιμίας της μελέτης, μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με την ανάλογη δράση του γνωστού νευροστεροειδούς DHEA στο ίδιο μοντέλο, είναι δυνατόν να γενικευθούν τα συμπεράσματα και στα τρία νευροστεροειδή που χρησιμοποιήθηκαν.

Σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους, τα νευροστεροειδή έχουν συνδεθεί με την ενεργοποίηση της μεταφραστικής ενεργότητας του NF-κΒ (nuclear factor-kappa B)<sup>(55)</sup>. Σύμφωνα με δύο ισχύουσες θεωρίες, το DHEA (άρα πιθανώς και τα BNN50, BNN124) δρα περιορίζοντας ή μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του ελεύθερου ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά από μαζική έκθεση σε NMDA, ή δρώντας ως ανταγωνιστής των γλυκοκορτικοειδών<sup>(46)</sup>.

Από την χρησιμοποίηση διαφορετικών συγκεντρώσεων νευροστεροειδών γίνεται εμφανές ότι η έκφραση των νευροπροστατευτικών τους ιδιοτήτων εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωσή τους. Με βάση αυτή την παρατήρηση θα μπορούσε να υποθεθεί ότι δεν προστατεύουν από το νευρωνικό θάνατο μέσα από ένα γενικευμένο μοντέλο ενεργοποίησης αντιαποπτωτικών παραγόντων. Πιθανώς αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με κυτταρικά μονοπάτια και υποδοχείς, σε τέτοιο βαθμό ώστε η συγκέντρωση των νευροστεροειδών και η δέσμευσή τους με τους υποδοχείς να διέπεται από τις φαρμακοδυναμικές ιδιότητές τους. Στον αμφιβληστροειδή έχει αναφερθεί η δόσοεξαρτώμενη επίδραση του NMDA στη σύνθεση της προγνεολόνης και πρεγνεολόνης<sup>(33)</sup>. Για την επίδραση αυτή υπήρξε ξεκάθαρη συσχέτιση ανάμεσα στην αύξηση της νευροστεροειδογένεσης και την έκθεση των ιστών σε NMDA, που ήταν ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων. Η ρύθμιση της νευροστεροειδογένεσης αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό με τον οποίο οι ευπαθείς σε NMDA περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος αντιδρούν στην ενδεχόμενη βλάβη από την εκτεταμένη έκθεση σε γλουταμινικό. Η μέσω NMDA ενεργοποίηση της σύνθεσης νευροστεροειδών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα πρώιμο στάδιο απόκρισης σε οξεία διεγερσιτοξικότητα, προοριζόμενο να καθυστερήσει / προστατεύσει από τον νευρωνικό κυτταρικό θάνατο<sup>(15)</sup>. Επιπλέον, αποτελεί ένδειξη της αλληλεπίδρασης των ενδογενών νευροστεροειδών με το γλουταμινεργικό σύστημα, η οποία στην περίπτωση που είναι αμφίδρομη, μπορεί εν μέρει να στηρίζει την προστατευτική δράση εξωγενούς χορήγησης νευροστεροειδών ως αποτέλεσμα της ρύθμισης των υποδοχέων του γλουταμινικού. Έχει προταθεί, επίσης, ότι υπάρχει μία εξειδικευμένη θέση πρόσδεσης νευροστεροειδών πάνω στο μόριο των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων, υποδεικνύοντας την ενδεχόμενη αλλοστερική ρύθμιση και κατ' επέκταση αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών και με το GABAεργικό σύστημα<sup>(41)</sup>. Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται και από προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι η αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών με τους GABA<sub>A</sub> υποδοχείς εξαρτάται από την σύσταση των υπομονάδων τους<sup>(3, 37)</sup>. Τα δύο αυτά συστήματα νευροδιαβιβαστών (γλουταμινεργικό και GABAεργικό) αποτελούν τα δύο βασικά συστήματα μεταγωγής σημάτων στον αμφιβληστροειδή, συνεπώς είναι πιθανό η οξεία νευροπροστατευτική δράση των νευροστεροειδών όπως παρατηρείται από την παρούσα μελέτη, να μεσολαβεί από τη ρύθμιση αυτών των συστημάτων.



Σχετικά πρόσφατα, έχει προταθεί η νευροπροστατευτική δράση των νευροστεροειδών (συγκεκριμένα των 17β-οιστραδιόλης και DHEA-S) μέσω θέσεων πρόσδεσης στους  $\sigma_1$  υποδοχείς των οπιοειδών<sup>(6)</sup>. Τα στεροειδή DHEA/S και PREG/S (με μειωμένη δραστηριότητα ανάλογα με το μοντέλο) δρουν ως αγωνιστές των  $\sigma_1$  υποδοχέων. Ενδέχεται, λοιπόν, τα στεροειδή να ρυθμίζουν άμεσα τη νευρική ενδοκυτταρική ομοιόσταση του  $Ca^{2+}$  και να συμβάλλουν στο σχηματισμό και την ανασύσταση λιπιδικών μικροπεριοχών μέσω της ενεργοποίησης των  $\sigma_1$  υποδοχέων. Σε αυτή τη δράση παρεμβαίνει, πιθανώς συνεργατικά, η άμεση επίδραση των στεροειδών στους υποδοχείς NMDA και  $GABA_A$ <sup>(58)</sup>.

Η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης των νευροστεροειδών περιπλέκεται περισσότερο αν ληφθούν υπόψη μελέτες που αναφέρουν νευροπροστατευτική δράση των DHEA και DHEAS σε νευρικής ακρολοφίας PC12 κύτταρα (neural crest derived PC12 cells), τα οποία είναι αρνητικά σε NMDA και  $GABA_A$  υποδοχείς, μετά από επαγωγή απόπτωσης με στέρηση του ορού. Η προστασία επιτεύχθηκε με την ενεργοποίηση των NF-κB και CREB, δύο upstream ρυθμιστικών παραγόντων των αντιαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών<sup>(11)</sup>. Στο ίδιο σύστημα, τα παραπάνω νευροστεροειδή ενεργοποίησαν την έκκριση κατεχολαμινών, εντός λίγων λεπτών έκθεσης και σε συγκεντρώσεις της τάξεως των nanomolars<sup>(9)</sup>. Η ταχεία εμφάνιση της επίδρασης του DHEA σε κύτταρα PC12 προτείνει την εμπλοκή εξειδικευμένων μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης και ειδικότερα μιας Gi πρωτεΐνης με θέση πρόσδεσης της DHEA<sup>(7, 90)</sup>. Σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, τα αποτελέσματα των πειραμάτων από Western Blot Analysis κατέδειξαν την επαγωγή διαδοχικών πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών (συγκεκριμένα των PI3K-Akt και Src-MEK1/2-ERK1/2) από τα υπό μελέτη νευροστεροειδή. Τα DHEA, BNN50 και BNN124 αύξησαν εντός 5min τη φωσφορυλίωση της PI3K και εντός 10min τη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στην χρονική διαδοχή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο κινασών, όπως αυτή τεκμηριώνεται βιβλιογραφικά. Τα νευροστεροειδή που μελετήθηκαν επάγουν την φωσφορυλίωση της κινάσης PI3K σε διάστημα 5min και αυτή η φωσφορυλίωση στη συνέχεια μεταφέρεται στην κινάση Akt που αποτελεί υπόστρωμα της PI3K. Η ρύθμιση της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/Akt πιθανώς έπεται της προαναφερθείσας ενεργοποίησης G-πρωτεϊνών. Επίσης, μελετήσαμε την ικανότητα των νευροστεροειδών DHEA, BNN50 και BNN124 να ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση των δύο κινασών MEK1/2 και ERK1/2. Με χρονο-εξαρτώμενη επίδραση για 10 εως και 20min τα στεροειδή αυτά διέγειραν τη φωσφορυλίωση και των δύο κινασών, υποστηρίζοντας περαιτέρω την άμεση συμμετοχή του μονοπατιού αυτού στην αντι-αποπτωτική τους δράση. Τα ανωτέρω στεροειδή αυξάνουν τη φωσφορυλίωση των MEK1/2 με τη μέγιστη δράση τους να παρατηρείται στα 10 λεπτά. Στην χρονική στιγμή των 20min παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης της κινάσης ERK1/2, από τα υπό μελέτη νευροστεροειδή.

Τα πειραματικά ευρήματα που εντοπίζονται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, προτείνουν ότι φυσικά και συνθετικά νευροστεροειδή φέρουν έναν υποσχόμενο ρόλο στην αποτροπή και θεραπεία αρκετών νευροεκφυλιστικών ασθενειών είτε αυτές σχετίζονται με τον αμφιβληστροειδή είτε με άλλες περιοχές του νευρικού συστήματος. Αναστέλλοντας άμεσα τον αποπτωτικό θάνατο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, νευροστεροειδή όπως DHEA ή αλλοπρεγνανολόνη, πιθανώς να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση αυτών των ασθενειών, καθώς οι συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν κυρίως στα συμπτώματα παρά στην εξέλιξη της νόσου <sup>(25)</sup>. Τα νευροστεροειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των νευρώνων από την απόπτωση. Καθώς ανακαλύπτονται καινούρια νευροστεροειδή και συνθετικά ανάλογά τους, εμφανίζεται ως εξέχουσας σημασίας η διεκρίνιση της δράσης τους στην νευρωνική αναγέννηση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών και πρόδρομων κυττάρων σε *in vivo* και *ex vivo* συνθήκες. Η ανανέωση των βλαστικών κυττάρων ρυθμίζεται από μια δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων, επιγενετικού ελέγχου, ρυθμιστές microRNA και ενδογενή σήματα από το μικροπεριβάλλον όπου εδρεύουν τα βλαστικά κύτταρα <sup>(10)</sup>. Η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα ενδογενή και συνθετικά νευροστεροειδή επιδρούν σε αυτά τα δίκτυα μπορεί να παρέχει δεδομένα τόσο για τη βασική νευροεπιστήμη όσο και για κλινικές εφαρμογές θεραπειών βασιζόμενες σε βλαστικά κύτταρα <sup>(72)</sup>. Τέλος, η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες των νευροστεροειδών μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη επιλεκτικών φαρμακολογικών εργαλείων για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Η ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή αντιπροσωπεύει ένα από τα βασικά αίτια που οδηγούν σε μία πληθώρα αμφιβληστροειδοπαθειών. Η ισχαιμία αποτελεί επακόλουθο της ανεπάρκειας της κυκλοφορίας του αίματος να καλύψει τις μεταβολικές ανάγκες του αμφιβληστροειδούς, οδηγώντας ενδεχομένως σε βλάβη της όρασης και τύφλωση λόγω της επαγόμενης νευροεκφύλισης. Συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα υποστηρίζουν την νευροπροστατευτική δράση ορισμένων στεροειδών που συντίθενται στο νευρικό σύστημα και καλούνται *νευροστεροειδή*. Στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η έλεγχος της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής δράσης των νευροπεπτιδίων Dehydroepiandrosterone (DHEA) και δύο νέων συνθετικών νευροστεροειδών, BNN50 (Tc50) και BNN124 (Tc124), χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο χημικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. Για τη μελέτη της επαγωγής ισχαιμίας / νευροπροστασίας χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο ανοσοϊστοχημικών δεικτών, χαρακτηριστικών για τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς. Αναλυτικότερα: (1) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για τη choline acetyltransferase (ChAT, 1:100) ως δείκτης για χολινεργικά αμακρινικά κύτταρα, (2) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεϊνική κινάση C (PKC, 1:50) ως δείκτης για τα δίπολα κύτταρα, (3) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για τη microtubule-associated protein-1 (MAP1, 1:100) ως δείκτης για τα γαγγλιακά κύτταρα, (4) ένα πολυκλωνικό αντίσωμα για τη brain nitric oxide synthase (bNOS, 1:2,000) ως δείκτης για τα κύτταρα που εκφράζουν τη συνθάση του NO, (5) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη recoverin (1:50) ως δείκτης για τους φωτοϋποδοχείς, (6) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη calbindin (CaBP, 1:800) ως δείκτης για τα οριζόντια κύτταρα, (7) ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για το thymocyte differentiation antigen 1 (Thy1, 1:10). Επιπλέον, για την μελέτη του κυτταρικού θανάτου πραγματοποιήθηκε TUNEL assay, καθώς και ανοσοϊστοχημικές μελέτες διπλού φθορισμού για την ταυτοποίηση των αποπτωτικών / νεκρωτικών κυττάρων. Τέλος, επιχειρήθηκε η αποσαφήνιση του μηχανισμού προστατευτικής δράσης των νευροστεροειδών με τη χρήση Western Blot Analysis. Η επαγωγή της χημικής ισχαιμίας οδήγησε σε σημαντική μείωση της ανοσοδραστικότητας των ChAT, bNOS και PKC, επίδραση η οποία σε μεγάλο βαθμό αναστρέφεται με την χορήγηση των υπό μελέτη νευροστεροειδών. Το DHEA προστάτευσε τους ισχαιμικούς ιστούς με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο (συγκεντρώσεις  $10^{-6}$  M,  $10^{-8}$  M και  $10^{-10}$  M). Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και για τα δύο συνθετικά νευροστεροειδή, όπου το BNN50 επέφερε σημαντική νευροπροστατευτική δράση ακόμα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ( $10^{-12}$  M), ενώ το BNN124 εμφάνισε βέλτιστη δράση σε συγκέντρωση  $10^{-8}$  M. Η νευροπροστατευτική δράση των νευροστεροειδών υποστηρίζεται περαιτέρω από τα δεδομένα των TUNEL assays. Ο πρωταρχικός ρόλος των νευροστεροειδών ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες, έχει δειχθεί και προηγούμενα προτείνοντας πιθανή εφαρμογή τους για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών παθολογιών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν την προαναφερθείσα δράση των DHEA, BNN50 και BNN124 και επιχειρούν μία πρώτη προσέγγιση προς την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους.

1. **Abreu BJ, Guimaraes M, Uliana LC, Vigh J, von Gersdorff H, Prado MA, and Guatimosim C.** Protein kinase C modulates synaptic vesicle acidification in a ribbon type nerve terminal in the retina. *Neurochem Int*, 2008.
2. **Agudo M, Perez-Marin MC, Lonngren U, Sobrado P, Conesa A, Canovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallbook F, and Vidal-Sanz M.** Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis* 14: 1050-1063, 2008.
3. **Belelli D, Casula A, Ling A, and Lambert JJ.** The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacol* 43: 651-661, 2002.
4. **Benn SC and Woolf CJ.** Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev* 5: 686-700, 2004.
5. **Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, and Diemer NH.** Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43: 1369-1374, 1984.
6. **Bucolo C and Drago F.** Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: role of sigma1 recognition sites. *Eur J Pharmacol* 498: 111-114, 2004.
7. **Charalampopoulos I, Alexaki VI, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, Calogeropoulou T, Margioris AN, Castanas E, and Gravanis A.** G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J* 20: 577-579, 2006.
8. **Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, Minas V, Dermitzaki E, Lasaridis I, Vardouli L, Stournaras C, Margioris AN, Castanas E, and Gravanis A.** Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann NY Acad Sci* 1088: 139-152, 2006.
9. **Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN, and Gravanis A.** Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinol* 146: 3309-3318, 2005.
10. **Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, and Gravanis A.** Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metabol: TEM* 19: 300-307, 2008.
11. **Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN, and Gravanis A.** Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 8209-8214, 2004.
12. **Chen YN, Yamada H, Mao W, Matsuyama S, Aihara M, and Araie M.** Hypoxia-induced retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of beta-adrenergic antagonists. *Brain Res* 1148: 28-37, 2007.
13. **Cheon EW, Park CH, Kang SS, Cho GJ, Yoo JM, Song JK, and Choi WS.** Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol. *Neurosci Lett* 330: 265-269, 2002.
14. **Chidlow G, Schmidt KG, Wood JP, Melena J, and Osborne NN.** Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacol* 43: 1015-1025, 2002.
15. **Compagnone NA and Mellon SH.** Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21: 1-56, 2000.

16. **Davidson CM, Pappas BA, Stevens WD, Fortin T, and Bennett SA.** Chronic cerebral hypoperfusion: loss of pupillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration. *Brain Res* 859: 96-103, 2000.
17. **Dijk F, van Leeuwen S, and Kamphuis W.** Differential effects of ischemia/reperfusion on amacrine cell subtype-specific transcript levels in the rat retina. *Brain Res* 1026: 194-204, 2004.
18. **Dreixler JC, Shaikh AR, Shenoy SK, Shen Y, and Roth S.** Protein kinase C subtypes and retinal ischemic preconditioning. *Exp Eye Res* 87: 300-311, 2008.
19. **Duarte CB, Ferreira IL, Santos PF, Carvalho AL, Agostinho PM, and Carvalho AP.** Glutamate in life and death of retinal amacrine cells. *Gen Pharmacol* 30: 289-295, 1998.
20. **Ehinger B and Falck B.** Concomitant adrenergic and parasympathetic fibres in the rat iris. *Acta Physiol Scand* 67: 201-207, 1966.
21. **Ferreira IL, Duarte CB, and Carvalho AP.** 'Chemical ischemia' in cultured retina cells: the role of excitatory amino acid receptors and of energy levels on cell death. *Brain Res* 768: 157-166, 1997.
22. **Ferreira IL, Duarte CB, and Carvalho AP.** Kainate-induced retina amacrine-like cell damage is mediated by AMPA receptors. *Neurorep* 9: 3471-3475, 1998.
23. **Fletcher EL, Hack I, Brandstatter JH, and Wassle H.** Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Compar Neurol* 420: 98-112, 2000.
24. **Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Gelezianas R, Bradshaw RA, and Greene WC.** NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* 20: 7556-7563, 2000.
25. **Forman MS, Trojanowski JQ, and Lee VM.** Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10: 1055-1063, 2004.
26. **Garcia-Segura LM, Azcoitia I, and DonCarlos LL.** Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60, 2001.
27. **Globus MY, Busto R, Martinez E, Valdes I, Dietrich WD, and Ginsberg MD.** Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *J Neurochem* 57: 470-478, 1991.
28. **Greene JG and Greenamyre JT.** Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48: 613-634, 1996.
29. **Greenstein B and Greenstein A.** *Color atlas of neuroscience : neuroanatomy and neurophysiology.* Stuttgart ; New York: Thieme, 2000.
30. **Grunert U.** Distribution of GABA and glycine receptors on bipolar and ganglion cells in the mammalian retina. *Micro Res Tech* 50: 130-140, 2000.
31. **Guarneri P, Cascio C, Russo D, D'Agostino S, Drago G, Galizzi G, De Leo G, Piccoli F, Guarneri M, and Guarneri R.** Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration. *Ann NY Acad Sci* 1007: 117-128, 2003.
32. **Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, and Papadopoulos V.** Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem* 63: 86-96, 1994.
33. **Guarneri P, Russo D, Cascio C, De Leo G, Piccoli T, Sciuto V, Piccoli F, and Guarneri R.** Pregnenolone sulfate modulates NMDA receptors, inducing and potentiating acute excitotoxicity in isolated retina. *J Neurosci Res* 54: 787-797, 1998.

34. **Gwon JS, Ju WK, Park SJ, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, and Chun MH.** The regulatory expression of neuronal nitric oxide synthase in the ischemic rat retina. *Neurorep* 12: 3385-3389, 2001.
35. **Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, and Hamberger A.** Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 5: 413-419, 1985.
36. **Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, and Yoshimura N.** Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 450-458, 1999.
37. **Hill-Venning C, Belelli D, Peters JA, and Lambert JJ.** Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Br J Pharmacol* 120: 749-756, 1997.
38. **Hoste AM, Boels PJ, Andries LJ, Brutsaert DL, and De Laey JJ.** Effects of beta-antagonists on contraction of bovine retinal microarteries in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1231-1237, 1990.
39. **Izumi Y, Benz AM, Kurby CO, Labruyere J, Zorumski CF, Price MT, and Olney JW.** An ex vivo rat retinal preparation for excitotoxicity studies. *J Neurosci Meth* 60: 219-225, 1995.
40. **Izumi Y, Hammerman SB, Kirby CO, Benz AM, Olney JW, and Zorumski CF.** Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. *Vis Neurosci* 20: 97-107, 2003.
41. **Jaliffa CO, Howard S, Hoijman E, Salido E, Sarmiento MI, Arias P, and Rosenstein RE.** Effect of neurosteroids on the retinal gabaergic system and electroretinographic activity in the golden hamster. *J Neurochem* 94: 1666-1675, 2005.
42. **Jellinger KA.** Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J Cell Mol Med* 5: 1-17, 2001.
43. **Kamphuis W, Dijk F, and Bergen AA.** Ischemic preconditioning alters the pattern of gene expression changes in response to full retinal ischemia. *Mol Vis* 13: 1892-1901, 2007.
44. **Kamphuis W, Dijk F, van Soest S, and Bergen AA.** Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina. *Mol Vis* 13: 1020-1030, 2007.
45. **Kaufman PL, Alm A, and Adler FH.** *Adler's physiology of the eye : clinical application.* St. Louis: Mosby, 2003.
46. **Kimionides VG, Khatibi NH, Svendsen CN, Sofroniew MV, and Herbert J.** Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 1852-1857, 1998.
47. **Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, Okeda R, and Tokoro T.** Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jap J Ophthalmol* 44: 235-244, 2000.
48. **Kousteni S, Chen JR, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino AT, Wen Y, Vertino AM, Powers CC, Stewart SA, Ebert R, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, and Manolagas SC.** Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 298: 843-846, 2002.
49. **Krantic S, Mechawar N, Reix S, and Quirion R.** Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28: 670-676, 2005.

50. **Kwong JM, Lam TT, and Caprioli J.** Hyperthermic pre-conditioning protects retinal neurons from N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat. *Brain Res* 970: 119-130, 2003.
51. **Larsen AK and Osborne NN.** Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2603-2611, 1996.
52. **Laties AM.** Central retinal artery innervation. Absence of adrenergic innervation to the intraocular branches. *Arch Ophthalmol* 77: 405-409, 1967.
53. **Lin B, Martin PR, and Grunert U.** Expression and distribution of ionotropic glutamate receptor subunits on parasol ganglion cells in the primate retina. *Vis Neurosci* 19: 453-465, 2002.
54. **Luo X, Lambrou GN, Sahel JA, and 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* 42: 2695-2705, 2001.
55. **Mao X and Barger SW.** Neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate: role of an NFkappaB-like factor. *Neurorep* 9: 759-763, 1998.
56. **Mastrodimou N, Lambrou GN, and Thermos K.** Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 44-53, 2005.
57. **Matsubara M, Hayashi N, Jing T, and Titani K.** Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem* 133: 773-781, 2003.
58. **Maurice T, Gregoire C, and Espallergues J.** Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 581-597, 2006.
59. **Monnet FP, Mahe V, Robel P, and Baulieu EE.** Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Nat Acad Sci USA* 92: 3774-3778, 1995.
60. **Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, and Hogg J.** Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem* 62: 1025-1033, 1994.
61. **O'Steen WK, Anderson KV, and Shear CR.** Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest Ophthalmol* 13: 334-339, 1974.
62. **Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, and Melena J.** Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Ret Eye Res* 23: 91-147, 2004.
63. **Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, and Melena J.** Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye (London, England)* 18: 1075-1084, 2004.
64. **Osborne NN and Herrera AJ.** The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neurosci* 59: 1071-1081, 1994.
65. **Osborne NN and Larsen AK.** Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem Int* 29: 263-270, 1996.
66. **Osborne NN, Melena J, Chidlow G, and Wood JP.** A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol* 85: 1252-1259, 2001.

67. **Osborne NN, Safa R, and Nash MS.** Photoreceptors are preferentially affected in the rat retina following permanent occlusion of the carotid arteries. *Vis Res* 39: 3995-4002, 1999.
68. **Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, and Nash MS.** Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1: S102-128, 1999.
69. **Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, and Donner DB.** NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nat* 401: 82-85, 1999.
70. **Paul SM and Purdy RH.** Neuroactive steroids. *FASEB J* 6: 2311-2322, 1992.
71. **Peachey NS, Green DJ, and Ripps H.** Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 58-65, 1993.
72. **Pellegrini G, De Luca M, and Arsenijevic Y.** Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 18: 805-818, 2007.
73. **Perche O, Doly M, and Ranchon-Cole I.** Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2753-2759, 2007.
74. **Pereira-Neves L and Ribeiro-da-Silva J.** Electrophysiology in pseudohistoplasmosis and chronic idiopathic retinal vasculitis. *Eur J Ophthalmol* 2: 179-189, 1992.
75. **Poljakovic M, Nygren JM, and Persson K.** Signalling pathways regulating inducible nitric oxide synthase expression in human kidney epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 469: 21-28, 2003.
76. **Purves D.** *Neuroscience*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Publishers, 2004.
77. **Reiner PB, Laycock AG, and Doll CJ.** A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci Lett* 119: 175-178, 1990.
78. **Santiago AR, Cristovao AJ, Santos PF, Carvalho CM, and Ambrosio AF.** High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiol Dis* 25: 464-472, 2007.
79. **Schmidt M, Giessl A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, and Burmester T.** How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem* 278: 1932-1935, 2003.
80. **Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, and Baulieu EE.** Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol* 29: 307-326, 2000.
81. **Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, and 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* 37: 2002-2014, 1996.
82. **Singh M, Savitz SI, Hoque R, Gupta G, Roth S, Rosenbaum PS, and Rosenbaum DM.** Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J Neurochem* 77: 466-475, 2001.
83. **Stevens WD, Fortin T, and Pappas BA.** Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: time course and role of light exposure. *Stroke* 33: 1107-1112, 2002.
84. **Sucher NJ, Lipton SA, and Dreyer EB.** Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vis Res* 37: 3483-3493, 1997.



85. **Syntichaki P and Tavernarakis N.** The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev* 4: 672-684, 2003.
86. **Thiersch M, Raffelsberger W, Frigg R, Samardzija M, Wenzel A, Poch O, and Grimm C.** Analysis of the retinal gene expression profile after hypoxic preconditioning identifies candidate genes for neuroprotection. *BMC Genom* 9: 73, 2008.
87. **Vornov JJ, Tasker RC, and Coyle JT.** Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* 25: 457-464; discussion 464-455, 1994.
88. **Weaver CE, Jr., Marek P, Park-Chung M, Tam SW, and Farb DH.** Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 10450-10454, 1997.
89. **Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, and Reme CE.** Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Ret Eye Res* 24: 275-306, 2005.
90. **Widstrom RL and Dillon JS.** Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Semin Reproduct Med* 22: 289-298, 2004.
91. **Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, and Bottner M.** Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinol* 142: 969-973, 2001.
92. **Wojtal K, Trojnar MK, and Czuczwar SJ.** Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep* 58: 335-340, 2006.
93. **Wood JP and Osborne NN.** The influence of zinc on caspase-3 and DNA breakdown in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 119: 81-88, 2001.
94. **Ye XD, Laties AM, and Stone RA.** Peptidergic innervation of the retinal vasculature and optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1731-1737, 1990.
95. **Yoles E and Schwartz M.** Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 116: 906-910, 1998.

***Η παρούσα εργασία παρουσιάστηκε υπό τη μορφή ανερτημένης ανακοινώσεως (poster) στο 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροεπιστημών που πραγματοποιήθηκε στο Ευγενίδιο Ίδρυμα Αθηνών από 16 έως 19 Οκτωβρίου 2008.***



# NEUROSTEROIDS AS NEUROPROTECTIVE AGENTS IN A MODEL OF RETINAL CHEMICAL ISCHEMIA



Panagiotis Giannogonas, Niki Mastrodimou, Ioannis Charalampopoulos, Achilleas Gravanis, Kyriaki Thermos

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, GR

## INTRODUCTION

### INTRODUCTION

Ischemia is the underlying cause of many ocular diseases that lead to blindness. Many strategies have been employed to develop therapeutic agents for the successful treatment of ischemia induced retinopathies and the prevention of visual loss. Neurosteroids have recently been shown to have antiapoptotic properties and to be neuroprotective due to their interaction with specific membrane DHEA-binding sites on the NTR receptor p75 [Charalampopoulos et al. 2004] and TrkA receptor [Charalampopoulos et al. 2006]. The aim of the present study was to investigate the putative neuroprotective properties of the known steroid dehydroepiandrosterone (DHEA) and two novel spiro-neurosteroids (BNN-50 and BNN-124) on chemically induced retinal ischemia [Mastrodimou et al. 2005].

## MATERIALS & METHODS

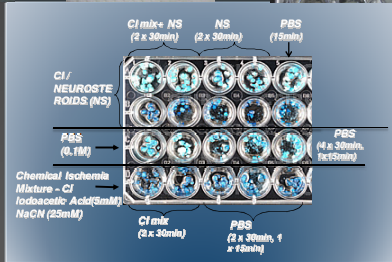
### MATERIALS & METHODS

**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).

**Surgical removal and isolation of rat eyecups,** which include the choroid, the retina and the sclera.



**Chemical ischemia:** Eyecups were immersed in PBS buffer alone and incubated for 15 min. Subsequently, eyecups were incubated with PBS alone or with PBS containing iodoacetic acid (IAA; 5 mM) and sodium cyanide (NaCN; 25 mM) (chemical ischemia solution) or with PBS containing chemical ischemia solution and neurosteroids (DHEA, Tc50, Tc124;  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  M) for 2x30 min, followed by incubation with PBS (control and ischemia groups) or neurosteroids in PBS (neuroprotection groups) for 2x30 min. Finally, eyecups were washed with PBS for 15 min. All incubations were performed at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>/95% air.



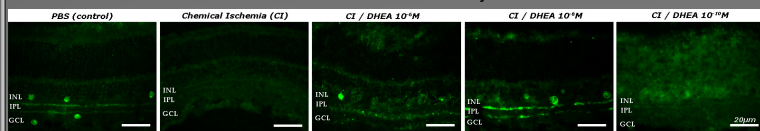
**Immunohistochemical studies:** Frozen eyecups were sectioned vertically at 10µm thickness using a cryostat. Mouse monoclonal antibodies raised against choline acetyltransferase (ChAT, 1:100, Biotrend, Cologne, Germany), protein kinase C (PKC, 1:50, Leinco Technologies, St. Louis, Mo., USA) and NGFR p75 (1:400) were employed as markers for acetylcholine-containing amacrine cells, rod bipolar cells and NGF receptor, respectively. Rabbit polyclonal antibodies raised against brain nitric oxide synthase (bNOS, 1:2,000, Sigma) and trkA (1:300) were also employed to detect bNOS expressing cells and TrkA receptor. Cryostat sections were incubated in 0.1 M TRIS buffered 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, Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (H+L) (1:400, Molecular Probes, Eugene, Ore., USA) for the monoclonal antibodies and Alexa Fluor546 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:300) for the polyclonal antibodies. Finally, the sections were washed and cover-slipped with mounting medium (Vector).

**TUNEL staining:** To determine apoptotic cell loss, enzymatic in situ labeling of apoptosis induced DNA strand breaks was performed using the TUNEL assay (Roche, Germany).

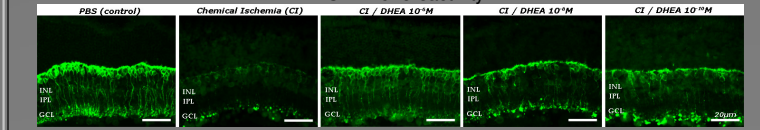
## RESULTS

### RESULTS

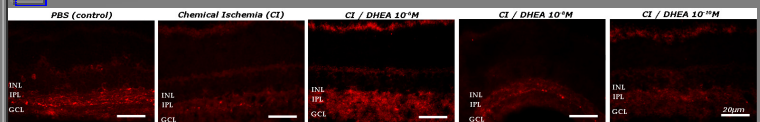
**1 Effect of DHEA on chemical ischemia in rat retina**  
ChAT immunoreactivity.



**2 PKC immunoreactivity.**

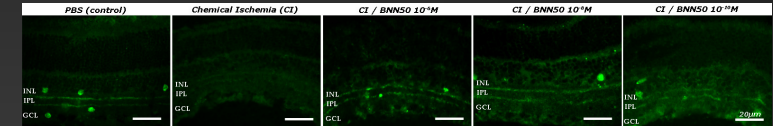


**3 bNOS immunoreactivity.**



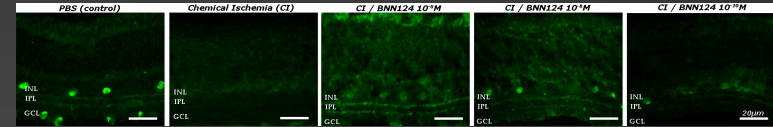
**DHEA protects against chemical ischemia in a concentration - dependent manner.**

**4 Effect of the novel neurosteroid BNN50 on chemical ischemia in rat retina**  
ChAT immunoreactivity.



**BNN50 was very effective in protecting cholinergic amacrine cells in a concentration dependent manner. BNN50 was also neuroprotective at a concentration of  $10^{-12}$ M.**

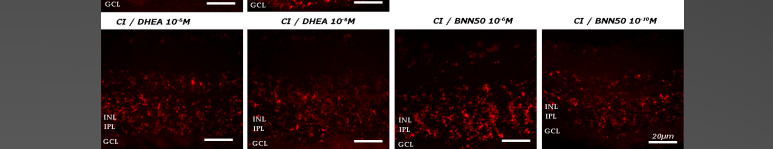
**5 Effect of the novel neurosteroid BNN124 on chemical ischemia in rat retina**  
ChAT immunoreactivity.



**BNN124 offered neuroprotection to the retina against chemical ischemia in a concentration dependent manner**

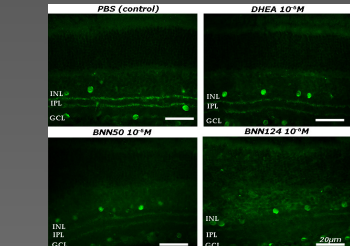
Immunohistochemistry experiments were performed employing all the markers mentioned in the MATERIALS & METHODS section. The two neurosteroids protected all cell types that were afflicted by chemical ischemia.

**6 TUNEL staining used to assess ischemia-induced retinal cell death and protection by the neurosteroids**



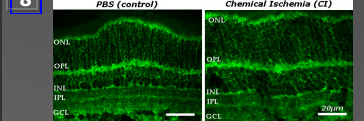
**TUNEL analysis further depicted the neuroprotective actions of the neurosteroids.**

**7 Toxicity test**  
ChAT immunoreactivity.

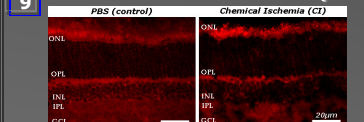


Eyecups were incubated with the neurosteroids at the highest concentration used in the neuroprotection experiments, but without the chemical ischemia mixture. No differences were detected between this treatment and the control treatment indicating that the neurosteroids had no toxic effect.

**8 Immunodetection of the p75<sup>(NTR)</sup>**



**9 Immunodetection of TrkA receptor**



p75<sup>(NTR)</sup> immunoreactivity is located in all retinal layers. TrkA receptor immunoreactivity is located primarily in the ONL and OPL. In both cases the immunoreactivities were not affected by the chemical ischemia.

**Abbreviations:**

GCL : Ganglion Cell Layer  
IPL : Inner Plexiform Layer

INL : Inner Nuclear Layer  
OPL : Outer Plexiform Layer  
ONL : Outer Nuclear Layer

## CONCLUSIONS

- Neuronal death induced by chemical ischemia is restricted in the two inner layers of the retina, namely, the IPL and INL.
- DHEA and the novel synthetic neurosteroids, BNN50 and BNN124, have neuroprotective effects in the retinal model of chemical ischemia.
- Neurosteroids exert their neuroprotective effects in a concentration – dependent manner.
- p75<sup>(NTR)</sup> and TrkA receptor were not affected by chemical ischemia and may prove to be the key players in neurosteroid protection.
- The pharmacologic profile of these agents renders them promising therapeutic agents in retinopathies, whose pathophysiology involves ischemic insults.

## REFERENCES

- Charalampopoulos I. et al. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathetic medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *PNAS* 101:8209-8214, 2004
- Charalampopoulos I. et al. G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J.* 20:577-579, 2006.
- Mastrodimou N. et al. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischemia in the rat retina. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol.* 371:44-53, 2005.

## AKNOWLEDGEMENTS

This study was partially funded by the Graduate Program in Neuroscience, Faculty of Medicine University of Crete.