

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μελέτη Νευροπροστατευτικής Δράσης του Νευροστεροειδούς
Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA dehydroepiandrosterone) σε
μοντέλο Διαβητικής Αμφιβληστροειδοπάθειας



Κουλάκης Μανώλης Χημικός

Υπεύθυνη Καθηγήτρια : Κυριακή Θερού Καθηγήτρια Φαρμακολογίας τμήμα Ιατρικής
Επιβλέπων Καθηγητής : Κατερινόπουλος Χαράλαμπος Καθηγητής Οργανικής Χημείας

Η διπλωματική αυτή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο:

Εργαστήριο Φαρμακολογίας,
Τομέας Βασικών επιστημών,
Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Κ. Θερμού

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
Χ. Ε. Κατερινόπουλος, Καθηγητής στην Οργανική Χημεία
Ι. Χαραλαμπόπουλος, Λέκτορας

Στην οικογένειά μου

Πρόλογός

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έρχεται να επισφραγίσει την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος «Απομόνωσης και Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα» στο οποίο συμμετείχα. Στα πλαίσια της ερευνητικής μου εργασίας μου δόθηκε η δυνατότητα να εξοικειωθώ σε μεγαλύτερο βαθμό με πειραματικές τεχνικές και να συνεργαστώ με αξιόλογα άτομα. Θεωρώ ότι αυτά τα χρόνια δεν αποκόμισα μόνο γνώσεις αλλά και πολύτιμες εμπειρίες, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο, οι οποίες σίγουρα θα αποτελέσουν σημαντικά εργαλεία για την οποιαδήποτε πορεία και αν ακολουθήσω από εδώ και πέρα. Φτάνοντας στο τέλος της συγγραφής της παρούσας εργασίας, συνειδητοποίησα ότι αποτέλεσε καρπό προσωπικής προσπάθειας, αλλά σίγουρα δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί χωρίς τη συνδρομή και της υποστήριξη πολλών ανθρώπων, στους οποίους θέλω να εκφράσω την ελκρινή μου ευγνωμοσύνη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Κυριακή Θερού, για την απόλυτη εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την κατανόηση που επιδείκνυε σε τυχόν προβλήματα που αντιμετώπιζα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, αλλά κυρίως για την ενθάρρυνση που μου παρείχε τις στιγμές που πραγματικά το χρειαζόμουν. Οι συμβουλές και οι γνώσεις που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας, από τις προπτυχιακές μου σπουδές μέχρι και σήμερα, σίγουρα θα με συνοδεύουν και θα με βοηθήσουν στη μετέπειτα σταδιοδρομία μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη του εργαστηρίου Νίκη Ματροδίμου, Δέσποινα Κοκονά, Σμαράγδα Πουλάκη και Γιώτα Ιορδανίδου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Νίκη για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδινε κατά την χρονική περίοδο που εργαζόμουν στο εργαστήριο και την βοήθεια της στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ευχαριστώ την Δέσποινα με την οποία περνούσα τις περισσότερες ώρες στο εργαστήριο, για τις αξέχαστες εμπειρίες που μοιραστήκαμε εντός και εκτός

εργαστηρίου, για τη βοήθεια που μου παρείχε όταν τη χρειαζόμουν, αλλά κυρίως για το πολύ ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αχιλλέα Γραβάνη, κ. Ιωάννη Χαραλαμπόπουλο και τον κ. Ιωάννη Δαλέζιο για την προσφορά υλικών και οργάνων τα οποία ήταν απαραίτητα για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους πολύ στενούς μου φίλους Σοφία Σφακιανάκη και Ταξιάρχη Στεργιανάκο οι οποίοι στάθηκαν στον πλευρό μου την περίοδο αυτή και ανέχθηκαν τις ψυχολογικές μου μεταπτώσεις, με στήριξαν και συνεχίζουν ακόμα να το κάνουν.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου η οποία με στήριξε ηθικά και οικονομικά όλο αυτό το χρονικό διάστημα θυσιάζοντας πολλά πράγματα την δύσκολη οικονομική περίοδο που διανύουμε. Σας ευχαριστώ πολύ για όλα.

Περιεχόμενα

Ενότητα I Εισαγωγή

1.1.Δομή Αμφιβληστροειδούς.....σελ 8
1.2.Λειτουργία των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή.....σελ 12
1.3.Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.....σελ 14
1.4.Παθοφυσιολογία της νόσου.....σελ 17
1.4.1.Βιοχημικά μονοπάτια.....σελ 20
1.4.2.Αιμοδυναμικά ευρήματα.....σελ 22
1.4.3.Ενδοκρινικά ευρήματα.....σελ 23
1.5.Νεοαγγείωση και ΔΑ.....σελ 25
1.5.1.Μηχανισμός Δράσης του VEGF.....σελ 26
1.6.Νευροεκφίληση και ΔΑ.....σελ 31
1.6.1.Διαβήτης και κύτταρα του αμφιβληστροειδούς.....σελ 33
1.7.Θεραπεία.....σελ 37
1.8.Νευροστεροειδή.....σελ 40
1.8.1.Νευροστεροειδή και νευροπροστασία.....σελ 42
1.8.2.Νευροστεροειδή και αμφιβληστροειδής.....σελ 48
1.9. Σκοπός της παρούσας εργασίαςσελ 50

Ενότητα II Πειραματικό μέρος

2.1. Ζώα και υλικά.....σελ 52
2.2. Πρόκληση διαβήτη.....σελ 52
2.3. Χορήγηση DHEA ενδοπερυτοναϊκά.....σελ 54
2.4. Ζελατινοποίηση.....σελ 54
2.5. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες.....σελ 55
2.6. Ιστοχημικές μελέτες.....σελ 57
2.7. Μικροσκόπηση.....σελ 58
2.8. Ποσοτικοποίηση εικόνων με το πρόγραμμα ImageJ.....σελ 58
2.9. Στατιστική ανάλυση.....σελ 61
2.10. Συνταγές, Διαλύματα και Αντισώματα.....σελ 61

Ενότητα III Αποτελέσματα

3.1 Πρόκληση διαβήτη με χορήγηση στρεπτοζωτοκίνης.....σελ 64
--

3.2 Ανοσοϊστοχημικές μελέτες.....σελ	66
3.3 Νευροπροστατευτική δράση της DHEA.....σελ	69
Ενότητα IV Συζήτηση αποτελεσμάτων.....σελ	78
4.1 Μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.....σελ	79
4.2 DHEA και νευροπροστασία.....σελ	84
Περίληψη.....σελ	87
Βιβλιογραφία.....σελ	89

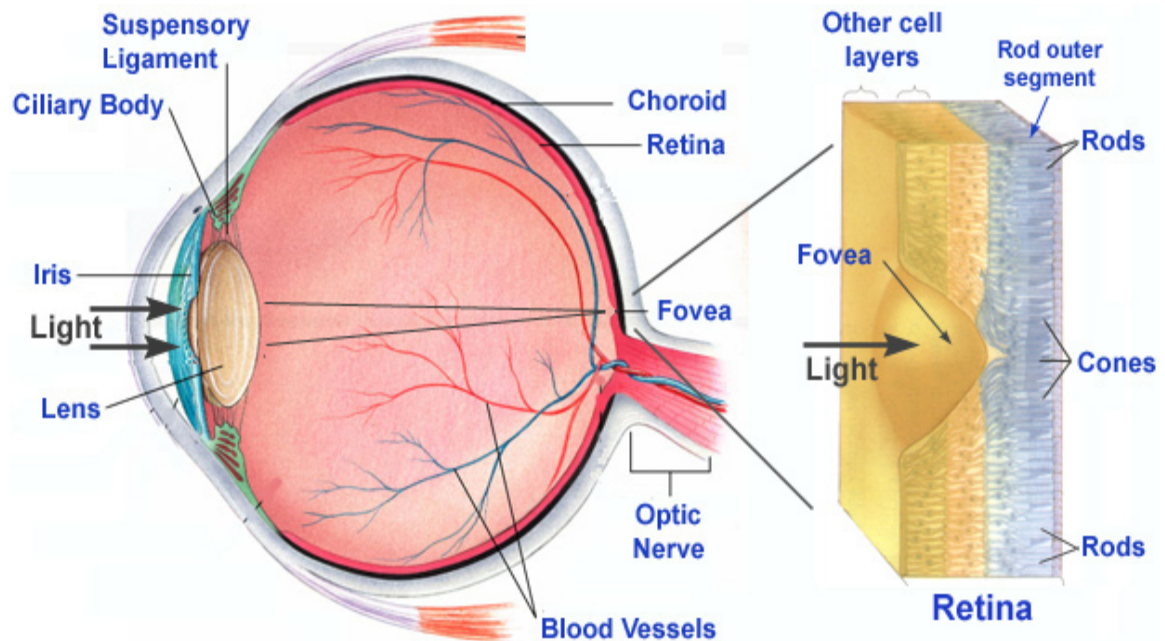
Ενότητα Ι

Εισαγωγή

1.1. Δομή αμφιβληστροειδούς

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του οφθαλμού είναι ένα πολύ λεπτό στρώμα νευρικού ιστού και αποτελεί το εξειδικευμένο αισθητήριο όργανο που μετατρέπει το φως σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα αυτό μεταβιβάζεται μέσω του οπτικού νεύρου, στη συνέχεια, σε ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου (οπτικός φλοιός) για περαιτέρω επεξεργασία, αναγκαία για την οπτική αντίληψη.

Αποτελείται από το νευροαισθητικό αμφιβληστροειδή και το μελάγχρουν επιθήλιο. Το φως πρέπει να διέλθει στο εσωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς για να φτάσει στην περιοχή όπου βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς, τα ραβδία και τα κωνία, που μετατρέπουν την φωτεινή ενέργεια σε ηλεκτρική ενέργεια. Τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς είναι αμύελα και διαφανή για να μπορεί να διέρχεται η ακτινοβολία. Συνδεδειγμένοι νευρώνες τροποποιούν και μεταδίδουν τα ηλεκτρικά σήματα στα γαγγλιακά κύτταρα, οι νευροάξονες των οποίων διέρχονται από την επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς και εισέρχονται στο οπτικό νεύρο.



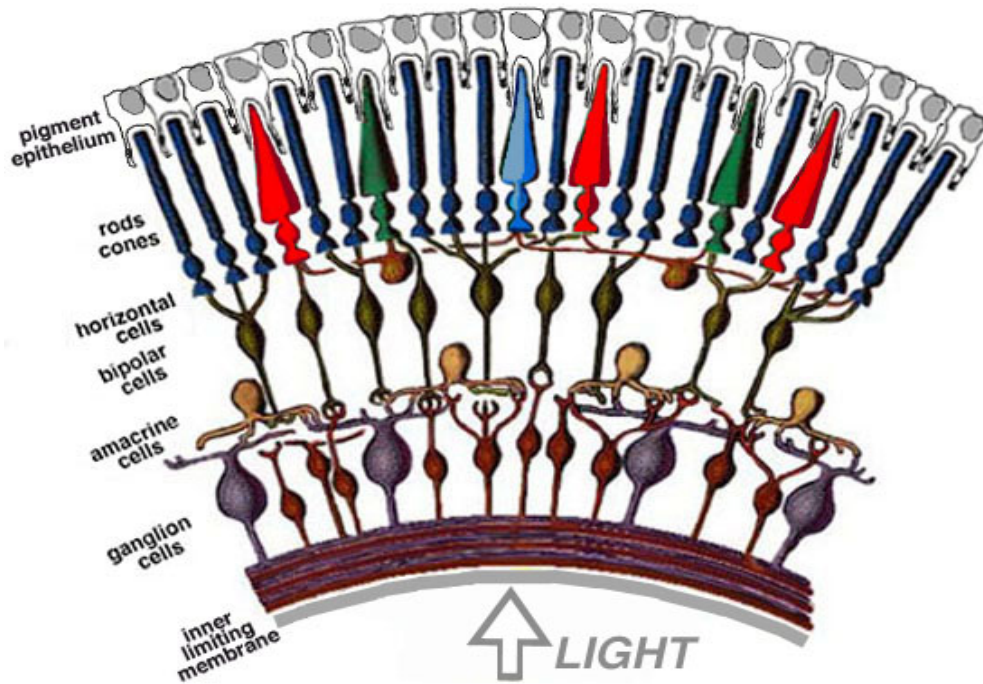
Σχήμα 1: Τομή από μάτι. Με ροζ χρώμα βλέπουμε τον αμφιβληστροειδή χιτώνα που καλύπτει το εσωτερικό του βολβού.

Η ωχρά κηλίδα, εξυπηρετεί την κεντρική όραση, ενώ στο κέντρο της υπάρχει μια υπερεξειδικευμένη περιοχή, το κεντρικό βοθρίο που εξυπηρετεί την ευκρινή όραση.

Τα κωνία είναι συγκεντρωμένα στην ωχρά και είναι υπεύθυνα για την οπτική οξύτητα και αντίληψη των χρωμάτων. Τα ραβδία χρησιμεύουν για την όραση σε χαμηλό φωτισμό (ένα και μόνο φωτόνιο είναι ικανό να διεγείρει ένα ραβδίο) και για την αντίληψη του χώρου και της κίνησης. Είναι διασκορπισμένα σε ολόκληρη την έκταση του αμφιβληστροειδή. Οι φωτοϋποδοχείς περιέχουν χρωστικές που αποτελούνται από ρετινόλη (βιταμίνη Α) συνδεδεμένη με μία πρωτεΐνη (οψίνη). Η απορρόφηση του φωτός προκαλεί δομικές και στη συνέχεια χημικές μεταβολές στις φωτοχρωστικές με αποτέλεσμα την ηλεκτρική υπερπόλωση των φωτοϋποδοχέων.

Εξωτερικά ο αμφιβληστροειδής περιβάλεται από το υαλώδες σώμα και το μελάγχρουν επιθήλιο. Το υαλώδες σώμα αποτελείται από 99% νερό, είναι άχρωμο, έχει παχύρρευστη μορφή και είναι προσκολλημένο στον αμφιβληστροειδή σε καθορισμένα σημεία. Ο σημαντικότερος ρόλος του είναι η προστασία του αμφιβληστροειδή με το να απορροφά την πίεση σε περίπτωση τραυματισμού, ενώ αποτελεί και μία δεξαμενή μεταβολιτών.

Το μελάγχρουν επιθήλιο βρίσκεται στην εσωτερική περιοχή του αμφιβληστροειδή και έρχεται σε επαφή με τους φωτοϋποδοχείς. Αποτελείται από μία απλή στοιβάδα μελαχρωστικών κυττάρων που έχουν ρόλο ζωτικής σημασίας για την φυσιολογία των φωτοϋποδοχέων. Τα κύτταρα αυτά είναι τα μοναδικά που περιέχουν χρωστική (μελανίνη) και σαν κύρια λειτουργία έχουν την απορρόφηση της περιττής ακτινοβολίας που δεν δεσμεύεται από τον αμφιβληστροειδή και με αυτόν τον τρόπο αποτρέπει την αντανάκλαση του φωτός στο οπίσθιο τοίχωμα του βολβού, γεγονός που θα αλλοίωνε την ποιότητα της εικόνας. Κάποιες άλλες από τις λειτουργίες που επιτελούν είναι η ανακύκλωση της βιταμίνης Α και η ανανέωση των φωτοϋποδοχέων.



Σχήμα 2: Η κυτταρική οργάνωση στον αμφιβληστροειδή

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από 5 βασικά είδη νευρικών κυττάρων τα οποία είναι:

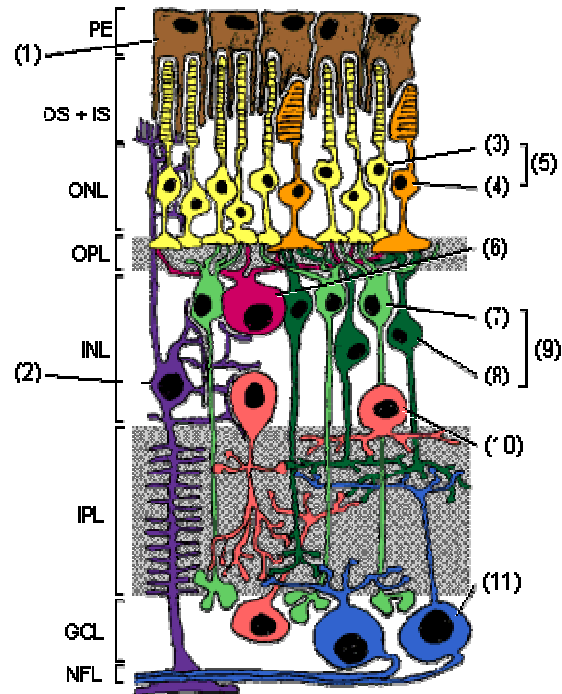
- ✚ Οι φωτοϋποδοχείς (ραβδία και κωνία)
- ✚ Τα οριζόντια κύτταρα
- ✚ Τα δίπολα κύτταρα
- ✚ Τα άμακρα κύτταρα
- ✚ Τα γαγγλιακά κύτταρα.

Η οργάνωσή τους παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα. Παρατηρώντας την θέση των κυττάρων και την οργάνωσή τους μπορούμε να χωρίσουμε τον αμφιβληστροειδή χιτώνα σε στρώματα :

- ✚ Η εξωτερική πυρηνική στιβάδα **ONL**(*Outer Nuclear Layer*) η οποία περιλαμβάνει τα φωτοϋποδοχτικά κύτταρα(ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα)

- ✚ Η εξωτερική δικτυωτή στιβάδα **OPL** (*Outer Plexiform Layer*) η οποία περιλαμβάνει τα φωτοϋποδοκτικά, τα οριζόντια και τα δίπολα κύτταρα
- ✚ Η εσωτερική πυρηνική στιβάδα **INL** (*Inner Nuclear Layer*) η οποία περιλαμβάνει τους ενδιάμεσους νευρώνες (οριζόντια, δίπολα, βραχύνα κύτταρα)
- ✚ Η εσωτερική δικτυωτή στιβάδα **IPL** (*Inner Plexiform Layer*) η οποία περιλαμβάνει τα δίπολα τα βραχύνα και τα γαγγλιακά κύτταρα και τέλος
- ✚ Η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων **GCL** (*Ganglion cell Layer*) η οποία περιλαμβάνει τα γαγγλιακά κύτταρα.

Η διάταξη των στιβάδων του αμφιβληστροειδή χιτώνα παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3: Κυτταρική δομή στον αμφιβληστροειδή: Κύτταρα του μελάγχρου επιθήλιο (PE, 1), κύτταρα Müller (2), φωτοϋποδοχείς (5): ραβδία(3) και κωνία(4), οριζόντια κύτταρα(6), δίπολα κύτταρα(9): ραβδοφόρα(7) και κωνοφόρα δίπολα κύτταρα (8), βραχύνα κύτταρα(10),γαγγλιακά κύτταρα(11). Με τα βέλη παρουσιάζεται η διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

1.2. Λειτουργία των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή.

Στην προηγούμενη ενότητα αναφερθήκαμε στα 5 διαφορετικά είδη νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή χιτώνα και σε ποια στοιβάδα τοποθετούνται. Σε αυτό το τμήμα θα γίνει μια σύντομη παρουσίαση των λειτουργιών αυτών των κυττάρων.

Τα οριζόντια κύτταρα μεταδίδουν ώσεις οριζοντίως στην OPL από τα ραβδία και τα κωνία προς τους δενδρίτες των δίπολων κυττάρων. Το εξερχόμενο σήμα από τα οριζόντια κύτταρα είναι πάντοτε ανασταλτικό και με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται η πιστή μετάδοση των οπτικών σημάτων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο μηχανισμός αυτός έχει ουσιαστική σημασία γιατί εξασφαλίζει υψηλού βαθμού οπτική ακρίβεια κατά την μετάδοση των αντιθέσεων των ορίων της οπτικής εικόνας.

Τα δίπολα κύτταρα μεταδίδουν τις ώσεις από τα ραβδία, τα κωνία και τα οριζόντια κύτταρα προς την IPL. Υπάρχουν δυο διαφορετικές κατηγορίες δίπολων κυττάρων τα οποία επιδρούν με διεγερτικά και ανασταλτικά σήματα στην οπτική οδό, τα εκπολωτικά και τα υπερπολωτικά δίπολα κύτταρα. Αυτό σημαίνει πώς ορισμένα δίπολα εκπολώνονται όταν διεγείρονται οι φωτοϋποδοχείς ενώ άλλα υφίστανται υπερπόλωση.

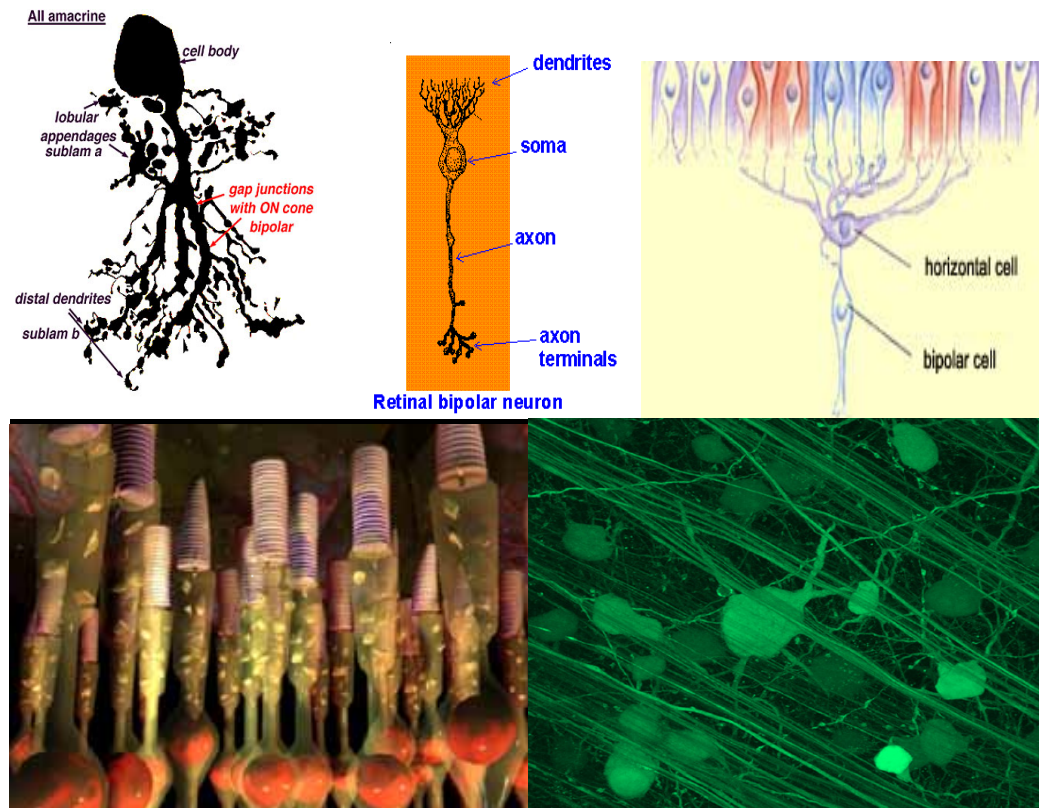
Αυτή τους η λειτουργία αποτελεί μια επιπλέον μορφή παράπλευρης αναστολής εκτός εκείνης που προκαλείται από τα οριζόντια κύτταρα. Δεδομένου ότι τα δίπολα κύτταρα που εκπολώνονται είναι σε γειτονικές θέσεις με αυτά που υπερπολώνονται, συγκροτείται ένας εξαιρετικά ισχυρός μηχανισμός διάκρισης των ορίων της αντίθεσης του φωτισμού μιας οπτικής εικόνας ακόμα και όταν το όριο αυτό βρίσκεται ακριβώς μεταξύ δυο γειτονικών φωτοϋποδοχέων!

Τα βραχύνια κύτταρα μεταδίδουν ώσεις προς δυο κατευθύνσεις, είτε απευθείας από τα δίπολα κύτταρα προς τα γαγγλιακά κύτταρα, είτε οριζοντίως στην INL μεταξύ των νευροαξόνων των δίπολων κυττάρων και των δενδριτών των γαγγλιακών κυττάρων ή άλλων βραχύνιων κυττάρων. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη βραχύνιων κυττάρων (έχουν

αναγνωριστεί τουλάχιστον 30) και επιτελούν διάφορες λειτουργίες. Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητές τους είναι η ευαισθησία στο όσον αφορά την κατεύθυνση.

Από μία άποψη, τα βραχύνια κύτταρα είναι τύποι ενδιάμεσων νευρώνων, τα οποία συμμετέχουν και υποβοηθούν στην αρχή της ανάλυσης ενός οπτικού σήματος πριν αυτό εγκαταλείψει τον αμφιβληστροειδή.

Τα γαγγλιακά κύτταρα μεταδίδουν φυγόκεντρες ώσεις από τον αμφιβληστροειδή και μέσω του οπτικού νεύρου στον εγκέφαλο. Οι μακριές νευρικές ίνες που σχηματίζουν το οπτικό νεύρο έχουν την αφετηρία τους σε αυτά τα κύτταρα τα οποία μεταδίδουν την οπτική πληροφορία με ώσεις δυναμικών ενέργειας. Μια ακόμα πολύ σημαντική πληροφορία για τα γαγγλιακά κύτταρα είναι ότι πραγματοποιείται ένας πρώτος χρωματικός διαχωρισμός ανάλογα με το είδος των κωνίων με τα οποία συνδέεται.



Σχήμα 4: Τα 5 βασικά είδη νευρικών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή χιτώνα: βραχύνια, δίπολα, οριζόντια, φωτοϋποδοχείς και γαγγλιακά κύτταρα(από πάνω προς τα κάτω)

Αξίζει λοιπόν να σημειώσουμε σε αυτό το σημείο ότι ο αμφιβληστροειδής αποτελεί ένα σχετικά απλό κύκλωμα νευρικών κυττάρων με μια αρκετά πολύπλοκη λειτουργία, γεγονός που τον καθιστά ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση του τρόπου λειτουργίας πιο σύνθετων νευρωνικών κυκλωμάτων του εγκεφάλου και του τρόπου με τον οποίο γίνεται η επεξεργασία και η ανάλυση των πληροφοριών.

1.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από την υπερπαραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ και χωρίζεται στους τύπους I και II. Στον τύπο I ο οργανισμός δεν έχει την ικανότητα να παράξει ινσουλίνη με αποτέλεσμα την συσσώρευση γλυκόζης στο αίμα, ενώ στον τύπο II ο οργανισμός παράγει ινσουλίνη η οποία όμως δεν μπορεί να δεσμευτεί και να οδηγήσει στο μεταβολισμό της γλυκόζης με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της γλυκόζης στο αίμα. Ο κληρονομικός παράγοντας της ασθένειας θεωρείται μικρός, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει το περιβάλλον, η διατροφή, η σωματική άσκηση και η παχυσαρκία. Χαρακτηριστικά των διαβητικών ατόμων αποτελούν η πολυουρία, η πολυδιψία και η μείωση του ρυθμού αύξησης του σωματικού τους βάρους. Η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα των ασθενών, διαβήτη τύπου I και II, έχει αρκετές συνέπειες στον οργανισμό τους. Μια από τις σημαντικότερες συνέπειες του είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) είναι η κυριότερη αιτία τύφλωσης σε άτομα κάτω των 65 ετών. Διαβητικοί ασθενείς που ο διαβήτης τους χρονολογείται πάνω από 10 χρόνια έχουν πιθανότητα να αναπτύξουν ΔΑ σε αναλογία 90% των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου I και 65% των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Ο κίνδυνος εμφάνισης ΔΑ σχετίζεται με πολλούς παράγοντες, όπως η διάρκεια της νόσου, η ρύθμιση του σακχάρου αίματος (υψηλά επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης), η εξάρτηση από την ινσουλίνη, η ηλικία. Επίσης κακή ρύθμιση υπέρτασης, υπερλιπιδαιμία, αυξημένη ενδαγγειακή κατακράτηση υγρών, νεφρική νόσος,

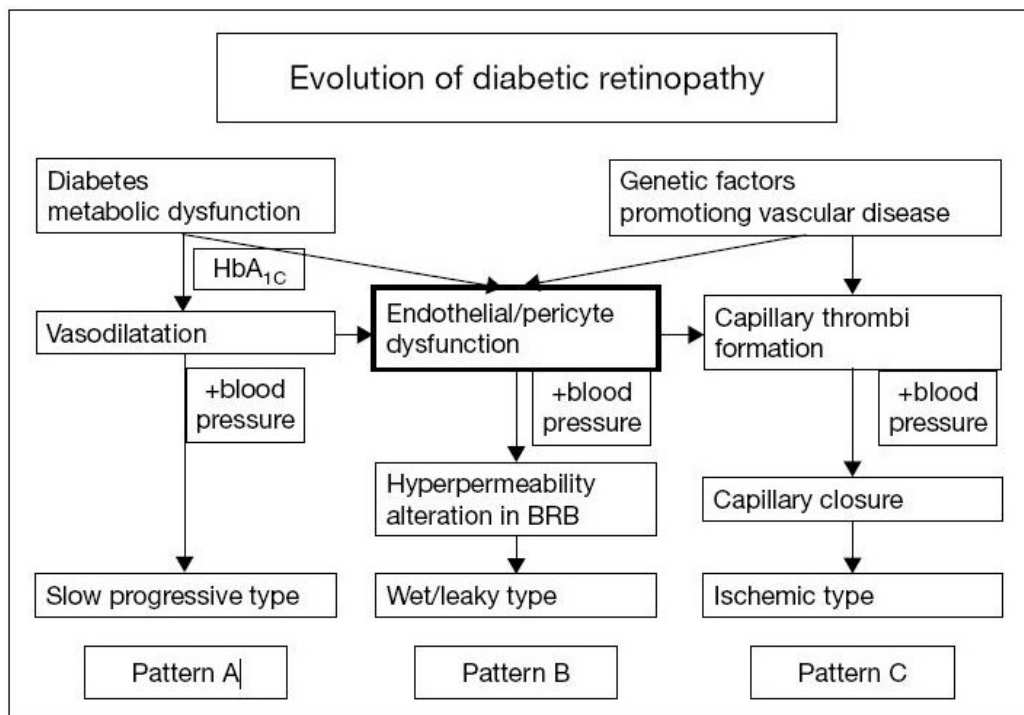
αναιμία και εγκυμοσύνη μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης και να επιδεινώσουν τη ΔΑ. Η πάθηση είναι εξελικτική. Αρχικά προσβάλλει τα αγγεία του αμφιβληστροειδή (διαβητική μικροαγγειοπάθεια). Αργότερα δημιουργεί εκτεταμένες αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή και ιδιαίτερα στην ωχρά κηλίδα που καταλήγουν σε μείωση της όρασης και τύφλωση (Λαδάς 2005, Kanski 2004).

Διάφοροι γενετικοί, ανοσολογικοί και εξωγενείς παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη (ΣΔ), η οποία μέχρι σήμερα εξακολουθεί να παρουσιάζει αρκετά σκοτεινά σημεία. Δυστυχώς, παρόμοια σκοτεινός εξακολουθεί να είναι και ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός μέσω του οποίου οδηγούμαστε στην ανάπτυξη της ΔΑ. Η υπεργλυκαιμία, η οποία αποτελεί την κύρια παθολογική διαταραχή του ΣΔ σε επίπεδο μεταβολισμού, στο μικροπεριβάλλον των ιστών κινητοποιεί διάφορους ενδοκυττάριους μηχανισμούς με στόχο τη χρησιμοποίηση της περίσσειας της γλυκόζης και των μεταβολιτών της.

Η ΔΑ μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια, την μη πολλαπλασιαστική ΔΑ και την πολλαπλασιαστική ΔΑ. Κατά την μη πολλαπλασιαστική ΔΑ, στον αμφιβληστροειδή προκαλούνται μικροανευρύσματα και μικρές αιμορραγίες, οι οποίες δεν έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην όραση του ασθενή εκτός και αν γίνουν στην περιοχή της ωχράς κηλίδας. Κατά την πολλαπλασιαστική ΔΑ η οποία είναι σοβαρότερη μορφή και έπεται της μη πολλαπλασιαστικής ΔΑ, είναι αποτέλεσμα εκτεταμένης ισχαιμίας και χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη και δημιουργία νέων αγγείων τα οποία έχουν αυξημένη διαπερατότητα και η αιμορραγία στο υαλώδες σώμα είναι πιο εκτεταμένη. Άμεσες συνέπειες αυτής της κατάστασης είναι ο σχηματισμός υπερβολικού ινώδους συνδετικού ιστού, αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς και το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας το οποίο είναι η κύρια αιτία απώλειας της όρασης στους ασθενείς με διαβήτη τύπου II.

Η διάγνωση της ασθένειας μπορεί να γίνει με απλούς τρόπους όπως στερεοσκοπική εξέταση, είτε με αγγειογραφία φθορισμού.

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια δεν εμφανίζει την ίδια εξέλιξη σε όλους τους ασθενείς. Μελέτες που έχουν γίνει από τους Nunes et al. 2013 σε ανθρώπους με διαβήτη κατηγοριοποίησαν την ΔΑ σε 3 υπότυπους ανάλογα με τον ρυθμό με τον οποίο εξελίσσεται η ασθένεια και τις επιπλοκές που παρουσιάζει. Στον υπότυπο Α οι ασθενείς εμφανίζουν σχετικά λίγες αντιστρεπτές αιμορραγίες και μικρό ρυθμό εμφάνισης μικροανευρυσμάτων, ενώ η αγγειακή ζώνη στην περιοχή της ωχράς κηλίδας είναι φυσιολογική. Αυτός ο υπότυπος ονομάζεται "slow progressive". Στον υπότυπο Β υπάρχουν αυξημένες και συχνές αιμορραγίες οι οποίες υποδηλώνουν διαταραχή του αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού ενώ η αγγειακή ζώνη της ωχράς κηλίδας είναι φυσιολογική. Αυτός ο υπότυπος χαρακτηρίζεται ως



Σχήμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση των τύπων της διαβητικής Αμφιβληστροειδοπάθειας.

"wet/leaky". Τέλος, ο υπότυπος C χαρακτηρίζεται από ποικίλες αιμορραγίες και διαταραχή της αγγειακής ζώνης της ωχράς κηλίδας και ονομάζεται "ischemic". Ο διαχωρισμός αυτός έγινε με βάση απεικονίσεις του αμφιβληστροειδούς και την δημιουργία χαρτών.

Πρόσφατα, όλο και περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι η ΔΑ χαρακτηρίζεται και από αντιδράσεις ανοσολογικής φλεγμονής (Adamis & Berman, 2008). Αύξηση των επιπέδων κυτταροκινών καθώς και άλλων προφλεγμονοδών παραγόντων οδηγούν σε διαρκή χαμηλού βαθμού φλεγμονή και σε εισροή λευκοκυττάρων. Αυτές οι ανοσολογικές αλλαγές που πραγματοποιούνται, συμβάλουν στις αγγειακές βλάβες και στην αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση που συνοδεύει τη ΔΑ.

Πέρα από τις παρατηρούμενες αγγειακές αλλαγές που παρατηρούνται, υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η ΔΑ είναι μια νευροεκφυλιστική πάθηση (Barber, 2003) που εκδηλώνει λειτουργικές αλλαγές στην όραση πριν και ανεξάρτητα από την εμφάνιση της νεοαγγείωσης (Lieth et al.). Οι αλλαγές οι οποίες πραγματοποιούνται έχουν μελετηθεί αρκετά στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας στον αρουραίο με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης καθώς και σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη και αφορούν αλλαγές στην ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα του αμφιβληστροειδούς, αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού οξέος, αυξημένη δραστηριότητα των κυττάρων της γλοίας και αποπτωτικό θάνατο των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς.

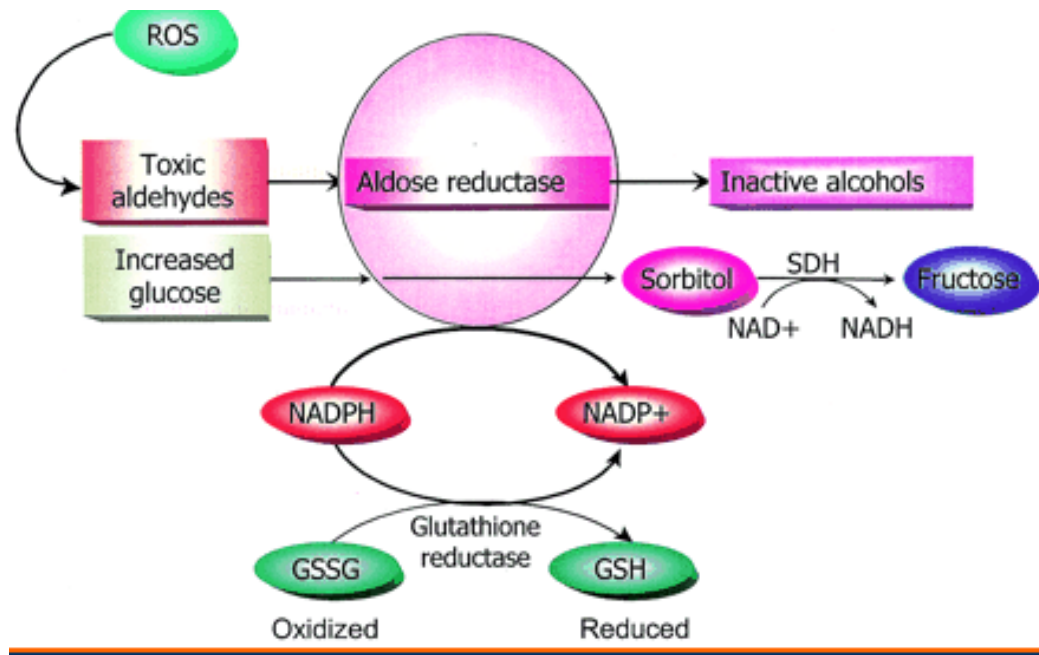
1.4. Παθοφυσιολογία της νόσου

Πολλές θεωρίες έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν την παθογένεση της ΔΑ και περιλαμβάνουν βιοχημικά μονοπάτια, αιμοδυναμικά και ενδοκρινικά ευρήματα. Με βάση τα σύγχρονα δεδομένα, οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς αυτούς, οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεια της ΔΑ, είναι οι ακόλουθοι: (Λαδάς 2005)

1.4.1. Βιοχημικά μονοπάτια

Μεταβολική οδός πολλολών: Το ένζυμο-κλειδί σ' αυτήν τη μεταβολική οδό είναι η αναγωγή των αλδοζών που μετατρέπει τη γλυκόζη στην αντίστοιχη αλκοόλη της και στη συνέχεια με τη βοήθεια της αφυδρογονάσης

της σορβιτόλης σε φρουκτόζη η οποία είναι υπεύθυνη και για τη συχνή εμφάνιση καταρράκτη σε διαβητικούς ασθενείς (Reddy et al. 2013). Σε φυσιολογικές τιμές γλυκόζης στον οργανισμό η αναγωγή της γλυκόζης έχει μικρή συγγένεια πρόσδεσης με την γλυκόζη, όμως σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας η περίσσεια της γλυκόζης μετατρέπεται σε σορβιτόλη με κατανάλωση NADPH και μετατροπή του σε NADP⁺. Έχει προταθεί ότι η οξυγόνωση της σορβιτόλης αυξάνει τον λόγο του NADH/NAD⁺ στο κυτταρόπλασμα αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την glyceraldehyde-3-aldehyde dehydrogenase (GAPDH). Ως αποτέλεσμα αυξάνεται η φωσφορική τριόζη και ο σχηματισμός



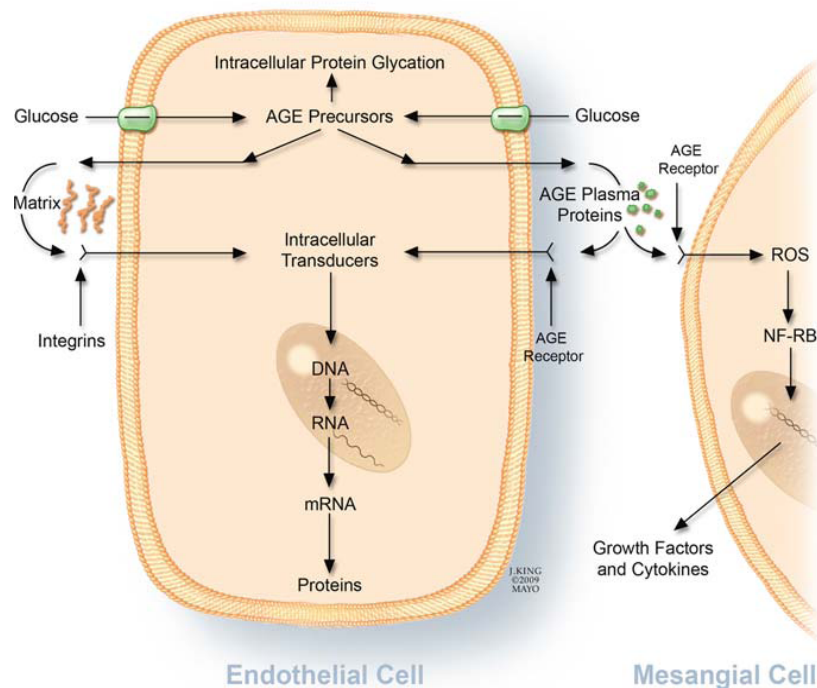
Σχήμα 6: Απεικόνιση του μηχανισμού της μεταβολικής οδού των πολυολών

μεθυλογλιοξάλης που αποτελεί πρόδρομη ένωση τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGE's) και διάκυλογλυκερόλης. Η κατανάλωση της NADPH κατά την μετατροπή της γλυκόζης σε σορβιτόλη εντείνει το οξειδωτικό στρες του κυττάρου αφού είναι απαραίτητη για την αναγέννηση της γλουταθειώνης. Η σορβιτόλη δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και αθροίζεται στα κύτταρα με αποτέλεσμα την ωσμωτική τους εξοίδηση. Στον οφθαλμό η οδός αυτή ενοχοποιείται για τη δυσλειτουργία των περικυττάρων

του τοιχώματος των αμφ/δικών αγγείων, τα οποία περιέχουν την αναγωγή των αλδοζών σε μεγάλες ποσότητες. Επίσης η ίδια οδός θεωρείται υπεύθυνη για τις μεταβολές της διαθλαστικής δύναμης του φακού που παρατηρούνται συχνά στους διαβητικούς ασθενείς.

Προσπάθειες που έχουν γίνει *in vivo* για ανακοπή του μονοπατιού των πολυολών, παρουσίασαν ανάμεικτα αποτελέσματα. Σε πενταετή μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σκύλους, επιτράπη η εμφάνιση διαβητικής νευροπάθειας, όχι όμως και αμφιβληστροειδοπάθειας. Χρήση ενός αναστολέα της αναγωγής της αλδόζης (Zenarestat) παρουσίασε ενθαρρυντικά αποτελέσματα κατά της διαβητικής νευροπάθειας στον άνθρωπο.

Μη ενζυμική γλυκοζύλιωση: Σε επίπεδα υπεργλυκαιμίας η γλυκόζη συνδέεται ομοιοπολικά με αμινοομάδες πρωτεϊνών και πιθανώς νουκλεϊκών οξέων καθώς και λιπίδια. Δημιουργούνται από την ενδοκυττάρια αυτόξειδωση της γλυκόζης σε γλυοξάλη, της glucose-derived-1-amino-1-deoxyfructose lysine adducts σε 3-δεοξυγλυκοζόνη και διάσπαση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και της φωσφορικής διυδροξυακετόνης προς μέθυλογλυοξάλη. Οι ομάδες αυτές αντιδρούν με τις αμινοομάδες των



Σχήμα 7: Απεικόνιση μηχανισμού μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης

ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων πρωτεϊνών προς σχηματισμό AGE. Οι ουσίες οι οποίες δημιουργούνται από τη σύνδεση αυτή (προϊόντα ενδιάμεσης γλυκοζυλίωσης) υπόκεινται αυτομάτως σε μη αναστρέψιμες μοριακές μεταβολές και μετατρέπονται σε τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης (“advanced glycozylation end products” AGE) με πιο γνωστό και χαρακτηριστικό προϊόν την αιμογλοβίνη A_{1c}. Η συσσώρευση προϊόντων AGE έχει σαν αποτέλεσμα μια σειρά μοριακών αλλαγών. Έχουν την ικανότητα να προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε υποδοχείς των κυττάρων με αποτέλεσμα να προκαλούν οξειδωτικό stress και καταστροφή τους. Πρόσδεση αυτών στα ενδοθλιακά κύτταρα έχει ποικίλες επιδράσεις στην αγγειορύθμιση προκαλώντας μικροανευρύσματα, αιμορραγίες και φαίνεται ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη της βασικής παθολογοανατομικής διαταραχής του ΣΔ, που είναι η πύκνωση των βασικών μεμβρανών μέσω γλυκοζυλίωσης του κολλαγόνου. Αναστολή της δράσης των AGE, προλαμβάνει τον σχηματισμό ανώμαλων αγγείων και την καταστροφή των περικυτταρών.

Μεταβολική οδός διακυλογλυκερόλης/πρωτεϊνικής κινάσης C: Οι πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), είναι μια οικογένεια 11 ισόμορφων από τις οποίες οι 9 ενεργοποιούνται μέσω της διακυλογλυκερόλης (DAG). Η ενδοφθάλμια αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης αυξάνει τα επίπεδα της DAG μέσω της φωσφορικής διυδροξυακετόνης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKC στα κύτταρα των αγγείων, στον αμφιβληστροειδή, καθώς και στα σπειράματα. Εναλλακτικοί μηχανισμοί με τους οποίους προκαλείται αύξηση ορισμένων ισομορφών της PKC εμπλέκει την πρόσδεση υποκαταστατών σε AGE τροποποιημένους υποδοχείς, καθώς και το μονοπάτι ενεργοποίησης των πολυολών. Ειδικότερα η PKC-β ενεργοποιούμενη προάγει ανωμαλίες στην αιματική ροή του αμφιβληστροειδούς, μειώνοντας τα επίπεδα του NO και αυξάνοντας την έκφραση της ενδοθελίνης-1. Μεγάλο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει και η ερευνούμενη σχέση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (“vascular endothelial growth factor”-

VEGF) με την οδό αυτή, δεδομένου ότι οι υποδοχείς του ανήκουν στην κατηγορία των κινασών τυροσίνης.

Η ενεργοποίηση της PKC συνεισφέρει στις συσώρευση πρωτεϊνών της μήτρας με αρκετούς μηχανισμούς. Α) επάγοντας την έκφραση του TGF-β1, της φμπρονεκτίνης και του κολλαγόνου IV η οποία μεσολαβείται μέσω της αναστολής του NO. Β) Προκαλώντας την έκφραση του ινοδοτύκτου αναστολέα PAI-1 και ενεργοποιώντας τον NF-kB των ενδοθηλιακών και αγγειακών κυττάρων και Γ) ρυθμίζοντας και ενεργοποιώντας NADP(H) εξαρτόμενες οξειδάσες.

Η χρήση αναστολέων της PKC-β ως θεραπευτικού μέσου παρουσίασε μείωση της ενεργότητας της PKC στον αμφιβληστροειδή και στους νεφρούς σε μοντέλα διαβητικών ζώων και βελτίωσε την κυκλοφορία του αίματος στον αμφιβληστροειδή

1.4.2. Αιμοδυναμικά ευρήματα

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές αιμοδυναμικές θεωρίες για την παθογένεια της Δ.Α. και αφορούν κυρίως την λευκόσταση του αμφιβληστροειδούς και την πήξη του αίματος λόγω της μορφολογικής αλλαγής των ερυθροκυττάρων.

Λευκόσταση του αμφιβληστροειδούς: Η θεώρηση αυτή υποδηλώνει ότι η καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων είναι επακόλουθα γεγονότα της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων. Σε διαβητικούς ασθενείς έχει παρατηρηθεί μια αύξηση των επιπέδων των κοκκιωδών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή. Παρόλο που μπορεί να εμπλέκονται αρκετοί ανοσολογικοί μηχανισμοί τα ευρήματα δείχνουν ότι στην λευκόσταση του αμφιβληστροειδούς συμμετέχουν κάποια συγκολλητικά μόρια με κύριο την intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Η έκφραση της ICAM-1 ήταν αυξημένη στο ενδοθήλιο των διαβητικών ασθενών εύρημα το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη συγκέντρωση των κοκκιωδών κυττάρων. Επιπλέον η ICAM-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι αυξημένη στον αμφιβληστροειδή σε καταστάσεις και παράγοντες που

σχετίζονται με την Δ.Α. όπως υποξία, υπεργλυκαιμία, shear stress, AGE, VEGF και TNF.

Πήξη αίματος: Έχει προταθεί ότι ανωμαλίες στα αιμοπετάλια των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη μπορεί να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη Δ.Α. δημιουργώντας τοπικές αποφράξεις σε τριχοειδή αγγεία με αποτέλεσμα την εμφάνιση ισχαιμικών περιοχών στο αμφιβληστροειδή. Η αύξηση του ιξώδους στο αίμα των ασθενών είναι πιθανή λόγω της αύξησης της γλυκοζυλίωσης των κυττάρων του αίματος. Το shear stress λόγω αυτής της κατάστασης είναι ικανό να προκαλέσει βλάβες στο ενδοθήλιο και διαρροή από τα αγγεία, ενώ η ροή του αίματος μειώνεται στο δίκτυο του αμφιβληστροειδούς.

Οι αιμοδυναμικές θεωρίες μπορούν να ερμηνεύσουν την πρόκληση ισχαιμίας και αιμορραγιών κατά τα αρχικά στάδια της μη πολλαπλασιαστικής διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας αλλά δεν μπορούν να ερμηνεύσουν την νεοαγγείωση που παρατηρείται στο πολλαπλασιαστικό στάδιο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.

1.4.3. Ενδοκρινικά ευρήματα

Από πολύ παλιά είχε αναγνωριστεί ότι σε ισχαιμικό περιβάλλον εννοείται η ανάπτυξη παθολογικής νεοαγγείωσης. Ο παράγοντας που θεωρείται ο κύριος μεσολαβητής για την ανάπτυξη της αμφ/δικής νεοαγγείωσης, όπως επίσης και της παθολογικής νεοαγγείωσης στο πρόσθιο ημιμόριο, είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (“vascular endothelial growth factor”-VEGF), που θα συζητηθεί εκτενώς παρακάτω. Ο παράγοντας αυτός είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 45.000 Daltons, η παραγωγή της οποίας αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες υποξίας. Σε κυτταρικό επίπεδο έχει αναγνωριστεί ότι ο VEGF προκαλεί διάσπαση του έσω αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού με αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα του τοιχώματος των αγγείων. Ικανότητα παραγωγής του VEGF έχουν διάφορα κύτταρα του αμφ/δούς, όπως τα κύτταρα του Mueller,

τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα των τοιχωμάτων των αμφ/δικών αγγείων. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αμφ/δούς έχουν το μεγαλύτερο αριθμό υψηλής συγγένειας υποδοχέων για τον VEGF σε σχέση με οποιαδήποτε άλλα κύτταρα. Για να αναπτυχθεί νεοαγγείωση είναι απαραίτητο η ισορροπία μεταξύ των αγγειοστατικών και των αγγειογενετικών παραγόντων να μετατοπιστεί υπέρ των τελευταίων. Η απώλεια περικυττάρων στους διαβητικούς ασθενείς τους στερεί από την επίδραση του αυξητικού παράγοντα β (“transforming growth factor beta” ή TGF-β), ο οποίος αναστέλλει την αγγειογένεση στο επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, σε καταστάσεις ισχαιμίας, η παραγωγή του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (“basic fibroblast growth factor” ή b-FGF) είναι αυξημένη. Τέλος, το ορμονικό περιβάλλον του διαβητικού ασθενούς, ιδίως εκείνου που παρουσιάζει κακή ρύθμιση με υπογλυκαιμικές κρίσεις, χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων αυξητικής ορμόνης και “insulin-like growth factor 1” (IGF-1) που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και επομένως την ανάπτυξη αμφ/δικής νεοαγγείωσης.

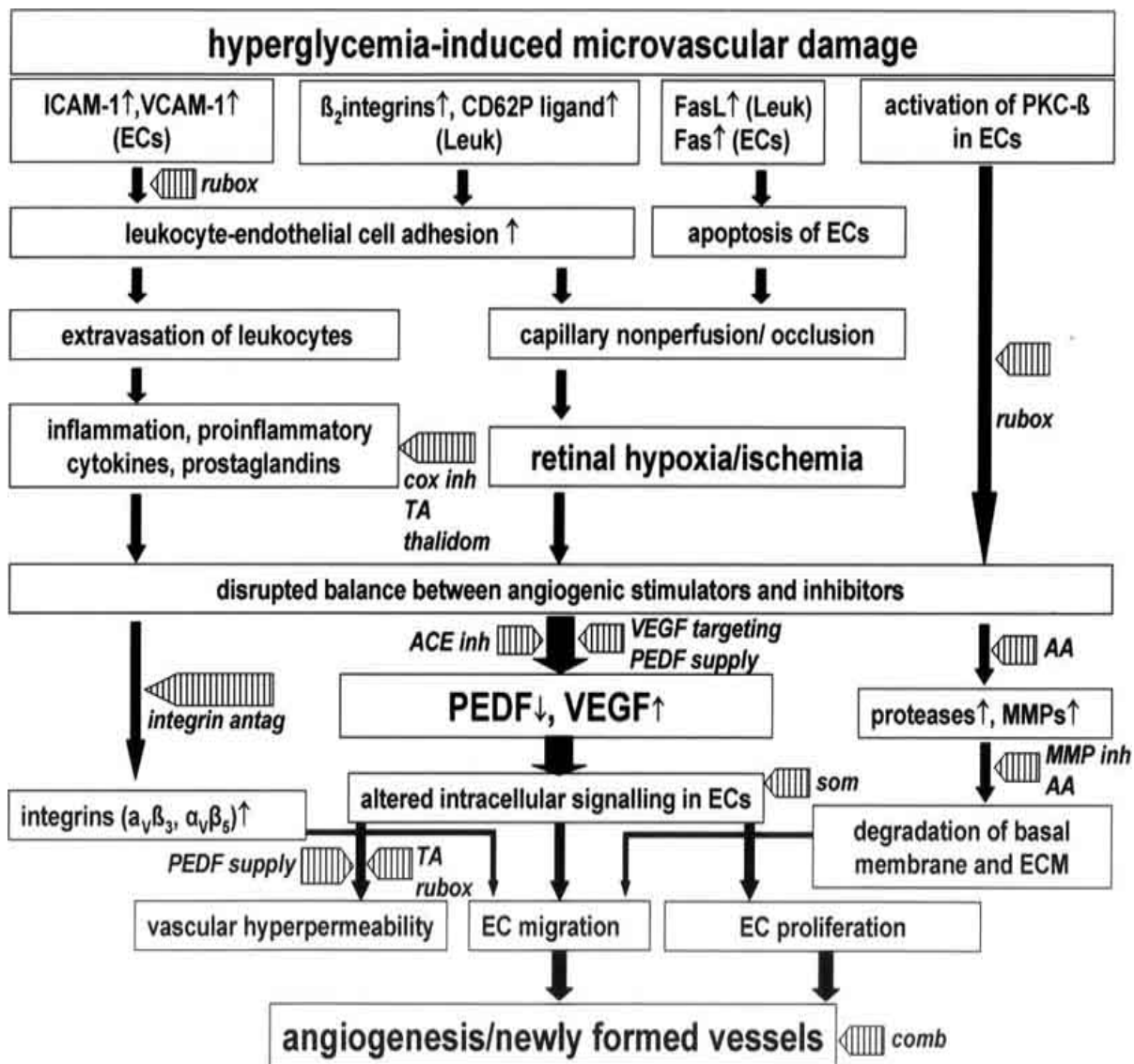
Οι δύο κύριες παθολογοανατομικές διαταραχές που παρατηρούνται στο ΣΔ και πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΔΑ είναι η πάχυνση των βασικών μεμβρανών και η μικροαγγειοπάθεια. Η μικροαγγειοπάθεια καθιστά παθολογική τη βατότητα των αγγείων και την αντίδραση τους στους διάφορους ρυθμιστές της μικροκυκλοφορίας δημιουργώντας συνθήκες μειωμένης αιματικής ροής και ιστικής υποξίας. Οι παθολογικές αλλοιώσεις της ΔΑ οφείλονται πρακτικά στην αντίδραση του αγγειακού συστήματος του αμφ/δούς στην πιο πάνω αναφερθείσα κατάσταση και εκδηλώνονται με τα ακόλουθα ευρήματα:

Διάταση αμφ/δικών αγγείων, διάσπαση του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού, μικροανευρύσματα, ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες, οίδημα ωχράς, σκληρά εξιδρώματα, αμφιβληστροειδική ισχαιμία, βαμβακόμορφες αλλοιώσεις (“cotton-wool spots”),

κομβολογιοειδείς φλέβες, ενδοαμφιβληστροειδικές μικροαγγειακές ανωμαλίες (“intraretinal microvascular abnormalities”, IRMA), αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση, αιμορραγία υαλοειδούς και δευτεροπαθής (ελκτική) αποκόλληση αμφ/δούς.

1.5. Νεοαγγείωση και ΔΑ.

Στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια μια διαγραμματική απεικόνιση του παθογενετικού μηχανισμού της νεοαγγείωσης δίνεται στην Εικ. 11 (Eichler 2006). Η διαταραχή της ακεραιότητας των τριχοειδών και η δυσλειτουργία σε μικροαγγειακό επίπεδο (λόγω του παθολογικού μεταβολισμού της γλυκόζης και της απώλειας των περικυττάρων, ένα από τα πρόδρομα σημεία στη ΔΑ) οδηγούν στην ελάττωση της αιματικής ροής στον αμφ/δή και απομένως σε υποξία/ισχαιμία. Σε κυτταρικό επίπεδο, η υποξία οδηγεί σε ενεργοποίηση της PKC-β στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και διαλυτοί διαμεσολαβητές αυξάνουν την έκφραση συγκολλητικών μορίων στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διεγείροντας την απελευθέρωση πρωτεασών. Ο ισχαιμικός αμφ/δής και τα φλεγμονώδη κύτταρα διεγείρουν κατ’ αυτόν τον τρόπο την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως του VEGF, ο οποίος με τη σειρά του προκαλεί τη διάσπαση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Έτσι, η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των παραγόντων που προάγουν και εκείνων που αναστέλλουν τη νεοαγγείωση οδηγεί σε μεταβολή της ομοιόστασης και νεοαγγείωση. Η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι μεγάλης σημασίας σ’ αυτή τη διαδικασία (Eichler 2006).



Σχήμα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της αμφιδικής νεοαγγείωσης στη ΔΑ. Πιθανοί στόχοι φαρμακοθεραπείας απεικονίζονται με βέλη (Eichler 2006). Συντομογραφίες: ICAM-1=Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, VCAM-1=vascular cell adhesion molecule-1, CD62P ligand = P-selectin (cell adhesion molecule), FasL=Fas ligand (type II transmembrane protein), PKC-β=Protein kinase C beta, rubox=ruboxistavrin, cox inh=cyclooxygenase inhibitors, ACE inh= inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme, ECM=extracellular matrix, TA=triamcinolone acetonide, thalidom=thalidomide, AA=anecortave acetate, MMPs=matrix metalloproteinase, comb=combretastatin

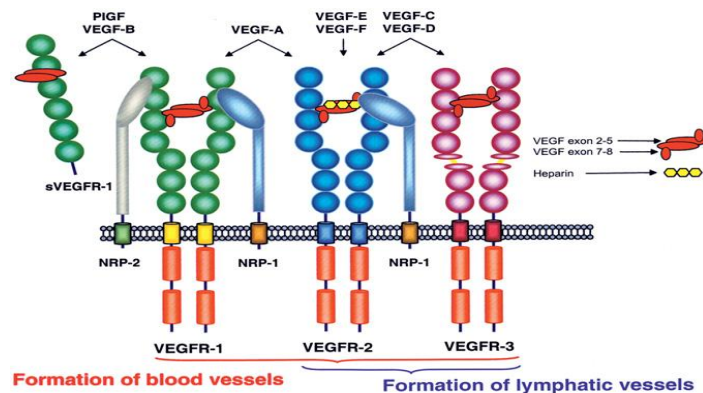
1.5.1 Μηχανισμός Δράσης του VEGF

Ο ανθρώπινος VEGF ή VEGF-A είναι ένας από τους περισσότερο σημαντικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της αγγειογένεσης. Είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη μοριακού βάρους 46.000 Daltons, που ανακαλύφθηκε σε αγγειοβριθείς όγκους το 1983 (Senger 1983). Ως τώρα έχουν απομονωθεί οκτώ VEGF ισομορφές προερχόμενες από το γονίδιο του VEGF μέσω εναλλακτικού ματίσματος (Ferrara 1991, Caligiuri 2007). Οι πιο συνήθεις ισομορφές περιέχουν 121, 165, 189 και 206 αμινοξέα και ονομάζονται VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ αντίστοιχα (Ferrara 1991). Ο VEGF₁₆₅ είναι η ισομορφή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στους περισσότερους ιστούς. Όλες οι μορφές εκτός από το VEGF₁₂₁ συνδέονται με την ηπαρίνη. Οι μακρύτερες συνδέονται με την εξωκυττάρια ουσία, ενώ οι μικρότερες διαχέονται ελεύθερα. Ο VEGF₁₆₅ έχει ενδιαμέσες ιδιότητες, δηλαδή εκκρίνεται, αλλά ένα σημαντικό ποσοστό παραμένει συνδεδεμένο με την κυτταρική επιφάνεια και την εξωκυττάρια ουσία. Το τελευταίο μπορεί να ελευθερωθεί σε μια μορφή ενός βιοενεργού μορίου που μπορεί να διαχέεται μέσω διάσπασης του στο καρβοξυτελικό άκρο από την πλασμίνη. Μετέπειτα, αναγνωρίστηκαν κι άλλα γονίδια ομόλογα στο γονίδιο του VEGF-A, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα προστέθηκαν στην υπερικογένεια των VEGF παραγόντων: placental growth factor-1 (PlGF-1), PlGF-2, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E. (Caligiuri 2007). Αν και η μιτογόνος δράση αυτών των ομόλογων πρωτεϊνών είναι σχετικά μικρή συγκρινόμενη με αυτή των VEGF-A ισομορφών, συμμετέχουν και αυτές στη ρύθμιση της νεοαγγείωσης.

Η υπερέκφραση του VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία παθολογικής αγγειογένεσης ανατρέποντας την ισορροπία διεγερτών και αναστολέων της. Ο VEGF είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας, που δρα στη ενδοθηλιακά κύτταρα επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την ενεργοποίηση του αντιαποπτωτικού μηχανισμού, την πρωτεολυτική δραστηριότητα και το σχηματισμό αυλού. Η υποξία επάγει την

έκφραση του VEGF μέσω της οικογένειας των HIF μεταγραφικών παραγόντων, που συνδέονται στην αντίστοιχη περιοχή (hypoxia response element, HRE) του VEGF-υποκινητή, με το μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω (Semenza 2000). Επίσης η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται και από άλλα ερεθίσματα που περιλαμβάνουν τον bFGF (basic fibroblast growth factor), τον TGF-β (transforming growth factor-β) και την IL-1β (ιντερλευκίνη 1β). Ο VEGF κατόπιν προκαλεί την παραγωγή οξειδίου του αζώτου που οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και αύξηση της αιματικής ροής, διαδικασίες οι οποίες αποτελούν τα αρχικά στάδια της νεοαγγείωσης. Επίσης είναι μιτογόνος και χημειοτακτικός παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επάγει την παραγωγή πρωτεασών όπως της urokinase-type plasminogen activator και της κολλαγενάσης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας έτσι την αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος. Επίσης αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων σε πρωτεΐνες του πλάσματος (Caligiuri 2007). Κατά την παθολογική νεοαγγείωση ο VEGF συμβάλλει και σε αύξηση της φλεγμονής στον αμφ/δή, καθώς επάγει την έκφραση του CD54/διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης-1 (ICAM-1) και τη συγκόλληση των λευκοκυττάρων (Ishida 2003).

Η δράση του επιτυγχάνεται μέσω πέντε υποδοχέων, του VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1 ή Flt-1), του VEGFR-2 (kinase insert domain-containing receptor ή Flk-1/KDR), του VEGFR-3 (Flt-2), του neuropilin-1 (NP-1) και του neuropilin-2 (NP-2), που εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε μικρότερο ποσοστό στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα.



Σχήμα 9: Δομή και είδη των VEGFR και VEGF παραγόντων.

Οι VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3 είναι κλασικοί διαμεμβρανικοί υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης, ενώ οι NP ανήκουν στις collapsing/semaphoring πρωτεΐνες (Caligiuri 2007). Η NP-1 αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως συν-υποδοχέας για τον VEGF165 και ενισχύει τη σύνδεση του VEGF-A στον VEGFR-2. Ο VEGFR-3 και ο NP-2 σχετίζονται με τη λεμφαγγειογένεση. Οι VEGF υποδοχείς VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3 συνδέονται μόνο με συγκεκριμένες ισομορφές του VEGF. Μελέτες με στόχο τα γονίδια των υποδοχέων του VEGF έχουν δείξει ότι και οι τρεις είναι ουσιαστικοί για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρυϊκού αγγειακού συστήματος. Ο VEGFR-1 φαίνεται ότι ρυθμίζει την διαπερατότητα των αγγείων, ενώ ο VEGFR-2 φαίνεται να εμπλέκεται στην αγγειογόνο διαδικασία. Μετά τη σύνδεση του VEGF, ο VEGFR-2 αυτοφωσφορυλιώνεται οδηγώντας στην ενεργοποίηση περίπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Ο αμφιβληστροειδής έχει διπλή αγγειακή παροχή. Οι έσω στοιβάδες αγγειώνονται από ένα λεπτό δίκτυο αγγείων του αμφιβληστροειδούς, ενώ οι έξω στοιβάδες όπου βρίσκονται και οι φωτουποδοχείς, στερούνται αγγείων και εξαρτώνται από το εκτεταμένο διαπερατό δίκτυο των τριχοειδών του χοριοειδούς (χοριοτριχοειδή). Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς συνδέονται με σφικτές συνδέσεις μεταξύ τους και σχηματίζουν τον έσω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό με αποτέλεσμα η μεταφορά ουσιών από το αίμα στη διάμεση ουσία να είναι αυστηρή και να υπόκειται σε ειδικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Αντίθετα η κυκλοφορία του χοριοειδούς δεν έχει τέτοιους φραγμούς. Η στοιβάδα του μελάγχρου επιθηλίου αποτελεί τον έξω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό (Στάγκος 2002). Η ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου στον αμφιβληστροειδή θεωρείται ότι γίνεται με έναν συνδυασμό αγγειακής διαφοροποίησης και αγγειογένεσης. Κατ'αυτό τον τρόπο τα επιφανειακά αγγεία του αμφιβληστροειδούς σχηματίζονται με αγγειακή διαφοροποίηση που αρχίζει από το οπτικό νεύρο και αναπτύσσονται από τον οπίσθιο προς τον πρόσθιο πόλο. Στη συνέχεια με τη διαδικασία της αγγειογένεσης αγγειακές προβολές από τα επιφανειακά αγγεία του αμφιβληστροειδούς διεισδύουν στον

αμφιβληστροειδή και σχηματίζουν το ενδιάμεσο και εν τω βάθει τριχοειδικό δίκτυο.

Στον αμφ/δή ο VEGF παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων: το μελάγχρουν επιθήλιο, τα περικύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα γλοιακά κύτταρα, τα κύτταρα του Mueller και τα γαγγλιακά κύτταρα (Lu 1999). Τα κύτταρα του Mueller και το μελάγχρουν επιθήλιο είναι η κύρια πηγή VEGF στον αμφ/δή, ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ο στόχος του VEGF (Pierce 1995). Στον φυσιολογικό αμφ/δή ενηλίκων, ο VEGF εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Αντιθέτως, τόσο σε διαβητικούς ασθενείς όσο και σε διαβητικά μοντέλα ζώων με παραγωγική ΔΑ, τα επίπεδα του VEGF αυξάνονται στον αμφ/δή, το υαλοειδές και το υδατοειδές υγρό (Funatsu 2002). Μετά από laser φωτοπηξία τα επίπεδα του VEGF στο υαλοειδές ελαττώνονται κατά 75% (Aiello 1994). Επίσης, σε διαβητικά μοντέλα ζώων αυξάνεται η έκφραση του VEGF και έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του αμφ/δικού mRNA VEGF σχετίζονται με την αγγειακή διαπερατότητα (Braun 2001). Άλλες παρατηρήσεις που ενισχύουν την επίδραση του VEGF στη νεοαγγείωση είναι ότι η ενδοϋαλοειδική έγχυση VEGF προκαλεί νεοαγγείωση ίριδας, νεοαγγειακό γλαύκωμα και προαμφιβληστροειδική νεοαγγείωση σε μάτια πηθήκων (Tolentino 1996 & 2002). Επίσης σε ασθενείς με ΗΕΩ έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα VEGF και των υποδοχέων του στην ινοαγγειακή μεμβράνη, τους περιβάλλοντες ιστούς και το μελάγχρουν επιθήλιο (Schwesinger 2001). Σε καλλιέργεια κυττάρων μελάγχρουν επιθηλίου, η έκθεση σε υποξία και κυτοκίνες προκάλεσε την επαγωγή της έκφρασης του VEGF τόσο και επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης (Schwesinger 2001). Επίσης η υπαμφιβληστροειδική ένεση ανασυνδυσασμένου αδενοϊού που εκφράζει τον VEGF₁₆₅, προκαλεί ισχυρή έκφραση του VEGF και δημιουργία χοριοειδικής νεοαγγείωσης, δείχνοντας ότι ακόμη και η προσωρινή υπερέκφραση του VEGF αρκεί για να προάγει τη νεοαγγείωση σε μάτια αρουραίων (Spilisbury 2000).

1.6 Νευροεκφύλιση και ΔΑ.

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της ΔΑ όπως παρουσιάστηκε παραπάνω οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας των αιμοφόρων αγγείων του αμφιβληστροειδούς με αποτέλεσμα την εμφάνιση οιδήματος μικροανευρισμάτων, ανάπτυξη μη φυσιολογικών αιμοφόρων αγγείων και την εμφάνιση φλεγμονής. Όλα τα παραπάνω συμπτώματα έχουν ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ομοιόστασης και την εμφάνιση ισχαιμικών επεισοδίων στον οφθαλμό.

Με τον όρο ισχαιμία αναφερόμαστε σε μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ελλιπή παροχή οξυγόνου και γλυκόζης σε έναν ιστό, καθώς και από μη αποτελεσματική αποβολή των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού. Μια ισχαιμική κατάσταση μπορεί να επιφέρει δραματικές συνέπειες στον προσβεβλημένο ιστό, καθώς μεταξύ άλλων, οδηγεί σε παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων, ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και άλλων ουσιών, οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν βλάβες αλλά ακόμα και να οδηγήσουν σε θάνατο τα προσβεβλημένα κύτταρα. Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία αποτελεί μια πολύ συνηθισμένη κλινική κατάσταση. Παρατηρείται σε πολύ σοβαρές οφθαλμικές παθήσεις, όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς και το γλαύκωμα και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και τύφλωση.

Αλλαγές στην λειτουργία των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς μπορούν να ανιχνευτούν πολύ πριν από την εμφάνιση των αγγειακών βλαβών. Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι ο διαβήτης προκαλεί βλάβες στα νευρικά κύτταρα σε αρχικά στάδια της ασθένειας, πράγμα που επιβεβαιώθηκε με την πραγματοποίηση ηλεκτροαμφιβληστοειδογραφίματος (ERG), μια διαδικασία κατά την οποία μετράται η ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα του αμφιβληστροειδούς με την χρήση εξωτερικών ηλεκτροδίων και μέτρηση αλλαγών των δυναμικών πεδίου που προκαλείται από το σύνολο των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς.

Μέσω της ERG έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στη δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων σε ασθενείς που έπασχαν από διαβήτη τύπου I, 5 χρόνια μετά την εκδήλωση της ασθένειας, αρκετά πριν από την διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των αιμοφόρων αγγείων του αμφιβληστροειδούς. Πέρα από τον άνθρωπο ERG έχει πραγματοποιηθεί και σε μοντέλα διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε ζώα όπως αρουραίους. Παρατηρήθηκε μεταβολή του b-wave από τα φυσιολογικά επίπεδα η οποία όμως αντιστράφηκε μετά την χρήση αναστολέων της αναγωγής της αλδόζης, ινσουλίνης και άλλων ουσιών ως θεραπευτικών μέσων. Η παραπάνω διαπίστωση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι πρώιμες αυτές αλλαγές στην φυσιολογία του οφθαλμού είναι αναστρέψιμες πριν από την εμφάνιση μόνιμων βλαβών.

Η απόδειξη ότι τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς υπόκεινται σε αποίπωση, προέκυψε από *post mortem* μελέτες σε οφθαλμούς ατόμων τα οποία έπασχαν από διαβήτη για περίπου 40 χρόνια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μοντέλα διαβήτη, τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε ζώα με την χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (STZ). Σε δείγματα αμφιβληστροειδούς των παραπάνω ζώων παρατηρήθηκε αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων με την χρήση TUNEL καθώς και από ιστολογικές μελέτες.

Η νευροεκφυλιστική δράση των αυξημένων επιπέδων της γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή έγινε φανερή με μία σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν από τους Barber et al.. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς σε ζώα στα οποία προκλήθηκε διαβήτης με την χορήγηση STZ, δεν οφείλεται στην δράση της ίδιας της ουσίας. Σε διαβητικά ζώα στα οποία χορηγήθηκε ινσουλίνη, παρατηρήθηκε μειωμένη αποπτωτική δραστηριότητα σε σχέση με ζώα στα οποία δεν χορηγήθηκε (Barber et al., 1998).

Μελέτες συνεντοπισμού με τη χρήση TUNEL και του δείκτη von Willebrand, ενός ειδικού παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι στην τα αποπτωτικά κύτταρα στην πλειοψηφία τους ήταν

νευρικά και γλοιακά κύτταρα, ενώ η αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα παρατηρείται καθ' όλη την διάρκεια του διαβήτη (Barber et al., 1998).

Τέλος παρατηρήθηκε μείωση των σωμάτων των γαγγλιακών κυττάρων στην GCL στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς καθ' όλη την διάρκεια του διαβήτη, αποτέλεσμα που συνάδει με μείωση των νευρικών απολήξεων στο οπτικό νεύρο (Scott et al., 1986).

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με βιοχημικά δεδομένα τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή του προ-αποπτοτικού παράγοντα Bax και της αποπτωτικής πρωτεΐνης κασπάση, στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών αρουραίων (Podesta et al., 2000; Mohr et al., 2002) φανερώνει ότι η νευροεκφύλιση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.

1.6.1. Διαβήτης και κύτταρα του αμφιβληστροειδούς

Τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα οδηγούν σε αλλαγές της λειτουργίας των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Shirao & Kawasaki, 1998; Li et al. 2002; Hancock & Kraft, 2004; Barile et al. 2005; Phipps et al. 2006; Kern et al. 2007) και στην απώλεια γαγγλιακών κυττάρων, βραχύνων κυττάρων, οριζόντιων κυττάρων και φωτουποδοχέων (Sima et al. 1992; Kamijo et al. 1993; Hammes et al. 1995; Barber et al. 1998; Lieth et al 2000; Zeng et al. 2000; Aizu et al. 2002; Asnaghi et al 2003; Park et al. 2003; Kusner et al. 2004; Martin et al. 2004; Ning et al. 2004; Seki et al. 2004; Gastinger et al. 2006)

Γαγγλιακά κύτταρα

Σε αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα αμφιβληστροειδούς ασθενών διαβήτη τύπου I και II, και αφορούν την κατηγορία των γαγγλιακών κυττάρων, έχει παρατηρηθεί μείωση της στοιβάδας GCL, καθώς και μείωση του αριθμού των κυττάρων. Από

ανοσοϊστοχημικές μελέτες παρατηρείται μία αύξηση στην έκφραση των παραγόντων Bax, caspase-3 και caspase-9(Oshitari et al. 2009), Bad cytochrome-c AIF ενώ η έκφραση των παραγόντων Cox-2 Akt Mcl-1 δεν επηρεάστηκε(Abu El-Astar et al 2007). Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα αυτά υπόκεινται σε αποπτωτικό θάνατο. Η απόπτωση πραγματοποιείται μέσω δύο διακριτών μονοπατιών. Το μονοπάτι εξαρτώμενο από κασπάσες, αλλά και το μονοπάτι ανεξάρτητο των κασπασών. Η κασπάση-3 είναι το σημαντικότερο μόριο στο πρώτο μονοπάτι, ενώ η AIF είναι η πρωτεΐνη που επάγει το δεύτερο μονοπάτι (Yong-hao et al., 2008).

Στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε αρουραίους, έχει ανιχνευθεί αυξημένη έκφραση της caspase-3 και εμφανίζεται αυξημένος αριθμός κυττάρων θετικά σε TUNEL (Barber et al. 1998, Lieth et al. 2000, Barber et al. 2005, Gastinger et al. 2006). Ο αριθμός των κυττάρων αυτών είναι μικρός, γεγονός που υποδηλώνει τον αργό ρυθμό εξέλιξης της ασθένειας. Παράλληλα σε ιστολογικές μελέτες παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 22% στο πάχος της στοιβάδας IPL σε χρονικό διάστημα 7,5 μηνών διαβήτη σε αρουραίους, γεγονός που υποδηλώνει μεταβολές σε δενδρίτες νευρικών κυττάρων και συνάψεις σε εσωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδούς (Barber et al. 1998). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στον αμφιβληστροειδή αρουραίων Sprague-Dawley όπου η μείωση σε χρονικό διάστημα ενός μήνα ήταν 10% και σε αρουραίους Brown-Norway η μείωση ήταν της τάξης του 16% (Aizu et al. 2002). Τέλος, η πυκνότητα των νευροαξόνων στο οπτικό νεύρο παρουσίασε μείωση σε ορισμένα τρωκτικά (Scott et al.1986, Sima et al. 1992, Kamijo et al. 1993).

Οι μορφολογικές αλλαγές οι οποίες συμβαίνουν στα γαγγλιακά κύτταρα, αφορούν αύξηση στο μήκος, την πυκνότητα και τον αριθμό των νευρικών απολήξεων στα ON γαγγλιακά κύτταρα τόσο στον άνθρωπο όσο και στους αρουραίους (Qin et al. 2006, Meyer-Rusenberget al. 2007). Αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή ελάττωση της νυκτερινής όρασης καθώς και την διάκριση λεπτομερειών σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.

Βραχύινα κύτταρα

Μια άλλη κατηγορία κυττάρων τα οποία επηρεάζονται από τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι τα βραχύινα, η απώλεια των οποίων οδηγεί σε μείωση του πάχους της των INL και ONL στοιβάδων του αμφιβληστροειδούς. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες βραχύνων κυττάρων, αυτά όμως τα οποία φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο κατά την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι εκείνα των οποίων βασικοί νευροδιαβιβαστές είναι η ντοπαμίνη (Nishimura et al. 1985, Labari et al. 1991) και η ακετυλοχολίνη (Sanchez-Chavez et al. 1995, 2001). Τα βραχύινα κύτταρα, υφίστανται απόπτωση κατά την εξέλιξη της νόσου σε τρωκτικά, γεγονός το οποίο συμβάλει στις επιπλοκές που εμφανίζονται στην όραση.

Τα χολινεργικά βραχύινα κύτταρα, παρουσίασαν μείωση της τάξης 20% σε ποντίκια διαβητικά για χρονικό διάστημα 6 μηνών σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα σε μετρήσεις σε ολόκληρο τον αμφιβληστροειδή. Η αντίστοιχη μείωση των ντοπαμινεργικών βραχύνων κυττάρων ήταν της τάξης του 16% (Gastinger et al. 2006). Μια ακόμα κατηγορία που φαίνεται να επηρεάζεται είναι τα βραχύινα κύτταρα τα οποία περιέχουν μονοξειδίο του αζώτου (Goto et al. 2005; Roufail et al. 1998).

Ο τρόπος με τον οποίο δρα η αυξημένη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα στο ντοπαμινεργικό κύκλωμα του αμφιβληστροειδούς, έχει ομοιότητες με την ασθένεια του Parkinson. Σε κάθε περίπτωση παρατηρείται μείωση της στοιβάδας των νευρικών απολήξεων (Lopes de Faria et al. 2002; Inzelberg et al. 2004), και η αύξηση του χρόνου αντίδρασης του αντανεκλαστικού της κόρης του οφθαλμού σε συνθήκες αλλαγής της έντασης του φωτός (Beaumont et al. 1987; Dutsch et al. 2004). Η ελάττωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στον οφθαλμό ασθενών με Parkinson, είναι παρόμοια με την μείωση της ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή λόγω διαβήτη.

Φωτοϋποδοχείς – Οριζόντια κύτταρα

Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα κατά τον διαβήτη προκαλεί αλλαγές στον μεταβολισμό της γλυκόζης από τα κύτταρα (Kumagai et al. 1994; Zeng et al. 2000). Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι μια αξιοσημείωτη μείωση του πάχους της ONL στοιβάδας και αλλαγές στους φωτοϋποδοχείς (Greenstein et al. 1990; Holorigian et al. 1997). Τα πρώτα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζονται συνήθως 4 εβδομάδες από την έναρξη του διαβήτη και αυξάνονται καθώς περνάει ο χρόνος. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν πριν από την εμφάνιση της νεοαγγείωσης και τα πρώτα προβλήματα τα οποία εμφανίζονται στην όραση σχετίζονται με την απώλεια τους (Nork et al. 2000). Ένας πιθανός λόγος που οδηγεί τους φωτοϋποδοχείς σε αποπτωτικό θάνατο, είναι η ύπαρξη ελευθέρων ριζών και κυρίως οξειδίων του αζώτου (Gotzes et al. 1998).

Μια ακόμα κατηγορία κυττάρων τα οποία φαίνεται να επηρεάζονται από τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, είναι τα οριζόντια κύτταρα. Οι μετασυναπτικές απολήξεις ορισμένων οριζόντιων κυττάρων που εντοπίζονται στην OPL κοντά σε αγγεία και περιβάλλουν την βασική μεμβράνη, παρουσιάζουν νευροεκφυλιστικές αλλαγές. Η ιδιότητά τους αυτή τα κάνει ευαίσθητα ακόμα και σε ελάχιστες αλλαγές που μπορεί να συμβούν στα αγγεία (Knabe et al. 2000).

Κύτταρα Müller

Τα κύτταρα της γλοίας διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό υποστηρικτικό ρόλο για τα νευρικά κύτταρα αφού διατηρούν ένα φυσιολογικό βιοχημικό περιβάλλον και στήριξη. Δυσλειτουργίες τους σχετίζονται με την παθογένεια νευροεκφυλιστικών ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως επιληψία (Binder et al. 2006), σχιζοφρένεια (Matute et al. 2005) και τη νόσο Alzheimer (Kuchibhotia et al. 2009).

Σε μοντέλο αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης, παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης GFAP από τα γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, η πλειοψηφία των οποίων ήταν κύτταρα Müller. Τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του αμφιβληστροειδούς (Newman et al. 1996). Η ενεργοποίηση αυτή έχει διπλό ρόλο. Μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση ορισμένων κυττάρων ενεργοποιώντας ειδικούς υποδοχείς που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο (Xu et al. 2009), να προκαλέσει διεγερσιτοξικότητα γλουταμικού και να διαταράξει την ομοιόσταση του νερού και των ιόντων καλίου (Brightman et al. 2005; Iandiev et al. 2008). Από την άλλη πλευρά η ενεργοποίησή τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την νευροπροστασία παράγοντας ουσίες αναγεννητικές ως απάντηση στην βλάβη που δημιουργήθηκε (Fisher and Reh 2003; Xue et al. 2006; Bemardos et al. 2007; Thummel et al. 2008).

Ειδικότερα στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, φαίνεται ότι τα κύτταρα Müller εμφανίζουν αλλαγές στην λειτουργία τους ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες που δημιουργείται με την αύξηση των επιπέδων του γλουταμικού και του NO στον αμφιβληστροειδή (Du et al. 2004). Οι Inokuchi et al. 2001 παρατήρησαν ότι τα επίπεδα του IGF-1 ήταν αυξημένα στον αμφιβληστροειδή διαβητικών ασθενών. Μια από τις πηγές του IGF-1 ήταν τα κύτταρα Müller.

1.7 Θεραπεία

Ο αμφιβληστροειδής είναι μέρος του ΚΝΣ και, όπως ο εγκέφαλος, δεν είναι ικανός να αναπληρώσει μεγάλη έκταση απώλεια νευρικών κυττάρων λόγω ασθένειας ή τραυματισμού. Είναι επομένως απαραίτητο, σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες του οφθαλμού να υπάρχουν αποτελεσματικές θεραπείες οι οποίες θα στοχεύουν στην πρόληψη της νόσου, τη μείωση της απόπτωσης των κυττάρων αλλά και στην αναγέννηση των εκφυλισμένων νευρώνων. Συγκριτικά με τον εγκέφαλο, ο αμφιβληστροειδής είναι ένας εύκολα προσβάσιμος ιστός με καλά μελετημένη ανατομία οπότε και είναι

εφικτή η πραγματοποίηση χειρουργικών επεμβάσεων συμπεριλαμβανομένων ενδοφθάλμιων ενέσεων, εμφύτευση φακών ή άλλων προσθετικών συσκευών καθώς και μεταμόσχευση μη νευρικών οφθαλμικών ιστών.

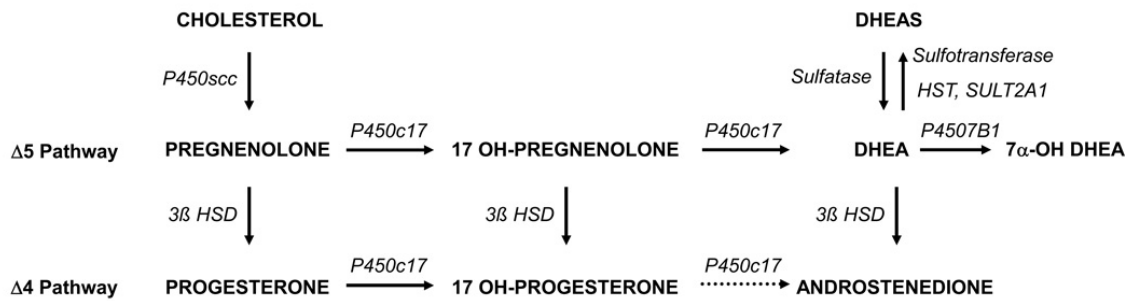
Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα απώλειας της όρασης στις σύγχρονες κοινωνίες και η θεραπεία της απασχολεί μεγάλο αριθμό επιστημόνων σε όλο τον κόσμο. Η αγωγή με ινσουλίνη για το διαβήτη φαίνεται να καθυστερεί την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Εδώ και πέντε δεκαετίες περίπου κύριοι τρόποι αντιμετώπισης αποτελούν η καταστρεπτική αμφιβληστροειδική φωτοπηξία, η υαλοδοεκτομή, καθώς και θεραπείες με anti-VEGF παράγοντες για την αντιμετώπιση της αύξησης του VEGF, οι οποίες στοχεύουν στη νεοαγγείωση και είναι ουσιαστικά τρόποι βελτίωσης της κατάστασης του ασθενούς και όχι πραγματική θεραπεία της νόσου. Η πρόληψη της εμφάνισης της νόσου δεν έχει καταστεί ακόμα δυνατή. Κυριότερη αιτία είναι η έλλειψη μεθόδων διάγνωσης της δυσλειτουργίας του αμφιβληστροειδούς πριν από την εμφάνιση των βλαβών στα αγγεία και γενικά των προβλημάτων στην όραση. Παρά την εύκολη προσβασιμότητα του ιστού δεν είναι δυνατή η πραγματοποίηση βιοψίας σε διαβητικούς ασθενείς. Δείγματα υαλώδους τα οποία παρουσιάζουν αλλαγές στα τελικά στάδια της νόσου, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό αλλαγών στα αρχικά στάδια. Τα μοντέλα διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας ποντικών ή αρουραίων χρησιμοποιούνται ευρέως για θεραπευτικές μελέτες αλλά και για λήψη πολύτιμων πληροφοριών οι οποίες αφορούν γενετικούς τόπους σχετιζόμενους με τη νόσο και αλλαγές που αυτή προκαλεί σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης και κυτταρικής σηματοδότησης. Παρόλα αυτά, η εξελικτική απόσταση των τρωκτικών από τον άνθρωπο με γενετικές αλλά και ανατομικές διαφορές μπορεί να περιορίσει σημαντικά τη χρησιμότητα των πληροφοριών που λαμβάνουμε από τα μοντέλα αυτά. Για παράδειγμα, το μικρό μέγεθος του οφθαλμού τους δεν επιτρέπει τη σωστή αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών δεδομένων που απαιτούνται για την ανάπτυξη συσκευών χορήγησης φαρμάκων σε ασθενείς (D. A. Antonetti et al., 2006).

Η νευροπροστασία αποτελεί αντικείμενο μεγάλου αριθμού μελετών, αφού παθήσεις του οφθαλμού όπως το γλαύκωμα, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια περιλαμβάνουν τη νευροεκφύλιση κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Μέχρι τώρα πολύ λίγες ουσίες έχουν φανεί να παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες και έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός δράσης τους. Επιπλέον, οι ουσίες αυτές θα πρέπει να μπορούν να τοποθετούνται εύκολα και με ασφάλεια στο μάτι ή να χορηγούνται με τρόπο που θα επιβεβαιώνει ότι μπορούν να περάσουν τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό και να φτάσουν στον ιστό (Mohamed et al., 2007). Ανάμεσα στις ουσίες αυτές είναι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο ciliary neurotrophic factor, ο pigment epithelium derived factor και ο nerve growth factor (NGF) οι οποίοι παρουσιάζουν νευροπροστατευτική δράση σε ζωικά μοντέλα διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Shen et al., 2010; Steinle, 2010; Tao, 2006). Μάλιστα ο NGF έχει δειχθεί ότι προστατεύει τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς ακόμα και όταν χορηγείται σε σταγόνες σε μοντέλα γλαυκώματος και διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε αρουραίους (Colafrancesco et al., 2011), αλλά και σε ασθενείς με γλαύκωμα ή ωχροπάθεια (Lambiase, Aloe, et al., 2009; Lambiase, Coassin, Tirassa, Mantelli, & Aloe, 2009). Ο μηχανισμός με τον οποίο ο NGF που είναι πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους μπορεί να φτάσει στον αμφιβληστροειδή μέσω χορήγησης με σταγόνες δεν έχει εξακριβωθεί. Η pituitary adenylate cyclase πρωτεΐνη (PACAP) είναι ένα νευροπεπτίδιο το οποίο επίσης παρουσιάζει νευροπροστατευτικές δράσεις. Έχει δειχθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διάφορων παθήσεων που σχετίζονται με το διαβήτη αλλά και ότι μειώνει την απώλεια νευρικών κυττάρων στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια όπως γαγγλιακά και ντοπαμινεργικά βραχύκινα κύτταρα (Szabadfi et al., 2012). Νευροπροστατευτικές δράσεις φαίνεται ότι παρουσιάζουν και τα νευροστεροειδή, όπως η DHEA, τα οποία θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

1.8. Νευροστεροειδή

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τις αντιαποπτωτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες των νευροστεροειδών. Ο όρος νευροστεροειδή έκανε την εμφάνιση του τη δεκαετία του 1980, όταν εντοπίστηκαν στον εγκέφαλο του αρουραίου στεροειδείς ορμόνες, σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από αυτές στο πλάσμα του αίματος (Corpechot et al. 1981, 1983). Επιπλέον οι συγκεντρώσεις των εν λόγω στεροειδών παρέμεναν υψηλές ακόμα και μετά από γοναδεκτομή ή επινεφριδιοτομή, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα νευροστεροειδή είτε συντίθενται *de novo* στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, είτε παράγονται στους ενδοκρινείς αδένες και συγκεντρώνονται σε δομές του νευρικού συστήματος. Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν πράγματι τα νευροστεροειδή συντίθενται στον εγκεφαλικό ιστό, ελέγχθηκε η παρουσία ενός συνόλου ενζύμων στο νευρικό σύστημα, τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην παραγωγή των στεροειδών σε άλλα όργανα (Compagnone & Mellon, 2000).

Με τον όρο νευροστεροειδή (νευροενεργά στεροειδή) αναφερόμαστε σε στεροειδείς ορμόνες οι οποίες δρουν σε νευρικό ιστό, ενώ συντίθενται είτε στο νευρικό σύστημα είτε σε ενδοκρινείς αδένες του οργανισμού (Paul & Purdy, 1992). Τα νευροστεροειδή, όπως η πρεγνανολόνη (pregnanolone-PREG), η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), η προγεστερόνη (PROG) και τα παράγωγά τους, συντίθενται παρουσία στεροειδικών ενζύμων. Το πρώτο ορμονικά ρυθμιζόμενο βήμα για τη σύνθεση όλων των νευροστεροειδών είναι η μετατροπή της χοληστερόλης (cholesterol) σε πρεγνανολόνη από το μιτοχονδριακό ένζυμο cholesterolchain cleavage P450_{sc}. Η PREG μπορεί να μετατραπεί είτε σε DHEA από το κυτόχρωμα P450_{c17}, μέσω του Δ5 μονοπατιού, είτε σε ανδρογόνα, μέσω του Δ4 μονοπατιού. Η DHEA που σχηματίζεται, μετατρέπεται με τη σειρά της είτε σε ανδρογόνα, μέσω του ενζύμου 3βHSD (3β-hydroxysteroid dehydrogenase), είτε στον πιο σταθερό σουλφιδικό εστέρα της DHEAS (DHEA sulfate), από το ένζυμο sulfotransferase (HST, SULT2A1) (Maninger et al. 2009).



Σχήμα 10: Τα μονοπάτια Δ4 και Δ5 των νευροστεροειδών

Τα νευροστεροειδή δρουν στο νευρικό σύστημα επιτελώντας είτε ενδοκρινή είτε παρακρινή δράση. Επηρεάζουν τη νευροδιαβίβαση, μέσω αλληλεπίδρασης με μεμβρανικά ιοντικά κανάλια ή μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους νευροδιαβιαστές, ενώ μπορούν να ελέγχουν και τη γονιδιακή έκφραση, μέσω πρόσδεσης σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς και ακόλουθης εισχώρησης τους στον πυρήνα, είτε απευθείας μέσω πρόσδεσης σε πυρηνικούς υποδοχείς. Οι DHEA(S) μπορούν να δράσουν σαν αλλοστερικοί ρυθμιστές σε υποδοχείς νευροδιαβιαστών, όπως είναι οι GABA (Majewska et al., 1986, Herd και et al., 2007, Hosie et al., 2006, Puia et al. 1990), οι NMDA (Wu et al., 1991) και οι σ υποδοχείς (Maurice et al., 1997), ενώ η PREG δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής των GABAA υποδοχέων (Majewska et al., 1985, Rabow et al., 1995) και των AMPA υποδοχέων (Wu & Chen, 1997, Spivak et al., 2004, Mamelì et al., 2005, Shirakawa et al., 2005), ενώ είναι θετικός ρυθμιστής των NMDA υποδοχέων (Wu et al., 1991, Bowlby, 1993, Irwin et al., 1994, Park-Chung et al., 1997, Horak et al., 2004). Τα νευροστεροειδή φαίνεται να έχουν ένα πολύ ευρύ φάσμα δυνητικών θεραπευτικών χρήσεων σε καταστάσεις όπως η επιληψία (Reddy & Rogawski, 2009) και τα εγκεφαλικά τραύματα (traumatic brain injury) (Morrow, 2007, Dubrovsky, 2005), ενώ τα επίπεδα τους φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Bastianetto et al., 1999, Lapchak et al., 2000, Charalampopoulos et al., 2008b).

Κατά την εμβρυική ανάπτυξη η DHEA και ο σουλφιδικός εστέρας της DHEAS [και τα δύο μαζί εν συντομία DHEA(S)], όπως και οι PREG και PROG, εκκρίνονται από τους επινεφριδιακούς αδένες και απαντούνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο έμβρυο (Mesiano & Jaffe, 1997). Οι συγκεντρώσεις

αυτές μειώνονται κατά τους πρώτους έξι μήνες της ζωής και παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα μέχρι την έναρξη της πρώιμης σεξουαλικής ωρίμανσης (adrenarche), όπου η DHEA παράγεται και εκκρίνεται από τον φλοιό των επινεφριδίων και αρχίζει να αυξάνεται η συγκέντρωση της τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, όσο και στο πλάσμα του αίματος (Havelock et al., 2004, Parker & Odell, 1980). Η DHEA στους ενήλικες εκκρίνεται επίσης από τις ωοθήκες και τους όρχεις (Nieschlag et al., 1973). Τα υψηλότερα επίπεδα DHEA(S) παρατηρούνται σε ηλικίες των 20-25 ετών, ενώ από εκεί και πέρα αρχίζουν να μειώνονται προοδευτικά, φτάνοντας στο ναδίρ στην ηλικία των 65-70 ετών, όπου αρχίζουν να εμφανίζονται πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Regelson & Kalimi, 1994, Guazzo et al., 1996, Azuma et al., 1993). Είναι πλέον αποδεδειγμένο πειραματικά ότι τα χαμηλά επίπεδα νευροστεροειδών σχετίζονται με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων καθώς έχει βρεθεί ότι μειωμένα επίπεδα DHEA κατά την πορεία της γήρανσης καθιστούν τους νευρώνες περισσότερο επιρρεπείς σε φθορά (Bastianetto et al., 1999, Lapchak et al., 2000, Charalampopoulos et al., 2008b).

1.8.1. Νευροστεροειδή και νευροπροστασία

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, εμφανίστηκε ένας μεγάλος αριθμός νέων δεδομένων που υποστηρίζουν τις ενδεχόμενες νευροπροστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών όπως η DHEA, η DHEAS, η PREG, η τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη. Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα νευροστεροειδή πιθανόν είναι ικανά να αποτρέπουν τον νευρωνικό κυτταρικό θάνατο που πυροδοτείται από διάφορα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της ισχαιμίας και της διεγερσιτοξικότητας, ενώ οι μεταβολές στα επίπεδα των στεροειδών φαίνεται να επηρεάζουν την νευρωνική τύχη σε ποικίλες νευρολογικές και διανοητικές διαταραχές, που έχουν ή όχι σχέση με την πάροδο της ηλικίας. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται μερικές από τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις για τις νευροπροστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών.

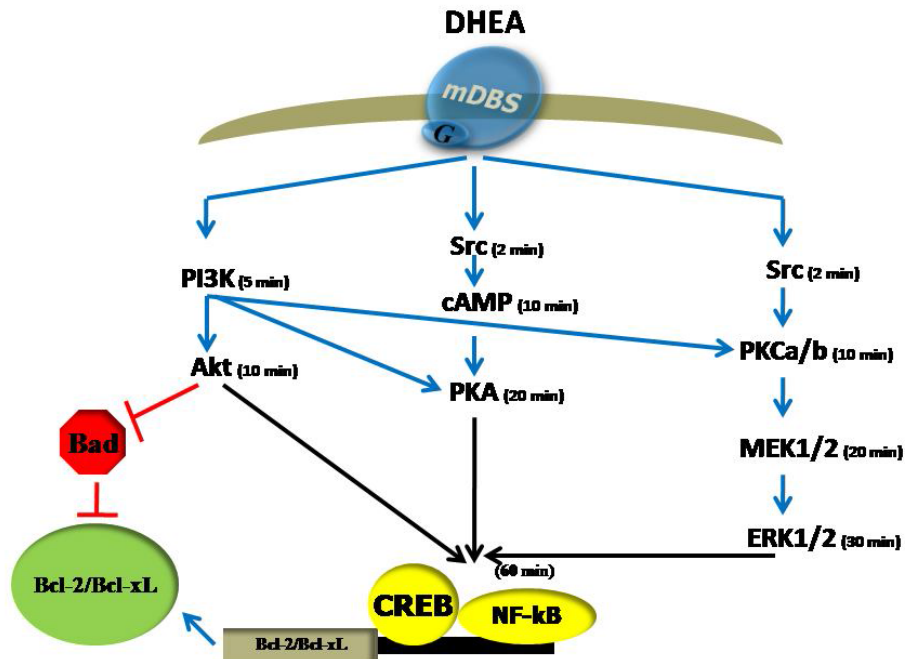
Πίνακας 1: Μερικές από τις νευροπροστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών (τροποποιημένες από Maninger et al. 2009).

Νευροστεροειδές	Νευροπροστατευτικές ιδιότητες
DHEA	Προστασία των DAεργικών νευρώνων έναντι του MPTP (σε μύες)
	Μείωση της φθοράς, που προκαλείται από ισχαιμικές καταστάσεις, στα κύτταρα της περιοχής CA1 του υποκάμπου
	Προστασία των πυραμιδικών νευρώνων του υποκάμπου από NMDA-Τοξικότητα
	Προστασία των μιτοχondρίων από την περίσσεια Ca ²⁺
	Αύξηση την νευρωνικής επιβίωσης μετά από ανοξία
	Προστασία των νευρώνων του υποκάμπου έναντι την τοξικότητας που επάγεται από NMDA, AMPA και KA
	Μείωση του ρυθμού αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου λόγω NMDA Νευροτοξικότητας
	Προστασία έναντι της απόπτωσης που επάγεται από αποστέρηση ορού
	Αύξηση της δραστηριότητας κινάσης της Akt σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων και μείωση της απόπτωσης
	7-α-hydroxy-DHEA
7-β-hydroxy-DHEA	Νευροπροστασία που επάγεται από αντιγλυκοκορτικοειδή
DHEAS	Προστασία των νευρώνων του υποκάμπου από νευροτοξικότητα που επάγεται από γλουταμινικό οξύ
	Μερική νευροπροστασία έναντι στην τοξικότητα που επάγεται από νευροτοξικότητα που επάγεται από κολχικίνη, NMDA και γλουταμινικό οξύ
	Προστασία των κοκκιωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας έναντι της αποστέρησης οξυγόνου και γλυκόζης
	Νευροπροστασία σε ένα ζωικό μοντέλο αντιστρεπτής ισχαιμίας στη σπονδυλική στήλη (σε κουνέλια)
	Νευροπροστασία σε μοντέλο καθολικής εγκεφαλικής ισχαιμίας σε Αρουραίους
PROG	Νευροπροστασία έναντι της νευροτοξικότητας που επάγεται από γλουταμινικό οξύ
	Νευροπροστασία μετά από πειραματική βλάβη του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος σε αρουραίους
19-norprogesterone	Νευροπροστασία έναντι της νευροτοξικότητας που επάγεται από γλουταμινικό οξύ

Όπως αναφέραμε και παραπάνω ο ρυθμός παραγωγής των στεροειδών τόσο στον εγκέφαλο όσο και στους αδένες μειώνεται προοδευτικά με την πάροδο της ηλικίας (Baulieu & Robel, 1998, Mensah-Nyagan et al, 1999, Compaone & Mellon, 2000). Αυτή η μείωση έχει σχετιστεί με νευρωνική δυσλειτουργία και νευροεκφύλιση (Sapolsky, 1992, Seals & Esler, 2000, Esler et al., 2002), πιθανότατα λόγω του ότι τα στεροειδή προστατεύουν το κεντρικό νευρικό σύστημα από επιβλαβείς παράγοντες (Bastianetto et al., 1999, Cardounel et al., 1999, Lapchak et al., 2000). Πράγματι, έχει βρεθεί ότι για παράδειγμα τα DHEA(S) προστατεύουν τους νευρώνες του ιπποκάμπου αρουραίου ενάντια στην διεγερσι-τοξικότητα που προκαλείται από NMDA, AMPA ή καϊνικό οξύ (Kimonides et al., 1998), ενώ η αλλοπρεγνανολόλη φαίνεται να βελτιώνει την προκαλούμενη από NMDA διεγερσι-τοξικότητα σε ανθρώπινους νευρώνες (Lockhart et al., 2002). Τόσο στο περιφερικό (Schumacher et al., 2002, Koenig et al., 1995) όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Ghoumari et al., 2003, 2005) η τοπική σύνθεση της PROG προάγει το σχηματισμό της μυελίνης κατά την αναγέννηση τραυματισμένων νευρώνων, ενώ επηρεάζει και την διαφοροποίηση των ολιγοδεντροκυττάρων (Gago et al., 2001, 2004, Ghoumari et al., 2005). Η τεστοστερόνη σε κινητικούς νευρώνες μετά την κοπή των αξόνων τους, προάγει την αναγέννηση, ενώ τα οιστρογόνα αναστέλλουν ή καθυστερούν την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer και τη διανοητική υστέρηση (Wise et al., 2001).

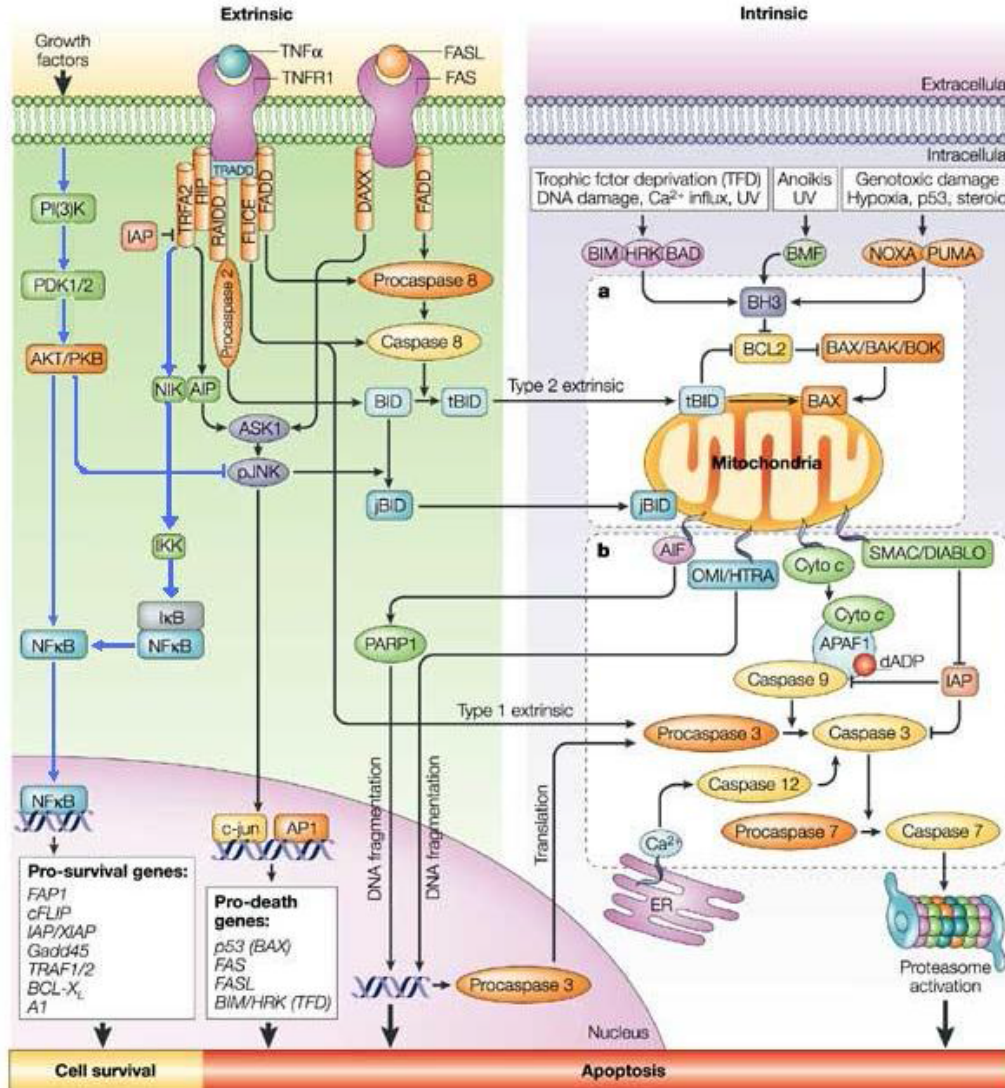
Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες νευροπροστατευτικές δράσεις παραμένουν ακόμη προς διεκρίνιση. Είναι γνωστό ότι τα νευροστεροειδή έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και η διαφορετική αποτελεσματικότητά τους ίσως αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών. Γενικά, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η δράση των στεροειδών ορμονών έγκειται στην πρόσδεση τους σε κυτταροπλασματικούς υποδοχείς και επακόλουθη μεταφορά τους στον πυρήνα, όπου προσδέονται σε μεταγραφικούς παράγοντες και επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Αυτό μπορεί να επιτευχτεί και με απ' ευθείας πρόσδεση τους σε πυρηνικούς υποδοχείς (Maninger et al., 2009). Ωστόσο,

μελέτες δείχνουν ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA ρυθμίζονται μέσω πρόσδεσης της σε υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (Charalampopoulos et al., 2006a). Επιπλέον η ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων διεγείρει έναν καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί στην επιβίωση των κυττάρων (Charalampopoulos et al., 2008a), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 11: Υποθετικό μοντέλο νευροπροστατευτικής δράσης της DHEA. Η DHEA προσδέεται με μεγάλη συγγένεια σε ειδικές μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες (membrane-binding sites coupled to G proteins - mDBS), ξεκινώντας μια αλληλουχία γεγονότων που συμβαίνουν εν παραλλήλω και περιλαμβάνουν: (i) διαδοχική φωσφορύλιωση των κινασών Src/PKCa/b/MEK1/2/ERK1/2 και ενεργοποίηση των CREB και NF-κB, προεπιβιωτικών μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν θετικά την έκφραση των αποπτωτικών Bcl-2 γονιδίων, (ii) φωσφορύλιωση των κινασών PI3K/Akt, οδηγώντας σε φωσφορύλιωση και απενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών Bad πρωτεϊνών και φωσφορύλιωση του CREB, και (iii) αύξηση του cAMP ενδοκυτταρικά, ενεργοποίηση της PKA κινάσης και ακόλουθη φωσφορύλιωση του CREB. Τα γλυκοκορτικοειδή και τα ανδρογόνα δρουν ως ενδογενείς ανταγωνιστές της δράσης της DHEA, μέσω συναγωνισμού για τις μεμβρανικές θέσεις δέσμευσης (Charalampopoulos και συν., 2006a). (Τροποποιημένη από Charalampopoulos και συν., 2008a)

Επιπρόσθετα, πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή των υποδοχέων του NGF (TrkA και p75NTR) στις νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA (Lazaridis et al., 2010). Οι υποδοχείς του NGF συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων μέσω ενός αντιαποπτωτικού μηχανισμού, στον οποίο εμπλέκονται οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, παρόμοιου με το μηχανισμό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 11. Η εκτενής ανάλυση των ενδοκυττάρων μονοπατιών που οδηγούν σε απόπτωση δεν ανταποκρίνονται άμεσα στο σκοπό της παρούσας μελέτης. Μια σύνοψη των βασικότερων διαδικασιών και μορίων που εμπλέκονται στα διάφορα αποπτωτικά μονοπάτια παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12: Ενδογενή και εξωγενή σηματοδοτικά αποπτωτικά μονοπάτια των νευρώνων. Τα μαύρα βέλη αντιπροσωπεύουν αποπτωτικά μονοπάτια ενώ τα μπλε μονοπάτια επιβίωσης. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται από την πρόσδεση των εξωκυττάρων μορίων TNF α ή FAS ligand (FASL), στους αντίστοιχους υποδοχείς TNFR1 και FAS. Η ενεργοποίηση του TNFR1 οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων από τα οποία το TRADD-RIP-TRAF2 δρα είτε μέσω του NF- κ B (nuclear factor- κ B) ελάγοντας επιβίωση, είτε μέσω του JNK ελάγοντας απόπτωση. Άλλα σύμπλοκα ενεργοποιούν προκασπάσες (προκασπάση 2 και 8) και ενεργοποιούν την απόπτωση μέσω κασπάσης 3 ή μέσω διάσπασης της BID ((BH3 BCL2 (B-cell leukaemia/lymphoma-2) homology domain 3) -interacting agonist) σε tBID. Ο θάνατος μέσω FAS μεσολαβείται μέσω της ενεργοποίησης της προκασπάσης 8 ή μέσω της ενεργοποίησης της JNK. Η JNK μετατρέπει την BID σε jBID, επιτρέποντας τη μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια και την απελευθέρωση του SMAC/DIABLO, που ενεργοποιεί μια σειρά κασπασών. Το ενδογενές μονοπάτι εκκινείται από τα μιτοχόνδρια από ποικίλα ερεθίσματα. **α** Μέσω αναστολής της καταστολής της BAX από την BCL2, επιτρέποντας τη μετατόπιση της μιτοχονδριακής BAX και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, του SMAC/DIABLO, του AIF και της HTRA2/OMI. **β** Μέσω αλληλεπίδρασης του κυτοχρώματος c με το APAF1, η οποία ενεργοποιεί την κασπάση 9, σχηματίζοντας το απορτοsome, το οποίο ενεργοποιεί τους downstream τελεστές, κασπάσες 3 και 7 (Από Benn & Woolf, 2004).

1.8.2. Νευροστεροειδή και αμφιβληστροειδής

Όπως και ο εγκέφαλος, έτσι και ο αμφιβληστροειδής αποτελεί στόχο στεροειδών ορμονών και κέντρο παραγωγής τους. Τα πρώτα δεδομένα που πρότειναν την ενδοκρινή επίδραση στη διαδικασία της όρασης, αφορούσαν στη δεκτικότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς προς τη φθορά από το φως, ως επακόλουθο σεξουαλικής ωρίμανσης (O'Steen et al., 1974). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν την παρουσία υποδοχέων στεροειδών και στερεοειδικών ενζύμων (Guarneri et al., 1994) στον αμφιβληστροειδή καθώς και την ανάμειξη αυτών στην φυσιολογία και την παθολογία της οπτικής λειτουργίας.

Στον αμφιβληστροειδή παρατηρούνται σταδιακά όλο και περισσότερα δεδομένα που αφορούν την νευροπροστατευτική δράση των νευροστεροειδών σε διάφορες μορφές εκφύλισης. Ο DHEAS και η 17β-εστραδιόλη φαίνεται να προστατεύουν τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς από ισχαιμία (Bucolo & Drago, 2004) και η τελευταία φαίνεται να προστατεύει τα εσωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδούς από απόπτωση και από αλλαγές στις συναπτικές συνδέσεις που προκαλούνται από ισχαιμικές καταστάσεις (Kaja et al., 2003). Τα οιστρογόνα θεωρείται ότι εμπλέκονται σε νόσους του αμφιβληστροειδούς που σχετίζονται με την ηλικία και το φύλο και αποτρέπουν τη φθορά που προκαλείται από ισχαιμία. Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται στον αμφιβληστροειδή λόγω τοξικών συγκεντρώσεων NMDA, μειώνεται μετά από χορήγηση PROG και DHEA(S), ενώ αναστέλλεται πλήρως μετά από χορήγηση 17α-οιστραδιόλης (Guarneri et al., 2003).

Το πιο διαδεδομένο νευροστεροειδές που απαντάται στον αμφιβληστροειδή είναι η PREG (Guarneri et al., 1994, 1995), ενώ ακολουθούν τα PROG και DHEA (Lanthier & Patwardhan, 1987). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι σουλφιδικοί εστέρες των παραπάνω εντοπίζονται σε μεγαλύτερα επίπεδα από ότι τα ίδια τα νευροστεροειδή (Guarneri et al., 1994). Η παραγωγή νευροστεροειδών στον αμφιβληστροειδή ξεκινά, όπως και στο υπόλοιπο

κεντρικό νευρικό σύστημα, από τη μετατροπή της χοληστερόλης σε PREG. GABAA υποδοχείς, που εντοπίζονται στα αμακρινικά και γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, ενεργοποιούν την σύνθεση της PREG, ενώ το cAMP και οι υποδοχείς περιφεριακού τύπου βενζοδιαζεπίνης (peripheral-type benzodiazepine) φαίνεται να προωθούν τη μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια όπου και πραγματοποιείται αυτή η σύνθεση (Yanagibashi et al., 1989, Guarneri et al., 1992). Είναι πιθανόν οι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν το κυτόχρωμα P450sc να αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, δεδομένου του μεγάλου αριθμού διαφορετικών τύπων γαγγλιακών και βραχύνων κυττάρων που εντοπίζονται στον αμφιβληστροειδή (Guarneri et al., 2003). Ένζυμα για το μεταβολισμό των νευροστεροειδών εντοπίζονται τόσο στους νευρώνες όσο και στα γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Paul & Purdy, 1992).

Η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επάγει γρήγορη αύξηση της παραγωγής PREG και PS (pregnanolone sulfate), ενώ έχει παρατηρηθεί *de novo* σύνθεση νευροστεροειδών, πριν από οξύ νευρωνικό θάνατο (Guarneri et al., 1998a,b). Επίσης έχει βρεθεί ότι το PS ρυθμίζει θετικά τη δραστηριότητα των NMDA υποδοχέων και ότι ενισχύει τον οξύ νευρωνικό θάνατο λόγω διεγερσι-τοξικότητας επαγόμενης από NMDA (Guarneri et al., 1998b). Ο DHEAS από την άλλη, φαίνεται να εμποδίζει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών αναστέλλοντας το NADPH (Aragno et al., 1994). Οι περίσσεια παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), που συνδέεται με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, φαίνεται να σχετίζεται με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση κασπασών (Fujimura et al., 1999), οι οποίες ρυθμίζουν τη διάσπαση του DNA σε αμφιβληστροειδείς και άλλες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος που υπόκεινται σε διεγερσι-τοξικότητα (Rosenbaum et al., 1997 Leist et al., 1997, Morrison et al., 1998, Fujimura et al., 1999).

1.9. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Με τη συνεχή αύξηση του ποσοστού των ατόμων που χάνουν την όρασή τους λόγω διαταραχών που προκαλούνται από το διαβήτη, είναι επιτακτική η ανάγκη για ανάπτυξη βέλτιστων μεθόδων για τη διάγνωση, πρόληψη και θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Όπως σε όλες τις νευροεκφυλιστικές νόσους έτσι και εδώ, οι προσπάθειες επικεντρώνονται πρώτα στην ελαχιστοποίηση του ρυθμού απώλειας των νευρώνων κι έπειτα στην προώθηση της αναγέννησης των εκφυλισμένων νευρώνων. Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, εργαστηριακές αλλά και κλινικές μελέτες προσφέρουν ελπιδοφόρες ενδείξεις σχετικά με τη νευροπροστατευτική δράση των νευροστεροειδών στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και ειδικότερα στον αμφιβληστροειδή.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο (Giannogonas unpublished data) στον αμφιβληστροειδή με το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας (*in vitro*), παρατηρήθηκε μια δόσοεξαρτώμενη προστασία από το νευροστεροειδές DHEA ενώ παρόμοια ήταν η δράση και των συνθετικών αναλόγων BNN50 και BNN124.

Στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν:

A) Η δημιουργία εργαστηριακού μοντέλου διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και παρατήρηση βλαβών που προκαλούνται στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς και

B) Η πιθανή νευροπροστατευτική δράση της DHEA στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.

Ενότητα II

Πειραματικό Μέρος

2.1. Ζώα και υλικά

Σε όλα τα πειράματα που περιγράφονται στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί και αρσενικοί αρουραίοι ράτσας Sprague-Dawley και βάρους 170-240 g, οι οποίοι τοποθετούνταν σε κλουβιά (1-2 ζώα ανά κλουβί) με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Τηρούνταν ένας κύκλος 12ωρου φωτός/σκοταδιού. Η ευθανασία των ζώων γινόταν μέσα σε πλαστικό θάλαμο με εισπνοή διαιθυλοαιθέρα εντός περίπου 10 λεπτών.

Όλα τα υλικά και οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω, ταυτόχρονα με την περιγραφή των μεθόδων που ακολουθήθηκαν.

2.2. Πρόκληση διαβήτη

Η στρεπτοζοτοκίνη (STZ) είναι ένα ανάλογο γλυκόζης. Αποτελείται από μια εξόζη (σάκχαρο) η οποία είναι συνδεδεμένη με μία ομάδα μέθυλονιτροουρίας. Παρόλο που η νιτροουρία είναι λιπόφιλη, η STZ λόγω της εξόζης είναι λιγότερο λιπόφιλη και εισέρχεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω των μεταφορέων GLUT2 της γλυκόζης.

Αρχικά τα ζώα πρέπει να παραμείνουν σε περίοδο νηστείας 12 ωρών. Η STZ δρα ανταγωνιστικά με την γλυκόζη για την πρόσδεση στους GLUT2 υποδοχείς και με την νηστεία μειώνουμε τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ώστε να δράσει η ουσία.

Στο επόμενο στάδιο, γίνεται μέτρηση των αρχικών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ζώων ώστε να βεβαιωθούμε ότι τα ζώα έχουν φυσιολογικές τιμές γλυκόζης στο αίμα τους και τα ζυγίζουμε για να καταγράψουμε την τιμή του βάρους τους. Με βάση την τιμή αυτή του βάρους, υπολογίζουμε την ποσότητα της STZ που θα χορηγήσουμε στο κάθε ζώο. Μετά από βιβλιογραφική έρευνα αποφασίσαμε η δόση της STZ που θα χορηγήσουμε στα ζώα να είναι 70mg/kg βάρους.

Η διάλυση της ουσίας γίνεται σε citrate buffer με pH 4,7. Το citrate buffer πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα από stock διαλυμάτων citric acid και sodium citrate.

Η STZ διαλύεται σε 500 μl citrate buffer και χορηγείται στα ζώα με ενδοπεριτοναϊκή (ip) ένεση. Η διάλυση της ουσίας πρέπει να γίνει λίγο πριν από την χορήγησή της γιατί η STZ δεν είναι σταθερή στην διαλυμένη της μορφή (αποσυντίθεται σε 20 λεπτά από την στιγμή που θα διαλυθεί) και επίσης είναι φωτοευαίσθητη. Η όλη κατεργασία της πρέπει να γίνει σε σκοτεινό μέρος. Καλό θα ήταν να προφυλάσσουμε το διάλυμα της STZ με αλουμινόχαρτο.

Αφού χορηγηθεί η ουσία στα ζώα, τα τοποθετούμε στο κλουβί στο οποίο έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και σε διάλυμα σουκρόζης 10% (το οποίο παρασκευάζουμε με νερό βρύσης αφού προορίζεται για κατανάλωση από τα ζώα).

Λίγες ώρες μετά την χορήγηση της STZ ξεκινάει η δράση της. Καταστρέφει δηλαδή τα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω νέκρωσης δρώντας ως αλκυλιωτικός παράγοντας του DNA, ως αλκυλιωτικός παράγοντας πρωτεϊνών και ως δότης NO. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση όλων των αποθεμάτων ινσουλίνης των β-κυττάρων στον οργανισμό των ζώων. Με το διάλυμα σουκρόζης αποφεύγουμε το απότομο υπογλυκαιμικό σοκ των ζώων το οποίο μπορεί να τα οδηγήσει ακόμα και σε θάνατο.

Μετά από 24 ώρες από την χορήγηση της STZ, αφαιρούμε το διάλυμα σουκρόζης και τα ζώα έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό. Από την στιγμή που έχουν καταστραφεί τα β-κύτταρα και δεν παράγεται ινσουλίνη από τον οργανισμό, τα επίπεδα της γλυκόζης αυξάνονται σημαντικά. Ορατά αποτελέσματα του διαβήτη που έχει προκληθεί είναι η πολυδιψία των ζώων και η πολουουρία. Μετρώντας με κάποια συσκευή τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα μπορούμε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη του διαβήτη. Η μέτρηση γίνεται με μεταφορά μικρής ποσότητας αίματος το οποίο το παίρνουμε από φλέβα της ουράς του ζώου κάνοντας μια μικρή τομή με ένα νυστέρι.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η STZ είναι τοξική τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Κατά τη ζύγιση πρέπει να λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα προστασίας (ζύγιση μέσα σε απαγωγό και χρήση γαντιών και μάσκας για να αποφευχθεί εισπνοή της ουσίας).

2.3. Χορήγηση DHEA ενδοπεριτοναϊκά

Τα ζώα κρατήθηκαν σε κλουβιά για 4 εβδομάδες και στη συνέχεια τους χορηγήθηκε για 7 συνεχόμενες μέρες με ενδοπεριτοναϊκά ένεση 10 mg/kg σωματικού βάρους DHEA. Η DHEA δεν είναι διαλυτή στο νερό και η διάλυσή της γινόταν σε 20 ml απόλυτης αιθανόλης στους 60°C.

Όταν το διάλυμα μεταφερόταν σε σύριγγα ινσουλίνης, προσθέταμε 180 ml ενέσιμου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου και χορηγούσαμε την ουσία στο ζώο άμεσα. Όταν η DHEA ερχόταν σε επαφή με το νερό, σχημάτιζε θρόμβους που συχνά έφρασαν το στόμιο της βελόνας. Γι' αυτό το λόγο η ένεση πρέπει να γίνεται άμεσα, και να χρησιμοποιείτε βελόνα 21G.

Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας και 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση, τα ζώα θανατώνονται με εισπνοή δυέθλοαιθέρα και τα μάτια τους προετοιμάζονται για να πραγματοποιηθούν ανοσοϊστοχημικές μελέτες.

2.4. Ζελατινοποίηση

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες προετοιμάστηκαν για τις τομές των ιστών στην κρυοτόμο. Πλύθηκαν καλά με σαπούνι, ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αφέθηκαν για αρκετές ώρες να στεγνώσουν. Προετοιμάστηκε το διάλυμα ζελατίνης με συνεχή ανάδευση της ζελατίνης στους 62°C και οι πλάκες βυθίστηκαν στο διάλυμα αυτό 3 με 4 φορές. Το διάλυμα αποτελείται από ζελατίνη (G-9382, ~ 300 Bloom) και Chrom Alum (AlCrO₃) διαλυμένα σε απιονισμένο νερό. Έπειτα από την εμβάπτησή τους στο παραπάνω διάλυμα, παρέμεναν overnight στους 37°C εωσότου να στεγνώσουν και στη συνέχεια μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν όπως αναφέρετε στη συνέχεια για την τοποθέτηση των τομών που λαμβάναμε με τον κρυοτόμο.

2.5. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες

Μετά την θανάτωση του ζώου, αφαιρέθηκαν τα μάτια και καθαρίστηκαν καλά εξωτερικά από μύες και αγγεία με τη βοήθεια λαβίδας και τοιμπίδας. Με νυστέρι και ψαλίδι αφαιρέθηκε ο πρόσθιος πόλος τους(φακός και υαλώδες σώμα)και κάθε eyecup τοποθετήθηκε σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS για να μην ξεραθεί.

Στην συνέχεια, ακολούθησε μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα PFA 4% (παραφορμαλδεΰδη) σε θερμοκρασία 4°C για 1 ώρα και έπειτα σε διάλυμα σουκρόζης 30% για 16 με 18 ώρες σε θερμοκρασία 4°C. Η σουκρόζη δρα στον ιστό κρυοπροστατευτικά, δηλαδή, προστατεύει τον ιστό από το να αλλοιωθεί από την υπόλοιπη διαδικασία που πραγματοποιείτε σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

Μετά από το χρονικό όριο που ορίστηκε, και αφού τα eyecups έχουν καταβυθιστεί στο διάλυμα της σουκρόζης, τα αφαιρέσαμε και ξεκινάμε την διαδικασία του παγώματος.

Τοποθετήθηκε κάθε eyecup ξεχωριστά σε ένα κομμάτι αλουμινόχαρτο με τον αμφιβληστροειδή προς τα πάνω και ρίχνω μικρή ποσότητα OCT compound. Το OCT compound, είναι μια πηκτή και κολλώδεις ουσία η οποία σε θερμοκρασία δωματίου είναι σε παχύρρευστη μορφή, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι λευκή και στερεή μάζα. Με την βοήθεια λαβίδας και σπάτουλας «χτίστηκε» εσωτερικά το eyecup με προσοχή, για να μην σχηματιστούν φυσαλίδες.

Όταν ολοκληρώθηκε αυτή η διαδικασία τοποθετήθηκε σε ξηρό πάγο ισοπεντάνιο το οποίο βρίσκεται στους -80°C)και ανεβάσαμε την θερμοκρασία του στους -45°C που είναι και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται το πάγωμα του ιστού. Σε αυτή τη θερμοκρασία τοποθετήθηκαν τα eyecups μέσα στο σωλήνα για 1 λεπτό. Με τη βοήθεια λαβίδας αφαιρέθηκαν από το ισοπεντάνιο, τοποθετήθηκαν μέσα σε σωληνάρια για να φυλαχτούν στους -

80°C μέχρι να χρειαστεί να κοπούν τομές για την πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημικής μελέτης.

Λήψη τομών ιστού.

Η λήψη τομών γινόταν από κρυτόμο Leica MC. Μισή ώρα πριν την χρήση του μηχανήματος ρυθμίζαμε την θερμοκρασία στους -25°C ώστε η τομή του ιστού να πραγματοποιείται στην σωστή θερμοκρασία. Όταν η θερμοκρασία έφτανε στην επιθυμητή τιμή, τοποθετούσαμε το eyecup πάνω στην ειδική τράπεζα και το σταθεροποιούσαμε με ποσότητα OCT compound. Ρυθμίζαμε το πάχος των τομών στα 10 μm και ξεκινούσε η λήψη των τομών. Οι τομές επιστρώονταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες καλυμμένες με ζελατίνη. Αφού στέγνωσαν οι τομές πάνω στις πλάκες, φυλάσσονταν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Ανοσοϊστοχημεία (έμμεσης σήμανσης).

Αρχικά οι πλάκες με τις τομές που είχαν τοποθετηθεί στους -20°C αφήνονταν να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, όπου και γινόταν κάθε πείραμα. Η θερμοκρασία διατηρούνταν στους 25°C καθ'όλη την πειραματική διαδικασία. Εν συνεχεία γίνονταν δύο ξεπλύματα των τομών με Tris Buffer Saline (TBS) 0,1 M και pH 7,4 και μετά επώαζονταν με Normal Goat Serum (NGS) 3,3% για 30 λεπτά. Αυτή η επώαση είχε σαν σκοπό να παρεμποδίσει την μη ειδική πρόσδεση του δευτερογενούς αντισώματος.

Ακολουθούσαν στη συνέχεια 3 ακόμα ξεπλύματα των 5 λεπτών για να απομακρυνθεί η περίσσεια του NGS και αμέσως μετά επιδρούσαμε με διάλυμα του πρώτου αντισώματος σε ρυθμιστικό TBS που περιείχε απορρυπαντικό Triton-X 100 0,3% και ορό NGS 0,5%. Το απορρυπαντικό χρησιμοποιείται σε αυτό το στάδιο για να σπάσει τις κυτταρικές μεμβράνες και το αντίσωμα να μπορέσει να προσδεθεί στις περιοχές στόχους που αναγνωρίζει. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα διαρκούσε 16 με 18 ώρες.

Την επόμενη μέρα, οι τομές δέχονταν τρία ξεπλύματα των 5 λεπτών με TBS 0,1 M και επωαζόταν για μία με μιάμιση ώρα με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι φωτοευαίσθητο. Η όλη διαδικασία πραγματοποιούνταν σε συνθήκες με χαμηλό φωτισμό για να μην επηρεαστεί το δεύτερο αντίσωμα. Στο τέλος πραγματοποιούσαμε τρία ακόμα ξεπλύματα με TBS 0,1 M και οι τομές καλύπτονταν με ειδικό υγρό κάλυψης, mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) και καλυπτρίδα. Οι πλάκες αυτές τελικά, φυλάσσονταν στους 4°C μέσα σε κλειστές σκουρόχρωμες θήκες (για την προστασία του φθορίζοντος αντισώματος) και ήταν έτοιμες για μικροσκοπική παρατήρηση.

Ακολουθεί παρακάτω ένας πίνακας με τα αντισώματα καθώς και οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν :

2.6. Ιστοχημικές μελέτες

Για να μελετήσουμε τυχόν μορφολογικές αλλαγές στον αμφιβληστροειδή λόγω του διαβήτη, χρησιμοποιήσαμε μόνιμη χρώση με Αιματοξυλίνη-Ιωσίνη, μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική μόνιμης χρώσης.

Αρχικά αφήναμε τις τομές να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και τις εμβαπίζαμε για 3 λεπτά σε απόλυτη αιθανόλη για να απομακρύνουμε την υγρασία και στη συνέχεια τις ενυδατώναμε σε νερό βρύσης. Αφού αφαιρούσαμε τη μεγαλύτερη ποσότητα νερού, εμβαπίζαμε τα πλακάκια σε διάλυμα Αιματοξυλίνης και απομακρύναμε την περίσσια Αιματοξυλίνης με νερό βρύσης.

Στη συνέχεια εμβαπίζαμε τα πλακάκια σε διάλυμα Ιωσίνης και πραγματοποιούσαμε εμβαπτίσεις σε 100%, 90% και 70% αιθανόλη. Ακολουθούσε εμβάπτιση σε δυο διαλύματα Ξυλόλης και αφού στεγνωναν καλά, μεταφέραμε μια σταγόνα μέσου κάλυψης (Endelan), και καλύπταμε προσεκτικά με καλυπτρίδα. Τα δείγματα ήταν έτοιμα στη συνέχεια για μικροσκόπηση.

2.7. Μικροσκόπηση

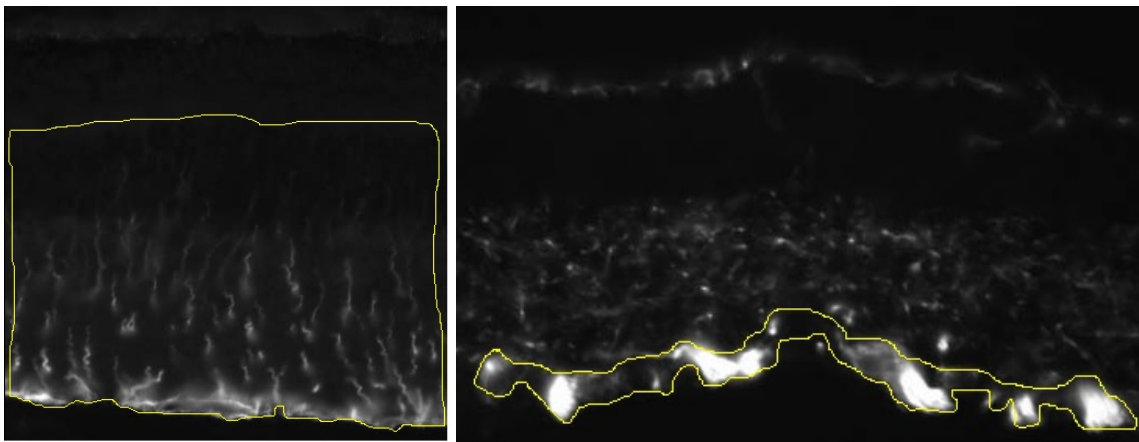
Ελήφθησαν φωτογραφίες από το συνεστιακό μικροσκόπιο [Leica DM RE laser-scanning (He/Ne laser) with HP Plan APO x20/0,70]. Η λήψη οπτικών τομών έγινε με διακριτική ικανότητα 1,1 μM . Για την απαραίτητη προσαρμογή του φωτισμού και της αντίθεσης των φωτογραφιών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe Photoshop software (version 5.0).

2.8. Ποσοτικοποίηση εικόνων με το πρόγραμμα ImageJ

Ποσοτικοποίηση εικόνων για την ανοσοδραστικότητα του NFL και GFAP

Οι εικόνες οι οποίες ελήφθησαν με το μικροσκόπιο με x40/0.75 φακό οριοθετήθηκαν στην GCL στοιβάδα για την ποσοτικοποίηση της ανοσοδραστικότητας του αντισώματος που αναγνώριζε το NFL. Από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα στην οποία επιδράσαμε με το εν λόγω αντίσωμα λάβαμε μια εικόνα από μία τομή.

Για την ανοσοδραστικότητα του αντισώματος για την GFAP η ποσοτικοποίηση έγινε σε ολόκληρη την έκταση του ιστού (από την GCL στοιβάδα έως και την ONL στοιβάδα). Από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα στην οποία επιδράσαμε με το εν λόγω αντίσωμα λάβαμε μια εικόνα από μία τομή. Σε κάθε περίπτωση έγινε προσπάθεια να ληφθούν εικόνες από ανάλογες τομές που βρίσκονταν στην ίδια θέση πάνω στο πλακίδιο.



Εικόνα 13: Αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση για την ανοσοδραστικότητα του GFAP (αριστερα) και του NFL (δεξιά).

Τα Mean Gray Value και Integrated Density των περιοχών αυτών υπολογίστηκαν για κάθε μία εικόνα από όλα τα group. Το Mean Gray Value αντιπροσωπεύει το σύνολο των gray values όλων των pixels της επιλεγμένης περιοχής, διαιρούμενο με τον αριθμό των pixels. Το Integrated Density, αντιπροσωπεύει το σύνολο των τιμών των pixels στην επιλεγμένη περιοχή. Αυτό ισούται με το γινόμενο των Area και Mean Gray Value.

Οι διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω πραγματοποιήθηκαν για όλες τις ομάδες των ζώων (φυσιολογικά, διαβητικά καθώς και τα διαβητικά στα οποία χορηγήθηκε DHEA).

Μέτρηση βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν την TH

Από τις αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες επιδράσαμε με το αντίσωμα για την TH μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των TH ανοσοδραστικών βραχύνων κυττάρων σε κάθε τομή του αμφιβληστροειδούς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε πλακάκι περιείχε εννέα τομές. Δεδομένου ότι κάποιες από τις τομές δεν ήταν κατάλληλες για μέτρηση κυττάρων (π.χ., εξαιτίας της αναδίπλωσης του ιστού ή ζημιάς του ιστού κατά τη διάρκεια της

λήψης τομών στην κρουτόμο), ο αριθμός των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες ποσοτικοποίησης ήταν πέντε έως εννέα για κάθε πλακάκι.

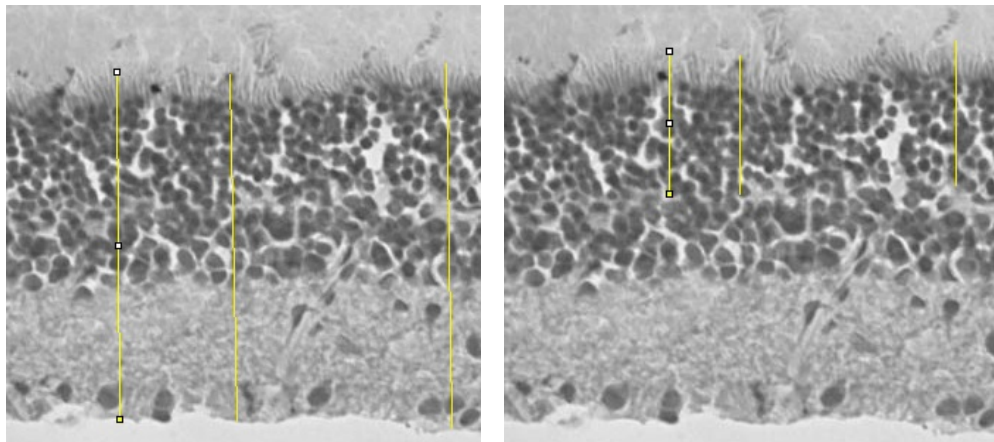
Και σε αυτή την περίπτωση η μέτρηση των κυττάρων έγινε για όλες τις ομάδες των ζώων όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Μέτρηση του πάχους του αμφιβληστροειδούς και της ONL στοιβάδας σε τομές με μόνιμη χρώση Αιματοξιλίνη-Ιωσίνη

Οι τομές στις οποίες έγινε μόνιμη χρώση με Αιματοξιλίνη-Ιωσίνη, παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Από κάθε πλακάκι ελήφθησαν 2 με 3 φωτογραφίες από διαφορετικές κάθε φορά τομές και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στις συγκεκριμένες τομές με το πρόγραμμα ImageJ.

Η μέτρηση του πάχους της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς μετρήθηκε φέρνοντας κάθετες γραμμές από την GCL στοιβάδα, μέχρι την άκρη των φωτοϋποδοχέων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς για κάθε φωτογραφία. Με αυτό τον τρόπο είχαμε από 6 μέχρι 9 τιμές για κάθε οφθαλμό και σαν τιμή του πάχους του αμφιβληστροειδούς θεωρήσαμε τον μέσο όρο αυτών των τιμών.

Με αντίστοιχο τρόπο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του πάχους της ONL στοιβάδας όπου οι κάθετες γραμμές ξεκινούσαν από την βάση της ONL, μέχρι την άκρη των φωτοϋποδοχέων.



Εικόνα 14: Αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του πάχους του αμφιβληστροειδούς (αριστερά) και της ONL στοιβάδας (δεξιά).

2.9. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) υπολογιστικού λογισμικού. Χρησιμοποιήθηκε το one-way ANOVA με ανάλυση Newman-Keuls posthoc για σύγκριση πάνω από δύο διαφορετικών ομάδων ζώων (3 ομάδες για τα πειράματα αυτά) ή το one-way ANOVA με το Dunnett's Multiple τεστ σύγκρισης για δύο μόνο ομάδες (ανοσοϊστοχημικές μελέτες για neurofilament). Σε όλες τις μελέτες ποσοτικοποίησης ο αριθμός των κυττάρων στις ομάδες των διαβητικών ζώων (vehicle group και group που έλαβε το ανάλογο της DHEA, BNN27) εκφράζεται ως το ποσοστό του αριθμού των κυττάρων στο control group (100%).

2.10. Συνταγές, Διαλύματα και Αντισώματα

PB 0,2M:

2,76gr NaH₂PO₄ + ddH₂O, τελικός όγκος 100ml (Δ 1)

17,42gr K₂HPO₄ + ddH₂O, τελικός όγκος 500ml (Δ 2)

Δ1 + Δ2 → 600ml PB 0,2M

TBS 0,1M:

6,055gr Trisma Base + 4,5gr NaCl + ddH₂O, τελικός όγκος 500ml. Ρύθμιση του pH στο 7,4 με προσθήκη HCl και συνεχή ανάδευση

PFA 4%:

40ml ddH₂O + 4gr PFA → ανάδευση στους 55oC + 4 σταγόνες NaOH 4% + ddH₂O, σε τελικό όγκο 50ml. Προσθήκη 50ml PB 0,2M και φιλτράρισμα

Διάλυμα ζελατινής για αντικειμενοφόρους πλάκες:

[5gr gelatin (G-9382, ~ 300 Bloom) + 500ml ddH₂O → ανάδευση στους 62oC]

+ 0,5gr Chrom Alum (AlCrO₃) → ανάδευση + προσθήκη ddH₂O σε τελικό όγκο 1L 31

Διάλυμα σουκρόζης:

3gr sucrose + PB 0,1M σε τελικό όγκο 10ml

Ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας των αντισωμάτων, των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το είδος των κυττάρων τα οποία σημαίνουν.

Πίνακας 2.

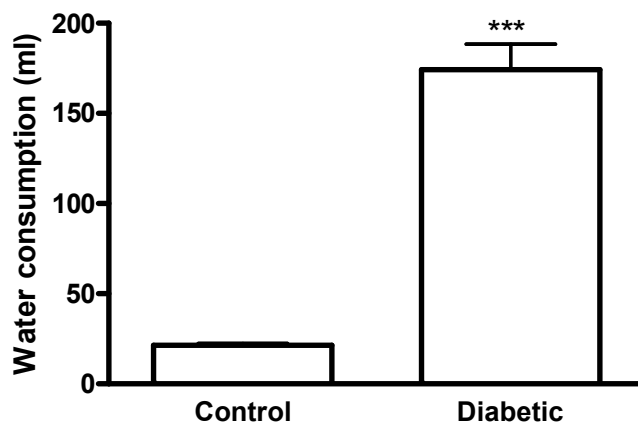
<i>Ab I</i>	<i>Host</i>	<i>Con.</i>	<i>Ab II</i>	<i>Con.</i>	<i>Cell Type Labeling</i>
a-NFL	mouse	1/500	a-ms IGG 488	1/400	Άξονες γαγγλιακών κυττάρων
a-GFAP	rabbit	1/400	a-rb IGG 546	1/400	Κύτταρα της γλοίας και κύτταρα Muller
a-bNOS	rabbit	1/2000	a-rb IGG 546	1/400	Βραχύινα θετικά b-NOS κύτταρα
a-CHAT	mouse	1/200	a-ms IGG 488	1/400	Χολινεργικά βραχύινα κύτταρα
a-recoverin	rabbit	1/50	a-rb IGG 546	1/400	Φωτοϋποδοχείς κύτταρα της ONL και δίπολα κύτταρα συνδεδεμένα με κωνία
a-calbindin	mouse	1/5000	a-ms IGG 488	1/400	Οριζόντια κύτταρα, δίπολα κύτταρα που συνδέονται με κωνία και βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν την Calbindin
a-TH mono	mouse	1/250	a-ms IGG 488	1/400	Βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν την TH

Ενότητα III

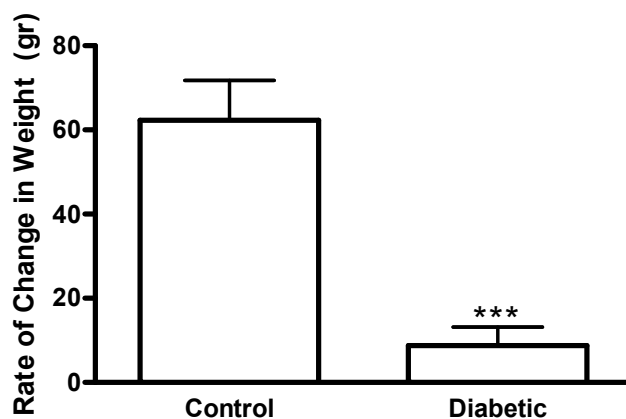
Αποτελέσματα

3.1 Πρόκληση διαβήτη με χορήγηση στρεπτοζωτοκίνης

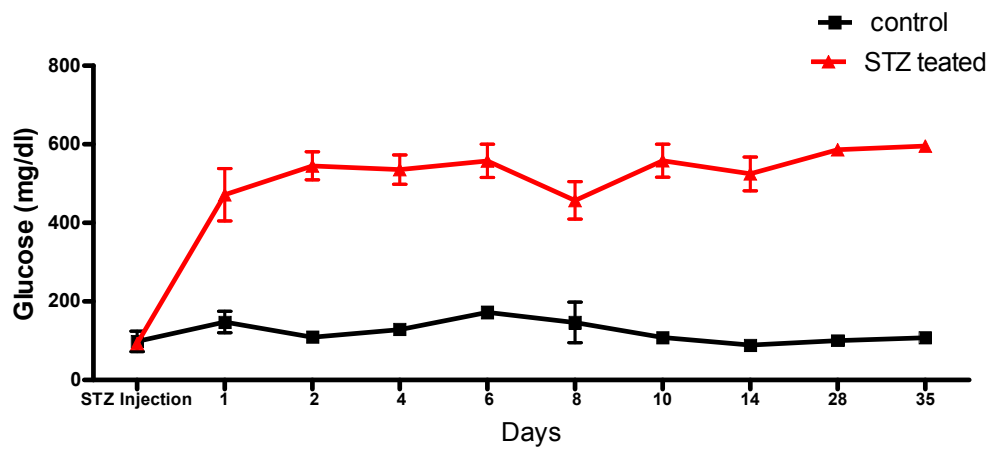
Σε μια ομάδα αρουραίων χορηγήθηκε μια δόση στρεπτοζωτοκίνης (STZ) 70 mg/kg διαλυμένης σε citrate buffer με pH 7,4 και έγινε ποσοτικοποίηση της ποσότητας του νερού που καταναλώθηκε, της μεταβολής του σωματικού βάρους καθώς και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα των ζώων. Σε μια άλλη ομάδα ζώων χορηγήθηκε η αντίστοιχη ποσότητα citrate buffer (control) και έγιναν οι αντίστοιχες ποσοτικοποιήσεις.



Σχήμα 1. : Ποσοτικοποίηση στην ποσότητα του νερού που καταναλώθηκε από τα ζώα. Τα φυσιολογικά ζώα καταναλώναν μικρότερη ποσότητα νερού από τα διαβητικά που εμφάνισαν πολυδιψία.



Σχήμα 2. : Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας παρατηρούμε ότι τα φυσιολογικά ζώα αύξησαν το σωματικό τους βάρος με μεγαλύτερο ρυθμό (περίπου 60 gr) σε σχέση με τα διαβητικά ζώα (περίπου 10 gr).

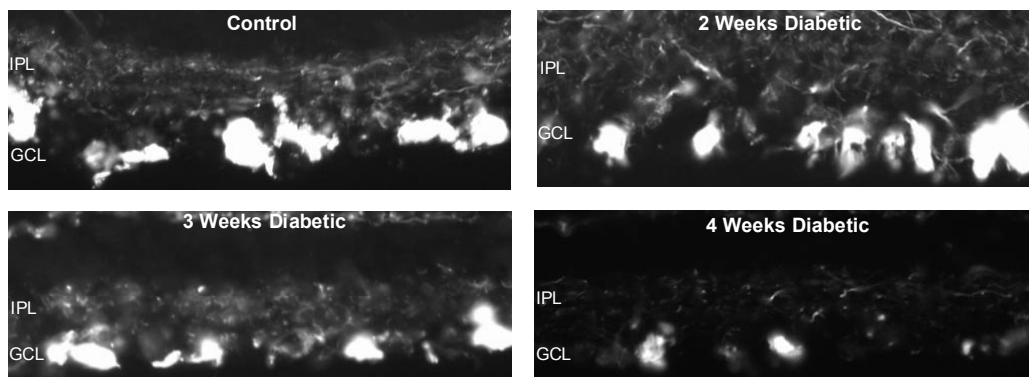


Σχήμα 3. : Την πρώτη ημέρα μετά από την χορήγηση της STZ παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα των ζώων. Για να θεωρήσουμε ένα ζώο διαβητικό έπρεπε η τιμή της γλυκόζης στο αίμα του να ήταν πάνω από 300 mg/dl.

3.2 Ανοσοϊστοχημικές μελέτες

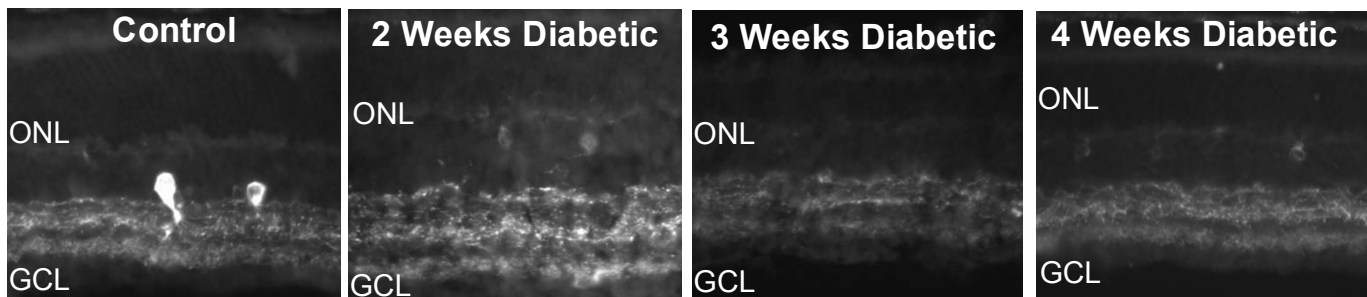
Από τη στιγμή που διαπιστώθηκε ο διαβήτης, σε διάστημα 2, 3 και 4 εβδομάδων μετά την χορήγηση της STZ θυσιάστηκαν 2 ζώα σε κάθε ομάδα και πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές (IHC) μελέτες με σκοπό να παρατηρήσουμε την επίδραση του διαβήτη στα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς.

Ανοσοϊστοχημεία με NFL



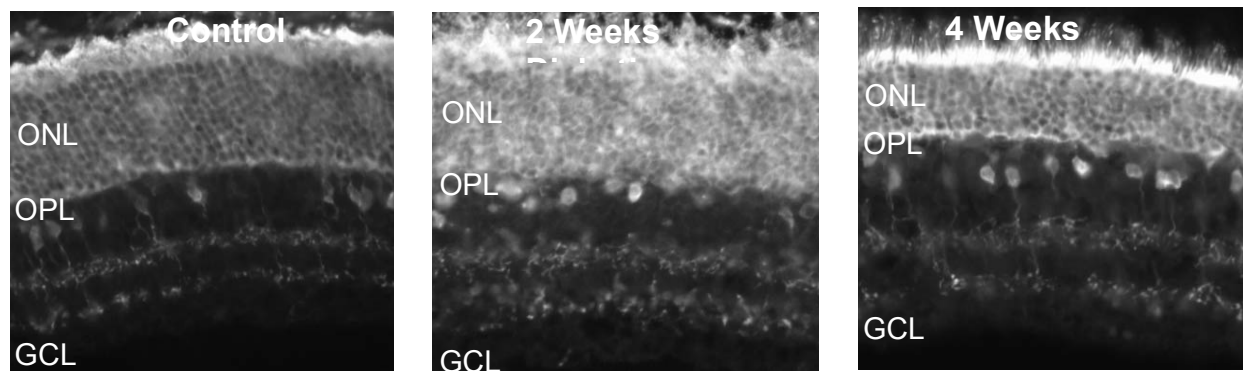
Σχήμα 4. : Ανοσοϊστοχημεία με NFL. Στην 4^η εβδομάδα μετά την πρόκληση του διαβήτη παρατηρήσαμε τη μέγιστη μείωση στην ανοσοδραστικότητα της NFL σε σχέση με το control.

Ανοσοϊστοχημεία με bNOS



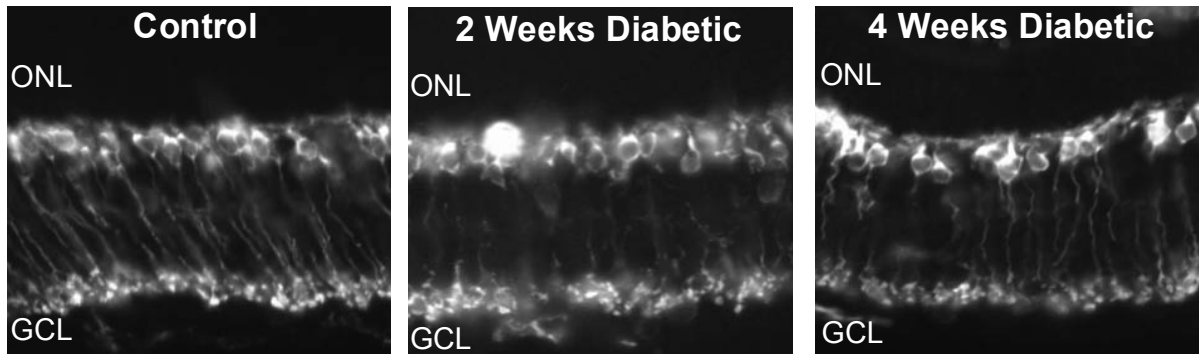
Σχήμα 5. : Ανοσοϊστοχημεία με bNOS. Παρατηρούμε ότι στην 4^η εβδομάδα μετά την χορήγηση της STZ, υπάρχει μείωση στην ανοσοδραστικότητα της bNOS καθώς και μείωση στον αριθμό των βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν τη bNOS

Ανοσοϊστοχημεία με recoverin



Σχήμα 6. : Ανοσοϊστοχημεία με recoverin. Παρατηρούμε ότι στην 2η εβδομάδα μετά τη χορήγηση της STZ, υπάρχει αύξηση στο πάχος του αμφιβληστροειδούς ενώ καθώς περνάμε στην και 4η εβδομάδα του διαβήτη το πάχος της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς έχει μειωθεί σε σχέση με το control. Η μείωση φαίνεται να εντοπίζεται στην ONL

Ανοσοϊστοχημεία με PKC

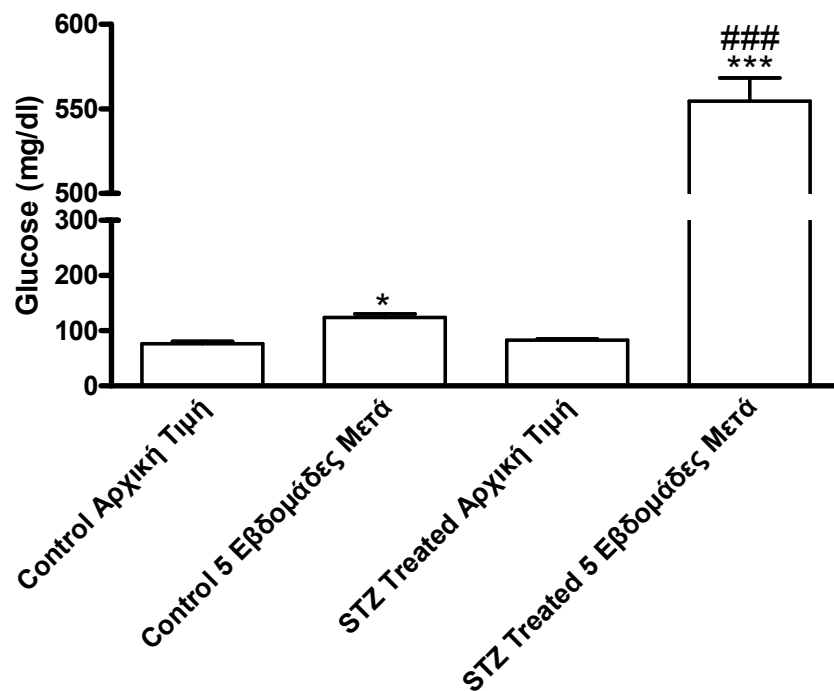


Σχήμα 7.: Ανοσοϊστοχημεία με PKC. Δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες μεταβολές μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα στα δίπολα κύτταρα που εκφράζουν την PKC.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω δεδομένα αποφασίσαμε η χορήγηση της DHEA να γίνει την 4^η εβδομάδα μετά την πρόκληση του διαβήτη με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μιας μόνο δόσης STZ.

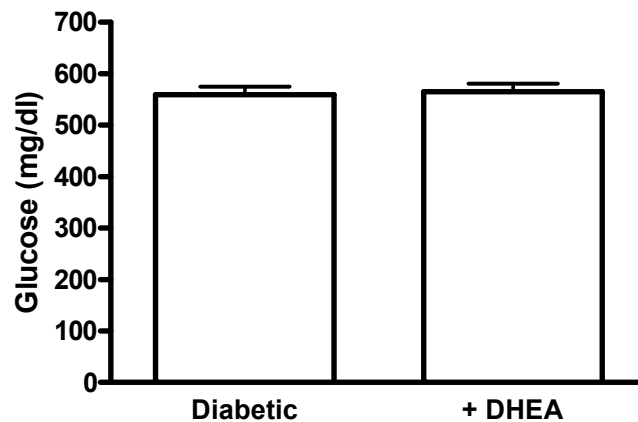
3.3 Νευροπροστατευτική δράση της DHEA

Παρατηρώντας τις αλλαγές που συνέβησαν στον αμφιβληστροειδή μέσα σε τέσσερις εβδομάδες αποφασίσαμε να διατηρήσουμε διαβητικά τα πειραματόζωα για ένα διάστημα τεσσάρων εβδομάδων και στη συνέχεια να γίνει η χορήγηση της DHEA. Αρχικά χωρίσαμε τους αρουραίους σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε μια δόση STZ 70 mg/kg η οποία προετοιμαζόταν λίγο πριν από τη χορήγηση, ενώ στην δεύτερη ομάδα χορηγήθηκε το έκδοχο. Οι τιμές της γλυκόζης στο αίμα καταγράφηκαν αρχικά πριν από την χορήγηση της STZ και 5 εβδομάδες μετά οπότε και ολοκληρωνόταν η πειραματική διαδικασία. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



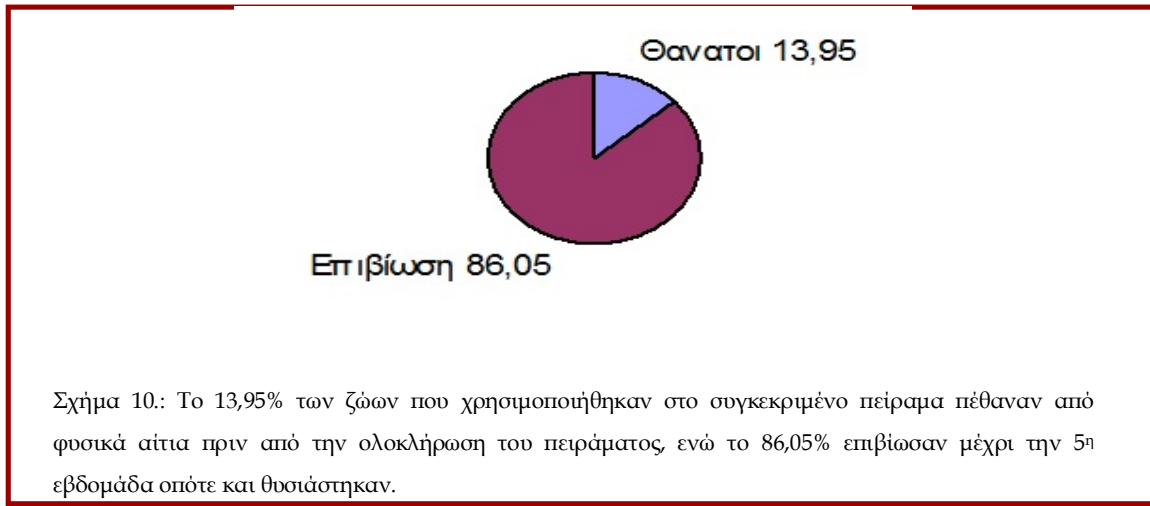
	Control	STZ Treated
Μέση συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα (mg/dl) στην αρχή του πειράματος	76,26(19) ± 19,40	83,12(33) ± 13,04
μετά την ολοκλήρωση του πειράματος (5 εβδομάδες μετά)	123,84(19) ± 28,46*	554,61(33) ± 78,67###/***

Τέσσερις εβδομάδες μετά την πρόκληση του διαβήτη τα διαβητικά ζώα χωρίστηκαν σε δυο νέες ομάδες. Η μία ομάδα λάμβανε καθημερινά για 7 ημέρες μια δόση DHEA ενδοπεριτοναϊκά (10 mg/kg) ενώ η δεύτερη ομάδα λάμβανε με τον ίδιο τρόπο, για το ίδιο χρονικό διάστημα την ίδια ποσότητα εκδόχου. Στο επόμενο σχήμα γίνεται μια σύγκριση ανάμεσα στην τιμή της γλυκόζης στο αίμα των αρουραίων που δέχθηκαν την DHEA και το έκδοχο (Diabetic).



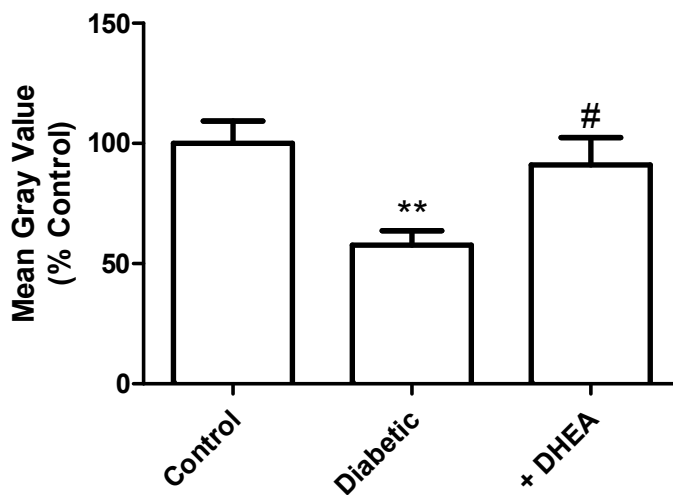
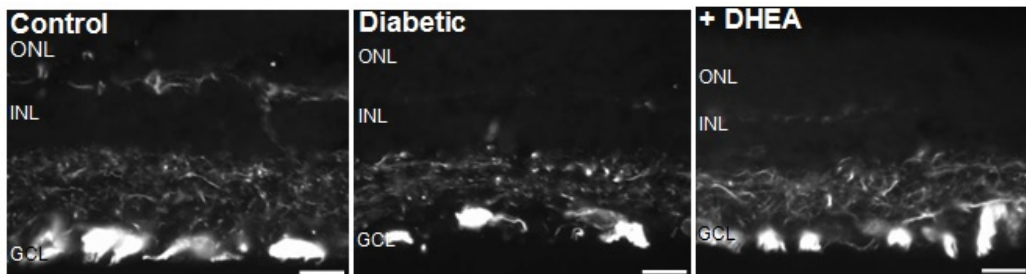
Σχήμα 9.: Απεικόνιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα των αρουραίων που δέχθηκαν την DHEA και το έκδοχο. Δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της γλυκόζης που θα μπορούσε να οφείλεται στην DHEA.

Από τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε STZ, δεν επιβίωσαν όλα. Ένας αριθμός ζώων πέθανε πριν από την ολοκλήρωση των πειραμάτων.



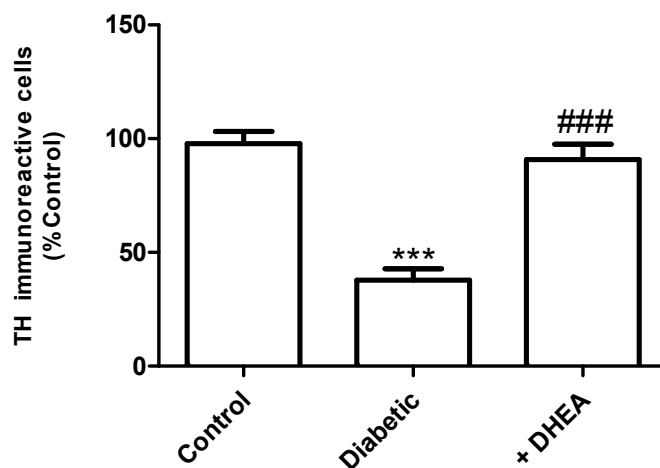
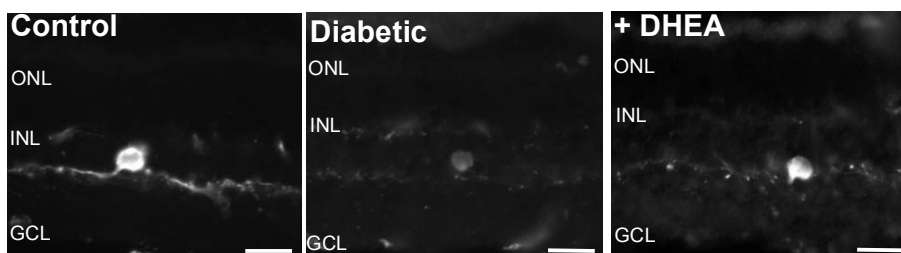
Μετά την ολοκλήρωση της περιόδου χορήγησης της DHEA και του εκδόχου της πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες.

Ανοσοϊστοχημεία με NFL και Ποσοτικοποίηση



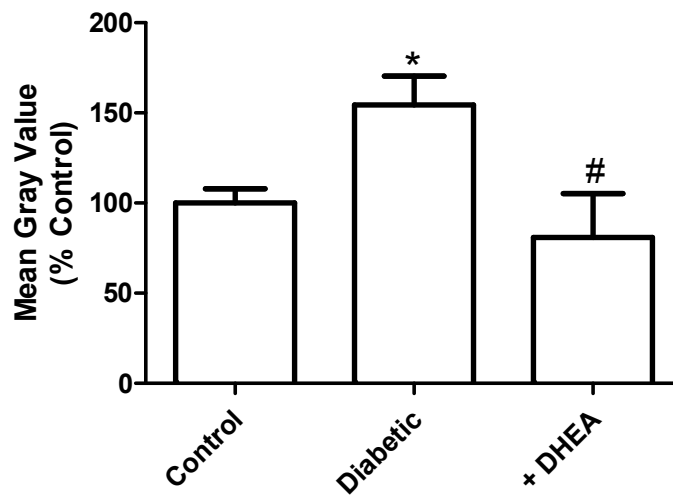
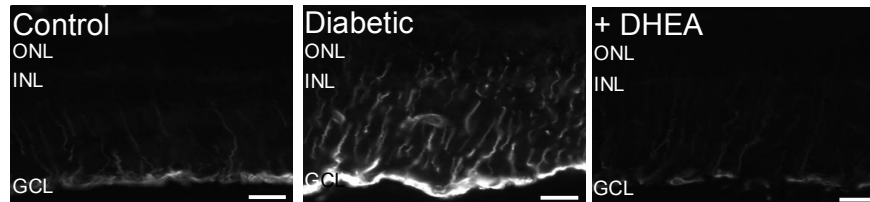
Σχήμα 11.: Ανοσοϊστοχημική μελέτη με NFL και ποσοτικοποίηση των εικόνων. Στα διαβητικά ζώα (n=17) παρατηρήθηκε μία μείωση της ανοσοδραστικότητας του NFL στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα (n=17) η οποία φαίνεται να ανατρέπεται στα ζώα στα οποία χορηγήθηκε DHEA (n=16). Η ποσοτικοποίηση η οποία πραγματοποιήθηκε έδειξε μια στατιστικά σημαντική μείωση της τάξεως του 40% στην ανοσοδραστικότητα της NFL στα διαβητικά ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά (**p<0.01), ενώ σύγκριση ανάμεσα στα διαβητικά ζώα που έλαβαν το έκδοχο και σε αυτά που έλαβαν την DHEA, έδειξαν ότι υπήρξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά (#p<0.05). Ανάμεσα στα φυσιολογικά ζώα και αυτά που έλαβαν την DHEA, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Ανοσοϊστοχημεία με TH και Ποσοτικοποίηση



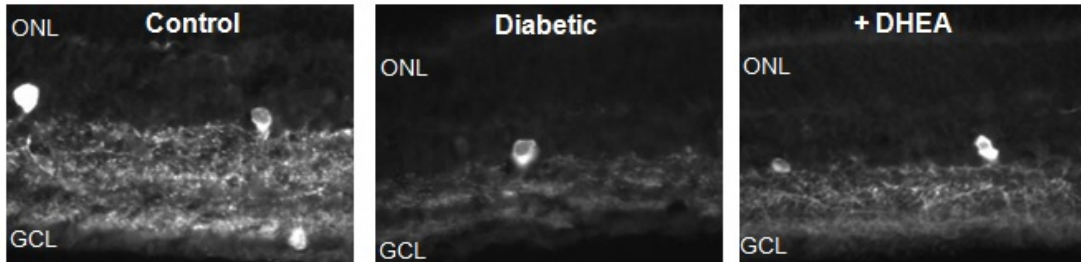
Σχήμα 12.: Ανοσοδραστικότητα της TH και ποσοτικοποίηση. Στα φυσιολογικά ζώα (n=9) η ανοσοδραστικότητα της TH παρατηρείται στα βραχύνια κύτταρα που εντοπίζονται στην INL. Στα διαβητικά ζώα (n=7) παρατηρείται μία στατιστικά σημαντική μείωση (περίπου 60%) του αριθμού αυτών των κυττάρων (**p<0,001). Στα ζώα στα οποία χορηγήθηκε DHEA (n=9), ο αριθμός των βραχύνιων κυττάρων που εκφράζουν την TH επανέρχεται στα επίπεδα των φυσιολογικών ζώων

Ανοσοϊστοχημεία με GFAP



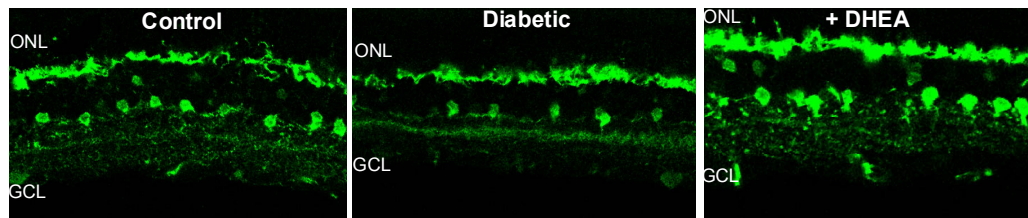
Σχήμα 13.: Ανοσοδραστικότητα της GFAP και ποσοτικοποίηση. Στον αμφιβληστροειδή φυσιολογικών ζώων (n=7) η GFAP παράγεται από τα κύτταρα της γλίας. Στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών ζώων (n=9) εμφανίζεται μια αύξηση της ανοσοδραστικότητας της που φαίνεται να υποχωρεί στα ζώα στα οποία έχει χορηγηθεί DHEA (n=7). Ποσοτικοποίηση των παραπάνω δεδομένων δείχνουν μια στατιστικά σημαντική αύξηση της GFAP στα διαβητικά ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά (*p<0.05), ενώ στα ζώα στα οποία χορηγήθηκε DHEA φαίνεται η ανοσοδραστικότητα να πέφτει στα επίπεδα των φυσιολογικών ζώων (#p<0.05).

Ανοσοϊστοχημεία με b-NOS



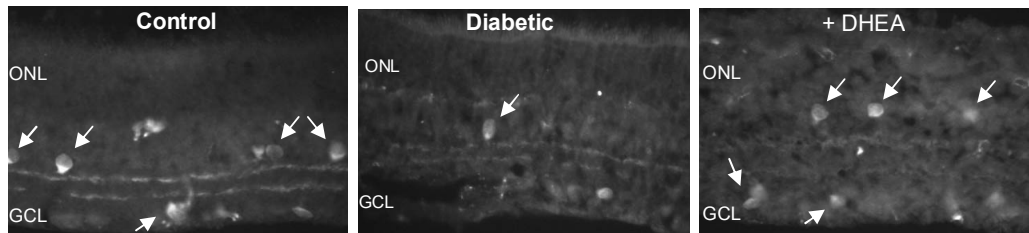
Σχήμα 14.: Ανοσοδραστικότητα της b-NOS. Στον αμφιβληστροειδή των φυσιολογικών ζώων (n=5) η b-NOS εκφράζεται από μια κατηγορία βραχύνων κυττάρων. Με τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν φάνηκε να υπάρχει στα διαβητικά ζώα (n=9) μια μείωση αυτών των κυττάρων ενώ ήταν μειωμένη και η ανοσοδραστικότητα των απολήξεων των κυττάρων όπως παρουσιάζεται στις παραπάνω εικόνες. Με την χορήγηση της DHEA (n=3) παρατηρήθηκε μια επαναφορά στην ανοσοδραστικότητα των απολήξεων των κυττάρων αυτών καθώς και αύξηση στον αριθμό τους σε σχέση με τα διαβητικά. Δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση.

Ανοσοϊστοχημεία με Calbidin



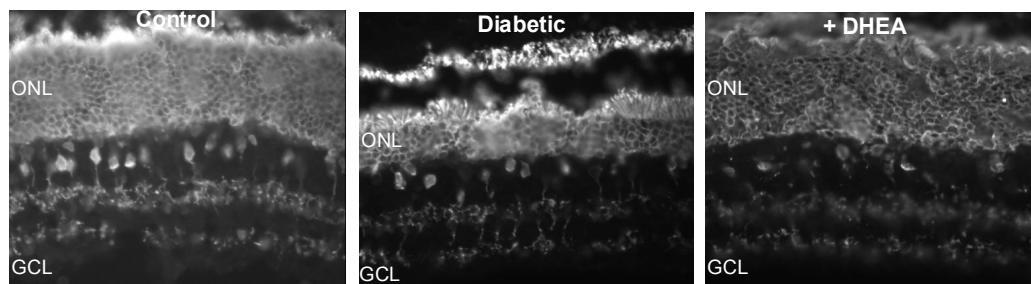
Σχήμα 15.: Ανοσοδραστικότητα της Calbidin. Στον αμφιβληστροειδή των φυσιολογικών ζώων (n=5) η Calbidin σημαίνει τα οριζόντια κύτταρα καθώς και τα βραχύνια κύτταρα που την εκφράζουν. Στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας στον αρουραίο δεν παρατηρήθηκαν στο διάστημα των 5 εβδομάδων της πειραματικής διαδικασίας μεταβολές στα οριζόντια κύτταρα όπως παρουσιάζεται στις παραπάνω εικόνες. Οι διαφορές οι οποίες εντοπίστηκαν αφορούσαν τον αριθμό και την ανοσοδραστικότητα των βραχύνων κυττάρων στα διαβητικά ζώα (n=6), κατάσταση η οποία φαίνεται να αναστρέφεται στην ομάδα των ζώων στην οποία χορηγήθηκε DHEA (n=6). Δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση.

Ανοσοϊστοχημεία με ChAT



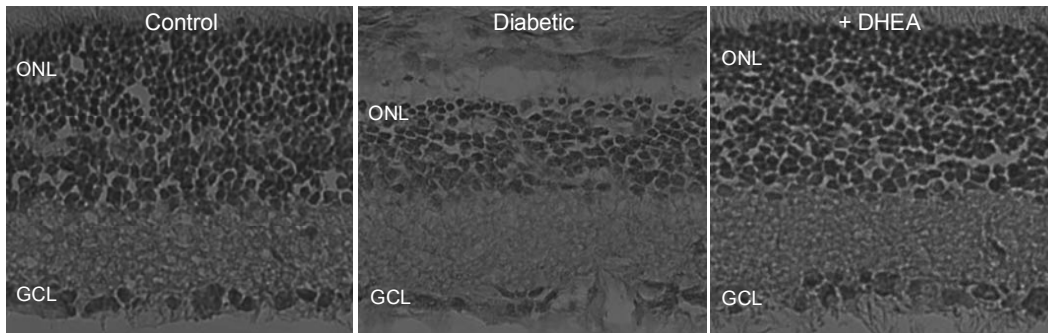
Σχήμα 16.: Ανοσοδραστικότητα της ChAT. Στον αμφιβληστροειδή των φυσιολογικών αρουραίων (n=6) η ChAT σημαίνει βραχίονα κύτταρα που βρίσκονται στην INL στοιβάδα, καθώς και εκτοπισμένα (displaced) βραχίονα κύτταρα που βρίσκονται στην GCL. Στα διαβητικά ζώα (n=9) παρατηρείται μείωση του αριθμού των κυττάρων αυτών καθώς και ελάττωση της έντασης του σήματος στην απολήξεις των κυττάρων αυτών στην IPL στοιβάδα. Στα ζώα στα οποία χορηγήθηκε DHEA (n=4) φαίνεται να υπάρχει μια αύξηση στον αριθμό των κυττάρων. Δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση.

Ανοσοϊστοχημεία με Recoverin

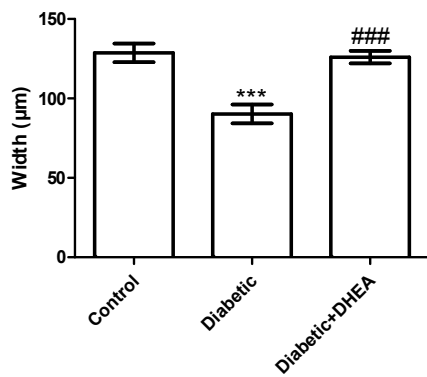


Σχήμα 17.: Ανοσοδραστικότητα της Recoverin. Στα φυσιολογικά πειραματόζωα (n=6) η recoverin εκφράζεται στα κύτταρα της ONL, καθώς και σε διπολα κύτταρα τα οποία είναι συνδεδεμένα με κωνία. Στα διαβητικά ζώα (n=9) παρατηρήθηκε μία αισθητή μείωση του πάχους της ONL στοιβάδας, μια διαδικασία που φαίνεται να αντιστρέφεται με την χορήγηση DHEA (n=6).

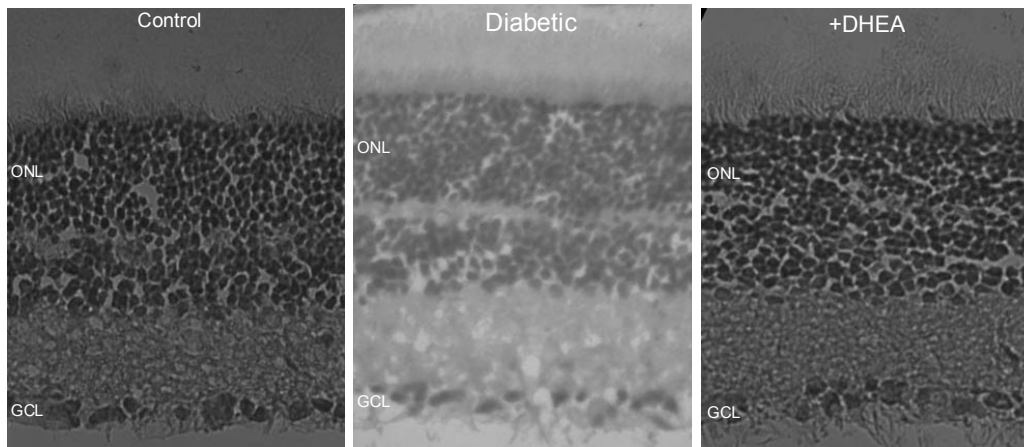
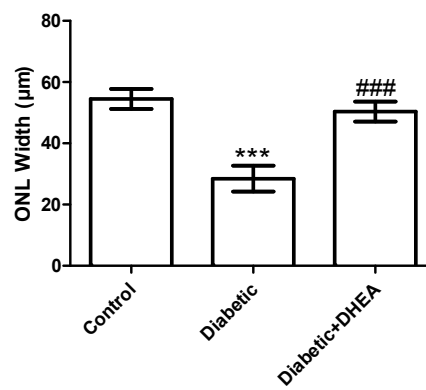
Ιστοχημεία με Αιματοξυλίνη-Ιωσίνη



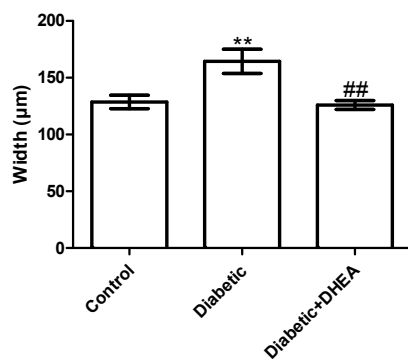
Changes in Retina Width < average control



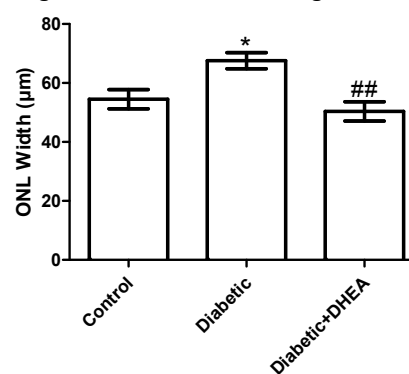
Changes in ONL Width < average control



Changes in Retina Width > average control



Changes in ONL Width > average control



Σχήμα 19.: Ποσοτικοποίηση ιστολογικών μελετών με Αιματοξυλίνη-Ιωσίνη. Τα διαβητικά ζώα σε αυτή τη μελέτη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα (n=10) συμπεριελήφθησαν οι τομές των ζώων των οποίων το πάχος της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς ήταν μικρότερο από το μέσο όρο των φυσιολογικών ζώων (n=15), ενώ στην δεύτερη ομάδα(n=7) συμπεριελήφθησαν τα ζώα των οποίων το πάχος της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς ήταν μεγαλύτερο από το μέσο όρο των φυσιολογικών ζώων (n=15). Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της κάθε ομάδας με τα διαβητικά ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί DHEA (n=14). Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκε και η ποσοτικοποίηση της στοιβάδας ONL του αμφιβληστροειδούς.

Ενότητα IV

Συζήτηση

Αποτελεσμάτων

4.1. Μοντέλο διαβητικής Αμφιβληστροειδοπάθειας

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι μία νευροεκφυλιστική επιπλοκή που προκαλείται στους ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από διαβήτη και μπορεί να οδηγήσει στην τύφλωση. Περιλαμβάνει την απόπτωση των νευρικών κυττάρων καθώς και αγγειακά προβλήματα τα οποία οδηγούν στη δημιουργία ανευρυσμάτων και τη νεοαγγείωση. Τα ακριβή αίτια και η σειρά των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως επομένως, ενώ είναι επιτακτική η ανάγκη για να βρεθεί μόνιμη θεραπεία της νόσου. Μέχρι σήμερα, οι αγωγές οι οποίες χορηγούνται στους ασθενείς, έχουν σαν στόχο την ανακούφιση από τα συμπτώματα και την καθυστέρηση των βλαβών στην όραση χωρίς όμως να θεραπεύουν την ίδια την ασθένεια.

Για τη μελέτη των βλαβών που εμφανίζονται στο νευρωνικό σύστημα του αμφιβληστροειδούς, χρησιμοποιήθηκε ένα ευρέως διαδεδομένο μοντέλο πρόκλησης διαβήτη, μέσω της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) ενδοπεριτοναϊκά. Η ουσία αυτή, είναι ένα φυσικό προϊόν και παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces achromogenes*. Έχει εξειδικευμένη δράση έναντι των β-κυττάρων του παγκρέατος στα οποία προκαλεί νέκρωση μέσω αλκυλίωσης του DNA (Elsner et al. 2000) λόγω παραγωγής NO, της ένωσης που απελευθερώνεται όταν η STZ μεταβολίζεται μέσα στο κύτταρο (Kröncke et al. 1995), καθώς και από ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) από τη δράση της STZ στα μιτοχόνδρια (Takasu et al. 1991). Η καταστροφή των β κυττάρων οδηγεί στην εμφάνιση ινσουλινο-εξαρτώμενου διαβήτη τύπου I στα πειραματόζωα.

Στα πειραματόζωα, χορηγήθηκε μια δόση STZ, όπως αναφέρθηκε και από την επόμενη ημέρα παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση στα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα τους. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα των ζώων διατηρήθηκε καθ' όλη την χρονική διάρκεια του πειράματος (σχήμα 3). Στα αρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν θελήσαμε σε διάφορα χρονικά διαστήματα (2,3,4 και 5 εβδομάδες), να παρατηρήσουμε με ανοσοϊστοχημικές μελέτες αλλαγές που πιθανόν να εμφανίζονταν στα

γαγγλιακά και σε άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Παράλληλα μετρήθηκε η ποσότητα του νερού που κατανάλωναν τα ζώα και γίνονταν μετρήσεις στο σωματικό τους βάρος, με σκοπό να υπολογιστεί εάν επηρεαζόταν η αύξηση του σωματικού τους βάρους.

Στο σχήμα 1 παρατηρούμε την πολυδιψία και στο σχήμα 2 παρατηρούμε την μειωμένη πρόσληψη βάρους από τα διαβητικά ζώα σε σχέση με τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control) και έλαβαν το έκδοχο της STZ. Μια ακόμη παράμετρος η οποία παρατηρήθηκε αλλά δεν ποσοτικοποιήθηκε ήταν η πολουρία. Τα κλουβιά στα οποία βρίσκονταν οι διαβητικοί αρουραίοι χρειάζονταν καθημερινό σχεδόν καθάρισμα λόγω των ούρων που συσσωρεύονταν σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα.

Σύμφωνα με τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, στο χρονικό διάστημα των τεσσάρων εβδομάδων παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση, σε σχέση με την 2^η και 3^η εβδομάδα από την πρόκληση του διαβήτη, στην ανοσοδραστικότητα του αντισώματος για το NFL, πρωτεΐνη του σκελετού των νευροαξόνων, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε και μείωση στην ανοσοδραστικότητα του αντισώματος για την b-NOS που ανιχνεύει βραχύινα κύτταρα τα οποία εκφράζουν την συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την βιβλιογραφία, αφού τα γαγγλιακά κύτταρα μαζί με τα βραχύινα είναι τα κύτταρα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη απώλεια στην περίπτωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε μοντέλα τρωκτικών αλλά και στον άνθρωπο (Abu-El-Asrar et al., 2004; A J Barber et al., 1998; Martin et al., 2004). Όσον αφορά τον αριθμό των γαγγλιακών κυττάρων, σε αρουραίους Sprague-Dawley η μείωση σε χρονικό διάστημα ενός μήνα ήταν 10% και σε αρουραίους Brown-Norway η μείωση ήταν της τάξης του 16% (Aizu et al. 2002). Στην παρούσα εργασία η μείωση του σήματος των νευρικών αξόνων μετά την πάροδο 5 εβδομάδων από την πρόκληση διαβήτη ήταν της τάξεως του 40%. Η μείωση αυτή υποδηλώνει ότι η γαγγλιακή στιβάδα επηρεάστηκε το συγκριμένο χρονικό διάστημα χωρίς ωστόσο να μπορούμε ποσοτικοποιήσουμε τη μεταβολή του αριθμού τους, δεδομένου ότι το

αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε αναγνωρίζει άξονες των γαγγλιακών κυττάρων και όχι κύτταρα.

Αναφορικά με τα βραχύινα κύτταρα, η μείωση που παρατηρήθηκε στις 4 εβδομάδες, μας οδήγησε να μελετήσουμε την επίδραση του διαβήτη και σε άλλες κατηγορίες κυττάρων όπως τα ντοπαμινεργικά. Η μείωση που παρατηρήθηκε σε αυτή την κατηγορία κυττάρων ήταν της τάξης του 60% στις 5 εβδομάδες από την πρόκληση του διαβήτη. Βιβλιογραφικά, η αντίστοιχη μείωση των ντοπαμινεργικών βραχύνων κυττάρων ήταν της τάξης του 16% (Gastinger et al. 2006) σε ποντίκια *Ins2^{Akita}* σε χρονικό διάστημα 6 μηνών.

Μελέτες που αφορούν τα κύτταρα γλοίας στον αμφιβληστροειδή, συμφωνούν στην αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP από τα κύτταρα Müller, λόγω ενεργοποίησης των γλοιακών αυτών κυττάρων, υπάρχουν διαφορετικά αποτελέσματα στους χρόνους στους οποίους παρατηρείται η αύξηση αυτή. Για παράδειγμα ο Hammes et al., παρατήρησε ανοσοδραστικότητα από τον πρώτο κίολας μήνα στο STZ-μοντέλο στον αρουραίο, ενώ οι Lieth et al., και Li et al., δεν παρατήρησαν διαφορές στην ανοσοδραστικότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες στις πρώτες πέντε εβδομάδες (Hammes et al., 1995; Q. Li et al., 2002; E Lieth et al., 1998). Στην παρούσα εργασία σε χρονικό διάστημα 5 εβδομάδων μετά την πρόκληση του διαβήτη παρατηρήθηκε ιδιαίτερη αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP κατά 50% σε σχέση με τα επίπεδα της, στον μάρτυρα.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες που αφορούν τα χολινεργικά βραχύινα κύτταρα, έδειξαν στο διάστημα 5 εβδομάδων, μικρή μείωση στον αριθμό των κυττάρων τα οποία εκφράζουν την ακετυλοχολίνη και δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κυττάρων. Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν όμως από την Ιορδανίδου Γιώτα στο εργαστήριο έδειξαν μείωση στην ανοσοδραστικότητα των κυττάρων αυτών κατά 40% έπειτα από πέντε εβδομάδες, γεγονός που συμφωνεί με τις μελέτες που παρουσιάζουν απώλεια των χολινεργικών βραχύνων κυττάρων στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (A J Barber et al., 1998; Gastinger et al., 2006) καθώς και μειωμένη ενζυμική ενεργότητα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση το

οποίο είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης (Sánchez-Chávez & Salceda, 2001).

Τα οριζόντια και δίπολα κύτταρα που συνδέονται με κωνία και εκφράζουν την Calbindin δεν παρουσίασαν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή, όμως τα βραχύτινα κύτταρα που την εκφράζουν φάνηκαν να μειώνονται στις 5 εβδομάδες μετά την πρόκληση του διαβήτη. Μέτρηση κυττάρων δεν πραγματοποιήθηκε και στην συγκεκριμένη περίπτωση. Στις 5 εβδομάδες δεν παρατηρήθηκε ποιοτικά καμία αλλαγή στην ανοσοδραστικότητα των δίπολων κυττάρων τα οποία εκφράζουν την PKC. Η ανοσοδραστικότητα της recoverin στα διαβητικά ζώα στις 5 εβδομάδες παρότι δεν έδειξε μείωση της έντασης του σήματος εμφάνισε ωστόσο μείωση του πάχους της ONL. Λόγω της παρατηρούμενης μείωσης του πάχους της ONL στοιβάδας πραγματοποιήθηκαν ιστοχημικές μελέτες για να ποσοτικοποιηθούν οι αλλαγές αυτές.

Λόγω του μεγάλου εύρους τιμών που πήραμε από τις μετρήσεις αποφασίσαμε να χωριστούν τα διαβητικά ζώα σε δυο ομάδες. Στην μία ομάδα, συμπεριελήφθησαν τα ζώα των οποίων το πάχος της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς συνολικά καθώς και της ONL στοιβάδας ήταν μεγαλύτερα (N=7) του μέσου όρου των μαρτύρων (N=15) και στην άλλη ομάδα συμπεριελήφθησαν τα ζώα των οποίων το πάχος της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς συνολικά καθώς και της ONL στοιβάδας ήταν μικρότερα (N=10) του μέσου όρου των μαρτύρων (N=15).

Στην πρώτη ομάδα παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους του αμφιβληστροειδούς και μικρότερη αύξηση στην ONL στοιβάδα. Η αύξηση αυτή σύμφωνα με την βιβλιογραφία οφείλεται σε οίδημα το οποίο εμφανίζεται στον αμφιβληστροειδή (Park et al. 2003). Το οίδημα αυτό εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της ασθένειας σε αρουραίους (μια εβδομάδα μετά την πρόκληση διαβήτη) και είναι εντονότερη στα εσωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδή παρά στα εξωτερικά. Στη συνέχεια ακολουθεί μείωση του πάχους του αμφιβληστροειδούς για τις υπόλοιπες εβδομάδες. Μια πιθανή ερμηνεία είναι η ρήξη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού η οποία

είναι εντονότερη στις εσωτερικές παρά στις εξωτερικές στοιβάδες (Carmo et al. 1998). Στην δεύτερη ομάδα παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στο πάχος του αμφιβληστροειδούς καθώς και τις ONL στοιβάδας η οποία είναι αρκετά σημαντική και συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Park et al. 2003) όπου παρατηρείται μείωση στο πάχος του αμφιβληστροειδούς ειδικότερα στην ONL στοιβάδα. Η μείωση αυτή πιθανότατα οφείλεται στις αλλαγές του βιοχημικού περιβάλλοντος που συμβαίνει (Kumagai et al. 1994; Zeng et al. 2000).

Παρόλο που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι κατά την διάρκεια της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας πολλές κατηγορίες κυττάρων, όπως ήδη αναφέρθηκε, παρουσιάζουν αποπτωτικό θάνατο και ο οποίος μπορεί να ανιχνευτεί είτε με ανοσοϊστοχημικές μελέτες είτε με χρήση TUNEL, στην παρούσα εργασία αυτό δεν ήταν εφικτό. Το αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδινε μια διάχυτη χρώση στον ιστό, η οποία ήταν ίδια σε όλες τις ομάδες των ζώων. Το ίδιο πρόβλημα αντιμετωπίστηκε όταν επιχειρήθηκε να γίνει η διαδικασία της TUNEL σε δείγματα φυσιολογικών και διαβητικών ζώων, όπου δεν παρατηρήθηκε χρώση στον ιστό. Πειράματα όμως που πραγματοποιήθηκαν από την Ιορδανίδου Γιώτα στο εργαστήριο, έδειξαν αυξημένη απόπτωση στην έσω πυρηνική στιβάδα με λίγα κύτταρα και στη γαγγλιακή στιβάδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μείωση ανοσοφθορισμού των βραχύνων και κάποιων γαγγλιακών κυττάρων που παρατηρήθηκαν με χρήση ανοσοϊστοχημικών δεικτών όπως περιγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιείται λόγω απόπτωσης των κυττάρων αυτών.

Αξίζει τέλος να αναφερθεί, ότι από την στιγμή που προκλήθηκε ο διαβήτης στους αρουραίους, ένα ποσοστό των ζώων (περίπου 14%) πέθανε από φυσικά αίτια πριν ολοκληρωθεί το διάστημα των 5 εβδομάδων, γεγονός που μπορεί να αιτιολογηθεί από την φύση της ασθένειας. Ο διαβήτης πέρα από τις επιπλοκές που προκαλεί στον αμφιβληστροειδή, είναι μια ασθένεια που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά όργανα του οργανισμού.

Σύμφωνα με όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, μέσα σε διάστημα 5 εβδομάδων, μπορούν να παρατηρηθούν αρκετές αλλαγές στα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς όπως για παράδειγμα στα γαγγλιακά κύτταρα, τα βραχύκινα κύτταρα και τα κύτταρα της γλοίας. Οι αλλαγές που παρατηρούνται κάνουν την εμφάνισή τους σταδιακά από την στιγμή που θα προκληθεί ο διαβήτης, δείχνοντας ότι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι μια ασθένεια η οποία εξελίσσεται με αργό και σταθερό ρυθμό.

4.2. DHEA και νευροπροστασία

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η *in vivo* εξέταση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης του νευροστεροειδούς DHEA στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας στον αρουραίο. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, η DHEA φαίνεται να δρα νευροπροστατευτικά στον αμφιβληστροειδή εμποδίζοντας την απόπτωση των νευρικών κυττάρων καθώς και των κυττάρων της γλοίας γεγονός που αποτελεί και το τελικό στάδιο σε πολλές νευρολογικές ασθένειες όπως Alzheimer, Parkinson, Huntington, εγκεφαλικό κ.α. Τα εναρκτήρια γεγονότα συμπεριλαμβάνουν διεγερσιτοξικότητα, οξειδωτικό στρες, απομάκρυνση αυξητικών παραγόντων, κιτοκίνες και τοξίνες, όπου εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια και μηχανισμούς οδηγώντας τελικά σε απόπτωση ή νέκρωση.

Μέχρι στιγμής τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα που παρείχαν ενδείξεις των νευροπροστατευτικών δράσεων των νευροστεροειδών στον αμφιβληστροειδή έχουν εστιάσει κυρίως στο σουλφίδιο της PREG (pregnenolone sulfate, PS) και στην 17β-εστραδιόλη. Συγκεκριμένα, χορήγηση 17β-εστραδιόλης φάνηκε να ασκεί προστατευτικές δράσεις σε αμφιβληστροειδή που έχει υποστεί ισχαιμία (Nonaka και συν., 2000, Kaja και συν., 2003). Ωστόσο, ο Cascio και οι συνεργάτες του το 2000 έδειξαν ότι χορήγηση PS ενισχύει τον καθυστερημένο κυτταρικό θάνατο (delayed cell death) των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς που προκαλείται από τοξικές συγκεντρώσεις NMDA, ενώ δρα από μόνο του τοξικά προκαλώντας ρήξη της

ομοιόστασης του κυττάρου και επακόλουθο οξύ κυτταρικό θάνατο (acute excitotoxic cell death) (Guarneri και συν., 1998b). Εν αντιθέσει, *in vitro* μελέτες υποστηρίζουν ότι ο κυτταρικός θάνατος σε αμφιβληστροειδή που εκτίθεται σε NMDA σε τοξική συγκέντρωση μειώνεται από τη χορήγηση PREG και DHEA(S), ενώ αναστέλλεται πλήρως από τη 17β-οιστραδιόλη (Guarneri και συν., 2003).

Τα νευροστεροειδή DHEA και DHEAS επέφεραν προστασία σε πυραμιδικούς νευρώνες αλλά και σε γλοιακά κύτταρα σε *in vivo* και *in vitro* διαδικασίες τόσο στον ιππόκαμπο όσο και σε απομονωμένους αμφιβληστροειδείς. Σε μια ανοσοκυτταροχημική μελέτη της Kimonides και των συναδέλφων της (Kimonides, 2008), εξετάστηκαν οι επιδράσεις των DHEA(S) σε κυτταροκαλλιέργειες υποκάμπου που είχαν υποστεί διεγερσι τοξικότητα από NMDA, AMPA ή καϊνικό οξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η DHEA και ο σουλφιδικός εστέρας της (DHEAS) αποτρέπουν ή τουλάχιστον μειώνουν αισθητά τις νευροτοξικές δράσεις του NMDA *in vivo* αλλά και *in vitro* στον ιππόκαμπο, ενώ μειώνουν και τις τοξικές δράσεις των AMPA και καϊνικού *in vitro*. Η αλλοπρεγνανολόνη έχει αναφερθεί ότι ενδεχομένως να έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε δομές του ιππόκαμπου που πλήττονται από αγωνιστές των NMDA υποδοχέων (Weaver et al. 1997).

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο από τον Γιαννόγκονα Παναγιώτη έδειξαν ότι στο *in vitro* μοντέλο της χημικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή, παρουσιάστηκε μια δόσοεξαρτώμενη νευροπροστατευτική δράση τόσο από την DHEA όσο και από τα συνθετικά της ανάλογα BNN50 και BNN124. Επίσης στο μοντέλο της *in vivo* επαγωγής AMPA διεγερσιτοξικότητας (Kokona et al. 2012), παρατηρήθηκε αναστροφή του κυτταρικού θανάτου στα ChAT βραχύινα κύτταρα και στα κύτταρα που εκφράζουν την Calbindin, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Στην παρούσα εργασία, στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, παρατηρήσαμε παρόμοια δράση στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς που είχαν επηρεαστεί από την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μεγαλύτερη μείωση

στους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στον αμφιβληστροειδή εμφανίστηκε την 4^η εβδομάδα μετά την χορήγηση της STZ. Σε εκείνο το χρονικό σημείο χωρίσαμε τα διαβητικά ζώα σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση DHEA για μια εβδομάδα, ενώ στην δεύτερη ομάδα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά το έκδοχο. Η DHEA φάνηκε να επαναφέρει το σήμα του NFL, στα επίπεδα του μάρτυρα, αφού δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα τους. Ο αριθμός των ντοπαμινεργικών κυττάρων φάνηκε κι αυτός να επιστρέφει στα επίπεδα του μάρτυρα, ενώ σημαντικά μειώθηκε και η έκφραση της GFAP στα κύτταρα της γλοίας. Τέλος, η DHEA φαίνεται να επαναφέρει το πάχος του αμφιβληστροειδούς και την στοιβάδα ONL στα επίπεδα σχεδόν των μαρτύρων. Αξιίζει να σημειωθεί ότι δεν υπήρχε καμία διαφορά στην συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα των ζώων στα οποία χορηγήθηκε η DHEA σε σχέση με τα ζώα τα οποία έλαβαν το έκδοχο.

Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η DHEA νευροπροστατευτικά στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, δεν είναι γνωστός. Υπάρχουν μελέτες (Lazaridis και συν., 2010) που υποστηρίζουν την εμπλοκή του TrkA υποδοχέα του NGF στις νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA. Σε καλλιέργειες κυττάρων νευρικής ακρολοφίας PC12, η DHEA μιμήθηκε τον NGF διεγείροντας τη φωσφορυλίωση του TrkA και ελέγχοντας τα επίπεδα τόσο του TrkA όσο και του p75NTR. Επίσης η DHEA ενεργοποίησε το σηματοδοτικό μονοπάτι κινασών που ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του NGF στους υποδοχείς του, δηλαδή τις κινάσες Shc, Akt, και ERK1/2, downstream των TrkA υποδοχέων, και τις πρωτεΐνες TRFA6, RIP2 και RhoGDI που ενεργοποιούνται μετά την ενεργοποίηση των p75NTRs.

Πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν από την Κοκονά Δέσποινα στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας το μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας, έδειξαν ότι συγχορήγηση AMPA με αναστολέα του TrkA υποδοχέα, μπορούσε να αναστείλει πλήρως ή μερικώς με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την νευροπροστατευτική δράση της DHEA. Παράλληλα, χορήγηση NGF έδειξε

νευροπροστατευτική δράση, ενώ χρήση του ανταγωνιστή του TrkA υποδοχέα ανέστειλε την δράση του NGF.

Ο NGF έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν ότι έχει ευεργετική δράση σε ιστούς του ΚΝΣ που υπόκεινται σε νευροεκφύλιση. Ενδοεγκεφαλική χορήγηση NGF έχει δράσει ευεργετικά σε ασθενείς με νόσο Alzheimer και Parkinson (Olson και συν., 1991, Seiger και συν., 1993, Tuszynski και συν., 2005). Οι νευροτροφίνες γενικά, θα μπορούσαν να είναι υποψήφιοι νευροπροστατευτικοί παράγοντες για οφθαλμικές ασθένειες και είναι γνωστό ότι είναι σημαντικοί για την ομαλή ανάπτυξη των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς (Lewin & Barde, 1996, von Bartheld και συν., 1996, Lambiase και συν., 1997, Atkinson και συν., 1999). Επίσης, πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν τη νευροπροστατευτική δράση του NGF. Ενδοβολβική χορήγηση σε ζωικά μοντέλα φαίνεται ότι αναστέλλει την εκφύλιση των RGCs (retinal ganglion cells) μετά από μηχανική, ισχαιμική ή υπερτασική βλάβη (Carmignoto και συν., 1989, Siliprandi και συν., 1993, Parisi και συν., 2006), ενώ τα κύτταρα Schwann, που παράγουν μεγάλες ποσότητες NGF (Heumann και συν., 1987), επάγουν επιβίωση των RGCs, των οποίων οι άξονες έχουν κοπεί, όταν μεταμοσχευθούν ενδοφθάλμια (Maffei και συν., 1990). Επίσης, τοπική χορήγηση NGF σε οφθαλμό ασθενών με neurotrophic keratitis φάνηκε να επαναφέρει τη λειτουργία των αισθητικών νευρώνων (Lambiase και συν., 1998).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω δεδομένα, η DHEA φαίνεται να δρα νευροπροστατευτικά στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας στον αρουραίο, εμποδίζοντας την εκφύλιση ορισμένων βραχύνων κυττάρων, γαγγλιακών κυττάρων και την ενεργοποίηση των κυττάρων της γλοίας διατηρώντας το πάχος της στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς πιθανότατα με την ενεργοποίηση των TrkA υποδοχέων του NGF.

Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν για πρώτη φορά υπέρ της νευροπροστατευτικής δράσης του νευροστεροειδούς DHEA στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και ταυτοποιούν τα νευροστεροειδή ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση της νόσου.

Περίληψη

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι μια σοβαρή επιπλοκή του διαβήτη που οδηγεί σε τύφλωση το μεγαλύτερο αριθμό των ασθενών ηλικίας άνω των 65 ετών. Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου ενώ αλλάζει το βιοχημικό περιβάλλον των κυττάρων. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από σταδιακή καταστροφή των νευρικών κυττάρων (νευροεκφύλιση), ενεργοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων, και διαταραχές στα αγγεία του αίματος, προκαλώντας μικροανευρύσματα και την δημιουργία μη φυσιολογικών αγγείων. Οι παραδοσιακές μέθοδοι αντιμετώπισης της ασθένειας στοχεύουν κυρίως στην νεοαγγείωση, καταστρέφοντας τα μη φυσιολογικά αγγεία και αποτρέποντας τον σχηματισμό νέων.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να καταγραφεί στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας ποιοι νευρικοί κυτταρικοί τύποι επηρεάζονται και σε ποιο βαθμό από τον διαβήτη και στη συνέχεια, χορηγώντας το νευροστεροειδές DHEA, να διαπιστώσουμε αν παρατηρούνται μεταβολές. Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν από τον διαβήτη αφορούσαν τα ντοπαμινεργικά βραχύτινα κύτταρα (μείωση αριθμού κυττάρων 60%), την μείωση της ανοσοδραστικότητας του NFL (μείωση σήματος 40%) και αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP κατά 50%. Ακόμα παρατηρήθηκε αύξηση του πάχους της στοιβάδας ONL και του πάχους του αμφιβληστροειδούς συνολικά σε αρκετά ζώα, ενώ σε άλλα μείωση.

Για πρώτη φορά έγινε σε *in vivo* μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας η χορήγηση του νευροστεροειδούς DHEA (10mg/kg, ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση) δείχνοντας ότι δρα νευροπροστατευτικά επαναφέροντας τον αριθμό των κυττάρων, μειώνοντας την αυξημένη έκφραση της GFAP στα κύτταρα της γλοίας και επαναφέροντας

την ανοσοδραστικότητα του NFL στους νευροάξονες στα επίπεδα των μαρτύρων.

Περαιτέρω μελέτες πρέπει να γίνουν ώστε να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο η DHEA διεκπεραιώνει τις νευροπροστατευτικές της δράσεις στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Επίσης, θα πρέπει να μελετηθούν και τα ανάλογά της BNN20 και BNN27 τα οποία στερούνται τις δράσεις της DHEA στην περιφέρεια. Οι ουσίες αυτές λόγω της υδρόφοβης χημικής σύστασης θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε σταγόνες στον οφθαλμό (πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο) και να προκαλέσουν νευροπροστασία στον διαβητικό αμφιβληστροειδή, κάτι που θα ωφελούσε πολύ τη θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Η μόνη φαρμακευτική θεραπεία που υπάρχει μέχρι στιγμής (anti-VEGFs) χορηγείται με ένεση στον οφθαλμό, στοχεύει στη μείωση της ανάπτυξης νέων αγγείων και πρέπει να χορηγείται ισοβίως. Ένα θεραπευτικό σχήμα που να αποτελείται τόσο από τα νευροστεροειδή (αντι-αποπτωτικά) όσο και τα anti-VEGF σκευάσματα θα αποτελούσε μια πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου.

Βιβλιογραφία

Πρωτογενής βιβλιογραφία

Λαδάς Ι. Αγγειακές παθήσεις αμφιβληστροειδούς. Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα, 2005.

David J. Browning Diabetic Retinopathy Evidence-Based Management

Kanski J. Κλινική οφθαλμολογία. Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. Αθήνα, 2004

Στάγκος Ν. Κλινική Οφθαλμολογία. University Studio Press. Θεσσαλονίκη, 2002

Δημοσιεύσεις

Abu-El-Asrar, A. M., Dralands, L., Missotten, L., Al-Jadaan, I. A., & Geboes, K. (2004). Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(8), 2760-6.

Abu El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L & Geboes K (2007). Expression of antiapoptotic and proapoptotic molecules in diabetic retinas. *Eye* 21, 238-245

Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol.* 2008 Apr;30(2):65-84

Aizu, Y., Oyanagi, K., Hu, J., & Nakagawa, H. (2002). Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of the streptozotocin-diabetic rats. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 22(3), 161-70.

Aiello L, Avery R, Arrigg P et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-1487.

Antonetti, D. A., Barber, A. J., Bronson, S. K., Freeman, W. M., Gardner, T. W., Jefferson, L. S., Kester, M., et al. (2006). Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*, 55(9), 2401-11.

Antonetti, D. a, Klein, R., & Gardner, T. W. (2012). Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine*, 366(13), 1227-39.

Aragno M., Tamagno E., Poli G., Boccuzzi G., Brignardello E. and Danni O. (1994) Prevention of carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver microsomes from dehydroepiandrosteronepretreated rats. *Free Radic Res* **21**: 427-435.

Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A & Lorenzi M (2003). A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes* **52**, 506-511

Azuma T., Matsubara T., Shima Y., Haeno S., Fujimoto T., Tone K., Shibata N. and Sakoda S. (1993) Neurosteroids in cerebrospinal fluid in neurologic disorders. *J Neurol Sci* **120**: 87-92.

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

Barber, A J, Antonetti, D. A., & Gardner, T. W. (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Investigative ophthalmology & visual science*, *41*(11), 3561-8.

Barber, A J, Lieth, E., Khin, S. A., Antonetti, D. A., Buchanan, A. G., & Gardner, T. W. (1998). Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *The Journal of clinical investigation*, *102*(4), 783-91.

Barber, A J, Nakamura, M., Wolpert, E. B., Reiter, C. E., Seigel, G. M., Antonetti, D. A., & Gardner, T. W. (2001). Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *The Journal of biological chemistry*, *276*(35), 32814-21.

Barber, Alistair J, Antonetti, D. A., Kern, T. S., Reiter, C. E. N., Soans, R. S., Krady, J. K., Levison, S. W., et al. (2005). The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, *46*(6), 2210-8.

Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J. and Quirion R. (1999)

Barile GR, Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Donmoyer CM, Ma W, Rong LL, Buciarelli LG, Wendt T, Horig H, Hudson BI, Qu W, Weinberg AD, Yan SF & Schmidt AM (2005). The RAGE axis in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2916-2924

Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Brain Res Mol Brain Res* **66**: 35–41.

Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Amer J Physiol Reg Integ Comp Phys* 2004;287:R735-R741

Baulieu EE. and Robel P. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4089–4091.

Beaumont SM, Harris JP, Lenndertz JA, Phillipson OT. The pupillary light reflex in mild Parkinson's disease. *Clin Vis Sci.* 1987;2:123–129.

Braun L, Kardon T, Reisz-Porszasz Z, Banhegyi G, Mandl J. The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats. *Life Sci* 2001;69:2533–2542

Bowlby MR. (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* **43**: 813–819

Bucolo C. and Drago F. (2004) Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: role of sigma1 recognition sites. *Eur J Pharmacol* **498**: 111-114.

Caligiuri M, Lotze M. Cytokines in the genesis and treatment of cancer. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2007

Cardounel A., Regelson W. and Kalimi M. (1999) Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotixin-induced cell death: mechanism of action. *Proc Soc Exp Biol Med* **222**: 145-149

Charalampopoulos I, Alexaki VI, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, Calogeropoulou T, Margioris AN, Castanas E and Gravanis A. (2006a) G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J* **20**: 577–579.

Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, Minas V, Dermitzaki E, Lazaridis I, Vardouli L, Stournaras C, Margioris AN, Castanas E and Gravanis A. (2006b) Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann NY Acad Sci* **1088**: 139-152.

Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN and Gravanis A. (2005) Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction

of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinol* **146**: 3309-3318.

Charalampopoulos I., Margiotis AN. and Gravanis A. (2008a) Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane-mediated, integrated genomic and non-genomic pro-survival signaling pathways. *J Neurochem* **107**(5): 1457- 1469.

Charalampopoulos I., Remboutsika E., Margioris A. and Gravanis A. (2008b) Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab* **19**: 300-307.

Charalampopoulos I., Tsatsanis C., Dermitzaki E., Alexaki VI., Castanas E., Margioris AN. and Gravanis A. (2004) Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* **101**: 8209-8214.

Colafrancesco, V., Coassin, M., Rossi, S., & Aloe, L. (2011). Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration, 284-289

Compagnone NA. and Mellon SH. (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* **21**: 1-56.

Corpéchet C., Robel P., Axelson M., Sjövall J. and Baulieu EE. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4704-4707.

Corpéchet C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjövall J., Vihko R., Baulieu EE. And Robel P. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* **270**: 119-125.

Dubrovsky BO. (2005) Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**(2): 169-92.

Dütsch M, Marthol H, Michelson G, Neundörfer B, Hilz MJ. Pupillography refines the diagnosis of diabetic autonomic neuropathy. *J Neurol Sci.*2004;**222**:75-81.

Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, Fengler D. Antineovascular agents in the treatment of eye diseases. *Curr Pharm Des* 2006;**12**(21):2645-60.

Esler M., Lambert G., Kaye D., Rumantir M., Hastings J. and Seals D. (2002) Influence of ageing on the sympathetic nervous system and adrenal medulla at rest and during stress. *Biogerontology* **3**: 45-49.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Winer J, Leung D. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cellular Biochem* 1991;47:211-218.

Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Mimura T, Yamashita T, Hori S. Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. *Am J Ophthalmol* 2002;133:70-77.

Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Kawase M., Copin JC., Calagui B., Epstein C. J. and Chan PH. (1999) Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome c and subsequent DNA fragmentation after permeant focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci.* **19**: 3414-3422.

Gago N., Akwa Y., Sananes N., Guennoun R., Baulieu EE., El-Etr M. and Schumacher M. (2001) Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia* **36**: 295-308.

Gago N., El-Etr M., Sananes N., Cadepond F., Samuel D., Avellana-Adalid V., Baron-Van Evercooren A. and Schumacher M. (2004) 3 α ,5 α -Tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and gamma-aminobutyric acid: autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM+ progenitor proliferation. *J Neurosci Res* **78**: 770-783.

Gastinger, M. J., Singh, R. S. J., & Barber, A. J. (2006). Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(7), 3143-50.

Ghoumari AM., Baulieu EE. and Schumacher M. (2005) Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neurosci* **135**: 47-58.

Ghoumari AM., Ibanez C., El-Etr M., Leclerc P., Eychenne B., O'Malley BW., Baulieu EE. and Schumacher M. (2003) Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J Neurochem* **86**: 848-859.

Goto R, Doi M, Ma N, Semba R, Uji Y. Contribution of nitric oxide-producing cells in normal and diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol.*2005;**49**:363-370.

Gotzes S, Vente J de, Müller F (1998) Nitric oxide modulates cGMP levels in neurons of the inner and outer retina in opposite ways. *Vis Neurosci* 15:945-955

Greenstein V, Sarter B, Hood D et al. (1990) Hue discrimination and S cone pathway sensitivity loss in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1008-1014

Guarneri P., Cascio C., Russo D., D'Agostino S., Drago G., Galizzi G., De Leo G., Piccoli F., Guarneri M. and Guarneri R. (2003) Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration. *Ann NY Acad Sci* **1007**: 117-128.

Guarneri P., Guarneri R., Cascio C., Pavaasant P., Piccoli F. and Papadopoulos V. (1994) Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem* **63**: 86-96.

Guarneri P., Guarneri R., Cascio C., Piccoli F. and Papadopoulos V. (1995) g-Aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptors regulate rat retina neurosteroidogenesis. *Brain Res* **683**: 65-72.

Guarneri P., Papadopoulos V., Pan B. and Costa E. (1992) Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(11): 5118-22.

Guarneri P., Russo D., Cascio C., De Leo G., Piccoli F., and Guarneri R. (1998a) Induction of neurosteroid synthesis by NMDA receptors in isolated rat retina: a potential early event in excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 1752-1763.

Guarneri P., Russo D., Cascio C., De Leo G., Piccoli T., Sciuto V., Piccoli F. and Guarneri R. (1998b) Pregnenolone sulfate modulates NMDA receptors, inducing and potentiating acute excitotoxicity in isolated retina. *J. Neurosci. Res.* **54**: 787-797.

Guazzo EP., Kirkpatrick PJ., Goodyer IM., Shiers HM. and Herbert J. (1996) Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 3951-3960.

Hammes H-P, Federoff HJ & Brownlee M (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med* **1**, 527-534

Hancock HA & Kraft TW (2004). Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1002-1008

Havelock JC., Auchus RJ. and Rainey WE. (2004) The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Semin Reprod Med* **22**:337-347

Herd MB., Belelli D. and Lambert JJ. (2007) Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **116**(1): 20-34.

Holopigian K, Greenstein VC, Seiple W et al. (1997) Evidence for photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2355–2365

Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky LJr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* 24:10318–10325

Hosie AM., Wilkins ME., da Silva HM. and Smart TG. (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444 (7118):486–489.

Inzelberg R, Ramirez JA, Nisipeanu P, Ophir A. Retinal nerve fiber layer thinning in Parkinson disease. *Vis Res.* 2004;44:2793–2797.

Irwin RP., Lin SZ., Rogawski MA., Purdy RH. and Paul SM. (1994) Steroid potentiation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca²⁺ responses: structureactivity studies. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 677–682.

Ishida S, Usui T, Yamashiro K et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2155-62

Kaja S., Yan SH., Wei J., Fujitani K., Liu R., Zinkernagel AMB., Simpkins JW., Inokuchi K. and Koulen P. (2003) Estrogen Protects the Inner Retina from Apoptosis and Ischemia- Induced Loss of Vesl-1L/Homer 1c Immunoreactive Synaptic Connections. *Invest Ophthalmol & Visual Sci* 44(7): 3155-3162.

Kamijo M, Cherian PV & Sima AAF (1993). The preventive effect of aldose reductase inhibition on diabetic optic neuropathy in the BB/W rat. *Diabetologia* 36, 893–898.

Kern TS, Miller CM, Du Y, Zheng L, Mohr S, Ball SL, Kim M, Jamison JA & Bingaman DP (2007). Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes* 56, 373–379

Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol.* 2008 Sep 15;586(Pt 18):4401-8.

Kimonides VG., Khatibi NH., Svendsen CN., Sofroniew MV. and Herbert J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1852–1857.

Knabe W, Kuhn HJ (2000) Capillary-contacting horizontal cells in the tree shrew *Tupaia belangeri* belong to the mammalian type A. *Cell Tissue Res* 299:307-311

Koenig HL., Schumacher M., Ferzaz B., Thi AN., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y. and Baulieu EE. (1995) Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268: 1500-1503.

Kumagai AK, Glasgow BJ, Pardridge WM (1994) GLUT1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2887-2894

Kusner LL, Sarthy VP & Mohr S (2004). Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a role in high glucose-induced apoptosis in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 1553-1561

Lambiase, A., Aloe, L., Centofanti, M., Parisi, V., Mantelli, F., Colafrancesco, V., Manni, G. L., et al. (2009). Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13469-13474.

Lambiase, A., Coassin, M., Tirassa, P., Mantelli, F., & Aloe, L. (2009). Nerve growth factor eye drops improve visual acuity and electrofunctional activity in age-related macular degeneration: a case report. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 45(4), 439-42.

Larabi Y, Dahmani Y, Gernigon T, Nguyen-Legros J. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the retina of the diabetic sand rat *Psammomys obesus*. *J Hirnfor.* 1991;32:525-531

Lanthier A. and Patwardhan VV. (1987) In vitro steroid metabolism by rat retina. *Brain Res* 463(2): 403-406.

Lapchak PA., Chapman DF., Nunez SY. and Zivin JA. (2000) Dehydroepiandrosterone Sulfate Is Neuroprotective in a Reversible Spinal Cord Ischemia Model. Possible Involvement of GABAA Receptors. *Stroke* 31: 1953-1957.

Lazaridis I, Charalampopoulos I, Vergou V., Avlonitis N., Calogeropoulou T. and Gravanis A. (2010) Neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) directly binds to nerve growth factor (NGF) receptors, rescuing neuronal cells from apoptosis. *FENS Abstr.*, vol.5, 102.7

Leist M., Volbracht C., Kühnle S., Fava E., Ferrando-May E. and Nicotera P. (1997) Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol. Med.* **3**: 750-764.

Li Q, Zemel E, Miller B & Perlman I (2002). Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res* **74**, 615-625

Lieth E, Gardner TW, Barber AJ & Antonetti DA (2000). Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol* **28**,3-8

Lockhart E., Warner D., Pearlstein R., Penning D., Mehrabani S. and Boustany RM. (2002) Allopregnanolone Attenuates NMDA-Induced Excitotoxicity and Apoptosis in the Human NT2 Cell Line in Culture. *Neurosci Lett* **238**: 33-36.

Lopes de Faria JM, Russ H, Costa VP. Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy. *Br J Ophthalmol.*2002;**86**:725-728.

Lu M, Amano S, Miyamoto K et al. Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;**40**:3281-3286

Majewska MD., Bisslerbe JC. and Eskay RL. (1985) Glucocorticoids are modulators of GABAA receptors in brain. *Brain Res* **339**: 178-182.

Majewska MD., Harrison NL., Schwartz RD., Barker JL. and Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **232**(4753): 1004-1007.

Mameli M., Carta M., Partridge LD. and Valenzuela CF. (2005) Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors. *J Neurosci* **25**: 2285-2294.

Maninger N., Wolkowitz OM., Reus VI., Epel ES. and Mellon SH. (2009) Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol* **30**(1):65-91

Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V & Smith SB (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 3330-3336

Maurice T., Junien JL. and Privat A. (1997) Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizocilpine-induced learning impairment in mice via sigma 1-receptors. *Behav Brain Res* **83**(1-2):159-64.

Mensah-Nyagan AG., Do-Rego JL., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G. and Vaudry H. (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**: 63-82.

Mesiano S. and Jaffe RB. (1997) Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* **18**:378-403.

Meyer-Rusenberg B, Pavlidis M, Stupp T & Thanos S (2007). Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **245**, 1009-1018

Mohamed, Q., Gillies, M. C., & Wong, T. Y. (2007). Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 298(8), 902-16.

Morrison RS., Kinoshita Y., Xiang H., Johnson M. D., Kunts C., Ghatan S., Ho J. T. and Schwartzkroin PA. (1998) Mechanisms of neuronal cell death. *Ment Retard Dev Dis Res Rev* **4**: 157-170.

Morrow AL. (2007) Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther* **116**(1): 1-6.

Nieschlag E., Loriaux DL., Ruder HJ., Zucker IR., Kirschner MA. and Lipsett MB. (1973) The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *J Endocrinol* **57**:123-134.

Ning X, Baoyu Q, Yuzhen L, Shuli S, Reed E & Li QQ (2004). Neuro-optic cell apoptosis and microangiopathy in KKAY mouse retina. *Int J Mol Med* **13**, 87-92

Nishimura C, Kuriyama K. Alterations in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neurochem*.1985;**45**:448-455.

Nunes S, Ribeiro L, Lobo C, Cunha-Vaz J. Three different phenotypes of mild nonproliferative diabetic retinopathy with different risks for development of clinically significant macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Jul 10;**54**(7):4595-604

Oshitari T, Yamamoto S, Hata N & Roy S (2008). Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* **92**, 552-556

O'Steen WK., Anderson KV. and Shear CR. (1974) Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest Ophthalmol* **13**: 334-339.

Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH & Oh SJ (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* **46**, 1260-1268.

Park-Chung M., Wu FS., Purdy RH., Malayev AA., Gibbs TT. and Farb DH. (1997) Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* **52**: 1113-1123

Parker LN. and Odell WD. (1980) Control of adrenal androgen secretion. *Endocr Rev* **1**: 392- 410.

Paul SM. and Purdy RH. (1992) Neuroactive steroids. *FASEB J* **6**: 2311-2322.

Pierce E, Avery R, Foley E, Aiello L, Smith L. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1995;92:905-909

Phipps JA, Yee P, Fletcher EL & Vingrys AJ (2006). Rod photoreceptor dysfunction in diabetes: activation, deactivation, and dark adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3187-3194

Puia G., Santi MR., Vicini S., Pritchett DB., Purdy RH., Paul SM., Seeburg PH. and Costa E. (1990). Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. *Neuron* **4**(5): 759-65.

Qin Y, Xu G & Wang W (2006). Dendritic abnormalities in retinal ganglion cells of three-month diabetic rats. *Curr Eye Res* **31**, 967-974.

Rabow LE., Russek SJ. and Farb DH. (1995) From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse* **21**: 189-274.

Reddy DS. and Rogawski MA. (2009) Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurotherapeutics* **6**(2):392-401.

Reddy PY¹, Giridharan NV, Balakrishna N, Validandi V, Pullakhandam R, Reddy GB. (2013) Increased risk of cataract development in WNIN-obese rats due to accumulation of intralenticular sorbitol. *IUBMB Life*. 2013 May;65(5):472-8. doi: 10.1002/iub.1163.

Regelson W. and Kalimi M. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--the multifunctional steroid. II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. *Ann N Y Acad Sci* **719**: 564-575.

Rosenbaum PS., Gupta H., Savitz SI. and Rosenbaum DM. (1997) Apoptosis in the retina. *Clin. Neurosci.* **4**: 224-232.

Roufail E, Soulis T, Boel E, Cooper ME, Rees S. Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia.* 1998;**41**:1419-1425.

Sanchez-Chavez G, Vidal CJ, Salceda R. Acetyl- and butyrylcholinesterase activities in the rat retina and retinal pigment epithelium. *J Neurosci Res.*1995;**41**:655-662.

Sanchez-Chavez G, Salceda R. Acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and diabetic rat retina. *Neurochem Res.* 2001;**26**:153-159.

Sapolsky RM. (1992) *Stress, the Aging Brain and the Mechanism of Neuron Death* (MIT Press, Cambridge, MA).

Schumacher M., Akwa Y., Guennoun R., Robert F., Labombarda F., Desarnaud F., Robel P., De Nicola AF. and Baulieu EE. (2000) Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol* **29**: 307-326.

Schwesinger C, Yee C, Rohan R et al. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001;**158**:1161-1172.

Scott TM, Foote J, Peat B & Galway G (1986). Vascular and neural changes in the rat optic nerve following induction of diabetes with streptozotocin. *J Anat***144**, 145-152.

Seals DR. and Esler MD. (2000) Human ageing and the sympathoadrenal system. *J. Physiol.* **528**: 407-417.

Seki M, Tanaka T, Nawa H, Usui T, Fukuchi T, Ikeda K, Abe H & Takei N (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes* **53**, 2412-2419

Semenza G. HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev* 2000;**19**:59-65.

Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi C, Harvey V, Dvorak H. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;**219**:983-985.

Shen, X., Zhong, Y., Xie, B., Cheng, Y., & Jiao, Q. (2010). Pigment epithelium derived factor as an anti-inflammatory factor against decrease of glutamine synthetase expression in retinal Müller cells under high glucose conditions. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 248(8), 1127-36

Shirakawa H., Katsuki H., Kume T., Kaneko S. and Akaike A. (2005) Pregnenolone sulphate attenuates AMPA cytotoxicity on rat cortical neurons. *Eur J Neurosci* **21**: 2329-2335.

Shirao Y & Kawasaki K (1998). Electrical responses from diabetic retina. *Prog Retin Eye Res* **17**, 59-76.

Sima AA, Zhang WX, Cherian PV & Chakrabarti S (1992). Impaired visual evoked potential and primary axonopathy of the optic nerve in the diabetic BB/W-rat. *Diabetologia* **35**, 602-607

Spilsbury K, Garrett K, Shen W, Constable I, Rakoczy P. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 2000;157:135-144.

Spivak V., Lin A., Beebe P., Stoll L. and Gentile L. (2004) Identification of a neurosteroid binding site contained within the GluR2-S1S2 domain. *Lipids* **39**: 811-819.

Szabadfi, K., Atlasz, T., Kiss, P., Reglodi, D., Szabo, A., Kovacs, K., Szalontai, B., et al. (2012). Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell and tissue research*, 348(1), 37-46.

Tolentino M, McLeod D, Taomoto M, Otsuji T, Adamis A, Luttly G. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol* 2002;133:373-385.

Tolentino M, Miller J, Gragoudas E, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis A. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996;114:964-970.

Weaver CE.Jr., Marek P., Park-Chung M., Tam SW. and Farb DH. (1997) Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* **94**: 10450-10454.

Wise PM., Dubal DB., Wilson ME., Rau SW. and Bottner M. (2001) Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinol* **142**: 969-973.

Wu FS, Chen SC. (1997) Mechanism underlying the effect of pregnenolone sulfate on the kainate-induced current in cultured chick spinal cord neurons. *Neurosci Lett* **222**: 79-82.

Wu FS., Gibbs TT. and Farb DH. (1991). "Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* **40**(3): 333-336.

Yanagibashi K., Papadopoulos V., Masaki E., Iwaki T., Kawamura M. and HALL PF. (1989). Forskolin activates voltagedependent Ca²⁺ channels in bovine but not rat fasciculate cells. *Endocrinology* **124**: 2383-2391.

Zeng XX, Ng YK & Ling EA (2000). Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis Neurosci* **17**, 463-471

Η παρούσα εργασία παρουσιάστηκε με μορφή αναρτιμένης ανακοίνωσης (poster) στο 8th FENS Forum of Neuroscience που πραγματοποιήθηκε στην Βαρκελώνη το διάστημα 14-18 Ιουλίου 2012.

Emmanouil Kouliakis, Panagiotis Iordanidou, Niki Mastrodimou, Smaranda Boulaki, Ioannis Charalampopoulos, Achille Gravanis, Kyriaki Thermos

University of Crete, Faculty of medicine, Department of Basic Sciences, Laboratory of Pharmacology, Heraklio, Crete 71003 GR



Purpose

Diabetic neuropathy (DN) is characterized by a neurodegenerative component. While various therapeutic agents for the neurodegenerative aspects of the disease, there are no available agents for the treatment of the neurodegenerative component. The neurosteroid DHEA (dehydroepiandrosterone) (DHEA) has been shown to afford neuroprotection in brain and anti-apoptosis in PC12 cells. Recently we showed that DHEA protected the retina from AβPA apoptosis in PC12 cells. A mechanism involving the NMDA receptor. The aim of the present study was to investigate the neuroprotective properties of the neurosteroid DHEA and its novel synthetic analog BNN27, shown to have anti-apoptotic actions by block the endosome site of each coenzyme with DHEA, in the STZ-model of DR.

Methods

Adult male and female Sprague-Dawley rats were used, weighing 150-220g. The animals were housed one per cage and were employed in accordance with Greek national laws (Animal Act, P.L. 1831/85). Induction of diabetes: After fasting for a period of 12 hours, the rats were subjected to a single streptozotocin (STZ) injection of freshly prepared streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich Stein, Louis, USA) at a dose of 10 mg/kg diluted in citrate buffer (pH 4.7). Age-matched normal controls were given equal volumes of citrate buffer (Na). Glucose levels (at 14h) were measured regularly after induction using fast strips (Glucofast/10723, Bayer). After the injection, rats had access to food and 10% sucrose diluted in water. Animals with glucose levels >200mg/dl were considered diabetic. Three groups of animals (control, diabetic and neurosteroid group (diabetic + neurosteroid)) were included in this study (n=6-12 per group).

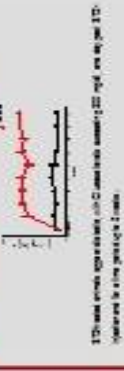
DHEA and BNN27 were administered as follows:



Quantification methods: For all the quantification studies each section of control or treated retina was studied by means of a 40X objective lens (Nikon) with Plan-Apochromat 40X objective. Cell Count (Cognosoft, Germany) For the quantification of TH, NG2, and NG2-expressing retinal cells, the total number of NG2 and NG2-expressing neurons was counted per field containing a minimum of 500 cells. The data in each treatment group are presented as a percentage of the total number of cells in the control retina (100%). For the NG2 and NG2+ quantification groups was measured using the public domain ImageJ 1.44 software and the mean gray value (integrated density) (fluorescence density/densitometric area) of this region was calculated in each image. In the treated animals (diabetic and DHEA and BNN27 treated) the mean gray value is expressed as a percentage of the mean gray value in the control retina (100%). All quantification data were analyzed using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc analysis using Cognosoft Prism 5.0 (Cognosoft Software, Inc, San Diego, CA, USA) computer software.

Results

1 STZ-induced changes to Glucose Levels



2 DHEA Protects NFL-J Immunoreactivity in the STZ-Model of Diabetic Retinopathy



3 DHEA reduces the GFAP Immunoreactivity



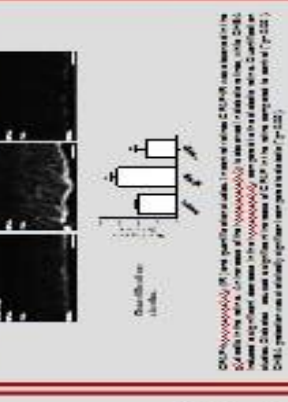
4 BNN27 Does not Protect NFL-J Immunoreactivity in the STZ-model of Diabetic Retinopathy



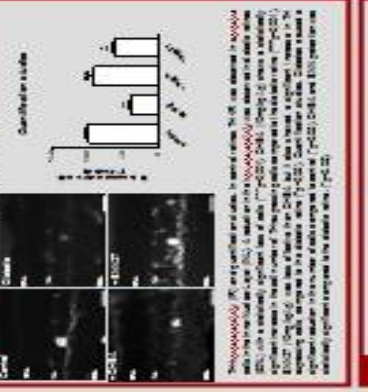
4 DHEA and BNN27 Protect TH-Immunoreactivity in Retinal Neurons



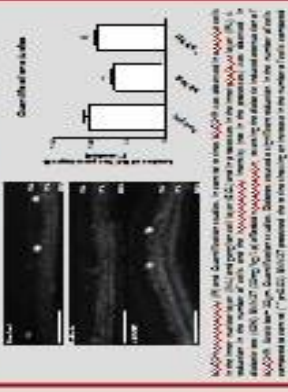
5 BNN27 Protects Nifedipine-Sensitive Calcium Signaling (NMDA)-Expressing Apoptosis Cells



6 DHEA and BNN27 Protects Retinal Cells from Apoptosis, Cleaved Caspase-3



7 BNN27 Protects Retinal Cells from Apoptosis, Cleaved Caspase-3



Conclusions

- In the STZ-model of diabetes, retinopathy, an approximately 10% loss of NFL-J immunoreactivity was observed in the early retinal neuropathy (Boulaki et al., 1998). This neurodegeneration was significantly reduced by the neurosteroid DHEA (10mg/kg, i.p.) (pre-treated retinal neuropathy) and BNN27 (10mg/kg, i.p.) (pre-treated retinal neuropathy) but not by BNN27 (10mg/kg, i.p.) (post-treated retinal neuropathy).
- These data strongly support that the neurosteroid DHEA and its synthetic analog protect retinal neurons in the STZ-model of diabetes (neurodegeneration) and BNN27 (neurodegeneration) but not retinal neuropathy (neurodegeneration).
- The novel DHEA synthetic analog, BNN27 (10mg/kg, i.p.) (pre-treated retinal neuropathy) and BNN27 (10mg/kg, i.p.) (post-treated retinal neuropathy) significantly protected retinal neurons in the STZ-model of diabetes (neurodegeneration) and BNN27 (neurodegeneration) but not retinal neuropathy (neurodegeneration).
- These data strongly support that the neurosteroid DHEA and its synthetic analog protect retinal neurons in the STZ-model of diabetes (neurodegeneration) and BNN27 (neurodegeneration) but not retinal neuropathy (neurodegeneration).
- These data strongly support that the neurosteroid DHEA and its synthetic analog protect retinal neurons in the STZ-model of diabetes (neurodegeneration) and BNN27 (neurodegeneration) but not retinal neuropathy (neurodegeneration).

References

1. Boulaki et al., J. Comp. Neurol. 402: 165-176, 1998.
2. Gravanis et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 1032-1037, 2002.
3. Kouliakis et al., Neurodegeneration 12: 1026-1037, 2003.
4. Kouliakis et al., J. Comp. Neurol. 465: 457-467, 2003.

Acknowledgements: The work was partly funded by the Graduate Program in Neurosciences, School of Medicine, University of Crete.