



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2012

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΙΟΡΔΑΝΙΔΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

«Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του
νευροστεροειδούς συνθετικού αναλόγου της DHEA, BNN27, στη
διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια στον αρουραίο»



ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Κ. ΘΕΡΜΟΥ
ΥΠΕΥΘΥΝΟ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Κ. ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	3
i. Δομή του Οφθαλμού	3
ii. Αμφιβληστροειδής Χιτώνας	5
iii. Αμφιβληστροειδής και Νευροδιαβίβαση.....	8
iv. Διαβήτης.....	9
v. Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια.....	10
vi. Επίδραση του διαβήτη στα νευρικά και γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς.....	12
vii. Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	14
viii. Νευροστεροειδή – DHEA και BNN27	16
ix. STZ-Μοντέλο για την πρόκληση του διαβήτη	21
2. Σκοπός της Μελέτης	23
3. Υλικά και Μέθοδοι	24
i. Πειραματόζωα	24
ii. Πρόκληση του Διαβήτη.....	24
iii. Χορήγηση Νευροστεροειδούς.....	25
iv. Απομόνωση και Επεξεργασία Αμφιβληστροειδούς.....	26
v. Ζελατινοποίηση Αντικειμενοφόρων Πλακών	26
vi. Ανοσοϊστοχημικές Μελέτες.....	27
vii. Μικροσκοπία.....	28
viii. Μελέτες ποσοτικοποίησης.....	29
ix. Στατιστική ανάλυση	30
x. Προετοιμασία Διαλυμάτων	30
4. Αποτελέσματα	32
Ανοσοϊστοχημικές και Ποσοτικές μελέτες.....	34
5. Συμπεράσματα και Συζήτηση	40
References	44
Επίλογος	55

1. Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα έχουν γίνει σημαντικές ανακαλύψεις σε ό,τι αφορά τη δομή και τη λειτουργία των διαφορετικών νευρικών κυττάρων και τη μεταφορά πληροφορίας μέσω ηλεκτρικών και χημικών συνάψεων. Λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας του εγκεφάλου των σπονδυλωτών, οι ερευνητές στρέφουν τις μελέτες τους είτε σε οργανισμούς με πιο απλό νευρικό σύστημα, είτε σε απλούστερα μέρη του εγκεφάλου, σε οργανισμούς με πολύπλοκο νευρικό σύστημα. Τέτοια μέρη είναι η παρεγκεφαλίδα, ο οσφρητικός βολβός και το σύστημα της όρασης. Το οπτικό σύστημα διεγείρεται με το φως και το μάτι, στο πίσω μέρος του οποίου βρίσκεται ο αμφιβληστροειδής, ξεχωρίζει από το υπόλοιπο μέρος του εγκεφάλου, γι' αυτό και έχει τραβήξει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων. Το οπτικό νεύρο είναι εύκολα προσβάσιμο και έδωσε τη δυνατότητα στους ερευνητές να μελετήσουν το πώς κωδικοποιείται η οπτική πληροφορία (Dowling, 1987). Το 1938 ο Hartline κατέγραψε για πρώτη φορά τη δραστηριότητα μεμονωμένων κυττάρων του οπτικού συστήματος, αφαιρώντας συγκεκριμένους άξονες του οπτικού νεύρου. Παρατήρησε ότι κάποιες ίνες ανταποκρίνονται μόνο κατά τη διάρκεια του φωτισμού, άλλες κατά τον τερματισμό της διέγερσης με φως και άλλες και στις δύο περιπτώσεις (Hartline, 1938).

i. Δομή του Οφθαλμού

Το τοίχωμα του βολβού του οφθαλμού σχηματίζεται από τρεις συγκεντρικές στιβάδες. Η εξωτερική στιβάδα είναι ο ινώδης χιτώνας, στον οποίο περιλαμβάνονται ο διαφανής κερατοειδής χιτώνας με το επιθήλιό του, τον επιπεφυκότα, και ο αδιαφανής σκληρός χιτώνας. Η μεσαία στιβάδα είναι ο αγγειώδης χιτώνας, που περιλαμβάνει την ίριδα και τον χοριοειδή χιτώνα. Η ίριδα περιέχει τόσο ακτινωτά όσο και κυκλικά προσανατολισμένες λείες μυϊκές ίνες, οι οποίες συνιστούν το διαστολέα και το σφιγκτήρα της κόρης. Η ίριδα σχηματίζει ένα διάφραγμα για να ελέγχει το μέγεθος της κόρης. Ο διαστολέας ενεργοποιείται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και ο σφιγκτήρας από το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα. Ο χοριοειδής

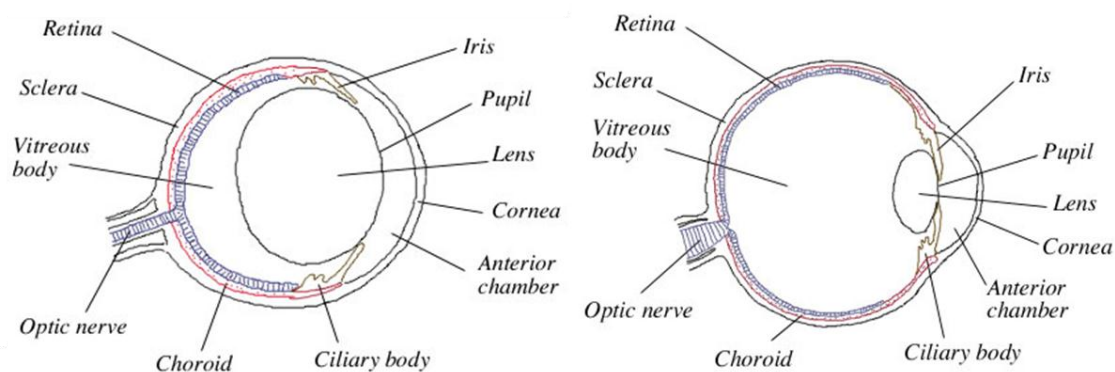
είναι πλούσιος σε αιμοφόρα αγγεία, που τροφοδοτούν τις εξωτερικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Οι εσωτερικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς τρέφονται από κλάδους της κεντρικής αρτηρίας και από τις φλέβες του αμφιβληστροειδούς. Τα αγγεία αυτά ακολουθούν την πορεία του οπτικού νεύρου (Berne & Levy, 2006).

Η έσω στιβάδα του οφθαλμού είναι ο νευρικός χιτώνας, ο αμφιβληστροειδής. Το λειτουργικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς καλύπτει το σύνολο του οπίσθιου θαλάμου, εκτός από το τυφλό σημείο, το οποίο είναι η θηλή του οπτικού νεύρου. Η οπτική οξύτητα είναι μέγιστη στο κεντρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς, την ωχρή κηλίδα. Ο κεντρικός βόθρος είναι ένα εντύπωμα σαν κοίλωμα στο μέσο της κηλίδας, όπου εστιάζονται οι οπτικοί στόχοι. Είναι το σημείο εστίασης των ακτινών του φωτός όταν οι οφθαλμοί είναι στραμμένοι σε έναν οπτικό στόχο που παρουσιάζει ενδιαφέρον. Το οπτικό νεύρο στην κυριολεξία δεν είναι νεύρο, αλλά μία προς τα μπροστά προέκταση του εγκεφάλου όπως και ο αμφιβληστροειδής. Εξέρχεται από το σκληρό χιτώνα του ματιού δια του ηθμοειδούς πετάλου και πηγαίνει, περιβαλλόμενο από τη σκληρή και λεπτή μήνιγγα, προς το οπτικό τμήμα και από εκεί στο εσωτερικό του κρανίου όπου μεταπίπτει στο οπτικό χιάσμα (Leydhecker, 1984).

Εκτός από τον αμφιβληστροειδή, ο οφθαλμός περιλαμβάνει τον κρυσταλλοειδή φακό, για να εστιάζει το φως στον αμφιβληστροειδή, μελαγχρωστική για να μειώνει την διάχυση του φωτός, καθώς και υγρά που ονομάζονται υδατοειδές υγρό και υαλώδες σώμα και βοηθούν στη διατήρηση του σχήματος του οφθαλμού. Το υαλοειδές σώμα είναι πηκτοειδές υλικό πίσω από το φακό και ανακυκλώνεται με πολύ αργό ρυθμό. Οι εξωτερικά προσφύομενοι εξωτερικοί οφθαλμικοί μύες κατευθύνουν τον οφθαλμό σε έναν κατάλληλο οπτικό στόχο. Τον φακό συγκρατούν στη θέση του πίσω από την ίριδα οι κρεμαστήριοι σύνδεσμοι (ή ζωνιαίες ίνες), οι οποίοι προσφύονται στο τοίχωμα του οφθαλμού με το ακτινωτό σώμα.

Η διάχυση του φωτός ελαχιστοποιείται χάρις στη μελαγχρωστική που περιέχεται άφθονη στο χοριοειδή. Επιπρόσθετα, η πιο εξωτερική στιβάδα του αμφιβληστροειδούς είναι ένα επιθήλιο που περιέχει μελαγχρωστική. Τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου παρεμβαίνουν στην ανακύκλωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων και στην αναγέννηση της ροδοψίνης.

Ο χώρος γύρω από την ίριδα είναι γεμάτος με υδατοειδές υγρό, το οποίο είναι διαυγές υγρό παρόμοιο με το εγκεφαλονωτιαίο. Εκκρίνεται από τις ακτινοειδείς προβολές, οι οποίες σχηματίζουν ένα επιθήλιο που βρίσκεται πίσω από την ίριδα και προβάλλει στον οπίσθιο θάλαμο. Το υγρό διασχίζει το θάλαμο αυτό, περνά από την κόρη και καταλήγει στον πρόσθιο θάλαμο όπου απορροφάται από το σωλήνα του Schlemm και επιστρέφει στη φλεβική κυκλοφορία (Berne & Levy, 2006).



Εικόνα: Δομές των οφθαλμών του αρουραίου (αριστερά) και του ανθρώπου (δεξιά) (<http://ratbehavior.org/Eyes.htm>)

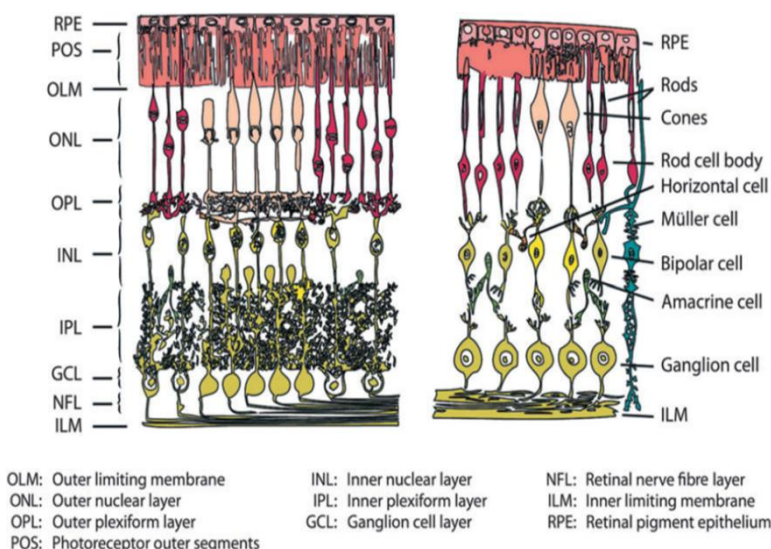
ii. Αμφιβληστροειδής Χιτώνας

Η οπτική αντίληψη αρχίζει στον αμφιβληστροειδή και πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το φως που διέρχεται τον κερατοειδή χιτώνα προβάλλεται στο βυθό του βολβού του οφθαλμού, όπου μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα από ένα εξειδικευμένο αισθητήριο όργανο, τον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Στη συνέχεια, τα σήματα αυτά μεταβιβάζονται, μέσω του οπτικού νεύρου, σε ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου για περαιτέρω επεξεργασία, αναγκαία για την αντίληψη (Kandel, Schwartz, & Jessel, 1995).

Ο αμφιβληστροειδής είναι μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) κι έτσι οι μηχανισμοί λειτουργίας των νευρώνων του μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για τη μελέτη μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων στους νευρώνες του εγκεφάλου των σπονδυλωτών. Ο αμφιβληστροειδής, όπως και άλλες περιοχές του εγκεφάλου, προέρχεται από το νευρικό σωλήνα. Κατά την εμβρυογένεση ο νευρικός

σωλήνας εγκοιλώνεται για τη δημιουργία δύο οπτικών κυστιδίων στην περιοχή του κεφαλιού του εμβρύου τα οποία τελικά θα αναδιπλωθούν σε δύο οπτικούς κάλυκες. Το νευρικό επιθήλιο στο εσωτερικό τοίχωμα του κάθε οπτικού κάλυκα είναι αυτό που τελικά θα αποτελέσει τον αμφιβληστροειδή. Αρχικά, και τα δύο τοιχώματα του οπτικού κάλυκα αποτελούν ένα μεγάλο κύτταρο, αλλά τα κύτταρα του εσωτερικού τοιχώματος διαιρούνται για το σχηματισμό μίας νευροεπιθηλιακής στιβάδας πάχους πολλών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά, που ονομάζονται νευροβλάστες, διαφοροποιούνται σε όλα τα κύτταρα του αμφιβληστροειδή. Οι φωτοϋποδοχείς σχηματίζονται στην κοιλιακή πλευρά της νευροεπιθηλιακής στιβάδας κι έτσι το φως θα πρέπει να περάσει μέσα από όλες τις στιβάδες του αμφιβληστροειδή για να δεσμευτεί από τους φωτοϋποδοχείς. Τα κύτταρα του εξωτερικού τοιχώματος του οπτικού κάλυκα διαφοροποιούνται και σχηματίζουν το μελάγχρουν επιθήλιο στο πίσω μέρος του ματιού. Μεταξύ του μελάγχρουν επιθηλίου και των φωτοϋποδοχέων δεν υπάρχει στενή προσκόλληση γεγονός που υποδηλώνει δύο πράγματα. Πρώτα απ' όλα καθιστά δυνατή την εύκολη απομόνωση του αμφιβληστροειδή από το πίσω μέρος του οφθαλμού. Παρόλα αυτά αυτή η έλλειψη προσκόλλησης μπορεί να προκαλέσει την αποκόλληση του αμφιβληστροειδή στους οργανισμούς σε κλινικές περιπτώσεις και να έχει ως αποτέλεσμα την τύφλωση του οργανισμού.

Για διάφορους λόγους ο αμφιβληστροειδής είναι ένα ιδανικό μέρος του ΚΝΣ για να χρησιμοποιηθεί προς μελέτη. Όπως αναφέρθηκε απομονώνεται εύκολα από τον οφθαλμό και μετά την απομόνωσή του παραμένει βιώσιμος για λίγες ώρες εάν διατηρηθεί σε υγρό και πλούσιο σε οξυγόνο περιβάλλον. Επιπλέον η ανατομία του είναι σχετικά απλή και παρόμοια σε όλα τα σπονδυλωτά. Τα κυτταρικά σώματα του



αμφιβληστροειδή είναι διαχωρισμένα από τις συνάψεις τους σχηματίζοντας διακριτές στιβάδες. Οι συνάψεις δημιουργούνται κατά κύριο λόγο σε δύο δικτυωτές στιβάδες, την εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (inner plexiform

layer – IPL) και την εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (outer plexiform layer – OPL) ενώ τα κυτταρικά σώματα σχηματίζουν τρεις πυρηνικές στιβάδες, την στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (ganglion cell layer – GCL), την έσω πυρηνική στιβάδα (inner nuclear layer – INL) και την έξω πυρηνική στιβάδα (outer nuclear layer – ONL), όπως φαίνεται και στην εικόνα (M Shahidi et al., 2010). Σε κάθε δικτυωτή στιβάδα μπορούμε μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου να αναγνωρίσουμε ποιες αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται ανάμεσα στα διαφορετικά κύτταρα.

Οι φωτοϋποδοχείς είναι τα μοναδικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή που είναι ευαίσθητα στο φως. Όλες οι απαντήσεις στο ερέθισμα του φωτός ξεκινούν από αυτά τα κύτταρα. Επιπλέον, υπάρχουν άλλες τέσσερις κατηγορίες κυττάρων τα οποία είναι τα γαγγλιακά κύτταρα (ganglion cells), τα δίπολα κύτταρα (bipolar cells), τα οριζόντια κύτταρα (horizontal cells) και τα βραχύινα ή αμακρινικά κύτταρα (amacrine cells). Τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων βρίσκονται στην έξω πυρηνική στιβάδα, ενώ τα κυτταρικά σώματα των δίπολων, οριζόντιων και βραχύνων κυττάρων του αμφιβληστροειδή βρίσκονται στην έσω πυρηνική στιβάδα. Τα οριζόντια κύτταρα τοποθετούνται στο εξωτερικό μέρος της στιβάδας, τα δίπολα κύτταρα στο μέσο της στιβάδας ενώ τα βραχύινα κύτταρα στο εσωτερικό μέρος της INL. Τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν την τελευταία στιβάδα του ιστού, τη γαγγλιακή στιβάδα (Dowling, 1987). Υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις όπου βρίσκουμε οριζόντια και δίπολα κύτταρα στην έξω πυρηνική στιβάδα, γαγγλιακά κύτταρα στην έσω πυρηνική στιβάδα και βραχύινα κύτταρα στη γαγγλιακή στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά τα ονομάζουμε εκτοπισμένα κύτταρα. Η ύπαρξη εκτοπισμένων βραχύνων κυττάρων στην γαγγλιακή στιβάδα αποτελεί πλέον ένα συνηθισμένο φαινόμενο στον αμφιβληστροειδή πολλών οργανισμών (Masland & Mills, 1979; Vaney, Peichi, & Boycott, 1981).

Ο κυριότερος τύπος κυττάρων γλοίας που συναντάμε στον αμφιβληστροειδή είναι τα κύτταρα Müller. Τα κύτταρα αυτά επεκτείνονται κάθετα διαμέσου του αμφιβληστροειδή από τον άνω όριο της έξω πυρηνικής στιβάδας μέχρι το κατώτερο όριο της γαγγλιακής στιβάδας. Ο πυρήνας των κυττάρων Müller βρίσκεται συνήθως στο μέσο της έσω πυρηνικής στιβάδας. Άλλοι τύποι κυττάρων που έχουν παρατηρηθεί περιλαμβάνουν αστροκύτταρα (Ogden, 1978) και μικρογλοιακά κύτταρα (Boycott & Hopkins, 1981).

iii. Αμφιβληστροειδής και Νευροδιαβίβαση

Ο διεγερτικός διαβιβαστής που απελευθερώνεται από τους πρωτοταγείς αισθητικούς νευρώνες είναι ένα αμινοξύ, το L-γλουταμινικό οξύ, ο κύριος διεγερτικός διαβιβαστής στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Οι υποδοχείς γλουταμινικού χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους υποδοχείς που ελέγχουν άμεσα διαύλους ιόντων (ιοντοτρόποι), οι οποίοι χωρίζονται περαιτέρω σε NMDA και μη-NMDA υποδοχείς (AMPA), και αυτούς που ελέγχουν τους διαύλους έμμεσα, με τη βοήθεια δεύτερων αγγελιοφόρων (μεταβολοτρόποι). Από τους σημαντικότερους ανασταλτικούς διαβιβαστές στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Δρα σε δύο υποδοχείς, τον GABA_A που είναι ένας ιοντοτρόπος υποδοχέας και ελέγχει ένα διάυλο Cl⁻, και τον GABA_B που είναι μεταβολοτρόπος και ενεργοποιεί έναν «καταρράκτη» δεύτερου αγγελιοφόρου ο οποίος τελικά ενεργοποιεί έναν διάυλο K⁺ (Kandel et al., 1995). Άλλα παραδείγματα νευροδιαβιβαστών που συναντάμε στον αμφιβληστροειδή είναι η γλυκίνη, η ακετυλοχολίνη (Sánchez-Chávez, Vidal, & Salceda, 1995) και η σεροτονίνη (Puro, 1985).

Το γλουταμινικό οξύ, ο νευροδιαβιβαστής που εντοπίζεται σε πάνω από 90% των συνάψεων του αμφιβληστροειδούς (Massey, 1990), προέρχεται κυρίως από τη γλουταμίνη που παράγεται από τα κύτταρα Müller και είναι υπεύθυνο για την κάθετη διαβίβαση της οπτικής πληροφορίας μεταξύ φωτοϋποδοχέων, δίπολων και οριζόντιων κυττάρων αλλά και μεταξύ δίπολων, αμακρινικών και γαγγλιακών κυττάρων. Αντίθετα, η οριζόντια μεταβίβαση της οπτικής πληροφορίας συντελείται κυρίως μέσω των GABA-εργικών συνάψεων μεταξύ οριζόντιων και αμακρινικών κυττάρων, με το GABA να παίζει σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των νευρώνων στις δύο δικτυωτές στιβάδες (IPL, OPL) (Vaughn et al., 1981; Yang, 2004). Ωστόσο, πέραν των κλασσικών νευροδιαβιβαστών, υπάρχουν και άλλες ουσίες οι οποίες συντίθενται κυρίως από διάφορες υποομάδες αμακρινικών κυττάρων και συμβάλουν μέσω των υποδοχέων τους στη ρύθμιση της ομαλής λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) (Eldred, 2000), η ντοπαμίνη (DA) (Nishimura & Kuriyama, 1985) και η σωματοστατίνη (Shapiro, Kronheim, & Pimstone, 1979).

Η διαταραχή της ισορροπίας διεγερτικών διαβιβαστών όπως είναι το γλουταμινικό οξύ, συντελεί στην εμφάνιση νόσων. Η υπερβολική ποσότητα γλουταμινικού είναι τοξική για τους νευρώνες και μπορεί να προκαλέσει νέκρωση πολλών νευρώνων σε ιστοκαλλιέργειες (Choi, 1988). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διεγερσιτοξικότητα του γλουταμινικού και εμπλέκεται στην εμφάνιση πολλών ασθενειών όπως οι αμφιβληστροειδοπάθειες (Kashii et al., 1994; Schwartz, 1993). Το πλάσμα του αίματος περιέχει 100 με 300M του γλουταμινικού οξέος ενώ στον αμφιβληστροειδή ελάχιστη συγκέντρωση, ακόμα και 5M, του αμινοξέος μπορεί να προκαλέσει το θάνατο νευρικών κυττάρων (Lipton & Rosenberg, 1994; Vorwerk et al., 1996). Φαίνεται επομένως λογικό ότι σε περιπτώσεις όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια όπου έχουμε βλάβη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (Cunha-Vaz, Faria de Abreu, & Campos, 1975), η διαρροή του γλουταμινικού και η μεγάλη συγκέντρωσή του στον ιστό μπορεί να προκαλέσει θάνατο των νευρώνων.

iv. Διαβήτης

Το 1922, όταν οι Banting και Best (Banting & Best, 1990; Banting, Best, Collip, Campbell, & Fletcher, 1991) δημοσίευσαν τα πρώτα αποτελέσματα για την ένεση ινσουλίνης στη θεραπεία του διαβήτη, οι κυριότερες επιπλοκές της νόσου ήταν η θολή όραση και ο καταρράκτης (Joslin, 1983). Η θεραπεία με την ινσουλίνη επέτρεψε στα άτομα να επιβιώνουν, αλλά και να ζουν αρκετά ώστε να αναπτύξουν σοβαρές επιπλοκές, οι οποίες περιλαμβάνουν τις μικροαγγειακές ασθένειες του αμφιβληστροειδούς, νευροπάθειες και νεφροπάθειες. Ο διαβήτης καθορίζεται από επίπεδα υπεργλυκαιμίας (Gries, Eckel, Rosen, & Zeigler, 2003). Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι διαβήτη. Ο διαβήτης τύπου 1, γνωστός και ως διαβήτης εξαρτώμενος από ινσουλίνη, χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, η οποία οδηγεί σε έλλειψη έκκρισης ινσουλίνης. Στον διαβήτη τύπου 2, ο μη εξαρτώμενος από ινσουλίνη, εμπλέκεται ένας συνδυασμός ανθεκτικότητας και ελαττωματικής έκκρισης της ινσουλίνης. Υπολογίζεται ότι μέσα στο 2010, 285 εκατομμύρια άνθρωποι έπασχαν από διαβήτη τύπου 2 το οποίο αποτελεί περίπου το 90% όλων των περιπτώσεων διαβήτη (Melmed, Polonsky, Larsen, & Kronenberg,

2011). Η ασθένεια συνδέεται με την ηλικία και κυρίως με την παχυσαρκία. Μία τρίτη περίπτωση είναι ο διαβήτης που προκαλείται στο 7% των κήσεων και προκαλεί κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 (World Health Organization. Diabetes; Fact sheet No.312. <http://www.who.int>; 2009).

v. Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

Πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες που απειλούν την ικανότητα της όρασης όπως είναι το γλαύκωμα, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, περιλαμβάνουν την προοδευτική και μη αναστρέψιμη απώλεια νευρώνων του αμφιβληστροειδούς και εμφανίζονται συχνότερα στις μεγαλύτερες ηλικίες. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι μία από τις κυριότερες επιπλοκές που προκαλείται στους ασθενείς με διαβήτη και εξελίσσεται, και στο διαβήτη τύπου 1 και 2, σε απώλεια της όρασης σε ποσοστό 5% των περιπτώσεων (Kempner et al., 2004). Όσο τα ποσοστά περιπτώσεων διαβήτη αυξάνονται παγκοσμίως, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια εξελίσσεται σε κύρια αιτία απώλειας της όρασης στις αναπτυσσόμενες χώρες (Fong, Aiello, Ferris, & Klein, 2004). Υπολογίζεται ότι το ποσοστό των διαβητικών ατόμων που έχουν πιθανότητα ολικής απώλειας της όρασής τους πρόκειται να διπλασιαστεί στα επόμενα 30 χρόνια (Wild, Roglic, Green, Sicree, & King, 2004). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει επίσης, ότι η εμφάνιση και η πρόοδος της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας επηρεάζονται από την υπεργλυκαιμία, την υπέρταση, και λιγότερο, από το δείκτη μάζας του σώματος, το βαθμό φυσικής δραστηριότητας και την αντίσταση στην ινσουλίνη (Antonetti, Klein, & Gardner, 2012). Όπως με πολλές παθήσεις που προκαλούνται στους ασθενείς με διαβήτη, έτσι και στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι η κύρια αιτία εμφάνισης της νόσου (Davis et al., 1998).

Τα προβλήματα στην όραση στους ασθενείς με διαβήτη σχετίζονται κυρίως με οίδημα της ωχράς κηλίδας, αλλά και με καταστάσεις ισχαιμίας του αμφιβληστροειδή και αιμορραγίες του υαλώδους. Το οίδημα πιστεύεται ότι προκαλείται από τη διαρροή των τριχοειδών αγγείων που έχει διαπιστωθεί κλινικά, χωρίς όμως να έχει εξακριβωθεί σε κυτταρικό επίπεδο ο μηχανισμός με τον οποίο το οίδημα αυτό οδηγεί

στη δημιουργία προβλημάτων στην όραση. Από κλινικής άποψης, το οίδημα προκαλεί διάχυση του φωτός στον αμφιβληστροειδή, το οποίο στη συνέχεια δε συγκεντρώνεται στους φωτοϋποδοχείς, με αποτέλεσμα τη μείωση της ποιότητας της εικόνας. Από κυτταρικής άποψης, η ικανότητα της όρασης μπορεί να μειώνεται λόγω του ότι η συσσώρευση υγρού στον αμφιβληστροειδή: α) προκαλεί αλλαγές στην εξωκυττάρια συγκέντρωση ιόντων απαραίτητων στα δυναμικά ενεργείας, β) προκαλεί πίεση ανατομικά στους νευρώνες, γ) επηρεάζει την ανταλλαγή γλουταμινικού – γλουταμίνης ανάμεσα σε νευρικά κύτταρα και κύτταρα γλοίας απαραίτητα για τη νευροδιαβίβαση ή δ) προσελκύει αμινοξέα που μπορεί να προκαλέσουν διεγερσιτοξικότητα καθώς και κύτταρα που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Antonetti et al., 2006).

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια διακρίνεται σε μη παραγωγική και παραγωγική. Κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η νεοαγγείωση στον αμφιβληστροειδή. Αρχικά, αλλαγές στις ιδιότητες και τη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων στον αμφιβληστροειδή οδηγούν, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στη δημιουργία μικροανευρυσμάτων στα τριχοειδή αγγεία της έσω πυρηνικής στιβάδας. Επιπλέον αλλαγές στη διαπερατότητα των αγγείων οδηγούν σε αιμορραγίες και μη φυσιολογική ηλεκτρική δραστηριότητα του αμφιβληστροειδούς. Η προσπάθεια επαναφοράς των αγγείων στη φυσιολογική τους κατάσταση οδηγεί στην πρόκληση περαιτέρω μικροαγγειακών ανωμαλιών καθώς και ισχαιμίας τα οποία αυξάνουν τις αιμορραγίες στον ιστό. Η ισχαιμία (Wise, 1956), καθώς και η επαγωγή αυξητικών παραγόντων, όπως η αύξηση έκφρασης του vascular endothelial growth factor (VEGF), από τους νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα (Murata et al., 1996) οδηγούν στην εξέλιξη της νόσου στην παραγωγική μορφή (Qian & Ripps, 2011). 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 (Kurtenbach, Mayser, Jägle, Fritsche, & Zrenner, 2006).

Παρά το χαρακτηρισμό της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας ως μικροαγγειακή νόσος, αυξημένος αριθμός μελετών, ήδη από το 1962 (Bloodworth, 1962), δείχνουν ότι η εκφύλιση των νευρώνων προηγείται των αγγειακών αλλαγών και τελικά οδηγεί σε δυσλειτουργίες στην όραση. Για παράδειγμα, έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς προβλήματα στην αντίληψη του χρώματος (North et al., 1997; Tregear, Knowles, Ripley, & Casswell, 1997) και την αντίθεση (Tregear et al., 1997) καθώς και μη φυσιολογικές ενδείξεις στο ERG (electroretinogram) (Brunette & Lafond, 1983; Palmowski, Sutter, Bearse, & Fung, 1997), πριν από τον εντοπισμό αγγειακών αλλαγών οι οποίες συνήθως χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Αλλαγές στα νευρικά και γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, πριν τη νεοαγγείωση, εντοπίζονται και σε μοντέλα χημικής επαγωγής του διαβήτη σε αρουραίους. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν αλλαγές στο ERG (Sakai, Tani, Shirasawa, Shirao, & Kawasaki, 1995) και επαγωγή απόπτωσης των νευρώνων (Barber et al., 2001).

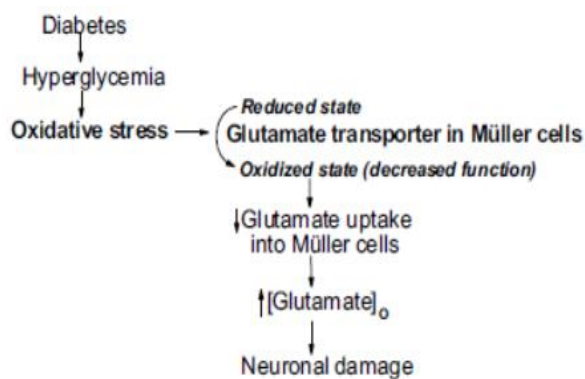
vi. Επίδραση του διαβήτη στα νευρικά και γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς

Ο διαβήτης και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια περιλαμβάνουν δυσλειτουργία (Hancock & Kraft, 2004; Q. Li, Zemel, Miller, & Perlman, 2002; Phipps, Yee, Fletcher, & Vingrys, 2006; Shirao & Kawasaki, 1998) και απώλεια νευρικών κυττάρων (Aizu, Oyanagi, Hu, & Nakagawa, 2002; Asnaghi, Gerhardinger, Hoehn, Adeboje, & Lorenzi, 2003; Barber et al., 1998; Hammes, Federoff, & Brownlee, 1995; Erich Lieth, Gardner, et al., 2000; Martin, Roon, Van Ells, Ganapathy, & Smith, 2004; Park et al., 2003; Sima, Zhang, Cherian, & Chakrabarti, 1992; Zeng, Ng, & Ling, 2000), τα οποία περιλαμβάνουν γαγγλιακά, βραχύινα, οριζόντια κύτταρα και φωτούποδοχείς. Η απόπτωση είναι ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου των νευρώνων στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Αποπτωτικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί σε όλες τις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς (Abu-El-Asrar, Dralands, Missotten, Al-Jadaan, & Geboes, 2004; Barber et al., 1998; Park et al., 2003), υποδεικνύοντας πως όλοι οι τύποι κυττάρων του ιστού είναι πιθανό να επηρεάζονται από τη νόσο. Επιπλέον, μελέτες στις οποίες έχει γίνει υπολογισμός του

πάχους των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς, δείχνουν την απώλεια νευρικών κυττάρων λόγω μείωσης του πάχους των στιβάδων INL και ONL (Barber et al., 2005; Martin et al., 2004). Τα μεγαλύτερα ποσοστά απόπτωσης έχουν παρατηρηθεί κυρίως στη γαγγλιακή αλλά και την INL στιβάδα και τα βραχύινα κύτταρα (Barber et al., 1998). 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 (apoptosis inducing factor) είναι η πρωτεΐνη που επάγει το δεύτερο μονοπάτι (Yong-hao et al., 2008). Σε αμφιβληστροειδείς διαβητικών ποντικών αλλά και αρουραίων στο μοντέλο της στρεπτοζοτοκίνης έχει παρατηρηθεί αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 (Kowluru & Koppolu, 2002; Mohr, Xi, Tang, & Kern, 2002). Επομένως, η νευροεκφύλιση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθολογία της νόσου, αν και οι ακριβείς τύποι κυττάρων που υφίστανται νευροεκφύλιση δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Ανοσοδραστικότητα κασπάσης-3 που έχει παρατηρηθεί στη γαγγλιακή στιβάδα μπορεί να περιλαμβάνει γαγγλιακά αλλά και εκτοπισμένα βραχύινα κύτταρα. Αποπτωτικά κύτταρα στην ONL μπορεί να υποδεικνύουν ότι και η απόπτωση φωτούποδοχέων είναι χαρακτηριστικό της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Gastinger, Singh, & Barber, 2006).

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα βραχύινα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς επηρεάζονται από το διαβήτη. Συγκεκριμένα, ντοπαμινεργικά και χολινεργικά βραχύινα κύτταρα έχουν μειωμένη ενζυμική ενεργότητα για την υδροξυλάση της τυροσίνης και την ακετυλοχολινεστεράση αντίστοιχα (Larabi, Dahmani, Gernigon, & Nguyen-Legros, 1991; Sánchez-Chávez & Salceda, 2001). Μείωση παρατηρείται επίσης και στα βραχύινα κύτταρα που περιέχουν μονοξειδίο του αζώτου (Goto, Doi, Ma, Semba, & Uji, 2005; Roufail, Soulis, Boel, Cooper, & Rees, 1998). Παρόλα αυτά, δεν έχει διαπιστωθεί εάν τα συγκεκριμένα αυτά κύτταρα υφίστανται τη διαδικασία της απόπτωσης.

Τα κύτταρα γλοίας παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών. Επιπλέον, χρησιμεύουν ως ρυθμιστές της συναπτικής διαβίβασης και βοηθούν στη διατήρηση ενός ομοιοστατικού περιβάλλοντος για τους νευρώνες (Newman & Reichenbach, 1996). Η λειτουργία των γλοιακών κυττάρων επηρεάζεται στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια όπως και στο γλαύκωμα, όπως φαίνεται από την αλλαγή στην GFAP (glial fibrillary acidic protein) ανοσοδραστικότητα



(Barber, Antonetti, & Gardner, 2000; Rungger-Brändle, Dosso, & Leuenberger, 2000; Tanihara et al., 1997), από τη διαταραχή στο μεταβολισμό του γλουταμινικού οξέος (Lieth et al., 1998; Lieth, LaNoue, Antonetti, & Ratz, 2000),

αλλά και την ενεργοποίηση της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή σε in vivo μοντέλα των ασθενειών αυτών (Naskar, Wissing, & Thanos, 2002; Zeng et al., 2000). Έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα Müller δεν εκφράζουν σε κανονικές συνθήκες τη GFAP και το κύριο συστατικό του κυτταροσκελετού τους είναι η βιμεντίνη. Διάφορες παθήσεις του αμφιβληστροειδή, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και το γλαύκωμα προκαλούν μη ειδική απάντηση από τα κύτταρα αυτά και επάγουν την έκφραση της GFAP (Eddleston & Mucke, 1993; Tanihara et al., 1997; Zeng et al., 2000).

vii. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Ο αμφιβληστροειδής είναι μέρος του ΚΝΣ και, όπως ο εγκέφαλος, δεν είναι ικανός να αναπληρώσει μεγάλης έκτασης 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 και η υαλωδοεκτομή. Προσφατα, 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, βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές. 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 (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 να 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, Gillies, & Wong, 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

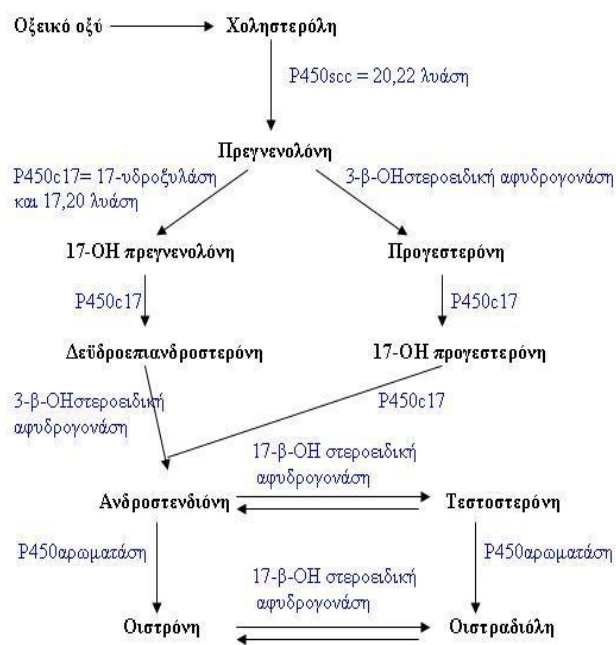
νευροπροστατευτική δράση σε ζωικά μοντέλα διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Shen, Zhong, Xie, Cheng, & Jiao, 2010; Steinle, 2010; Tao, 2006). Μάλιστα ο NGF έχει δειχθεί ότι προστατεύει τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς ακόμα και όταν χορηγείται σε σταγόνες σε μοντέλα γλαυκώματος και διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε αρουραίους (Colafrancesco, Coassin, Rossi, & Aloe, 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 βραχύινα κύτταρα (Szabadfi et al., 2012). Νευροπροστατευτικές δράσεις φαίνεται ότι παρουσιάζουν και τα νευροστεροειδή, όπως η DHEA, τα οποία θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

viii. Νευροστεροειδή – DHEA και BNN27

Με τον όρο νευροστεροειδή χαρακτηρίζουμε τα στεροειδή τα οποία συντίθενται, ανεξάρτητα από τις ενδοκρινολογικές πηγές του περιφερειακού νευρικού συστήματος (ΠΝΣ), και *de novo* στο ΚΝΣ και συσσωρεύονται στον εγκέφαλο. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τις αντιαποπτωτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα νευροστεροειδή. Ο όρος 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 (Copréchet, Robel, Axelson, Sjövall, & Baulieu, 1981). Επιπλέον οι συγκεντρώσεις των εν λόγω στεροειδών παρέμεναν υψηλές ακόμα και μετά από γοναδεκτομή ή επινεφριδιοτομή, γεγονός που υποδηλώνει είτε τη *de novo* σύνθεσή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα, είτε τη συγκέντρωσή τους σε δομές του νευρικού συστήματος μετά την παραγωγή τους στους ενδοκρινείς αδένες (Baulieu, 1997). 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).

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται έχοντας ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη και χαρακτηρίζονται από παρόμοιες χημικές δομές. Μικρές διαφοροποιήσεις στη δομή με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων καθορίζουν τα στάδια σύνθεσης των στεροειδών και τις διαφορές στη λειτουργία τους. Έτσι το είδος του στεροειδούς που παράγεται σε ένα κύτταρο εξαρτάται και από τη συγκέντρωση διαφορετικών ενζύμων στο κύτταρο αυτό (Vander, Sherman, & Luciano, 2001). Ο σκελετός των στεροειδών σχηματίζεται από τέσσερις συνδεδεμένους δακτυλίους ατόμων άνθρακα, ενώ στη δομή τους συνδέονται και αρκετές υδροξυλομάδες. Η σύνθεση των στεροειδών και



συγκεκριμένα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA), πραγματοποιείται από τη χοληστερόλη, μέσω της πρεγνεολόνης όπως φαίνεται στην εικόνα αριστερά. Μαζί με το θεικό εστέρα της (DHEAS) αποτελούν τα πιο άφθονα στεροειδή στον άνθρωπο. Η μετατροπή της DHEA σε DHEAS είναι αντιστρέψιμη κι αυτή η αλληλομετατροπή συμβαίνει συνεχώς· επομένως

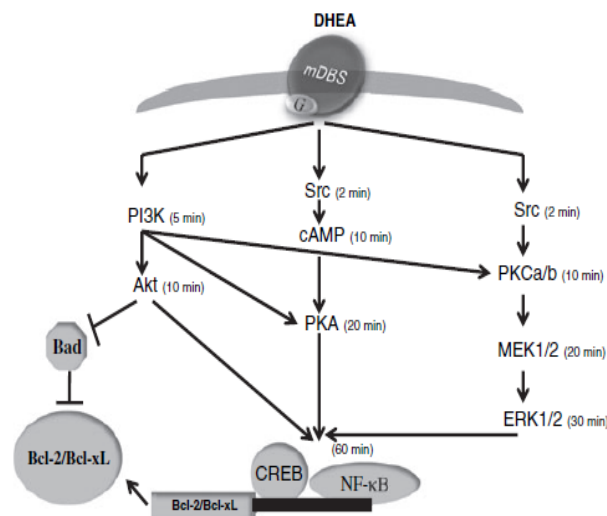
είναι δύσκολο να αναφερθούμε στη μία χωρίς την άλλη, για αυτό συχνά αναφέρονται ως DHEA(S). Ωστόσο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η DHEA(S) ανήκει επίσης και στην ομάδα των νευροστεροειδών, αφού συντίθεται de novo στο ΚΝΣ. Τα επίπεδα της ξεπερνούν τα αντίστοιχα αυτής στο ΠΝΣ, γεγονός που υποδηλώνει τη σημαντικότητα της διαλεύκανσης του ρόλου της στο ΚΝΣ. Η παρουσία της υδροξυστεροειδούς σουλφονοτρανσφεράσης στον εγκέφαλο, το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της DHEA στο θεικό της εστέρα, υποδηλώνει ότι μπορεί με ευκολία να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μετατρέπεται τοπικά σε DHEAS (Aldred & Waring, 1999). Αντίστοιχα, και η παρουσία της σουλφατάσης που καταλύει την αντίθετη πορεία, είναι ευρεία στο ΚΝΣ και η φαρμακευτική αναστολή

της φαίνεται ότι επιδρά στη μνήμη (Rhodes, Li, Burke, & Johnson, 1997). Τα επίπεδα της DHEA παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ζωής και το μέγιστο των επιπέδων της στον άνθρωπο και στο κεντρικό, αλλά και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, είναι στην ηλικία των 20 με 25 ετών. Στη συνέχεια μειώνονται σταδιακά κατά ένα ποσοστό της τάξης του 70-80% μέχρι την ηλικία των 70-80 χρόνων. Λόγω της μείωσης αυτής, τα επίπεδα του νευροστεροειδούς έχουν συσχετιστεί με την αιτιολογία νόσων όπως το Alzheimer's που περιλαμβάνουν εκφύλιση των νευρώνων (Charalampopoulos, Remboutsika, Margioris, & Gravanis, 2008; Kroboth, Salek, Pittenger, Fabian, & Frye, 1999).

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 (Herd, Belelli, & Lambert, 2007; Hosie, Wilkins, da Silva, & Smart, 2006; Majewska, Harrison, Schwartz, Barker, & Paul, 1986; Puia et al., 1990), οι NMDA (Wu, Gibbs, & Farb, 1991) και οι σ υποδοχείς (Maurice, Junien, & Privat, 1997), ενώ η PREG δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής των GABA_A υποδοχέων (Majewska, Bisserbe, & Eskay, 1985; Rabow, Russek, & Farb, 1995) και των AMPA υποδοχέων (Shirakawa, Katsuki, Kume, Kaneko, & Akaike, 2005; Wu & Chen, 1997), ενώ είναι θετικός ρυθμιστής των NMDA υποδοχέων (Bowlby, 1993; Horak, Vlcek, Petrovic, Chodounska, & Vyklicky, 2004). Τα νευροστεροειδή φαίνεται να έχουν ένα πολύ ευρύ φάσμα δυναμικών θεραπευτικών χρήσεων σε καταστάσεις όπως η επιληψία (Reddy & Rogawski, 2009) και τα εγκεφαλικά τραύματα (traumatic brain injury) (Dubrovsky, 2005; Morrow, 2007), καθώς και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Σε ό,τι αφορά τις νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ρυθμίζονται μέσω πρόσδεσής της σε υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται με G πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων προκαλεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί στην επιβίωση των κυττάρων. Το υποθετικό

μοντέλο των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται με την πρόσδεση της DHEA φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



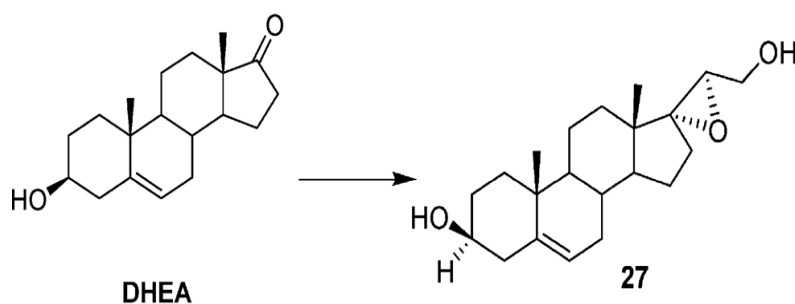
Εικόνα: α) Φωσφορυλίωση των κινασών Src/PKCα/b/MEK1/2/ERK1/2 και ενεργοποίηση των CREB και NF-κΒ, μεταγραφικών παραγόντων επιβίωσης που ελέγχουν θετικά την έκφραση των αποπτωτικών Bcl-2 γονιδίων, β) φωσφορυλίωση των κινασών PI3K/Akt, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών Bad πρωτεϊνών και φωσφορυλίωση του CREB, και γ) αύξηση του cAMP ενδοκυτταρικά, ενεργοποίηση της PKA κινάσης και ακόλουθη φωσφορυλίωση του CREB (Charalampopoulos, Margioris, & Gravanis, 2008).

Η DHEA μπορεί να λειτουργήσει όπως ο νευροτροφικός παράγοντας NGF σε ό,τι αφορά τις αντι-αποπτωτικές του ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος των επινεφριδίων που εκφράζουν λειτουργικές μορφές των υποδοχέων του NGF, TrkA και p75NTR, απαλοιφή της έκφρασης του TrkA ανέστειλε την αντι-αποπτωτική δράση του NGF και της DHEA και μείωσε την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Στην κυτταρική σειρά που εξέφραζε μόνο τον υποδοχέα p75NTR, επίδραση με NGF ή DHEA προήγαγε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, ο οποίος αναστέλλεται με συν-έκφραση του TrkA υποδοχέα. Με την ταυτοποίηση της ειδικής πρόσδεσης της DHEA με τους υποδοχείς TrkA και p75NTR σε *in vivo* και *ex vivo* πειράματα, αποδείχθηκε ότι η έλλειψη του NGF σε συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς νευρώνες μπορεί να αντισταθμιστεί από τη DHEA, καθώς μειώνεται ο αποπτωτικός θάνατος. Επομένως το νευροστεροειδές αυτό μπορεί να δρα ως νευροτροφικός παράγοντας (Lazaridis et al., 2011). Γίνεται έτσι αντιληπτό ότι αυτή η ικανότητα της DHEA δίνει πολύ σημαντικές ελπίδες για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών που ταλαιπωρούν μεγάλο μέρος του πληθυσμού.

Στον αμφιβληστροειδή, το πιο διαδεδομένο νευροστεροειδές είναι η προγνεβολόνη (PREG) (Guarneri et al., 1994) και ακολουθούν η προγεστερόνη (PROG) και η DHEA (Lanthier & Patwardhan, 1988), καθώς και οι θεικοί τους εστέρες. Ο θειικός εστέρας της DHEA και η 17β-εστραδιόλη προστατεύουν τα γαγγλιακά κύτταρα σε

καταστάσεις ισχαιμίας (Bucolo & Drago, 2004). Επιπλέον, ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται λόγω τοξικών συγκεντρώσεων NMDA μειώνεται μετά από χορήγηση της DHEA(S) και της PROG, ενώ αναστέλλεται τελείως μετά από χορήγηση 17 α -εστραδιόλης (Guarneri et al., 2003). Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι ο NGF και η DHEA δρουν ως νευροπροστατευτικά στον αμφιβληστροειδή σε καταστάσεις AMPA διεγερσι-τοξικότητας. Θεραπεία με ενδοφθάλμια χορήγηση DHEA ή NGF έδειξε να προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, μέσω χρήσης αναστολέων για τον υποδοχέα TrkA, φάνηκε ότι και στον αμφιβληστροειδή η DHEA ασκεί τις νευροπροστατευτικές δράσεις της μέσω του υποδοχέα του NGF (Kokona, Charalampopoulos, Pediaditakis, Gravanis, & Thermos, 2012). Η DHEA χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο και για μελέτες στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια στο STZ-μοντέλο σε αρουραίους όπου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά για 7 συνεχόμενες ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι προστατεύει τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και συγκεκριμένα, τύπους αμακρινικών και γαγγλιακά κύτταρα καθώς και μειώνει την αυξημένη έκφραση της GFAP από τα γλοιακά κύτταρα (Koulakis et al., unpublished data).

Παρά τις σημαντικές νευροπροστατευτικές ιδιότητες της DHEA, σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες, όλα τα νευροστεροειδή όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, μεταβολίζονται στον άνθρωπο σε ανδρογόνα και οιστρογόνα. Αυτό μπορεί να προκαλέσει σημαντικές ενδοκρινολογικές παρενέργειες όπως ορμονο-εξαρτώμενες νεοπλασίες γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους. Έτσι, το ενδιαφέρον εστιάζεται σε συνθετικά ανάλογα των νευροστεροειδών ώστε να αποκτήσουμε γνώσεις για τη δομή και τη λειτουργία τους συγκριτικά με τα νευροπροστατευτικά παράγωγά τους. Η σύνθεση αναλόγων της DHEA πραγματοποιήθηκε από την ομάδα της Calogeropoulou και αξιολογήθηκαν για τη δυνατότητα χορήγησής τους σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Τα ανάλογα αυτά παρουσιάζουν τροποποιήσεις στον άνθρακα 17 ώστε να μην είναι δυνατός ο μεταβολισμός τους σε ανδρογόνα ή

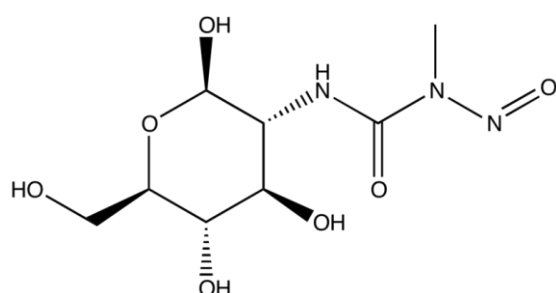


οιστρογόνα όπως φαίνεται στην εικόνα. Σε συνθήκες τροφικής υστέρησης, το ανάλογο BNN27 είναι

ικανό να προστατεύσει κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (PC12), με καταστολή της έκφρασης προ-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, δράση όμοια με αυτή της DHEA (Calogeropoulou et al., 2009).

ix. STZ-Μοντέλο για την πρόκληση του διαβήτη

Διάφορα μοντέλα για την πρόκληση του διαβήτη έχουν προταθεί με το μοντέλο της ένεσης με στρεπτοζοτοκίνη (STZ) να είναι το ευρέως χρησιμοποιούμενο. Η

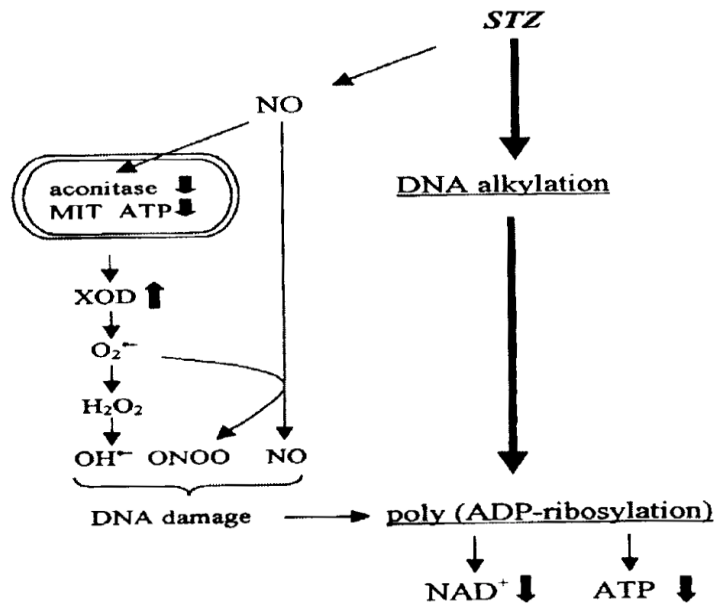


στρεπτοζοτοκίνη 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) συντίθεται από το μικροοργανισμό *Streptomyces achromogenes* και μπορεί να προκαλέσει σε πειραματόζωα και τον εξαρτώμενο, αλλά και τον μη

εξαρτώμενο από ινσουλίνη τύπο διαβήτη. Χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά αλλά και ενδοφλέβια σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Καταστρέφει επιλεκτικά β-κύτταρα του παγκρέατος, επηρεάζοντας τα επίπεδα ινσουλίνης και γλυκόζης στο αίμα. Δημιουργείται έτσι ένα μοντέλο κατάλληλο για τη μελέτη των βραχέων αλλά και μακρόχρονων συνεπειών που επιφέρει η νόσος, αλλά και θεραπευτικών μηχανισμών (Szkudelski, 2001).

Δύο ώρες μετά την ένεση με στρεπτοζοτοκίνη παρατηρείται υπεργλυκαιμία και μείωση των επιπέδων ινσουλίνης στο αίμα. Περίπου έξι ώρες αργότερα τα επίπεδα ινσουλίνης ανεβαίνουν απότομα και έχουμε υπογλυκαιμία. Τελικά, τα επίπεδα μειώνονται σε μεγάλο βαθμό με την υπεργλυκαιμία να διατηρείται. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται λόγω μη φυσιολογικής λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος (West, Simon, & Morrison, 1996). Η στρεπτοζοτοκίνη μεταφέρεται στα κύτταρα αυτά μέσω του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT2.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα πεθαίνουν κυρίως λόγω αλκυλίωσης του DNA (Elsner, Guldbakke, Tiedge, Munday, & Lenzen, 2000). Η ζημιά στο DNA προκαλείται από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) της ένωσης που απελευθερώνεται όταν η STZ μεταβολίζεται μέσα στο κύτταρο (Kröncke, Fehsel, Sommer, Rodriguez, & Kolb-Bachofen, 1995), καθώς και από ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) από τη δράση της STZ στα μιτοχόνδρια (Takasu, Komiya, Asawa, Nagasawa, & Yamada, 1991). Στην εικόνα φαίνεται αναλυτικά οι δράσεις της στρεπτοζοτοκίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος (MIT: μιτοχόνδρια, XOD: xanthine oxidase) (Szkudelski, 2001).



2. Σκοπός της Μελέτης

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.

Έπειτα από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου για το ρόλο της DHEA στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Koulakis et al., unpublished data), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δρα ως νευροπροστατευτικό και είναι ικανή να αντιστρέψει, ως ένα σημείο, τις επιπτώσεις στα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς του αρουραίου. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του νευροστεροειδούς συνθετικού αναλόγου της DHEA, BNN27, το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω του ότι δεν υφίσταται το μεταβολισμό σε οιστρογόνα ή ανδρογόνα. Είναι επομένως απαραίτητο να μελετηθεί ο ρόλος και του αναλόγου αυτού ως νευροπροστατευτικό στο μοντέλο του επαγόμενου από στρεπτοζοτοκίνη διαβήτη σε Sprague-Dawley αρουραίους. Η εύρεση μιας ουσίας ικανής να αντιμετωπίσει την προοδευτική απώλεια των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς θα αποτελέσει σημαντική εξέλιξη στις προσπάθειες θεραπείας ασθενειών όπως το γλαύκωμα και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.

3. Υλικά και Μέθοδοι

i. Πειραματόζωα

Για τα πειράματα της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι αρσενικοί και θηλυκοί Sprague–Dawley αρουραίοι, με τα βάρη τους να κυμαίνονται από 180-230 g. Τα ζώα διέμεναν, ένα σε κάθε κλουβί, σε δωμάτιο ζωοκομείου με σταθερή θερμοκρασία στους 22 °C, φωτοπερίοδο 12h και ad libitum πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα κλουβιά διατηρούνταν πάντα καθαρά με πολύ συχνό πλύσιμο και αλλαγή στο πριονίδι. Η θανάτωσή τους γινόταν με παρατεταμένη εισπνοή διαιθυλαιθέρα. Όλες οι διαδικασίες των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε συμφωνία με τις διατάξεις του ARVO (Association in Research for Vision and Ophthalmology) για τη χρήση των πειραματόζωων στην έρευνα και τις διατάξεις του ελληνικού κράτους (Animal Act, P.D. 160/91).



Εικόνα: Ένα από τα Sprague-Dawley rats που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (αριστερά) και η θανάτωση των ζώων με διαιθυλαιθέρα (δεξιά)

ii. Πρόκληση του Διαβήτη

Τα ζώα γίνονταν διαβητικά με μία ένεση στρεπτοζοτοκίνης (STZ) (70mg/kg σε 500μl citrate buffer) η οποία πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (IP), αφού πρώτα υποβλήθηκαν σε μία περίοδο νηστείας για 12 ώρες με πρόσβαση μόνο σε νερό. Η στρεπτοζοτοκίνη είναι μία χημική ουσία που καταστρέφει τα κύτταρα του παγκρέατος που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης. Είναι φωτοευαίσθητη ουσία, η ζύγισή της πραγματοποιείται σε χαμηλά επίπεδα φωτισμού και η διάλυσή της στο buffer πραγματοποιείται το νωρίτερο μερικά λεπτά πριν τη

χορήγησή της στο ζώο. Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ως controls έλαβαν την ένεση η οποία περιείχε μόνο το buffer (500μl). Η εμφάνιση του διαβήτη παρατηρήθηκε μέσα σε μία εβδομάδα από τη χορήγηση της ένεσης με την εμφάνιση των κοινών συμπτωμάτων της ασθένειας τα οποία είναι η πολυουρία, η πολυδιψία και η πολυφαγία. Μετρήσεις κατανάλωσης νερού σε ογκομετρημένα μπουκάλια των 500ml και αλλαγής στο βάρος των διαβητικών ζώων σε σύγκριση με τα controls, πραγματοποιούνταν για κάθε εβδομάδα και η ύπαρξη της ασθένειας επιβεβαιώθηκε τελικά έπειτα από τις 4 εβδομάδες με τις μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης. Τα επίπεδα αυτά υπολογίζονταν με χρήση ενός απλού μηχανήματος μέτρησης της γλυκόζης στο αίμα. Μετρήσεις γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν κατά την έναρξη του πειράματος, έπειτα από 4 εβδομάδες πριν τη χορήγηση του νευροστεροειδούς, κι έπειτα από 5 εβδομάδες μετά τη χορήγησή του και πριν τη θανάτωση των ζώων. Τα ζώα μεταφέρονταν ένα ένα στο χειρουργείο για την αποφυγή της πρόκλησης αυξημένου stress και ακινητοποιούνταν. Με ένα νυστέρι πραγματοποιούνταν μία μικρή τομή στην ουρά τους ώστε να γίνει η συλλογή μικρής ποσότητας αίματος και να μετρηθούν τα επίπεδα της γλυκόζης σε αυτό. Οι αρουραίοι με τα επίπεδα της γλυκόζης τους να είναι >300-350mg/dl καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος θεωρούνταν διαβητικοί ενώ τα ζώα που είναι υγιή έχουν επίπεδα που κυμαίνονται περίπου στα 60 με 120mg/dl.

iii. Χορήγηση Νευροστεροειδούς

Τα ζώα διατηρούνταν για 4 εβδομάδες από την ημέρα της ένεσης ως διαβητικά. Κατά τη διάρκεια της πέμπτης εβδομάδας έλαβαν το νευροστεροειδές ανάλογο της DHEA, BNN27, ώστε να μελετηθεί η ύπαρξη νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων στον αμφιβληστροειδή. Η BNN27 χορηγήθηκε και πάλι με ενδοπεριτοναϊκές (IP) ενέσεις διαλυμένη σε νερό και αιθανόλη (10mg/kg σε 20μl EtOH+180μl water for injection). Οι αρουραίοι έλαβαν συνολικά 7 ενέσεις για 7 συνεχόμενες ημέρες. Τελικά δημιουργήθηκαν 3 ομάδες ζώων : η ομάδα με τα ζώα-μάρτυρες δηλαδή τα μη διαβητικά ζώα (control), η ομάδα με τα διαβητικά ζώα στα οποία δε χορηγήθηκε το ανάλογο της DHEA (vehicle), και η ομάδα με τα διαβητικά ζώα τα οποία έλαβαν το BNN27 (STZ+BNN27). Παρόλα αυτά, επειδή έπρεπε να τηρηθούν οι ίδιες συνθήκες για όλα τα ζώα και τα ίδια επίπεδα stress, και στις 3 ομάδες αρουραίων

πραγματοποιήθηκαν οι 7 ενέσεις. Οι μάρτυρες και τα vehicle έλαβαν μόνο το διάλυμα νερού και αιθανόλης χωρίς το νευροστεροειδές.

iv. Απομόνωση και Επεξεργασία Αμφιβληστροειδούς

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την τελευταία ένεση τα ζώα θανατώθηκαν με εισπνοή διαιθυλαιθέρα. Τα μάτια αφαιρέθηκαν, καθαρίστηκαν και απομονώθηκε το eyecup δηλαδή ο οπίσθιος πόλος με το σκληρό, τον χοριοειδή και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, με απομάκρυνση του εμπρόσθιου πόλου (κερατοειδής χιτώνας, υαλώδες υγρό και κρυσταλλοειδής φακός). Τα eyecups μονιμοποιήθηκαν για μία ώρα σε 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA) σε 0.1 M phosphate buffer (PB) στους 4°C. Μετά τη μία ώρα, ξεπλύθηκαν με το buffer και επώστηκαν overnight (16-18h) σε 30% σουκρόζη στους 4°C για κρυοπροστασία. Την επόμενη μέρα οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ισοπεντάνιο στους 45°C (σε ξηρό πάγο) για 1 λεπτό για να πραγματοποιηθεί ταχεία ψύξη αυτών και φυλάχθηκαν στους -80°C ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα για τομές στην κρυοτόμο.



Εικόνα: Η κρυοτόμος της Leica που χρησιμοποιήθηκε για το sectioning των ιστών

v. Ζελατινοποίηση Αντικειμενοφόρων Πλακών

Οι αντικειμενοφόροι 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 μερικές φορές. Το διάλυμα αποτελείται από ζελατίνη (G-9382, ~ 300 Bloom) και Chrom Alum (AlCrO_3) διαλυμένα σε απιονισμένο νερό. Έπειτα από τη

βύθιση, οι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν overnight στους 37 °C και ήταν έτοιμες για τη χρήση τους στην κρυτόμο μετά από 16-18h.

vi. Ανοσοϊστοχημικές Μελέτες

Η κρυτόμος αφέθηκε για μερικά λεπτά να έρθει σε θερμοκρασία -25 °C που είναι η θερμοκρασία που χρειάζεται για τη λήψη των τομών. Τα eyecups τοποθετήθηκαν κάθετα στην κρυτόμο (Leica) με χρήση του optimal cutting temperature (OCT) για τη στερέωσή τους και έγινε η λήψη των τομών πάχους 10μm. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις τομές φυλάσσονται στους -20 °C για να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα. Δέκα πλακάκια χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε μάτι με εννέα τομές πάνω σε κάθε πλακάκι. Οι τομές λαμβάνονται με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε πλακάκι να καλύπτεται ένα μεγάλο μέρος από τον αμφιβληστροειδή. Οι πλάκες χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες έτσι ώστε να παρατηρηθεί η επίδραση του διαβήτη στον αμφιβληστροειδή και ο πιθανός νευροπροστατευτικός ρόλος του αναλόγου της DHEA, BNN27. Για τη μελέτη της επίδρασης αυτής στους διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων του αμφιβληστροειδή χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για διάφορους αμφιβληστροειδικούς δείκτες.

Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε μύες για την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης [Choline acetyl transferase (ChAT, 1:300), Biotrend, Cologne, Germany] χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των χολινεργικών βραχύνων κυττάρων. Πολυκλωνικό αντίσωμα, ανεπτυγμένο σε λαγό ενάντια στη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου [(brain nitric oxide synthetase, (bNOS 1:2000), Sigma, St. Louis, MO], χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για τα βραχύνα κύτταρα του αμφιβληστροειδή που περιέχουν τη συνθετάση αυτή. Με σκοπό την παρατήρηση των αλλαγών στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε μύες ενάντια στο neurofilament (NFL, 1:500), χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των αξόνων των κυττάρων αυτών. Το πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε λαγό για την glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:400, Cambridge, United Kingdom), πρωτεΐνη που εκφράζεται στα κύτταρα γλοίας του αμφιβληστροειδή για τη μελέτη της επίδρασης του διαβήτη και της θεραπείας με το ανάλογο στα κύτταρα αυτά. Τέλος, με την παρατήρηση σημαντικών αλλαγών κυρίως στα βραχύνα κύτταρα της έσω πυρηνικής στιβάδας (inner nuclear layer, INL), κάποιες ανοσοϊστοχημικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με ένα αντίσωμα

ανεπτυγμένο σε λαγό για την κασπάση-3 (Cleaved Caspase-3, 1:350), ένα μέλος της οικογένειας των κασπασών με λειτουργία πρωτεάσης [cysteine-aspartic acid protease, (Caspase) family], ώστε να υπολογιστεί το αποπτωτικό επίπεδο των κυττάρων του αμφιβληστροειδή στις 3 ομάδες των πειραματόζων.

Η διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας περιγράφεται αναλυτικά ως εξής:

Τα πλακάκια με τις τομές που πήραμε από την κρυοτόμο αφήνονται να ξεπαγώσουν από τους -20°C που ήταν φυλαγμένα για περίπου μισή ώρα. Έπειτα, ξεπλένονται δύο φορές για 10 λεπτά με 0.1M TBS (Tris buffer saline), pH 7.4, για την απομάκρυνση του optimal cutting temperature (OCT). Για να αποκλειστεί η περίπτωση της μη ειδικής πρόσδεσης του δεύτερου αντισώματος, οι τομές επωάζονται για 30 λεπτά σε TBS containing 3,3% Normal Goat Serum (NGS). Μετά από 3 ξεπλύματα των 5 λεπτών με TBS, προστίθεται το πρώτο αντίσωμα στην αραιώση που πρέπει, σε TBS που περιέχει 0,5% NGS και 0,3% Triton X-100 και οι τομές αφήνονται overnight σε θερμοκρασία δωματίου (16-18h). Την επόμενη ημέρα, το αντίσωμα ξεπλένεται (3 ξεπλύματα με TBS για 5 λεπτά) και οι τομές επωάζονται για 2 ώρες με το δευτερογενές αντίσωμα, Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (H+L) (1:400, Molecular Probes, Eugene, USA) για τα αντισώματα ChAT και NFL ή Alexa Fluor546 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:400, Molecular Probes, Eugene, USA) για τα αντισώματα bNOS, GFAP και Caspase-3. Τελικά, οι τομές ξεπλένονται 3 φορές από 5 λεπτά με TBS, τα πλακάκια καλύπτονται με fluorescent mounting medium και καλυπτρίδες, και αφήνονται να στεγνώσουν για να γίνει η παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

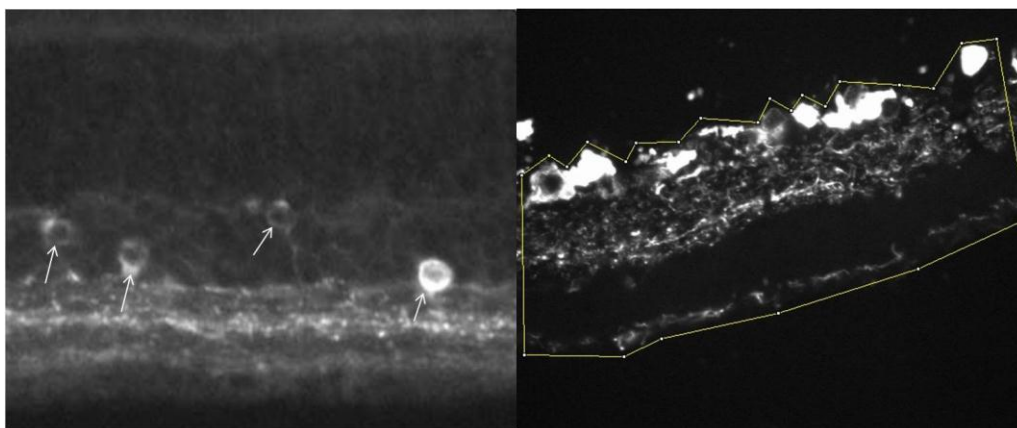
vii. Μικροσκοπία

Η λήψη εικόνων από το μικροσκόπιο φθορισμού έγινε με κάμερα (Axioskop with Plan-Neofluar $\times 40/0.75$; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) και z-axis ανάλυση του 1.1 μm διαμέσου των ανοσοσημασμένων κυττάρων. Οι προσαρμογές φωτεινότητας και αντίθεσης στις εικόνες, όπως και οποιαδήποτε ανάγκη περιστροφής ή αποκοπής αυτών έγιναν με τη χρήση εμπορικού λογισμικού (Adobe Photoshop ver. 7.0; Adobe Systems, San Jose, CA). Για τις μελέτες απόπτωσης με την κασπάση-3, χρησιμοποιήθηκε επίσης συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο και πραγματοποιήθηκε

συνεντοπισμός του αντισώματος με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) για την ακριβή παρατήρηση των πυρήνων.

viii. Μελέτες ποσοτικοποίησης

Για την ποσοτικοποίηση των bNOS- and ChAT-expressing κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, οι τομές από τους οφθαλμούς είτε των control είτε των ζώων που έλαβαν το ανάλογο BNN27, μελετήθηκαν με x40/0.75 φακό (Axioskop with Plan-Neofluar ×40/0.75; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Μετρήθηκε έτσι ο συνολικός αριθμός των bNOS και ChAT ανοσοδραστικών νευρώνων σε κάθε τομή του αμφιβληστροειδούς. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, 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 κρυοτόμο), ο αριθμός των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες ποσοτικοποίησης ήταν τέσσερις έως εννέα για κάθε πλακάκι που μετρήθηκε. Ο αριθμός των πλακών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση ήταν ίσος με 7 ή παραπάνω για κάθε ομάδα ζώων. Επομένως, ο ελάχιστος αριθμός τομών που εξετάστηκαν ήταν $n=7$ (αριθμός ιστών) \times 4. Σε ό,τι αφορά την ανοσοδραστικότητα με τα αντισώματα GFAP και NFL, η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση των εικόνων από x40/0.75 φακό. Η περιοχή οριοθετήθηκε από τη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων έως την έξω πυρηνική στιβάδα (outer nuclear layer, ONL) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.44p. 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.



Εικόνα: Μέτρηση bNOS-expressing βραχίνιων κυττάρων σε x40 φακό (αριστερά) και επιλογή περιοχής για τον υπολογισμό παραμέτρων όπως το mean gray value στο ImageJ (δεξιά)

ix. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) υπολογιστικού λογισμικού. Χρησιμοποιήθηκε η 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%).

x. Προετοιμασία Διαλυμάτων

- **PB 0,2M:**

2,76gr NaH_2PO_4 + ddH₂O, τελικός όγκος 100ml (δλμ 1)

17,42gr K_2HPO_4 + ddH₂O, τελικός όγκος 500ml (δλμ 2)

δλμ 1 + δλμ 2 → 600ml PB 0,2M

- **PBS 0,1M:**

50ml PB 0,2M + 0,9gr NaCl + ddH₂O, τελικός όγκος 100ml

- **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 55°C + 4 σταγόνες NaOH 4% + ddH₂O, σε τελικό όγκο 50ml. Προσθήκη 50ml PB 0,2M και φιλτράρισμα

- **Gelatin solution** για αντικειμενοφόρους πλάκες:

[5gr gelatin (G-9382, ~ 300 Bloom) + 500ml ddH₂O → ανάδευση στους 62°C] + 0,5gr Chrom Alum (AlCrO₃) → ανάδευση + προσθήκη ddH₂O σε τελικό όγκο 1L

- **Sucrose solution:**

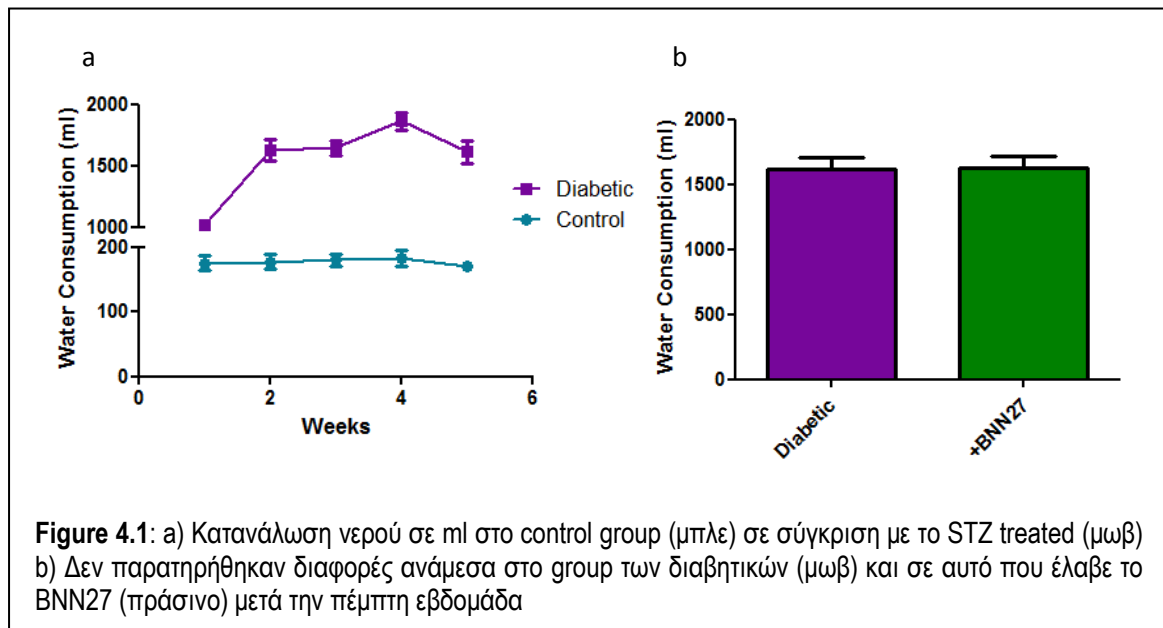
3gr sucrose + PB 0,1M σε τελικό όγκο 10ml

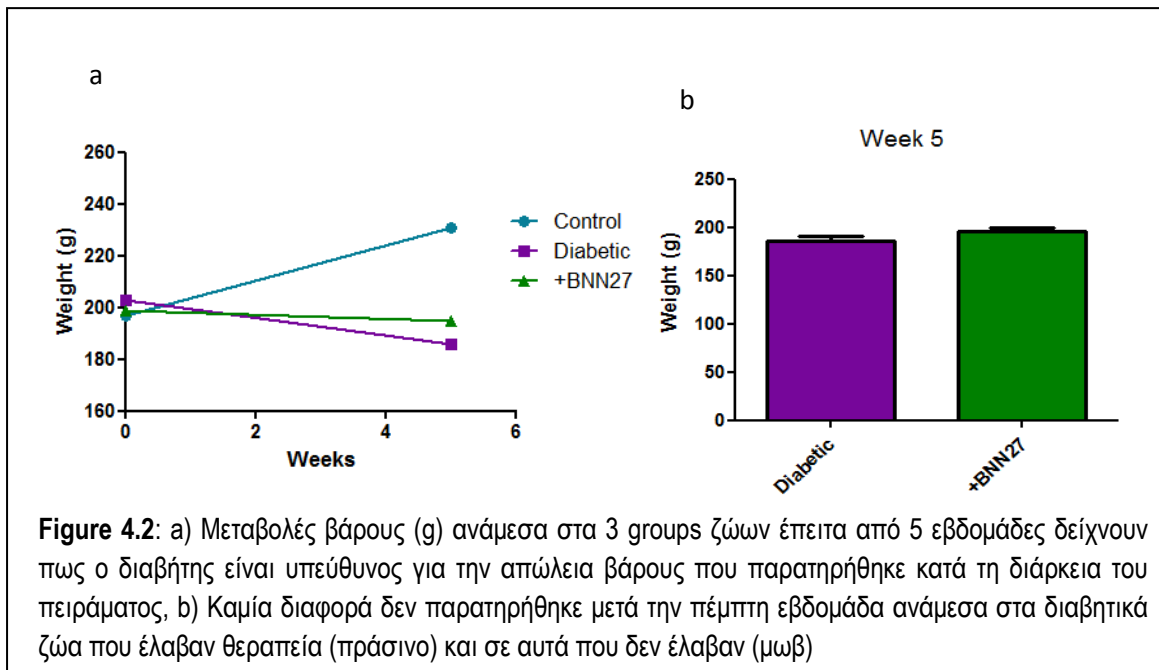
- **Citrate Buffer** pH 4,7:

20ml citric acid (0,1M, MR 210,1) + 30ml sodium citrate (0,1M, MR 294,1) → water for injection σε τελικό όγκο 100ml + φιλτράρισμα

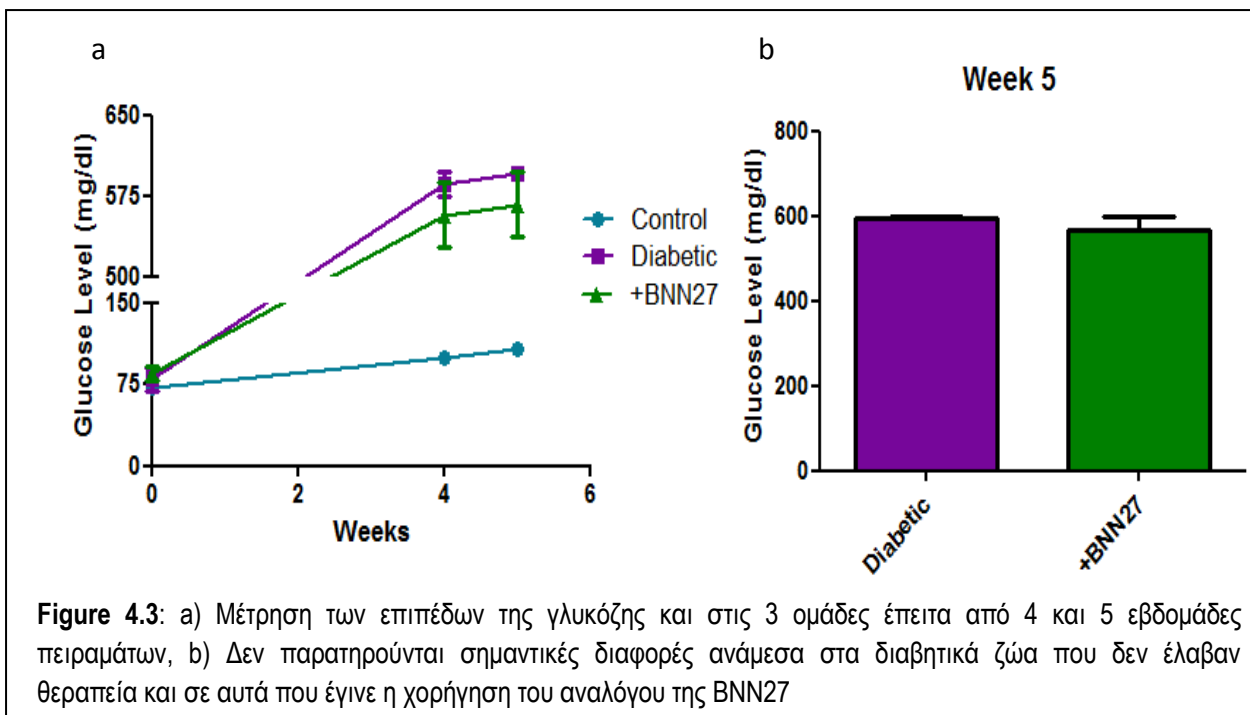
4. Αποτελέσματα

Η επαγωγή του διαβήτη στους αρουραίους παρατηρήθηκε ελέγχοντας κάποια από τα κοινά συμπτώματα της ασθένειας όπως είναι η μεγάλη κατανάλωση του νερού και η απώλεια βάρους. Η κατανάλωση του νερού υπολογιζόταν κάθε δύο ημέρες και κατασκευάστηκε τελικά ένα εβδομαδιαίο διάγραμμα (Fig. 4.1a), το οποίο δείχνει τη διαφορά στο νερό που πίνουν τα control ζώα σε σύγκριση με τα διαβητικά. Παρόλα αυτά, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στα διαβητικά ζώα που έλαβαν θεραπεία την πέμπτη εβδομάδα και σε αυτά που δεν έλαβαν (Fig. 4.1b). Επιπλέον, τα βάρη σημειώνονταν στην αρχή του πειράματος και κάθε εβδομάδα για πέντε εβδομάδες ώστε να επιβεβαιωθεί η απώλεια βάρους στα διαβητικά ζώα. Το control group είχε φυσιολογική άνοδο βάρους μετά από πέντε εβδομάδες ενώ τα διαβητικά ζώα τείνουν να διατηρούν και τελικά να έχουν μείωση στο βάρος τους (Fig. 4.2a). Αυτό παρατηρήθηκε και στο group που έλαβε αλλά και σε αυτό που δεν έλαβε τη θεραπεία με το ανάλογο (Fig. 4.2b).





μύες και το λιπώδη ιστό να παίρνουν τη γλυκόζη από το αίμα και να την αποθηκεύουν ως γλυκογόνο στο συκώτι και στους μύες. Η έλλειψη της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Έτσι, ο διαβήτης χαρακτηρίζεται κυρίως από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η επαγωγή του διαβήτη από το μοντέλο της ένεσης με στρεπτοζοτοκίνη επιβεβαιώθηκε μετρώντας τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα των αρουραίων. Όπως περιγράφηκε και στις μεθόδους, έγινε λήψη μίας μικρής ποσότητας αίματος από μία τομή που έγινε στην ουρά τους. Ζώα με επίπεδα πάνω από 300-350mg/dl θεωρούνται διαβητικά. Τα control ζώα κυμαίνονταν σε 60-120 mg/dl καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος ενώ τα διαβητικά ζώα, την τέταρτη και πέμπτη εβδομάδα, είχαν επίπεδα πάνω από 500mg/dl όπως φαίνεται στη Fig. 4.3a. Η θεραπεία με το BNN27 ανάλογο δεν έχει καμία επίδραση στη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης (Fig 4.3b).

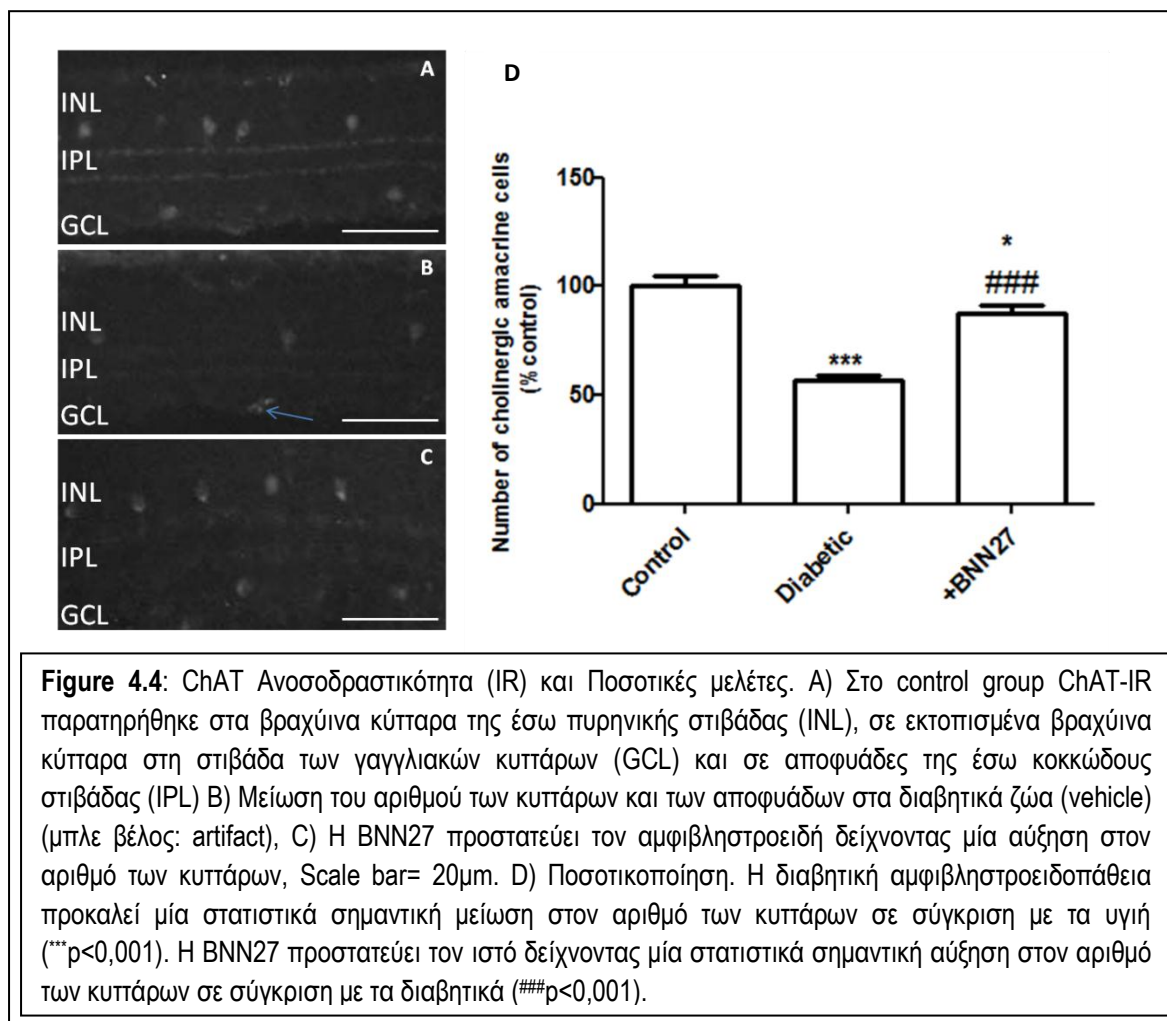


Ανοσοϊστοχημικές και Ποσοτικές μελέτες

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του διαβήτη και της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας στα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα γλοίας του αμφιβληστροειδή, πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες και μελέτες ποσοτικοποίησης. Επιπλέον, επειδή προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει την ύπαρξη του νευροπροστατευτικού ρόλου της DHEA στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου στην περίπτωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, η θεραπεία με ένα ανάλογο της, τη BNN27, εφαρμόστηκε και ερευνήθηκε ο ρόλος του ως νευροπροστατευτικό. Το ανάλογο αυτό στερείται της ιδιότητας της ενδογενούς DHEA να μεταβολίζεται για την παραγωγή οιστρογόνων και ανδρογόνων και η προσπάθεια της εύρεσης ύπαρξης νευροπροστασίας από αυτό είναι σημαντική.

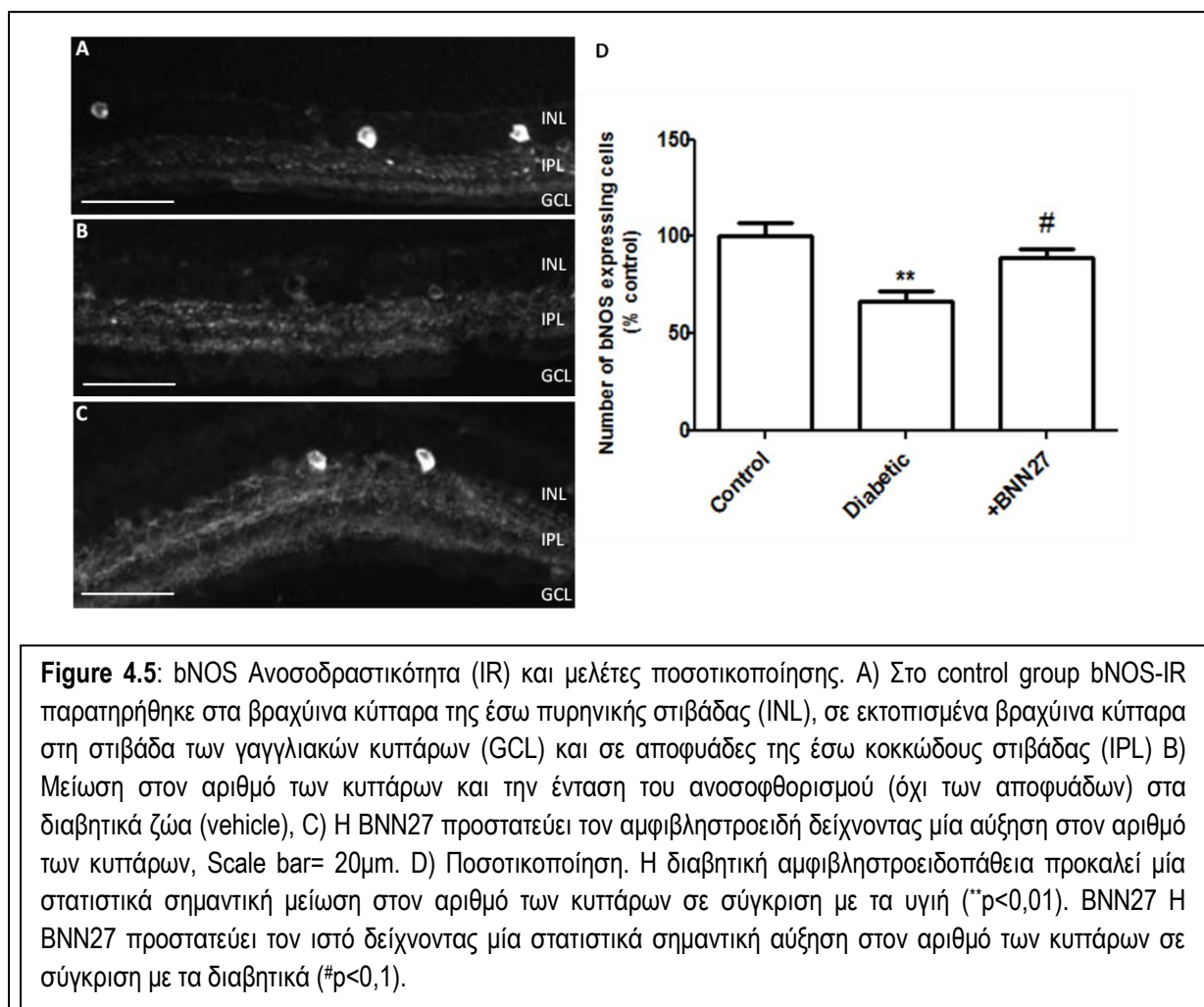
Η ChAT-ανοσοδραστικότητα εντοπίστηκε στα βραχύνια κύτταρα της έσω πυρηνικής στιβάδας (INL), σε εκτοπισμένα βραχύνια κύτταρα στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) και σε αποφυάδες της έσω κοκκώδους στιβάδας (IPL) στους ιστούς του control group (Fig 4.4A, n=9). Η επαγωγή του διαβήτη και της

αμφιβληστροειδοπάθειας με στρεπτοζοτοκίνη προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων αυτών στις INL και GCL όπως επίσης και στα processes στην IPL (Fig.4.4B, n=7). Η θεραπεία με τη BNN27 έδειξε να προστατεύει τον αμφιβληστροειδή και να επαναφέρει αυτή την απώλεια του αριθμού των κυττάρων με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο (Fig.4.4C, n=10). Οι μελέτες ποσοτικοποίησης επιβεβαίωσαν αυτές τις παρατηρήσεις (Fig.4.4D).

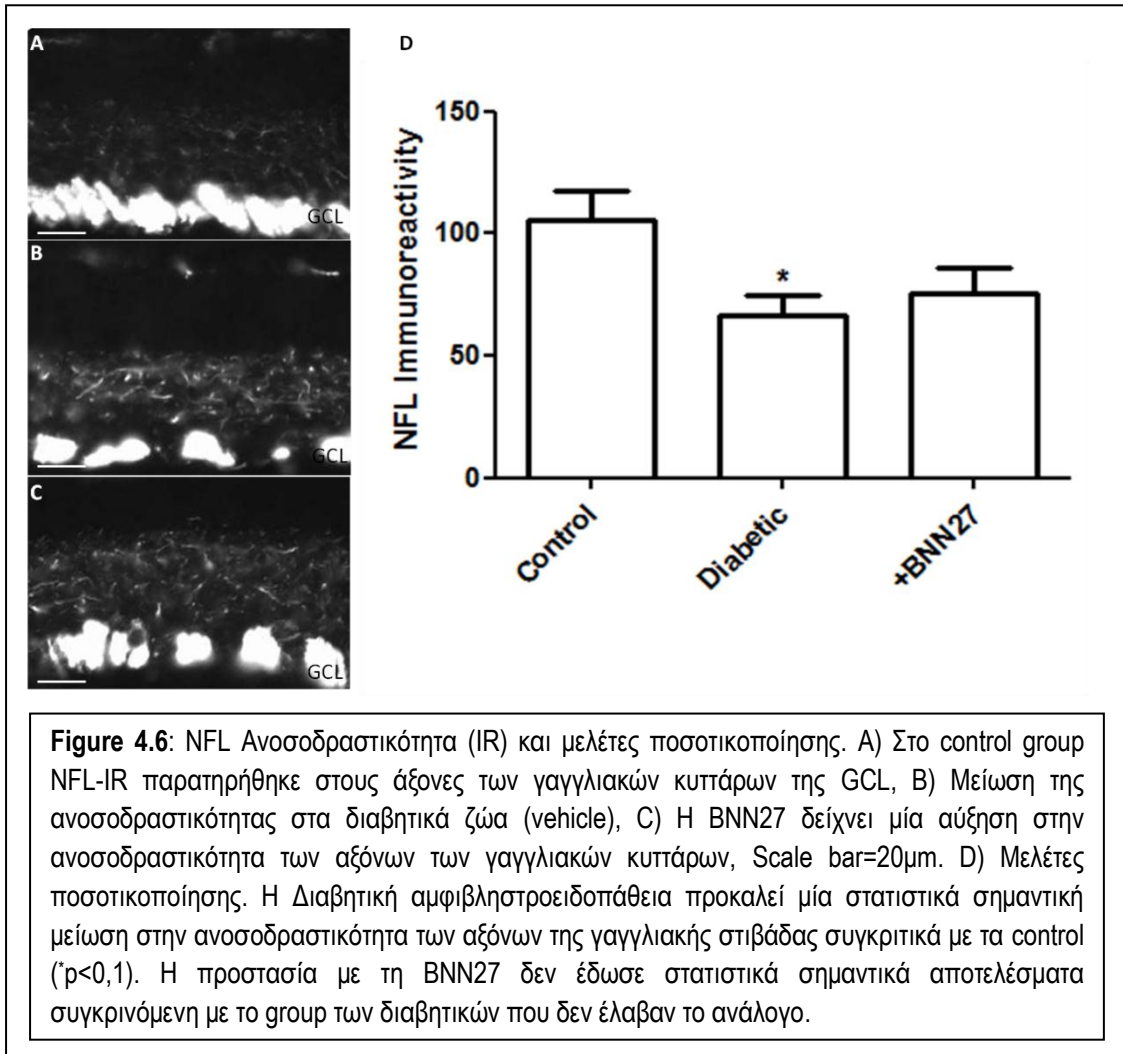


Η bNOS ανοσοδραστικότητα εντοπίστηκε σε βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και βρίσκονται στην έσω πυρηνική στιβάδα (INL), στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) και σε αποφυάδες της έσω κοκκώδους στιβάδας (IPL) στους ιστούς του control group (Fig 4.5A, n=8). Η επαγωγή του διαβήτη και της αμφιβληστροειδοπάθειας με στρεπτοζοτοκίνη προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων αυτών στις INL και GCL χωρίς αξιοσημείωτες διαφορές στην ανοσοδραστικότητα των processes στην IPL

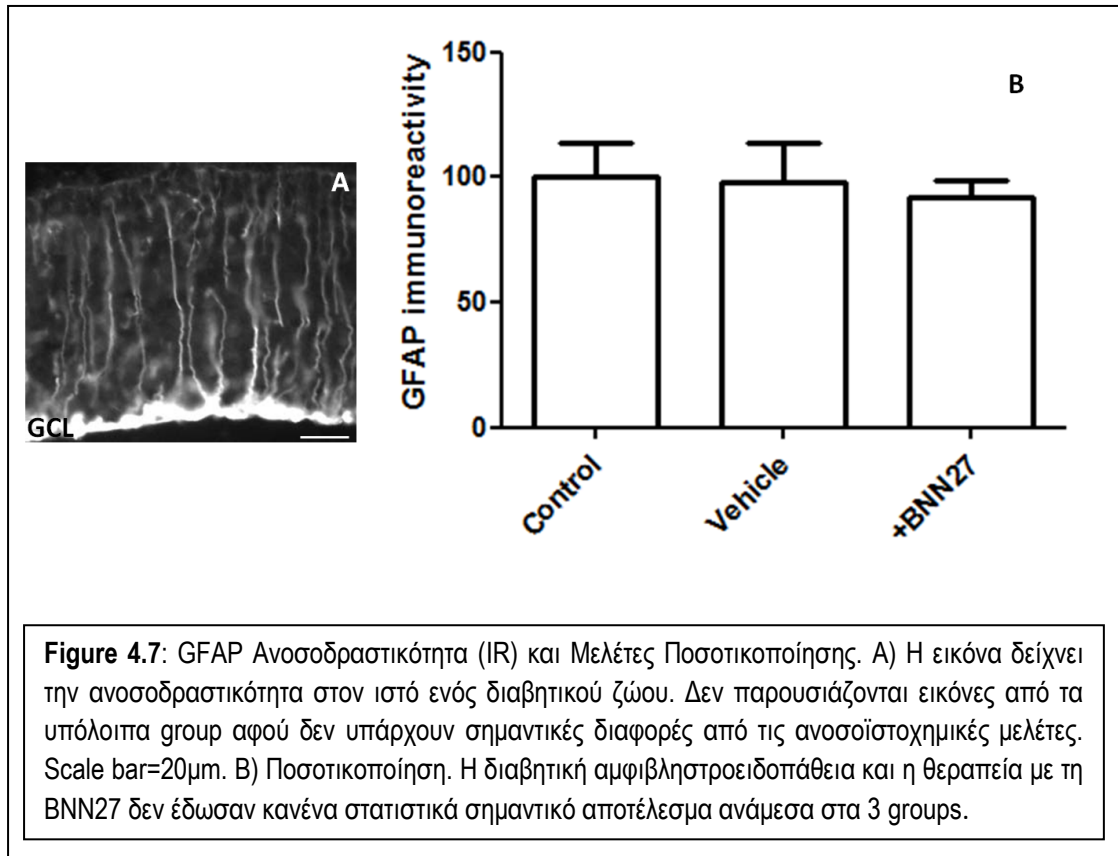
(Fig.4.5B, n=7). Η θεραπεία με τη BNN27 έδειξε να έχει ένα νευροπροστατευτικό ρόλο στον ιστό και επανέφερε την απώλεια των βραχύνων κυττάρων σε σημαντικό βαθμό (Fig.4.5C, n=7). Μελέτες ποσοτικοποίησης έγιναν για να επιβεβαιώσουν αυτές τις παρατηρήσεις (Fig.4.5D).



Η NFL ανοσοδραστικότητα εντοπίστηκε στο neurofilament των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων στη στιβάδα των κυττάρων αυτών (GCL) στο control group (Fig 4.6A, n=10). Η επαγωγή του διαβήτη προκάλεσε μείωση στο σήμα του ανοσοφθορισμού στη στιβάδα (Fig 4.6B, n=7) και ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με το control σύμφωνα με το Dunnett's Multiple Comparison Test. Η θεραπεία με το ανάλογο της DHEA, BNN27, έδειξε μία τάση για αύξηση της ανοσοδραστικότητας στα ζώα που το έλαβαν σε σύγκριση με τα διαβητικά ζώα στα οποία δεν χορηγήθηκε (Fig 4.6C, n=10) όμως, σύμφωνα με τις μελέτες ποσοτικοποίησης, η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική με τη χρήση του Newman-Keuls Multiple Comparison Test (Fig 4.6D).

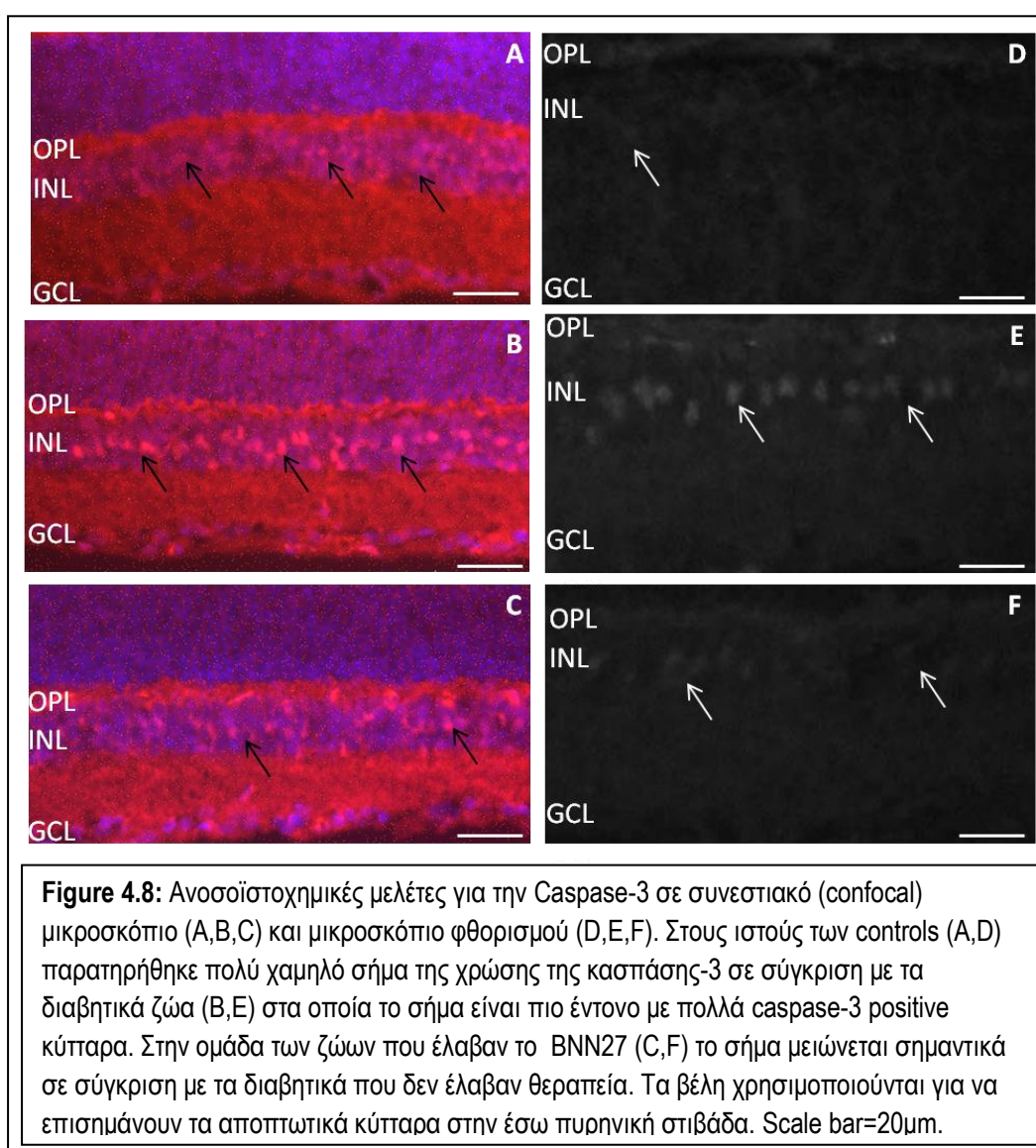


Στις ανοσοϊστοχημείες για την glial fibrillary acidic protein (GFAP) στα κύτταρα γλοίας παρατηρήθηκε ανοσοδραστικότητα στα κύτταρα Muller, τα οποία αποτελούν το βασικό πληθυσμό γλοιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (Fig 4.7A). Η επαγωγή του διαβήτη δεν προκάλεσε την αναμενόμενη, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου και άλλες βιβλιογραφικές πηγές, αύξηση του σήματος το οποίο ξεκινάει από τη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) και επεκτείνεται προς τα πάνω σε όλο τον ιστό. Η αύξηση αυτή ήταν αναμενόμενη λόγω της ενεργοποίησης της γλοίας σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Επιπλέον, καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε έπειτα από θεραπεία με το ανάλογο BNN27 και οι μελέτες ποσοτικοποίησης με τη χρήση του προγράμματος ImageJ δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Fig 4.7B).



Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες με την Caspase-3 έγιναν για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αποπτωτικών κυττάρων κυρίως στην έσω πυρηνική στιβάδα (INL) των διαβητικών ζώων. Επιπλέον, στην ομάδα των ζώων που έλαβε το ανάλογο της DHEA, BNN27 αναμενόταν μείωση του αποπτωτικού σήματος με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα κυρίως με τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες με τα αντισώματα ChAT και bNOS για τους τύπους βραχύνων κυττάρων στην έσω πυρηνική στιβάδα. Η ανοσοδραστικότητα παρατηρήθηκε τόσο με μικροσκόπιο φθορισμού όσο και με confocal μικροσκόπιο. Ένα όχι έντονο σήμα παρατηρήθηκε στο control group (Fig 4.8A,D, n=4) συγκριτικά με το μεγάλο αριθμό των caspase-3 positive κυττάρων των διαβητικών ζώων (Fig 4.8B,E, n=4). Το σήμα για την Caspase-3 εντοπίστηκε κυρίως στην έσω πυρηνική στιβάδα (INL) με λίγα κύτταρα και στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL). Στο group των αρουραίων που έλαβαν το ανάλογο της DHEA, BNN27, το σήμα που παρατηρήθηκε ήταν σημαντικά μειωμένο συγκριτικά με την ομάδα των ζώων που δεν έλαβαν θεραπεία. (Fig 4.8C,F, n=5). Μελέτες ποσοτικοποίησης με μέτρηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων με χρήση κάποιου λογισμικού μένει να γίνει έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η αύξηση στην απόπτωση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, στην κατάσταση της διαβητικής

αμφιβληστροειδοπάθειας. Στα πειράματα αυτά δεν πραγματοποιήθηκαν ποσοτικές μελέτες λόγω της ταχύτατης απώλειας του σήματος ανοσοφθορισμού του αντισώματος της κασπάσης-3. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως ένα πιθανό πρόβλημα του συγκεκριμένου αντισώματος στο οποίο συμβαίνει πολύ γρήγορη απώλεια του σήματος. Παρόλα αυτά, μία εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού αλλά και συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο παρατίθεται παρακάτω ως οι πρώτες παρατηρήσεις του αποπτωτικού επιπέδου των κυττάρων του αμφιβληστροειδή που συνεπάγεται λόγω της παθολογικής κατάστασης της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.



5. Συμπεράσματα και Συζήτηση

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 αποτελεσματική θεραπεία της νόσου, αυτό δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα. Τα νευροστεροειδή είναι ουσίες οι οποίες έχει δειχθεί ότι παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές δράσεις σε ισχαιμικές καταστάσεις και επηρεάζουν την έκκριση διαβιβαστών και λειτουργία της νευροδιαβίβασης.

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, στο μοντέλο του STZ-επαγόμενου διαβήτη, στα νευρικά και γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς του αρουραίου. Επιπλέον, εξετάστηκε το μόριο BNN27, το οποίο είναι νευροστεροειδές συνθετικό ανάλογο της DHEA, για τις νευροπροστατευτικές του δράσεις στο μοντέλο αυτό. Τα κύτταρα που μελετήθηκαν για να διαπιστωθεί η δράση του αναλόγου είναι δύο τύποι βραχύνων κυττάρων, τα γαγγλιακά και τα κύτταρα γλοίας. Τέλος, έγινε έλεγχος ανοσοδραστικότητας της κασπάσης-3 για να διαπιστωθεί αν τα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς υφίστανται τη διαδικασία της απόπτωσης όπως υποστηρίζεται από τη βιβλιογραφία.

Στο μοντέλο του επαγόμενου από ενδοπεριτοναϊκή ένεση στρεπτοζοτοκίνης, διαβήτη, παρατηρήθηκαν όλα τα βασικά συμπτώματα που γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία (X.-zhen Li, Zhang, Liu, Cheng, & Zhang, 2010). Τα ζώα εμφάνισαν υπεργλυκαιμία, πολουρία, πολυδιψία καθώς και απώλεια βάρους παρά την παρατήρηση της αυξημένης όρεξης (πολυφαγία). Διαπιστώθηκε πολύ αυξημένη κατανάλωση νερού, φαγητού, αυξημένη ανάγκη για αλλαγή στο πριονίδι καθώς και απώλεια βάρους έπειτα από τις πέντε εβδομάδες.

Το νευροστεροειδές BNN27 δε βοήθησε στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων καθώς δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στα επίπεδα της γλυκόζης παρά την ελάχιστη μείωση που παρουσιάζεται στην εικόνα 4.3, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Τέτοιες αλλαγές δεν αναμένονταν καθώς δεν παρατηρήθηκαν και στις μελέτες του εργαστηρίου με το νευροστεροειδές DHEA στο ίδιο μοντέλο (Koulakis et al., unpublished data).

Μετά από τις μελέτες αυτές που δείχνουν την ύπαρξη νευροπροστατευτικών δράσεων της DHEA στον αμφιβληστροειδή σε αμακρινικά και γαγγλιακά κύτταρα, παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και με τη θεραπεία με το ανάλογο BNN27. Η μεγάλη σημασία που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα αυτά αφορούν την πιο εξειδικευμένη δράση του αναλόγου συγκριτικά με τη DHEA, καθώς αποφεύγονται οι παρενέργειες που μπορεί να δημιουργούνται λόγω του μεταβολισμού της σε ανδρογόνα και οιστρογόνα (Calogeropoulou et al., 2009). Η διάρκεια του πειράματος ορίστηκε στις τέσσερις εβδομάδες συν μία εβδομάδα χορήγησης του νευροστεροειδούς, μετά από αρχικά πειράματα για διαφορετικούς χρόνους του Κουλάκη Μ. ο οποίος παρατήρησε τη μεγαλύτερη μείωση στην ανοσοδραστικότητα δεικτών των νευρικών κυττάρων στο χρόνο αυτό.

Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες για την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT) πραγματοποιούνται αφού δεν υπάρχει πιο άμεση τεχνική για τον εντοπισμό της ακετυλοχολίνης στα βραχύινα κύτταρα (Yasuhara et al., 2003). Έπειτα από τις μελέτες με την ChAT, παρατηρήθηκε 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). Το νευροστεροειδές BNN27 παρουσιάζει σημαντική επαναφορά του σήματος περίπου στο 85% του control γεγονός που απαιτεί περαιτέρω πειράματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθώς και χρόνους χορήγησης ώστε να διαπιστωθεί αν το μόριο αυτό μπορεί να προκαλέσει την ολική επαναφορά του σήματος.

Περαιτέρω έρευνα στο χρόνο χορήγησης και την ποσότητα του BNN27 πρέπει να πραγματοποιηθούν και για τη μελέτη των βραχύνων κυττάρων που περιέχουν τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (bNOS). Τα πειράματα έδειξαν μείωση του σήματος της bNOS κατά 40% στα διαβητικά ζώα καθώς και επαναφορά του σήματος στο 90% του control, δηλαδή σχεδόν ολική επαναφορά του σήματος στη

συγκεκριμένη δόση του νευροστεροειδούς. Απώλεια των βραχύνων αυτών κυττάρων έχει παρατηρηθεί και σε σχετικά πρόσφατη μελέτη για τη συνεισφορά των κυττάρων που παράγουν NO στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια στο STZ-μοντέλο αρουραίων (Goto et al., 2005).

Τα γαγγλιακά κύτταρα μαζί με τα βραχύνια 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; Barber et al., 1998; Martin et al., 2004). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε απώλεια αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, όχι όμως τόσο μεγάλης έντασης όσο η απώλεια των βραχύνων κυττάρων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο χρόνο διεξαγωγής των πειραμάτων στις τέσσερις εβδομάδες αφού και σε μελέτη των Park et al., παρατηρήθηκε μικρή μόνο μείωση των γαγγλιακών κυττάρων σε διάρκεια τεσσάρων εβδομάδων γεγονός που έρχεται να συμφωνήσει με τα αποτελέσματα μας (Park et al., 2003). Η χορήγηση του αναλόγου δείχνει μία τάση για επαναφορά του σήματος στους άξονες η οποία όμως είναι πολύ μικρή. Περαιτέρω πειράματα χρειάζεται να πραγματοποιηθούν για να διευκρινιστεί αν όντως η τάση αυτή για επαναφορά είναι πραγματική και το ανάλογο δρα προστατευτικά και στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Επιπλέον, αντίσωμα που παρουσιάζει την ανοσοδραστικότητα στα σώματα των γαγγλιακών κυττάρων μπορεί να δώσει πιο σαφή αποτελέσματα σχετικά με τη δράση του νευροστεροειδούς στα γαγγλιακά κύτταρα.

Μελέτες που αφορούν τα κύτταρα γλοίας στον αμφιβληστροειδή παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά την ενεργοποίησή τους στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Αν και όλες οι μελέτες 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 κιάλας μήνα στο STZ-μοντέλο στον αρουραίο, ενώ οι Lieth et al., και Li et al., δεν παρατήρησαν διαφορές στην ανοσοδραστικότητα σε σύγκριση με τα control στις πρώτες πέντε εβδομάδες (Hammes et al., 1995; Li et al., 2002; Lieth et al., 1998). Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το BNN27 δεν έδειξαν καμία διαφορά στη GFAP ανοσοδραστικότητα στις πέντε εβδομάδες σε καμία από τις τρεις ομάδες που

εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά, μελέτες του εργαστηρίου στις πέντε εβδομάδες για τη DHEA δείχνουν αύξηση του σήματος της GFAP στα διαβητικά ζώα και μερική επαναφορά του σήματος με τη χορήγηση του νευροστεροειδούς. Περαιτέρω πειράματα με το ανάλογο καθώς και διαφορετικά χρονικά διαστήματα μελέτης πρέπει να πραγματοποιηθούν για να διευκρινιστεί η δράση των νευροστεροειδών στα κύτταρα γλοίας του αμφιβληστροειδούς στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.

Οι μελέτες για την κασπάση-3 επιβεβαιώνουν τα δεδομένα ύπαρξης απόπτωσης στον αμφιβληστροειδή στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια έπειτα από μελέτες κασπασών (Kiechle & Zhang, 2002; Mohr et al., 2002; Oshitari, Yamamoto, Hata, & Roy, 2008) αλλά και TUNEL staining (Asnaghi et al., 2003). Παρατηρήθηκε 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. Λόγω προβλημάτων στο φθορισμό του συγκεκριμένου αντισώματος δεν κατέστη δυνατή η ακριβής επιβεβαίωση των κυτταρικών τύπων που υφίστανται απόπτωση αλλά και η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης, η οποία είναι σημαντική καθώς, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.8, η χορήγηση του αναλόγου BNN27 μειώνει σημαντικά τα επίπεδα κυτταρικής απόπτωσης που παρατηρήθηκε στα διαβητικά ζώα.

Συμπερασματικά και κλείνοντας την εργασία αυτή, πρέπει να τονιστεί ότι το συνθετικό νευροστεροειδές BNN27 είναι ένα μόριο που βρέθηκε να δρα νευροπροστατευτικά στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, σε βραχύινα και λιγότερο σε γαγγλιακά κύτταρα καθώς και να μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση στην απόπτωση των νευρώνων. Σε μία πάθηση όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, όπου ο αριθμός των ατόμων που νοσούν αυξάνεται συνεχώς, και η θεραπεία είναι επιτακτική ανάγκη να βρεθεί άμεσα, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διευκρίνιση των δράσεων αυτού αλλά και άλλων συνθετικών αναλόγων στην αντιμετώπιση της νευροεκφύλισης.

References

- 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.
- 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.
- Aldred, S., & Waring, R. H. (1999). Localisation of dehydroepiandrosterone sulphotransferase in adult rat brain. *Brain research bulletin*, 48(3), 291-6.
- 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.
- Asnagli, 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(2), 506-11.
- Banting, F. G., & Best, C. H. (1990). Pancreatic extracts. 1922. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 115(2), 254-72.
- Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., & Fletcher, A. A. (1991). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 145(10), 1281-6.
- 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.
- Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent progress in hormone research*, 52, 1-32.
- Berne, R. M., & Levy, M. N. (2006). *Principles of Physiology* (Second Ed.). Mosby-Year Book, Inc.
- Bloodworth, J. M. (1962). Diabetic retinopathy. *Diabetes*, 11, 1-22.
- Bowlby, M. R. (1993). Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Molecular pharmacology*, 43(5), 813-9.
- Boycott, B. B., & Hopkins, J. M. (1981). Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience*, 6(4), 679-88.
- Brunette, J. R., & Lafond, G. (1983). Electroretinographic evaluation of diabetic retinopathy: sensitivity of amplitude and time of response. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 18(6), 285-9.
- Bucolo, C., & Drago, F. (2004). Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: role of sigma1 recognition sites. *European journal of pharmacology*, 498(1-3), 111-4.
- Calogeropoulou, T., Avlonitis, N., Minas, V., Alexi, X., Pantzou, A., Charalampopoulos, I., Zervou, M., et al. (2009). Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *Journal of medicinal chemistry*, 52(21), 6569-87.
- Charalampopoulos, I., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane-mediated, integrated genomic and non-genomic pro-survival signaling pathways. *Journal of neurochemistry*, 107(5), 1457-69.
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 19(8), 300-7.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8), 623-34.

- 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, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(1), 1-56.
- Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., & Baulieu, E. E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(8), 4704-7.
- Cunha-Vaz, J., Faria de Abreu, J. R., & Campos, A. J. (1975). Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *The British journal of ophthalmology*, 59(11), 649-56.
- Davis, M. D., Fisher, M. R., Gangnon, R. E., Barton, F., Aiello, L. M., Chew, E. Y., Ferris, F. L., et al. (1998). Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report #18. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(2), 233-52.
- Dowling, J. E. (1987). *The Retina: An Approachable Part of the Brain*. Cambridge: Belknap of Harvard UP.
- Dubrovsy, B. O. (2005). Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 29(2), 169-92.
- Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1), 15-36.
- Eldred, W. D. (2000). *Nitric oxide in the retina. Functional neuroanatomy of the nitric oxide system*. (J. Devente & S. R. Vincent, Eds.) (pp. 111-145). Handbook of Chemical Neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier.
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., & Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*, 43(12), 1528-33.
- Fong, D. S., Aiello, L. P., Ferris, F. L., & Klein, R. (2004). Diabetic retinopathy. *Diabetes care*, 27(10), 2540-53.
- 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.

- Goto, R., Doi, M., Ma, N., Semba, R., & Uji, Y. (2005). Contribution of nitric oxide-producing cells in normal and diabetic rat retina. *Japanese journal of ophthalmology*, 49(5), 363-70.
- Gries, F., Eckel, J., Rosen, P., & Zeigler, D. (2003). *Diabetes mellitus: An introduction*. (F. Gries, N. Cameron, P. Low, & D. Zeigler, Eds.) (pp. 1–28). Textbook of Diabetic Neuropathy. Stuttgart: Thieme.
- Guarneri, P., Cascio, C., Russo, D., D'Agostino, S., Drago, G., Galizzi, G., De Leo, G., et al. (2003). Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1007, 117-28.
- Guarneri, P., Guarneri, R., Cascio, C., Pavasant, P., Piccoli, F., & Papadopoulos, V. (1994). Neurosteroidogenesis in rat retinas. *Journal of neurochemistry*, 63(1), 86-96.
- Hammes, H. P., Federoff, H. J., & Brownlee, M. (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(5), 527-34.
- Hancock, H. A., & Kraft, T. W. (2004). Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(3), 1002-8.
- Hartline, H. K. (1938). The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *American Journal of Physiology*, 121, 400-415.
- Herd, M. B., Belelli, D., & Lambert, J. J. (2007). Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 116(1), 20-34.
- Horak, M., Vlcek, K., Petrovic, M., Choudounska, H., & Vyklicky, L. (2004). Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(46), 10318-25.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M. A., & Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444(7118), 486-9.
- Joslin, E. P. (1983). Nutrition classics. The treatment of diabetes mellitus with observations based upon three thousand cases, Lea and Febiger, 1923. *Nutrition reviews*, 41(6), 187-9.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessel, T. M. (1995). *Essentials of Neural Science and Behavior*. Appleton & Lange-A Simon & Shuster Company.

- Kashii, S., Takahashi, M., Mandai, M., Shimizu, H., Honda, Y., Sasa, M., Ujihara, H., et al. (1994). Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(2), 685-95.
- Kempen, J. H., O'Colmain, B. J., Leske, M. C., Haffner, S. M., Klein, R., Moss, S. E., Taylor, H. R., et al. (2004). The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Archives of ophthalmology*, 122(4), 552-63.
- Kiechle, F. L., & Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 326(1-2), 27-45.
- Kokona, D., Charalampopoulos, I., Pediaditakis, I., Gravanis, A., & Thermos, K. (2012). The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. *Neuropharmacology*, 62(5-6), 2106-17.
- Kowluru, R. A., & Koppolu, P. (2002). Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free radical research*, 36(9), 993-9.
- Kroboth, P. D., Salek, F. S., Pittenger, A. L., Fabian, T. J., & Frye, R. F. (1999). DHEA and DHEA-S: a review. *Journal of clinical pharmacology*, 39(4), 327-48.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodriguez, M. L., & Kolb-Bachofen, V. (1995). Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 376(3), 179-85.
- Kurtenbach, A., Mayser, H. M., Jägle, H., Fritsche, A., & Zrenner, E. (2006). Hyperoxia, hyperglycemia, and photoreceptor sensitivity in normal and diabetic subjects. *Visual neuroscience*, 23(3-4), 651-61.
- 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.
- Lanthier, A., & Patwardhan, V. V. (1988). In vitro steroid metabolism by rat retina. *Brain research*, 463(2), 403-6.

- Larabi, Y., Dahmani, Y., Gernigon, T., & Nguyen-Legros, J. (1991). Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the retina of the diabetic sand rat *Psammomys obesus*. *Journal für Hirnforschung*, 32(4), 525-31.
- Lazaridis, I., Charalampopoulos, I., Alexaki, V.-I., Avlonitis, N., Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., Calogeropoulou, T., et al. (2011). Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS biology*, 9(4), e1001051.
- Leydhecker, W. (1984). *Augenheilkunde* (21st ed., pp. 1: 4-10).
- Li, Q., Zemel, E., Miller, B., & Perlman, I. (2002). Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Experimental eye research*, 74(5), 615-25.
- Li, X.-zhen, Zhang, X.-hong, Liu, L., Cheng, J., & Zhang, W. (2010). [Neonatal diabetes mellitus: a clinical analysis of 13 cases]. *Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics*, 48(10), 775-8.
- Lieth, E, Barber, A. J., Xu, B., Dice, C., Ratz, M. J., Tanase, D., & Strother, J. M. (1998). Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47(5), 815-20.
- Lieth, E, LaNoue, K. F., Antonetti, D. A., & Ratz, M. (2000). Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Experimental eye research*, 70(6), 723-30.
- Lieth, Erich, Gardner, T. W., Barber, A. J., Antonetti, D. A., Penn, T., & Retina, S. (2000). Viewpoint Retinal neurodegeneration : early pathology in diabetes, 3, 3-8.
- Lipton, S. A., & Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England journal of medicine*, 330(9), 613-22.
- M Shahidi, A., Sampson, G. P., Pritchard, N., Edwards, K., Russell, A., Malik, R. a, & Efron, N. (2010). Exploring retinal and functional markers of diabetic neuropathy. *Clinical and Experimental Optometry*, 93(5), 309-323.
- Majewska, M. D., Bisslerbe, J. C., & Eskay, R. L. (1985). Glucocorticoids are modulators of GABAA receptors in brain. *Brain research*, 339(1), 178-82.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., & Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4753), 1004-7.

- Martin, P. M., Roon, P., Van Ells, T. K., Ganapathy, V., & Smith, S. B. (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, *45*(9), 3330-6.
- Masland, R. H., & Mills, J. W. (1979). Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. *The Journal of cell biology*, *83*(1), 159-78.
- Massey, S. C. (1990). Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Progress in retinal research*, *9*, 399-425. Pergamon Press.
- Maurice, T., Junien, J. L., & Privat, A. (1997). Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizocilpine-induced learning impairment in mice via sigma 1-receptors. *Behavioural brain research*, *83*(1-2), 159-64.
- Melmed, S., Polonsky, K. S., Larsen, R. P., & Kronenberg, H. M. (2011). *Williams textbook of endocrinology* (12th ed., pp. 1371–1435). Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- 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.
- Mohr, S., Xi, X., Tang, J., & Kern, T. S. (2002). Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients. *Diabetes*, *51*(4), 1172-9.
- Morrow, A. L. (2007). Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacology & therapeutics*, *116*(1), 1-6.
- Murata, T., Nakagawa, K., Khalil, A., Ishibashi, T., Inomata, H., & Sueishi, K. (1996). The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *74*(4), 819-25.
- Naskar, R., Wissing, M., & Thanos, S. (2002). Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, *43*(9), 2962-8.
- Newman, E., & Reichenbach, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in neurosciences*, *19*(8), 307-12.
- Nishimura, C., & Kuriyama, K. (1985). Alterations in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of neurochemistry*, *45*(2), 448-55.
- North, R. V., Farrell, U., Banford, D., Jones, C., Gregory, J. W., Butler, G., & Owens, D. R. (1997). Visual function in young IDDM patients over 8 years of age. A 4-year longitudinal study. *Diabetes care*, *20*(11), 1724-30.

- Ogden, T. (1978). Astrocytes in neurofibrillar layer. Golgi studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 17:499-510.
- Oshitari, T., Yamamoto, S., Hata, N., & Roy, S. (2008). Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*, 92(4), 552-6.
- Palmowski, A. M., Sutter, E. E., Bearse, M. A., & Fung, W. (1997). Mapping of retinal function in diabetic retinopathy using the multifocal electroretinogram. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(12), 2586-96.
- Park, S.-H., Park, J.-W., Park, S.-J., Kim, K.-Y., Chung, J.-W., Chun, M.-H., & Oh, S.-J. (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*, 46(9), 1260-8.
- Phipps, J. A., Yee, P., Fletcher, E. L., & Vingrys, A. J. (2006). Rod photoreceptor dysfunction in diabetes: activation, deactivation, and dark adaptation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(7), 3187-94.
- Puia, G., Santi, M. R., Vicini, S., Pritchett, D. B., Purdy, R. H., Paul, S. M., Seeburg, P. H., et al. (1990). Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. *Neuron*, 4(5), 759-65.
- Puro, D. (1985). *Cholinergic systems. In: Retinal transmitters and modulators: models for the brain.* (W. Morgan, Ed.) (Vol I., pp. 63–91).
- Qian, H., & Ripps, H. (2011). Neurovascular interaction and the pathophysiology of diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*, 2011, 693426.
- Rabow, L. E., Russek, S. J., & Farb, D. H. (1995). From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse (New York, N.Y.)*, 21(3), 189-274.
- Reddy, D. S., & Rogawski, M. A. (2009). Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(2), 392-401.
- Rhodes, M. E., Li, P. K., Burke, A. M., & Johnson, D. A. (1997). Enhanced plasma DHEAS, brain acetylcholine and memory mediated by steroid sulfatase inhibition. *Brain research*, 773(1-2), 28-32.
- Roufail, E., Soulis, T., Boel, E., Cooper, M. E., & Rees, S. (1998). Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia*, 41(12), 1419-25.
- Rungger-Brändle, E., Dosso, A. A., & Leuenberger, P. M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(7), 1971-80.

- Sakai, H., Tani, Y., Shirasawa, E., Shirao, Y., & Kawasaki, K. (1995). Development of electroretinographic alterations in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Ophthalmic research*, 27(1), 57-63.
- Schwartz, E. A. (1993). L-glutamate conditionally modulates the K⁺ current of Müller glial cells. *Neuron*, 10(6), 1141-9.
- Shapiro, B., Kronheim, S., & Pimstone, B. (1979). The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 11(1), 79-80.
- 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., & Akaike, A. (2005). Pregnenolone sulphate attenuates AMPA cytotoxicity on rat cortical neurons. *The European journal of neuroscience*, 21(9), 2329-35.
- Shirao, Y., & Kawasaki, K. (1998). Electrical responses from diabetic retina. *Progress in retinal and eye research*, 17(1), 59-76.
- Sima, A. A., Zhang, W. X., Cherian, P. V., & Chakrabarti, S. (1992). Impaired visual evoked potential and primary axonopathy of the optic nerve in the diabetic BB/W-rat. *Diabetologia*, 35(7), 602-7.
- Steinle, J. J. (2010). Topical administration of adrenergic receptor pharmaceuticals and nerve growth factor. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 4, 605-10.
- 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.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 50(6), 537-46.
- Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R. (2001). Acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and diabetic rat retina. *Neurochemical research*, 26(2), 153-9.
- Sánchez-Chávez, G., Vidal, C. J., & Salceda, R. (1995). Acetyl- and butyrylcholinesterase activities in the rat retina and retinal pigment epithelium. *Journal of neuroscience research*, 41(5), 655-62.

- Takasu, N., Komiya, I., Asawa, T., Nagasawa, Y., & Yamada, T. (1991). Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes*, *40*(9), 1141-5.
- Tanihara, H., Hangai, M., Sawaguchi, S., Abe, H., Kageyama, M., Nakazawa, F., Shirasawa, E., et al. (1997). Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Archives of ophthalmology*, *115*(6), 752-6.
- Tao, W. (2006). Application of encapsulated cell technology for retinal degenerative diseases. *Expert opinion on biological therapy*, *6*(7), 717-26.
- Tregear, S. J., Knowles, P. J., Ripley, L. G., & Casswell, A. G. (1997). Chromatic-contrast threshold impairment in diabetes. *Eye (London, England)*, *11* (Pt 4), 537-46.
- Vander, A., Sherman, J., & Luciano, D. (2001). *Human Physiology, The Mechanisms of Human Body* (8th ed.). NY, USA: McGraw-Hill.
- Vaney, D. I., Peichi, L., & Boycott, B. B. (1981). Matching populations of amacrine cells in the inner nuclear and ganglion cell layers of the rabbit retina. *The Journal of comparative neurology*, *199*(3), 373-91.
- Vaughn, J. E., Famiglietti, E. V., Barber, R. P., Saito, K., Roberts, E., & Ribak, C. E. (1981). GABAergic Amacrine Cells in Rat Retina : Immunocytochemical Identification and Synaptic Connectivity, *127*, 113-127.
- Vorwerk, C. K., Lipton, S. A., Zurakowski, D., Hyman, B. T., Sabel, B. A., & Dreyer, E. B. (1996). Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Investigative ophthalmology & visual science*, *37*(8), 1618-24.
- West, E., Simon, O. R., & Morrison, E. Y. (1996). Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *The West Indian medical journal*, *45*(2), 60-2.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*, *27*(5), 1047-53.
- Wise, G. N. (1956). Retinal neovascularization. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, *54*, 729-826.
- Wu, F. S., & Chen, S. C. (1997). Mechanism underlying the effect of pregnenolone sulfate on the kainate-induced current in cultured chick spinal cord neurons. *Neuroscience letters*, *222*(2), 79-82.

- Wu, F. S., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular pharmacology*, *40*(3), 333-6.
- Yang, X.-L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in neurobiology*, *73*(2), 127-50.
- Yasuhara, O., Tooyama, I., Aimi, Y., Bellier, J.-P., Hisano, T., Matsuo, A., Park, M., et al. (2003). Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(7), 2872-81.
- Yong-hao, L. I., Ye-hong, Z., Lin, L. Ü., Ling-yan, C., Xin-hua, H., Jing-lin, Z., Shi-yi, L. I., et al. (2008). Caspase-dependent retinal ganglion cell apoptosis in the rat model of acute diabetes, *121*(30672277), 2566-2571.
- Zeng, X. X., Ng, Y. K., & Ling, E. A. (2000). Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual neuroscience*, *17*(3), 463-71.

Sites

<http://www.who.int>

<http://webvision.umh.es/webvision/sretina.html>

<http://ratbehavior.org/Eyes.htm>

Επίλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Κας Κ. Θερμού. Φτάνοντας στο τέλος της συγγραφής της θα ήθελα να επισημάνω ότι για την πραγματοποίησή της έλαβα τη βοήθεια και τη στήριξη πολλών ανθρώπων τους οποίους επιθυμώ και οφείλω να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Θέλω πρώτα από όλα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου Κυριακή Θερμού για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο που με ενδιαφέρει πραγματικά, καθώς και για την άποψη συνεργασία την οποία είχαμε. Κυρίως όμως θέλω να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε.

Επίσης, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Νίκη Μαστροδήμου και τη Δέσποινα Κοκκονά που με προθυμία με βοήθησαν σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπισα στο εργαστήριο και χωρίς τις οποίες δε θα ήταν εφικτή η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Τις ευχαριστώ επίσης για το κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο και μαζί με τη Σμαράγδα Πουλάκη και τη Μελίνα Τσέλιου έκαναν καλύτερη και πιο ευχάριστη την παραμονή μου όλο αυτό το διάστημα.

Την ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα επιπλέον να εκφράσω στην Κα Κυριακή Σιδηροπούλου και τους Σήφη Πεδιαδιτάκη και Πασχάλη Ευσταθόπουλο για τις γνώσεις που μου προσέφεραν και τις πολύτιμες συμβουλές τους που θα με βοηθήσουν στη μετέπειτα ερευνητική μου πορεία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στους γονείς και την αδερφή μου για την εμπιστοσύνη και όλη τη στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και στους πολύ κοντινούς μου ανθρώπους Μπομπολάκη Μαρία, Ρωμανού Κατερίνα, Καβρουλάκη Νίκο, Καβαφάκη Χρύσα, Αναστασάκη Ελπίδα και Καλαποθάκου Ελένη οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα και με βοήθησαν να συνεχίσω.