



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΩΝ:
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ NADPH ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ**

**INVESTIGATION OF NOVEL THERAPEUTICS FOR
RETINOPATHIES: NADPH OXIDASE INHIBITORS**

Διονυσοπούλου Σταυρούλα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Θερού Κυριακή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Θερμού Κυριακή (Επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Τσιλιμπάρης Μιλτιάδης

Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Χαραλαμπόπουλος Ιωάννης

Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Στον πατέρα μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά τη διάρκεια της χρονικής περιόδου Φεβρουαρίου - Οκτωβρίου 2018. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα. Θερού Κυριακή για την ευκαιρία που μου προσέφερε, να γίνω μέλος της εργαστηριακής, ερευνητικής ομάδας της, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε, την καθοδήγηση και την κατανόηση της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Οφθαλμολογίας κο. Τσιλιμπάρη Μιλτιάδη και τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κο. Χαραλαμπίδου Ιωάννη για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη και αξιολόγηση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Θεοδωράκη Κωνσταντίνο, Επιστημονικό Συνεργάτη στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας – Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας, για τη διεξαγωγή του συνολικού πειράματος της RT-PCR ανάλυσης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Μαστροδήμου Νίκη, Παπαδογκωνάκη Σοφία και Σπυριδάκο Δημήτρη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου προσέφεραν και για την όμορφη επικοινωνία και συνεργασίας μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου - τους γονείς μου και την αδερφή μου- για την αγάπη, τη βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχαν, σε κάθε μου βήμα, καθώς επίσης και τους φίλους μου, για την παρουσία τους δίπλα μου και τη στήριξή τους σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΟΧΕΜΕΝΑ

Περίληψη	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή	10
1.1. Οφθαλμός και Αμφιβληστροειδής	10
1.1.1. Ανατομία του οφθαλμού	10
1.1.2. Ανατομία αμφιβληστροειδούς	11
1.1.3. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή	14
1.1.4. Αμφιβληστροειδοπάθειες και διαθέσιμες θεραπείες	14
1.2. NADPH Οξειδάσες	18
1.2.1. Δομή και ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών	19
1.2.2. Εντοπισμός των NADPH οξειδασών	21
1.2.3. Ρόλος των NADPH οξειδασών	23
1.2.3.1. Φυσιολογία	23
1.2.3.2. Παθοφυσιολογία του ΚΝΣ	23
1.2.4. Η αναστολή των NADPH οξειδασών ως θεραπευτική προσέγγιση	26
2. Σκοπός	28
3. Μεθοδολογία	29
3.1. Πειραματόζωα	29
3.2. In vivo μοντέλο AMPA διεγερτοτοξικότητας	29
3.3. Απομόνωση και προετοιμασία ιστού	30
3.3.1. Για ανοσοϊστοχημικές μελέτες	30
3.3.2. Για ανάλυση μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	30

3.4. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες	31
3.5. Μικροσκοπική παρατήρηση	32
3.6. Ποσοτικοποίηση	32
3.7. Στατιστική Ανάλυση	33
3.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	33
3.8.1. Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του	33
3.8.2. Σύνθεση cDNA	34
3.8.3. RT-PCR	35
4. Αποτελέσματα	37
4.1. Νευροπροστατευτικές επιδράσεις των NOX αναστολέων στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας	37
4.1.1. Δοσοεξαρτώμενη μελέτη της νευροπροστατευτικής επίδρασης του αναστολέα VAS2870 στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας	37
4.1.2. Δοσοεξαρτώμενη μελέτη της νευροπροστατευτικής επίδρασης του αναστολέα της NOX1 ισομορφής, ML171 στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας	39
4.2. Επιδράσεις των NOX αναστολέων στη μακρογλοία, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας	41
4.3. Επιδράσεις των NOX αναστολέων στη μικρογλοία, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας	44
4.4. Ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των ισομορφών NOX1, NOX2 και NOX4 στον αμφιβληστροειδή επίμυος, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας	47

4.5. Έκφραση της NOX1 ισομορφής στον αμφιβληστροειδή επίμυος	49
5. Συζήτηση	50
Βιβλιογραφία	62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αναστολείς των NADPH οξειδασών φαίνεται ότι συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της αγγειοπάθειας και της φλεγμονής σε διάφορα μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, ωστόσο, ελάχιστα μελετημένη είναι η αποτελεσματικότητά τους σε επίπεδο νευροεκφύλισης. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των αναστολέων των NADPH οξειδασών, VAS2870 και ML171, στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν Sprague-Dawley επίμυες (200-300g). Πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες με αντισώματα έναντι δεικτών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, καθώς και RT-PCR ανάλυση, για την ταυτοποίηση της έκφρασης των επιμέρους NOX ισομορφών στον αμφιβληστροειδή.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη έναντι του νευρωνικού δείκτη bNOS επιβεβαιώνει την νευροπροστατευτική επίδραση των δύο εξεταζόμενων αναστολέων στην επαγόμενη από AMPA απώλεια των αμακρυνικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, τα οποία εκφράζουν τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου. Επίσης, οι αναστολείς VAS2870 και ML171 μείωσαν την -επαγόμενη από AMPA- ενεργοποίηση της μακρογλοίας και μικρογλοίας (GFAP και Iba-1 ανοσοδραστικότητα αντίστοιχα). Μέσω της RT-PCR ανάλυσης προσδιορίστηκε ποιοτικά η έκφραση των ισομορφών NOX1, NOX2 και NOX4 στον αμφιβληστροειδή επίμυων στο μοντέλο της παρούσας εργασίας. Η NOX1 ισομορφή, μέσω ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης, βρέθηκε να εκφράζεται στο μελάγχρουν επιθήλιο και σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, ενώ η έκφρασή της δε φάνηκε να τροποποιείται ως απόρροια της επαγόμενης από AMPA διεγερτοτοξικότητας. Συμπερασματικά, οι αναστολείς των NADPH οξειδασών παρουσιάζονται ως μόρια ικανά να αντιμετωπίσουν και τις τρεις συνιστώσες των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών κι επομένως κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη και αξιολόγησή τους.

ABSTRACT

NADPH oxidase inhibitors potentially contribute to the reduction of vasculopathy and inflammation in various models of retinopathies. However, less is known about the efficacy of these molecules against retinal neurodegeneration. The aim of this study was to evaluate the neuroprotective and anti-inflammatory actions of NADPH oxidase inhibitors, VAS2870 and ML171, in the *in vivo* model of AMPA excitotoxicity in the retina of Sprague-Dawley rats, using immunohistochemical studies. RT-PCR and immunohistochemical analysis, using an antibody against the NOX1 isoform, were also performed, to study the expression of the individual NOX isoforms in the control retina and in the *in vivo* model of AMPA excitotoxicity.

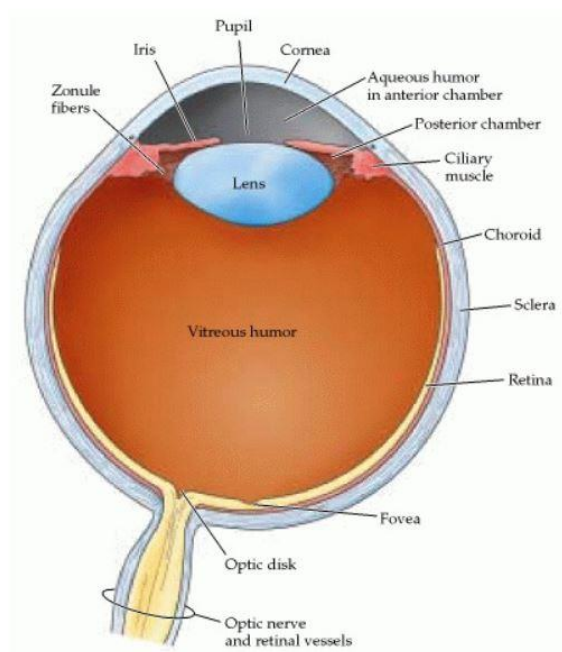
The immunohistochemical study against brain nitric oxide synthase (bNOS) confirms the neuroprotective effect of both inhibitors on AMPA-induced loss of retinal amacrine cells. Furthermore, the results of the immunohistochemical studies, using antibodies against GFAP and Iba-1, demonstrate the anti-inflammatory activity of these agents. Both inhibitors decrease macroglial and microglial activation, respectively. RT-PCR results confirmed - qualitatively- the expression of the NOX1, NOX2 and NOX4 isoforms in control rat retina and in the model of AMPA excitotoxicity. Anti-NOX1 immunohistochemistry resulted in the observation that NOX1 is expressed in the Retinal Pigment Epithelium and in Retinal Ganglion Cells, while qualitatively, its expression was not modified due to AMPA induced excitotoxicity. In conclusion, NADPH oxidase inhibitors are potentially able to cope with the vascular, inflammatory and neuronal disorders that characterize ischemic retinopathies. Therefore, further investigation and evaluation of their efficacy will provide important data on their potential clinical use.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οφθαλμός και αμφιβληστροειδής

1.1.1. Ανατομία του οφθαλμού

Ο οφθαλμός αποτελεί το όργανο του οπτικού συστήματος ενός οργανισμού που είναι υπεύθυνο για την αντίληψη του φωτός στον περιβάλλοντα χώρο και εν συνεχεία τη μετατροπή των οπτικών ερεθισμάτων σε ηλεκτρικά σήματα, με σκοπό τη μεταφορά της εκάστοτε πληροφορίας στον εγκέφαλο. Ανατομικά μπορούν να διακριθούν τρεις στιβάδες ιστού. Η πλέον εξωτερική στιβάδα συγκροτείται από ινώδη ιστό, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου είναι αδιαφανές και ονομάζεται σκληρός χιτώνας. Εξάιρεση αποτελεί το πρόσθιο, εξωτερικό τμήμα του οργάνου, όπου εντοπίζεται ο κερατοειδής χιτώνας, διαφανής ιστός μέσω του οποίου είναι εφικτή η διέλευση του φωτός. Η ενδιάμεση στιβάδα απαρτίζεται συνολικά από τρεις δομές, την ίριδα, το ακτινωτό σώμα και το



Εικόνα 1.1.1.: Ανατομία του οφθαλμού. (Purves, 2004)

σημαντική δομή του οφθαλμού είναι ο κρυσταλλοειδής φακός, ο οποίος, σε συνδυασμό με τον κερατοειδή, διαδραματίζει ρόλο στην εστίαση των ακτινών του εισερχόμενου φωτός στον αμφιβληστροειδή.

χοριοειδές, τη δομή που είναι - κατά κύριο λόγο - υπεύθυνη για την παροχή αίματος στους φωτοϋποδοχείς. Ο αμφιβληστροειδής είναι η πλέον εσωτερική στιβάδα ιστού και αποτελεί το νευρικό τμήμα του οφθαλμού, καθώς σε αυτόν εντοπίζονται οι επιμέρους νευρώνες του οργάνου, που ανιχνεύουν και ακολούθως μεταδίδουν τις οπτικές πληροφορίες στον εγκέφαλο. Εξίσου

Για την θρεπτική υποστήριξη του κερατοειδούς και του φακού, το τμήμα του οφθαλμού που βρίσκεται ανάμεσα σε αυτές τις δύο δομές και ονομάζεται πρόσθιος θάλαμος εμπερικλείει το υδατοειδές υγρό. Η παραγωγή του υδατοειδούς υγρού εξασφαλίζεται μέσω του ακτινωτού σώματος, στον οπίσθιο θάλαμο του οφθαλμού, απ' όπου το υγρό διοχετεύεται μέσω της κόρης στον πρόσθιο θάλαμο. Για την ομαλή λειτουργία του οργάνου και τη διατήρηση φυσιολογικής ενδοφθάλμιας πίεσης, η παραγωγή και διοχέτευση του υδατοειδούς υγρού στον πρόσθιο θάλαμο εξισορροπείται από την παροχέτευσή του μέσω του δοκιδωτού πλέγματος. Εξίσου σημαντική για την λειτουργία του οφθαλμού είναι η παρουσία του υαλώδους υγρού, ανάμεσα στο οπίσθιο τμήμα του φακού και τον αμφιβληστροειδή. Το στοιχείο αυτό εξασφαλίζει την απομάκρυνση κυτταρικών κατάλοιπων μέσω των φαγοκυττάρων που περιέχει και παράλληλα συμβάλλει στη διατήρηση του σχήματος του οργάνου (Purves, 2004).

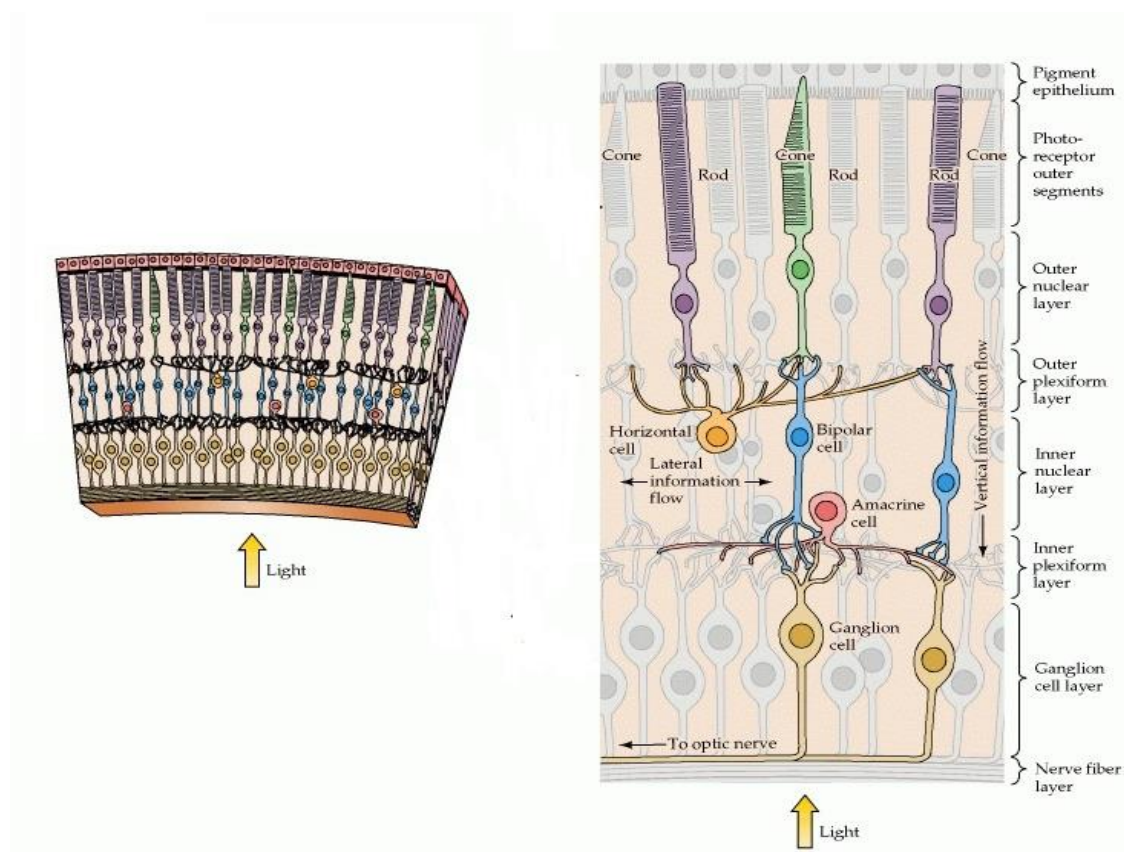
1.1.2. Ανατομία αμφιβληστροειδούς

Ο αμφιβληστροειδής εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού και περιλαμβάνει συνολικά πέντε νευρωνικούς τύπους, οργανωμένους σε διακριτές μεταξύ τους κυτταρικές στιβάδες. Οι φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι διακρίνονται σε ραβδία και κωνία, αποτελούν την πρώτη κατηγορία νευρώνων του αμφιβληστροειδούς και είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη του οπτικού ερεθίσματος, μέσω των φωτοευαίσθητων πρωτεϊνών που περιέχουν, και τη μετατροπή του σε ηλεκτρικό σήμα. Οι νευρώνες αυτοί έρχονται σε επαφή με το μελάγχρουν επιθήλιο, την κυτταρική στιβάδα που εντοπίζεται στο εξωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς και -μεταξύ άλλων λειτουργιών- εξασφαλίζει την ανανέωση των φωτοευαίσθητων πρωτεϊνών των φωτοϋποδοχέων. Τα κυτταρικά σώματα και οι πυρήνες των φωτοϋποδοχέων σχηματίζουν την έξω πυρηνική στιβάδα (Outer Nuclear Layer, ONL). Οι συνάψεις των φωτοϋποδοχέων με τα δίπολα

κύτταρα, τη δεύτερη κατηγορία νευρώνων του αμφιβληστροειδούς, εντοπίζονται στην έξω δικτυωτή στιβάδα (Outer Plexiform Layer, OPL), ενώ τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων αυτών συμμετέχουν στο σχηματισμό της έσω πυρηνικής στιβάδας (Inner Nuclear Layer, INL). Τα δίπολα κύτταρα συνάπτονται με τους δενδρίτες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς στο επίπεδο της έσω δικτυωτής στιβάδας (Inner Plexiform Layer, IPL). Με αυτόν τον τρόπο, οι εκάστοτε πληροφορίες από το επίπεδο των φωτοϋποδοχέων περνούν μέσω των δίπολων κυττάρων στα γαγγλιακά κύτταρα, οι νευράξονες των οποίων σχηματίζουν το οπτικό νεύρο και εξασφαλίζουν την μεταφορά των οπτικών πληροφοριών από τον αμφιβληστροειδή σε άλλα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν την πέμπτη κύρια στιβάδα στον αμφιβληστροειδή, που ονομάζεται στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Ganglion Cell Layer, GCL). Οι δύο επιπρόσθετοι νευρωνικοί τύποι που απαντώνται στον αμφιβληστροειδή είναι τα οριζόντια και τα αμακρινικά κύτταρα, υπεύθυνα για φαινόμενα πλευρικών αλληλεπιδράσεων στο επίπεδο των φωτοϋποδοχέων και των γαγγλιακών κυττάρων αντίστοιχα. Τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων αυτών εντοπίζονται στην έσω πυρηνική στιβάδα (Purves, 2004).

Πέρα από τους νευρωνικούς τύπους που αναφέρθηκαν, στον αμφιβληστροειδή εντοπίζονται επίσης μακρογλοιακά κύτταρα, κυρίως αστροκύτταρα και κύτταρα Müller, καθώς επίσης και κύτταρα μικρογλοίας. Ο ρόλος της μακρογλοίας είναι υποστηρικτικός και σημαντικός για τη διατήρηση της ακεραιότητας του αμφιβληστροειδούς, με τα κύτταρα Müller να έχουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. Από την άλλη πλευρά, τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν ουσιαστικά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του αμφιβληστροειδούς, ικανά να ενεργοποιούνται σε καταστάσεις τραυματισμού του ιστού και να συμμετέχουν στην εκδήλωση φλεγμονής (Fletcher et al., 2011).

Η περιοχή του αμφιβληστροειδούς από την οποία εξέρχονται οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων και ουσιαστικά αποτελεί την αρχή του οπτικού νεύρου ονομάζεται οπτικός δίσκος και από αυτήν απουσιάζουν παντελώς οι φωτοϋποδοχείς. Παράλληλα, μέσω του οπτικού δίσκου εισέρχονται και εξέρχονται αντίστοιχα οι οφθαλμικές αρτηρίες και φλέβες (Purves, 2004). Τέλος, μία ακόμα σημαντική περιοχή, που εντοπίζεται πλησίον του κέντρου του αμφιβληστροειδούς και εξασφαλίζει την κεντρική όραση, είναι η ωχρά κηλίδα, στο κέντρο της οποίας βρίσκεται το κεντρικό βοθρίο, η δομή με τη μεγαλύτερη πυκνότητα κωνίων στον αμφιβληστροειδή (Jager et al., 2008).



Εικόνα 1.1.2.: Δομή του αμφιβληστροειδούς. Διακρίνονται οι πέντε νευρωνικοί τύποι του αμφιβληστροειδούς και οι κυτταρικές στιβάδες στις οποίες οργανώνονται. (Purves, 2004)

1.1.3. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή

Στον αμφιβληστροειδή, το γλουταμινικό οξύ (Glu) αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή. Κατά την κύρια οδό ροής της οπτικής πληροφορίας, δηλαδή από τους φωτοϋποδοχείς, στα δίπολα κύτταρα και από εκεί στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, το γλουταμινικό οξύ παράγεται και απελευθερώνεται και από τις τρεις κατηγορίες νευρώνων της οδού, δρώντας στη συνέχεια μέσω ιοντοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων γλουταμινικού, που εκφράζονται στους επιμέρους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς. Από την άλλη πλευρά, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή, που παράγεται και απελευθερώνεται από οριζόντια και αμακρυνικά κύτταρα, συμμετέχοντας στους μηχανισμούς τροποποίησης της οπτικής πληροφορίας στο επίπεδο της έξω και έσω δικτυωτής στιβάδας. Άλλοι νευροδιαβιβαστές που συμμετέχουν στα νευρωνικά κυκλώματα του αμφιβληστροειδούς είναι η ντοπαμίνη, η γλυκίνη και η ακετυλοχολίνη (Crooks & Kolb, 1992; Yang et al., 2004).

1.1.4. Αμφιβληστροειδοπάθειες και διαθέσιμες θεραπείες

Οι αμφιβληστροειδοπάθειες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία παθήσεων του οφθαλμού, που σχετίζονται με διαταραχές της όρασης και ενδεχόμενη τύφλωση και επηρεάζουν σημαντικό ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού. Κρίσιμο στοιχείο της παθοφυσιολογίας επιμέρους αμφιβληστροειδοπαθειών είναι η υποξία και οι επακόλουθες αυτής επιπλοκές. Στις ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες, όπως η Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια και η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η αρχική επιπλοκή αφορά στην απώλεια κυττάρων του αγγειακού συστήματος και την επακόλουθη ανάπτυξη ισχαιμικών συνθηκών στον ιστό, οι οποίες εν συνεχεία επάγουν: 1) αύξηση στην έκφραση αγγειογόνων παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού

επιθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και ανώμαλη ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων, που ενδεχομένως εισέρχονται και στο υαλώδες σώμα και 2) διαταραχή της λειτουργίας των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς (Fulton et al., 2009; Sarpieha et al., 2010). Ιδιαίτερα κρίσιμοι παράγοντες για την ανάπτυξη ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών θεωρούνται -μεταξύ άλλων- το οξειδωτικό στρες, η διεγερτοτοξικότητα, η απόπτωση και η φλεγμονή (Rivera et al., 2017).

Η Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) προκύπτει ως επιπλοκή του Διαβήτη τύπου 1 ή τύπου 2 και αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης στον ενεργό πληθυσμό (Cheung et al., 2010). Τα μακροχρόνια, μη ελεγχόμενα, υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ασθενών με Διαβήτη ενδέχεται να προκαλέσουν την καταστροφή των αιμοφόρων αγγείων του αμφιβληστροειδούς, οδηγώντας σε μία σειρά αλληλοσυνδεόμενων μικροαγγειακών επιπλοκών και στην εμφάνιση αμφιβληστροειδοπάθειας. Κατά την εξέλιξη της, η ΔΑ μπορεί να διακριθεί σε επιμέρους στάδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από διακριτές αλλοιώσεις του αμφιβληστροειδούς, όπως μικροανευρίσματα και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα λόγω διάσπασης του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού, ενώ στο πλέον σοβαρό στάδιο (πολλαπλασιαστική ΔΑ) παρατηρούνται φαινόμενα νεοαγγείωσης (Wong et al., 2016). Πέρα από τις αγγειακές διαταραχές, η ΔΑ χαρακτηρίζεται επίσης από απώλεια νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, ιδίως των γαγγλιακών κυττάρων του ιστού (Kern & Barber, 2008), λόγω διαταραχής στην ισορροπία προ-αποπτωτικών και προ-επιβιωτικών σημάτων (Valverde et al., 2013), αλλά και παρατεταμένη εκδήλωση φλεγμονής, που δρα επιβαρυντικά για τον ιστό (Stitt et al., 2016).

Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας είναι μία διαταραχή του οφθαλμού, ιδιαίτερα κοινή σε άτομα ηλικίας 50 ετών και άνω, η οποία οφείλεται στην προοδευτική καταστροφή της ωχράς κηλίδας και σχετίζεται με απώλεια της κεντρικής όρασης, ενώ η

περιφερική όραση κατά κανόνα δεν επηρεάζεται. Η νόσος χαρακτηρίζεται από εναποθέσεις πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ύλης και λιπιδίων ανάμεσα στο μελάγχρουν επιθήλιο και το υποκείμενο χοριοειδές, κατάσταση η οποία προκαλεί καταστροφές στον αμφιβληστροειδή και επηρεάζει την περιοχή της ωχράς κηλίδας. Στο προχωρημένο στάδιο της νόσου, οι καταστροφές αυτές μπορούν να οδηγήσουν είτε σε ατροφία του αμφιβληστροειδούς, που εκτείνεται ως την περιοχή της ωχράς κηλίδας ή σε φαινόμενα νεοαγγείωσης στο χοριοειδές, καταστάσεις οι οποίες οδηγούν τελικά σε εκτεταμένη καταστροφή των φωτοϋποδοχέων και απώλεια της κεντρικής όρασης (Jager et al., 2008).

Ο όρος γλαύκωμα χρησιμοποιείται ουσιαστικά για να περιγράψει ένα σύνολο διαταραχών του οφθαλμού, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την προοδευτική απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και των αξόνων τους, οδηγώντας σε καταστροφή του οπτικού νεύρου και επακόλουθη τύφλωση. Κύριο σύμπτωμα του γλαυκώματος είναι η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, λόγω διαταραχής στην ισορροπία παραγωγής και απομάκρυνσης του υδατοειδούς υγρού, κατάσταση η οποία οδηγεί στην εκδήλωση μηχανικού στρες στον ιστό και η οποία τελικά ευθύνεται για την καταστροφή του οπτικού νεύρου (Weinreb et al., 2014).

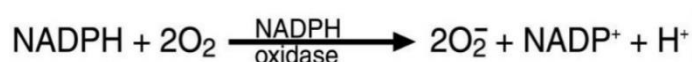
Στις περισσότερες περιπτώσεις, η θεραπεία του γλαυκώματος στηρίζεται σε φαρμακευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες στοχεύουν στη μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης, προκειμένου να αποφευχθεί η περαιτέρω καταπόνηση και καταστροφή του ιστού (Weinreb et al., 2014). Για την αντιμετώπιση των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών, κυρίαρχη στρατηγική παραμένει ο περιορισμός της δράσης αγγειογόνων παραγόντων, όπως ο παράγοντας VEGF, με σκοπό την αναστολή της νεοαγγείωσης. Για το λόγο αυτό, χορηγούνται ενδοβολβικά anti-VEGF παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν ουσιαστικά αντισώματα έναντι του παράγοντα VEGF, που εμποδίζουν τη δράση του αποτρέποντας τη δέσμευσή του με τον υποδοχέα του (Al-Latayfeh et al., 2012). Εναλλακτικές

προσεγγίσεις αντιμετώπισης είναι η φωτοπηξία με τη χρήση laser, η οποία στοχεύει στην καταστροφή των αγγείων που σχηματίζονται λόγω του φαινομένου της νεοαγγείωσης και χειρουργικές επεμβάσεις όπως η υαλοειδεκτομή, που στοχεύει στην απομάκρυνση αίματος και ουλώδους ιστού από το υαλώδες σώμα (Stefansson, 2001).

Κοινό χαρακτηριστικό των διαθέσιμων μεθόδων αντιμετώπισης των αμφιβληστροειδοπαθειών είναι ότι στοχεύουν στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της κάθε διαταραχής και προκειμένου να αποτραπεί η εξέλιξη της, είναι απαραίτητη η τακτική επανάληψη τους. Στην πραγματικότητα λοιπόν, η εκάστοτε αμφιβληστροειδοπάθεια ουσιαστικά δε θεραπεύεται και ο ασθενής καλείται να επαναλαμβάνει καθορισμένες αγωγές, που ενδεχομένως έχουν σημαντικές, ανεπιθύμητες παρενέργειες. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι είναι αναγκαία η αναζήτηση νέων, θεραπευτικών προσεγγίσεων, που θα στοχεύουν στην αντιμετώπιση των πρωτογενών μηχανισμών που ευθύνονται για την παθοφυσιολογία των αμφιβληστροειδοπαθειών κι έτσι θα συμβάλλουν στη θεραπεία της εκάστοτε διαταραχής.

1.2. NADPH Οξειδάσες

Η πρώτη αναφορά για τις NADPH οξειδάσες έγινε το 1976, όταν ταυτοποιήθηκε σε ουδετερόφιλα κύτταρα η ύπαρξη ενός μεμβρανικού ενζυμικού συμπλόκου ικανού να χρησιμοποιεί μόρια NADPH ως δότες ηλεκτρονίων για την αναγωγή μορίων οξυγόνου (O₂) σε υπεροξειδίο (O₂^{•-}), ως μηχανισμό προστασίας έναντι βακτηριακών λοιμώξεων (Segal & Peters, 1976). Πιο αναλυτικά, ο ρόλος μιας NADPH οξειδάσης έγκειται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από ενδοκυττάρια μόρια NADPH, σε μόρια οξυγόνου που εντοπίζονται κατά κανόνα στο εξωκυττάριο περιβάλλον, προς σχηματισμό υπεροξειδίου, το οποίο ακολούθως μπορεί να μετασχηματιστεί σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) (Maghzal et al., 2012). Το παραγόμενο υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί μέσω επακόλουθων χημικών αντιδράσεων να οδηγήσει στο σχηματισμό επιπρόσθετων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Bedard & Krause, 2007). Με αυτόν τον τρόπο, οι NADPH οξειδάσες αποτελούν, μαζί με την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, τους δύο βασικότερους μηχανισμούς παραγωγής ROS εντός του κυττάρου (Skonieczna et al., 2017).



Εικόνα 1.2.: Η αντίδραση που καταλύει μία NADPH οξειδάση (Τροποποιημένο από: Yamazaki et al., 2011)

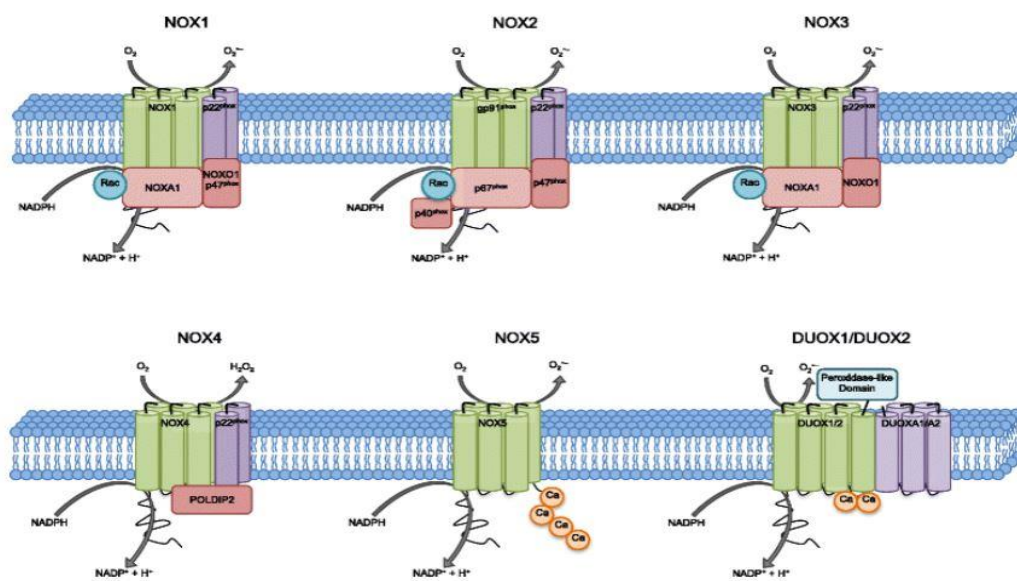
Η πρώτη ισομορφή NADPH οξειδάσης που ταυτοποιήθηκε ονομάστηκε αρχικά gp91^{phox}, ενώ πλέον είναι γνωστή ως NOX2 και αποτελεί μία από τις επτά συνολικά αναγνωρισμένες ισομορφές NADPH οξειδασών που εντάσσονται στην οικογένεια NOX. Οι εναπομείναντες ισομορφές της οικογένειας ταυτοποιήθηκαν μετά τη NOX2 κι έτσι συνολικά είναι οι: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 και DUOX1, DUOX2. Καθεμία ισομορφή παρουσιάζει διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς του σώματος, συμπεριλαμβανομένου και του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Bedard & Krause, 2007).

1.2.1. Δομή και ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών

Σε επίπεδο δομής, οι NOX ισομορφές παρουσιάζουν μεταξύ τους ορισμένες βασικές ομοιότητες, αλλά και χαρακτηριστικά που τις διαφοροποιούν. Πιο συγκεκριμένα, κάθε ισομορφή διαθέτει συνολικά έξι διαμεμβρανικές επικράτειες, εκ των οποίων οι επικράτειες III και V διαθέτουν συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης, υπεύθυνα για την δέσμευση δύο μορίων αίμης. Το καρβοξυτελικό άκρο διαθέτει θέσεις δέσμευσης μορίων FAD και NADPH. Η δομή αυτή εξασφαλίζει ότι, μετά την ενεργοποίηση του ενζυμικού συμπλόκου, ηλεκτρόνια από δεσμευμένα μόρια NADPH θα μεταφερθούν, με τη μεσολάβηση μορίων FAD και των δύο μορίων αίμης, σε εξωκυττάρια μόρια οξυγόνου (Bedard & Krause, 2007; Skonieczna et al., 2017). Πέρα από αυτό το βασικό δομικό μοτίβο, στο αμινοτελικό άκρο των ισομορφών NOX5, DUOX1 και DUOX2 εντοπίζονται επικράτειες δέσμευσης ιόντων ασβεστίου, γεγονός που καθιστά τις ισομορφές αυτές ικανές να ενεργοποιούνται μετά από αλλαγές στα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Banfi et al., 2001), ενώ οι DUOX1-2 διαθέτουν επιπρόσθετα ένα έβδομο διαμεμβρανικό τμήμα, το οποίο εξωκυττάρια περιλαμβάνει μία επικράτεια υπεροξειδάσης (Geiszt & Leto, 2004).

Σε συνθήκες ηρεμίας, κάθε NOX ισομορφή βρίσκεται σε ανενεργό κατάσταση και προκειμένου να σχηματιστεί το τελικό, ενεργό ενζυμικό σύμπλοκο, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση μεταξύ επιμέρους ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Όταν δεν υπάρχει κάποιο ερέθισμα, που να οδηγήσει σε ενεργοποίηση μιας NADPH οξειδάσης, οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται σε διακριτές θέσεις στο κυτταρόπλασμα ή προσδεμένες στις μεμβράνες ενδοκυτταρικών οργανιδίων κι αυτή η διάταξη εξασφαλίζει ότι η λειτουργία του ενζυμικού συμπλόκου θα είναι χωρικά και χρονικά καθορισμένη, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες κάθε κυττάρου και ιστού (Groemping & Rittinger, 2005). Ωστόσο, παρουσία ερεθίσματος, οι πρωτεΐνες αυτές μεταναστεύουν προς την κυτταρική

μεμβράνη, προκειμένου να συμμετέχουν, μαζί με τις διαμεμβρανικές επικράτειες, στο σχηματισμό του ενεργού συμπλόκου (Heyworth et al., 1991). Οι διαμεμβρανικές επικράτειες των NOX1-3 ισομορφών συνδέονται με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη p22^{phox}, μέσω της οποίας εξασφαλίζεται η αλληλεπίδραση με τις υπόλοιπες ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπλόκου. Για την ενεργοποίηση του συμπλόκου της NOX2 ισομορφής, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση του διαμεμβρανικού τμήματος με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες p67^{phox} και p40^{phox}, με τη μεσολάβηση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης p47^{phox}, καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση της Rac GTPάσης με την πρωτεΐνη p67^{phox} του συμπλόκου (Nauseef, 2004). Τα ενεργά σύμπλοκα των NOX1 και NOX3 ισομορφών περιλαμβάνουν τις ομόλογες πρωτεΐνες των p67^{phox} και p47^{phox}, NOXA1 και NOXO1 αντίστοιχα και την πρωτεΐνη Rac (Petry et al., 2010). Η NOX4 ισομορφή αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη p22^{phox}, ωστόσο η αλληλεπίδραση αυτή δε φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του συμπλόκου, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη ισομορφή είναι ιδιόσυστατα ενεργή (Martyn et al., 2006). Η NOX5 ισομορφή δεν αλληλεπιδρά με ρυθμιστικές πρωτεΐνες, ενώ οι DUOX1 και DUOX2 ισομορφές αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες- ενεργοποιητές DUOXA1/ DUOXA2. (Ma et al., 2017).



Εικόνα 1.2.1.: Οι επτά αναγνωρισμένες ισομορφές της οικογένειας NOX. (Ma et al., 2017)

1.2.2. Εντοπισμός των NADPH οξειδασών

Πολυάριθμες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει, κυρίως μέσω της ανίχνευσης του mRNA, την έκφραση των επιμέρους NOX ισομορφών σε όλα τα συστήματα ενός οργανισμού, με διαφορετικές ισομορφές να εκφράζονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, ιστούς και όργανα (Bedard & Krause, 2007).

Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), το πρότυπο έκφρασης των NOX ισομορφών διαφοροποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Τα διαθέσιμα δεδομένα, στην πλειονότητά τους, υποδηλώνουν ότι μόνο τα ολιγοδενδροκύτταρα δεν εκφράζουν κάποια NOX ισομορφή (Nayernia et al., 2014), αν και υπάρχουν ενδείξεις έκφρασης των DUOX1-2 ισομορφών στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (Damiano et al., 2012). Στα κύτταρα της μικρογλοίας αρχικά προσδιορίστηκε η έκφραση της NOX2 ισομορφής (Lavigne et al., 2001; Sankarapandi et al., 1998), δεδομένο που συμβαδίζει με τον ρόλο των κυττάρων αυτών ως φαγοκύτταρα στο ΚΝΣ. Ωστόσο, αργότερα ταυτοποιήθηκε επίσης η έκφραση των NOX1 (Chéret et al., 2008) και NOX4 ισομορφών στα κύτταρα της μικρογλοίας (Li et al., 2009). Οι ίδιες ισομορφές έχουν ταυτοποιηθεί και στους νευρώνες, χωρίς να εντοπίζονται σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση τους (Sorice & Krause, 2009; Tammariello et al., 2000; Vallet et al., 2005;). Στα αστροκύτταρα κυρίαρχη ισομορφή θεωρείται η NOX2, με τις NOX1 και NOX4 να έχουν επίσης ταυτοποιηθεί (Abramov et al., 2005; Nayernia et al., 2014). Η έκφραση των υπόλοιπων ισομορφών δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί με ακρίβεια, παρόλο που υπάρχοντα δεδομένα υποστηρίζουν την έκφραση της NOX3 ισομορφής στους νευρώνες (Cooney et al., 2013). Αξιοσημείωτο ωστόσο είναι το γεγονός ότι σε περιπτώσεις τραυματισμού του νευρικού ιστού και γενικότερων διαταραχών του ΚΝΣ, το πρότυπο έκφρασης των επιμέρους NOX ισομορφών διαφοροποιείται σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες (Cooney et al., 2013; McCann et al., 2008).

Σε επίπεδο αμιβληστροειδούς, δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια το πρότυπο έκφρασης των NOX ισομορφών. Δεδομένα από μελέτες πρωτογενών καλλιιεργειών αμιβληστροειδικών κυττάρων αρουραίου δείχνουν ότι οι NOX1, NOX2 και NOX4 ισομορφές εκφράζονται –μεταξύ άλλων- και σε μικρογλοιακά κύτταρα, αλλά και σε γαγγλιακά κύτταρα του αμιβληστροειδούς. Οι τρεις αυτές ισομορφές εκφράζονται επίσης στα περικότταρα του αμιβληστροειδούς, που αποτελούν τμήμα του συνδετικού ιστού, ενώ τα γλοιακά κύτταρα του αμιβληστροειδούς φαίνεται ότι εκφράζουν τις ισομορφές NOX1 και NOX4 (Wilkinson-Berka et al., 2014). Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε παράλληλα ότι και η NOX5 ισομορφή εκφράζεται στον αμιβληστροειδή του ανθρώπου, παρά την παντελή έλλειψη έκφρασής της στα τρωκτικά (Kawahara et al., 2007), αλλά και ότι στον αμιβληστροειδή, η μικρογλοία αποτελεί την κύρια πηγή ROS (Wilkinson- Berka et al., 2014).

Σκόπιμο να επισημανθεί στο σημείο αυτό είναι ότι, πέραν των επιμέρους κυτταρικών τύπων του νευρικού ιστού που ήδη αναφέρθηκαν, οι NOX ισομορφές εκφράζονται και στο αγγειακό σύστημα, τόσο του εγκεφάλου όσο και του αμιβληστροειδούς, όπου φαίνεται πώς συμμετέχουν στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου (Ago et al., 2005; Miller et al., 2005). Ειδικότερα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του αμιβληστροειδούς φαίνεται ότι εκφράζουν τις ισομορφές NOX1, NOX2 και NOX4, με τα επίπεδα έκφρασης της τελευταίας να είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τις άλλες δύο ισομορφές, γεγονός που την καθιστά κυρίαρχη υποψήφια για τις διαταραχές του αγγειακού συστήματος που παρατηρούνται στις αμιβληστροειδοπάθειες, όπως η διάσπαση του αιματο-αμιβληστροειδικού φραγμού (Li et al., 2010).

1.2.3. Ρόλος των NADPH οξειδασών

1.2.3.1. Φυσιολογία

Κατά αντιστοιχία με την ευρεία και διακριτή κατανομή τους στους ιστούς ενός οργανισμού, οι επιμέρους NOX ισομορφές εμπλέκονται σε ποικίλες και διαφορετικές μεταξύ τους λειτουργίες. Παρόλα αυτά, σε γενικές γραμμές, διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν είναι: η άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων (Segal & Peters, 1976), η κυτταρική σηματοδότηση, μέσω αλληλεπίδρασης των παραγόμενων ROS με σηματοδοτικές πρωτεΐνες, ιοντικούς διαύλους και ενδοκυττάρια μόρια ασβεστίου (Bedard & Krause, 2007), η κυτταρική διαφοροποίηση (Cucoranu et al., 2005; Suzukawa et al., 2000), η κυτταρική επιβίωση και αύξηση (Mochizuki et al., 2006), αλλά και η γήρανση και ο κυτταρικός θάνατος (Kim et al., 2002). Παράλληλα, φαίνεται να εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της έκφρασης ποικίλων γονιδίων, μέσω της αλληλεπίδρασης των ROS με επιμέρους μεταγραφικούς παράγοντες (Bedard & Krause, 2007). Οι προαναφερόμενες λειτουργίες, στις οποίες συμμετέχουν οι NOX ισομορφές, αφορούν τόσο ολόκληρο τον οργανισμό, όσο και ειδικότερα το ΚΝΣ (Nayernia et al., 2014).

1.2.3.2. Παθοφυσιολογία του ΚΝΣ

Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί άμεσα με την παθοφυσιολογία διαταραχών του ΚΝΣ. Οι NADPH οξειδάσες, ως μόρια υπεύθυνα για την παραγωγή ROS, αποτελούν ένα σύστημα που εμπλέκεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και κατ' επέκταση, θεωρείται πιθανή και η εμπλοκή τους σε διαταραχές του νευρικού ιστού και φαινόμενα νευροτοξικότητας. Επιμέρους NOX ισομορφές έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και γενικότερα την ανάπτυξη ισχαιμικών συνθηκών στο νευρικό ιστό (Casas et al., 2017; Vallet et al., 2005; Walder et al., 1997). Παράλληλα, η NOX2 ισομορφή -κυρίως μέσω της μικρογλοίας- φαίνεται να σχετίζεται με την

παθοφυσιολογία νευρολογικών διαταραχών, όπως η νόσος Alzheimer (Qin et al., 2006) και η νόσος Parkinson (Zhang et al., 2004), αλλά και με φαινόμενα απομυελίνωσης και νευροεκφύλισης γενικότερα (Fischer et al., 2012).

Επιμέρους μελέτες έχουν επίσης συσχετίσει τις NOX ισομορφές με διαταραχές του αμφιβληστροειδούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η έκφραση των NOX ισομορφών φαίνεται πώς παρουσιάζει αύξηση, όπως παρατηρήθηκε για τις NOX2 και NOX4 ισομορφές σε μοντέλα της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας: στο επαγόμενο μέσω στρεπτοζοτοκίνης μοντέλο ΔΑ (Kowluru et al., 2016) και στο γενετικό μοντέλο db/db μυών (Li et al., 2010) αντίστοιχα. Μέσω των παραγόμενων ROS, οι NOX ισομορφές θεωρείται ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε συνθήκες ισχαιμίας, επηρεάζοντας ουσιαστικά την επιβίωση των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς (Dvorianchikova et al., 2012). Σε διαγονιδιακά ποντίκια, η έκφραση στον αμφιβληστροειδή μιας ιδιόσυστατα ενεργούς παραλλαγής της Rac1 πρωτεΐνης, μίας ρυθμιστικής πρωτεΐνης απαραίτητης για την ενεργοποίηση του συμπλόκου της NOX2 ισομορφής, οδήγησε σε σημαντική αύξηση των παραγόμενων ROS εντός του ιστού, γεγονός που κατ' επέκταση συσχετίστηκε με αυξημένη απώλεια φωτοϋποδοχέων (Song et al., 2016). Παράλληλα, οι NOX ισομορφές φαίνεται να σχετίζονται με διαταραχές του αγγειακού συστήματος του αμφιβληστροειδούς, επιπλοκές που παρατηρούνται σε διάφορες μορφές αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας (Al-Shabrawey et al., 2005; Li et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, η NOX1 ισομορφή φαίνεται να συσχετίζεται με τον αγγειακό τραυματισμό και το οξειδωτικό στρες, που εκδηλώνονται σε καταστάσεις ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών (Wilkinson- Berka et al., 2014), ενώ η NOX4 ισομορφή των ενδοθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, αλλά και η NOX2 ισομορφή, πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην αύξηση των επιπέδων του παράγοντα VEGF στον

αμφιβληστροειδή και στο επακόλουθο φαινόμενο της νεοαγγείωσης (Chan et al., 2013; Wang et al., 2014). Ειδικότερα για τη NOX4 ισομορφή, έχει βρεθεί ότι η αυξημένη έκφρασή της στον αμφιβληστροειδή σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή H_2O_2 , γεγονός που συνδέεται με αυξημένη ενεργοποίηση, μέσω του παράγοντα VEGF, του υποδοχέα VEGFR2 και της ERK. Το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται ότι επάγει τελικά την εκδήλωση του φαινομένου της νεοαγγείωσης (Li et al., 2015).

Στο σημείο αυτό, κρίνεται σκόπιμη μία λεπτομερέστερη αναφορά στο ρόλο που διαδραματίζουν οι NOX ισομορφές σε φαινόμενα φλεγμονής στο ΚΝΣ, καθώς ποικίλες μελέτες υποστηρίζουν την άμεση εμπλοκή τους σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των NOX ισομορφών που εκφράζονται στα μικρογλοιακά κύτταρα έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση φλεγμονής στο νευρικό ιστό, η οποία συνδέεται άμεσα με επακόλουθους μηχανισμούς νευροεκφύλισης (Green et al., 2001). Σε καταστάσεις αυξημένης ενεργοποίησης τους, τα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν επιμέρους, τοξικούς για τους νευρώνες παράγοντες, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και οι ROS, με τις NADPH οξειδάσες να αποτελούν βασική πηγή αυτών. Πέραν όμως από την τοξική τους δράση, τα μόρια αυτά φαίνεται ότι επιδρούν σε σηματοδοτικούς μηχανισμούς, επάγοντας περαιτέρω ενεργοποίηση της μικρογλοίας, με αποτελέσματα την επιπρόσθετη απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και τη διαίωσιση της φλεγμονής στον ιστό (Qin et al., 2004). Σε αντίστοιχες περιπτώσεις, η αναστολή των NADPH οξειδασών φαίνεται ότι μπορεί να αντιστρέψει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων, δρώντας ως αντιφλεγμονώδης μηχανισμός και επάγοντας ουσιαστικά προστασία του νευρικού ιστού (Choi et al., 2012). Στον αμφιβληστροειδή, η ανάπτυξη φλεγμονής αποτελεί κρίσιμο παράγοντα κατά την εκδήλωση ποικίλων διαταραχών του ιστού, που επάγει με τη σειρά της επιπλοκές στο αγγειακό σύστημα, όπως προσκόλληση λευκοκυττάρων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, καθώς και

αυξημένη διαπερατότητα και τραυματισμό των αγγείων του ιστού, διαταραχές που χαρακτηρίζουν τις ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες (Yoshida et al., 2003). Παράλληλα, η αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από την ενεργοποιημένη μικρογλοία, έχει συσχετιστεί με αυξημένη απώλεια γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Sivakumar et al., 2011). Οι παραγόμενες μέσω των NADPH οξειδασών ROS πιστεύεται ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εκδήλωση φλεγμονής και κατ' επέκταση στις διαταραχές που συνδέονται με αυτή, καθώς τόσο η NOX2 ισομορφή (Al-Shabrawey et al., 2008), όσο και οι NOX1 και NOX4 (Deliyanti & Wilkinson-Berka, 2015) έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση φλεγμονής στον αμφιβληστροειδή.

1.2.4. Η αναστολή των NADPH οξειδασών ως θεραπευτική προσέγγιση

Η αναστολή της λειτουργίας των NADPH οξειδασών μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω γενετικής απάλειψης του γονιδίου της εκάστοτε NOX ισομορφής, είτε με τη χρήση κατάλληλων μορίων- αναστολέων της λειτουργίας των ενζύμων αυτών (Sorice et al., 2017). Μελέτες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί, έχουν συσχετίσει την αναστολή της λειτουργίας των NADPH οξειδασών με τη βελτίωση του φαινοτύπου πειραματόζωων σε διάφορα μοντέλα διαταραχών του ΚΝΣ, όπως η νόσος Alzheimer (Qin et al., 2006), η νόσος Parkinson (Zhang et al., 2004) και το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Casas et al., 2017). Ειδικότερα στον αμφιβληστροειδή, έχει ήδη βρεθεί ότι η αναστολή της λειτουργίας επιμέρους NOX ισομορφών, συμβάλλει στη μείωση της νεοαγγείωσης και της γενικότερης διαταραχής του αγγειακού συστήματος του αμφιβληστροειδούς σε διάφορα μοντέλα ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως το μοντέλο της αμφιβληστροειδοπάθειας της προωρότητας (Oxygen-Induced Retinopathy, OIR) (Al-Shabrawey et al., 2005; Chan et al., 2013; Wang et al., 2014; Wilkinson-Berka et al., 2014) και ένα γενετικό μοντέλο (db/db μύες) της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Li

et al., 2010). Παράλληλα, φαίνεται πιθανή η αντιφλεγμονώδης δράση των NOX αναστολέων – για τις ισομορφές NOX2 και NOX1-4- στις διαταραχές του αμφιβληστροειδούς (Al-Shabrawey et al., 2008; Deliyanti & Wilkinson- Berka, 2015). Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις παρούσες μελέτες υποδηλώνουν ότι στις διαταραχές του αμφιβληστροειδούς εμπλέκονται κυρίως τρεις ισομορφές NOX, οι: NOX1, NOX2 και NOX4. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι οι επιμέρους μελέτες της πιθανής προστατευτικής δράσης των NOX αναστολέων σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, θα πρέπει να στοχεύουν στην αναστολή της δράσης των συγκεκριμένων ισομορφών.

Οι διαταραχές του αγγειακού συστήματος και η ανάπτυξη φλεγμονής αποτελούν σημαντικές πτυχές στην παθοφυσιολογία των περισσότερων αμφιβληστροειδοπαθειών. Ωστόσο, εξίσου κρίσιμη θεωρείται και η απώλεια νευρώνων του αμφιβληστροειδούς, η οποία μάλιστα θα οδηγήσει τελικά στην τύφλωση, αν δεν αντιμετωπιστεί κατάλληλα. Σε *in vitro* καλλιέργειες γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς βρέθηκε ότι η αναστολή των NOX ισομορφών δρα προστατευτικά για τα κύτταρα, εμποδίζοντας την υπέρμετρη παραγωγή ROS και την επικείμενη ανάπτυξη ισχαιμικών συνθηκών (Dvorianchikova et al., 2012). Παράλληλα, η απάλειψη του γονιδίου της NOX2 ισομορφής βρέθηκε να περιορίζει τον κυτταρικό θάνατο και την απώλεια γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή στο μοντέλο ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης (Yokota et al., 2011). Παρόλα αυτά, η πλειονότητα των διαθέσιμων μελετών εστιάζει στη δράση των NOX αναστολέων έναντι της φλεγμονής και των διαταραχών του αγγειακού συστήματος του αμφιβληστροειδούς. Αναμφίβολα, τα δεδομένα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα και σημαντικά, αλλά πλέον κρίνεται σκόπιμη η λεπτομερέστερη μελέτη των NOX αναστολέων σε επίπεδο νευροπροστασίας, προκειμένου να διασαφηνιστεί αν μία τέτοια προσέγγιση μπορεί να δράσει ωφέλιμα έναντι σε όλες τις πτυχές που ευθύνονται για την ανάπτυξη αμφιβληστροειδοπάθειας.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου των NOX ισομορφών στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, στον αμφιβληστροειδή επίμυον και κυρίως η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των NOX αναστολέων ως νευροπροστατευτικά και αντιφλεγμονώδη θεραπευτικά μέσα. Ειδικότερα σε επίπεδο νευροπροστασίας, τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι περιορισμένα κι έτσι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας αναμένεται να συμβάλλουν στην περαιτέρω κατανόηση και αποσαφήνιση του ρόλου των NOX αναστολέων στην αντιμετώπιση διαταραχών του αμφιβληστροειδούς. Παράλληλα, η διεγερτοτοξικότητα αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία ποικίλων διαταραχών του αμφιβληστροειδούς και σχετίζεται άμεσα με τα φαινόμενα της νευροτοξικότητας, του κυτταρικού θανάτου και της φλεγμονής, που χαρακτηρίζουν τις καταστάσεις αυτές. Επομένως, ο προσδιορισμός μορίων ικανών να δράσουν προστατευτικά έναντι των επιβλαβών επιπτώσεων της διεγερτοτοξικότητας παρέχει μία σημαντική βάση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση των αμφιβληστροειδοπαθειών.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Πειραματόζωα

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι επίμυες Sprague-Dawley, θηλυκού και αρσενικού γένους (βάρους: 200-300g). Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, τα πειραματόζωα διατηρούνταν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού (θερμοκρασία δωματίου, 12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι) και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με βάση τον Οδηγό για τη Φροντίδα και τη Χρήση των Εργαστηριακών Ζώων (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals), 8η έκδοση (2011) και σε συμφωνία με την Ελληνική Εθνική Νομοθεσία (Π.Δ. 160/1991).

3.2. In vivo μοντέλο AMPA διεγερτοτοξικότητας

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν μοντέλο, αρχικά αναισθητοποιήθηκαν μέσω ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης κεταμίνης (100mg/kg) και ξυλαζίνης (10mg/kg) και με τη βοήθεια στερεοταξικής συσκευής σταθεροποιήθηκε το κεφάλι τους. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν ενδοβολβικές χορηγήσεις, με τη χρήση βελόνων 27G που είχαν συνδεθεί μέσω σύριγγας Hamilton με μικροαντλία, ρυθμισμένη να χορηγεί σε κάθε ξεχωριστή χορήγηση 5μl του εκάστοτε διαλύματος, με ρυθμό ροής 1μl/min. Η χορήγηση γινόταν εντός του υαλώδους υγρού του οφθαλμού και κάθε ένας οφθαλμός αποτελούσε ένα μεμονωμένο δείγμα. Οι χορηγήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν: 50mM PBS (δείγματα ελέγχου-control), 8,4mM AMPA (Tocris, 1074, αραιωμένο σε 50mM PBS), AMPA+ VAS2870 (Sigma-Aldrich, SML0273, οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ήταν οι: 10^{-6} M, 10^{-5} M και 10^{-4} M, αραιωμένο σε 50mM PBS) και AMPA+ ML171 (EMD Millipore, 492002, οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ήταν οι: 10^{-5} M και 10^{-4} M, αραιωμένο σε 50mM PBS). Οι ουσίες VAS2870 και ML171 επιλέχθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή προστατευτική δράση των NOX αναστολέων στο

συγκεκριμένο μοντέλο, καθώς αποτελούν αναστολείς όλων των NOX ισομορφών και της NOX1 ισομορφής, αντίστοιχα.

3.3. Απομόνωση και προετοιμασία του ιστού

3.3.1 Για ανοσοϊστοχημικές μελέτες

Στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, 24 ώρες μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν μέσω εισπνοής αιθέρα και απομονώθηκαν οι οφθαλμοί τους. Αρχικά, οι οφθαλμοί τοποθετήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για 45 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρέθηκαν ο κερατοειδής χιτώννας, ο φακός και το υαλώδες υγρό (πρόσθιος πόλος) και οι απομονωμένοι οπίσθιοι πόλοι επανατοποθετήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για 90 λεπτά, για περαιτέρω μονιμοποίηση. Στο επόμενο βήμα, οι ιστοί επωάστηκαν για 24 ώρες σε διάλυμα σουκρόζης 30% για κρυοπροστασία και στη συνέχεια καλύφθηκαν με optimal cutting temperature compound (OCT, VWR Chemicals, 361603E), καταψύχθηκαν για 1 λεπτό σε ισοπεντάνιο, στους -45°C και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

Για να είναι δυνατή η χρήση τους σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες, οι ιστοί κόπηκαν κατακόρυφα με τη βοήθεια κρυοτόμου (Leica CM1850). Συνολικά, για κάθε οφθαλμό χρησιμοποιήθηκαν 4 ξεχωριστές, ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες τοποθετούνταν διαδοχικά τομές, πάχους 10μm η καθεμία. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα περιελάμβανε 8 τομές και μετά την προετοιμασία τους, οι πλάκες διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες.

3.3.2. Για ανάλυση μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Για ανάλυση μέσω RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν αμφιβληστροειδείς που απομονώθηκαν από οφθαλμούς, στους οποίους είχε γίνει ενδοβολβική χορήγηση είτε 50mM PBS (δείγματα ελέγχου-control), είτε 8.4mM AMPA. Συνολικά για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα- αμφιβληστροειδείς (3 δείγματα ελέγχου και 3 δείγματα AMPA). Αμέσως μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις, απομονώθηκαν οι οφθαλμοί, αφαιρέθηκε ο πρόσθιος πόλος και απομονώθηκαν οι αμφιβληστροειδείς, οι οποίοι διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

3.4. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες

Στις ανοσοϊστοχημικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα: αντίσωμα έναντι της εγκεφαλικής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (brain Nitric Oxide Synthase, bNOS, Sigma, N7280) σε αραιώση 1:2000, αντίσωμα έναντι της όξινης γλοιακής ινδικής πρωτεΐνης (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP, Sigma, G3893) σε αραιώση 1:2000, αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba-1, WAKO, 019-19741) σε αραιώση 1:2500 και αντίσωμα έναντι της NOX1 ισομορφής (NOVUS, NBP1-31546) σε αραιώση 1:2000. Κατά την έναρξη του πειράματος, οι τομές αφέθηκαν αρχικά για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M TBS (Tris-buffered saline). Στη συνέχεια, προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης, οι τομές επώαστηκαν για 30 λεπτά με διάλυμα που περιείχε 3,3% φυσιολογικό ορό αίγας (Normal Goat Serum, NGS) σε 0.1M TBS. Μετά από 3 διαδοχικές πλύσεις με 0.1M TBS, οι τομές επώαστηκαν για 16-18 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 0.1M TBS, που περιείχε 0.5% NGS και 0.3% Triton X-100. Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη της NOX1 ισομορφής η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα έγινε σε θερμοκρασία +4°C. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές πλύσεις με 0.1M TBS

και οι τομές επώστηκαν για 1,5-2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, με το κατάλληλο σε κάθε περίπτωση δευτερογενές αντίσωμα: CF543 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Biotium, 20309) σε αραιώση 1:1000 για bNOS, Iba-1 και NOX1 και CF488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Biotium, 20010) σε αραιώση 1:400 για GFAP. Αφού πραγματοποιήθηκαν ξανά 3 πλύσεις με 0.1M TBS, οι αντικειμενοφόρες πλάκες σκουπίστηκαν προσεκτικά για να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρού, καλύφθηκαν με τη βοήθεια καλυπτικού μέσου (Ever Brite Mounting Medium with DAPI, Biotium, 23002) και καλυπτρίδων και διατηρήθηκαν στους +4°C μέχρι την μικροσκοπική παρατήρηση τους.

3.5. Μικροσκοπική Παρατήρηση

Για την παρατήρηση των τομών μετά τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DMLB) και οι φωτογραφίες ελήφθησαν με τη βοήθεια κάμερας (Leica DC 300F). Οι προσαρμογές φωτεινότητας και αντίθεσης έγιναν με τη βοήθεια του λογισμικού Photoshop (Adobe Photoshop, version 14.0).

3.6. Ποσοτικοποίηση

Για τον προσδιορισμό της bNOS ανοσοδραστικότητας υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των θετικών bNOS κυττάρων σε 3 διακριτές τομές κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας (3 μετρήσεις/ αμφιβληστροειδή), με τη βοήθεια φακού x40 μεγέθυνσης. Για την πρωτεΐνη GFAP, με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ υπολογίστηκε η μέση πυκνότητα φθορισμού για τις στιβάδες GCL έως ONL, σε 2 φωτογραφίες (x20 μεγέθυνση) για κάθε μία εκ των 3 τομών που παρατηρήθηκαν για κάθε αμφιβληστροειδή (συνολικά 6 μετρήσεις/αμφιβληστροειδή). Για τον προσδιορισμό της Iba-1 ανοσοδραστικότητας, μετρήθηκαν τα θετικά Iba-1 κύτταρα, σε 2 φωτογραφίες (x20 μεγέθυνση) για κάθε μία εκ των 3 τομών που παρατηρήθηκαν για κάθε αμφιβληστροειδή (συνολικά 6 μετρήσεις/αμφιβληστροειδή) και ο αριθμός τους κανονικοποιήθηκε ως προς τη συνολική

περιοχή μέτρησης (από τη στιβάδα GCL έως τη στιβάδα INL). Για κάθε αμφιβληστροειδή, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των διακριτών μετρήσεων και για τις πρωτεΐνες bNOS και GFAP τα δεδομένα εκφράστηκαν ως 100% των δειγμάτων ελέγχου.

3.7. Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων των ανοσοϊστοχημικών μελετών για τις πρωτεΐνες bNOS, GFAP και Iba-1 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism, Version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean \pm SEM και η αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ των προς εξέταση ομάδων έγινε με τη χρήση ανάλυσης one-way ANOVA, ακολουθούμενης από έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων μέσω της δοκιμασίας Newman-Keuls. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$.

3.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

3.8.1. Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του

Η απομόνωση του ολικού RNA από ομογενοποιημένους αμφιβληστροειδείς έγινε με τη βοήθεια του kit NucleoSpin, RNA (Macherey- Nagel, 740955.50). Για την ομογενοποίηση του απομονωμένου ιστού, κάθε αμφιβληστροειδής ξεχωριστά περάστηκε αρχικά περίπου 10 φορές από βελόνα 23G, με τη βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης του 1ml και ακολούθως περίπου 10 φορές από βελόνα 30G, με τη βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης των 0,5ml και στη συνέχεια, σε κάθε ομογενοποίημα προστέθηκαν 350μl Buffer RA1 και 3,5μl DTT (τελική συγκέντρωση DTT: 20mM) και έγινε ανάδευση (vortex) όλων των δειγμάτων. Ακολούθησε φιλτράρισμα των ομογενοποιημάτων με τη χρήση φίλτρου (NucleoSpin Filter) και μέσω φυγοκέντρησης (11.000g, 1 λεπτό). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 350μl αιθανόλης (70%) σε κάθε ομογενοποίημα και έγινε ανάμιξη με τη βοήθεια πιπέτας (up and down 5 φορές). Για την απομόνωση του RNA από κάθε δείγμα

χρησιμοποιήθηκαν στήλες (περιλαμβάνονταν στο kit), οι οποίες ουσιαστικά περιέχουν μεμβράνη πάνω στην οποία θα δεσμευτεί το RNA κάθε δείγματος (Spin column- based nucleic acid purification). Έτσι, κάθε ομογενοποίηση αναδεύτηκε 2-3 φορές με τη βοήθεια πιπέτας, προστέθηκε στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση (11.000g, 30 δευτερόλεπτα). Με το βήμα αυτό εξασφαλίζεται η απομάκρυνση πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, κάθε στήλη, που θεωρητικά πλέον περιείχε δεσμευμένα στη μεμβράνη μόνο τα νουκλεϊκά οξέα κάθε δείγματος, μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf και ακολούθησε η απομάκρυνση καταλοίπων αλάτων από τη μεμβράνη, με την προσθήκη 350μl του διαλύματος MDB και φυγοκέντρηση (11.000g, 1 λεπτό). Ακολούθως, για την πέψη του DNA σε κάθε δείγμα, στο κέντρο κάθε μεμβράνης προστέθηκαν 95μl διαλύματος DNAσης κι έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο επόμενο βήμα, για την απενεργοποίηση της DNAσης, στη στήλη προστέθηκαν 200μl διαλύματος RAW2 κι έγινε φυγοκέντρηση (11.000g, 30 δευτερόλεπτα), ενώ ακολούθησαν 2 πλύσεις της μεμβράνης (με διάλυμα RA3, 600μl και φυγοκέντρηση 11.000g/30 δευτερόλεπτα η πρώτη πλύση, 250μl και φυγοκέντρηση 11.000g/2 λεπτά η δεύτερη πλύση). Τέλος, κάθε στήλη μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο erpendorf που παρείχε το kit και έγινε έκλυση του RNA με 50μl RNase-free H₂O και φυγοκέντρηση (11.000g/1 λεπτό). Τα συνολικά βήματα που ακολουθήθηκαν βασίστηκαν στο πρωτόκολλο που παρείχε η εταιρεία του kit που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια, για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ολικού απομονωμένου RNA, μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης (OD_{260/280}). Για την αξιολόγηση της ακεραιότητας του απομονωμένου RNA κάθε δείγματος, 3μl RNA για κάθε ένα από τα 6 δείγματα φορτώθηκαν και αναλύθηκαν σε gel αγαρόζης. Ακολούθως, ελέγχθηκε η έκφραση των ριβοσωμικών μπαντών 28S και 18S για κάθε δείγμα.

3.8.2. Σύνθεση cDNA

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στην RT-PCR ανάλυση, για κάθε δείγμα, έγινε σύνθεση cDNA, με βάση το RNA που απομονώθηκε σε κάθε περίπτωση και με τη βοήθεια του kit PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis (TAKARA, 6110A). Η σύνθεση έγινε με βάση το πρωτόκολλο που περιείχε το συγκεκριμένο kit. Στο πρώτο βήμα, 8μl από κάθε δείγμα απομονωμένου RNA αναμίχθηκαν με 1μl του διαλύματος του Oligo dT εκκινητή και με 1μl του μίγματος των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), το μίγμα θερμάνθηκε για 5 λεπτά στους 65°C και ακολούθως τοποθετήθηκε σε πάγο. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκε για κάθε δείγμα το μίγμα αντίδρασης για τη σύνθεση του cDNA, προσθέτοντας συνολικά: 10μl από το μίγμα του RNA με τον εκκινητή και τα dNTPs, 4μl 5X PrimeScript Buffer, 0,5μl RNase Inhibitor, 1μl PrimeScript RT και 4,5μl RNase-free H₂O. Ακολούθησε ήπια ανάμιξη και επώαση στους 42°C για 45 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 70°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο.

3.8.3. RT-PCR

Στο τελικό βήμα έγινε η RT-PCR ανάλυση με στόχο τον έλεγχο της έκφρασης των NOX1, NOX2 και NOX4 ισομορφών στα 6 συνολικά δείγματα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Ισομορφή	Εκκινητής	Αλληλουχία
NOX1	Πρόσθιος (Forward)	5'-GACCAATGTGGGACAATGAGTTT-3'
	Αντίστροφος (Reverse)	5'-GGAGGGCCGCAT AAGAAAA-3'
NOX2	Πρόσθιος	5'-CGCATGCTTTTGAGTGGTTC-3'
	Αντίστροφος	5'-AAGTGATTGGCCTGAGATTCATC-3'
NOX4	Πρόσθιος	5'-CTGGACAGAAAGATTCCGAGATTT-3'
	Αντίστροφος	5'-GAATGAAGGGCAGAATCTCAGA-3'

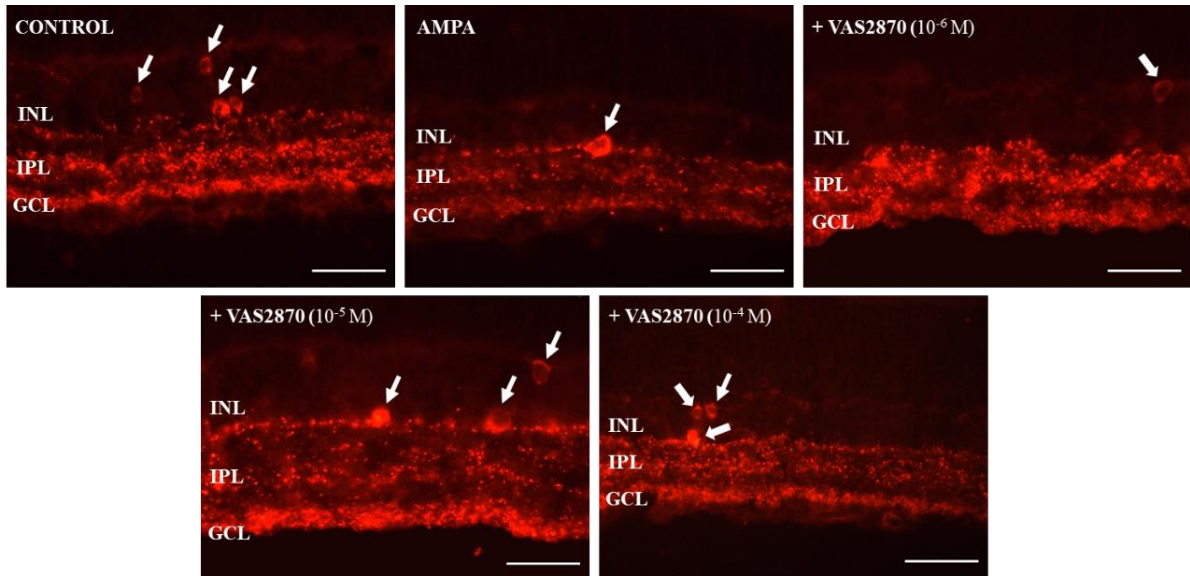
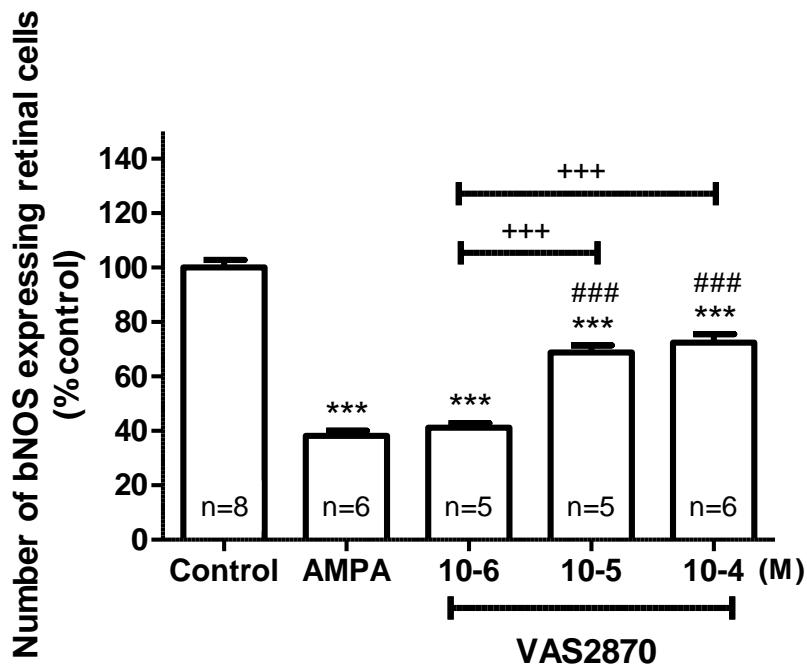
Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα, αναμίχθηκαν: 2μl του αντίστοιχου cDNA, 2μl 10X PCR Buffer, 2μl dNTPs, 1μl του κατάλληλου πρόσθιου εκκινητή, 1μl του κατάλληλου αντίστροφου εκκινητή, 0,7μl Taq πολυμεράσης και 11,3μl dH₂O (τελικός όγκος 20μl). Το συνολικό πρόγραμμα της RT-PCR ανάλυσης, για τις τρεις ισομορφές NOX, περιλάμβανε: 5 λεπτά στους 94°C, στη συνέχεια, για 32 συνολικά κύκλους: 30 δευτερόλεπτα στους 94°C (αποδιάταξη), 30 δευτερόλεπτα στους 58°C (προσαρμογή εκκινητών), 30 δευτερόλεπτα στους 72°C (επιμήκυνση), ακολούθως 5 λεπτά στους 72°C και φύλαξη στους 4°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν σε gel αγαρόζης και οι μπάντες οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Νευροπροστατευτικές επιδράσεις των NOX αναστολέων στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας

4.1.1. Δοσοεξαρτώμενη μελέτη της νευροπροστατευτικής επίδρασης του αναστολέα VAS2870 στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας

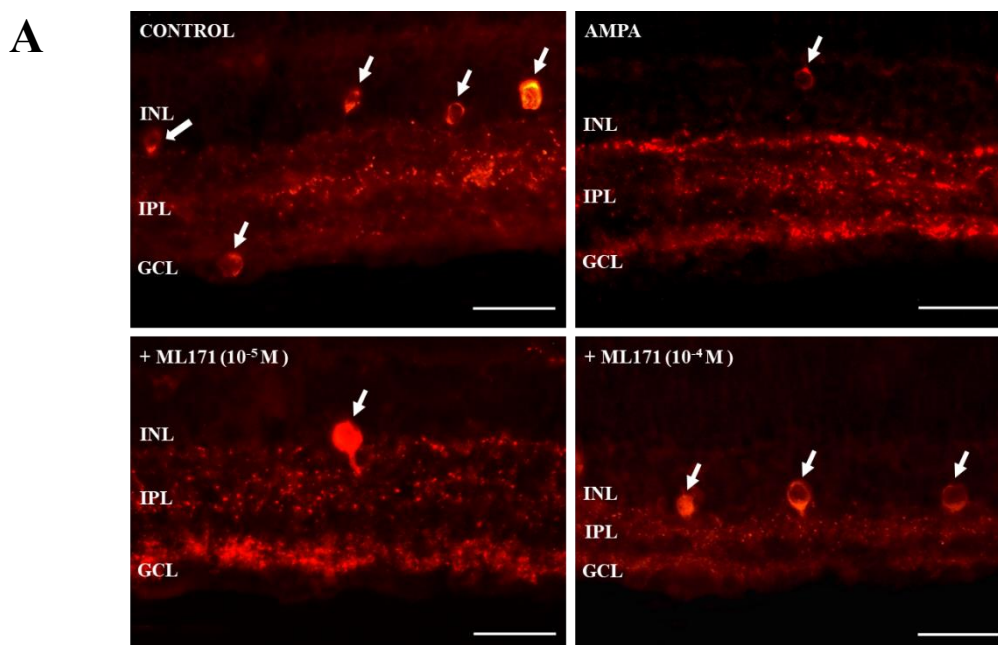
Προκειμένου να αξιολογηθεί η νευροπροστατευτική δράση του αναστολέα όλων των NOX ισομορφών, VAS2870 στην επαγόμενη από AMPA διεγερτοτοξικότητα πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες με αντίσωμα έναντι της εγκεφαλικής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (brain nitric oxide synthetase, bNOS) και προσδιορίστηκε ο αριθμός των bNOS θετικών κυττάρων στις επιμέρους ομάδες μελέτης. Ο αναστολέας συγχορηγήθηκε με AMPA σε 3 διαφορετικές δόσεις: 10^{-6} M, 10^{-5} M και 10^{-4} M. Η bNOS ανοσοδραστικότητα εντοπίζεται στα κυτταρικά σώματα των αμακρυνικών κυττάρων στην έσω πυρηνική στιβάδα (INL), σε απομακρυσμένα κυτταρικά σώματα των αμακρυνικών κυττάρων στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL), καθώς και στις απολήξεις των αμακρυνικών κυττάρων στην έσω δικτυωτή στιβάδα (IPL). Η χορήγηση του AMPA προκάλεσε μείωση της τάξης του 62% στο συνολικό αριθμό των bNOS θετικών κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (** $p < 0.001$ σε σχέση με το control). Ο αναστολέας όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, προσέφερε μερική νευροπροστασία μόνο στις δύο μεγαλύτερες δόσεις που εξετάστηκαν, με τις δόσεις των 10^{-5} M και 10^{-4} M να οδηγούν σε επαναφορά της τάξης του 69% και 72% επί των control, αντίστοιχα (** $p < 0.001$ σε σχέση με το control, ### $p < 0.001$ σε σχέση με το AMPA, +++ $p < 0.001$ σε σχέση με τη δόση των 10^{-6} M). Η δόση των 10^{-6} M δεν παρείχε καμία νευροπροστασία (** $p < 0.001$ σε σχέση με το control), σε αντίθεση με τις δόσεις των 10^{-5} M και 10^{-4} M. (Εικόνα 4.1.1.)

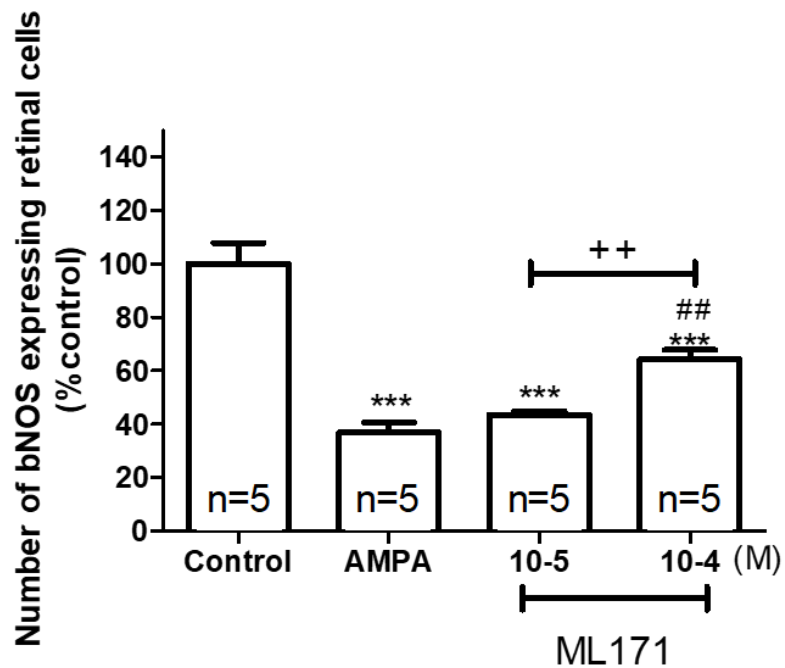
A**B**

Εικόνα 4.1.1.: Δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις του αναστολέα VAS2870 στους αμφιβληστροειδικούς νευρώνες στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. **A:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες bNOS ανοσοδραστικότητας από control, AMPA και AMPA + VAS2870 (10^{-6} M, 10^{-5} M ή 10^{-4} M) αμφιβληστροειδείς επίμους, 24h μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις (τα βέλη απεικονίζουν τα θετικά για bNOS κύτταρα). Μεγέθυνση $\times 40$. Scale bar: 50 μ m. INL: Inner Nuclear Layer. IPL: Inner Plexiform Layer, GCL: Ganglion Cell Layer. **B:** Μελέτη ποσοτικοποίησης της bNOS ανοσοδραστικότητας σε control, AMPA και AMPA + VAS2870 (10^{-6} M, 10^{-5} M ή 10^{-4} M) αμφιβληστροειδείς επίμους. (***) $p < 0.001$ σε σχέση με το control, (###) $p < 0.001$ σε σχέση με το AMPA, (+++) $p < 0.001$ σε σχέση με το AMPA+ VAS2870 10^{-6} M).

4.1.2. Δοσοεξαρτώμενη μελέτη της νευροπροστατευτικής επίδρασης του αναστολέα της NOX1 ισομορφής, ML171 στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας

Για την αξιολόγηση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης που παρέχει η αναστολή της NOX1 ισομορφής, χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός έναντι αυτής αναστολέας ML171 και προσδιορίστηκε η bNOS ανοσοδραστικότητα στις ομάδες μελέτης. Ο αναστολέας συγχορηγήθηκε με AMPA σε 2 διαφορετικές δόσεις: 10^{-5} M και 10^{-4} M. Η χορήγηση του AMPA οδήγησε ξανά σε μείωση 63% του συνολικού αριθμού των bNOS κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($***p < 0.001$ σε σχέση με το control). Μόνο η μεγαλύτερη δόση του αναστολέα ML171 που εξετάστηκε (10^{-4} M) οδήγησε σε μερική νευροπροστασία, επαναφέροντας τα επίπεδα των bNOS θετικών κυττάρων στο 64% της ομάδας ελέγχου ($***p < 0.001$ σε σχέση με το control, $##p < 0.01$ σε σχέση με το AMPA, $++p < 0.01$ σε σχέση με τη δόση των 10^{-5} M). Η δόση των 10^{-5} M δεν είχε καμία νευροπροστατευτική επίδραση ($***p < 0.001$ σε σχέση με το control), σε αντίθεση με τη δόση των 10^{-4} M. (Εικόνα 4.1.2.)

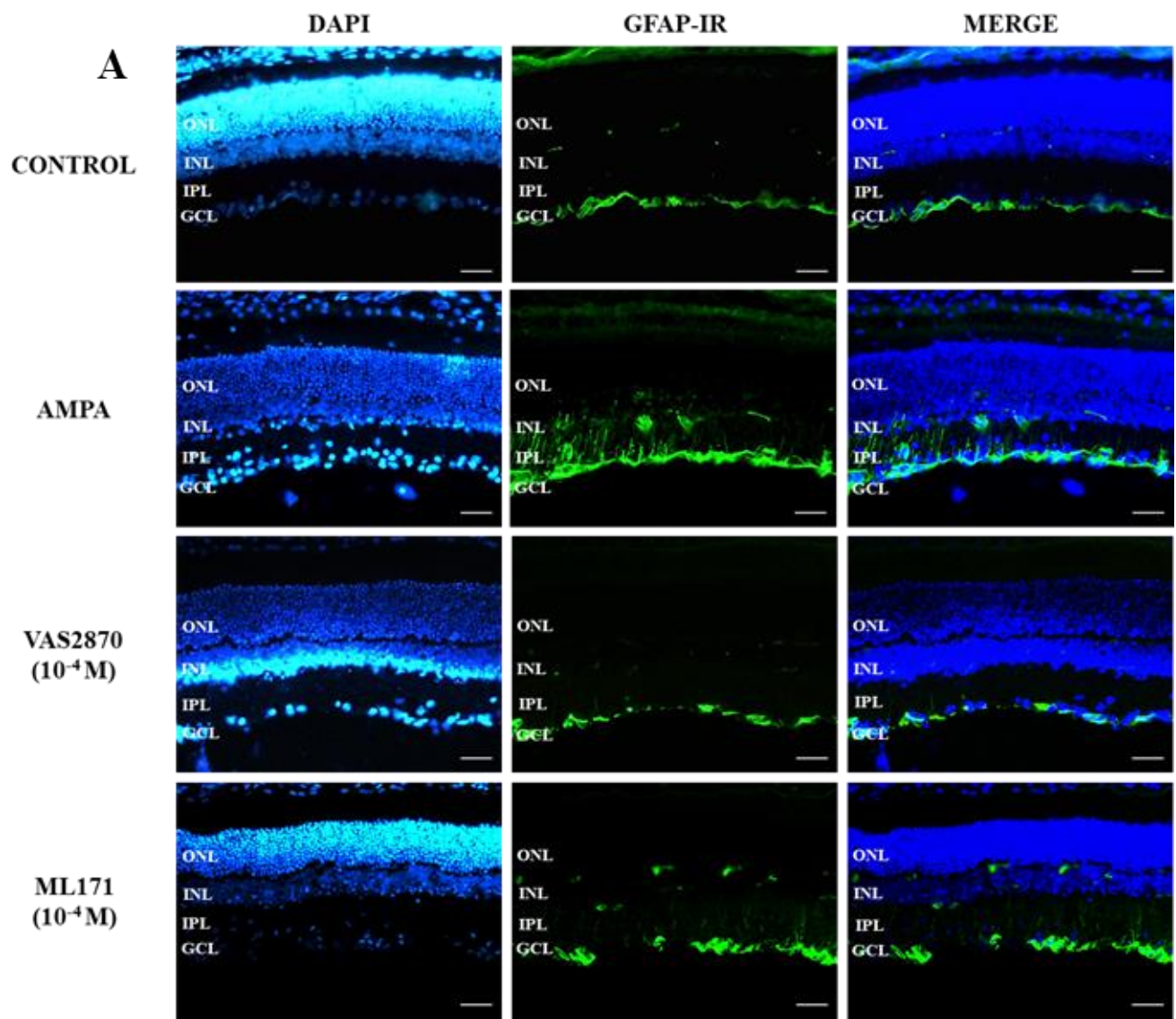


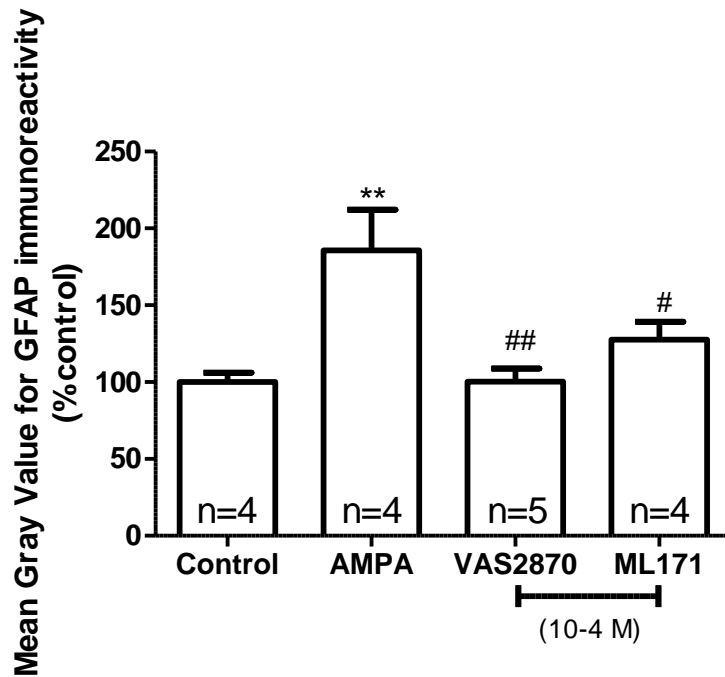
B

Εικόνα 4.1.2.: Δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις του αναστολέα της NOX1 ισομορφής, ML171, στους αμφιβληστροειδικούς νευρώνες στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. **A:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες bNOS ανοσοδραστικότητας από control, AMPA και AMPA + ML171 (10⁻⁵ M ή 10⁻⁴ M) αμφιβληστροειδείς επίμυος, 24h μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις (τα βέλη απεικονίζουν τα θετικά για bNOS κύτταρα). Μεγέθυνση x40. Scale bar: 50μm. INL: Inner Nuclear Layer. IPL: Inner Plexiform Layer, GCL: Ganglion Cell Layer. **B:** Μελέτη ποσοτικοποίησης της bNOS ανοσοδραστικότητας σε control, AMPA και AMPA + ML171 (10⁻⁵ M ή 10⁻⁴ M) αμφιβληστροειδείς επίμυος. (**p < 0.001 σε σχέση με το control, ##p < 0.01 σε σχέση με το AMPA, ++p < 0.01 σε σχέση με το AMPA+ ML171 10⁻⁵ M).

4.2. Επιδράσεις των NOX αναστολέων στη μακρογλοία, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας

Οι επιδράσεις των NOX αναστολέων, VAS2870 και ML171, στη μακρογλοία και την ενεργοποίησή της, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, αξιολογήθηκαν μέσω του προσδιορισμού της ανοσοδραστικότητας για την πρωτεΐνη GFAP στις ακόλουθες ομάδες μελέτης: control, AMPA, AMPA + VAS2870 (10^{-4} M) και AMPA + ML171 (10^{-4} M). Η χορήγηση του AMPA οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση της GFAP ανοσοδραστικότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (** $p < 0.01$ σε σχέση με το control). Η συγχορήγηση του AMPA με τον αναστολέα όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, στη δόση των 10^{-4} M, απέτρεψε την ενεργοποίηση της μακρογλοίας, οδηγώντας σε μείωση, της τάξης του 86% , της GFAP ανοσοδραστικότητας σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο AMPA (## $p < 0.01$ σε σχέση με το AMPA). Παράλληλα, ο αναστολέας της NOX1 ισομορφής, ML171, στην δόση των 10^{-4} M, προκάλεσε 58% μείωση της GFAP ανοσοδραστικότητας σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο AMPA (# $p < 0.05$ σε σχέση με το AMPA). (Εικόνα 4.2.)

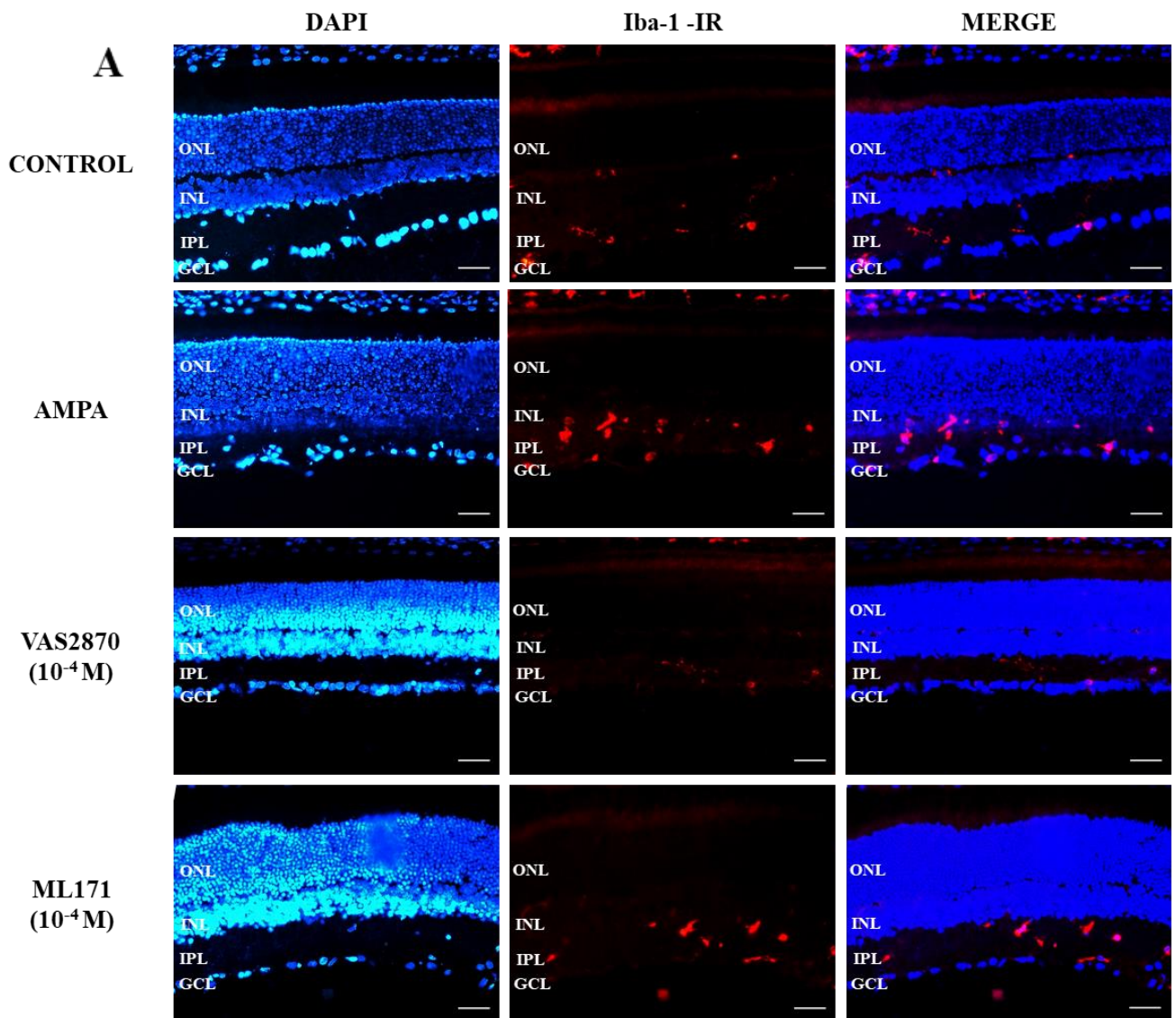


B

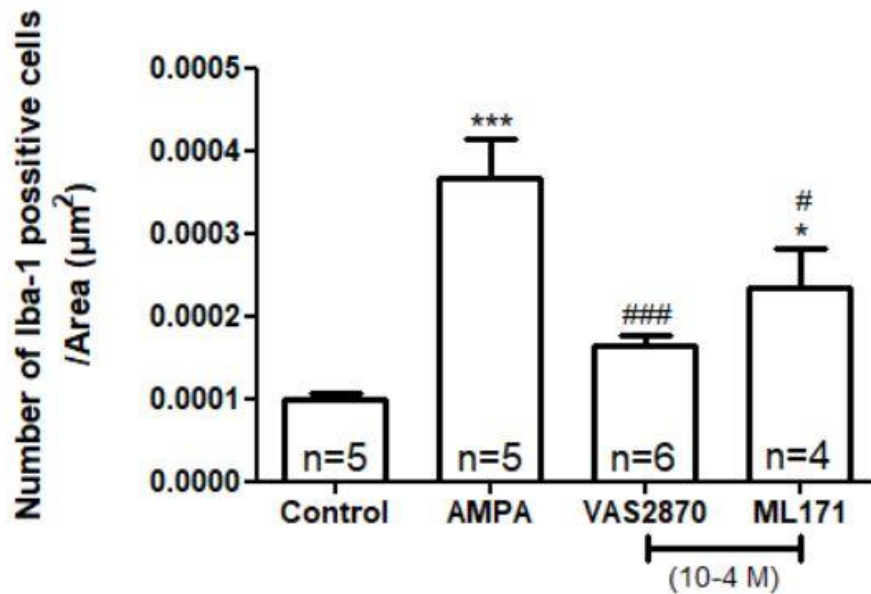
Εικόνα 4.2.: Επίδραση των NOX αναστολέων, VAS2870 και ML171, στην ενεργοποίηση της μακρογλοίας, στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. Α: Αντιπροσωπευτικές εικόνες GFAP ανοσοδραστικότητας από control, AMPA, AMPA + VAS2870 (10^{-4} M) και AMPA + ML171 (10^{-4} M) αμφιβληστροειδείς επίμυος, 24h μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις. Μεγέθυνση x20. Scale bar: 50 μ m. ONL: Outer Nuclear Layer. INL: Inner Nuclear Layer. IPL: Inner Plexiform Layer, GCL: Ganglion Cell Layer. Οι αντίστοιχες εικόνες DAPI και Merge παρουσιάζονται σε κάθε περίπτωση. **Β:** Μελέτη ποσοτικοποίησης της GFAP ανοσοδραστικότητας σε control, AMPA, AMPA + VAS2870 (10^{-4} M) και AMPA + ML171 (10^{-4} M) αμφιβληστροειδείς επίμυος. (**p< 0.01 σε σχέση με το control, ##p< 0.01 και #p< 0.05 σε σχέση με το AMPA).

4.3. Επιδράσεις των NOX αναστολέων στη μικρογλοία, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των NOX αναστολέων, VAS2870 και ML171, στη μικρογλοία, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, προσδιορίστηκε ο αριθμός των Iba-1 θετικών κυττάρων στις ακόλουθες ομάδες μελέτης: control, AMPA, AMPA + VAS2870 10^{-4} M και AMPA + ML171 10^{-4} M. Η χορήγηση του AMPA οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού των Iba-1 θετικών κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (** $p < 0.001$ σε σχέση με το control). Ο αναστολέας όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, όταν συγχρηγήθηκε με το AMPA, στη δόση των 10^{-4} M, οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση του αριθμού των Iba-1 θετικών κυττάρων σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο AMPA (### $p < 0.001$ σε σχέση με το AMPA). Η συγχρηγήση του AMPA με τον ειδικό έναντι της NOX1 ισομορφής αναστολέα, ML171, στη δόση των 10^{-4} M, επίσης προκάλεσε μείωση του αριθμού των Iba-1 θετικών κυττάρων σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο AMPA (# $p < 0.05$ σε σχέση με το AMPA, * $p < 0.05$ σε σχέση με το control). (Εικόνα 4.3.)



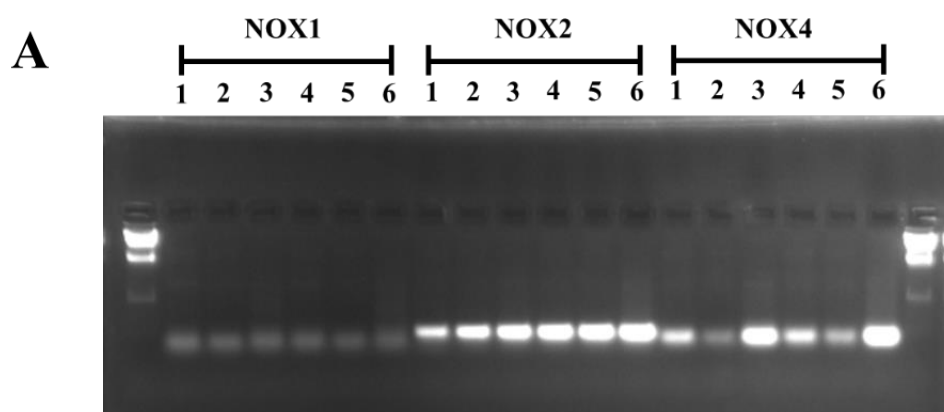
B

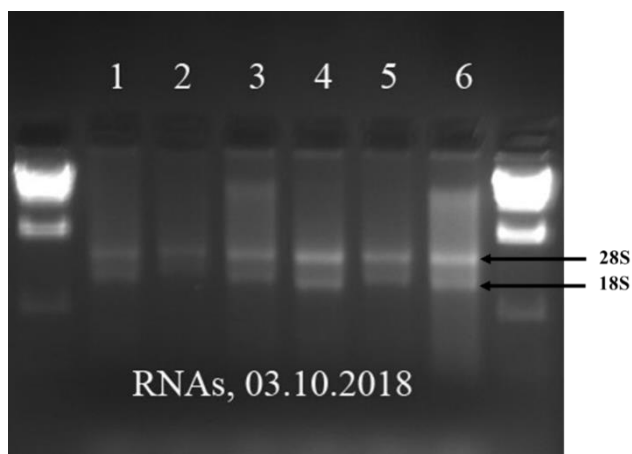


Εικόνα 4.3.: Επίδραση των NOX αναστολέων, VAS2870 και ML171, στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας, στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. Α: Αντιπροσωπευτικές εικόνες Iba-1 ανοσοδραστικότητας από control, AMPA, AMPA + VAS2870 (10^{-4} M) και AMPA + ML171 (10^{-4} M) αμφιβληστροειδείς επίμους, 24h μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις. Μεγέθυνση x20. Scale bar: 50μm. ONL: Outer Nuclear Layer. INL: Inner Nuclear Layer. IPL: Inner Plexiform Layer, GCL: Ganglion Cell Layer. Οι αντίστοιχες εικόνες DAPI και Merge παρουσιάζονται σε κάθε περίπτωση. **Β:** Μελέτη ποσοτικοποίησης της Iba-1 ανοσοδραστικότητας σε control, AMPA, AMPA + VAS2870 (10^{-4} M) και AMPA + ML171 (10^{-4} M) αμφιβληστροειδείς επίμους. (**p < 0.001 και *p < 0.05 σε σχέση με το control, ##p < 0.01 και #p < 0.05 σε σχέση με το AMPA).

4.4. Ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των ισομορφών NOX1, NOX2 και NOX4 στον αμφιβληστροειδή επίμυος, στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας

Σκοπός της παρούσας πειραματικής προσέγγισης ήταν ο ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των τριών ισομορφών, NOX1, NOX2 και NOX4, στον αμφιβληστροειδή επίμυων, υπό φυσιολογικές συνθήκες, καθώς και μετά τη χορήγηση AMPA. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την RT-PCR που πραγματοποιήθηκε, φαίνεται ότι και οι τρεις ισομορφές εκφράζονται στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν, τόσο στους αμφιβληστροειδείς που έλαβαν PBS (control), όσο και σε εκείνους οι οποίοι έλαβαν AMPA. Από την συνολική εικόνα της αντίδρασης, φαίνεται ποιοτικά πώς η NOX1 ισομορφή εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν, η NOX2 ισομορφή σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τη NOX1, ενώ η έκφραση της NOX4 ισομορφής παρουσιάζει διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων (Εικόνα 4.4A.). Για κάθε δείγμα, έγινε έλεγχος της ακεραιότητας του απομονωμένου RNA μέσω ανάλυσης των ριβοσωμικών μπαντών 28S και 18S. Η εικόνα που προέκυψε επιβεβαιώνει την καλή ποιότητα των δειγμάτων RNA που απομονώθηκαν (Εικόνα 4.4B). Παράλληλα, προσδιορίστηκε, μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης ($OD_{260/280}$) η συγκέντρωση του ολικού RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα.(Εικόνα 4.4Γ)



B**Γ**

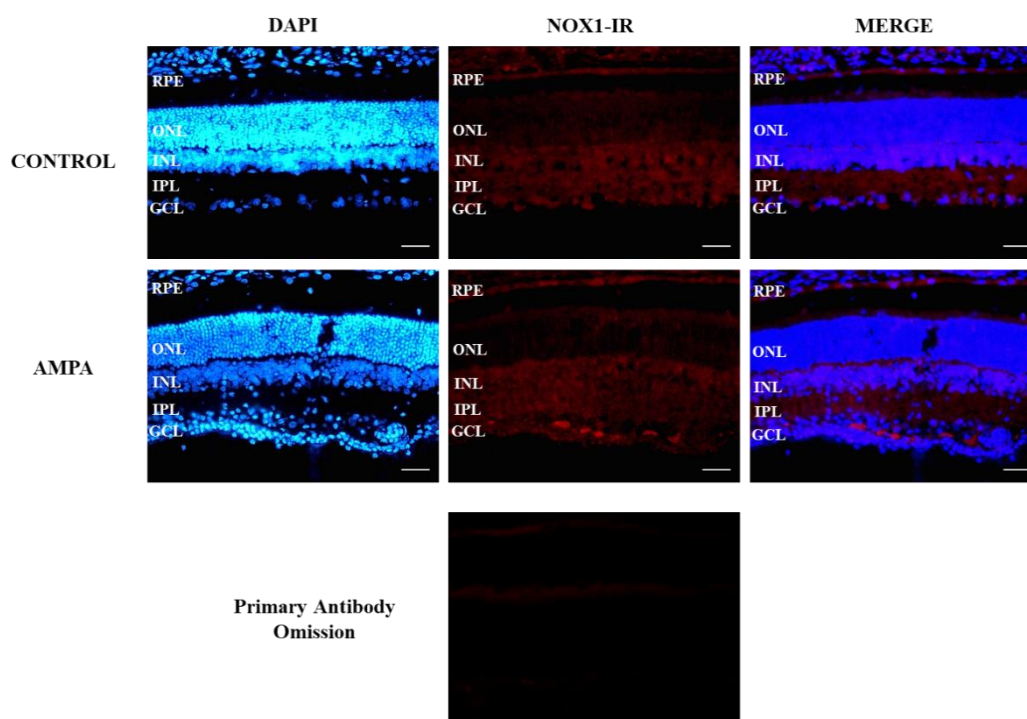
Δείγμα	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)
1	80
2	36
3	130
4	100
5	54
6	146

Η ανάλυση των δειγμάτων με RT-PCR πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Κ. Θεοδωράκη, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας-Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας.

Εικόνα 4.4.: Ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των ισομορφών NOX1, NOX2 και NOX4 στον αμφιβληστροειδή επίμυον, στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. **A:** Αντιπροσωπευτική εικόνα της RT-PCR μελέτης, σε 6 συνολικά δείγματα (3 control, 3 AMPA), για τον ποιοτικό έλεγχο της έκφρασης των ισομορφών NOX1, NOX2 και NOX4. **B:** Έλεγχος ακεραιότητας του απομονωμένου RNA μέσω ανάλυσης των ριβοσωμικών μπαντών (28S και 18S) στα 6 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά. **Γ:** Πίνακας παρουσίασης της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώθηκε για κάθε ένα από τα 6 δείγματα. 1,3 και 6: δείγματα ελέγχου (control). 2,4 και 5: δείγματα AMPA.

4.5. Έκφραση της NOX1 ισομορφής στον αμφιβληστροειδή επίμυος

Προκειμένου να αξιολογηθεί ποιοτικά η έκφραση της NOX1 στον αμφιβληστροειδή επίμυος, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη με αντίσωμα έναντι της συγκεκριμένης ισομορφής σε φυσιολογικό (control) αμφιβληστροειδή και σε αμφιβληστροειδή που έλαβε AMPA (in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας). Με βάση την εικόνα που προκύπτει από τον συνεντοπισμό της NOX1 ανοσοδραστικότητας με το DAPI, φαίνεται πως η NOX1 ισομορφή εκφράζεται στο μελάγχρουν επιθήλιο, καθώς επίσης και σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 4.5.). Ωστόσο, η έκφραση της NOX1 ισομορφής δεν παρουσιάζει καμία αλλαγή ανάμεσα στον αμφιβληστροειδή που έλαβε PBS - και ουσιαστικά αποτελούσε το δείγμα ελέγχου- και τον αμφιβληστροειδή, ο οποίος έλαβε AMPA. (Εικόνα 4.5.)



Εικόνα 4.5.: Έκφραση της NOX1 ισομορφής στον αμφιβληστροειδή επίμυος. Αντιπροσωπευτικές εικόνες NOX1 ανοσοδραστικότητας από control και AMPA αμφιβληστροειδείς επίμυος, 24h μετά τις ενδοβολβικές χορηγήσεις. Μεγέθυνση x20. Scale bar: 50μm. RPE: Retinal Pigment Epithelium, ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer, IPL: Inner Plexiform Layer, GGL: Ganglion Cell Layer. Primary Antibody Omission: Παράλειψη πρωτογενούς (NOX1) αντισώματος.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία, αξιοποιώντας το *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας σε αμφιβληστροειδείς επίμυων και τους αναστολείς των NADPH οξειδασών, VAS2870 (αναστολέας όλων των NOX ισομορφών) και ML171 (αναστολέας της NOX1 ισομορφής), έδειξε ότι η αναστολή της δράσης των NADPH οξειδασών στον αμφιβληστροειδή μπορεί να δράσει και νευροπροστατευτικά, πέρα από τις ήδη γνωστές, ωφέλιμες ιδιότητες της στην αντιμετώπιση των διαταραχών του αγγειακού συστήματος και της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα, ο αναστολέας όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, στις δύο μεγαλύτερες δόσεις που μελετήθηκαν (10^{-5} M και 10^{-4} M), προσέφερε σημαντική νευροπροστασία, περιορίζοντας ουσιαστικά την επαγόμενη από AMPA απώλεια των αμακρυνικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Παράλληλα, και ο αναστολέας της NOX1 ισομορφής, ML171, στη μεγαλύτερη δόση του (10^{-4} M), παρουσίασε νευροπροστατευτικές ιδιότητες, συμβάλλοντας στη διάσωση σημαντικού ποσοστού των αμακρυνικών κυττάρων. Σε μία μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα ζωικό μοντέλο μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας (*rd1*+/+ μύες), η αναστολή των NADPH οξειδασών μέσω της χρήσης αποκυνίνης, φάνηκε να συμβάλλει στη διάσωση των κωνίων του αμφιβληστροειδούς (Usui et al., 2009). Συγχρόνως, η γενετική απόλειψη του γονιδίου της NOX2 ισομορφής βρέθηκε να δρα προστατευτικά στο μοντέλο ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης, οδηγώντας στη διάσωση σημαντικού αριθμού γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Yokota et al., 2011). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Ο αναστολέας όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, βρέθηκε να επάγει νευροπροστασία ήδη από τη δόση των 10^{-5} M, κάτι που δεν παρατηρήθηκε για τον αναστολέα της NOX1 ισομορφής, ML171, ενώ συγχρόνως η δράση του αναστολέα VAS2870 οδήγησε στο μέγιστο επίπεδο νευροπροστασίας που παρατηρήθηκε (επαναφορά της τάξης του 72% επί

του control στον αριθμό των bNOS θετικών κυττάρων, έναντι του 64% που παρατηρήθηκε για τον αναστολέα, ML171, στη δόση των 10^{-4} M). Λαμβάνοντας υπόψη τις συγκεκριμένες παρατηρήσεις, φαίνεται ότι η NOX1 ισομορφή διαδραματίζει ρόλο στην επαγόμενη από AMPA απώλεια των αμακρυνικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, ωστόσο σε αυτή πιστεύεται ότι εμπλέκονται και άλλες NOX ισομορφές, δεδομένου ότι ο αναστολέας όλων των NOX ισομορφών - και όχι ο ειδικός έναντι της NOX1 ισομορφής- οδήγησε στο μεγαλύτερο επίπεδο νευροπροστασίας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η επαγόμενη μέσω AMPA διεγερτοτοξικότητα φαίνεται να συντελεί σε αυξημένη ενεργοποίηση της μακρογλοίας και της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή επίμυον. Αυτό υποστηρίζεται από την αύξηση της GFAP και της Iba-1 ανοσοδραστικότητας, αντίστοιχα, η οποία παρατηρήθηκε στους αμφιβληστροειδείς που έλαβαν AMPA, σε σχέση με τους αμφιβληστροειδείς που έλαβαν PBS (ομάδες ελέγχου). Και στις δύο περιπτώσεις, η συγχορήγηση του AMPA, είτε με τον αναστολέα όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, είτε με τον αναστολέα της NOX1 ισομορφής, ML171, στη δόση των 10^{-4} M, οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση της παρατηρούμενης ανοσοδραστικότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι NOX αναστολείς παρουσιάζουν και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Όπως και στη μελέτη της νευροπροστασίας, το μέγιστο ωφέλιμο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στην περίπτωση του αναστολέα όλων των NOX ισομορφών, VAS2870, με τη χορήγηση του να οδηγεί σε σημαντική μείωση της GFAP και της Iba-1 ανοσοδραστικότητας, σε σχέση με την AMPA ομάδα, ενώ ο αναστολέας της NOX1 ισομορφής, ML171, οδήγησε επίσης σε σημαντική μείωση της ανοσοδραστικότητας σε κάθε περίπτωση, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τον αναστολέα VAS2870. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η NOX1 ισομορφή φαίνεται ότι εμπλέκεται, μαζί με τη μεσολάβηση κι άλλων NOX ισομορφών, στην εκδήλωση φαινομένων φλεγμονής στο in vivo μοντέλο της

AMPA διεγερτοτοξικότητας. Στο μοντέλο της αμφιβληστροειδοπάθειας της προωρότητας, η διπλή αναστολή των ισομορφών NOX1 και NOX4, μέσω του ειδικού -έναντι αυτών των ισομορφών- αναστολέα GKT137831, οδήγησε σε μείωση της παρατηρούμενης φλεγμονής στον αμφιβληστροειδή (Deliyanti & Wilkinson- Berka, 2015), ενώ στο -επαγόμενο μέσω στρεπτοζοτοκίνης- μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, η γενετική απάλειψη του γονιδίου της NOX2 ισομορφής, συσχετίστηκε με μείωση στην εκδήλωση φλεγμονής στον αμφιβληστροειδή (Al-Shabrawey et al., 2008). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, στα φαινόμενα φλεγμονής που παρατηρούνται σε επιμέρους μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, πιθανόν εμπλέκονται και οι τρεις ισομορφές: NOX1, NOX2 και NOX4. Επομένως, η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του αναστολέα VAS2870, έναντι του αναστολέα ML171, στο μοντέλο της συγκεκριμένης εργασίας, κατά πάσα πιθανότητα έγκειται στο γεγονός ότι ο πρώτος αναστέλλει και τις τρεις αυτές ισομορφές, ενώ ο δεύτερος δρα ειδικά έναντι της NOX1 ισομορφής.

Η διεγερτοτοξικότητα ως μηχανισμός σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή ROS και την επακόλουθη ανάπτυξη οξειδωτικού στρες, καταστάσεις οι οποίες συντελούν στην πρόκληση διαταραχών στον νευρικό ιστό και στον κυτταρικό θάνατο. Μελέτες σε μοντέλα διεγερτοτοξικότητας έχουν δείξει ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων γλουταμινικού, ιοντοτροπικών και μεταβολοτροπικών, σχετίζεται άμεσα με αυξημένη δραστηριότητα των NADPH οξειδάσων και επακόλουθη αύξηση του παραγόμενου υπεροξειδίου και εν συνεχεία κι άλλων ROS (Guemez- Gamboa et al., 2011). Μάλιστα υπάρχουν ενδείξεις ότι οι NADPH οξειδάσες αποτελούν την κύρια πηγή υπεροξειδίου σε καταστάσεις διεγερτοτοξικότητας, καθώς επιμέρους τρόποι αναστολής της λειτουργίας τους εμποδίζουν την υπέρμετρη παραγωγή υπεροξειδίου, που προκύπτει ως απόρροια της παρατεταμένης ενεργοποίησης των υποδοχέων γλουταμινικού (Brennan

et al., 2009). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η διεγερτοτοξικότητα επάγει την αυξημένη δραστηριότητα των NADPH οξειδασών και την επακόλουθη υπέρμετρη παραγωγή ROS μέσω αυτών, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, μελέτες στο μοντέλο της NMDA διεγερτοτοξικότητας, υποστηρίζουν έναν πιθανό μηχανισμό: η επαγόμενη - μέσω της υπερενεργοποίησης των υποδοχέων γλουταμινικού- αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση της ασβεστιο-εξαρτώμενης νευρωνικής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου και εν συνεχεία, το παραγόμενο μονοξείδιο του αζώτου επάγει, μέσω αλληλεπίδρασης με επιμέρους σηματοδοτικά μόρια, την ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών και την επακόλουθη παραγωγή υπεροξειδίου μέσω αυτών (Girouard et al., 2009). Μία άλλη μελέτη στο ίδιο μοντέλο, υποστηρίζει ότι η ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών, ως απόκριση στην αυξημένη ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων, επάγεται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των PI3K/PKC κινασών, που οδηγεί στη φωσφορυλίωση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του συμπλόκου της NADPH οξειδάσης (Brennan-Minnella et al., 2013). Σε κάθε περίπτωση, το παραγόμενο - μέσω των NADPH οξειδασών- υπεροξείδιο δίνει με τη σειρά του γένεση σε άλλες μορφές ROS, ενώ παράλληλα μπορεί να αντιδράσει με το μονοξείδιο του αζώτου, οδηγώντας στο σχηματισμό Δραστικών Μορφών Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Όλα τα προαναφερόμενα μόρια, λόγω της δραστηριότητάς τους και της υπέρμετρης παραγωγής τους, μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική και σοβαρές αλλοιώσεις στις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και τις μεμβράνες ενός κυττάρου, αλλά και να επηρεάσουν σηματοδοτικούς μηχανισμούς μέσω της αλληλεπίδρασής τους με επιμέρους μεταγραφικούς παράγοντες. Με αυτό τον τρόπο, οι ROS μπορούν να επάγουν διαφορετικές μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως απόπτωση και νέκρωση, οδηγώντας τελικά σε σημαντική απώλεια νευρώνων (Valencia & Morán, 2004). Παράλληλα, τα

αυξημένα επίπεδα ROS που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της διεγερτοτοξικότητας, ενδέχεται να προκαλέσουν την εκδήλωση και ανάπτυξη φλεγμονής, με παθολογικές συνέπειες για τον ιστό. Σε φυσιολογικά επίπεδα, οι ROS είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη φλεγμονής, με στόχο την αντιμετώπιση της εκάστοτε απειλής. Ωστόσο, σε καταστάσεις υπέρμετρης παραγωγής τους, όπως στα μοντέλα διεγερτοτοξικότητας, οι ROS μπορούν να επάγουν επιβλαβείς φλεγμονώδεις αντιδράσεις, είτε μέσω των αλλοιώσεων που προκαλούν στα κύτταρα, καθιστώντας τα μη αναγνωρίσιμα μόρια και κατ' επέκταση στόχους των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, είτε μέσω αλληλεπίδρασης τους με μεταγραφικούς παράγοντες που θα επάγουν στη συνέχεια την έκφραση γονιδίων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Ingram, 2017; Schieber & Chandel, 2014).

Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν αμέσως παραπάνω, είναι δυνατόν να εξηγηθεί η παρατηρούμενη, στην παρούσα εργασία, νευροπροστατευτική και αντιφλεγμονώδης επίδραση των NOX αναστολέων, VAS2870 και ML171, στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. Ουσιαστικά, αναστέλλοντας τη λειτουργία των NADPH οξειδασών, τα συγκεκριμένα μόρια περιορίζουν σημαντικά τα επίπεδα των παραγόμενων ROS και κατ' επέκταση όλες τις ανεπιθύμητες επιδράσεις αυτών, όπως ο κυτταρικός θάνατος και η φλεγμονή. Το πλεονέκτημα των NOX αναστολέων έναντι άλλων ουσιών που στοχεύουν στην καταπολέμηση των ήδη παραχθέντων τοξικών μορίων, είναι ότι στοχεύουν στην βασική πηγή παραγωγής των ROS, παρεμποδίζοντας εξ' αρχής το σχηματισμό τους. Μάλιστα, αν λάβει κανείς υπόψη ότι οι NADPH οξειδάσες φαίνεται να είναι η κύρια πηγή υπεροξειδίου μετά την υπερενεργοποίηση των υποδοχέων γλουταμινικού, μία προσέγγιση αναστολής της λειτουργίας τους και επομένως περιορισμού του παραγόμενου υπεροξειδίου, ενδέχεται να συμβάλλει σε μείωση και των παραγόμενων RNS, που είναι γνωστό ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στον

κυτταρικό θάνατο που επάγεται μέσω διεγερτοτοξικότητας (Chen et al., 2011). Παρόλα αυτά, πρέπει να λάβει κανείς υπόψη του ότι οι NADPH οξειδάσες δεν αποτελούν τη μόνη πηγή υπέρμετρης παραγωγής ROS σε καταστάσεις διεγερτοτοξικότητας. Εδώ και πολλά χρόνια είναι γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου που προκύπτουν ως απόρροια της υπερενεργοποίησης των υποδοχέων γλουταμινικού επάγουν διαταραχές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων του κυττάρου και μεταξύ άλλων, οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ROS μέσω αυτών (Nicholls & Budd, 1998). Παράλληλα, τα υψηλά επίπεδα ROS δεν αποτελούν το μοναδικό μηχανισμό που ευθύνεται για φαινόμενα κυτταρικού θανάτου και εκδήλωσης φλεγμονής σε καταστάσεις διεγερτοτοξικότητας. Επομένως, γίνεται κατανοητό γιατί στην παρούσα εργασία, οι αναστολείς των NADPH οξειδασών που χρησιμοποιήθηκαν δεν προσέφεραν πλήρη νευροπροστασία και ολική μείωση στην έκφραση των δεικτών φλεγμονής, αλλά μόνο μερική επαναφορά προς τα φυσιολογικά επίπεδα.

Τα αποτελέσματα της RT-PCR μελέτης έδειξαν ότι στον αμφιβληστροειδή των επίμυων παρατηρείται έκφραση των ισομορφών NOX1, NOX2 και NOX4, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες, όσο και σε συνθήκες διεγερτοτοξικότητας επαγόμενης από το AMPA. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, που υποστηρίζουν ότι οι τρεις συγκεκριμένες NOX ισομορφές είναι αυτές που εκφράζονται σε επιμέρους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς του επίμυος (Wilkinson-Berka et al., 2014). Ο έλεγχος της ακεραιότητας του απομονωμένου RNA μέσω της ανάλυσης των ριβοσωμικών μπαντών 28S και 18S επιβεβαιώνει την καλή ποιότητα του RNA που απομονώθηκε και από τα έξι δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Με βάση τα αποτελέσματα της RT-PCR ανάλυσης, η NOX1 ισομορφή παρουσίασε – ποιοτικά- τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τις άλλες δύο εξεταζόμενες ισομορφές, κάτι που παρατηρήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων που

αναλύθηκαν. Η NOX2 ισομορφή φαίνεται να έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τη NOX1, ενώ η NOX4 ισομορφή παρουσίασε διακυμάνσεις της έκφρασής της μεταξύ των δειγμάτων. Οι διακυμάνσεις αυτές φαίνεται ότι οφείλονται στη διαφορετική συγκέντρωση RNA που απομονώθηκε σε κάθε δείγμα, καθώς η ποιοτική εικόνα κάθε μπάντας στην RT-PCR συνάδει με την τιμή της συγκέντρωσης του RNA στο αντίστοιχο δείγμα (η πιο αχνή μπάντα αντιστοιχεί στο δείγμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση απομονωμένου RNA, κ.ο.κ.). Το συνολικό προφίλ έκφρασης των NOX ισομορφών που προκύπτει μπορεί να δικαιολογήσει γιατί ο αναστολέας της NOX1 ισομορφής παρουσίασε μικρότερη αποτελεσματικότητα σε επίπεδο νευροπροστασίας και αντιμετώπισης της φλεγμονής σε σχέση με τον αναστολέα όλων των NOX ισομορφών, VAS2870. Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που στην παρούσα μελέτη ποιοτικά δεν παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση της NOX1 ισομορφής, δεν είναι δυνατό να γνωρίζουμε τι συμβαίνει με τη δραστηριότητα του ενζύμου που εκφράζεται και πώς αυτή τροποποιείται ως απόκριση στην επαγόμενη από AMPA διεγερτοτοξικότητα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η διεγερτοτοξικότητα επάγει αύξηση στη δραστηριότητα των NADPH οξειδασών, ωστόσο μέχρι τώρα δεν είναι γνωστό αν η αύξηση αυτή αφορά όλες τις εκφραζόμενες ισομορφές ή αν η επίδραση διαφοροποιείται ανάλογα με κάθε συγκεκριμένη ισομορφή. Το γεγονός ότι η αναστολή της NOX1 ισομορφής, από μόνη της προσφέρει μερική νευροπροστασία, υποδηλώνει ότι, παρά την - κατά πάσα πιθανότητα- χαμηλή έκφρασή της, η συγκεκριμένη ισομορφή δραστηριοποιείται σε σημαντικό βαθμό στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας. Σε επόμενο στάδιο, κρίνεται σκόπιμη η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των NOX ισομορφών με τη βοήθεια PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR), προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια η επίδραση της AMPA διεγερτοτοξικότητας στα επίπεδα έκφρασης τους. Συγχρόνως, ο προσδιορισμός του τρόπου με τον οποίο η AMPA

διεγερτοτοξικότητα επηρεάζει τη δραστηριότητα κάθε ισομορφής ξεχωριστά, θα παρείχε μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την εμπλοκή των NOX ισομορφών στο συγκεκριμένο μοντέλο, από το επίπεδο έκφρασης μέχρι το επίπεδο ενεργότητας και εν τέλει συμμετοχής του κάθε ενός ενζύμου στην αυξημένη παραγωγή ROS.

Σε επίπεδο πρωτεΐνης, στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη με αντίσωμα έναντι της NOX1 ισομορφής, σε τομές που προήλθαν από αμφιβληστροειδή που είχε λάβει PBS (δείγμα ελέγχου) και σε τομές από αμφιβληστροειδή που είχε λάβει AMPA, προκειμένου να αξιολογηθεί ποιοτικά αν παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση της συγκεκριμένης ισομορφής, ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες, αλλά και να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασής της στις επιμέρους στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Αναφορικά με το πρότυπο έκφρασης, οι εικόνες συνεντοπισμού της NOX1 ανοσοδραστικότητας με το DAPI υποδηλώνουν έκφραση της NOX1 ισομορφής στο μελάγχρον επιθήλιο, αλλά και σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Με βάση τις εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης που προέκυψαν, δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί με ακρίβεια το πρότυπο έκφρασης της NOX1 ισομορφής στην έσω πυρηνική και έσω δικτυωτή στιβάδα κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Αναζητώντας την ήδη διαθέσιμη βιβλιογραφία, δε βρέθηκε κάποια εργασία, στην οποία να έχει πραγματοποιηθεί ανοσοϊστοχημική μελέτη έναντι της NOX1 ισομορφής στον αμφιβληστροειδή, προκειμένου να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως σχετίζεται με ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι τα μέχρι τώρα διαθέσιμα αντισώματα έναντι της NOX1 ισομορφής παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς ως προς την ειδικότητά τους (Altenhöfer et al., 2012). Σε κάθε περίπτωση, θεωρείται σκόπιμη η επανάληψη των πειραμάτων μελέτης της NOX1 ανοσοδραστικότητας σε αμφιβληστροειδείς, σε μία προσπάθεια περαιτέρω κατανόησης του προτύπου έκφρασης της συγκεκριμένης ισομορφής στον ιστό. Με στόχο τη

βελτίωση των αποτελεσμάτων σε ό,τι αφορά την ανοσοϊστοχημική χρώση, έχει ήδη εξεταστεί μία σειρά από τροποποιήσεις στο ακολουθούμενο πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας, όπως η τροποποίηση της θερμοκρασίας επώασης του πρωτογενούς αντισώματος (+4°C για την επώαση με το αντίσωμα έναντι της NOX1 ισομορφής αντί της θερμοκρασίας δωματίου που χρησιμοποιήθηκε στις επωάσεις με τα υπόλοιπα πρωτογενή αντισώματα) και ο έλεγχος διαφορετικών αραιώσεων του πρωτογενούς αντισώματος προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη δυνατή, ενώ μία άλλη τροποποίηση που πρόκειται να εξεταστεί είναι η αύξηση της επί της εκατό συγκέντρωσης του NGS στο διάλυμα μπλοκαρίσματος, σε μία προσπάθεια να περιοριστούν πιο αποτελεσματικά οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης του πρωτογενούς αντισώματος. Παράλληλα, μέσω της ανοσοϊστοχημικής μελέτης που έγινε με παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος, αποκλείστηκε η πιθανότητα εσφαλμένου σήματος που θα οφειλόταν σε μη ειδικές θέσεις δέσμησης του δευτερογενούς αντισώματος (Εικόνα 4.5.).

Σχετικά με την έκφραση της NOX1 ισομορφής στις δύο διακριτές συνθήκες (control και AMPA), με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ποιοτικά δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή. Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι στην παρούσα ανοσοϊστοχημική μελέτη δεν έγινε ποσοτική, παρά μόνο ποιοτική, ανάλυση, λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων (ένα δείγμα ελέγχου και ένα δείγμα AMPA). Μελλοντικός στόχος επομένως, είναι η επανάληψη της ανοσοϊστοχημικής μελέτης με αντίσωμα έναντι της NOX1 ισομορφής με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, προσέγγιση που θα καθιστά εφικτή την ποσοτική ανάλυση και σύγκριση της έκφρασης της συγκεκριμένης ισομορφής ανάμεσα στις συνθήκες ελέγχου και στις συνθήκες διεγερτοτοξικότητας επαγόμενης από AMPA. Συγχρόνως, η αξιοποίηση της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot) θα οδηγήσει σε πιο εξακριβωμένη μελέτη των ενδεχόμενων αλλαγών της NOX1 ισομορφής– σε επίπεδο πρωτεΐνης– στο

μοντέλο της *in vivo* διεγερτοτοξικότητας. Τέλος, ο έλεγχος της έκφρασης και των άλλων δύο ισομορφών, NOX2 και NOX4, και των ενδεχόμενων αλλαγών που επάγονται σε αυτή σε καταστάσεις διεγερτοτοξικότητας, θα συμβάλλει στο να προκύψει μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την εμπλοκή των NOX ισομορφών γενικά σε αυτές τις καταστάσεις.

Εξετάζοντας την εργασία στο σύνολό της, γίνεται αντιληπτό ότι, πέρα από τη γενική μελέτη της εμπλοκής των NADPH οξειδασών στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, δόθηκε έμφαση στην NOX1 ισομορφή αυτών. Η προσέγγιση αυτή προέκυψε με βάση τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία στηρίχθηκε αρχικά η μελέτη και τα οποία καταδείκνυαν την άμεση και κρίσιμη εμπλοκή της NOX1 ισομορφής σε επιμέρους μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν την εμπλοκή της συγκεκριμένης ισομορφής και στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, που εφαρμόστηκε στον αμφιβληστροειδή επίμυον και συγκεκριμένα, στους μηχανισμούς που σχετίζονται με τη νευρωνική απώλεια και την ανάπτυξη φλεγμονής. Ωστόσο, φαίνεται πως στους μηχανισμούς αυτούς, για το μοντέλο που εξετάστηκε, εμπλέκονται και άλλες NOX ισομορφές, καθώς η αναστολή της NOX1 ισομορφής και μόνο δεν παρουσίασε την ίδια αποτελεσματικότητα με την αναστολή όλων των NOX ισομορφών, σε επίπεδο νευροπροστασίας και αντιμετώπισης της φλεγμονής. Παρόμοιες προσεγγίσεις αναστολής των ισομορφών NOX2 και NOX4, οι οποίες αποτελούν τις NOX ισομορφές που επιβεβαιωμένα εκφράζονται στον αμφιβληστροειδή, θα συνέβαλαν στη λεπτομερέστερη κατανόηση του ρόλου κάθε NOX ισομορφής στην επαγόμενη από AMPA διεγερτοτοξικότητα.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας υποστηρίζουν, με βάση το *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας, ότι η αναστολή των NADPH

οξειδασών μπορεί να λειτουργήσει και ως μία νευροπροστατευτική προσέγγιση, κάτι που μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Παράλληλα, σε συμφωνία με άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, οι αναστολείς των NADPH οξειδάσων που εξετάστηκαν, παρουσίασαν αντιφλεγμονώδη δράση, συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση της φλεγμονής που βρέθηκε ότι προκαλείται στον ιστό ως απόρροια της επαγόμενης από AMPA διεγερτοτοξικότητας. Σε μεγαλύτερο βαθμό μέχρι τώρα έχει μελετηθεί η εμπλοκή των NOX ισομορφών στις διαταραχές του αγγειακού συστήματος που παρατηρούνται κατά την εξέλιξη των επιμέρους ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών. Οι προσεγγίσεις αναστολής της λειτουργίας των NOX ισομορφών φαίνεται να συμβάλλουν σε σημαντικό βαθμό στον περιορισμό των διαταραχών αυτών, σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως στην επαγομένη από οξυγόνο αμφιβληστροειδοπάθεια (OIR, Al-Shabrawey et al., 2005; Chan et al., 2013; Wang et al., 2014; Wilkinson- Berka et al., 2014) και σε ένα γενετικό μοντέλο (db/db μύες) της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Li et al., 2010). Συγχρόνως, σε μελέτη καλλιέργειών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς βρέθηκε ότι η αναστολή της NOX4 ισομορφής μπορεί να δράσει ωφέλιμα, αποτρέποντας τη δυσλειτουργία των κυττάρων μετά από έκθεσή τους σε παράγοντες που διαταράσσουν την ομοιοστατική λειτουργία τους και την επακόλουθη υπέρμετρη έκφραση του παράγοντα VEGF και την αυξημένη παραγωγή ROS από αυτά (Appukuttan et al., 2018). Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν την πρώτη εικόνα μελέτης της αναστολής των NADPH οξειδασών σε επίπεδο ανθρώπου.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα αναφέρθηκαν αμέσως προηγουμένως, πιστεύεται ότι η αναστολή των NADPH οξειδασών μπορεί να αποτελέσει μία προσέγγιση ικανή να συμβάλει στην αντιμετώπιση και των τριών συνιστωσών των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών, δηλαδή της νευροεκφύλισης, της φλεγμονής και των

διαταραχών του αγγειακού συστήματος, περιορίζοντας την ανάπτυξη φαινομένων οξειδωτικού στρες και διεγερτοτοξικότητας, που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία των επιμέρους αμφιβληστροειδοπαθειών. Σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, η αναστολή των NADPH οξειδασών πιστεύεται ότι μπορεί να δράσει με διττό τρόπο: 1) αναστέλλοντας την ανάπτυξη συνθηκών οξειδωτικού στρες και 2) περιορίζοντας τις επιβλαβείς επιπτώσεις της επαγομένης διεγερτοτοξικότητας, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας. Επομένως, η προσέγγιση αυτή πιθανότατα πλεονεκτεί έναντι άλλων προσεγγίσεων, όπως η χρήση αντιοξειδωτικών μορίων ή η χρήση μορίων ανταγωνιστών των υποδοχέων γλουταμινικού, καθώς οι προσεγγίσεις αυτές στοχεύουν αποκλειστικά είτε στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες ή στην αποτροπή ανάπτυξης συνθηκών διεγερτοτοξικότητας και όχι και στους δύο μηχανισμούς ταυτόχρονα. Παρόλα αυτά, δεν πρέπει κανείς να ξεχνά ότι οι αμφιβληστροειδοπάθειες αποτελούν διαταραχές, στην παθοφυσιολογία των οποίων εμπλέκονται πολλοί και διακριτοί μεταξύ τους μηχανισμοί κι έτσι δεν είναι εύκολο να βρεθεί μία προσέγγιση, ικανή από μόνη της να αντιμετωπίσει ταυτόχρονα όλους αυτούς τους μηχανισμούς. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών αναστολής των NADPH οξειδασών παρέχουν ικανοποιητικά στοιχεία για την αξιοποίηση των αναστολέων των NADPH οξειδασών στην αντιμετώπιση επιμέρους αμφιβληστροειδοπαθειών, δρώντας πιθανότατα συνεργατικά με άλλες, κατάλληλες σε κάθε περίπτωση προσεγγίσεις. Αναμφίβολα, κρίνεται σκόπιμο να πραγματοποιηθούν επιπρόσθετες μελέτες για την περαιτέρω διευκρίνηση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων των NADPH οξειδασών στην αντιμετώπιση των αμφιβληστροειδοπαθειών και κυρίως να αξιολογηθεί η δυνατότητα εφαρμογής και η αποτελεσματικότητα αντίστοιχων προσεγγίσεων σε επίπεδο ανθρώπου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abramov, A. Y., Jacobson, J., Wientjes, F., Hothersall, J., Canevari, L., & Duchen, M. R. (2005). Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *25*, 9176-9184.

Ago, T., Kitazono, T., Kuroda, J., Kumai, Y., Kamouchi, M., Ooboshi, H. et al. (2005). NAD (P) H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke*, *36*, 1040-1046.

Al-Latayfeh, M., Silva, P. S., Sun, J. K., & Aiello, L. P. (2012). Antiangiogenic therapy for ischemic retinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*, a006411.

Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A. B., Platt, D. H., Matragoon, S., Behzadian, M. A. et al. (2005). Inhibition of NAD (P) H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *The American Journal of Pathology*, *167*, 599-607.

Al-Shabrawey, M., Rojas, M., Sanders, T., Behzadian, A., El-Remessy, A., Bartoli, M. et al. (2008). Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*, 3239-3244.

Altenhöfer, S., Kleikers, P. W., Radermacher, K. A., Scheurer, P., Hermans, J. R., Schiffers, P. et al. (2012). The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*, 2327-2343.

Appukuttan, B., Ma, Y., Stempel, A., Ashander, L. M., Deliyanti, D., Wilkinson-Berka, J. L., & Smith, J. R. (2018). Effect of NADPH oxidase 1 and 4 blockade in activated human retinal endothelial cells. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, *46*, 652-660.

Bánfi, B., Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedûs, B., Demaurex, N., & Krause, K. H. (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 37594-37601.

Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *87*, 245-313.

Brennan, A. M., Suh, S. W., Won, S. J., Narasimhan, P., Kauppinen, T. M., Lee, H. et al. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience*, *12*, 857-863.

Brennan-Minnella, A. M., Shen, Y., El-Benna, J., & Swanson, R. A. (2013). Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death. *Cell Death & Disease*, *4*, e580.

Casas, A. I., Geuss, E., Kleikers, P. W., Mencl, S., Herrmann, A. M., Buendia, I. et al. (2017). NOX4-dependent neuronal autotoxicity and BBB breakdown explain the superior sensitivity of the brain to ischemic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*, 12315-12320.

Chan, E. C., van Wijngaarden, P., Liu, G. S., Jiang, F., Peshavariya, H., & Dusting, G. J. (2013). Involvement of Nox2 NADPH oxidase in retinal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*, 7061-7067.

Chen, H., Yoshioka, H., Kim, G. S., Jung, J. E., Okami, N., Sakata, H. et al. (2011). Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*, 1505-1517.

- Chéret, C., Gervais, A., Lelli, A., Colin, C., Amar, L., Ravassard, P. et al. (2008). Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*, 28, 12039-12051.
- Cheung, N., Mitchell, P., & Wong, T.Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet*, 376, 124-136.
- Choi, S. H., Aid, S., Kim, H. W., Jackson, S. H., & Bosetti, F. (2012). Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*, 120, 292-301.
- Cooney, S. J., Bermudez-Sabogal, S. L., & Byrnes, K. R. (2013). Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isotypes after brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 10, 155.
- Crooks, J., & Kolb, H. (1992). Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina. *Journal of Comparative Neurology*, 315, 287-302.
- Cucoranu, I., Clempus, R., Dikalova, A., Phelan, P. J., Ariyan, S., Dikalov, S., & Sorescu, D. (2005). NAD (P) H oxidase 4 mediates transforming growth factor- β 1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circulation Research*, 97, 900-907.
- Damiano, S., Fusco, R., Morano, A., De Mizio, M., Paterno, R., De Rosa, A. et al. (2012). Reactive oxygen species regulate the levels of dual oxidase (Duox1-2) in human neuroblastoma cells. *PLoS One*, 7, e34405.
- Deliyanti, D., & Wilkinson-Berka, J. L. (2015). Inhibition of NOX1/4 with GKT137831: a potential novel treatment to attenuate neuroglial cell inflammation in the retina. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 136.

- Dvorianchikova, G., Grant, J., Santos, A. R. C., Hernandez, E., & Ivanov, D. (2012). Neuronal NAD (P) H oxidases contribute to ROS production and mediate RGC death after ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *53*, 2823-2830.
- Fischer, M. T., Sharma, R., Lim, J. L., Haider, L., Frischer, J. M., Drexhage, J. et al. (2012). NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, *135*, 886-899.
- Fletcher, E. L., Jobling, A. I., Vessey, K. A., Luu, C., Guymer, R. H., & Baird, P. N. (2011). Animal models of retinal disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *100*, 211-286.
- Fulton, A. B., Hansen, R. M., Moskowitz, A., & Akula, J. D. (2009). The neurovascular retina in retinopathy of prematurity. *Progress in Retinal and Eye Research*, *28*, 452-482.
- Geiszt, M., & Leto, T. L. (2004). The Nox family of NAD (P) H oxidases: host defense and beyond. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 51715-51718.
- Girouard, H., Wang, G., Gallo, E. F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V. M., & Iadecola, C. (2009). NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *Journal of Neuroscience*, *29*, 2545-2552.
- Green, S. P., Cairns, B., Rae, J., Errett-Baroncini, C., Hongo, J. A. S., Erickson, R. W., & Curnutte, J. T. (2001). Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *21*, 374-384.
- Groemping, Y., & Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochemical Journal*, *386*, 401-416.

Guemez-Gamboa, A., Estrada-Sánchez, A. M., Montiel, T., Páramo, B., Massieu, L., & Morán, J. (2011). Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70, 1020-1035.

Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Nauseef, W. M., Volpp, B. D., Pearson, D. W., Rosen, H., & Clark, R. A. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *The Journal of Clinical Investigation*, 87, 352-356.

Ingram, S. (2017). Reactive oxygen species: rapid fire in inflammation. *Biochemist*, 39, 30-33.

Jager, R. D., Mieler, W. F., & Miller, J. W. (2008). Age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 358, 2606-2617.

Kawahara, T., Quinn, M. T., & Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 109.

Kern, T. S., & Barber, A. J. (2008). Retinal ganglion cells in diabetes. *The Journal of Physiology*, 586, 4401-4408.

Kim, S. H., Won, S. J., Sohn, S., Kwon, H. J., Lee, J. Y., Park, J. H., & Gwag, B. J. (2002). Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *The Journal of Cell Biology*, 159, 821-831.

- Kowluru, R. A., Mishra, M., & Kumar, B. (2016). Diabetic retinopathy and transcriptional regulation of a small molecular weight G-Protein, Rac1. *Experimental Eye Research*, *147*, 72-77.
- Lavigne, M. C., Malech, H. L., Holland, S. M., & Leto, T. L. (2001). Genetic requirement of p47 phox for superoxide production by murine microglia. *The FASEB Journal*, *15*, 285-287.
- Li, B., Bedard, K., Sorce, S., Hinz, B., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K. H. (2009). NOX4 expression in human microglia leads to constitutive generation of reactive oxygen species and to constitutive IL-6 expression. *Journal of Innate Immunity*, *1*, 570-581.
- Li, J., Wang, J. J., Yu, Q., Chen, K., Mahadev, K., & Zhang, S. X. (2010). Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: role of NADPH oxidase 4. *Diabetes*, *59*, 1528-1538.
- Li, J., Wang, J. J., & Zhang, S. X. (2015). NADPH oxidase 4-derived H₂O₂ promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy. *Journal of Diabetes Research*, *2015*, 963289.
- Ma, M. W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K. M., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2017). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration*, *12*, 7.
- Maghzal, G. J., Krause, K. H., Stocker, R., & Jaquet, V. (2012). Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*, 1903-1918.

- Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., & Knaus, U. G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular Signalling*, *18*, 69-82.
- McCann, S. K., Dusting, G. J., & Roulston, C. L. (2008). Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats. *Journal of Neuroscience Research*, *86*, 2524-2534.
- Miller, A. A., Drummond, G. R., Schmidt, H. H., & Sobey, C. G. (2005). NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circulation Research*, *97*, 1055-1062.
- Mochizuki, T., Furuta, S., Mitsushita, J., Shang, W. H., Ito, M., Yokoo, Y. et al. (2006). Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene*, *25*, 3699-3707.
- Nauseef, W. M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and Cell Biology*, *122*, 277-291.
- Nayernia, Z., Jaquet, V., & Krause, K. H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*, 2815-2837.
- Nicholls, D. G., & Budd, S. L. (1998). Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1366*, 97-112.
- Petry, A., Weitnauer, M., & Goerlach, A. (2010). Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*, 467-487.
- Purves, D. (2001). *Neuroscience. 2nd edition*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Qin, B., Cartier, L., Dubois-Dauphin, M., Li, B., Serrander, L., & Krause, K. H. (2006). A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiology of Aging*, *27*, 1577-1587.
- Qin, L., Liu, Y., Wang, T., Wei, S. J., Block, M. L., Wilson, B. et al. (2004). NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 1415-1421.
- Rivera, J. C., Dabouz, R., Noueihed, B., Omri, S., Tahiri, H., & Chemtob, S. (2017). Ischemic retinopathies: oxidative stress and inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1-16.
- Sankarapandi, S., Zweier, J. L., Mukherjee, G., Quinn, M. T., & Huso, D. L. (1998). Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *353*, 312-321.
- Sapieha, P., Hamel, D., Shao, Z., Rivera, J. C., Zaniolo, K., Joyal, J. S., & Chemtob, S. (2010). Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *42*, 5-12.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, *24*, R453-R462.
- Segal, A. W., & Peters, T. J. (1976). Characterisation of the enzyme defect in chronic granulomatous disease. *The Lancet*, *307*, 1363-1365.
- Sivakumar, V., Foulds, W. S., Luu, C. D., Ling, E. A., & Kaur, C. (2011). Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *The Journal of Pathology*, *224*, 245-260.

- Skonieczna, M., Hejmo, T., Poterala-Hejmo, A., Cieslar-Pobuda, A., & Buldak, R. J. (2017). NADPH oxidases: insights into selected functions and mechanisms of action in cancer and stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-15.
- Song, H., Vijayasarathy, C., Zeng, Y., Marangoni, D., Bush, R. A., Wu, Z., & Sieving, P. A. (2016). NADPH oxidase contributes to photoreceptor degeneration in constitutively active RAC1 mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 2864-2875.
- Sorce, S., & Krause, K. H. (2009). NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 2481-2504.
- Sorce, S., Stocker, R., Seredenina, T., Holmdahl, R., Aguzzi, A., Chio, A. et al. (2017). NADPH oxidases as drug targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the evidence?. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 387-396.
- Stefánsson, E. (2001). The therapeutic effects of retinal laser treatment and vitrectomy. A theory based on oxygen and vascular physiology. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 79, 435-440.
- Stitt, A. W., Curtis, T. M., Chen, M., Medina, R. J., McKay, G. J., Jenkins, A. et al. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 156-186.
- Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., & Kamata, T. (2000). Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 13175-13178.

Tammariello, S.P., Quinn, M. T., & Estus, S. (2000). NADPH Oxidase Contributes Directly to Oxidative Stress and Apoptosis in Nerve Growth Factor-Deprived Sympathetic Neurons. *Journal of Neuroscience*, *20*, RC53.

Usui, S., Oveson, B. C., Lee, S. Y., Jo, Y. J., Yoshida, T., Miki, A. et al. (2009). NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of Neurochemistry*, *110*, 1028-1037.

Valencia, A., & Morán, J. (2004). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*, 1112-1125.

Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F. et al. (2005). Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*, *132*, 233-238.

Valverde, A. M., Miranda, S., García-Ramírez, M., González-Rodríguez, Á., Hernández, C., & Simó, R. (2013). Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy. *Molecular Vision*, *19*, 47-53.

Walder, C. E., Green, S. P., Darbonne, W. C., Mathias, J., Rae, J., Dinauer, M. C. et al. (1997). Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke*, *28*, 2252-2258.

Wang, H., Yang, Z., Jiang, Y., & Hartnett, M. E. (2014). Endothelial NADPH oxidase 4 mediates vascular endothelial growth factor receptor 2-induced intravitreal neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Molecular Vision*, *20*, 231-241.

Weinreb, R. N., Aung, T., & Medeiros, F. A. (2014). The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*, *311*, 1901-1911.

- Wilkinson-Berka, J. L., Deliyanti, D., Rana, I., Miller, A. G., Agrotis, A., Armani, R. et al. (2014). NADPH oxidase, NOX1, mediates vascular injury in ischemic retinopathy. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*, 2726-2740.
- Wong, T.Y., Cheung, C.M.G., Larsen, M., Sharma, S. & Simó, R. (2016) Diabetic retinopathy. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 16012.
- Yamazaki, T., Kawai, C., Yamauchi, A., & Kuribayashi, F. (2011). A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Tropical Medicine and Health*, *39*, 41-45.
- Yang, X. L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in Neurobiology*, *73*, 127-150.
- Yokota, H., Narayanan, S. P., Zhang, W., Liu, H., Rojas, M., Xu, Z. et al. (2011). Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*, 8123-8131.
- Yoshida, S., Yoshida, A., Ishibashi, T., Elner, S. G., & Elner, V. M. (2003). Role of MCP-1 and MIP-1 α in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *Journal of Leukocyte Biology*, *73*, 137-144.
- Zhang, W., Wang, T., Qin, L., Gao, H. M., Wilson, B., Ali, S. F. et al. (2004). Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *The FASEB Journal*, *18*, 589-591.