



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ



Μελέτη του ρόλου της σωματοστατίνης στο μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς

Διδακτορική Διατριβή

Θεοκλήτης Γ. Παπαδάκη
Ιατρού

Ηράκλειο 2009

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου

Οφείλω να ευχαριστήσω,

την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή:

- Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κ. Κυριακή Θερού γιατί συμμερίστηκε τον ενθουσιασμό μου και μου έδειξε από την αρχή απεριόριστη εμπιστοσύνη. Χωρίς την επιστημονική της συμβολή και καθοδήγηση, την ηθική και πρακτική συμπαράσταση και βέβαια την υπομονή της, η διατριβή αυτή δεν θα πραγματοποιούνταν ποτέ.
- Καθηγητή Οφθαλμολογίας και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Κρήτης, κ. Ιωάννη Παλλήκαρη που μου έδειξε το δρόμο της έρευνας.
- Καθηγητή Οφθαλμολογίας, κ. Μιλτιάδη Τσιλιμπάρη για την επιστημονική του συμβολή στα επιμέρους στάδια κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής

τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους:

- Καθηγητή Νευρολογίας, κ. Ανδρέα Πλαϊτάκη
- Καθηγητή Γαστρεντερολογίας, κ. Ηλία Κουρούμαλη
- Καθηγητή Παθολογίας, κ. Δημήτριο Μπούμπα
- και ιδιαίτερα τον Επίκ. Καθηγητή Κλινικής Χημείας, κ. Χρήστο Τσατσάνη για την καθοδήγηση και βοήθεια του στα πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άννα Βασιλάκη για την καθοδήγηση και ουσιαστική βοήθεια της στα πρώτα μου βήματα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, την υποψήφια διδάκτορα και φίλη, Νίκη Μαστροδήμου για τη βοήθεια της σε όλα τα στάδια της παρούσας διατριβής, την τεχνικό Δέσποινα Παπασάββα και τους φοιτητές Ιατρικής Σταύρο Παπαχρήστου και Μαριλένα Μαρκιανού για την τεχνική υποστήριξη, τους Μάριο Μαρσέλο, Περικλή Παππά και Dr. Richard Hunt για τη δωρεά της κυτταρικής σειράς D407, τις Ρένα Δερμιτζάκη και Μαριλένα Καμπά για τη βοήθεια με τις κυτταροκαλλιέργειες, τους Γιώργο Νότα, Γιώργο Κολιό και Κώστα Ξυδάκη για τη συμβολή τους στα πειράματα μέτρησης μεταβολιτών του NO και RT-PCR, τις Μαρία Θειακάκη και Φωτεινή Κιαγιαδάκη για τη βοήθεια τους με τα πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ανοσοαποτύπωσης και τις Φοίβη Νιφλή και Άννα Τσαπάρα για την ηθική και πρακτική συμπαράσταση. Επίσης, ευχαριστώ τους συναδέλφους ιατρούς Μαριέττα Καραβέλλα, Μαρία Κουτεντάκη και Δημήτρη Σαμωνάκη, τους φυσικούς Κωνσταντίνο Μπάλλα και Αντώνη Παπαδάκη, τον στατιστικολόγο Μανώλη Λιναρδάκη και την ιατρική φωτογράφο Susanna Exinger για τη συμβολή τους στην κλινική μελέτη. Τέλος, ευχαριστώ το Γιώργο Αγορογιάννη, ειδικευόμενο Οφθαλμολογίας, για το κριτικό διάβασμα του τελικού κειμένου και τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή τιμήθηκε με την υποτροφία «Μαρίκα Μανασάκη» του Πανεπιστημίου Κρήτης για τα ακαδημαϊκά έτη 2000 - 2002.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΜΕΛΑΓΧΡΟΥΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ	1
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Ιστολογία του ΜΕΑ	2
1.3 Φυσιολογία του ΜΕΑ	4
1.3.1 Ανανέωση των φωτοϋποδοχέων	4
1.3.2 Κύκλος της βιταμίνης Α.....	5
1.3.3 Ρύθμιση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος των φωτοϋποδοχέων	5
1.3.4 Διατήρηση της προσκόλλησης του αμφιβληστροειδή.....	5
1.3.5 Αιματο-οφθαλμικός φραγμός.....	6
1.3.6 Ανοσορρύθμιση.....	7
1.3.7 Αδρανοποίηση ελευθέρων ριζών και φαρμάκων	7
1.3.8 Κυτταρικός κύκλος	7
1.4 Συμμετοχή του ΜΕΑ σε διάφορες παθήσεις του οφθαλμού	8
1.4.1 Εκφύλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία.....	10
1.4.2 Κλινικές μορφές της ΗΕΩ.....	10
1.4.3 Ο ρόλος του ΜΕΑ στην παθογένεια της ΗΕΩ.....	12
1.4.4 Θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης στην ΗΕΩ.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	16
2.1 Η ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ	16
2.1.1 Γενικά.....	16
2.1.2 Η ανακάλυψη της σωματοστατίνης	16
2.1.3 Θέσεις έκφρασης της σωματοστατίνης.....	16
2.1.4 Οι δράσεις της σωματοστατίνης	17
2.1.5 Οι δραστικές μορφές της σωματοστατίνης	19
2.2 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ	21
2.2.1 Γενικά.....	21
2.2.2 Η κλωνοποίηση των υποδοχέων της σωματοστατίνης	22
2.2.3 Η δομή του σωματοστατινεργικού υποδοχέα.....	22
2.2.4 Μηχανισμοί μετάδοσης σήματος των υποδοχέων της σωματοστατίνης	24
2.3 ΤΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ	27
2.4 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΦΘΑΛΜΟΣ	30
2.4.1 Έκφραση της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στον οφθαλμό	30
2.4.2 Οι δράσεις της σωματοστατίνης στον οφθαλμό.....	32
2.4.3 Θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές της σωματοστατίνης στην Οφθαλμολογία.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO).....	43
3.1 Η ελεύθερη ριζα του μονοξειδίου του αζώτου.....	43
3.1.1 Γενικά.....	43
3.1.2 Πώς σχηματίζεται η ελεύθερη ριζα του μονοξειδίου του αζώτου.....	43

3.2	Ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και οφθαλμός	45
3.3	Ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και σωματοστατίνη.....	47
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	48
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	49
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	51
I.	<i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	51
4.1	Κυτταρική σειρά D407 (ανθρώπινο μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς)	51
4.2	Καλλιέργεια κυττάρων.....	52
4.3	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	54
4.4	Ραδιοανοσοανίχνευση και μέτρηση της ποσότητας της σωματοστατίνης που εκκρίνεται από τα κύτταρα D407.....	55
4.5	Απομόνωση RNA από τα κύτταρα D407.....	58
4.6	Επίδραση με DNάση, ανάστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	60
4.7	Μελέτες δέσμευσης για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407	64
4.8	Μελέτες ανοσοφθορισμού για ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407	68
4.9	Ιστοχημική χρώση NADPH-διαφοράσης.....	70
4.10	Μελέτη της παραγωγής μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα D407 .	73
4.11	Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων D407 με την τεχνική μεταβολισμού του MTT	75
4.12	Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην απόπτωση των κυττάρων D407 με την τεχνική APO Percentage.....	77
4.13	Μελέτη της τοξικότητας της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων στα κύτταρα D407 με την τεχνική χρώσης με trypan blue	79
4.14	Ανίχνευση των υποδοχέων της σωματοστατίνης και της SHP1 στα κύτταρα D407 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (immunoblot).....	81
II.	ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	84
	Ασθενείς	84
	Μέθοδοι	85
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
I.	<i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	88
5.1.	Προσδιορισμός της ύπαρξης σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στο MEA.....	88
5.1.1	Ραδιοανοσοανίχνευση και μέτρηση των επιπέδων της σωματοστατίνης στα κύτταρα D407	88
5.1.2	Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά D407	89
5.1.2.1	Ανίχνευση έκφρασης του mRNA των υποδοχέων σωματοστατίνης με RT-PCR.	89
5.1.2.2	Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 με μικροσκοπία συνεστίασης και ανοσοφθορισμό.	91
5.1.2.3	Ανίχνευση των υποδοχέων ssts στις μεμβράνες των κυττάρων D407 με μελέτες δέσμευσης.	94
5.1.2.4	Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 με μελέτες ανοσοαποτύπωσης (Western blot).....	95

5.2 Προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης της σωματοστατίνης με το μονοξείδιο του αζώτου στα κύτταρα MEA	97
5.2.1 Ανίχνευση NADPH-διαφοράσης στα κύτταρα D407 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο.	97
5.2.2 Ανίχνευση υποτύπων συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου στα κύτταρα D407 με RT-PCR	98
5.2.3 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην παραγωγή μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα D407 με την μέθοδο Grisham	99
5.3 Προσδιορισμός της δράσης της σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MEA	104
5.3.1 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην βιωσιμότητα των κυττάρων D407 με την τεχνική μεταβολισμού του MTT	105
5.3.2 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην απόπτωση των κυττάρων D407 με την τεχνική APO Percentage	107
5.3.3 Μελέτη της τοξικότητας της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων στα κύτταρα D407 με την τεχνική χρώσης με trypan blue	109
5.3.4 Προσδιορισμός του μηχανισμού με τον οποίο η σωματοστατίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MEA	112
5.3.5 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων D407 μετά από αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατάσων (PTPs)	112
5.3.6 Ανίχνευση της SHP1 φωσφοτυροσινικής φωσφατάσης στα κύτταρα D407 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (immunoblot)	114
II. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	115
A. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία	115
B. Συμμόρφωση ασθενών με το πρωτόκολλο και παρακολούθηση	115
Γ. Αξιολόγηση της ασφάλειας της θεραπείας	115
Δ. Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας	117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	125
Ανίχνευση της σωματοστατίνης στα κύτταρα MEA	125
Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά D407	126
Η αλληλεπίδραση της σωματοστατίνης με το μονοξείδιο του αζώτου στα κύτταρα MEA	129
Επίδραση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MEA	131
Κλινική μελέτη της χρήσης της λανρεοτίδης στην θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που σχετίζεται με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (HEΩ)	134
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	138
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	155
Περίληψη	159
Abstract	161
Συντμήσεις	163
Σχετικές επιτημονικές ανακοινώσεις	169
Βιογραφικό Σημείωμα	189

Μέρος



Εισαγωγή

Κεφ. 1^ο: Το Μελάχρουν Επιθήλιο του Αφιβληστροειδούς

Κεφ. 2^ο: Το Σωματοστατινεργικό Σύστημα

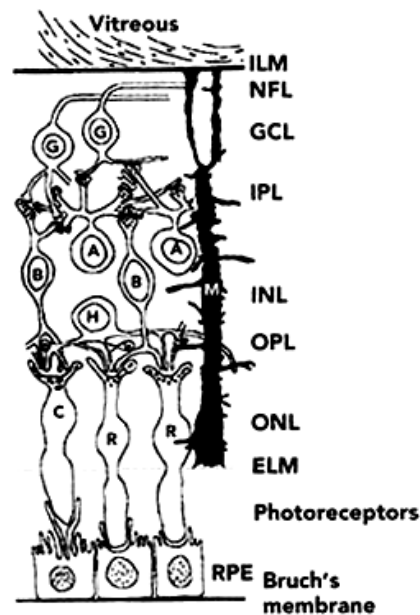
Κεφ. 3^ο: Το Σύστημα του Μονοξειδίου του Αζώτου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΜΕΛΑΓΧΡΟΥΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

1.1 Γενικά

Ο αμφιβληστροειδής είναι ο αισθητηριακός χιτώνας του οφθαλμού. Αποτελείται από το μελάγχρουν επιθήλιο (ΜΕΑ) και το νευροαισθητηρικό αμφιβληστροειδή. Το ΜΕΑ βρίσκεται ανάμεσα στο νευροαισθητηρικό αμφιβληστροειδή και το χοριοειδή χιτώνα. Εμβρυολογικά προέρχεται από το νευροεξώδερμα, όπως και ο νευροαισθητηρικός αμφιβληστροειδής. Παρόλο που ο τελευταίος διαφοροποιείται σε πολλές στιβάδες νευρώνων, το ΜΕΑ παραμένει μία μονή κυτταρική στιβάδα που διαφοροποιείται σε εκκριτικό επιθήλιο (Εικόνα 1-1).

Το ΜΕΑ δεν επιτελεί φωτοδεκτικές ή νευρικές λειτουργίες αλλά είναι απαραίτητο για τη στήριξη και τη βιωσιμότητα των φωτοϋποδοχέων. Ρυθμίζει το περιβάλλον των φωτοϋποδοχέων, συνθέτει αυξητικούς παράγοντες, απαντά σε χυμικά ερεθίσματα και εμφανίζει επουλωτικές ικανότητες, που μπορεί να είναι ωφέλιμες ή επιβλαβείς ανάλογα με το αίτιο που τις προκάλεσε.



Εικόνα 1-1: Σχηματική αναπαράσταση του αμφιβληστροειδή του ανθρώπου, όπου φαίνεται η κατά στιβάδες διάταξη των κυττάρων. Vitreous: υαλώδες σώμα, ILM: έσω αφοριστική μεμβράνη, NFL: στιβάδα νευρικών ινών, GCL: στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων, IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα, INL: έσω πυρηνική στιβάδα, OPL: έξω δικτυωτή στιβάδα, ONL: έξω πυρηνική στιβάδα, ELM: έξω αφοριστική μεμβράνη, Photoreceptors: φωτοϋποδοχείς, RPE: μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς, Bruch's membrane: μεμβράνη του Bruch. Τροποποιημένο από (Arevalo JF *et al.*, 2006)

1.2 Ιστολογία του ΜΕΑ

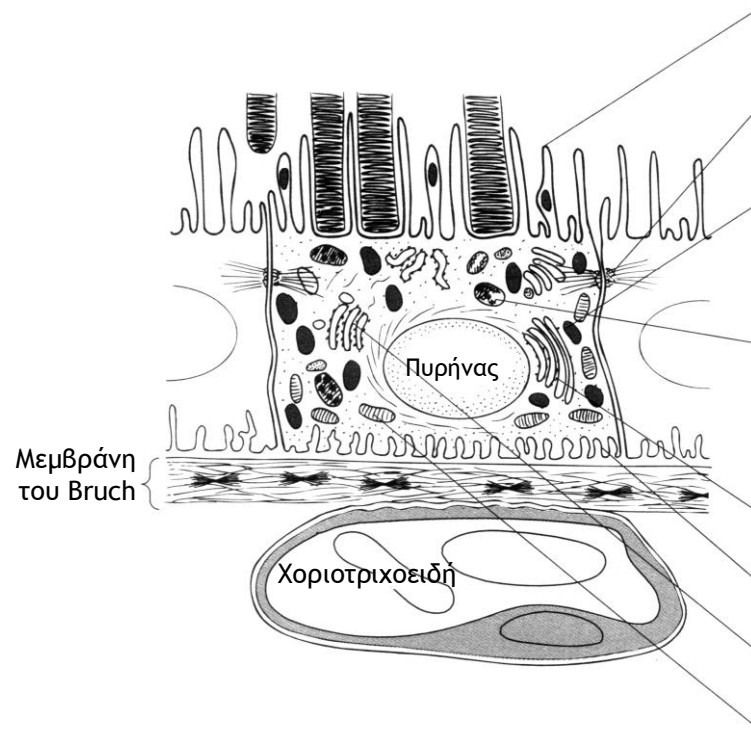
Το ΜΕΑ αποτελεί μια συνεχή στιβάδα από κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα που εκτείνεται από την οπτική θηλή ως την άκρα περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς. Τα κυριότερα ανατομικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες του κυττάρου ΜΕΑ συνοψίζονται στην Εικόνα 1-2.

Το μέγεθος των κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με την εντόπιση τους και την ηλικία και είναι μικρότερο (διάμετρος 10-14μ) στην περιοχή της ωχράς, ενώ αυξάνει (διάμετρος 60μ) προς την περιφέρεια. Ο αριθμός τους ποικίλλει από 4.2 ως 6.1 εκατομμύρια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το κύτταρο ΜΕΑ παρουσιάζει ελάχιστη ή καθόλου μιτωτική δραστηριότητα, και ενδεχόμενη απώλεια κυττάρων αντισταθμίζεται με υπερτροφία των γειτονικών κυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού πληθυσμού του ΜΕΑ και την αλλοίωση του σχήματος τους στη διάρκεια της ζωής.

Σε κάθε κύτταρο διακρίνουμε την κορυφή (προς τον νευροαισθητηρικό αμφιβληστροειδή) και τη βάση (προς τον χοριοειδή). Στην κορυφή, η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει πολυάριθμες προσεκβολές, τις μικρολάχνες, που επενδύουν τα έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων. Σε κάθε κύτταρο ΜΕΑ αντιστοιχεί σταθερός αριθμός φωτοϋποδοχέων (περίπου 45).

Το κυτταρόπλασμα περιέχει μικροϊνίδια, μικροσωληνίσκους, πολυάριθμα κοκκία χρωστικής (τα μελανοσώματα) καθώς και κοκκία λιποφουσκίνης. Τα μελανοσώματα δημιουργούνται *in situ* κατά την εμβρυογένεση και ο αριθμός τους μειώνεται με την ηλικία, ενώ τα κοκκία λιποφουσκίνης αυξάνουν με την ηλικία και πιθανόν αντιπροσωπεύουν προϊόντα φαγοκυττάρωσης των φωτοϋποδοχέων. Η φαγοκυτταρική δραστηριότητα του κυττάρου ΜΕΑ είναι ιδιαίτερα έντονη, όπως φαίνεται από τα πολυάριθμα λυσοσώματα και φαγοσώματα. Τα τελευταία είναι κομμάτια των έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων τα οποία περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη. Μέσα στο κυτταρόπλασμα περιέχονται ακόμα, εκτός από τον πυρήνα και μιτοχόνδρια, αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή Golgi.

Στην βάση του κυττάρου, η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει πολλαπλές αναδιπλώσεις και βρίσκεται σε επαφή με τη μεμβράνη του Bruch, μια στιβάδα από εξωκυττάριο ιστό, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στο ΜΕΑ και τα χοριοτριχοειδή.



ΟΡΓΑΝΙΔΙΟ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Μικρολάχνες

Προσκόλληση και φαγοκυττάρωση των φωτοϋποδοχέων. Επιφάνεια για μεταβολικές ανταλλαγές

Διακυτταρικές συνδέσεις

Έξω αίματο-οφθαλμικός φραγμός

Μελανοσώματα

Απορρόφηση σκεδασμένου φωτός και UV
Αδραναιοποίηση ελευθέρων ριζών

Λιποσώματα

Περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα για την πέψη των φωτοϋποδοχέων

Φαγοςώματα

Περιέχουν φαγοκυττωμένα τμήματα των φωτοϋποδοχέων

Λιποφουσκίνη

Χρωστική της «γήρανσης», υπολείμματα της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας

Συσκευή Golgi

Έκκριση γλυκοζαμινογλυκανών (GAG's)

Αναδιπλώσεις της μεμβράνης

Αύξηση της επιφάνειας απορρόφησης

Ενδοπλασματικό δίκτυο

Σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων

Μιτοχόνδρια

Ο μεγάλος αριθμός τους υποδεικνύει την λειτουργία του ΜΕΑ ως ενεργού αντλίας

Εικόνα 1-2: Σχηματική απεικόνιση της δομής του κυττάρου ΜΕΑ και σύνοψη των κυριότερων λειτουργιών του. Τροποποιημένο από (Forrester J *et al.*, 1996)

1.3 Φυσιολογία του ΜΕΑ

Το κύτταρο ΜΕΑ από μεταβολική άποψη είναι εξαιρετικά ενεργό. Συνθέτει πληθώρα ενζύμων για λειτουργίες όπως η ενεργός μεταφορά ουσιών, ο μεταβολισμός της βιταμίνης Α, η αποδόμηση προϊόντων μεταβολισμού και η σύνθεση χυμικών και αυξητικών παραγόντων για τη ρύθμιση του περιβάλλοντος του ΜΕΑ και των φωτοϋποδοχέων. Το ΜΕΑ επίσης συμβάλλει στο σχηματισμό και τη διατήρηση του εξωκυττάρου περιβάλλοντος των φωτοϋποδοχέων, λειτουργία που είναι κρίσιμη για τη βιωσιμότητα τους αλλά και για τη διατήρηση της προσκόλλησης του αμφιβληστροειδή. Πολλές από αυτές τις μεταβολικές λειτουργίες διενεργούνται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης όπου εντοπίζονται υποδοχείς, κανάλια ιόντων και μεταβολίτες. Οι υποδοχείς αυτοί μπορεί να ευθύνονται για μερικές από τις ανοσολογικές ιδιότητες του ΜΕΑ και τη συμμετοχή του σε πληθώρα φλεγμονωδών και ιδιοπαθών νόσων.

Ο κυριότερος ρόλος του ΜΕΑ είναι ίσως η διασφάλιση της λειτουργίας των φωτοϋποδοχέων. Πράγματι, είναι γνωστό εδώ και περισσότερο από έναν αιώνα ότι «για να επιτελεί την οπτική λειτουργία του ο αμφιβληστροειδής πρέπει να εφάπτεται στο ΜΕΑ» (Kuhne, 1877)

1.3.1 Ανανέωση των φωτοϋποδοχέων

Οι φωτοϋποδοχείς ακολουθούν έναν ημερήσιο κύκλο ανανέωσης, όπου τμήματα των δίσκων των ραβδίων κατά κύριο λόγο αλλά και των κωνίων καταστρέφονται και αναπαράγονται. Υπολογίζεται ότι κάθε κύτταρο ΜΕΑ φαγοκυτταρώνει καθημερινά το ισοδύναμο από τους δίσκους 10 ραβδίων (Young, 1971) και η διαδικασία αυτή διαρκεί σε όλη τη ζωή. Το αποπίπτωντα τμήματα περιβάλλονται από μεμβράνη σχηματίζοντας έτσι τα φαγοσώματα. Τα φαγοσώματα ενώνονται με τα λυσοσώματα και τα ένζυμα που περιέχονται μέσα στα τελευταία οδηγούν σε αποδόμηση των συστατικών του φαγοσώματος. Τα προϊόντα από την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, είτε διαχέονται μέσω της μεμβράνης της βάσης του κυττάρου προς τα χοριοτριχοειδή, είτε επαναχρησιμοποιούνται σε συνθετικές οδούς. Υπολείμματα από την φαγοκυττάρωση των φωτοϋποδοχέων, κοκκία λιποφουσκίνης και άλλα προϊόντα μεταβολισμού εναποτίθενται ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και τη μεμβράνη του Bruch με τη μορφή διακριτών σχηματισμών που ονομάζονται drusen τα οποία θεωρείται ότι ακολουθούν ένα κύκλο αύξησης και υποστρόφης που εξαρτάται από την ακεραιότητα, λειτουργική και ανατομική, του υπερκείμενου ΜΕΑ (Feeney - Burns and Ellersieck, 1985, Grindle and Marshall, 1978). Η αύξηση των drusen, με την ηλικία μπορεί να αντικατοπτρίζει την φθίνουσα

ικανότητα του ΜΕΑ να απομακρύνει τα προϊόντα αποδόμησης. Τα drusen ταξινομούνται ανάλογα με την εμφάνιση τους σε σκληρά και μαλακά και θεωρείται, χωρίς να έχει αποδειχτεί ότι ενέχονται στην παθογένεια της εκφύλισης της ωχράς που σχετίζεται με την ηλικία (λεπτομερέστερη ανάλυση ακολουθεί παρακάτω)

1.3.2 Κύκλος της βιταμίνης Α

Το ΜΕΑ συμμετέχει στον μεταβολισμό της βιταμίνης Α. Συγκεκριμένα ένα βήμα του κύκλου των ρετινοειδών, η ισομερείωση της βιταμίνης Α επιτελείται αποκλειστικά μέσα στο κύτταρο ΜΕΑ. Τα κύτταρα ΜΕΑ προσλαμβάνουν βιταμίνη Α από την κυκλοφορία και τους φωτοϋποδοχείς και μπορούν και αποθηκεύουν τη βιταμίνη Α με την μορφή εστέρα.

1.3.3 Ρύθμιση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος των φωτοϋποδοχέων

Το εξωκυττάριο περιβάλλον των φωτοϋποδοχέων (interphotoreceptor matrix, IPM), που ονομάζεται και υποαμφιβληστροειδικός χώρος (subretinal space), είναι μια δομή υψηλής οργάνωσης που περιβάλλει τα ραβδία και τα κωνία και εκτείνεται από την έξω αφοριστική μεμβράνη ως την κορυφή των κυττάρων ΜΕΑ (Εικόνα 1-1). Αποτελείται από πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκοσαμινογλυκάνες, ορισμένες από τις οποίες παράγονται από το ΜΕΑ. Οι λειτουργίες του εξωκυττάριου περιβάλλοντος είναι σημαντικές και περιλαμβάνουν την ανταλλαγή των χρωμοφόρων, τη διατήρηση της προσκόλλησης του αμφιβληστροειδή στο ΜΕΑ, την ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και μεταβολιτών ανάμεσα στο ΜΕΑ και τον αμφιβληστροειδή και τη διατήρηση της ομοιόστασης των υποδοχέων καθώς και των απαραίτητων παραγόντων για τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης.

1.3.4 Διατήρηση της προσκόλλησης του αμφιβληστροειδή

Η προσκόλληση του αμφιβληστροειδή είναι μια πολύπλοκη λειτουργία που επιτυγχάνεται με παθητικούς και ενεργητικούς μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι παθητικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την τάση του υαλώδους σώματος, την πίεση του ενδοφθάλμιου υγρού και την ωσμωτική πίεση του χοριοειδή που κρατούν τον αμφιβληστροειδή στην θέση του. Επιπλέον, όμως, η διατήρηση της προσκόλλησης του αμφιβληστροειδή εξαρτάται και από τη μεταβολική του δραστηριότητα, καθώς και αυτήν του ΜΕΑ.

Η ελαστικότητα και η συγκολλητική ικανότητα του εξωκυττάριου περιβάλλοντος των φωτοϋποδοχέων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του σε νερό και ιόντα που με τη

σειρά τους ρυθμίζονται από τη μεταβολική δραστηριότητα του ΜΕΑ (Marmor *et al.*, 1980). Για να αντισταθμίσει τον αιματο-οφθαλμικό φραγμό το κύτταρο ΜΕΑ καταναλώνει μεγάλα ποσά ενέργειας για τη μεταφορά νερού και ιόντων. Η βάση και η κορυφή του κυττάρου διαφοροποιούνται όσον αφορά τους υποδοχείς και τους μηχανισμούς μεταφοράς. Έτσι για παράδειγμα η αντλία καλίου-νατρίου εντοπίζεται στην κορυφή, ενώ οι διάλυτοι ανταλλαγής ιόντων χλωρίου-διαττανθρακικών στη βάση. Πολλαπλά συστήματα ενεργητικής μεταφοράς μεταφέρουν νερό και ιόντα και προς τις δύο κατευθύνσεις, αλλά η συνισταμένη της δράσης τους είναι η μετακίνηση νερού από τον αμφιβληστροειδή προς τον χοριοειδή καθώς και η δημιουργία του δυναμικού ηρεμίας του κυττάρου. Έκτος από την ενεργητική μεταφορά, το κύτταρο ΜΕΑ χρησιμοποιεί και παθητικούς μηχανισμούς, όπως η ώσμωση και η υδροστατική πίεση.

Σε περίπτωση βλάβης του ΜΕΑ διαταράσσεται ο υπό τον αμφιβληστροειδή χώρος και κατά συνέπεια και η προσκόλληση του αμφιβληστροειδή, όπως συμβαίνει σε πολλές και διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, όπως η αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς, ορισμένες μορφές εκφύλισης της ωχράς σχετιζόμενες με την ηλικία, η κεντρική ορώδης χοριοειδο-αμφιβληστροειδοπάθεια και ορισμένες μορφές της μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου αποτελεί τη βάση για το ηλεκτρο-οφθαλμογράφημα (Electrooculogram, EOG), την ηλεκτροφυσιολογική δοκιμασία η οποία χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για την εξέταση του ΜΕΑ.

1.3.5 Αιματο-οφθαλμικός φραγμός

Τα κύτταρα ΜΕΑ συνδέονται μεταξύ τους με στέρεες συνδέσεις (zonula occludens) που εμποδίζουν τη διάβαση νερού και ιόντων. Οι συνδέσεις αυτές συνιστούν τον έξω αιματο-οφθαλμικό φραγμό (ο έσω συγκροτείται από τις συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών του αμφιβληστροειδή). Ο φραγμός αυτός αποτελεί εμπόδιο στη διάβαση στοιχείων του αίματος από το χοριοειδή προς τον αμφιβληστροειδή. Επιπλέον, λόγω της λειτουργίας του ως βιολογικό φίλτρο, το ΜΕΑ διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό του αμφιβληστροειδή και ιδιαίτερα των φωτοϋποδοχέων, καθώς μεταβολίτες και άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού, με κατεύθυνση από και προς τον αμφιβληστροειδή, πρέπει να περάσουν από το ΜΕΑ (Zinn KM and Benjamin - Henkind, 1982).

1.3.6 Ανοσορρύθμιση

Εκτός από την παθητική ανοσία που προσφέρει στον αμφιβληστροειδή με τον έξω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, το MEA έχει να επιδείξει, σε *in vitro* μελέτες κυρίως, και ενεργό ανοσοκατασταλτική δράση. Κάτω από συνθήκες φλεγμονής τα κύτταρα MEA, παράγουν ένα μεγάλο αριθμό κυτοκινών οι οποίες προκαλούν την παραγωγή ελευθέρων ριζών του μονοξειδίου του αζώτου (Liversidge *et al.*, 1994), την έκφραση μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και μορίων προσκόλλησης (adhesion molecules), καθώς, επίσης, και κατάργηση της λειτουργίας του αιματο-οφθαλμικού φραγμού (Holtkamp *et al.*, 2001). Επίσης, υπό συνθήκες stress τα κύτταρα MEA μπορούν και εκφράζουν πρωτεΐνες χαρακτηριστικές των μακροφάγων. Τέτοιες είναι υποδοχείς για το Fc τμήμα της IgG ανοσοσφαιρίνης (Eckert and Hafeman, 1986, Elner *et al.*, 1981), το μόριο CD68 (Elner *et al.*, 1992) και παράγοντες του συμπληρώματος (Elner *et al.*, 1981). Επιπλέον, τα κύτταρα MEA περιέχουν σε μεγάλη συγκέντρωση φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη όπως επίσης και κορεσμένα λιπαρά οξέα και αραχιδονικό οξύ. Έτσι εξηγείται σε κάποιο βαθμό η ικανότητα τους να παράγουν προσταγλανδίνες με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (Liversidge *et al.*, 1993).

1.3.7 Αδρανοποίηση ελευθέρων ριζών και φαρμάκων

Τα μελανοσώματα, κοκκία που περιέχουν μελανίνη, αποτελούν βασικό συστατικό του κυττάρου MEA. Ο ρόλος της μελανίνης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Πιστεύεται ότι απορροφά την περίσσεια φωτεινής ακτινοβολία και μειώνει τη σκέδαση του φωτός, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα της εικόνας. Επίσης, η μελανίνη δρα ως σταθεροποιητής των ελευθέρων ριζών και μπορεί να δεσμεύσει πολλές χημικές ουσίες (Ostrovsky *et al.*, 1987, Sarna, 1992).

1.3.8 Κυτταρικός κύκλος

Ως νευροεπιθήλιο, το MEA κάτω από φυσιολογικές συνθήκες παρουσιάζει ελάχιστη ή καθόλου μιτωτική δραστηριότητα. Προκειμένου να αντικαταστήσει ή να επιδιορθώσει τα οργανίδια ή τα συστατικά του, χρησιμοποιεί τη λειτουργία της αυτο-φαγοκυττάρωσης και επανασύνθεσης (Young and Bok, 1979).

Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις καθώς και *in vitro*, τα κύτταρα MEA πολλαπλασιάζονται. Έτσι, ένα μικρό έλλειμμα MEA (όπως μετά από εφαρμογή ακτινοβολίας LASER χαμηλής ισχύος) μπορεί να επουλωθεί μετά από 1-2 εβδομάδες με τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό μικρών κυττάρων που γεμίζουν το χάσμα

(Marmor, 1998). Η ικανότητα αυτή όμως κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να αποβεί επιβλαβής σε καταστάσεις όπου τα κύτταρα ΜΕΑ μεταναστεύουν σε εκφυλισμένο αμφιβληστροειδή (μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια) ή στην υαλοειδική κοιλότητα (παραγωγική υαλοειδο-αμφιβληστροειδοπάθεια) (Hiscott and Sheridan, 1998). Με το κατάλληλο ερέθισμα, τα κύτταρα ΜΕΑ μπορούν να συνθέτουν και να εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως VEGF (Adamis *et al.*, 1993, Shima *et al.*, 1995), PDGF (Campochiaro *et al.*, 1994, Yoshida *et al.*, 1992), FGF και κυτοκινών όπως IGF-1 (Moriarty *et al.*, 1994, Waldbillig *et al.*, 1991) και IL-1 (Jaffe *et al.*, 1992, Planck *et al.*, 1993). Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην φυσιολογία του αμφιβληστροειδούς, όμως έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η χοριοειδική νεοαγγείωση.

1.4 Συμμετοχή του ΜΕΑ σε διάφορες παθήσεις του οφθαλμού

Το ΜΕΑ συμμετέχει σε συγγενή, κληρονομούμενα, μεταβολικά, φλεγμονώδη και άλλα νοσήματα του οφθαλμού τα περισσότερα από τα οποία συνοψίζονται στον Πίνακα 1-1. Καθώς οι φυσιολογικές λειτουργίες του ΜΕΑ γίνονται περισσότερο κατανοητές, διαπιστώνουμε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ αμφιβληστροειδούς, χοριοειδούς και ΜΕΑ είναι τόσο ισχυρή, ώστε το ΜΕΑ να εμπλέκεται σε παθήσεις που παλαιότερα θεωρούνταν καθαρά «χοριοειδικές» ή «αμφιβληστροειδικές» (Marmor, 1998).

Επιπρόσθετα, καθώς οι γνώσεις μας για τη γενετική των παθήσεων του αμφιβληστροειδούς διευρύνονται, φαίνεται ξεκάθαρα πόσο λανθασμένη είναι κάθε προσπάθεια διαχωρισμού ανάμεσα σε παθήσεις που προέρχονται από τον αμφιβληστροειδή και αυτές που προέρχονται από το μέλαγχρον επιθήλιο. Η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, για παράδειγμα, ονομάζεται έτσι εξαιτίας του κλασσικού ευρήματος κατά την οφθαλμοσκόπηση της διασποράς χρωστικής από το ΜΕΑ. Όμως τα γονίδια που έχουν αναγνωριστεί ως τώρα και σχετίζονται με τη νόσο, κωδικοποιούν πρωτεΐνες των φωτοϋποδοχέων (Kent and Marmor, 1998). Έτσι είναι πιθανόν, η διαταραχή των φωτοϋποδοχέων να προκαλεί μεταβολικές βλάβες στο ΜΕΑ ή αντίστροφα η διαταραχή του ΜΕΑ να προκαλεί σε δεύτερο χρόνο το θάνατο των φωτοϋποδοχέων.

Η λεπτομερής ανάλυση των επιμέρους νοσημάτων διαφεύγει τον σκοπό της εργασίας αυτής. Θα αναφερθούμε παρακάτω μόνο στην εκφύλιση της ωχράς κηλίδας τη σχετιζόμενη με την ηλικία, στην οποία αναφέρεται και το κλινικό μέρος αυτής της μελέτης.

Πίνακας 1- 1: Παθήσεις του οφθαλμού όπου συμμετέχει και το ΜΕΑ

Συγγενείς	Συγγενής υπερτροφία του ΜΕΑ
Κληρονομούμενες	Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια Νόσος Stargardt Νόσος Best Δυστροφίες ώχρας (pattern dystrophies) Οικογενή drusen Δυστροφίες χοριοειδούς Χοριοειδερεμία Γυροειδής ατροφία Central areolar pigment epithelial dystrophy North Carolina dystrophy
Επίκτητες	Αποκόλληση αμφιβληστροειδούς Κυστοειδές οίδημα της ωχράς Παραγωγική υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια Κεντρική ορώδης χοριοαμφιβληστροειδοπάθεια Εκφύλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία Πολυποειδής χοριοειδική αγγειοπάθεια
Μεταβολικές	Γυροειδής ατροφία Αλφισμός Βλεννοπολυσακχαριδώσεις (σύνδρομα Hurler, Hunter, Sanfilippo) Λιπιδώσεις (νόσος Gaucher I) Γαγγλιοσιδωση τύπου II Σύνδρομο Kerns - Sayre Νόσος Refsum Ομοκυστινουρία Κυστίωση
Φλεγμονώδεις	Σύνδρομο λευκών κηλίδων Οξεία οπίσθια πολυεστιακή πλακώδης επιθηλιοπάθεια Πολλαπλές εφήμερες λευκές κηλίδες Έρπουσα χοριοειδοπάθεια Χοριοειδοπάθεια εν είδη κυνηγετικών χόνδρων Σύνδρομο πολυεστιακής χοριοειδίτιδας και πανραγοειδίτιδας Οξεία επιθηλίτιδα του ΜΕΑ (νόσος Krill) Αυτοάνοσες ραγοειδίτιδες (σαρκοειδωση, νόσος Αδαμαντιάδη- Behçet, σύνδρομο Vogt-Koyanagi-Harada, συμπαθητική οφθαλμία) Λοιμώδεις ραγοειδίτιδες (φυματίωση, σύφιλη τοξοπλάσμωση, ερυθρά)
Τοξικές	Φωτοτοξικότητα, Χλωροκίνη, Φαινοθειαζίνες, Ταμοξιφένη, Κανθαξαμίνη, Μεθοξυφλουράνη, Ισοτρετινοΐνη

1.4.1 Εκφύλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία

Η ωχρά κηλίδα είναι η περιοχή του αμφιβληστροειδή που είναι υπεύθυνη για την όραση υψηλής ανάλυσης και τη διάκριση των χρωμάτων. Ανατομικά ορίζεται ως κεντρική περιοχή του οπίσθιου αμφιβληστροειδή που περιέχει ξανθοφύλλη και δύο ή περισσότερες στιβάδες γαγγλιακών κυττάρων (Εικόνα 1-3α).

Η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία (ARMD, age-related macular degeneration) είναι η κύρια αιτία σημαντικής, μη αναστρέψιμης απώλειας της κεντρικής όρασης μετά την ηλικία των 65, στο δυτικό κόσμο (Fine *et al.*, 2000). Επίσης, είναι μια πάθηση με αδιευκρίνιστη ακόμη αιτιολογία, παθοφυσιολογία και θεραπεία. Παρακάτω, χάριν συντομίας θα την αναφέρουμε ως ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (HEΩ).

1.4.2 Κλινικές μορφές της HEΩ

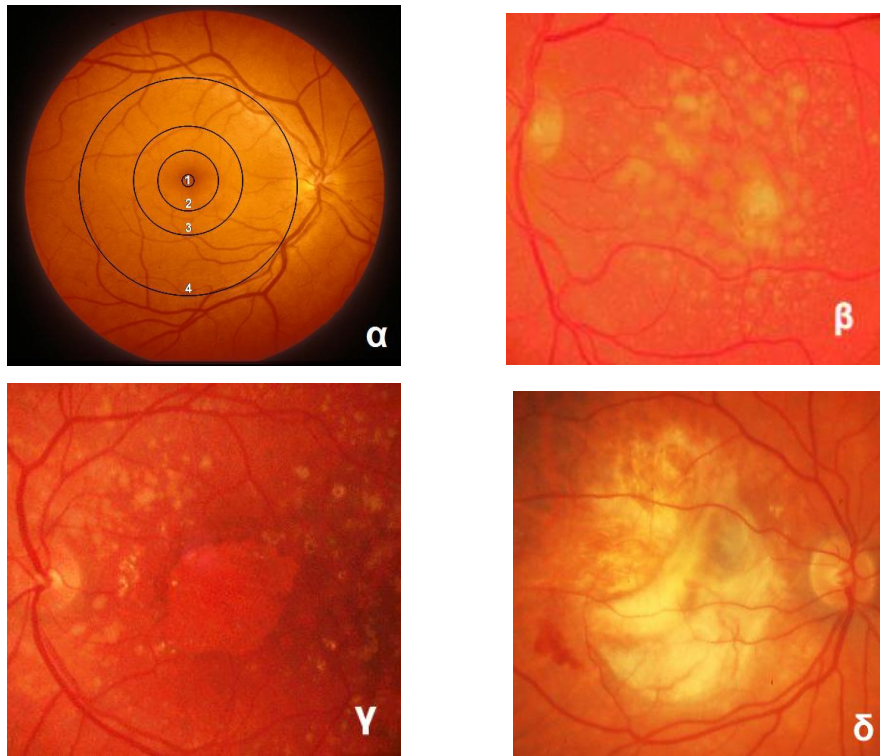
Το «σήμα κατατεθέν» της νόσου είναι η διαταραχή (υπέρχρωση) του MEA και η παρουσία drusen (Gass, 1972, Young, 1987) εναποθέσεων δηλαδή ανάμεσα στο MEA και τη μεμβράνη του Bruch (δες ανωτέρω, φυσιολογία MEA) (Εικόνα 1-3β). Ολιγάριθμα drusen δεν προδιαθέτουν για HEΩ (Sarks *et al.*, 1999), αλλά πολυάριθμα συρρέοντα drusen αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για απώλεια όρασης καθώς και για την ανάπτυξη χοριοειδικής νεοαγγείωσης (MPSG., 1997, Sarks, 1976).

Συνηθίζουμε να διακρίνουμε δύο κλινικές μορφές της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς, την ξηρά και την υγρή. Η ξηρού τύπου εκφύλιση της ωχράς ή γεωγραφική ατροφία (Εικόνα 1-3γ) χαρακτηρίζεται από την ατροφία του MEA και των υπερκείμενων φωτοϋποδοχέων με συνέπεια την προοδευτική απώλεια της όρασης (Green and Key, 1977).

Το χαρακτηριστικό της υγρής ή εξιδρωματικού τύπου εκφύλισης της ωχράς, είναι η χοριοειδική νεοαγγείωση, η ανάπτυξη δηλαδή νεόπλαστων αγγείων στον χοριοειδή, τα οποία μπορεί να παραμείνουν κάτω από το MEA ή να περάσουν διαμέσου του MEA στον υπό τον αμφιβληστροειδή χώρο. Ο ιστός αυτός διαταράσσει την ανατομία MEA - φωτοϋποδοχέων, προκαλεί διαρροή πλάσματος ή και αίματος από τα παθολογικά αγγεία με συνέπεια τη μείωση, συνήθως αιφνίδια και δραματική, της κεντρικής όρασης. Συχνά, το πρώτο οφθαλμοσκοπικό εύρημα της χοριοειδικής νεοαγγείωσης είναι αιμορραγία υπό το MEA ή υπό τον αμφιβληστροειδή. Η χρόνια διαρροή αίματος, ορρού και λιπιδίων αποτελεί ερέθισμα για την ανάπτυξη ινικής και γλοίας και το σχηματισμό δισκοειδούς ουλής στην ωχρά (Εικόνα 1-3δ).

Παλαιότερα πιστευόταν ότι η ατροφική μορφή HEΩ δεν μεταπίπτει στην εξιδρωματική μορφή. Ο Green και Enger όμως με μία ιστοπαθολογική μελέτη κατέδειξαν

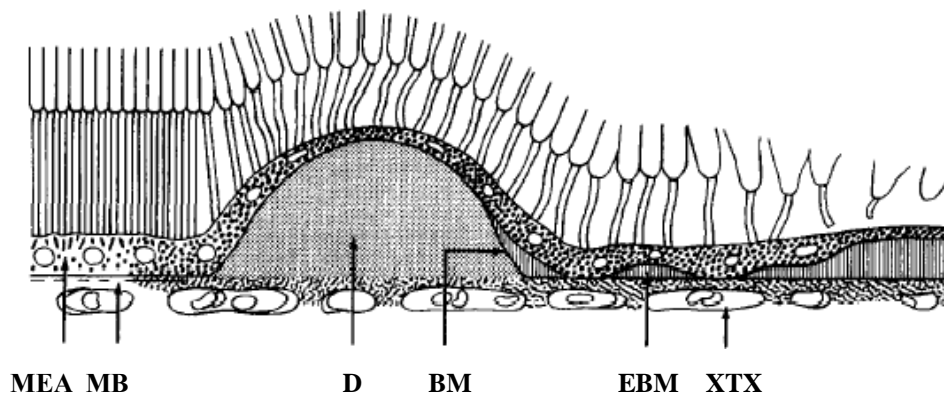
την παρουσία γεωγραφικής ατροφίας σε ποσοστό 34% των οφθαλμών με χοριοειδική νεοαγγείωση (Green and Enger, 1993). Η γεωγραφική ατροφία όπως και η χοριοειδική νεοαγγείωση εμφανίζεται σε ασθενείς με μεγάλα συρρέοντα drusen και διαταραχές χρωστικής (Holz *et al.*, 1994, Klein *et al.*, 1997). Τέλος, βρέθηκε ότι 2-4% των ασθενών με αμφοτερόπλευρη ατροφία εμφάνισαν χοριοειδική νεοαγγείωση σε μια περίοδο 2 ετών (Sunness *et al.*, 1999).



Εικόνα 1- 3. Οι διάφορες κλινικές μορφές της εκφύλισης της ωχράς που σχετίζεται με την ηλικία. [1-3α]: τοπογραφική ανατομία του οπισθίου πόλου (4) όπου διακρίνεται η ωχρά κηλίδα (3) η οποία περικελείει την περιβοθριακή περιοχή (2) και το κεντρικό βοθρίο (1). Στα αρχικά στάδια της ΗΕΩ εμφανίζονται drusen στην ωχρά [1-3β]. Η πάθηση μπορεί να εξελιχθεί στην ξηρή μορφή με έκδηλη την ατροφία του ΜΕΑ στην οφθαλμοσκόπηση [1-3γ], ή στην υγρή ή εξιδρωματική μορφή που χαρακτηρίζεται οφθαλμοσκοπικά από αιμορραγίες και οίδημα και στα τελικά στάδια ανάπτυξη ινοαγγειακού ιστού (ουλής) στην ωχρά [1-3δ].

1.4.3 Ο ρόλος του ΜΕΑ στην παθογένεια της ΗΕΩ

Η εστιακή υπερπλασία του ΜΕΑ, ο σχηματισμός drusen, η πάχυνση της μεμβράνης του Bruch και οι εναποθέσεις στη βασική μεμβράνη παρατηρούνται σε άλλοτε άλλο βαθμό σε όλους τους οφθαλμούς με την πάροδο της ηλικίας (Εικόνα 1-4), όμως μόνο ένα μικρό ποσοστό εκδηλώνει εκφυλιστική βλάβη με θάνατο των φωτουποδοχέων και απώλεια της όρασης (Feeney - Burns and Ellersieck, 1985, Green, 1982, Hogan, 1967, Hoshino *et al.*, 1984, Reese, 1960, Ring and Fujino, 1967). Ακόμα και η διάτρηση της μεμβράνης του Bruch από χοριοειδικά νεοαγγεία που σηματοδοτεί την έναρξη της εξιδρωματικής ΗΕΩ, αποτελεί συχνό εύρημα σε φυσιολογικούς οφθαλμούς ηλικιωμένων ασθενών (Ring and Fujino, 1967, Sarks, 1973). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις μπορούμε να πούμε ότι η ΗΕΩ αποτελεί ένα προχωρημένο στάδιο της φυσιολογικής γήρανσης του οφθαλμού και διαχωρίζεται από την τελευταία από την επίπτωση που έχει στην όραση.



Εικόνα 1-4: Σχηματικό διάγραμμα που παρουσιάζει τις ιστολογικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται στο ΜΕΑ και τους γειτονικούς ιστούς, με την πάροδο της ηλικίας.

Αριστερά, τα κύτταρα ΜΕΑ περιέχουν ελάχιστα κοκκία λιποφουσκίνης στη βάση και άφθονα κοκκία μελανίνης στην κορυφή. Η μεμβράνη του Bruch (MB) είναι λεπτή και διαυγής και η διάταξη των φωτουποδοχέων (απεικονίζονται μόνο τα έσω και έξω τμήματά τους) είναι πυκνή και ομαλή. Αυτή είναι η τυπική εικόνα στο νεαρό οφθαλμό.

Στην αμέσως γειτονική περιοχή φαίνονται οι πρώιμες εκφυλιστικές βλάβες: τα κοκκία λιποφουσκίνης αυξάνουν σε αριθμό, και γεμίζουν το κυτταρόπλασμα, ενώ παχύνεται η μεμβράνη του Bruch.

Στα δεξιά έχει σχηματιστεί ένα druse (D). Τα κύτταρα ΜΕΑ πάνω από το druse είναι αποπλατυσμένα, διογκωμένα και γεμάτα με κοκκία λιποφουσκίνης, η ποσότητα μελανίνης έχει μειωθεί, όπως επίσης έχουν χαθεί ορισμένοι από τους φωτουποδοχείς, ενώ η διάταξη των υπολοίπων εμφανίζεται διαταραγμένη (οι υποδοχείς που επιβιώνουν κονταίνουν και αποπλατύνονται).

Δεξιότερα του druse, η εκφύλιση του ΜΕΑ είναι περισσότερο έκδηλη, ενώ εμφανίζονται και εναποθέσεις στη βασική μεμβράνη (EBM).

Τέλος, κάτω από τα εκφυλισμένα κύτταρα ΜΕΑ σχηματίζεται ένα παχύ και συνεχόμενο στρώμα από εναποθέσεις της ΒΜ, η εκφύλιση των φωτουποδοχέων είναι πλέον εκσεσημασμένη ενώ αρχίζει και η ατροφία των χοριοτριχειοδών (ΧΤΧ). Τροποποιημένο από (Young, 1987)

Παρόλο που δεν μπορεί να αποκλειστεί η συμμετοχή των χοριοτριχοειδών, της μεμβράνης του Bruch και των φωτοϋποδοχέων στην παθογένεια της ΗΕΩ, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η αρχική βλάβη στην ΗΕΩ συμβαίνει στο ΜΕΑ (Green and Enger, 1993, Hogan, 1972).

Το αρχικό γεγονός στην εκφύλιση του ΜΕΑ φαίνεται να είναι η ανεπάρκεια των κυττάρων του να φαγοκυτταρώσουν σωστά τις μεμβράνες των φωτοϋποδοχέων, όπως φαίνεται από την αύξηση της συγκέντρωσης λιποφουσκίνης (Εικόνα 1-4). Η ανεπάρκεια αυτή μπορεί να προκαλείται, όπως και στον υπόλοιπο οργανισμό, από την τοξική δράση των ελευθέρων ριζών και της ορατής ακτινοβολίας (Young, 1987). Έχει διαπιστωθεί ότι οι φωτοϋποδοχείς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην επίδραση των παραγόντων αυτών (Young, 1988), αλλά το ίδιο ισχύει και για τα κύτταρα ΜΕΑ (Kuwabara, 1979). Φαίνεται ότι η άθροιση λιποφουσκίνης στα κύτταρα ΜΕΑ οφείλεται στη φαγοκυττάρωση μορίων των φωτοϋποδοχέων που έχουν υποστεί βλάβη και όχι σε άμεση μοριακή βλάβη του ΜΕΑ, καθώς η άθροιση λιποφουσκίνης μειώνεται σε περιπτώσεις που οι φωτοϋποδοχείς εκφυλίζονται πρώιμα (Katz *et al.*, 1986). Μελέτες σε ζώα (Hayes, 1974, Hughes and Coogan, 1974, Katz *et al.*, 1982), αλλά και σε ανθρώπους (Eagle *et al.*, 1980, Frangieh *et al.*, 1982, Weingeist *et al.*, 1982) έχουν αποδείξει ότι υπάρχει κάποιος ουδός στην αύξηση της συγκέντρωσης λιποφουσκίνης μέσα στο κύτταρα ΜΕΑ, πέρα από τον οποίο προκαλείται σοβαρή βλάβη στο μεταβολισμό του κυττάρου με συνέπεια το θάνατο των υπερκείμενων φωτοϋποδοχέων.

Στην περίπτωση της γεωγραφικής ατροφίας, στις περιοχές ατροφίας που είναι ορατές οφθαλμοσκοπικά διαπιστώνεται ατροφία του αμφιβληστροειδή και των χοριοτριχοειδών (McLeod *et al.*, 2002, Ramrattan *et al.*, 1994). Μελέτες αυτοφθορισμού σε οφθαλμούς με γεωγραφική ατροφία κατέδειξαν την ύπαρξη περιοχών αυτοφθορισμού, οι οποίες αργότερα εξελίσσονται σε περιοχές ορατής ατροφίας (Holz *et al.*, 2001). Ο αυτοφθορισμός αποδεικνύει την αυξημένη συγκέντρωση, στις περιοχές αυτές, λιποφουσκίνης η οποία είναι η κύρια φθορίζουσα χρωστική (fluophore) του βυθού και εντοπίζεται κυρίως στο ΜΕΑ. Με βάση αυτήν την παρατήρηση, είναι πιθανόν ότι η λιποφουσκίνη σχετίζεται με την παθογένεια της γεωγραφικής ατροφίας. Εκσεσημασμένη απόπτωση της έσω (κυρίως των κωνίων) αλλά και της έξω πυρηνικής στιβάδας του αμφιβληστροειδή έχει παρατηρηθεί κοντά σε περιοχές ατροφικού ΜΕΑ (Dunaief *et al.*, 2002)

Η βλάβη στο μεταβολισμό του κυττάρου ΜΕΑ έχει σαν επακόλουθο το σχηματισμό εναποθέσεων παθολογικών προϊόντων κάτω από τη βασική μεμβράνη του

κυττάρου, τον σχηματισμό δηλαδή των drusen και των εναποθέσεων της βασικής μεμβράνης (Εικόνα 1-4). Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και άλλες έχουν δείξει ότι οι εναποθέσεις στη βασική μεμβράνη (Feeney - Burns and Ellersieck, 1985, Friedman *et al.*, 1980, Grindle and Marshall, 1978, Hogan, 1967, Hogan, 1972, Hollenberg and Burt, 1969, Marshall and Laties, 1985, Mishima and Hasebe, 1978) και τα drusen (Farkas *et al.*, 1971a, Farkas *et al.*, 1971b, Farkas *et al.*, 1971c, Ishibashi *et al.*, 1986, Hogan, 1972, Mishima and Hasebe, 1978) είναι προϊόντα του MEA.

Το μελάγχρουν επιθήλιο συμμετέχει επίσης με διαφορετικούς τρόπους στα διάφορα στάδια της εξέλιξης της χοριοειδικής νεοαγγείωσης. Στα πρώιμα στάδια το MEA και οι υπερκείμενοι φωτουπόδοχοις ατροφούν, ενώ τα υποκείμενα χοριοτριχοειδή αποφράσσονται. Στο στάδιο αυτό αυξάνει η παραγωγή VEGF, bFGF and TGF- β και των υποδοχέων τους από το MEA (Wada *et al.*, 1999, Yi *et al.*, 1998). Αναπτύσσονται νεόπλαστα αγγεία στο χοριοειδή, τα οποία οργανώνονται σε νεοαγγειακές μεμβράνες που διατιτραίνουν τη μεμβράνη του Bruch με αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση της HEΩ υγρού τύπου. Επιλεκτική βλάβη του MEA στο πρώιμο αυτό στάδιο, φαίνεται να περιορίζει την ανάπτυξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης (Takahashi *et al.*, 1990, Uyama *et al.*, 1988).

Στα όψιμα στάδια της χοριοειδικής νεοαγγείωσης τα κύτταρα MEA πολλαπλασιάζονται και περιβάλλουν τον ινοαγγειακό ιστό, προκαλώντας τη συρρίκνωση του (Soubrane *et al.*, 1990, Zhu *et al.*, 1989, Luttly *et al.*, 1999, Uyama, 1991, Uyama *et al.*, 1987).

1.4.4 Θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης στην HEΩ

Οι συνέπειες της χοριοειδικής νεοαγγείωσης για την όραση είναι δραματικές. Μέσα στα 5 πρώτα έτη από την διάγνωση, το 65% των οφθαλμών υφίσταται σημαντική απώλεια της όρασης (>6 γραμμές στον πίνακα οπτικής οξύτητας Snellen) (MPSa, 1994, MPSb., 1994).

Η «κλασσική» μέθοδος θεραπείας της HEΩ στοχεύει στην καταστροφή των νεόπλαστων αγγείων με LASER φωτοπηξία, μόνη ή σε συνδυασμό με συστηματική χορήγηση φωτοευαίσθητων πορφυρινών (φωτοδυναμική θεραπεία). Παρόλο που η αποτελεσματικότητα της φωτοπηξίας με LASER σε επιλεγμένες μορφές HEΩ αποδείχτηκε με εμπειρισταωμένες κλινικές μελέτες (MPS, 1991, MPSa, 1994, MPSb., 1994), φάνηκε επίσης ότι η πλειονότητα (87%) των ασθενών με πρόσφατα διαγνωσμένη HEΩ εξιδρωματικού τύπου δεν πληρούν τα κριτήρια για την εφαρμογή φωτοπηξίας με LASER (Freund *et al.*, 1993). Ομοίως, παρόλο που η φωτοδυναμική θεραπεία αποδείχτηκε αποτελεσματική σε ορισμένες μορφές της εξιδρωματικής HEΩ (TAP, 1999, TAP, 2001)

πολύ μικρό ποσοστό ασθενών βελτίωσε οπτική οξύτητα με τη θεραπεία. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι μόλις 18% των ασθενών με εξιδρωματικού τύπου εκφύλιση της ωχράς πληρούν τα κριτήρια για φωτοδυναμική θεραπεία (Bermig *et al.*, 2002).

Πρόσφατες μελέτες έριξαν φως στην παθογένεια της HEΩ και άνοιξαν το δρόμο για νέες θεραπείες (Ambati *et al.*, 2003). Η αγγειογένεση θεωρείται σήμερα ότι παίζει τον κύριο ρόλο. Στην διάρκεια της τελευταίας 10ετίας, νέα φάρμακα που στοχεύουν στον παράγοντα VEGF εγκρίθηκαν για χρήση στην HEΩ από τον Αμερικάνικο οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA). Οι παράγοντες αυτοί χορηγούνται με ενδοβολβικές ενέσεις. Το Ranibizumab (Lucentis) εγκρίθηκε από το FDA το 2006 για τη θεραπεία της εξιδρωματικής HEΩ. Αποτελεί τμήμα εξανθρωποποιημένου αντισώματος κατά του VEGF-A (Ferrara *et al.*, 2006). Το Bevacizumab (Avastin, εγκεκριμένο από το FDA για χρήση σε μεταστατικό καρκίνο, αλλά όχι σε οφθαλμικές παθήσεις) φάνηκε ότι είναι επίσης αποτελεσματικό για την αναστολή της εξιδρωματικής HEΩ (Schouten *et al.*, 2009). Πρόκειται για μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του VEGF-A με φαρμακολογική δράση παρόμοια με αυτήν του ranibizumab. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ των δύο φαρμάκων βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη. Το Pegaptanib (Macugen) είναι ένα τροποποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο που δεσμεύει μια ισομορφή του VEGF, την VEGF165, η οποία ενέχεται στην οφθαλμική νεοαγγείωση. Η κλινική του χρήση εγκρίθηκε από το FDA το 2004. Οι κλινικές μελέτες ως τώρα δείχνουν ότι υπολείπεται σε αποτελεσματικότητα σε σχέση με το ranibizumab (Colquitt *et al.*, 2008).

Η μελέτη των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη και πολλά ερωτήματα όσον αφορά τη δοσολογία, τις παρενέργειες και την αποτελεσματικότητά τους σε βάθος χρόνου μένει να απαντηθούν. Το κυριότερο πρόβλημα από τη χρήση τους είναι η παροδική τους δράση: δεν προκαλούν μόνιμη υποστρόφη της νεοαγγείωσης.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται περισσότερο αντιληπτή η συμμετοχή της ισχαιμίας στην παθογένεια της HEΩ (Feigl, 2009). Έτσι, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην έρευνα παραγόντων που θα μπορούσαν να προλάβουν την ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς και να χρησιμοποιηθούν μόνοι ή σε συνδυασμό με την LASER φωτοπηξία, τη φωτοδυναμική θεραπεία ή τους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες. Με την έννοια αυτή και η σωματοστατίνη, όπως θα δούμε παρακάτω, θα μπορούσε να έχει κάποιο ρόλο στη θεραπευτική της HEΩ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

2.1 Η ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ

2.1.1 Γενικά

Η σωματοστατίνη είναι ένα πεπτίδιο με πολλαπλές δράσεις, το οποίο παράγεται από νευρικά και εκκρινικά κύτταρα σε διάφορους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, τα νησίδια του παγκρέατος, το έντερο και ο θυρεοειδής αδένας. Ρυθμίζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως την έκκριση ορμονών, τη νευροδιαβίβαση, τη συσταλτικότητα των λείων μυϊκών ινών και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Patel, 1992b).

2.1.2 Η ανακάλυψη της σωματοστατίνης

Η έρευνα για την ανίχνευση των παραγόντων εκείνων που επάγουν την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH, Growth Hormone) από την υπόφυση, έδωσε τις πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός υποθαλαμικού παράγοντα που αναστέλλει την έκκριση της GH (Krulich *et al.*, 1968). Λίγα χρόνια αργότερα, απομονώθηκε σε υποθαλαμικά παρασκευάσματα προβάτου, ένα κυκλικό δεκατετραπεπτίδιο, η σωματοστατίνη-14 (SRIF-14, Somatotropin Release Inhibitory Factor-14), και χαρακτηρίστηκε ως ο παράγοντας εκείνος που αναστέλλει την έκκριση της GH (Brazeau *et al.*, 1973).

2.1.3 Θέσεις έκφρασης της σωματοστατίνης

Μετά την ανακάλυψη της SRIF-14 στον υποθάλαμο, κύτταρα που περιέχουν σωματοστατίνη εντοπίστηκαν και σε πληθώρα άλλων κεντρικών και περιφερικών οργάνων (Πίνακας 2-1). Υψηλή έκφραση σωματοστατίνης εντοπίστηκε με ραδιοανοσολογικές (radioimmunoassay, RIA) και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές στο Κεντρικό (Κ.Ν.Σ) και το περιφερικό νευρικό σύστημα (Π.Ν.Σ), το έντερο, την ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος και τον αμφιβληστροειδή, και σε μικρότερο βαθμό στο θυρεοειδή, τους υπογνάθιους αδένες, τα επινεφρίδια, τον πλακούντα, το ουροποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα (Patel, 1999, Reisine and Bell, 1995b, Thermos, 2003).

Πίνακας 2-1: Θέσεις έκφρασης της σωματοστατίνης

Περιοχή	Θέσεις	
Νευρικό σύστημα	Νευρώνες:	Υποθάλαμος
		Μεταϊχμιακό σύστημα
		Εγκεφαλικός φλοιός
		Μέσος εγκέφαλος
		Έξωπυραμιδικό σύστημα
		Νωτιαίος μυελός
		Αυτόνομα γάγγλια
		Γάγγλια της πρόσθιας ρίζας
Έντερο	D-κύτταρα:	Βλεννογόμος
	Νευρώνες:	Μυεντερικό πλέγμα
Πάγκρεας	D-κύτταρα:	Νησίδια Langerhans
Οφθαλμός	Αμφιβληστροειδής	Αμακρινικά κύτταρα
		Γαγγλιακά κύτταρα
Θυρεοειδής	C-κύτταρα:	Παραθηλακιδώδη κύτταρα
Υπογάθιος αδένας	D-κύτταρα:	Εκφορητικά κύτταρα
Επινεφρίδια	Κύτταρα του μυελού	
Πλακούντας	Κυτταροτροφοβλάστες	
Ουροποιητικό σύστημα	Νεφρικά σπειράματα, αθροιστικά σωληνάρια	
Αναπαραγωγικά όργανα	Όρχεις, επιδιδυμίδα, προστάτης	

Τροποποιημένο από (Tannenbaum and Epelbaum, 2000)

2.1.4 Οι δράσεις της σωματοστατίνης

Εκτός από την αναστολή της έκκρισης της GH, έχει αναγνωριστεί και ένα ευρύ φάσμα άλλων δράσεων της σωματοστατίνης. Το πεπτίδιο αυτό δρα σε πολλαπλούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου, του ενδοκρινικού και εξωκρινικού παγκρέατος, του γαστρεντερικού σωλήνα, του θυρεοειδή, των επινεφριδίων του νεφρού και του αμφιβληστροειδή, και ρυθμίζει ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών ασκώντας κυρίως ανασταλτική δράση (Πίνακας 2-2).

Πίνακας 2-2: Δράσεις της σωματοστατίνης σε διάφορα όργανα

Πρόσθια υπόφυση	GH ↓ TSH ↓ ACTH ↓ Prl ↓	Ενδοκρινικό πάγκρεας	Ινσουλίνη ↓ Γλουκαγόνο ↓ Σωματοστατίνη ↓ Παγκρεατικά πολυπεπίδια ↓
Κ.Ν.Σ	Νευροδιαβιβαστές ↓ ↑ CRH ↓ TRH ↓ GHRH ↓ Σωματοστατίνη ↓ Διέγερση νευρώνων ↑ Εγρήγορση ↑ Τονικοί-κλωνικοί σπασμοί ↑ Λήψη τροφής ↓ ↑ Ύπνος REM ↑	Εξωκρινικό πάγκρεας Γαστρεντερικός σωλήνας	Ένζυμα ↓ Δικαρβονικά ↓ Γαστρίνη ↓ Σεκρετίνη ↓ CCK-πανκρεοζυμίνη ↓ VIP ↓ GIP ↓ Μοτουλίνη ↓ Γαστρικό οξύ ↓ Πεψίνη ↓ Ρυθμός εκκένωσης ↓ Κινητικότητα ↓ Απορρόφηση τροφών ↓ Απορρόφηση ιόντων ↓ Πολλ/σμός βλεννογόνου ↓ Αιματική ροή ↓
Θυρεοειδής	T3 ↓ T4 ↓ Καλιτονίνη ↓		
Νεφρό	Ρενίνη ↓ Απορρόφηση νερού ↓	Αμφιβληστροειδής	Σωματοστατίνη ↓ Παραγωγή NO _x ↑ Νεοαγγείωση αμφιβληστροειδούς ↓
Επινεφρίδια	Αλδοστερόνη ↓ Κατεχολαμίνες ↓		

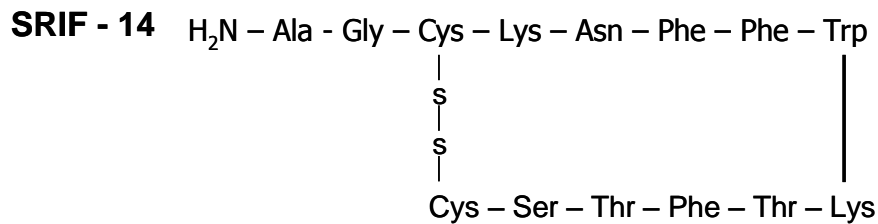
GH: Αυξητική ορμόνη, TSH: Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, ACTH: Αδρενοκορτικοτροπίνη, Prl: Προλακτίνη CRH: Εκλυτικός παράγοντας (ορμόνη) της Κορτικοτροπίνης, TRH: Εκλυτικός παράγοντας (ορμόνη) της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης, T3: Τριωδοθυρονίνη, T4: Τετραϊωδοθυρονίνη (Θυροξίνη), CCK: Χοληκυστοκινίνη VIP: Αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο GIP: Γαστρικό ανασταλτικό πολυπεπίδιο. Τροποποιημένο από (Tannenbaum and Epelbaum, 2000)

Η σωματοστατίνη δρα ως νευροδιαβιβαστική και νευροτροποποιητική ουσία στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, ενώ αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων (Buscail *et al.*, 1994a, Ferjoux *et al.*, 2000). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η σωματοστατίνη αναστέλλει τη βασική και την επαγόμενη έκκριση και άλλων ορμονών εκτός από την αυξητική ορμόνη, όπως η ινσουλίνη, το γλουκαγόνο, η γαστρίνη, η σεκρετίνη και το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) (Bertherat *et al.*, 1991, Heintges *et al.*, 1994, Patel, 1992b, Unger *et al.*, 1978).

Συμπερασματικά, η σωματοστατίνη δρα συστηματικά ως κλασσική ορμόνη, τοπικά ως νευροδιαβιβαστής-νευροτροποποιητής και παρακρινικά-αυτοκρινικά ως ρυθμιστής (Tannenbaum and Epelbaum, 2000).

2.1.5 Οι δραστικές μορφές της σωματοστατίνης

Έχουν βρεθεί δύο βιολογικά δραστικές μορφές της σωματοστατίνης: η σωματοστατίνη-14 και η σωματοστατίνη-28. Το μόριο της σωματοστατίνης περιέχει δύο υπολλείματα κυστεΐνης τα οποία ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό. Ο δεσμός αυτός είναι σημαντικός για τη βιολογική της δράση όπως σημαντικά είναι επίσης και τα αμινοξέα 6-9, τα οποία περιέχονται μέσα στη δακτυλιοειδή δομή του μορίου (Εικόνα 2-1).

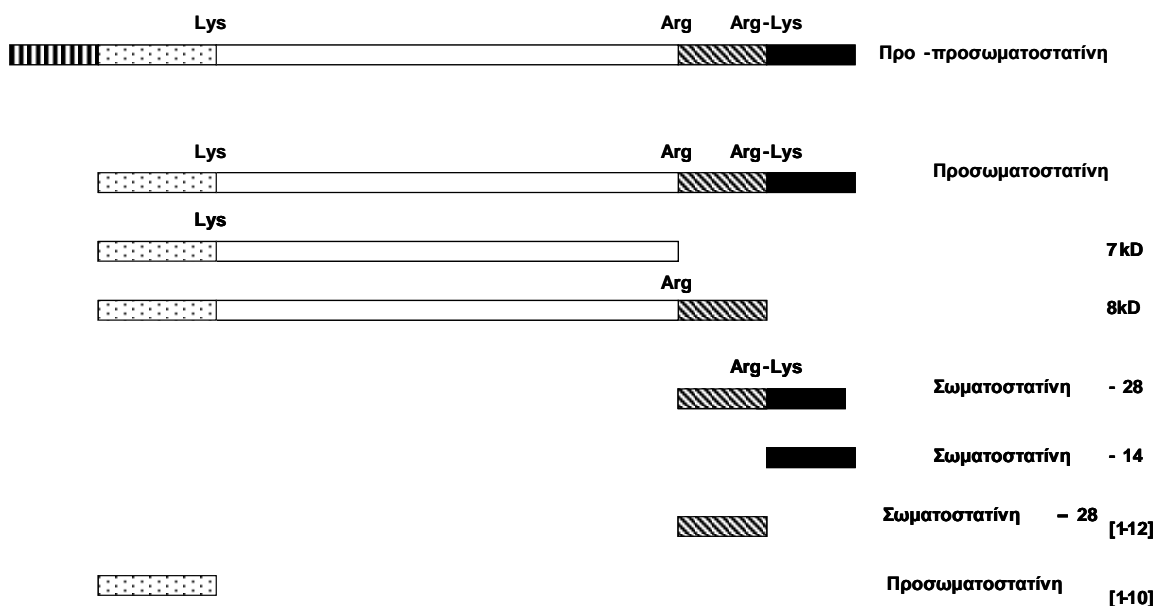


Εικόνα 2-1: Δευτεροταγής δομή της SRIF-14. Ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των δύο υπολλειμάτων κυστεΐνης, καθώς και τα αμινοξέα Trp⁸ και Lys⁹ είναι ουσιαστικής σημασίας για τη βιολογική δράση του μορίου.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της σωματοστατίνης βρίσκεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 3q28 (Naylor *et al.*, 1983) στο ποντίκι στο χρωμόσωμα 16 (Patel and Tannenbaum, 1990) στον αρουραίο στο χρωμόσωμα 11 (Du *et al.*, 1994) και στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 1q23-q25 (Thue and Schmutz, 1995). Το γονίδιο της σωματοστατίνης παρουσιάζει κοινή μορφολογία μεταξύ ποντικού (Montminy *et al.*, 1984, Tavianini *et al.*, 1984) και ανθρώπου (Shen and Rutter, 1984).

Όπως συμβαίνει με όλα τα νευροδραστικά πεπτίδια, η σωματοστατίνη συντίθεται αρχικά ως τμήμα της προ-προσωματοστατίνης, μιας πρόδρομης πρωτεΐνης 115-122 υπολλειμάτων αμινοξέων, ανάλογα με το είδος (Benoit *et al.*, 1985, Patel, 1992a).

Στην Εικόνα 2-2 παρουσιάζεται η επεξεργασία που υφίσταται η προ-προσωματοστατίνη προκειμένου να παραχθούν τα τελικά προϊόντα της, SRIF-14 και SRIF-28. Συγκεκριμένα, η προ-προσωματοστατίνη διασπάται ταχύτατα σε μία πρωτεΐνη 92 αμινοξέων, την προσωματοστατίνη. Στο καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου της προσωματοστατίνης υπάρχουν δύο διακριτές θέσεις πρωτεόλυσης, μία διβασική θέση αργινίνης-λυσίνης και μία μονοβασική θέση αργινίνης. Πέψη της προορμόνης στη διβασική θέση Arg-Lys παράγει τη σωματοστατίνη-14 και ένα πεπτίδιο 8kDa, ενώ πέψη στην μονοβασική θέση αργινίνης (Arg) παράγει την σωματοστατίνη-28 και ένα πεπτίδιο 7kDa (Lepage-Lezin *et al.*, 1991). Η παραγωγή της SRIF-14 συμβαίνει ανεξάρτητα από αυτήν της SRIF-28 (Patel and Galanorouli, 1995). Επιπρόσθετα, υπάρχει μια δεύτερη μονοβασική θέση λυσίνης (Lys) στο αμινο-τελικό τμήμα του μορίου της προσωματοστατίνης. Πέψη στη θέση αυτή παράγει το δεκαπεπτίδιο προσωματοστατίνη_[1-10], το οποίο είναι ένα μόριο χωρίς κάποια γνωστή βιολογική δράση (Benoit *et al.*, 1987).



Εικόνα 2-2: Σχηματική αναπαράσταση της προ-προσωματοστατίνης των θηλαστικών, της διβασικής και των μονοβασικών θέσεων πέψης της και των προϊόντων αποδόμησης της.

Στα θηλαστικά η αναλογία SRIF-14 προς SRIF-28 διαφέρει ανάλογα με τον ιστό. Έτσι, στον υποθάλαμο και τον εγκεφαλικό φλοιό η αναλογία αυτή είναι 4:1, ενώ στο στομάχι, τα νησίδια του παγκρέατος, τους εντερικούς νευρώνες και τον αμφιβληστροειδή, παράγεται σχεδόν αποκλειστικά η σωματοστατίνη-14. Αντίθετα, τα κύτταρα του

βλεννογόνου του λεπτού εντέρου παράγουν κυρίως σωματοστατίνη-28 (Patel *et al.*, 1981, Patel *et al.*, 1985). Αν και η σωματοστατίνη-28 φαίνεται να αποτελεί πρόδρομο μόριο, διαθέτει μία πλειάδα βιολογικών δράσεων. Αποδείχθηκε, για παράδειγμα, ότι η SRIF-28 είναι αποτελεσματικότερη της SRIF-14 στην αναστολή της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης και της ινσουλίνης (Tannenbaum *et al.*, 1982). Τα υπόλοιπα σωματοστατινεργικά πεπτιδία δεν έχουν γνωστή βιολογική δράση. Η σωματοστατίνη-14 αποδομείται γρηγορότερα από την σωματοστατίνη-28. Η αποδόμηση και των δύο πεπτιδίων γίνεται με την δράση ειδικών ενδοπρωτεασών στην θέση Try⁸ και Lys⁹ της σωματοστατίνης-14 (Εικόνα 2-1) (Dahms and Mentlein, 1992).

Το σωματοστατινεργικό σύστημα επεκτάθηκε πρόσφατα με την ανακάλυψη της κορτιστατίνης, η οποία έχει κοινά με την σωματοστατίνη 11 από τα 14 αμινοξέα της. Αγγελιοφόρο RNA της κορτιστατίνης έχει εντοπιστεί σε πολλαπλές θέσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Dalm *et al.*, 2004).

2.2 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

2.2.1 Γενικά

Η σωματοστατίνη ασκεί τις φυσιολογικές της δράσεις μέσω μεμβρανικών υποδοχέων υψηλής συγγένειας (Schonbrunn and Tashjian, 1978) οι οποίοι συζεύγνυνται με G-πρωτεΐνες (Reisine and Bell, 1995b) και συνδέονται με πολλαπλά εκτελεστικά συστήματα, όπως αυτά της αδενυλικής κυκλάσης, διαύλων ιόντων και φωσφατασών της τυροσίνης (Bruns *et al.*, 1995, Delesque *et al.*, 1995, Kleuss, 1995).

Σημαντικό ρόλο στη μελέτη των σωματοστατινεργικών υποδοχέων έπαιξε η σύνθεση αναλόγων της σωματοστατίνης ανθεκτικών στις πεπτιδάσες. Οι πρώτες ενδείξεις για την ετερογένεια των υποδοχέων της σωματοστατίνης προέκυψαν από μελέτες δέσμευσης με ραδιενεργά ανάλογα της σωματοστατίνης, όπου βρέθηκε ότι το συνθετικό ανάλογο της σωματοστατίνης SMS 201-995 (οκτρεοτιδίο), παρουσίασε αγωνιστική προς τη σωματοστατίνη δράση και είχε την ικανότητα να δεσμεύεται με διαφορετική συγγένεια στις θέσεις δέσμευσης της σωματοστατίνης στον εγκέφαλο αρουραίου (Reubi, 1984). Ακολούθησε πληθώρα ενδείξεων για την ύπαρξη πολλαπλών υποδοχέων σωματοστατίνης τόσο από φαρμακολογικές (Reubi *et al.*, 1986, Reubi *et al.*, 1987, Tran *et al.*, 1985) όσο και βιοχημικές μελέτες (Strikant and Patel, 1985). Η ετερογένεια των υποδοχέων της σωματοστατίνης αποδείχτηκε τελικά με την κλωνοποίηση τους το 1992.

2.2.2 Η κλωνοποίηση των υποδοχέων της σωματοστατίνης

Στα θηλαστικά, έχουν αναγνωρισθεί και κλωνοποιηθεί έως τώρα πέντε υποτύποι υποδοχέων σωματοστατίνης που ονομάζονται sst_{1-5} , αριθμημένοι ανάλογα με τη σειρά που ανακαλύφθηκαν [λεπτομερής ιστορική ανασκόπηση σε (Reisine and Bell, 1995a)].

Τα γονίδια των sst υποδοχέων κωδικοποιούν πρωτεΐνες με 346 έως 428 υπολείματα αμινοξέων. Τα γονίδια αυτά γενικά στερούνται ιντρονίων και βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα στον άνθρωπο (14q13, 17q24, 22q13.1, 20p11.2 και 16p13.3 αντίστοιχα για τους sst_1 έως sst_5). Στον αρουραίο και το ποντίκι το γονίδιο για τον sst_2 διαθέτει ένα ιντρόνιο και οι sst_2 υποδοχείς στα είδη αυτά υπάρχουν σε δύο ισομορφές : sst_{2A} και sst_{2B} . Οι ισομορφές αυτές είναι προϊόντα διαφορετικού ματίσματος (alternative splicing) του sst_2 γονιδίου (Reisine *et al.*, 1993, Schindler *et al.*, 1998, Vanetti *et al.*, 1992). Ο sst_{2A} υπότυπος αποτελεί την ακέραια μορφή του γονιδίου και ο sst_{2B} την ματισμένη (spliced) μορφή. Τα γονίδια sst_{2A} και sst_{2B} του ποντικού κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεγέθους 369 και 346 αμινοξέων, αντίστοιχα (Εικόνα 2-3).

sst_{2A}	VSGTEDGERSDSKQDKSRLNETTETQRTLLNGDLQTSI	332-369
sst_{2B}	ADNSQSGAEDI IAWV	332-346

Εικόνα 2-3: Διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων των υποτύπων sst_{2A} και sst_{2B} .

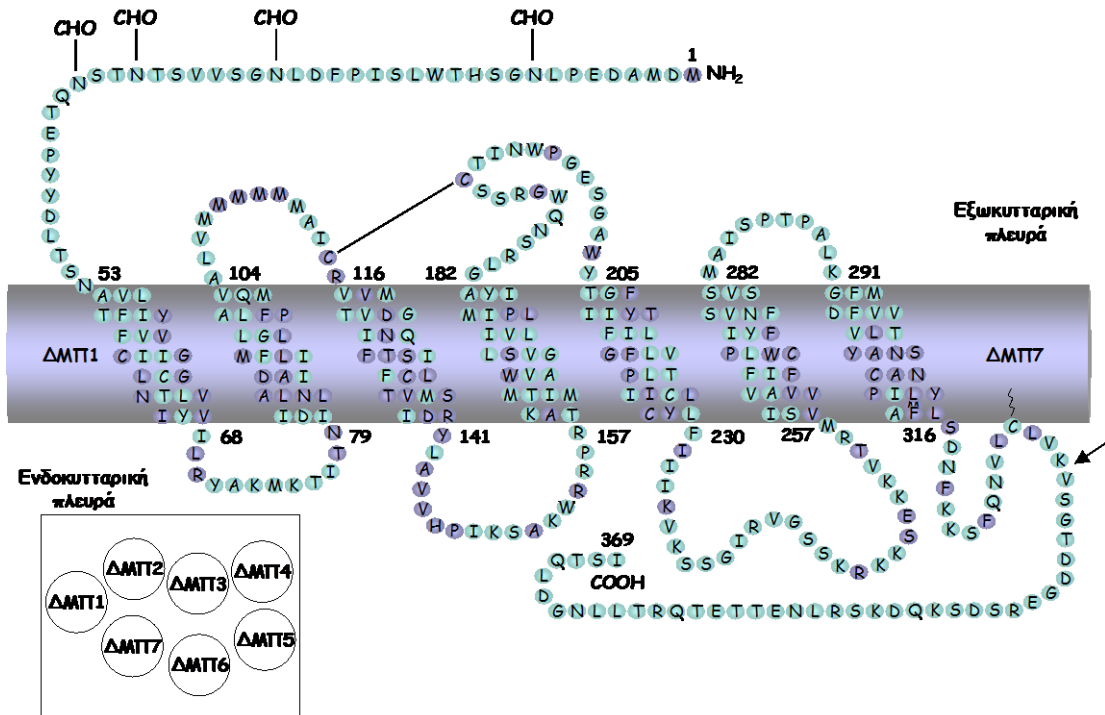
Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδίου sst_2 αποκάλυψε επίσης την παρουσία ορίων ιντρονίων-εξονίων, γεγονός δείχνει ότι ο sst_2 του ανθρώπου όπως και του ποντικού μπορεί να έχει επίσης ισομορφές (Patel *et al.*, 1993). Οι υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή τους, διαφέρουν, όμως, ως προς τις φαρμακολογικές τους δράσεις.

2.2.3 Η δομή του σωματοστατινεργικού υποδοχέα

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης ανήκουν στην ομάδα I των υποδοχέων με 7 διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες συνδέονται με τις G-πρωτεΐνες (Bell *et al.*, 1995) (Εικόνα 2-4). Διαφέρουν ως προς την αλληλουχία τους από τα άλλα μέλη της υπερικογένειας, με εξαίρεση τους υποδοχείς των οπιοειδών, με τους οποίους παρουσιάζουν ομοιότητα ως και 30% (Yasuda *et al.*, 1993, Yasuda *et al.*, 1992).

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης στον άνθρωπο ποικίλουν σε μέγεθος από 364 (sst_5) ως 418 (sst_3) αμινοξέα με 46-61% ομολογία μεταξύ των υποτύπων στην αλληλουχία των

αμονοξέων και περίπου 125 σταθερά αμινοξέα (25%). Περισσότερο σταθερή είναι η πρωτοταγής δομή των 7 διαμεμβρανικών τμημάτων, ενώ αυτή των N- και C- τελικών άκρων παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των υποτύπων



Εικόνα 2-4: Μοντέλο της διάταξης του ανθρώπινου υποδοχέα της σωματοστατίνης (hsst₂) στην κυτταρική μεμβράνη. Αλληλουχία του hsst₂ υπότυπου. Το αμινο-τελικό άκρο του μορίου βρίσκεται στο εξωτερικό του κυττάρου και το καρβοξυ-τελικό άκρο ενδοκυττάρια, ενώ η αλυσίδα των αμινοξέων διέρχεται 7 φορές διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Με μπλε σημειώνονται τα αμινοξέα που διατηρούνται σταθερά μεταξύ των διαφόρων υποτύπων των hssts. Στο αμινο-τελικό άκρο σημειώνονται τέσσερις πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης (CHO).

Τα αμινοξέα Cys¹¹⁵ και Cys¹⁹³ προβλέπεται ότι συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό, ενώ η Cys³²⁸ μπορεί να αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του καρβοξυ-τελικού άκρου στην κυτταρική μεμβράνη. Η αλληλουχία Asp-Arg-Tyr στον τρίτο ενδοκυττάριο βρόγχο αποτελεί τη θέση για σύζευξη με G-πρωτεΐνες. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση διαφορετικού ματίσματος για τους sst_{2A} και sst_{2B} στο ποντίκι.

Στο ένθετο πλαίσιο φαίνεται η πιθανή κατανομή στον χώρο των διαμεμβρανικών περιοχών (ΔΜΠ1-7). *Τροποποιημένο από (Reisine and Bell, 1995a)*

Η ομολογία των υποδοχέων της σωματοστατίνης μεταξύ τους, ανέρχεται στο 70%. Όλοι οι υποδοχείς δεσμεύουν τη φυσική σωματοστατίνη με υψηλή συγγένεια αλλά διαφέρουν στα χαρακτηριστικά πρόσδεσης διαφόρων αναλόγων της σωματοστατίνης (Patel and Srikant, 1994). Με βάση τη δομή και το φαρμακολογικό τους προφίλ οι υποδοχείς αυτοί χωρίζονται σε δύο ομάδες: το ζευγάρι sst_1/sst_4 από τη μια, και την ομάδα των $sst_2/sst_3/sst_5$ από την άλλη (Πίνακας 2-3). Και οι πέντε υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια και για τα δύο ενδογενή πεπτίδια σωματοστατίνης SRIF-14 και 28.

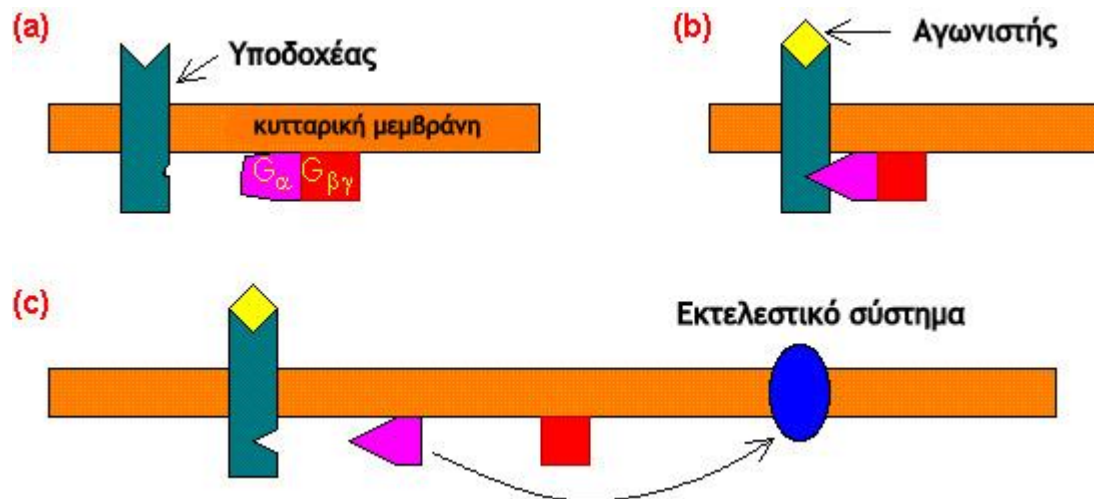
Πίνακας 2-3: Χαρακτηριστικά των ανθρώπινων κλωνοποιημένων υποδοχέων σωματοστατίνης

	sst_1	sst_2	sst_3	sst_4	sst_5
Χρωμοσωμική εντόπιση	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
Μοριακό Βάρος (kDa)	53-72	71-95	65-85	45	52-66
Αριθμός αμινοξέων	391	369	418	388	363
Μέγεθος mRNA (kb)	4.8	8.5	5.0	4.0	4.0
Ομολογία αμινοξέων					
sst_1	-	47%	46%	61%	49%
sst_2		-	51%	47%	52%
sst_3			-	46%	59%
sst_4				-	51%
sst_5					-

2.2.4 Μηχανισμοί μετάδοσης σήματος των υποδοχέων της σωματοστατίνης

Οι σωματοστατινεργικοί υποδοχείς συνδέονται με πολλαπλά εκτελεστικά συστήματα μέσω διαφόρων G-πρωτεϊνών (Bell and Reisine, 1993, Florio and Schettini, 1996, Law *et al.*, 1991, Law and Reisine, 1992, Law *et al.*, 1993, Meyerhof *et al.*, 1991, Reisine and Bell, 1995a, Reyl and Lewin, 1982). Οι G-πρωτεΐνες είναι τριμερή συμπλέγματα που αποτελούνται από α -, β - και γ - πρωτεϊνικές υπομονάδες. Δέσμευση του αγωνιστή στον υποδοχέα προκαλεί αλλαγή στη δομή του υποδοχέα που οδηγεί στη δέσμευση του τελευταίου με τις G-πρωτεΐνες. Η δέσμευση αυτή με τη σειρά της προκαλεί την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών με απομάκρυνση της GDP από την α -υπομονάδα και δέσμευση της GTP σε αυτή. Η μορφή της α -υπομονάδας που συνδέεται με GTP,

αποδεσμεύεται από το σύμπλεγμα των β/γ υπομονάδων. Τέλος, τόσο η ελεύθερη α-υπομονάδα όσο και το ελεύθερο σύμπλεγμα των β/γ υπομονάδων αλληλεπιδρούν με εκτελεστικά συστήματα (effector systems) του κυττάρου-στόχου (Kleuss *et al.*, 1991, Kleuss *et al.*, 1992, Kleuss *et al.*, 1993, Stryer, 1988) (Εικόνα 2-5).



Εικόνα 2-5: Μηχανισμός μετάδοσης σήματος των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Στην φάση ηρεμίας οι τρεις υπομονάδες της G - πρωτεΐνης συνδέονται μεταξύ τους (a). Η σύνδεση του αγωνιστή με τον υποδοχέα προκαλεί την αλληλεπίδραση μεταξύ της G-πρωτεΐνης και του υποδοχέα (b). Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στον διαχωρισμό της α από τις β/γ υπομονάδες της G-πρωτεΐνης. Οι επιμέρους υπομονάδες αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με διάφορα εκτελεστικά συστήματα (c).

Η μελέτη των ενδοκυττάρων μηχανισμών μετάδοσης σήματος των σωματοστατινεργικών υποδοχέων κατέστη δυνατή με τη χρήση ανασυνδυασμένων υποτύπων που εκφράζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Γνωρίζουμε λοιπόν σήμερα ότι οι υποδοχείς σωματοστατίνης, με τη διαμεσολάβηση ανασταλτικών κυρίως G_i - πρωτεϊνών και ειδικότερα των G_{ai1} , G_{ai2} , ή G_{ai3} τροποποιούν πολλαπλά ενδοκυττάρια εκτελεστικά συστήματα (Reisine and Bell, 1995a, Meyerhof, 1998) (Πίνακας 2-4).

Πίνακας 2-4: Τα εκτελεστικά συστήματα που τροποποιούν οι υποδοχείς σωματοστατίνης και η επίδραση των επιμέρους υποτύπων σε αυτά. Τροποποιημένο από (Guillemet-Guibert *et al.*, 2005b).

ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	sst ₁	sst ₂	sst ₃	sst ₄	sst ₅
Αδενυλική κυκλάση	↓	↓	↓	↓	↓
Φωσφολιπάση C	↑	↑	↑	↑	↑/↓
Φωσφολιπάση A2	↓	↓		↑	
Τυροσινικές Φωσφατάσες	↑	↑	↑	↑	↑
SHP-1		↑			
SHP-2	↑	↑			
MAP Κινάση	↑	↑/↓	↑	↑	↓
Συνθετάσες του NO					
Νερωνική συνθετάση του NO		↑			
Ενδοθηλιακή συνθετάση του NO			↓		
Δίαιλοι Ca ²⁺	↓	↓			↓
Δίαιλοι K ⁺	↓	↑	↑	↑	↑
Αντλία Na ⁺ /H ⁺	↓		↓	↓/↑	

Και οι πέντε υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης συνδέονται με την αδενυλική κυκλάση κυρίως μέσω ανασταλτικών Gi-πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης του cAMP. Σε νευρικά και ενδοκρινικά κύτταρα, η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της ρυθμίζουν τη λειτουργία της αντλίας ιόντων καλίου (Kreienkamp *et al.*, 1997). Η σωματοστατίνη μπορεί επίσης να μειώσει την είσοδο ιόντων ασβεστίου με άμεση αναστολή διαύλων ιόντων ασβεστίου υψηλού δυναμικού, μέσω G_{0a2} (Chiba and Yamada, 1994, Roosterman *et al.*, 1998, Tallent *et al.*, 1996). Η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της ενεργοποιούν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών φωσφατασών, όπως είναι οι φωσφατάσες της σερίνης/θρεονίνης, της τυροσίνης και εκείνες που συνδέονται με ιόντα ασβεστίου (Buscail *et al.*, 1994b, Le Romancer *et al.*, 1994, Liebow *et al.*, 1994, White *et al.*, 1991). Σε ότι αφορά τις φωσφατάσες της τυροσίνης υπάρχει μεγάλη σειρά μελετών που παρουσιάζουν αποδείξεις ότι μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταροστατική επίδραση των υποδοχέων της σωματοστατίνης σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων (Douziech *et al.*, 1999, Florio *et*

al., 2001, Florio *et al.*, 1994, Florio *et al.*, 1996, Florio *et al.*, 2003b, Massa *et al.*, 2004). Το μονοπάτι της MAP κινάσης περιλαμβάνεται, επίσης, στα συστήματα δευτέρου αγγελιοφόρου των υποδοχέων σωματοστατίνης, αλλά η επίδραση σε αυτό εξαρτάται από τον υπότυπο του υποδοχέα. Στα κύτταρα CHOK1, οι υποδοχείς sst_1 και sst_4 ενεργοποιούν τις MAP κινάσες ERK1:2 (Bito *et al.*, 1994, Florio *et al.*, 1999). Η ενεργοποίηση της ERK1:2 (extracellular signal regulated kinase 1:2) από τον υποδοχέα sst_4 , οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2 (Bito *et al.*, 1994, Sellers *et al.*, 1999). Αντιστρόφως, ο υποδοχέας sst_5 αναστέλλει τις MAP κινάσες ERK1:2 μέσω μιας σειράς αποφωσφορυλίωσεων που περιλαμβάνει την αναστολή της γουανυλικής κυκλάσης, και της πρωτεϊνικής κινάσης G της εξαρτώμενης από το cGMP (Cordelier *et al.*, 1997). Σε μία κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού (κύτταρα Ltk⁻), ο υποδοχέας sst_1 βρέθηκε ότι αναστέλλει την ανταλλαγή ιόντων νατρίου / υδρογόνου, μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από τις G πρωτεΐνες (Hou *et al.*, 1994).

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να σχηματίζουν διμερή. Η μετατροπή σε διμερή μορφή τροποποιεί τη δεσμευτική συγγένεια με τον αγωνιστή, την πρόκληση σήματος από κάποιο αγωνιστή και την εσωτερίκευση (internalization) του υποδοχέα (Rocheville *et al.*, 2000b). Διαφορετικοί υπότυποι μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με το σχηματισμό ετεροδιμερών δημιουργώντας έτσι ένα νέο επίπεδο κυτταρικής επικοινωνίας. Για παράδειγμα, ο τύπος 2 του υποδοχέα της ντοπαμίνης και ο sst_5 μπορούν να συνδεθούν με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ποικιλία στους μηχανισμούς μετάδοσης σήματος των επιμέρους υποδοχέων (Rocheville *et al.*, 2000a).

2.3 Τα συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης

Οι φυσικές μορφές της σωματοστατίνης έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (1-3 λεπτά) στην κυκλοφορία. Για τον λόγο αυτό προέκυψε η ανάγκη δημιουργίας περισσότερο σταθερών συνθετικών αναλόγων με δράση παρόμοια με αυτήν της σωματοστατίνης.

Η ειδικότητα της ενδογενούς σωματοστατίνης οφείλεται στο γεγονός ότι παράγεται κυρίως τοπικά και αδρανοποιείται ταχύτατα μετά την απελευθέρωση της από τις πεπτιδάσες των ιστών και του αίματος ελαχιστοποιώντας με τον τρόπο αυτό τα ανεπιθύμητα συστηματικά αποτελέσματα. Η χορήγηση όμως συνθετικής σωματοστατίνης προκαλεί μια σειρά συστηματικών αποτελεσμάτων λόγω της ενεργοποίησης πολλών κυττάρων στόχων. Ο λόγος αυτός δημιούργησε την ανάγκη σύνθεσης εκλεκτικών αναλόγων. Η ανακάλυψη των διαφόρων υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης βοήθησε στην αναγνώριση και δημιουργία αναλόγων εκλεκτικών για κάθε υπότυπο.

Από την πληθώρα των συνθετικών αναλόγων της σωματοστατίνης που υπάρχουν σήμερα, δύο χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη: η οκτρεοτίδη και η λανρεοτίδη. Ένα τρίτο ανάλογο, η βαπρεοτίδη (RC-160) έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, σε κλινικές μελέτες. Και τα τρία αυτά ανάλογα είναι κυκλικά οκταπεπτίδια τα οποία στερούνται θέσεων ενζυμικής διάσπασης – κάθαρσης και για το λόγο αυτό είναι περισσότερο σταθερά από την φυσική σωματοστατίνη (πχ. ο χρόνος ημίσειας ζωής της οκτρεοτίδης είναι περίπου 90 λεπτά). Τα ανάλογα αυτά παρουσιάζουν όμοια συγγένεια για τους υποδοχείς σωματοστατίνης και συγκεκριμένα υψηλή συγγένεια για τον sst₂, λιγότερη για τον sst₅ και ακόμα λιγότερη για τον sst₃. Κανένα από τα συνθετικά ανάλογα της σωματοστατίνης που είναι διαθέσιμα για κλινική χρήση δεν δεσμεύεται στους sst₁ και sst₄ υποδοχείς (IC₅₀ ≥ 1 μM) (Meyerhof, 1998).

Τα τελευταία χρόνια έγινε εφικτή, με τη χρήση μεθόδων συνδυαστικής χημείας, η σύνθεση μη-πεπτιδικών αγωνιστών της σωματοστατίνης με υψηλή συγγένεια για καθένα από τους επιμέρους υποτύπους των υποδοχέων της (sst₁₋₅) (Rohrer *et al.*, 1998). Η ύπαρξη των αναλόγων αυτών διευκολύνει τη μελέτη των φυσιολογικών δράσεων των υποτύπων των ssts.

Η συγγένεια ορισμένων από τα ανάλογα της σωματοστατίνης για τους διάφορους υπότυπους των υποδοχέων της παρουσιάζεται στον Πίνακα 2-5.

Πίνακας 2-5: Συγγένεια της σωματοστατίνης και των αναλόγων της με τους υποδοχείς sst₁-sst₅

Ουσία	sst ₁	sst ₂	sst ₃	sst ₄	sst ₅
Φυσικοί αγωνιστές					
SRIF-14	0.1-2.3	0.04-1.3	0.3-1.6	0.3-2.0	0.2-2.32
SRIF-28	0.1-2.4	0.2-4.1	0.3-6.1	0.3-7.9	0.05-0.4
Συνθετικά πεπτίδια					
Οκτρεοτίδη (SMS 201-995)	290-1140	0.28-2.1	4.4-38	>1000	0.77-32
Λανρεοτίδη (BIM 23014)	500-2330	0.5-1.8	43-107	66-2100	0.6-14
Βαπρεοτίδη (RC-160)	481->1000	5.4	31	45-351	0.7-7.5
BIM 23244	>1000	0.3	133	>1000	0.7
Σεγκλιτίδη (MK-678)	>10000	0.05-1.5	27-230	127-4949	0.06-232
BIM 23052	6.3-100	10-13.5	2.1-5.6	16-141	1.2-18
BIM 23056	110->1000	132->1000	10.8-177	17-234	5.7-158
L-362,855	830->1000	1.0-2.0	5.1-6.2	63->1000	0.002-63
BIM 23268	18.4	15.1	61.6	16.3	0.37
CYN 154806	1200	3.6	150	650	2.0
CH 275	1.8-4.9	740->1000	12->1000	4.3-874	980->1000
Μη πεπτιδικοί αγωνιστές					
NNC 26-9100	5000	3300	6800	100	4100
L-054,264	1740	1.6	2950	2000	4470
L-054,522	2392	0.01	31	81	163
L-363,301	>1000	5.1	129	>1000	25
L-797,591	1.4-3.5	1875	2240	170	3600
L-779,976	2760	0.05	729	310	4260
L-796,778	1255	>10000	24	8650	1200
L-803,087	199	4720	1280	0.7	3880
L-817,818	3.3	52	64	82	0.4

Η συγγένεια δέσμευσης κάθε ουσίας εκφράζεται ως IC₅₀ ή K_i (nM). Σημειώνονται οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Η μεγάλη διακύμανση των τιμών αντικατοπτρίζει, κυρίως, διαφορές που οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές δοκιμασίες [τροποποιημένο από (Olias *et al.*, 2004)]

2.4 ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΦΘΑΛΜΟΣ

2.4.1 Έκφραση της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στον οφθαλμό

Η σωματοστατίνη και οι υποδοχείς της εκφράζονται σχεδόν σε κάθε δομή του οφθαλμού και συγκεκριμένα τον κερατοειδή, το υδατοειδές υγρό, τον κρυσταλλοειδή φακό, το υαλώδες σώμα το ραγοειδή, το νευροαμφιβληστροειδή, το μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς (ΜΕΑ) καθώς και σε περιοφθαλμικούς ιστούς (Bagnoli *et al.*, 2003, Baldysiak-Figiel *et al.*, 2005, Cristiani *et al.*, 2000, Cristiani *et al.*, 2002, Elbadri *et al.*, 1991, Firth *et al.*, 2002, Hernandez *et al.*, 2005, Klisovic *et al.*, 2001, Lambooiij *et al.*, 2000, Mori *et al.*, 1997, Pasquali *et al.*, 2002, Pasquali *et al.*, 2001, Simo *et al.*, 2002, Taylor and Yee, 2003, Tervo *et al.*, 1982, Thermos, 2003, van Hagen *et al.*, 2000, Vasilaki *et al.*, 2001, Yamada *et al.*, 1980) (Πίνακας 2-6).

Περισσότερα δεδομένα έχουμε για την έκφραση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή. Ανοσοδραστική και βιολογικά ενεργή σωματοστατίνη εντοπίστηκε στον αμφιβληστροειδή αρουραίου για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του '70 και στη συνέχεια αναγνωρίστηκε στον αμφιβληστροειδή και άλλων ειδών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου [λεπτομερής ανασκόπηση σε (Thermos, 2003)].

Ανοσοδραστικότητα στη σωματοστατίνη παρατηρήθηκε ακόμα και ένα χρόνο μετά την εκτομή του οπτικού νεύρου σε αμφιβληστροειδείς βατράχου και ποντικού, ενώ mRNA για την σωματοστατίνη-14 έχει ανιχνευτεί σε αμφιβληστροειδή ανθρώπου (van Hagen *et al.*, 2000). Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σωματοστατίνη παράγεται στον αμφιβληστροειδή.

Η σωματοστατίνη φαίνεται να παράγεται στο εσωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδή και κυρίως στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε κυρίως σε κύτταρα της εσωτερικής δικτυωτής στιβάδας όπως επίσης και σε έκτοπα βραχύϊνα κύτταρα της στιβάδας των γαγγλιακών κυττάρων (Lin *et al.*, 1983), ενώ παρατηρήθηκε απώλεια της ανοσοδραστικότητας της μετά από εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων (Lake and Patel, 1980).

Σωματοστατίνη	sst ₁	sst ₂	sst _{2A}	sst _{2B}	sst ₃	sst ₄	sst ₅	
Κερατοειδής								
Στρώμα	1	1						
Ενδοθήλιο	1	1						
Υδατοειδές υγρό	2							
Στρώμα της ίριδας	4	1	1,3			1,3		
Ακτινωτό σώμα								
Στρώμα	4	1	1,3			1,3		
Επιθήλιο		1	1			1		
Κρυσταλλοειδής φακός		5	5		5	5	5	
Γαλώδες σώμα	6,7							
Νευροαμφιβληστροειδής	8-12	1,13,14,16,18	1,13,14	13-15, 17,19	13,15,19	1,14	1,13,20	1,13,21,22
Μελάγχρουν επιθήλιο		1	1					
Χοριοειδής		1	1					
Ινοβλάστες του κόγχου*		23,24	23,24		23,24	23,24	23,24	

* Μόνο σε ασθενείς με νόσο Graves.

Πίνακας 2-6: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων μελετών εντοπισμού της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στον οφθαλμό. (1) Klisovic et al. (2001), (2) Taylor and Yee (2003), (3) Mori et al (1997), (4) Firth et al. (2002), (5) Baldysiak - Figiel et al. (2005), (6) Hernandez et al. (2005), (7) Simo et al. (2002), (8) Tervo et al. (1982), (9) Elbadri et al. (1991), (10) Yamada et al. (1980), (11) Bagnoli et al. (2003), (12) Cristiani et al. (2002), (13) Thermos (2003), (14) van Hagen et al. (2000), (15) Vasilaki et al. (2001), (16) Cristiani et al. (2000), (17) Lambooi et al. (2000), (18) Mastorodimou et al. (2004), (19) Vasilaki et al. (2001), (20) Vasilaki et al. (2002), (21) Kiagiadaki et al (2009), (22) Ke & Zhong (2007), (23) Pasquali et al. (2002), (24) Pasquali et al. (200)

Η προ-προσωματοστατίνη εντοπίστηκε σε όλους τους οργανισμούς που μελετήθηκαν, ενώ παρατηρήθηκε διαφορική έκφραση της σωματοστατίνης-14 και σωματοστατίνης-28 στον αμφιβληστροειδή κάποιων ειδών. Έτσι, στον αρουραίο διαπιστώθηκε η ύπαρξη τόσο σωματοστατίνης-14 όσο και σωματοστατίνης-28 με την τελευταία να αντιπροσωπεύει μόλις το 4% της συνολικής ποσότητας (Rorstad *et al.*, 1979) ενώ στον αμφιβληστροειδή του κουνελιού, η σωματοστατίνη-14 είναι τέσσερις φορές περισσότερη από τη σωματοστατίνη-28 (Sagar *et al.*, 1982).

Στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών έχουν εντοπιστεί και οι 5 υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατίνης, με τη βοήθεια φαρμακολογικών, ανοσοϊστοχημικών μελετών και της τεχνικής της ανάστροφης μεταγραφάσης - αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR: reverse transcriptase- polymerase chain reaction) (λεπτομερής ανασκόπηση σε (Thermos, 2003). Στην έναρξη της παρούσας διατριβής (2000), δεν είχε ακόμη μελετηθεί η ύπαρξη θέσεων δέσμευσης της σωματοστατίνης στο MEA. Στην διάρκεια των ετών που ακολούθησαν, εντοπίστηκαν με ανοσοϊστοχημικές μελέτες οι υπότυποι sst_1 και sst_2 στο MEA αρουραίου (Vasilaki *et al.*, 2002) και ανθρώπου (Klisovic *et al.*, 2001).

Οι υποδοχείς σωματοστατίνης συνυπάρχουν στον αμφιβληστροειδή με την ντοπαμίνη (sst_1 , sst_2), με την ίδια τη σωματοστατίνη, ως αυτοϋποδοχείς (sst_1 , sst_2) και με την NADPH-διαφοράση (sst_1 , sst_{2A} , sst_{2B}) (Cristiani *et al.*, 2000, Fontanesi *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 1998, Johnson *et al.*, 1999, Vasilaki *et al.*, 2001, Helboe and Moller, 1999).

2.4.2 Οι δράσεις της σωματοστατίνης στον οφθαλμό

Γενικά στοιχεία για τις φυσιολογικές δράσεις της σωματοστατίνης σε διάφορα όργανα, αναφέρθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο. Εδώ θα εστιάσουμε στις δράσεις εκείνες της σωματοστατίνης τις σχετικές με πιθανές εφαρμογές της στην Οφθαλμολογία.

Αντιφλεγμονώδης δράση

Η σωματοστατίνη έχει γενικά ανοσοκατασταλτική δράση. Υποδοχείς της εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και το λεμφοειδή ιστό. Η σωματοστατίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιδρά στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών και κυτοκινών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Συγκεκριμένα, προκαλεί μετανάστευση και επιδρά στη διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων (Lichtenauer-Kaligis *et al.*, 2000, Oomen *et al.*, 2000). Οι

κυτοκίνες TNF- α , IL-1 β και IL-4 επάγουν και η INF- γ αναστέλλει την απελευθέρωση σωματοστατίνης. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η σωματοστατίνη, μέσω των sst₂ υποδοχέων της μειώνει την παραγωγή INF- γ από τα T λεμφοκύτταρα (Weinstock and Elliott, 2000, Zavros *et al.*, 2004).

Η σωματοστατίνη ανιχνεύεται στο υδατοειδές υγρό και το υαλώδες σώμα (Hernandez *et al.*, 2005, Simo *et al.*, 2002, Taylor and Yee, 2003) και αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη ότι συμμετέχει στην ανοσία του οφθαλμού (Taylor, 2003). Σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα όπως είναι η θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια (νόσος Graves) και σε κοκκιοματώδεις φλεγμονές όπως η σαρκοειδωση, αυξάνουν οι υποδοχείς της σωματοστατίνης και ιδιαίτερα οι sst₂ και sst₃ (Pasquali *et al.*, 2002, Pasquali *et al.*, 2001). Επιπρόσθετα, μελέτες σε ποντίκια και ανθρώπους έδειξαν ότι τα T-λεμφοκύτταρα παράγουν σωματοστατίνη-14 και το συγγενές με αυτήν πεπτίδιο κορτιστατίνη (Dalm *et al.*, 2003, Ferone *et al.*, 2004, ten Bokum *et al.*, 1999, Weinstock and Elliott, 1998). Τέλος, υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις και για την αντιφλεγμονώδη δράση της σωματοστατίνης σε νευροφλεγμονώδη νοσήματα (Helyes *et al.*, 2001, Nemeth *et al.*, 1999).

Αντι-αγγειογενετική δράση

Η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της προκαλούν αναστολή της αγγειογένεσης *in vitro* και *in vivo* (Woltering *et al.*, 1997). Η σωματοστατίνη ασκεί την αντιαγγειογενετική δράση της αναστέλλοντας έμμεσα και άμεσα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων.

Υποδοχείς της σωματοστατίνης εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και σε χοριοειδικές νεοαγγειακές μεμβράνες (Adams *et al.*, 2005, Lambouij *et al.*, 2000). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες και μελέτες *in vivo* σπινθηρογραφίας έδειξαν την παρουσία υποδοχέων sst₂ στο ενδοθήλιο αναπτυσσόμενων αγγείων, ενώ τα μη αναπτυσσόμενα αγγεία στερούνται sst₂ (Watson *et al.*, 2001).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στην αντι-αγγειογενετική δράση της σωματοστατίνης εξετάζουν τον υποδοχέα sst₂. Εντούτοις και άλλοι υποδοχείς μπορεί να εμπλέκονται, και ιδιαίτερα οι sst₃ (Celiker and Ilhan, 2002, Florio *et al.*, 2003a) και sst₅ (Adams *et al.*, 2004, Adams *et al.*, 2005).

Τα ανάλογα της σωματοστατίνης ασκούν και έμμεση αντιαγγειογενετική δράση, αναστέλλοντας τη σύνθεση και τη δράση πληθώρας αγγειογενετικών παραγόντων, όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor – PDGF), ο αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης (insulin growth factor - IGF-I), ο αυξητικός

παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (vascular endothelial growth factor - VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor – FGF-2). Οι παράγοντες αυτοί εκκρίνονται από νεοπλασματικά καθώς και πολλαπλασιαζόμενα φλεγμονώδη κύτταρα και ο ρόλος τους στην αγγειογένεση έχει τεκμηριωθεί πλήρως (Ferrara, 1999).

Τα ανάλογα της σωματοστατίνης μειώνουν την τραυματική νεοαγγείωση του κερατοειδούς (Demir *et al.*, 1999) και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου (EGF) (Adams *et al.*, 2005) και των ινοβλαστών (FGF) (Wu *et al.*, 2003). Σε κυτταροκαλλιέργειες MEA, η σωματοστατίνη και το sst_{2/5} εκλεκτικό ανάλογο της οκτρεοτίδη, αναστέλλουν την παραγωγή VEGF που επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης-1 (IGF-1) (Casini *et al.*, 2005, Dasgupta, 2004, Grant and Caballero, 2002, Wegewitz *et al.*, 2005, Sall *et al.*, 2004).

Τα μονοκύτταρα αποτελούν, επίσης, σημαντικούς μεσολαβητές της αγγειογένεσης *in vivo*. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιαζόμενα παράγουν κυτοκίνες που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προάγουν έτσι την αγγειογένεση. Σε πειραματικό μοντέλο σαρκώματος Karosi, η σωματοστατίνη βρέθηκε να αναστέλλει τη μετανάστευση τόσο των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και των μονοκυττάρων (Albini *et al.*, 1999).

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Εκτός από αναστολή της αγγειογένεσης, η σωματοστατίνη επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προκαλώντας κυρίως την αναστολή του, με διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή/και απόπτωση.

Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου γίνεται με πολλούς μηχανισμούς όπως είναι η ενεργοποίηση των τυροσινικών φωσφατασών και των MAP κινασών και η αναστολή της αντλίας Na⁺/H⁺ και της νευρωνικής συνθετάσης του NO (nNOS).

Η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της ενεργοποιούν ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών φωσφατασών (Le Romancer *et al.*, 1994, Lopez *et al.*, 1997, Renstrom *et al.*, 1996). Η ενεργοποίηση των SHP1 και SHP2 φωσφατασών από τη σωματοστατίνη, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλείται είτε από τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω των υποδοχέων sst₂ (Ferjoux *et al.*, 2000, Lopez *et al.*, 1997, Zapata *et al.*, 2002) ή με αναστολή της μιτωτικής δράσης αυξητικών παραγόντων (Florio *et al.*, 1999, Liebow *et al.*, 1989, Lopez *et al.*, 1997).

Από τις MAP κινάσες, το μονοπάτι της κινάσης που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα (extracellular signal-regulated kinase – ERK) αποτελεί τον πιο σημαντικό μεσολαβητή της σωματοστατίνης στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2, οδηγεί γενικά σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εντούτοις το αποτέλεσμα εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και τον υπότυπο των υποδοχέων της σωματοστατίνης. Έτσι, μέσω των sst₄ υποδοχέων, η σωματοστατίνη αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2 (Smalley *et al.*, 1999). Το αντίθετο αποτέλεσμα προκαλείται μέσω των sst₁, sst₂, sst₃ και sst₅ υποδοχέων (Cattaneo *et al.*, 2000, Cordelier *et al.*, 1997, Florio *et al.*, 2003a).

Η ενεργοποίηση της αντλίας ανταλλαγής ιόντων Na⁺/H⁺ (NHE1), προκαλεί την είσοδο Na⁺ στο κύτταρο, συμμετέχοντας έτσι στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου pH και του όγκου του κυττάρου, και σχετίζεται με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Guillemet-Guibert *et al.*, 2005a). Από τους υποδοχείς της σωματοστατίνης, μόνο οι sst₁, sst₃ και sst₄ βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με την NHE1 ενεργοποιώντας (sst₄) ή αναστέλλοντας την (sst₁, sst₃) (Smalley *et al.*, 1999).

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (λεπτομερής αναφορά στο Κεφάλαιο 3). Από τις συνθετάσες του NO, η νευρωνική ισομορφή (nNOS), αποτελεί υπόστρωμα για την SHP1 και εμπλέκεται στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της σωματοστατίνης μέσω των sst₂ (Ferjoux *et al.*, 2003, Lopez *et al.*, 2001).

Η σωματοστατίνη και τα sst_{2/5} ανάλογα της αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων κυττάρων (Ferjoux *et al.*, 2000, Schally *et al.*, 2004, Weckbecker *et al.*, 1993) συμπεριλαμβανομένων και των ενδοθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Grant *et al.*, 1993). Στο MEA, η οκτρεοσίδη (sst_{2/5} ανάλογο), αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είτε άμεσα (Luo *et al.*, 1996), ή με εξουδετέρωση της δράσης των αυξητικών παραγόντων PDGF, bFGF και EGF (Amann *et al.*, 2000). Υπάρχουν ενδείξεις και για δόσοεξαρτώμενη δράση της σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MEA. Φαίνεται ότι σε χαμηλές δόσεις επάγει και σε υψηλές δόσεις αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του MEA *in vitro* (Lahlou *et al.*, 2004, Sharma and Srikant, 1998, Teijeiro *et al.*, 2002).

Η απόπτωση στα κύτταρα των θηλαστικών ακολουθεί δύο κύρια μονοπάτια. Το εξωγενές μονοπάτι οδηγεί στην απόπτωση με δέσμευση υποδοχέων της οικογένειας του

παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α (tumor necrosis factor – α , TNF α). Το ενδογενές μονοπάτι (που ονομάζεται επίσης μιτοχondριακό μονοπάτι), που ενεργοποιείται από βλάβη του DNA, απώλεια παραγόντων σημαντικών για την επιβίωση του κυττάρου, ή οποιασδήποτε μορφής κυτταρικού stress, οδηγεί στην απόπτωση με ενεργοποίηση της υπεροικογένειας του προ-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2. Και τα δύο μονοπάτια περιλαμβάνουν ενεργοποίηση ειδικών ενζύμων που ονομάζονται κασπάσες τα οποία ευθύνονται για την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από την απόπτωση (Guillermet-Guibert *et al.*, 2005a).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η σωματοστατίνη επάγει την απόπτωση σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα μέσω και των δύο μονοπατιών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Lattuada *et al.*, 2002, Sharma and Srikant, 1998, Teijeiro *et al.*, 2002). Η δράση της αυτή επιτελείται μέσω των υποδοχέων sst₂ (Ferrante *et al.*, 2006, Gruszka *et al.*, 2001, Guillermet *et al.*, 2003, Luciani *et al.*, 2005, Teijeiro *et al.*, 2002) και sst₃ (Sharma *et al.*, 1996). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι και η φωσφατάση SHP-1 εμπλέκεται στο συνεργιστικό μηχανισμό που οδηγεί σε απόπτωση μέσω TNF- α και sst₂ υποδοχέων (Guillermet *et al.*, 2003).

Νευροπροστασία

Η νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης στον οφθαλμό και ιδιαίτερα τον αμφιβληστροειδή, έχει μελετηθεί σε διάφορα, *in vivo* and *in vitro*, μοντέλα ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς.

Αρχικές μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η σωματοστατίνη μέσω κυρίως των sst₂ υποδοχέων της, μειώνει τη νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς την επαγόμενη από ισχαιμία (Dal Monte *et al.*, 2007, Higgins *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 1997). Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη διερεύνηση του ρόλου της σωματοστατίνης στην ισχαιμία του αμφιβληστροειδή που προκαλείται από χημικά και διεγερτοτοξικά ερεθίσματα. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η σωματοστατίνη ασκεί νευροπροστατευτική δράση μέσω των sst₂ υποδοχέων της σε διάφορα μοντέλα χημικής ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς (Catalani *et al.*, 2007, Celiker *et al.*, 2002, Dal Monte *et al.*, 2003, Mastrodimou *et al.*, 2005).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η σωματοστατίνη ασκεί τη νευροπροστατευτική της δράση, είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Σε καλλιέργειες κυττάρων φλοιού, το cGMP φάνηκε ότι είναι σημαντικός μεσολαβητής για την προστατευτική δράση της σωματοστατίνης κατά του νευρωνικού θανάτου που προκαλείται από το N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Forloni *et al.*, 1997). Η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα του NO και

του cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου, μέσω των sst₂ υποδοχέων (Mastrodimou *et al.*, 2006, Vasilaki *et al.*, 2002). Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι με την επίδραση της σωματοστατίνης, το NO επάγει τη σύνθεση cGMP από το κύτταρο και προσφέρει νευροπροστασία.

Μελέτες σε μοντέλα χημικής ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς, έδειξαν ότι η νευροπροστατευτική δράση των sst₂ σωματοστατινεργικών αναλόγων μειώνεται σε καταστολή της NOS ή του cGMP (Mastrodimou *et al.*, 2008). Αντίθετα, το ανάλογο του cGMP, 8-Br-cGMP ασκεί νευροπροστατευτική δράση στον αμφιβληστροειδή. Τα sst₂ ανάλογα της σωματοστατίνης Lanreotide και L-779,976 προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή από την τοξική δράση του αμινοξέος (RS)-α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA), ενώ τα sst₁ and sst₄ ανάλογα δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα (Kiagiadaki and Thermos, 2008). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης ασκείται κυρίως μέσω των sst₂ υποδοχέων της.

Πρόσφατα, εντοπίστηκε ο sst₅ υπότυπος στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Ke and Zhong, 2007). Οι Κιαγιαδάκη και συνεργάτες (Kiagiadaki *et al.*) ανακοίνωσαν ότι τα sst₅ σωματοστατινεργικά ανάλογα, χορηγούμενα ενδοϋαλοειδικά, ασκούν προστατευτική δράση στον αμφιβληστροειδή έναντι της διεγερτοτοξικότητας που προκαλείται από το AMPA.

2.4.3 Θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές της σωματοστατίνης στην Οφθαλμολογία

Θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια

Η νόσος του Graves αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα που προκαλείται από υπερέκκριση θυρεοειδικών ορμονών από το σύνολο του θυρεοειδή αδένα. Η νόσος προσβάλλει κυρίως γυναίκες που βρίσκονται στην 4^η με 5^η δεκαετία της ζωής τους. Η προσβολή του οφθαλμού συνίσταται σε υπερτροφία και διήθηση των περιοφθαλμικών ιστών από φλεγμονώδη κύτταρα με επακόλουθα ανάσπαση ή/και οίδημα των βλεφάρων, πρόπτωση του βολβού, περιοριστική μυοπάθεια από διήθηση των εξοφθάλμιων μυών, και σε βαριά προσβολή συμπίεση του οπτικού νεύρου από τους περιοφθαλμικούς ιστούς με συνέπεια τη μερική ή ολική απώλεια της όρασης (Kanski, 1993).

Τα ανάλογα της σωματοστατίνης έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας με ποικίλα αποτελέσματα (Chang *et al.*, 1992, Dickinson *et al.*, 2004,

Durak *et al.*, 1995, Krassas *et al.*, 1999, Krassas *et al.*, 1995, Krassas *et al.*, 1997, Krassas *et al.*, 2001, Kung *et al.*, 1996, Ozata *et al.*, 1996, Pichler *et al.*, 2001, Pilarska and Kulig, 2004, Su *et al.*, 2005, Wemeau *et al.*, 2005). Ο ακριβής μηχανισμός της δράσης της σωματοστατίνης στην πάθηση αυτή είναι άγνωστος. Πιθανόν να ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση έμμεσα μειώνοντας την παραγωγή κυτοκινών και του IGF-1 ή άμεσα, δρώντας στους ινοβλάστες του κόγχου ή τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που φέρουν ssts (Pasquali *et al.*, 2002, Pasquali *et al.*, 2001).

Η σωματοστατίνη έχει και διαγνωστική εφαρμογή στη νόσο του Graves. Το σπινθηρογράφημα με το ραδιενεργό ανάλογο ¹¹¹In-pentetreotide (octreoscan) χρησιμοποιείται για τη διάγνωση όσο και για τη μέτρηση της δραστηριότητας της νόσου καθώς και για τον εντοπισμό των ασθενών εκείνων με μεγαλύτερες πιθανότητες για καλύτερη ανταπόκριση στην θεραπεία (Krassas *et al.*, 1999, Postema *et al.*, 1994). Το 75% των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε σωματοστατίνη ή τα ανάλογα της οκτρεοτίδη και λανρεοτίδη, η νόσος βελτιώθηκε (Bartalena *et al.*, 2002, Bartalena *et al.*, 2000, Krassas).

Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Πρόκειται για μικροαγγειοπάθεια του αμφιβληστροειδούς που αποτελεί όψιμη επιπλοκή του σακχαρώδη διαβήτη. Στο δυτικό κόσμο η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) αποτελεί την πιο συχνή αιτία τύφλωσης σε άτομα της παραγωγικής ηλικίας. Διακρίνουμε δύο μορφές της νόσου: τη μη παραγωγική και την παραγωγική

Η μη παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια χαρακτηρίζεται από μικροαιμορραγίες και εξιδρώματα. Η όραση δεν επηρεάζεται έκτος αν προσβληθεί η ωχρά κηλίδα. Το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας χαρακτηρίζεται από άθροιση ορρού και λιπιδίων με τη μορφή σκληρών εξιδρωμάτων στην ωχρά. Αποτελεί την κύρια αιτία μείωσης της όρασης σε άτομα με διαβήτη τύπου 2. Η παραγωγική μορφή της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας προκαλείται σε παρατεταμένη ισχαιμία του αμφιβληστροειδή, οπότε αναπτύσσονται παθολογικά αγγεία στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδή ή του οπτικού νεύρου. Τα αγγεία αυτά μπορεί να αιμορραγήσουν με επακόλουθο την ενδοαλοειδική αιμορραγία, ίνωση και ελκτική αποκόλληση του αμφιβληστροειδή.

Η φωτοπηξία του αμφιβληστροειδή με LASER αποτελεί την κλασσική θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Τα τελευταία χρόνια αναζητούνται λιγότερο καταστροφικές, φαρμακολογικές θεραπείες οι οποίες στοχεύουν στους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, όπως η χρόνια παραγωγή αυξητικής ορμόνης (GH), IGF-1 και

VEGF καθώς και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) που επάγεται από την υπεργλυκαιμία (Porta and Allione, 2004, Das Encimen and King, 2007).

Η παρατήρηση της μειωμένης επίπτωσης της ΔΑ σε νάνους, στους οποίους έλειπε η αυξητική ορμόνη (GH) (Merimee, 1978), έδωσε το έναυσμα για τις πρώτες κλινικές μελέτες του ρόλου της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στη θεραπεία της παραγωγικής ΔΑ. Η σωματοστατίνη και το sst₂ ανάλογο λανρεοτίδη επέδειξαν αντιαγγειογενετική δράση σε ασθενείς με παραγωγική ΔΑ, ενώ η μακροχρόνια θεραπεία με οκτρεοτίδη φάνηκε να σταθεροποιεί την βαριά παραγωγική ΔΑ σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με LASER (Mallet *et al.*, 1992, McCombe *et al.*, 1991). Οι Grant και συνεργάτες (Grant *et al.*, 2000) έδειξαν ότι η θεραπεία με οκτρεοτίδη ασθενών με βαρεία μη παραγωγική και αρχόμενη παραγωγική ΔΑ επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου και επιτρέπει παράταση του χρόνου έναρξης της LASER φωτοπηξίας. Οι Boehm και συνεργάτες (Boehm *et al.*, 2001) ανακοίνωσαν ότι η οκτρεοτίδη σε συνδυασμό με παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία με LASER, μειώνει την πιθανότητα ενδοϋαλοειδικής αιμορραγίας και μείωσης της οπτικής οξύτητας σε ασθενείς με παραγωγική ΔΑ υψηλού κινδύνου. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στην παραγωγική ΔΑ, σε ασθενείς με μη παραγωγική ΔΑ, η χορήγηση σωματοστατίνης και των sst₂ παραγώγων της, δεν είχε σημαντικά αποτελέσματα (Kirkegaard *et al.*, 1990, Shumak *et al.*, 1990).

Τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης (IGF) βρέθηκαν αυξημένα στο υαλώδες ασθενών με παραγωγική ΔΑ και δεν επηρεάζονται από την φωτοπηξία με LASER (Hernandez *et al.*, 2005, Spranger *et al.*, 2000). Με βάση αυτή την παρατήρηση, υποτέθηκε ότι ο συνδυασμός της LASER φωτοπηξίας με φάρμακα που μειώνουν τα επίπεδα των GH-IGF πιθανόν να ήταν ωφέλιμος για αυτούς τους ασθενείς (Spranger *et al.*, 2001). Εντούτοις, η συστηματική χρήση του αγωνιστή της GH, pegvisomat, δεν ανέστειλε την αμφιβληστροειδική νεοαγγείωση σε οφθαλμούς με παραγωγική ΔΑ (GHAPDRSG, 2001). Επιπλέον, ο ρόλος της IGF-1 του ορού στην παθογένεια της ΔΑ παραμένει αμφιλεγόμενος (Janssen *et al.*, 1997, Janssen and Lamberts, 2000, Wilkinson-Berka *et al.*, 2006). Από τα παραπάνω διαμορφώθηκε η υπόθεση ότι η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της πιθανόν, εκτός της μείωσης της IGF-1 του ορού, να ασκούν και άμεση αντιαγγειογενετική και νευροπροστατευτική δράση στον αμφιβληστροειδή (Davis *et al.*, 2001). Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή, οι Wilson και συνεργάτες (Wilson *et al.*, 2001) ανακοίνωσαν ότι ενεργοποίηση του sst₃ υποδοχέα έχει άμεσο αποτέλεσμα στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε αμφιβληστροειδή ανθρώπου. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η σωματοστατίνη αναστέλλει την επαγόμενη από τον IGF-1 αύξηση του VEGF σε κύτταρα MEA ανθρώπου

(Sall *et al.*, 2004) ενώ στο υαλώδες διαβητικών ασθενών τα επίπεδα της σωματοστατίνης είναι μειωμένα σε σχέση με την κυκλοφορία (Simo *et al.*, 2007, Simo *et al.*, 2002). Τέλος, ανακοινώθηκε ότι ένα από τα αρχικά γεγονότα στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι η μείωση της έκφραση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή και ΜΕΑ, πιθανόν λόγω συνοδού εκφύλισης των νευρικών ινών (Carrasco *et al.*, 2007). Μέletes *in vivo* σε μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας σε ποντίκια, έδειξαν ότι στα αρχικά στάδια της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, όχι μόνο ενεργοποιούνται οι sst₂ υποδοχείς, αλλά απελευθερώνεται και ενδογενής σωματοστατίνη (Vasilaki A *et al.*, 2008).

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα συνηγορούν για τη νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Οι κλινικές μελέτες ως τώρα χρησιμοποίησαν την οπτική οξύτητα σαν την κύρια παράμετρο έκβασης, η οποία όμως επηρεάζεται από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες όπως είναι η ισχαιμία ή το οίδημα της ωχράς, η ενδοουλοειδική αιμορραγία και άλλες οφθαλμικές επιπλοκές του διαβήτη. Νέες κλινικές μελέτες με τη χρήση νευροφυσιολογικών μεθόδων όπως είναι η μικροπεριμετρία και ηλεκτροφυσιολογία (πολυεστιακό ERG), θα μπορούσαν πιθανόν να επιβεβαιώσουν τη νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.

Εξιδρωματικού τύπου ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς

Τα κλινικά χαρακτηριστικά και η παθογένεια της ΗΕΩ αναφέρθηκαν με λεπτομέρεια στο Κεφάλαιο 1. Εδώ πρόκειται να αναφέρουμε τα εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα που αφορούν στη χρήση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της για τη θεραπεία αυτής της πάθησης.

Αρχικές μελέτες σε καλλιέργειες ΜΕΑ βοός και ανθρώπου, έδειξαν ότι η οκτρεοτίδη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που επάγεται από τους αυξητικούς παράγοντες VEGF, bFGF και PDGF (Baldysiak-Figiel *et al.*, 2004, Kaven *et al.*, 2000, Spraul *et al.*, 1999). Οι Lambooij και συνεργάτες (Lambooij *et al.*, 2000) μελέτησαν νεοσχηματισμένες νεοαγγειακές μεμβράνες από ανθρώπους οφθαλμούς με ΗΕΩ για να διαπιστώσουν αυξημένη έκφραση του sst_{2A} υποδοχέα σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη οι Palii και συνεργάτες (Palii *et al.*, 2008) μελέτησαν τη δράση των νεώτερων μη πεπτιδικών imidazolidin-2,4-dione (NISA) αναλόγων της σωματοστατίνης σε δύο μοντέλα οφθαλμικής νεοαγγείωσης: την αμφιβληστροειδοπάθεια που προκαλείται από ισχαιμία και τη χοριοειδική νεοαγγείωση που επάγεται από LASER. Κατέληξαν ότι και η οκτρεοτίδη και τα NISA ανάλογα που

μελετήθηκαν εμφάνισαν παρόμοια αντιαγγειογενετική δράση μετά από συστηματική χορήγηση. Τέλος, σε πειραματικό μοντέλο χοριοειδικής νεοαγγείωσης επαγόμενης από LASER σε ποντίκια μελετήθηκε η τοξικότητα και αποτελεσματικότητα του συμπλόκου SRIF-καμποθεσίνης (JF-10-81). Βρέθηκε ότι το (JF-10-81), χορηγούμενο ενδοουλοειδικά μία έως 3 εβδομάδες μετά την εφαρμογή της LASER φωτοπηξίας, ήταν ασφαλές και αποτελεσματικό για τη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης (Bezerra *et al.*, 2005).

Ως την έναρξη της παρούσας διατριβής δεν υπήρχαν δημοσιευμένες κλινικές μελέτες για τη χρήση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της σε ασθενείς με εξιδρωματική ΗΕΩ παρά μόνο σποραδικές αναφορές (van Hagen *et al.*, 2000).

Χρόνιο κυστεοειδές οίδημα της ωχράς

Το κυστεοειδές οίδημα της ωχράς (cystoid macular edema, CME) είναι άθροιση υγρού μέσα στο νευροαμφιβληστροειδή και αποτελεί επιπλοκή κοινή ενδοφθάλμιων επεμβάσεων ή πληθώρας οφθαλμολογικών παθήσεων όπως οι ενδοφθάλμιες φλεγμονές (ραγοειδίτιδες), τα τραύματα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η εξιδρωματική ΗΕΩ, η απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδή και η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Bringmann *et al.*, 2004).

Η παθογένεια του CME παραμένει αδιευκρίνιστη. Στον έσω αμφιβληστροειδή, η μεταφορά ύδατος γίνεται μέσω των κυττάρων Müller (Moseley *et al.*, 1984, Nagelhus *et al.*, 1999), ενώ η απομάκρυνση του νερού από τον αμφιβληστροειδή προς το χοριοειδή γίνεται με την ανταλλαγή ιόντων από τα κύτταρα MEA (δες και Κεφάλαιο 1, η φυσιολογία του MEA). Ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας για το σχηματισμό κύστεων θεωρείται ότι είναι η δυσλειτουργία του MEA που οδηγεί σε συγκέντρωση εξωκυττάριου υγρού. Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι και το οίδημα των κυττάρων του Müller μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου [λεπτομερής ανασκόπηση σε (Bringmann *et al.*, 2004)].

Το 1998 αναφέρθηκε για πρώτη φορά ένα περιστατικό ιδιοπαθούς CME όπου η θεραπεία με οκτρεοτίδη είχε ευνοϊκή δράση (Kuijpers *et al.*, 1998). Ορισμένες μελέτες του ρόλου της σωματοστατίνης στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, επιβεβαίωσαν το εύρημα αυτό (Chantelau and Frystyk, 2005, Hernaez-Ortega *et al.*, 2004). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται επίσης μεμονωμένα περιστατικά άλλων παθήσεων που εμφάνισαν ως επιπλοκή CME και όπου η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της είχαν ευεργετική δράση, όπως είναι η ραγοειδίτιδα (Kafkala *et al.*, 2006, Papadaki *et al.*, 2005) και η πρώιμη επικρατούσα κυστεοειδή εκφύλιση της ωχράς (μια κληρονομούμενη μορφή

CME με πολλή κακή πρόγνωση) (Hogewind *et al.*, 2008). Σε μία πρόσφατη κλινική μελέτη σε ασθενείς με χρόνια CME λόγω ραγοειδίτιδας, το sst₂ ανάλογο sandostatin-LAR μείωσε το οίδημα και η απάντηση στο φάρμακο βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με τη διάρκεια του CME πριν από τη θεραπεία (Missotten *et al.*, 2007).

Αξιοσημείωτο είναι ότι η σωματοστατίνη και τα sst₂ ανάλογα της είχαν θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία του CME που προκαλείται από ποικιλία οφθαλμικών παθήσεων. Αυτό μπορεί να συνδέεται με την παρουσία υποδοχέων sst_{2A} στην κορυφή του κυττάρου ΜΕΑ, όπου υπάρχουν και τα συστήματα μεταφοράς ιόντων (van Hagen *et al.*, 2000). Η παρουσία των υποδοχέων στη θέση αυτή μπορεί να βοηθά τη ρύθμιση μεταφοράς νερού και ηλεκτρολυτών από το κύτταρο ΜΕΑ και αποκατάσταση της λειτουργίας του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO)

3.1 Η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου

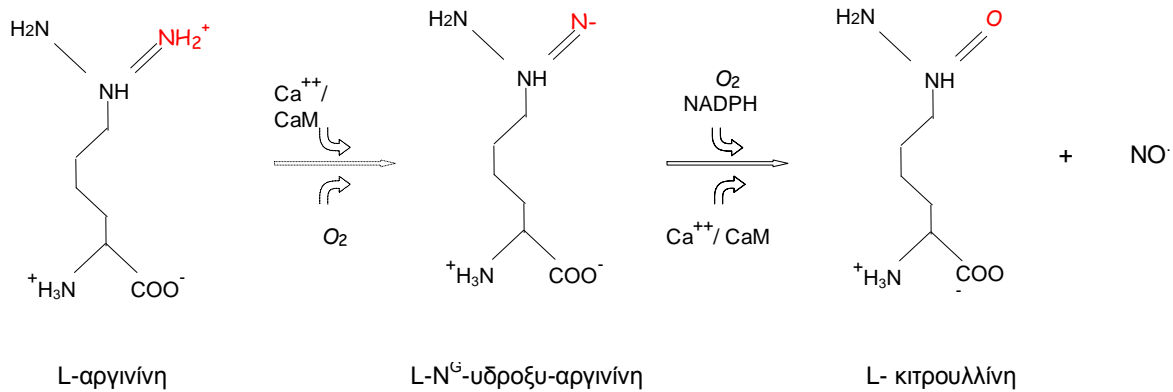
3.1.1 Γενικά

Η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]) είναι ένα απλό μόριο με ποικίλες δράσεις το οποίο δρα άμεσα, μεταβάλλοντας ενδοκυτταρικά μονοπάτια μετάδοσης σήματος και μακροπρόθεσμα, τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων. Η NO[•] αναγνωρίστηκε αρχικά ως ο παραγόμενος από το ενδοθήλιο παράγοντας χάλασης (Endothelial-Derived Relaxation Factor, EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980, Palmer *et al.*, 1987). Πρόκειται για ένα λιπόφιλο μόριο που φέρει ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. Το ηλεκτρόνιο αυτό καθιστά το μόριο χημικά ενεργό. Η NO δρα ως ελεύθερη ρίζα με χρόνο ζωής λιγότερο των 10 δευτερολέπτων, δε συνδέεται με υποδοχείς αλλά σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με τα μόρια-στόχους της.

Το σύστημα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και των ενζύμων που το συνθέτουν (συνθετάσες της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου, NOS), έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες (Wink *et al.*, 1993). Η NO δρα ως κυτταρικός διαβιβαστής, νευροδιαβιβαστής και νευροτροποποιητής παρακρινική, αυτοκρινική ουσία και ως ορμόνη (Hemish *et al.*, 2003, Lane *et al.*, 1999, Lane and Gross, 1999). Στο ανοσοποιητικό σύστημα, χρησιμοποιείται από τα μακροφάγα για την εξόντωση καρκινικών κυττάρων και μικροοργανισμών ενώ στο κυκλοφορικό σύστημα συμμετέχει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης δρώντας ως αγγειοδιασταλτικός παράγοντας (Moncada *et al.*, 1991).

3.1.2 Πώς σχηματίζεται η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου

Η NO παράγεται από το ένζυμο συνθετάση της NO (NOS) με οξείδωση της L-αργινίνης σε κιτρουλίνη και NO[•] παρουσία της ανηγμένης μορφής του φωσφορικού νικοταμιδο-αδενινουκλεοτιδίου (NADPH), και των συμπαραγόντων φλαβίνης [φλαβινο-αδενινουκλεοτιδίο (FAD) και φλαβινομονονουκλεοτιδίο (FMN)], καλμοδουλίνης, αίμης και BH₄ (5,6,7,8-τετραϋδροβιοπτερίνη) (Dawson *et al.*, 1991, Marletta, 1994, Stuehr, 1997) (Εικόνα 3-1).



Εικόνα 3-1: Σχηματισμός της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου από την αργινίνη. CaM: καλμοδουλίνη

Το ένζυμο συνθετάση του NO (NOS) απαντάται σε τρεις ισομορφές (Goldstein *et al.*, 1996). Οι δύο από αυτές, η νευρωνική (neuronal NOS, nNOS) και η ενδοθηλιακή (endothelial NOS, eNOS) είναι ιδιοσυστατικές και δρουν μόνο παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η τρίτη ισομορφή της συνθετάσης του NO δεν εξαρτάται από το ασβέστιο και επάγεται από ανοσολογικά σήματα σε κύτταρα όπως τα μακροφάγα και για τον λόγο αυτό η ισομορφή αυτή αναφέρεται ως επαγομένη (inducible NOS, iNOS) (Knowles and Moncada, 1994).

Η νευρωνική ισομορφή της NOS είναι μια διμερής κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η οποία φέρει ένα πορφυρινικό δακτύλιο αναγκαίο για την καταλυτική της δράση. Το άμινο τελικό άκρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του υποστρώματος (L-αργινίνη) και την καταλυτική παραγωγή NO, ενώ το καρβόξυ-τελικό του άκρο, περιέχει τις περιοχές πρόσδεσης με το NADPH, FAD και FMN (Bredt *et al.*, 1991, Bredt and Snyder, 1990, Stuehr and Ikeda-Saito, 1992). Η NOS ενεργοποιείται από Ca⁺⁺/καλμοδουλίνη (CaM) και απενεργοποιείται από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC, protein kinase C) και πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από cAMP, cGMP και Ca⁺⁺/καλμοδουλίνη, η δράση των οποίων κατευθύνεται στις θέσεις φωσφορυλίωσης που υπάρχουν πάνω στο μόριο της NOS (Bredt *et al.*, 1991, Jaffrey and Snyder, 1995)

Από τα μέσα σχεδόν του 20^{ου} αιώνα ήταν γνωστό ότι ορισμένοι νευρώνες του εγκεφάλου έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τη διαλυτή χρωστική κυανό του τετραζολίου σε αδιάλυτο ίζημα παρουσία NADPH, γεγονός που αποτελεί τη βάση της ιστοχημικής χρώσης της NADPH-διαφοράσης (Dawson *et al.*, 1991, Scherer-Singler *et al.*, 1983, Vincent and Hope, 1992, Vincent and Kimura, 1992). Η αντίδραση αυτή αποδόθηκε

πολύ αργότερα, στη συνθετάση της NO[•] λόγω της ικανότητας του ενζύμου να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH στο κυανό του τετραζολίου και να το μετατρέπει σε ίζημα (Bredt *et al.*, 1991, Dawson *et al.*, 1991, Djamgoz *et al.*, 1995, Hope *et al.*, 1991). Η ταύτιση των δύο αυτών ενζύμων επιτρέπει τη χρήση της ιστοχημικής μεθόδου της NADPH-διαφοράσης για τον εντοπισμό των κυττάρων που συνθέτουν την NO[•] ανεξάρτητα από την ισομορφή της NOS που αυτά εκφράζουν. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον άλλα έξι ένζυμα τα οποία εξαρτώνται από το NADPH (Tracey *et al.*, 1993).

3.2 Ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και οφθαλμός

Η χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών και της ιστοχημικής τεχνικής ανίχνευσης της NADPH-διαφοράσης επέτρεψε τον εντοπισμό της συνθετάσης της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου σε όλα σχεδόν τα κύτταρα στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών. Έτσι, τα βραχύινα, και μετατοπισμένα βραχύινα κύτταρα στην στιβάδα των γαγγλιακών εκφράζουν τη NOS σε όλα τα είδη θηλαστικών που έχουν ως τώρα μελετηθεί (Kim *et al.*, 1999, Mitrofanis, 1989, Neufeld *et al.*, 2000, Perez *et al.*, 1995, Sagar, 1986, Sandell, 1985, Wassle *et al.*, 1987). NOS εντοπίστηκε, επίσης, στους φωτοϋποδοχείς αρουραίου, κουνελιού, και ανθρώπου σε ενδοπλεγματοειδή κύτταρα ποντικού, γάτας, ψαριών και αμφιβίων (Kim *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2000) σε οριζόντια κύτταρα κουνελιού (Haverkamp and Eldred, 1998, Kim *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 1993) σε δίπολα κύτταρα κουνελιού, ινδικού χοιριδίου και αρουραίου και σε γαγγλιακά κύτταρα αρουραίου και ανθρώπου (Haverkamp and Eldred, 1998, Sagar, 1986, Sandell, 1985, Kim *et al.*, 2000).

Η NO[•] παράγεται και από τα κύτταρα MEA διαφόρων ειδών ως απάντηση στην παρουσία κυτοκινών. Σε κύτταρα βοοειδών, η NO[•] παράγεται παρουσία του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF- α , tumor necrosis factor- α) και λιποπολυσακχαριτών (LPS, lipopolysaccharides) ή ιντερφερόνης γάμμα (INF- γ , interferon- γ) και LPS (Goureau *et al.*, 1993, Goureau *et al.*, 1992). Τα κύτταρα MEA ποντικού, παράγουν επίσης iNOS και NO[•] μετά από επίδραση με INF- γ και LPS, ενώ η παραγωγή και των δύο αναστέλλεται μετά από επίδραση του παράγοντα αύξησης όγκων βήτα (TGF- β , tumor growth factor β) (Sparrow *et al.*, 1994). Σε ανθρώπινα κύτταρα MEA, η NO[•] παράγεται μετά από επίδραση INF- γ , ιντερλευκίνης-1 β και TNF- α (Goureau *et al.*, 1994, Kutty *et al.*, 1995). Σύνθεση της NO[•] και της iNOS παρατηρήθηκε επίσης και σε MEA αρουραίου μετά από επίδραση με INF- γ και TNF- α (Liversidge *et al.*, 1994). Επιπλέον, κύτταρα MEA αρουραίου παράγουν υψηλά επίπεδα NO[•] όταν καλλιεργούνται μαζί με ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα

(Liversidge *et al.*, 1994). Τέλος, η διεπιθηλιακή αντίσταση (trans- epithelial resistance, TER) των κυττάρων του MEA αυξάνει παρουσία δοτών της NO[•], όπως αυτό αποδεικνύεται από την αλλαγή στη διεπιθηλιακή μεταφορά ραδιοσημασμένης ινουλίνης και από τις μορφολογικές αλλαγές των στερρών συνδέσεων των κυττάρων αυτών (Zech *et al.*, 1998).

Η NO[•] είναι μόριο πολύ σημαντικό για την φυσιολογία του οφθαλμού. Οι ρόλοι της περιλαμβάνουν την διατήρηση αιματο-οφθαλμικού φραγμού (Zech *et al.*, 1998), την ανοσολογική απάντηση του οφθαλμού (Holtkamp *et al.*, 2001) και τη ρύθμιση της ροής του αίματος στον οφθαλμό (Dezsi *et al.*, 1997). Στον αμφιβληστροειδή η NO δρα ως νευροδιαβιβαστής και νευρορυθμιστής (Goldstein *et al.*, 1996). Όπως και σε άλλα συστήματα, η NO ενεργοποιεί μια διαλυτή γουανυλική κυκλάση αυξάνοντας έτσι την παραγωγή του cGMP (Ding and Weinberg, 2007, Koch *et al.*, 1994). Το cGMP αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της φυσιολογίας του αμφιβληστροειδούς καθώς επιδρά σε μια σειρά βιοχημικών υποστρωμάτων όπως είναι οι διάλυτοι ιόντων (Meriney *et al.*, 1994), οι χασματοσυνδέσεις (gap junctions) μεταξύ των οριζόντιων κύτταρων (DeVries and Schwartz, 1989) αλλά και των βραχύνων και διπόλων των ραβδίων (Mills and Massey, 1995).

Επιπλέον, η NO[•] διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση που προκαλείται από τον VEGF. Ο VEGF επάγει την eNOS και κατά συνέπεια και την απελευθέρωση NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Paparetropoulos *et al.*, 1997, Uhlmann *et al.*, 2001), ενώ η NO[•] με την σειρά της ενισχύει τη σύνθεση VEGF (Dulak *et al.*, 2000). Φαρμακολογικός αποκλεισμός ή συγγενής έλλειψη της eNOS συνεπάγεται αναστολή της αγγειογένεσης που προκαλείται από τον VEGF και μείωση της νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδούς που προκαλείται από την ισχαιμία (Brooks *et al.*, 2001, Fukumura *et al.*, 2001). Η NO[•] φαίνεται ότι ευνοεί την αγγειογένεση αυξάνοντας τη μεταναστευτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και την διαφοροποίησή τους σε τριχοειδή (Lee *et al.*, 2000). Σε αντίθεση με την eNOS, η iNOS βρέθηκε ότι αναστέλλει την αγγειογένεση, μειώνοντας τα επίπεδα του VEGF (Sennlaub *et al.*, 1999, Sennlaub *et al.*, 2001). Προδρομικές μελέτες συνηγορούν για τον πιθανό ρόλο της NO[•] στη χοριοειδική νεοαγγείωση που συναντάται στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (HEΩ). Σε χοριοειδικές νεοαγγειακές μεμβράνες ανθρώπινης προέλευσης εμφανίζονται πολύ αυξημένα επίπεδα iNOS σε κύτταρα MEA και μακροφάγα (Hattenbach *et al.*, 2002). Σε πειραματικό μοντέλο χοριοειδικής νεοαγγείωσης σε ποντίκια, βρέθηκε ότι ο σχηματισμός νέων αγγείων μειώνεται σε ποντίκια που στερούνται την iNOS αλλά όχι την eNOS (Ando *et al.*, 2002).

3.3 Ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και σωματοστατίνη

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί συνεντοπισμός NO και σωματοστατίνης, εντούτοις έχει παρατηρηθεί συνεντοπισμός των υποδοχέων σωματοστατίνης με την NADPH-διαφοράση στον αμφιβληστροειδή και το MEA. Συγκεκριμένα, η NADPH-διαφοράση συνεντοπίζεται με τους sst₁ υποδοχείς στα κύτταρα MEA και στα αγγεία του έσω αμφιβληστροειδούς αρουραίου, με τους sst_{2A} υποδοχείς στα δίπολα κύτταρα των ραβδίων κουνελιού, με τους sst_{2B} υποδοχείς σε κύτταρα MEA ανθρώπου και στους φωτούποδοχείς αρουραίου, με τους sst₄ υποδοχείς στα γαγγλιακά κύτταρα αρουραίου και με τους sst₅ υποδοχείς στα κύτταρα MEA ανθρώπου (Vasilaki *et al.*, 2001, Vasilaki *et al.*, 2002, Vasilaki *et al.*, 2004). Η σωματοστατίνη αυξάνει την παραγωγή NO από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου και τα κύτταρα MEA ανθρώπου. Η δράση της αυτή ασκείται μέσω των sst₂ υποδοχέων της και είναι δοσοεξαρτώμενη (Vasilaki *et al.*, 2002, Vasilaki *et al.*, 2004).

Τα παραπάνω ευρήματα, ορισμένα από τα οποία προέκυψαν στην εξέλιξη αυτής της διατριβής, αποδεικνύουν τη συμμετοχή της σωματοστατίνης στη ρύθμιση του NO στον αμφιβληστροειδή. Εντούτοις, στον αμφιβληστροειδή ποντικού δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός των υποδοχέων σωματοστατίνης με NADPH, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι στο είδος αυτό η σωματοστατίνη δεν είναι σημαντικός ρυθμιστής του NO (Mastrodimitou *et al.*, 2006).

Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα του cGMP σε αμφιβληστροειδή αρουραίου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο μέσω των υποδοχέων sst₂ και με την συμμετοχή της nNOS. Έτσι, το σύστημα NO/cGMP μπορεί να αποτελεί ένα νέο μονοπάτι μέσω του οποίου ασκούνται οι δράσεις της σωματοστατίνης (Thermos, 2008).

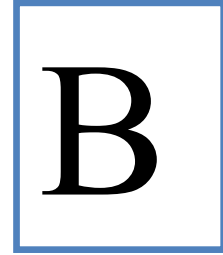
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής υπήρχαν ελάχιστες μελέτες στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο της σωματοστατίνης στα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς (ΜΕΑ) και την παρουσία των υποδοχέων σωματοστατίνης σε αυτόν.

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

1. η διερεύνηση της ύπαρξης σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στο ΜΕΑ,
2. η σχέση του σωματοστατινεργικού συστήματος με αυτό του μονοξειδίου του αζώτου,
3. η διερεύνηση της επίδρασης της σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ΜΕΑ και του μηχανισμού μέσω του οποίου ασκείται η δράση αυτή και
4. η μελέτη της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της σωματοστατίνης στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που σχετίζεται με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (ΗΕΩ).

Μέρος



Ειδικό Μέρος

Κεφ. 4^ο: Μεθοδολογία

Κεφ. 5^ο: Αποτελέσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

I. *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

4.1 Κυτταρική σειρά D407 (ανθρώπινο μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς)

Η κυτταρική σειρά D407 προέρχεται από αυτόματη μετατροπή (transformation) του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς (MEA) που απομονώθηκε από τον οφθαλμό ενός 12χρονου αγοριού (Davis *et al.*, 1995).

Τα κύτταρα D407 ανακαλλιεργήθηκαν περισσότερο από 300 φορές χωρίς να χάσουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους. Εμφανίζουν μορφολογία εν είδη πλακόστρωτου, χαρακτηριστική για επιθηλιακά κύτταρα, με διακυτταρικές συνδέσεις που περιέχουν N-cadherin. Ο κυτταροσκελετός των D407 αποτελείται από κυτταροκερατίνες χαρακτηριστικές για τα επιθηλιακά κύτταρα, όπως είναι η κερατίνη 8 και 18. Επιπλέον εκφράζουν ακτίνη, σπεκτρίνη και βιμεντίνη. Η τελευταία είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων των μεσεγχυματικών κυττάρων, όμως έχει βρεθεί ότι σε συνθήκες καλλιέργειας την εκφράζουν τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης συμπεριλαμβανομένου και του MEA (Hunt and Davis, 1990, Matsumoto *et al.*, 1990).

Τα κύτταρα MEA έχουν την δυνατότητα να φαγοκυτταρώνουν τις μεμβράνες από τα αποπίπτοντα έξω τμήματα των ραβδίων *in vivo*. Τα κύτταρα D407 εμφανίζουν επίσης φαγοκυτταρική δραστηριότητα, ενώ συνθέτουν και την κυτταρική πρωτεΐνη που δεσμεύει την ρετιναλδεύδη (CRALBP: cellular retinaldehyde binding protein) η οποία συμμετέχει στην μεταφορά ρετινοειδών από την κυκλοφορία στον αμφιβληστροειδή και η οποία εντοπίζεται επίσης στα κύτταρα MEA και Müller του αμφιβληστροειδούς *in vivo*. Τα κύτταρα D407 εκφράζουν επίσης δραστικότητα για την αφυδρογονάση της ρετινόλης αλλά όχι για την ισομεράση των ρετινοειδών ή την λεκιθίνη ρετινολ-ακυλοτρανφεράση (lecithin retinol acyl transferase). Πάντως, η κυτταρική σειρά D407 είναι η μόνη σειρά MEA που εμφανίζει ικανότητα μεταβολισμού των ρετινοειδών. Άλλες ιδιότητες των D407 που συνηγορούν για την προέλευση τους από το MEA είναι η έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών του εξωκυττάρου υποστρώματος παρόμοια με τα κύτταρα MEA *in vivo* καθώς και η απελευθέρωση ιόντων σιδήρου από την τρανσφερρίνη.

Τα κύτταρα D407 έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε μελέτες της βιολογίας του MEA όπως, μεταξύ άλλων, μελέτες κυτταρικής σύνδεσης, φαγοκυττάρωσης, μεταβολισμού των ρετινοειδών και αυξητικών παραγόντων του αμφιβληστροειδούς.

4.2. Καλλιέργεια κυττάρων

Υλικά και συσκευές

Κυτταρική σειρά D407 (R. Hunt, USC Columbia, USA)

Dulbecco's high glucose Modified Eagle Medium (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Ορός εμβρύου βοός: FBS (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Διάλυμα L-γλουταμίνης (Invitrogen-Gibco BRL, Paisley, UK).

Διάλυμα πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης (Invitrogen-Gibco BRL, Paisley, UK).

Διάλυμα τρυψίνης- EDTA (Gibco -BRL Life Technologies, UK)

Χρωστική Trypan-blue (Seromed Biochrom, Germany)

Φλάσκες καλλιέργειών (Nunc, USA)

DMSO (Sigma, USA)

Ανοδικό μικροσκόπιο και Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Φυγόκεντρος Hermle Z320 (B. Hermle AG, Germany)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer

Επωαστικός κλίβανος

Μέθοδοι

Απόψυξη και εγκατάσταση κυτταροκαλλιιεργειών

Ο σωλήνας με τα αποθέματα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς εμβαπτίζεται αμέσως μετά την έξοδό του από τον υπερκαταψύκτη (-80°C) σε νερό θερμοκρασίας 37°C. Τα κύτταρα μεταφέρονται στη συνέχεια σε σωλήνα 50ml που περιέχει 20ml πλήρες θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιιεργειών και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στα 800g. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρες θρεπτικό μέσο και τοποθετούνται σε φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειας επιφάνειας 75cm².

Συνθήκες κυτταροκαλλιιεργειών

Τα κύτταρα καλλιιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θεοκρασία 37°C και σε υγρή ατμόσφαιρα με 5%CO₂/95% αέρα. Το θρεπτικό υλικό είναι DMEM υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη με 3% ορό εμβρύου βοός 1% L-γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Αλλαγή θρεπτικού υλικού γίνεται κάθε 72 ώρες. Η εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων γίνεται με παρατήρησή τους σε ανοδικό στερεομικροσκόπιο.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα φτάσουν να παρουσιάζουν πληρότητα στην επιφάνεια της φλάσκας τουλάχιστον 90%. Όταν τηρούν αυτή τη συνθήκη τα κύτταρα αποσύρονται από τον επωαστήρα και αφαιρείται το θρεπτικό μέσο. Προστίθεται 1ml διαλύματος 10x Τρυψίνης / EDTA (Gibco BRL) και μετά από επώαση για 5 λεπτά στους 37°C, τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πάτο της φλάσκας. Τα κύτταρα ξεπλένονται από την φλάσκα με θρεπτικό υλικό το οποίο ταυτόχρονα απενεργοποιεί την τρυψίνη και φυγοκεντρώνεται στα 800g για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml θρεπτικού υλικού. Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίζεται με την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός (μεγέθυνση 40X) και η μέτρησή των κυττάρων γινόταν πάνω σε ειδική πλάκα-κυτταρομετρητή (Chemocytometer-Neubauer, Hauser Scientific) με την χρήση Trypan-blue για την αναγνώριση των νεκρών κυττάρων.

Αποθήκευση αποθέματος κυτταρικής σειράς

Τα κύτταρα καταψύχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και τα πειράματα πραγματοποιούνταν στον ίδιο περίπου αριθμό γενεών. Για την κατάψυξη κυττάρων τα κύτταρα αποκολλώνται από την φλάσκα καλλιέργειας με τρυψίνη ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα κυττάρων όπως αναφέρεται και παραπάνω, το οποίο μεταφέρεται σε σωλήνα 50ml και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 800g. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε επιθυμητό όγκο ορού εμβρύου βοός στον οποίο έχει προστεθεί DMSO σε τελική αραίωση 20%. Το νέο εναιώρημα τοποθετείται σε ειδικά σωληνάκια (cryovials) και ακολούθως μέσα σε ειδική συσκευή ψύξης κυτταροκαλλιιεργειών (επιτρέπει την πτώση της θερμοκρασίας κατά 1°C ανά λεπτό) στον υπερκαταψύκτη (-80°C).

4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Υλικά και συσκευές

Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) (Sigma, USA)

Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250: Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies, USA)

Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)

Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα (διαφέρει ανάλογα με το πείραμα)

Διάλυμα αλβουμίνης βοός (200μg/ml)

Μέθοδος

Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται προσδιορισμός κυτταρικών πρωτεϊνών (ολικών, μεμβρανικών, κυτταροπλασματικών) (Bradford, 1976) Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 να υπάρχει σε δύο διαφορετικές χρωματικές μορφές, κόκκινη και μπλε. Μετά τη σύνδεσή της με τις πρωτονωμένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας η κόκκινη μορφή μετατρέπεται σε μπλε προκαλώντας μία μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τη μέτρηση της πρωτεΐνης. Η σύνδεση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (περίπου σε δύο λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα του χρώματος για περίπου 1 ώρα μετά την προσθήκη της χρωστικής.

Σε μία μικροπλάκα 96 οπών τοποθετήθηκαν 160 μl ανά μικροκυβελίδα των γνωστών και των άγνωστων δειγμάτων (κάθε δείγμα τοποθετήθηκε εις διπλούν) και 40 μl ανά μικροκυβελίδα του διαλύματος της χρωστικής. Ακολούθησε καλή ανάδευση του μείγματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 595 nm και σε φωτόμετρο ELISA.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία λαμβάνεται από την ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA (5-100 μg/ml). Τα αποτελέσματα με βάση την πρότυπη καμπύλη εκφράζονται σε μg πρωτεΐνης/ml διαλύματος.

4.4 Ραδιοανοσοανίχνευση και μέτρηση της ποσότητας της σωματοστατίνης που εκκρίνεται από τα κύτταρα D407

Υλικά και συσκευές

Πλάκες καλλιέργειών 24 οπών (Nunc, USA)

PBS (Sigma, USA)

Οξικό οξύ (Merck, Germany)

Na₂HPO₄ (Sigma, USA)

NaH₂PO₄ (Sigma, USA)

NaCl (Sigma, USA)

Ζελατίνη (Sigma, USA)

Αντι-ορός κουνελιών έναντι της σωματοστατίνης συνδεδεμένης με οβαλβουμίνη L-2044 – Rougeot, Pasteur Institute (δώρο από τον prof. Sperk, Innsbruck, Austria)

[¹²⁵I]-Tyr¹¹-SRIF-14 (Amersham, UK)

SRIF-14 (Bachem Bioscience, Heidelberg, Germany)

Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) (Sigma, USA)

Βακιτρακίνη (Sigma, USA)

Αζίδιο του νατρίου (NaN₃, Sigma, USA)

Ξυλάνθρακας (Charcoal, Sigma, USA)

Δεξτράνη T70 (Sigma, USA)

Συσκευή υπερήχων Vibracell™ 72434 (Bioblock Scientific, USA)

Λυοφιλοποιητής Centrivan Cold Trap (Labconco Corp, USA)

Μετρητής γ-ακτινοβολίας (LKB-Wallak MiniGamma 1275, απόδοσης 75%).

Διαλύματα

Διάλυμα 2N οξικού οξέος

Διάλυμα NaN₂ (0.2M) (0.2M Na₂HPO₄, 0.2M NaH₂PO₄ 81/19)

Διάλυμα ραδιοανοσοανίχνευσης I (0.2M NaN₂ pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.1% ζελατίνη, 0.02% NaN₃, 0.1% B.S.A, 0.02% βακιτρακίνη

Διάλυμα ραδιοανοσοανίχνευσης II (0.2M NaN₂ pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% B.S.A, 0.02% βακιτρακίνη

Διάλυμα ξυλάνθρακα 2.5% και δεξτράνης T70 0,25%

Μέθοδος

Προετοιμασία των δειγμάτων

Τα κύτταρα D407 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών. Όταν καλύφθηκε η καλλιεργητική επιφάνεια σε ποσοστό >90% τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δις με PBS, ομογενοποιήθηκαν με υπερήχους σε 0,5ml, 2N οξικού οξέος, κρατήθηκαν 50μL από την κάθε οπή στους -20°C για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford) και το υπόλοιπο τοποθετήθηκε στους -80°C για 24-48 ώρες.

Στην συνέχεια, τα δείγματα ξεπαγώθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000g για 20 λεπτά στους 4°C και από το υπερκείμενο φτιάχτηκαν διπλές των 100μL από το κάθε δείγμα, λυοφιλοποιήθηκαν και φυλάχτηκαν στους -80°C μέχρι τη μέτρησή τους με ραδιοανοσολογική τεχνική (RIA).

Μέτρηση με ραδιοανοσολογική τεχνική (RIA)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, 20μL συνθετικής σωματοστατίνης SRIF-14 συγκέντρωσης 2×10^{-4} M αραιώθηκαν σε κατάλληλες ποσότητες διαλύματος ραδιοανοσοανίχνευσης I και προέκυψαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις SRIF-14: 200pgr/100μL, 150pgr/100μL, 100pgr/100μL, 50 pgr/100μL, 25 pgr/100μL, 12,5pgr/100μL, 6,25pgr/100μL, 3,125pgr/100μL, 1,56pgr/100μL, 0,78pgr/100μL και 0pgr/100μL.

Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε 100μL διαλύματος ραδιοανοσοανίχνευσης. Σε καθένα από τα δείγματα προς μελέτη και στα δείγματα της πρότυπης καμπύλης προστέθηκαν:

- 100μL ραδιενεργής σωματοστατίνης [^{125}I]-Tyr¹¹-SRIF-14
- 100μL αντί-ορού κουνελιών, ανεπτυγμένου έναντι της οβαλβουμίνης που συνδέεται με την SRIF-14 (Sperk and Widmann, 1985) σε τελική συγκέντρωση 1:15,000
- 200μL διαλύματος ραδιοανοσοανίχνευσης I

και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 4°C .

Για τον διαχωρισμό των συνδεδεμένων από τα ελεύθερα πεπτίδια, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν από 900μL διαλύματος 2,5% ξυλάνθρακα/ 0, 25% δεξτράνης σε διάλυμα ραδιοανοσοανίχνευσης II. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν επί 20min στους 4°C στις 3000 g. Από το υπερκείμενο κάθε δείγματος συλλέχτηκαν 700μL τα οποία μετρήθηκαν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα πειράματα αυτά βασίζονται στην αντίδραση:



όπου:

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

Κατά την προσθήκη διαλύματος ξυλάνθρακα / δεξτράνης μετά την αντίδραση, γίνεται κατακρήμνιση της ελεύθερης ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης S* και διαχωρισμός της από την συνδεδεμένη με το αντίσωμα της σωματοστατίνη AbS*, η οποία και μετρίεται στον γ-counter. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κρούσεων, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου αντισώματος-ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης, τόσο μικρότερη η συγκέντρωση του συμπλόκου αντισώματος-σωματοστατίνης και επομένως τόσο μικρότερη η αρχική συγκέντρωση της σωματοστατίνης. Έτσι προσδιορίζεται έμμεσα η αρχική συγκέντρωση της σωματοστατίνης.

Η ανάλυση των πειραμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος GraphPad Prism 2.01. Σχεδιάστηκαν σιγμοειδείς καμπύλες με συντεταγμένες: στον άξονα των x, τις λογαριθμικές τιμές των συγκεντρώσεων της μη ραδιοσημασμένης ουσίας (log [M], λογάριθμος της συγκέντρωσης σε molar) και στον άξονα των y, τις τιμές των κρούσεων ανά λεπτό του συμπλόκου του αντισώματος με τη ραδιοσημασμένη σωματοστατίνη. Οι τιμές που προκύπτουν από την πρότυπη καμπύλη για τα δείγματα ανάγονται σε µg πρωτεΐνης με βάση την αρχική μέτρηση.

4.5 Απομόνωση RNA από τα κύτταρα D407

Υλικά και συσκευές

Πλάκες κυτταροκαλλιιεγείων με 6 πηγάδια καλλιέργειας (Nunc, USA)

Φαινολικό διάλυμα ομογενοποίησης Trizol (Invitrogen, Carisband CA, USA)

Αποστειρωμένο νερό άνευ RNAασών – RNase Free Water

Φυγόκεντρος Labofuge 400R (Heraeus Istruments, Germany)

Χλωροφόρμιο (Sigma, USA)

Ισοπροπανόλη (Sigma, USA)

Αιθανόλη

Φωτόμετρο (Hitatsi, Japan)

NaOH (Sigma, USA)

Διαλύματα

0,1N NaOH σε RNase Free Water

Μέθοδος

Για την λήψη RNA από κύτταρα D407, τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό δίχως ορό εμβρύου βοός σε πλάκες έξι οπών. Το θρεπτικό υλικό στη συνέχεια αφαιρέθηκε και σε κάθε οπή προστέθηκε 1ml του φαινολικού διαλύματος ομογενοποίησης Trizol το οποίο αφέθηκε να δράσει για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε ελαφρά απόξεση των κυττάρων και το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο erpendorf στους -80°C μέχρι το επόμενο στάδιο.

Τα ομογενοποιημένα σε Trizol δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15min. Προστέθηκε χλωροφόρμιο υπό στείρες συνθήκες σε αναλογία 0,1ml/ml Trizol και στη συνέχεια το δείγμα υπέστη ισχυρή ανάδευση (~30 sec) και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 5min περίπου. Α

Ακολούθησε φυγοκέντρηση υπό 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C . Η φυγοκέντρηση βοηθά τα βαρέα συστατικά να καθιζάνουν (πρωτεΐνες, DNA) με τη φαινόλη, ενώ το RNA παραμένει διαλυμένο στο χλωροφόρμιο, το οποίο σχηματίζει άχρωμο υπερκείμενο (άνω φάση).

Το τελευταίο μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο μικροσωληνάριο erpendorf. Στο διάλυμα αυτό προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύτηκε ισχυρά για σύντομο χρονικό διάστημα (~10sec) και αφέθηκε να σχηματίσει ίζημα (15 min, RT).

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12000g για 15min σε θερμοκρασία 4°C, μετά από την οποία είναι ορατός ο σχηματισμός ίζήματος. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και ακολούθησε έκπλυση με 1ml κρύας (4°C) αιθανόλης 75% (v/v) σε RNase Free H₂O. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 7000g για 8 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, αφαίρεση του υπερκειμένου και επανάληψη. Μετά από την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το σχηματισμένο λευκόφαιο ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε απαγωγό και επαναδιαλύθηκε σε RNase Free H₂O.

Ακολουθεί η μέτρηση καθαρότητας του RNA στο δείγμα με τη χρήση φωτομέτρου το οποίο έχει ρυθμιστεί να μετρά σε δύο μήκη κύματος το λόγο 260/280nm. Ο λόγος αυτός προσδιορίζει την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA (260nm) και πρωτεΐνης (280nm) με ιδανική τιμή το λόγο 2. Δύο μL RNA του προς εξέταση δείγματος διαλύονται σε 0.1M NaOH. Η απορρόφηση του δείγματος μετράται και το αποτέλεσμα αντιστοιχίζεται στο μαθηματικό τύπο υπολογισμού του βάρους του RNA:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}) = A_{260\text{nm}} * \Phi * V$$

όπου:

- A_{260nm} η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm
 Φ ο συντελεστής αραίωσης [= 500 (2μL δείγματος σε 1000μL NaOH)]
 V ο όγκος του εναπομείναντος διαλύματος RNA σε ml

4.6 Επίδραση με DNAση, ανάστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Υλικά και συσκευές

DNAse I (Gibco BRL, Paisley, UK)

Θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp PCR Systems 2400 (Applied Biosystems, USA)

Ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης 12-18 - Oligo d(T)₁₂₋₁₈ ή Pd(T)₁₂₋₁₈ ομο-ολιγομερές (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)

Ανάστροφη μεταγραφάση – Superscript II™ RNase H- (Gibco BRL, Paisley, UK)

Αναστολέας ριβονουκλεασών – RNAsin® (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Roche, Mannheim, Germany)

Πολυμεράση – Taq DNA Polymerase (Roche, Mannheim, Germany)

100 bp DNA Ladder (Gibco BRL, Paisley, UK)

Αποστειρωμένο νερό άνευ ριβονουκλεασών - RNase-free H₂O (USB, Cleveland Ohio, USA)

Ολιγονουκλεοτίδια έναρξης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης – primers MWG (Ebersberg, Germany)

Αγαρόζη (Sigma, USA)

Tris Base (Sigma, USA)

Boric Acid (Sigma, USA)

EDTA (Sigma, USA)

Bromophenol blue

Ficoll (Type 400)

Ethidium bromide (Sigma, USA)

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad Life Technologies, USA)

Συσκευή και λογισμικό ανάγνωσης πυκτωμάτων (Molecular Analyst Software, Bio-Rad Life Technologies, USA).

Διαλύματα

5x TBE (ανά 1L: 54g Tris Base, 27,5g Boric Acid, 20ml 0,5M EDTA, συμπλήρωση με αφιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο του 1L, pH 8)

Διάλυμα ανάμειξης δείγματος (Loading Buffer) (0,25% Bromophenol blue, 15% Ficoll (Type 400) σε νερό)

Διάλυμα κλίμακας μοριακού βάρους DNA (100bp) (1μL stock 100bp ladder, 7μL 1xTBE, 3μL Loading Buffer)

Μέθοδοι

Επίδραση με DNase

Η επεξεργασία με DNase για την αποδόμηση του DNA που εμπεριέχεται στα δείγματα ήταν ένα απαραίτητο στάδιο στην μελέτη των υποδοχέων σωματοστατίνης διότι με εξαίρεση τον *sst₂* δε έχουν ιντρόνια και ο κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων από επιμόλυνση από γενομικό DNA είναι σημαντικός (Patel, 1999)

Σε προσημειωμένα μικροσωληνάρια όγκου 0,2ml (microeppendorfs) με την ένδειξη [(+) = με μεταγραφάση] και [(-) = χωρίς μεταγραφάση] , εισάγεται όγκος δείγματος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA και ο όγκος του συμπληρώνεται στα 8μL με RNase Free H₂O. Σε κάθε δείγμα (+ και -) προστίθενται αρχικά 1μL 10xDNase I Reaction Buffer και έπειτα 1μL DNase.

Τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται 1μL διαλύματος 25mM EDTA. Ακολουθεί τοποθέτηση των microeppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή και υφίστανται θερμική επεξεργασία για 10 λεπτά στους 65°C, με τη λήξη της οποίας τοποθετούνται σε πάγο (4°C).

Ανάστροφη Μεταγραφή

Ακολούθως προστίθενται σε κάθε δείγμα 2μL ολιγονουκλεοτιδίων με 12 έως 18 μόρια Θυμίνης (Pd(T)12-18) το οποίο δρα δημιουργώντας πλαίσια έναρξης της διαδικασίας ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription) σε αντίστοιχα πολυαδενυλιωμένα τμήματα RNA του δείγματος.

Τα δείγματα επανατοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή και θερμαίνονται στους 70°C για 10 λεπτά για να προκληθεί η ξεδίπλωμα των αλύσεων του RNA και καλύτερη εφαρμογή των ολιγονουκλεοτιδίων.

Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο (4°C) και ακολουθεί η προσθήκη σε κάθε δείγμα: 4μL 5x RT-buffer, 1μL DTT, 1μL dNTPs, 1μL RNAsin. Τέλος, στο δείγμα με την ένδειξη (+) προστίθεται 1μL ενζύμου (reverse transcriptase), ενώ στο δείγμα (-) προστίθεται ίσος όγκος RNase Free H₂O, ελέγχοντας μ' αυτόν τον τρόπο τυχόν μόλυνση των υπό διερεύνηση δειγμάτων.

Τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή και ξεκινά η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής σε θερμοκρασία 42°C για 60 min, έπειτα στους 95°C για 5 min και τέλος στους 4°C. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στη συνέχεια στους -20°C μέχρι την εκτέλεση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε 1μL cDNA υποβλήθηκε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τελικού όγκου 25μL, στον οποίο περιλαμβάνονταν 1X ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM forward και reverse primers, και 0,05 U/μl Taq DNA πολυμεράση.

Οι primers για τους ssts (Πίνακας 4.1) και τις NOS (Πίνακας 4.2) επιλέχθηκαν από την τράπεζα δεδομένων NCBI UNISTS και προήλθαν από την MWG (Ebersberg, Germany).

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 5 λεπτά στους 94°C, 35 κύκλοι (30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 56°-60°C και 30 δευτερολέπτων στους 72°C) που ακολουθούνται από επιμήκυνση του προϊόντος για 7 λεπτά σε 72°C. Επειδή τα γονίδια των ssts (με εξαίρεση τον sst₂) δεν περιέχουν ιντρόνια και προκειμένου να ελέγχονται τα υλικά για επιμόλυνση μόλυνση, μια ίδια παράλληλη αντίδραση εκτελείται περιέχοντας αρχικό υλικό στο οποίο δεν είχε γίνει αντίστροφη μεταγραφή (το προαναφερθέν αρνητικό δείγμα).

Ανίχνευση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

Παρασκευάζεται 2% πηκτή αγαρόζης σε 0,5x TBE (2g αγαρόζης σε 100ml για μεσαίου μεγέθους πήκτωμα). Το μείγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για να επιτευχθεί η ομοιογενής διάλυσή του και προ της έγχυσης στο ειδικό δοχείο πήξεως (με χτένι) προστίθενται 40μL διαλύματος ethidium bromide (1mg/ml). Μετά την πήξη του, αφαιρείται από το πήκτωμα το χτένι, έχοντας σχηματίσει βοθρία - θέσεις όπου θα τοποθετηθούν τα προς διερεύνηση δείγματα, και το σύστημα τοποθετείται στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.

Σε καθένα εκ των προϊόντων της PCR προστίθεται διάλυμα ανάμειξης δείγματος σε αναλογία 5:1 και 10μL από το καθένα εισέρχεται στο βοθρίο που έχει σχηματιστεί από το χτένι στο πήκτωμα της αγαρόζης. Το gel ηλεκτροφορείται σε 0.5x TBE στα 100V για 45-60min. Η ανίχνευση των δεσμών γονιδιακού σήματος (bands) είναι εφικτή υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Σε αυτό το σημείο το πήκτωμα φωτογραφίζεται ηλεκτρονικά και οι δέσμες αντιστοιχίζονται στο ανάλογο γονίδιο με τη βοήθεια της κλίμακας μοριακού βάρους ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA

Πίνακας 4-1: Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 με RT-PCR, οι θερμοκρασίες τήξης τους και το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης.

Γονίδιο	Κωδικός UniSTS	Κωδικός GenBank ή RHdb	Primers	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Κύκλοι
β-actin	109142	G49387	F GGTGGCTTTTAGGATGGCAAG	62.9	161	30
			R ACTGGAACGGTGAAGGTGACAG	63.6		
sst ₁	186758	G67495	F CCACCAACATCTACATCCTA	55.3	555	35
			R CCACCATCATCACCATTAAG	55.3		
sst ₂	186761	G67500	F CATCTTCTGCCTGACAGTC	56.7	509	35
			R CCACCACAAAGTCAAACAT	52.4		
sst ₃	186764	G67503	F AGAACGCCCTGTCCTACTGG	61.4	533	40
			R GTTGACGATGTTGAGCACG	56.7		
sst ₄	3081	RH69015	F AACCTCGTCGTGACCAG	55.2	207	40
			R AGCAGTGGCATAGTAGTCCAG	59.8		
sst ₅	50681	RH66813	F GCTTCCAGAAGTTCTGTGC	59.4	145	40
			R TTGCTGGTCTGCATAAGCC	56.7		

F: forward, R: reverse

Πίνακας 4-2: Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των διαφόρων ισομορφών συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου στα κύτταρα D407 με RT-PCR, οι θερμοκρασίες τήξης τους και το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης.

Γονίδιο	Κωδικός UniSTS	Κωδικός GenBank ή RHdb	Primers	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Κύκλοι
β-actin	109142	G49387	F GGTGGCTTTTAGGATGGCAAG	62.9	161	35
			R ACTGGAACGGTGAAGGTGACAG	63.6		
iNOS	84524	RH79885	F ACA GGA GGG GTT AAA GCT GC	60.5	232	35
			R TTG TCT CCA AGG GAC CAG G			
nNOS	11632	L02881	F AGACACAGCCATCAGACGC	59.8	142	35
			R TCGGTGGCATGATTTTCCT			
eNOS*			F AAT CCT GTA TGG CTC CGA GA	59.4	121	35
			R GGG ACA CCA CGT CAT ACT CA			

F: forward, R: reverse

* Οι primers για την eNOS σχεδιάστηκαν από την ομάδα μας.

4.7 Μελέτες δέσμευσης για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407

Υλικά και συσκευές

PBS (Sigma, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) (Sigma, USA)

Tris-HCL (Sigma, USA)

MgCl (Sigma, USA)

EGTA (Sigma, USA)

PMSF (Sigma, USA)

Βακτράκίνη (Sigma, USA)

Λευπεπτίνη (Sigma, USA)

Ομογενοποιητής Polytron (Janke & Kynkel GmbH & CG. IKA Lab., Typ T 25)

Υπερφυγόκεντρο Beckman XL-90 με κεφαλή τύπου 70 Ti ($r_{av}=65.7$).

Σωληνάρια πολυστυρενίου, 12x75mm

[¹²⁵I]Tyr¹¹ SRIF-14 (Amersham USA)

SRIF-14 (Bachem Bioscience)

MK-678 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

CH275 δώρο από τον Dr J. Epelbaum (Paris, France)

L-817,818 δώρο από τον Dr J. Epelbaum (Paris, France).

Υδατόλουτρο (Hotpack-Shaker)

Φίλτρα ινών ύαλου, (Whatman GF/C, 2.5cm, Millipore)

Συσκευή κενού, 12 οπών (Millipore)

Πολυαιθυλενιμίνη (PEI, Merck)

Μετρητής γ-ακτινοβολίας (LKB-Wallak MiniGamma 1275, απόδοσης 75%).

Διαλύματα

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Sigma, USA)

Ρυθμιστικό διάλυμα-I [50mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM MgCl₂, 5mM EGTA, 0.1mM PMSF, 200μg/ml βακτράκίνη και 10μg/ml λευπεπτίνη].

Διάλυμα 0.1% w/v πολυαιθυλενιμίνης

Διάλυμα 1% w/v αλβουμίνης ορού βοός

Διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7.4

Μέθοδος

Απομόνωση μεμβρανικών παρασκευασμάτων κυττάρων D407

Κύτταρα D407 τα οποία καλλιεργούνταν σε φλάσκες 75cm², αποκολλήθηκαν με προσθήκη 1ml διαλύματος 10x Τρυψίνης/EDTA (Gibco BRL). Το ελαιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στα 800g για 10 λεπτά, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι να γίνουν τα πειράματα.

Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος-I. Η ομογενοποίηση έγινε στον πάγο, στις 13000 στροφές το λεπτό και με τη χρήση λεπίδων του τύπου S25-10G.

Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά σε 27000g και σε θερμοκρασία 4°C σε υπερφυγόκεντρο. Το ίζημα ομογενοποιήθηκε για άλλη μια φορά και επαναφυγοκεντρήθηκε, όπως παραπάνω. Το ίζημα, της δεύτερης αυτής φυγοκέντρησης ομογενοποιήθηκε σε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος-I. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των μεμβρανικών αυτών παρασκευασμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford.

Μελέτες δέσμευσης

Για τον προσδιορισμό της αναστολής της δέσμευσης της [¹²⁵I]Tyr¹¹ SRIF-14, σε μεμβρανικά παρασκευάσματα κυττάρων D407, από ειδικά ανάλογα για τους διαφορετικούς υπότυπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, σύμφωνα με αυτή των Thermos & Reisine (Thermos and Reisine, 1988) και Liapakis & Thermos (Liapakis and Thermos, 1992).

Σε σωληνάρια πολυστυρενίου, 12x75mm, εις διπλούν, προστέθηκαν [¹²⁵I]Tyr¹¹ SRIF-14 (C_{final}: 51pM, 2000Ci/mmol, C_{final}: Τελική συγκέντρωση ουσίας στο διάλυμα), ρυθμιστικό διάλυμα-I, ή 10⁻⁶M μη ραδιενεργού αναλόγου σωματοστατίνης και ελαιώρημα μεμβρανών (75μg) έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υγρού επώασης να είναι 0.25ml. Η μη ειδική δέσμευση (NSB, non specific binding) της [¹²⁵I]Tyr¹¹ SRIF-14 προσδιορίστηκε παρουσία SRIF-14 (1μM) σύμφωνα με τον τύπο:

$$\%NSB = \frac{Total - Blank}{NSB - Blank} \times 100 \quad (1)$$

όπου:

NSB: Μη ειδική δέσμευση της [¹²⁵I] Tyr¹¹ SRIF-14 παρουσία 1μM SRIF-14 σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm, counts per min)

TOTAL: Ολική δέσμευση της [^{125}I] Tyr 11 SRIF-14 απουσία μη ραδιοσημασμένης ουσίας σε cpm,

Blank: Μη ειδική δέσμευση της [^{125}I] Tyr 11 SRIF-14 στα GF/C φίλτρα απουσία μεμβρανικών παρασκευασμάτων σε cpm.

Τα μη ραδιενεργά ανάλογα της σωματοστατίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα: CH-275, (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους sst $_1$ υποδοχείς), MK-678 (sst $_2$ ανάλογο) και L-817,818 (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους sst $_5$, υποδοχείς και μικρότερη για τους sst $_1$). Το μείγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο (*Hotpack-Shaker*) για 90 λεπτά με ήπια ανάδευση (40 strokes/min) και σε θερμοκρασία 25°C. Ο διαχωρισμός της δεσμευμένης με τον υποδοχέα από την ελεύθερη ιωδιωμένη σωματοστατίνη έγινε με διήθηση σε φίλτρα ινών ύαλου σε συσκευή Millipore, 12 οπών με τη βοήθεια κενού. Τα φίλτρα είχαν προηγουμένως εμποτιστεί για μια ώρα σε 0.1% w/v πολυαιθυλενιμίνη και 30 λεπτά σε 1% w/v αλβουμίνη ορού βοός στους 4°C. Μετά το διαχωρισμό τα φίλτρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με 5ml, 50mM Tris-HCl, pH 7.4 στους 4°C και μετρήθηκαν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα πειράματα της φαρμακολογικής μελέτης των υποδοχέων σωματοστατίνης (πειράματα δόσης- απάντησης) βασίζονται στην αντίδραση Bylund (Bylund and Martinez, 1980):



όπου:

- [R]: Συγκέντρωση ελεύθερων υποδοχέων
- [L*]: Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης ουσίας πριν την αντίδραση
- [I]: Συγκέντρωση ελεύθερης μη ραδιοσημασμένης πριν την αντίδραση
- [RL]: Συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα-ραδιοσημασμένης ουσίας
- [RI]: Συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα-μη ραδιοσημασμένης ουσίας
- [L*'] : Συγκέντρωση ελεύθερης ραδιοσημασμένης ουσίας μετά την αντίδραση
- [I'] : Συγκέντρωση ελεύθερης μη ραδιοσημασμένης μετά την αντίδραση

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών προσδιορίστηκε το επί της εκατό ποσοστό της ειδικής δέσμευσης της ραδιοσημασμένης ουσίας (%SB, percent of specific binding) και κατά συνέπεια το ποσοστό της ειδικής δέσμευσης που αντιστοιχεί στον

συγκεκριμένο υπότυπο υποδοχέα σωματοστατίνης για τον οποίο είναι ειδικό το συγκεκριμένο ανάλογο:

$$\%SB = \frac{X - NSB}{Total - NSB} \times 100 \quad (2)$$

όπου:

X: Δέσμευση της [¹²⁵I] Tyr¹¹ SRIF-14 παρουσία μη ραδιοσημασμένης ουσίας σε cpm

NSB: Μη ειδική δέσμευση της [¹²⁵I] Tyr¹¹ SRIF-14 παρουσία 1μM SRIF-14 ή SRIF -28 σε cpm

TOTAL: Ολική δέσμευση της [¹²⁵I] Tyr¹¹ SRIF-14 απουσία μη ραδιοσημασμένης ουσίας σε cpm,

Η ανάλυση των πειραμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος *GraphPad Prism 2.01*. Σχεδιάστηκαν καμπύλες με συντεταγμένες: στον άξονα των x, τις λογαριθμικές τιμές των συγκεντρώσεων της μη ραδιοσημασμένης ουσίας (log [M], λογάριθμος της συγκέντρωσης σε molar) και στον άξονα των y, τις τιμές της επί της εκατό ειδικής δέσμευσης του ραδιενεργού πεπτιδίου.

4.8 Μελέτες ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407

Υλικά -Συσκευές

Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων – Chamber Slides (Nunc, USA)

Παραφορμαλδεΐδη (Sigma, USA)

Πολυκλωνικά αντισώματα ανεπτυγμένα σε κουνέλι ενάντια στο καρβοξυ- τελικό άκρο των sst₁, sst_{2A}, sst_{2B}, sst₃₋₅ υποδοχέων (Dr S. Schultz, Germany),

Συνθετικό πεπτίδιο FRNNKNRKK (Dr S. Schultz, Germany),

Συνθετικό πεπτίδιο QEATRPRTAAANGLMQTSKL (Dr S. Schultz, Germany),

Αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη (Vector Laboratories, USA)

Μικροσκόπιο συνεστίασης Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

Tris-HCl (Sigma, USA)

NaCl (Sigma, USA)

NGS, normal goat serum (Gibco-BRL Life Technologies, UK)

Triton X-100 (Sigma, USA)

DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Vector Laboratories, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα TBS (0.1M Tris-HCl, και 0.9% NaCl, pH 7.4)

2% παραφορμαλδεΐδη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) 0.1M.

Υλικό κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium, Vectashield[®], Vector Laboratories, USA)

Μέθοδοι

Μονιμοποίηση των κυττάρων

Τα κύτταρα D407 καλλιεγήθηκαν σε chamber slides των 8 οπών και σε αρχική συγκέντρωση 6X10⁴ κύτταρα ανά οπή. Αφού αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε 50-70% της επιφάνειας έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και ακολούθησε επώαση για μία ώρα. Το θρεπτικό υλικό στη συνέχεια αφαιρέθηκε και τα κύτταρα αφέθηκαν για μισή ώρα με διάλυμα 2% παραφορμαλδεΐδης.

Ανοσοφθορισμός

Για τη μελέτη της ανοσοδραστικότητας των υποδοχέων της σωματοστατίνης sst₁₋₅ στα κύτταρα D407 χρησιμοποιήθηκαν ανεπτυγμένα σε κουνέλι, πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια στο καρβοξυ- τελικού άκρου των υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα, σε συγκέντρωση 2.5µg/ml:

- hsst₁ : CRNGTCTSRITTL [αμινοξέα 382-391]
- hsst_{2A} ETQRTLLNGDLQTSI [αμινοξέα 355-369]
- hsst_{2B} FRNNKNRKK [αμινοξέα 348-356]
- hsst₃ CQERPPSRVA [αμινοξέα 384-393]
- hsst₄ CQQEALQPEPGRKRIPLTRTTTF [αμινοξέα 366-388]
- hsst₅ QEATRPRTAAANGLMQTSKL [αμινοξέα 345-364]

Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε διάλυμα 0.1M TBS το οποίο περιείχε 3.3% φυσιολογικό ορό αίγας (NGS, normal goat serum) για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμευσης των αντισωμάτων.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επώαστηκαν, για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με το πρώτο αντίσωμα το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα 0.1M TBS το οποίο περιείχε 0.5% NGS και 0.3% Triton X-100.

Μετά από αυτό, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 0.1M TBS και επώαστηκαν για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη σε συγκέντρωση 1:150.

Τα κύτταρα αφού ξεπλύθηκαν με TBS, καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου συνεστίασης.

Δείκτης χρώσης του πυρήνα

Προκειμένου να γίνει ορατή η χρώση του πυρήνα τα κύτταρα επώαστηκαν επί 5 λεπτά με την χρωστική DAPI (6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride 4µg/ml σε 0.1M TBS).

Έλεγχος της ειδικότητας των αντισωμάτων κατά των υποδοχέων σωματοστατίνης

Η ειδική δέσμευση των αντισωμάτων κατά των σωματοστατινεργικών υποδοχέων sst_{2B} και sst₅ ελέγχθηκε με προεπώαση των αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους για τα πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα

αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνθετικά πεπτίδια αντίστοιχα του καρβόξυ-τελικού άκρου των υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης το οποίο αποτέλεσε και τον επίτοπο στόχο των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10μg/ml τα πεπτίδια:

- sst_{2B} [FRNNKNRKK, αμινοξέα 348-356]
- sst₅ [QEATRPRTAAANGLMQTSKL, αμινοξέα 345-364]

Μικροσκοπία

Τα παρασκευάσματα των μελετών ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο συνεστίασης [συνεστιακό μικροσκόπιο laser, Leica DM RE (Leica,), (He/Ne laser) με φακό Plan Fluotar x 40/1.00 και ελαιοκαταδυτικό φακό Plan Apo x 63 / 1.32]. Η ρύθμιση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Adobe Photoshop 5.0.

4.9 Ιστοχημική χρώση NADPH-διαφοράσης

Υλικά -Συσκευές

Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων – Chamber Slides (Nunc, USA)

Παραφορμαλδεύδη PFA (Merck, Germany)

Οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss, Germany)

Tris-HCl (Sigma, USA)

NaCl (Sigma, USA)

β-NADPH (Sigma, USA)

Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma, USA)

Malic Acid (Sigma, USA)

Triton X-100 (Sigma, USA)

Αιθανόλη (Sigma, USA)

Ξυλόλη (Sigma, USA)

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) (Sigma, USA)

Διάλυμα TBS (0.1M Tris-HCl, και 0.9% NaCl, pH 7.4)

Διάλυμα 0.8mM β-NADPH, 1mM NBT, 10mM μηλικό οξύ και 1.5% Triton X-100 σε 0.1M Tris-HCl pH 7.4

2% παραφορμαλδεΐδη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) 0.1M.

Διάλυματα αιθανόλης σε νερό 75, 95 και 100%

Υλικό κάλυψης (Edellan[®] neu, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

Μέθοδοι

Μονιμοποίηση των κυττάρων

Τα κύτταρα D407 καλλιεργούνται σε chamber slides των 8 οπών και σε αρχική συγκέντρωση 6×10^4 κύτταρα ανά οπή. Αφού αναπτυχθούν σε 50-70% της επιφάνειας αλλάζεται το θρεπτικό υλικό και τίθενται σε νέο θρεπτικό υλικό για μία ώρα. Η μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε όπως και στην περίπτωση των μελετών ανοσοφθορισμού.

Αντίδραση NADPH-διαφοράσης

Για να διαπιστωθεί αν τα D407 συνθέτουν την ελεύθερη ρίζα του οξειδίου του αζώτου (NO[•]) εφαρμόστηκε η ιστοχημική μέθοδος ανίχνευσης του ενζύμου διαφοράση του φωσφορικού-β-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH-διαφοράση). Η NADPH-διαφοράση ταυτίζεται με το βιοσυνθετικό ένζυμο της NO[•], συνθετάση της NO[•] (NOS). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες αυτές αποτελεί μια ελαφρώς τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου του Kowall και των συνεργατών του (Kowall *et al.*, 1985) και στηρίζεται στη μετατροπή του εξωγενούς υποστρώματος μπλέ του νιτροτετραζολίου (NBT, Nitro Blue Tetrazolium) σε έγχρωμο ίζημα παρουσία β-NADPH (Εικόνα 4-1).

Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν αρχικά 2 φορές επί δέκα λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα PB σε θερμοκρασία δωματίου και 3 φορές επί 10 λεπτά σε διάλυμα 0.1M Tris-HCl pH 7.4 στους 37°C. Ακολούθησε επώαση τους επί μιάμιση ώρα στους 37°C και σε 0.1M Tris-HCl pH 7.4 το οποίο περιείχε 0.8mM β-NADPH, 1mM NBT, 10mM μηλικό οξύ και 1.5% Triton X-100.

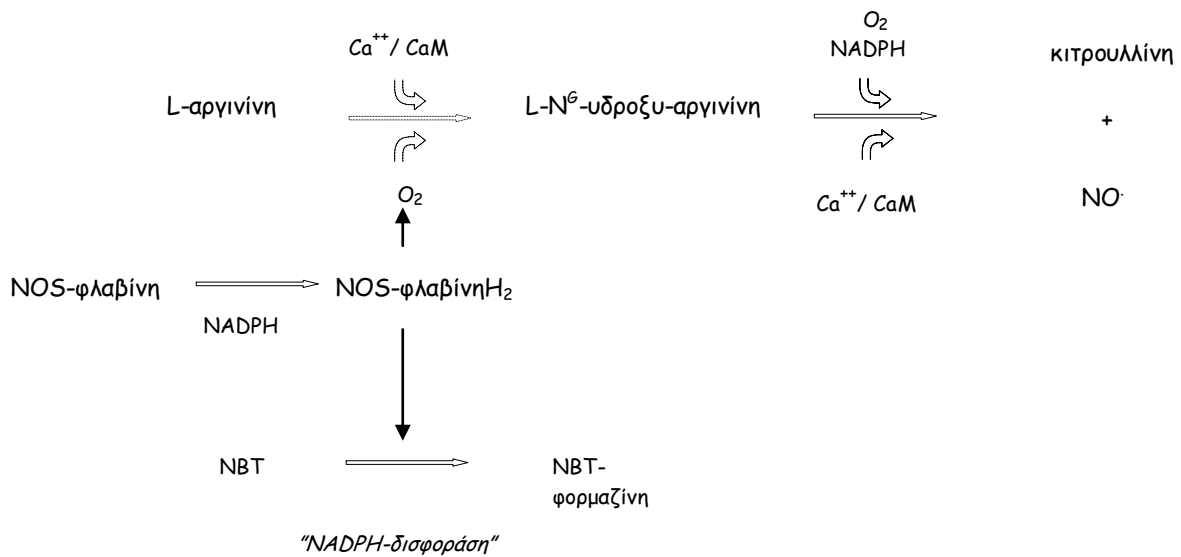
Τέλος, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και πάλι τρεις φορές επί 10min με 0.1M Tris-HCl στους 37°C και αφέθηκαν για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 16 ώρες.

Ακολούθησε αφυδάτωση των κυττάρων με εμβύθιση τους δύο φορές επί 2min σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (75, 95 και 100%) και ξυλόλη.

Τέλος τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με TBS και καλύφθηκαν με υλικό επικάλυψης.

Μικροσκοπία

Τα παρασκευάσματα των ιστοχημικών μελετών παρατηρήθηκαν σε συμβατικό μικροσκόπιο [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75 και ελαιοκαταδυτικό φακό Plan-Neofluar x100/1.3]. Η ρύθμιση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Adobe Photoshop 5.0.



Εικόνα 4-1: Αντίδραση NADPH-διαφοράσης

Η συνθέταση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) αρχικά δέχεται ηλεκτρόνια από το NADPH ανεξάρτητα από την παρουσία L-αργινίνης και Ca⁺⁺/καλμοδουλίνης (Ca⁺⁺/CaM). Η αναγμένη μορφή της NOS οξειδώνεται και πάλι παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων όπως το μπλέ του νιτροτετραζολίου (NBT) (αντίδραση NADPH-διαφοράσης). Παρουσία Ca⁺⁺, CaM και μοριακού οξυγόνου η αναγμένη μορφή της NOS υδροξυλιώνει την L-αργινίνη η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται από τη NOS σε κιτρουλλίνη και NO. Δανεισμένο από A, Βασιλάκη: «Μοριακή προσέγγιση των υποδοχέων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή» Διατριβή επί διδακτορία Ηράκλειο 2001.

4.10 Μελέτη της παραγωγής μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα D407

Υλικά και συσκευές

SRIF-14 (Bachem Bioscience)
CH275 (δώρο από τον Dr J. Epelbaum, Paris, France)
MK-678 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)
L-796778 (δώρο από τον Dr J. Epelbaum, Paris, France)
L-809087 (δώρο από τον Dr J. Epelbaum, Paris, France)
L-817,818 (δώρο από τον Dr J. Epelbaum, Paris, France)
HEPES (Sigma, USA)
FAD (Sigma, USA)
NADPH (Sigma, USA)
Νιτρική αναγωγάση (Nitrate reductase) (Sigma, USA)
LDH (Sigma, USA)
πυρροβικό οξύ (Sigma, USA)
Sulfanilamide (Sigma, USA)
N-1-naphthyl-ethylen-diamine (Sigma, USA)
H₃PO₄ (Merck, Germany)
NaNO₂ (Sigma, USA)
Πλάκες καλλιέργειών 24 οπών (Nunc, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα Griess (1% Sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthyl-ethylen-diamine, 2.5% H₃PO₄, σε απιονισμένο νερό)
Φασματοφωτόμετρο ELX 800 (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA)

Μέθοδος

Κύτταρα D407 (γενιές 116-118) καλλιεργήθηκαν σε ειδικές πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 οπών επί 2-4 ημέρες ως την χρήση τους. Τα κύτταρα επώαστηκαν επί 20 min με ή χωρίς σωματοστατίνη (SRIF-14) ή με τα εκλεκτικά για τους υποδοχείς της ανάλογα και ειδικότερα τα: CH 275 (sst₁), MK 678 (sst₂), L-796778 (sst₃), L-809087 (sst₄) και L,817,818 (sst₅) σε συγκεντρώσεις από 10⁻⁵ ως 10⁻¹⁰M.

Η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα D407 μελετήθηκε στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών, όπου το σύνολο (NOx) των νιτρικών (NO₃⁻) και νιτρώδων (NO₂⁻) ιόντων, που αντιπροσωπεύουν τους τελικούς μεταβολίτες του NO, μετρήθηκε με φωτομετρική μέθοδο βασισμένη σε μια τροποποίηση της αντίδρασης Griess (Grisham *et al.*, 1996).

Συγκεκριμένα, 50 μl δείγματος επωάζονται για 30 λεπτά στους 37⁰C, παρουσία 50 mM HEPES, 5 μM FAD, 0.1 mM NADPH και 0,2 U/ml Νιτρικής αναγωγάσης (Nitrate reductase) σε τελικό όγκο 250μL, έτσι ώστε να μετατραπούν τα νιτρικά ιόντα σε νιτρώδη (που είναι και τα ιόντα που ανίχνευει η αντίδραση Griess).

Στην συνέχεια προστίθενται 50 μL διαλύματος 81 U/ml LDH και 50 μL διαλύματος 54 mM πυρουβικού οξέος για την πλήρη οξείδωση του NADPH (η παρουσία NADPH αναστέλλει την αντίδραση Griess) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 37⁰C.

Η τελική προσθήκη 300 μl διαλύματος Griess οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη λαμπερού ιώδους χρώματος.

Η απορρόφηση του τελικού προϊόντος της αντίδρασης ανιχνεύεται σε μήκος κύματος 545 ή 550 nm με φασματοφωτόμετρο.

Η τελική συγκέντρωση NOx υπολογίζεται σε κάθε πείραμα με βάση πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται από διαδοχικές αραιώσεις NaNO₂ (6,25-400 μM NaNO₂). Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου παρασκευάστηκαν μεμβράνες των κυττάρων D407 με επίδραση με οξεϊκό οξύ και ομογενοποίηση των κυττάρων. Στο ομογενοποίημα έγινε προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Οι μετρήσεις ανάγονται σε συγκέντρωση NOx ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης.

4.11 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων D407 με την τεχνική μεταβολισμού του MTT

Υλικά - Συσκευές

Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)

SRIF-14 (Bachem Bioscience)

BIM 23014 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-797,591 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-779,976 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-796,778 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-803,087 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-817,818 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

MTT thiazol blue [3(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma USA) Columbia

Προπανόλη 1 (Lab-Scan Analytical Sciences, Ireland)

Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

Διαλύματα

Διάλυμα MTT σε high glucose DMEM 5mg/ml: Το MTT διαλύθηκε σε high glucose DMEM και διηθήθηκε έτσι ώστε να αποστειρωθεί.

Μέθοδος

Πρόκειται για μία μέθοδο η οποία βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων να ανάγουν το άλας του τετραζολίου σε αδιάλυτη φορμαζάνη με την βοήθεια της NADH και NADPH αναγωγής (Mosmann, 1983). Έτσι, το κίτρινο χρώμα του τετραζολίου μετατρέπεται σε μπλε κρυστάλλους φορμαζάνης οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους δίνουν ένα μπλε-μοβ χρώμα το οποίο μετράται σε φωτόμετρο ELISA. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων και άρα και η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας και συνεπώς του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Με τη μέθοδο λοιπόν αυτή γίνεται προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και της κυτταροτοξικότητας διαφόρων ουσιών.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα D407 (γενιές 123-127) καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 οπών σε μια αρχική πυκνότητα 2×10^4 κυττάρων/ οπή. Όλες οι ουσίες προστέθηκαν μια ημέρα μετά από την έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων (που θεωρήθηκε η ημέρα 0), προκειμένου να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη πρόσκλιση των κυττάρων στις πλάκες στην αρχή των πειραμάτων.

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με ή χωρίς SRIF-14 ή τα ειδικά για τους υποδοχείς της ανάλογα και συγκεκριμένα τα: L797,591 (sst₁), L779,976 (sst₂), BIM 23014 (sst₂ and sst₅), L796,778 (sst₃), L803,087 (sst₄) και L817,818 (sst₅) σε συγκεντρώσεις από 10^{-14} ως 10^{-4} και με θρεπτικό υλικό που περιείχε μείγμα από αναστολείς πρωτεασών (Aprotinin 0.5μg/ml, Leupeptin 1 μg/ml and PMSF 0.1mM).

Την ημέρα της μέτρησης αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν σε κάθε οπή 0,5 ml διαλύματος MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml και οι πλάκες τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 2 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μπλε κρύσταλλοι μόνο στα ζωντανά κύτταρα. Μετά το τέλος της επώασης σε κάθε οπή προστέθηκαν 100μL προπανόλης-1, και αναδεύτηκαν καλά ώστε να διαλυθούν όλοι οι κρύσταλλοι που είχαν σχηματιστεί.

Ακολούθησε η μέτρηση του χρώματος (optical density, OD) σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 620nm. Η μέτρηση πρέπει να γίνει μέσα σε διάστημα 1 ώρας από την στιγμή πρόσθεσης της προπανόλης-1, διάστημα κατά το οποίο το χρώμα παραμένει σταθερό.

Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και σε τετραπλέτες.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) από τα δείγματα κυττάρων στα οποία είχε γίνει επίδραση με τις προς μελέτη ουσίες διαιρούνταν με τον μέσο όρο της OD των δειγμάτων από κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση (μάρτυρες-control) κατά τον τύπο:

$$\text{Τιμή.ΜΤΤ} = \frac{\text{OD.δείγματος}}{\text{Μέση.τιμή.OD.μαρτύρων}} \times 100$$

Η τιμή που προκύπτει από τον τύπο αντιστοιχεί στο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων μετά από την επίδραση των υπό μελέτη ουσιών σε σχέση με τα κύτταρα - μάρτυρες.

4.12 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην απόπτωση των κυττάρων D407 με την τεχνική APO Percentage

Υλικά - Συσκευές

Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)

SRIF-14 (Bachem Bioscience)

BIM 23014 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-797,591 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-779,976 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-796,778 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-803,087 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-817,818 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

APOPercentage Apoptosis Assay kit (Biocolor, Newtownabbey, Northern Ireland)

Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

Διαλύματα

Διάλυμα χρωστικής APOPercentage σε πλήρες θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιιεργειών και σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml.

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Sigma, USA)

Διαλύτης χρωστικής APOPercentage (Biocolor, Newtownabbey, Northern Ireland)

Μέθοδος

Η διαδικασία της απόπτωσης διαρκεί 2-4 ώρες στην διάρκεια των οποίων ένα φαινομενικά ζωντανό κύτταρο διαλύεται σιωπηρά και εξαφανίζεται χωρίς να αφήσει ίχνη. Η κυτταρική απόπτωση αποτελεί μια αλληλουχία γεγονότων που περιλαμβάνει και αλλαγές στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης.

Στα ζωντανά κύτταρα η κυτταρική μεμβράνη αποτελεί ένα μωσαϊκό από πρωτεΐνες, χοληστερόλη και φωσφολιπίδια. Τα τελευταία διατάσσονται με την μορφή διπλοστιβάδας όπου η έσω στιβάδα έχει διαφορετική σύνθεση από την έσω. Συγκεκριμένα, η έξω στιβάδα αποτελείται από φωσφολιπίδια που περιέχουν χολίνη (όπως φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη) ενώ η έσω στιβάδα αποτελείται από φωσφατιδυλ- αιθανολαμίνη και φωσφατιδυλσερίνη. Η ασύμμετρη αυτή διάταξη των φωσφολιπιδίων είναι ουσιώδης για

την διατήρηση των λειτουργιών της μεμβράνης του ζωντανού κυττάρου όπως είναι η ανταλλαγή ουσιών και η δημιουργία διαφορετικών συγκεντρώσεων ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο. Κατά την διαδικασία της απόπτωσης και με την ενεργοποίηση ειδικών ενζύμων (florrase) και απενεργοποίηση άλλων (flippases) διαταράσσεται η διάταξη των φωσφολιπιδίων μεταξύ της έσω και έξω στιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης (μηχανισμός flip-flop) (Zhou *et al.*, 1997). Η εμφάνιση της φωσφατιδυλσερίνης στην έξω στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης σηματοδοτεί την έναρξη της τελικής (εκτελεστικής) φάσης στην διαδικασία της απόπτωσης.

Η εμφάνιση της φωσφατιδυλσερίνης στην έξω στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέπει επίσης την πρόσληψη της χρωστικής APOPercentage από το κύτταρο. Η πρόσληψη αυτή ξεκινά μόνο αφού έχει ολοκληρωθεί ο μηχανισμός flip-flop, είναι μονόδρομη, οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της χρωστικής στο εσωτερικό του κυττάρου και τερματίζεται μόνο όταν το κύτταρο μεταπέσει στο στάδιο της φυσαλίδας (bleb). Από εκεί και ύστερα η χρωστική παραμένει μέσα στο νεκρό κύτταρο.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα D407 (γενιές 123-127) καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 οπών σε μια αρχική πυκνότητα 2×10^4 κυττάρων / οπή. Όλες οι ουσίες προστέθηκαν μια ημέρα μετά από την έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων (που θεωρήθηκε η ημέρα 0), προκειμένου να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη πρόσκληση των κυττάρων στις πλάκες στην αρχή των πειραμάτων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με ή χωρίς SRIF-14 ή τα ειδικά για τους υποδοχείς της ανάλογα και συγκεκριμένα τα: L797,591 (sst₁), L779,976 (sst₂), BIM 23014 (sst₂ and sst₅), L796,778 (sst₃), L803,087 (sst₄) και L817,818 (sst₅) σε συγκεντρώσεις από 10^{-14} ως 10^{-4} και με θρεπτικό υλικό που περιείχε μείγμα από αναστολείς πρωτεασών (Aprotinin 0.5μg/ml, Leupeptin 1 μg/ml and PMSF 0.1mM).

Την ημέρα της μέτρησης αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και σε κάθε οπή προστέθηκαν 0,1 ml διαλύματος χρωστικής APOPercentage σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml και οι πλάκες τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 1 ώρα. Κατά τη διάρκεια της επώασης η χρωστική προσλαμβάνεται μόνο από τα κύτταρα που βρίσκονται στην τελική φάση απόπτωσης και όχι από τα ήδη νεκρά κύτταρα. Μετά το τέλος της επώασης η πλάκες φυγοκεντρήθηκαν στα 3.500g επί 5min. Ακολούθησε δύο φορές ξέπλυμα με PBS (200μL/οπή) με ενδιάμεση φυγοκεντρήση στα 3.500g επί 5min. Αφού οι πλάκες φυγοκεντρήθηκαν μία ακόμη φορά (3.500g επί 5min), αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν σε κάθε οπή 100μL διαλύτη της χρωστικής APOPercentage.

Ακολούθησε ήπια ανάδευση επί 10min και η μέτρηση της απορρόφησης (A_{540}) σε φωτόμετρο ELISA και σε μήκος κύματος 540nm.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι τιμές απορρόφησης (A_{540}) από τα δείγματα κυττάρων στα οποία είχε γίνει επίδραση με τις προς μελέτη ουσίες διαιρούνταν με τον μέσο όρο της A_{540} των δειγμάτων από κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση (μάρτυρες-control) κατά τον τύπο:

$$\text{Τιμή } A_{540} = \frac{A_{540} \text{ δείγματος}}{\text{Μέση τιμή } A_{540} \text{ μαρτύρων}} \times 100$$

Η τιμή που προκύπτει από τον τύπο αντιστοιχεί στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης μετά από την επίδραση των υπό μελέτη ουσιών σε σχέση με τα κύτταρα - μάρτυρες.

4.13 Μελέτη της τοξικότητας της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων στα κύτταρα D407 με την τεχνική χρώσης με trypan blue

Υλικά - Συσκευές

Μικροπλάκες ELISA επίπεδου πυθμένα (Corning & Costar, USA)

SRIF-14 (Bachem Bioscience)

BIM 23014 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-797,591 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-779,976 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-796,778 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-803,087 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

L-817,818 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA)

Χρωστική Trypan-blue (Seromed Biochrom, Germany)

Ανοδικό μικροσκόπιο και Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer

Διαλύματα

Διάλυμα χρωστικής Trypan-blue water for injection και σε τελική συγκέντρωση 10%.

Μέθοδος

Η μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής trypan blue (trypan blue exclusion method), χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Όταν η χρωστική trypan blue αναμιχθεί με ορισμένο όγκο κυττάρων δεν προσλαμβάνεται από τα ζωντανά κύτταρα που έχουν ακέραιη την κυτταρική μεμβράνη, ενώ τα νεκρά κύτταρα των οποίων η μεμβράνη είναι διαπερατή στην χρωστική χρωματίζονται σκούρα μπλε. Στην συνέχεια μετράται στο μικροσκόπιο με την χρήση πλάκας αιματοκυτταρομετρητή ο αριθμός των χρωματισμένων και μη κυττάρων και υπολογίζεται η % βιωσιμότητα των κυττάρων.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα D407 (γενιές 122-125) καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 οπών σε μια αρχική πυκνότητα 5×10^4 κυττάρων / οπή. Όλες οι ουσίες προστέθηκαν μια ημέρα μετά από την έναρξη της καλλιέργειας των κυττάρων (που θεωρήθηκε η ημέρα 0), προκειμένου να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη πρόσκλιση των κυττάρων στις πλάκες στην αρχή των πειραμάτων. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με ή χωρίς SRIF-14 ή τα ειδικά για τους υποδοχείς της ανάλογα και συγκεκριμένα τα: L797,591 (sst₁), L779,976 (sst₂), BIM 23014 (sst₂ and sst₅), L796,778 (sst₃), L803,087 (sst₄) και L817,818 (sst₅) σε συγκεντρώσεις από 10^{-12} ως 10^{-4} και με θρεπτικό υλικό που περιείχε μείγμα από αναστολείς πρωτεασών (Aprotinin 0.5μg/ml, Leupeptin 1 μg/ml and PMSF 0.1mM).

Την ημέρα της μέτρησης αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και συλλέχθηκε σε σωληνάρια erpendorf (ένα για κάθε οπή). Τα κύτταρα από κάθε οπή αποκολλήθηκαν με την προσθήκη 50μL διαλύματος τρυψίνης-EDTA 0.1%. Μετά από ήπια ανάδευση, 90μL από το περιεχόμενο του κάθε σωληναρίου αναμίχθηκαν ταχέως με 10μL διαλύματος trypan blue 10%. Τα χρωματισμένα και μη κύτταρα από κάθε οπή μετρήθηκαν σε πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer με ανοδικό μικροσκόπιο ορατού φωτός.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Το ποσοστό % των ζωντανών κυττάρων υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{Ζωντανά.κύτταρα(\%)} = \frac{\text{Μη.χρωματισμένα.κύτταρα}}{\text{Χρωματισμένα} + \text{Μη.χρωματισμένα.κύτταρα}} \times 100$$

Όλα τα πειράματα έγιναν σε τριπλέτες και επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

4.14 Ανίχνευση των υποδοχέων της σωματοστατίνης και της SHP1 στα κύτταρα D407 με την τεχνική της ανοσοαποτύωσης (immunoblot)

Υλικά και συσκευές

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose membranes 0.45µm, Sigma, ΗΠΑ)

Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (Regilait, Nestle)

Tween-20

Sodium Dodesyl Sulphate (SDS, Sigma, ΗΠΑ)

Tris-HCl (Sigma, ΗΠΑ)

Γλυκερόλη (Sigma, ΗΠΑ)

Κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, ΗΠΑ)

Μερκαπτοαιθανόλη (Sigma, ΗΠΑ)

Ακρυλαμίδα (Sigma, ΗΠΑ)

Μεθυλενο-δισ ακρυλαμίδα (Sigma, ΗΠΑ)

Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS, ammonium persulfate, Sigma, ΗΠΑ)

Αντίσωμα ειδικό για την SHP1 (Chemicon International, Inc, ΗΠΑ)

Πολυκλωνικά αντισώματα ανεπτυγμένα σε κουνέλι ενάντια στο καρβοξυ- τελικό άκρο των sst₁, sst_{2A}, sst_{2B}, sst₃₋₅ υποδοχέων (Dr S. Schultz, Germany),

Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση του ραπανιού (*Vector Laboratories, H.P.A.*)

N, N, N, N-τετραμεθυλ-διαμίδιο (TEMED, N, N, N, N-tetramethyle diamide, Sigma, ΗΠΑ)

Λουμινόλη (Luminol, Chemiluminescence Reagent *Plus*, Chemicon International, Temecula, CA)

Φωτογραφικό φιλμ (ECL, Hyperfilm, Amersham).

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος: 62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 5% γλυκερόλη, 0.001% κυανό της βρωμοφαινόλης και 10% μερκαπτοαιθανόλη.

Πηκτή επιστίβαξης : 5.1% διαλύματος (30% ακρυλαμίδης και 0.825% N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης), 130mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% υπερθεϊκό αμμώνιο, 0.1% TEMED.

Πηκτή διαχωρισμού: 12% ακρυλαμίδα, 375mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.04% TEMED.

5% (w/v) γάλακτος σε PBS + 0.1% (v/v) Tween-20

2.5% γάλακτος σε PBS + 0.1% Tween-20

Μέθοδοι

Η ανίχνευση της τυροσινοφωσφατάσης SHP1 και των ssts στα κύτταρα D407 έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot) και τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

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

Η ηλεκτροφόρηση των μεμβρανικών παρασκευασμάτων των D407 έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, (SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) σύμφωνα με τον Laemmli (Laemmli, 1970). Ως μέσο υποστήριξης χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου, κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με τον λογάριθμο της μάζας τους.

Το μίγμα των πρωτεϊνών των κυττάρων D407 (50-100 μg) διαλύθηκε πρώτα σε διάλυμα δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS, Sodium Dodesyl Sulphate), ενός απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης ενώ τα ανιόντα του δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών γεγονός που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης.

Στα μεμβρανικά παρασκευάσματα των κυττάρων D407 και εγκεφαλικού φλοιού αρουραίου (θετικός μάρτυρας) προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος. Τα δείγματα έβρασαν σε υδατόλουτρο για 3-4 λεπτά στους 100°C για την μετουσίωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος επιστιβάξης. Η σύσταση της πηκτής διαχωρισμού ήταν η κατάλληλη για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού βάρους 16-98 kD. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με

σταθερή τάση 800mV αρχικά και 1500mV μετά το πέρασμα του μετώπου των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου μεταφέρθηκαν με αποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος εντάσεως 300mA επί 12 ώρες, στους 4°C . Για την κάλυψη των υπολειπόμενων θέσεων δέσμησης (residual binding sites), η μεμβράνη επώαστηκε επί 2 ώρες σε διάλυμα 5% (w/v) γάλακτος and 0.1% (v/v) Tween-20. Έπειτα ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με το ειδικό για την φωσφατάση της τυροσίνης SHP1 αντίσωμα (1:1.500) σε διάλυμα 2.5% γάλακτος σε PBS + 0.1% Tween-20 επί 12 ώρες, στους 4°C.

Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύθηκε με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο αντίσωμα το οποίο ήταν συναρμοσμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση ραπανιού (HRP: horseradish peroxidase) [πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με HRP (1:3000)].

Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ανιχνεύθηκε με την τεχνική της χημειοφωταύγειας και την προσθήκη, ως υπόστρωμα του ενζύμου λουμινόλης, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός το οποίο αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ.

Στατιστική Ανάλυση

Οι τιμές των αποτελεσμάτων των πειραμάτων εκφράζονται ως η μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. Η στατιστική επεξεργασία περιελάμβανε τις μεθόδους: oneway-ANOVA και Student-t test για ανεξάρτητες μεταβλητές. Διαφορές τιμών που ελέγχθηκαν με τις παραπάνω μεθόδους με $p < 0,05$ θεωρήθηκε ότι διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Microsoft® Excel version 2002 και GraphPad Prism version 2.01

II. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μελέτη της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της χρήσης λανρεοτίδης (BIM 23014 |) σε ασθενείς με χοριοειδική νεοαγγείωση που οφείλεται σε εκφύλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία.

Ασθενείς

Οι ασθενείς προήλθαν από το τμήμα παθήσεων του αμφιβληστροειδούς της οφθαλμολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και η μελέτη σχεδιάστηκε σύμφωνα με την διακήρυξη του Ελσίνκι την σχετική με την διεξαγωγή κλινικών ερευνών (World Medical Association 1989, www.wma.net) και εγκρίθηκε από την επιτροπή Ηθικών Θεμάτων του Νοσοκομείου. Όλοι οι ασθενείς ενημερώθηκαν προφορικά και υπέγραψαν έγγραφη συγκατάθεση πριν την είσοδο τους στην μελέτη.

Κατάλληλοι για να συμπεριληφθούν στην μελέτη κρίθηκαν οι ασθενείς που πληρούσαν όλα τα παρακάτω κριτήρια: κλινική εικόνα χοριοειδικής νεοαγγείωσης (XNA) που σχετίζεται με την ηλικία, καλύτερη οπτική οξύτητα με διόρθωση ίση ή μεγαλύτερη από 20/800 κατά την είσοδο τους στην μελέτη, νεοαγγειακή μεμβράνη που επεκτείνονταν και στο κεντρικό βοθρίο της ωχράς και χαρακτηρίστηκε με βάση την φλουροαγγειογραφία ως κρύφια, κλασσική ή μεικτή, σύμφωνα με τα κριτήρια της ομάδας για την μελέτη της φωτοπηξίας της ωχράς (MPS, 1991).

Από την μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς μικρότεροι των 50 ετών, όσοι αδυνατούσαν να κατανοήσουν το περιεχόμενο και να υπογράψουν το έγγραφο συγκατάθεσης καθώς και ασθενείς με ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη, νόσου του γαστρεντερικού, ηπατικής ή νεφρικής ανεπάρκειας. Επίσης αποκλείστηκαν όσοι ασθενείς πληρούσαν στον υπό μελέτη οφθαλμό μία τουλάχιστον από τις παρακάτω συνθήκες: προηγούμενη φωτοπηξία με laser για την θεραπεία της XNA, οποιαδήποτε ενδοφθάλμια επέμβαση ή χρήση άλλων πειραματικών ουσιών για την θεραπεία της XNA τουλάχιστον 3 μήνες νωρίτερα και σοβαρή οφθαλμική νόσο που περιόριζε την όραση. Τέλος στην μελέτη δεν συμπεριλήφθηκαν ασθενείς στους οποίους για οποιονδήποτε λόγο ήταν αδύνατη η λήψη φωτογραφιών και φλουροαγγειογραφίας (συμπεριλαμβανομένης και της κακής ποιότητας περιφερικών φλεβών), με γνωστή αλλεργία στην φλουορεσκεΐνη και όσοι είχαν χρησιμοποιήσει στο παρελθόν σωματοστατίνη ή κάποιο από τα ανάλογα της για άλλη ένδειξη.

Είκοσι ασθενείς κατανεμήθηκαν τυχαία σε δύο ομάδες των 10. Στην ομάδα μελέτης οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία με λανρεοτιδίη ενώ στην ομάδα ελέγχου με placebo. Σε περιπτώσεις αμφοτερόπλευρης νόσου, μόνο ο ένας οφθαλμός (στον οποίο η ΧΝΑ είχε διαγνωστεί πιο πρόσφατα) από κάθε ασθενή συμπεριλήφθηκε στην μελέτη.

Οι ασθενείς της ομάδας μελέτης παρακολουθήθηκαν επί 12 μήνες (κατά τους 6 μήνες της θεραπείας και για 6 μήνες μετά) ενώ οι ασθενείς-μάρτυρες παρακολουθήθηκαν κατά τους 6 μήνες της θεραπείας.

Μέθοδοι

Παράμετροι που εξετάστηκαν

A. Διάθλαση και οπτική οξύτητα

Για την μέτρηση της οπτικής οξύτητας και την διάθλαση χρησιμοποιήθηκαν τα οπτότυπα ETDRS που καθιερώθηκαν από την μελέτη της πρώιμης θεραπείας της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας [Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)].

Η διάθλαση εξετάστηκε και για τους δύο οφθαλμούς του κάθε ασθενούς μία φορά κατά την αρχική εξέταση οπότε και καταγράφηκε η καλύτερη οπτική οξύτητα με διόρθωση (best spectacle corrected visual acuity, BSCVA). Η BSCVA μετρήθηκε ξανά στους 1, 3, 6, 7, 9 και 12 μήνες στους ασθενείς της ομάδας μελέτης και στους 1, 3, και 6 μήνες στους ασθενείς-μάρτυρες.

B. Φλουοροαγγειογραφία

Φλουοροαγγειογραφία (Φ.Α) πραγματοποιήθηκε κατά την είσοδο στην μελέτη και στους 1, 3, και 6 μήνες μετά. Οι ασθενείς της ομάδας μελέτης υποβλήθηκαν σε Φ.Α. έλεγχο και μετά την διακοπή της θεραπείας και συγκεκριμένα στους 7, 9 και 12 μήνες. Οι πρώιμη, μέση και όψιμη φάση κάθε εξέτασης χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση από τον υπολογιστή. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικά τροποποιημένο πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας συμβατό με τα windows (προσφορά του Καθηγητή κ. Μπάλα, Εργαστήριο Ιατρικής Απεικόνισης, ΙΤΕ).

Δύο έμπειροι αναγνώστες δούλεψαν ανεξάρτητα και ανέλυσαν τις εικόνες της Φ.Α. ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία: αρχικά η περιοχή της ΧΝΑ περιχαρακώθηκε με το χέρι και αφού αφαιρέθηκε ο φθορισμός του υποστρώματος, η ολική επιφάνεια και η μέση ένταση του υπολειπόμενου υπερφθορισμού υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα.

Εκτίμηση από Παθολόγο

Κάθε ασθενής πριν από την είσοδο στην μελέτη υποβλήθηκε σε λήψη πλήρους ιατρικού ιστορικού, εξέταση κατά συστήματα, ηλεκτροκαρδιογράφημα, υπέρηχο άνω κοιλίας για τον αποκλεισμό ύπαρξης νόσου των χοληφόρων, και σε βασικές εργαστηριακές εξετάσεις για τον αποκλεισμό αιματολογικής νεφρικής, ηπατικής ή άλλης συστηματικής νόσου.

Η λίστα των εργαστηριακών εξετάσεων περιελάμβανε:

1. Γενική αίματος
2. Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών
3. Μέτρηση στον ορό του αίματος των επιπέδων γλυκόζης, ουρίας κρεατινίνης, χοληστερόλης, λιποπρωτεϊνών (HDL και LDL), ηλεκτρολυτών, χολερυθρίνης, λευκώματος, αλκαλικής φωσφατάσης, γ-GT και των τρανσαμινασών (SGOT και SGPT).

Οι εργαστηριακές εξετάσεις επαναλαμβάνονταν κάθε μήνα στην διάρκεια του 6μηνου θεραπείας και στο τέλος του χρόνου παρακολούθησης καθώς επίσης και κατά περίπτωση σε ασθενείς που παρουσίασαν κάποια παρενέργεια από την θεραπεία.

Θεραπευτικό σχήμα

Στους ασθενείς της ομάδας μελέτης χορηγούσαμε μία ενδομυϊκή ένεση Λανρεοτίδης (Somatuline, IPSEN, France) κάθε 15 ημέρες για 6 μήνες συνολικά. Στους ασθενείς – μάρτυρες χορηγούσαμε από την ίδια οδό και με την ίδια συχνότητα και διάρκεια, διάλυμα water-for-injection (DEMO, Greece.). Οι ενέσεις γίνονταν με διαφορά τουλάχιστον 10 ημερών και όχι περισσότερο από 15 ημέρες η μία από την άλλη με σκοπό να διατηρηθούν τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα όσο το δυνατόν πιο σταθερά στην διάρκεια του 6μηνου της θεραπείας. Τόσο το διάλυμα λανρεοτίδης όσο και το placebo παρασκευάζονταν στο Φαρμακείο του Νοσοκομείου. Ελήφθησαν όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις ώστε οι ασθενείς να παραμείνουν «τυφλοί» ως προς το είδος του χορηγούμενου φαρμάκου.

Κριτήρια αποτελεσματικότητας

Ως κύρια παράμετρος αποτελεσματικότητας ορίστηκε η μεταβολή στην μέση οπτική οξύτητα (μετρούμενη σε κλίμακα Snellen) μεταξύ 0 και 6 μηνών.

Οι μεταβολές στις παραμέτρους της Φ.Α. στο ίδιο διάστημα ορίστηκαν ως δευτερεύουσες παράμετροι. Η επιφάνεια του υπερφθορισμού υπολογίστηκε στην μεσαία φάση της Φ.Α. και μετρήθηκε σε pixels. Η ένταση υπερφθορισμού υπολογίστηκε στην όψιμη φάση της Φ.Α. και μετρήθηκε από το πρόγραμμα σε αυθαίρετες μονάδες. Έγιναν συγκρίσεις των παραπάνω παραμέτρων ανάμεσα στις δύο ομάδες. Υπολογίστηκε επίσης η

μεταβολή στην οπτική οξύτητα και τις παραμέτρους της Φ.Α. από τους 6 στους 12 μήνες για την ομάδα μελέτης.

Λόγω του μικρού μεγέθους των δύο ομάδων δεν έγινε επιμέρους ανάλυση των υποομάδων. Η κύρια παράμετρος αποτελεσματικότητας ήταν η συχνότητα εμφάνισης παρενεργειών στην διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης.

Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των δύο ομάδων ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους έγινε με την χρήση της δοκιμασίας X^2 για τις ποιοτικές μεταβλητές και την μη παραμετρική δοκιμασία Mann – Whitney (U-test) για τις ποσοτικές μεταβλητές. Η δοκιμασία Mann – Whitney χρησιμοποιήθηκε επίσης για την αξιολόγηση της μεταβολής των παραμέτρων της μελέτης μεταξύ των δύο ομάδων στην διάρκεια του 6μήνου της θεραπείας καθώς και μέσα στην ομάδα μελέτης στην διάρκεια του 6μήνου που ακολούθησε την διακοπή της θεραπείας.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τα προγράμματα SPSS 8.0 για τα Windows (SPSS, Inc, Chicago IL, USA) και Origin 6.0 (Microcal TM Software, Inc, Northampton, MA, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

5.1. Προσδιορισμός της ύπαρξης σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στο ΜΕΑ

5.1.1 Ραδιοανοσοανίχνευση και μέτρηση των επιπέδων της σωματοστατίνης στα κύτταρα D407

Προηγούμενες αναφορές σχετικά με την ύπαρξη mRNA σωματοστατίνης-14 σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπου (van Hagen *et al.*, 2000) μας οδήγησαν στο να αναζητήσουμε την ύπαρξη σωματοστατίνης και στις καλλιέργειες κυττάρων D407. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόσαμε τη μέθοδο ραδιοανοσοανίχνευσης (RIA). Χρησιμοποιώντας το ειδικό για την σωματοστατίνη-14 αντίσωμα ανιχνεύσαμε μετρήσιμα επίπεδα σωματοστατίνης στις καλλιέργειες των κυττάρων D407 της τάξης των 0.56 ± 0.13 picomoles/mg πρωτεΐνης.

Συμπέρασμα:

Η παρουσία σωματοστατίνης στις καλλιέργειες των κυττάρων D407 αποδεικνύει ότι η σωματοστατίνη παράγεται από τα ίδια τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου. Διαμορφώνεται έτσι η υπόθεση ότι, η παραγόμενη από τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου σωματοστατίνη ενδέχεται να δρα με αυτοκρινικό τρόπο στο μελάγχρου επιθήλιο ή / και με παρακρινικό τρόπο στο γειτονικό αμφιβληστροειδή.

5.1.2 Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά D407

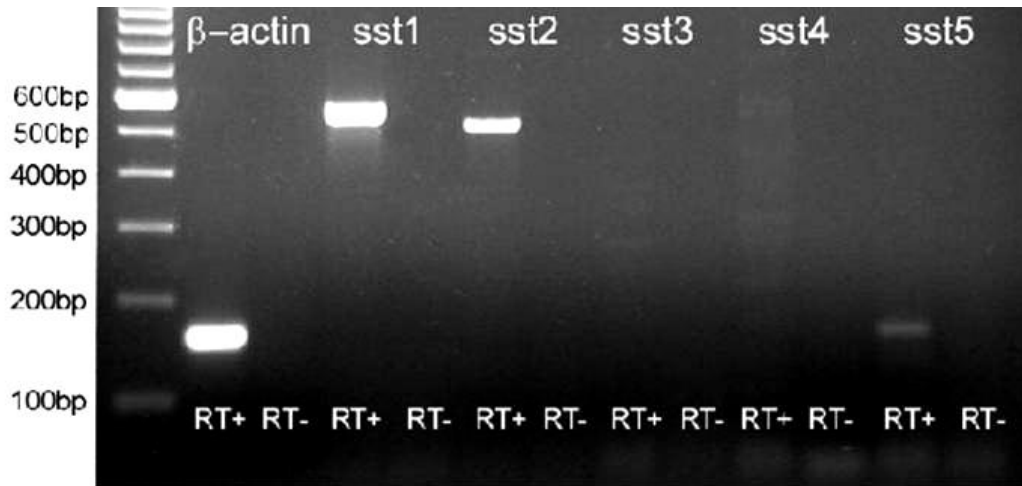
Η προηγούμενη υπόθεση που έγινε περί πιθανής επίδρασης της σωματοστατίνης στο μελάγχρουν επιθήλιο, προϋποθέτει την έκφραση και παραγωγή λειτουργικών υποδοχέων της σωματοστατίνης (sst_s) από τα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου. Για τον λόγο αυτό εκτελέσαμε αρχικά RT-PCR για την ανίχνευση mRNA των υποδοχέων sst_s. Με βάση τα αποτελέσματα της PCR, προχωρήσαμε σε περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας των sst_s στα κύτταρα D407 με μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε συνδυασμό με μικροσκοπία συνεστίασης, με μελέτες δέσμησης και ανοσοαποτύπωσης.

5.1.2.1 Ανίχνευση έκφρασης του mRNA των υποδοχέων σωματοστατίνης με RT-PCR.

Η ανίχνευση του mRNA των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 που βρίσκονταν σε ηρεμία και είχαν τεθεί σε στέρηση ορού εμβρύου βοός, έγινε με RT-PCR με ειδικούς primers (Πίνακας 4-1).

Με εξαίρεση τον sst₂, οι υποδοχείς σωματοστατίνης δεν έχουν ιντρόνια (Patel, 1999). Επομένως ο κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων λόγω επιμόλυνσης από γενωμικό DNA ήταν σημαντικός. Για τον λόγο αυτό, προηγήθηκε επεξεργασία των δειγμάτων με DNase για την αποδόμηση του DNA. Μελετήθηκαν τουλάχιστον 2 διαφορετικά δείγματα που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα οποία έγινε επεξεργασία απομόνωσης RNA και ανάστροφης μεταγραφής ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα σε όλα τα πειράματα. Παράλληλα εκτελέστηκε PCR με RNA στο οποίο δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή (αρνητικός δείκτης) με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης με γενωμικό DNA.

Ανιχνεύτηκε με RT-PCR γονιδιακό σήμα για τους υπότυπους υποδοχέων της σωματοστατίνης sst₁, sst₂ και sst₅, ενώ ανιχνεύτηκε πολύ μικρότερο το σήμα για τους υποτύπους sst₃ και sst₄ (Εικόνα 5-1). Δεν εμφανίστηκε σήμα σε κανένα από τα δείγματα στα οποία είχε γίνει επεξεργασία με DNάση αλλά δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή, επιβεβαιώνοντας την καθαρότητα των δειγμάτων και την απουσία επιμόλυνσης από γενωμικό DNA.



Εικόνα 5-1: Έκφραση mRNA των *ssts* στα κύτταρα D407. Τα κύτταρα του MEA εκφράζουν τους υποτύπους των υποδοχέων σωματοστατίνης *sst*₁, και *sst*₂ και σε μικρότερο βαθμό τους *sst*₅. Οι αρνητικοί δείκτες (RT-) ήταν συνέχεια αρνητικοί. Στην εικόνα φαίνεται ο φθορισμός των προϊόντων της PCR που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση και βαφεί με ethidium bromide. Οι ταινίες γονιδιακού σήματος ήταν ορατές στο υπεριώδες μήκος κύματος και η σύγκριση τους έγινε με βάση την κλίμακα μοριακού βάρους που απεικονίζεται αριστερά.

5.1.2.2 Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 με μικροσκοπία συνεστίασης και ανοσοφθορισμό.

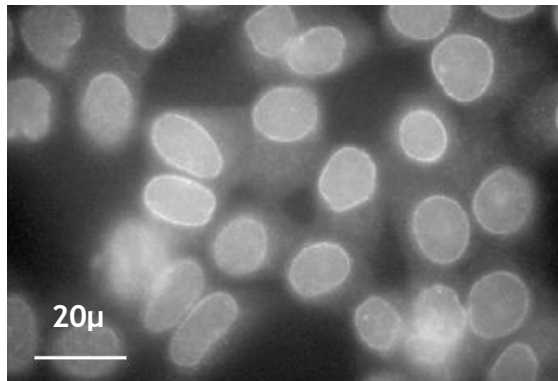
Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοφθορισμού με σκοπό την ανίχνευση των ίδιων των πρωτεϊνών των ssts, επειδή η έκφραση mRNA των υποδοχέων ssts από μόνη της δεν επαρκεί για την επιβεβαίωση της παρουσίας της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Επιπλέον η PCR δεν θα μπορούσε να διαχωρίσει μεταξύ των υποτύπων του υποδοχέα sst₂, αλλά και να δώσει πληροφορίες σχετικά με την θέση των υποδοχέων ssts μέσα στα κύτταρα.

Για τις μελέτες ανίχνευσης των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι των καρβοξυτελικών άκρων όλων των υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης (sst₁, sst_{2A}, sst_{2B}, sst₃, sst₄ και sst₅). Τα αντισώματα αυτά είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες για τον εντοπισμό των διαφόρων υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης σε όγκους ανθρώπινης προέλευσης. Η ειδική δέσμευση των αντισωμάτων κατά των σωματοστατινεργικών υποδοχέων sst_{2B} και sst₅ ελέγχθηκε με προεπάση των αντισωμάτων με αντιγόνα που αντιστοιχούν στους επιτόπους που είναι στόχοι των αντισωμάτων αυτών. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνθετικά πεπτίδια αντίστοιχα του καρβόξυ-τελικού άκρου των υποτύπων των υποδοχέων σωματοστατίνης sst_{2B} FRNNKNRKK (αμινοξέα 348-356) και sst₅ QEATRPRTAAANGLMQTSKL (αμινοξέα 345-364). Τα παρασκευάσματα των μελετών ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο συνεστίασης με το οποίο και ελήφθησαν οι εικόνες.

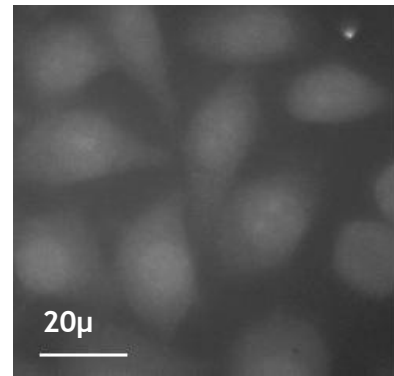
Οι μελέτες ανοσοφθορισμού επιβεβαίωσαν την παρουσία sst₂, και sst₅ ανοσοδραστικότητας στα κύτταρα D407. Ο sst₂ υποδοχέας αντιστοιχούσε στον υπότυπο sst_{2B}. Δεν επιβεβαιώθηκε η παρουσία του sst₁.

Ανίχνευση υποδοχέα sst_{2B}

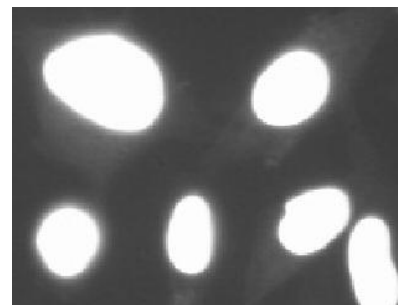
Ο sst_{2B} βρέθηκε γύρω και μέσα στον πυρήνα των κυττάρων D407. Το σήμα εξαφανιζόταν όταν το αντίσωμα προεπωάζονταν με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτίδιο (sst_{2B} FRNNKNRKK, αμινοξέα 348-356: 10 $\mu\text{g/ml}$). Η χρωστική DAPI (4 $\mu\text{g/ml}$) που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης του πυρήνα έδωσε παρόμοιο σήμα με το αντίσωμα sst_{2B} , επιβεβαιώνοντας έτσι την ενδοπυρηνική παρουσία του υποδοχέα. (Εικόνα 5-2).



A.

 sst_{2B} 

B.

 $sst_{2B}+\text{Ag}$ 

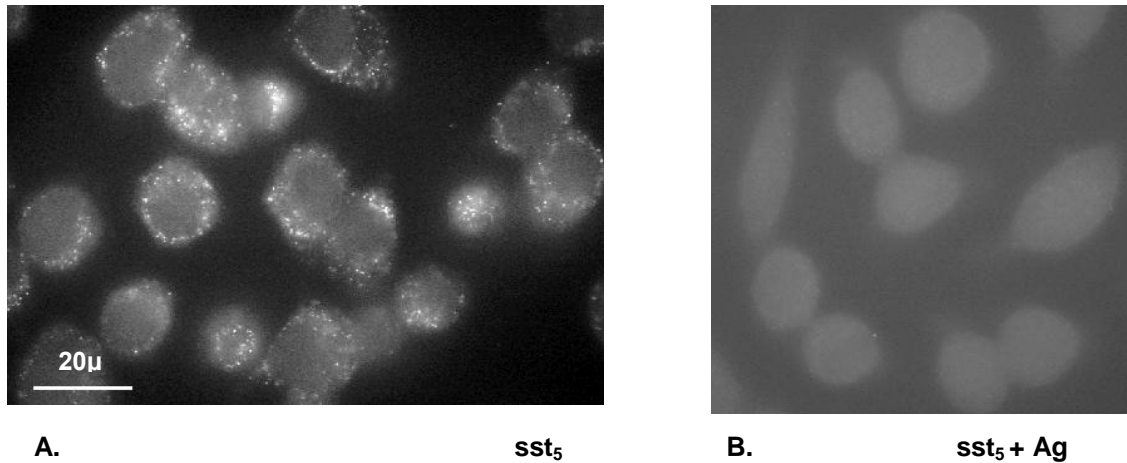
Γ.

DAPI

Εικόνα 5-2: Ανίχνευση των υποδοχέων sst_{2B} με ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία συνεστίασης στα κύτταρα D407. Το σήμα των sst_{2B} είναι ορατό στον πυρήνα των κυττάρων (A) και εξαφανίζεται όταν προηγηθεί επώαση με το ειδικό αντιγόνο (B). Η χρήση της χρωστικής DAPI που αποτελεί δείκτη του πυρήνα επιβεβαιώνει την παρουσία των sst_{2B} στον πυρήνα των D407 (Γ) Όλες οι εικόνες ελήφθησαν σε μεγέθυνση 40X

Ανίχνευση υποδοχέα sst_5

Το σήμα του sst_5 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των D407 με την μορφολογία στικτών σωματιδίων συσσώρευσης του αντιγόνου, δίχως να υπάρχει χρώση στην περιοχή του πυρήνα. Το σήμα εξαφανιζόταν όταν το αντίσωμα προεπωάζονταν με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτίδιο (sst_5 QEATRPRTAAANGLMQTSKL, αμινοξέα 345–364: 10 $\mu\text{g/ml}$) (Εικόνα 5-3).



Εικόνα 5-3: Ανίχνευση των υποδοχέων sst_5 με ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία συνεστίασης στα κύτταρα D407. Το σήμα των sst_5 είναι ορατό στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιμετρικά του πυρήνα (A) και εξαφανίζεται όταν προηγηθεί επώαση με το ειδικό αντιγόνο (B). Όλες οι εικόνες ελήφθησαν σε μεγέθυνση 40X.

5.1.2.3 Ανίχνευση των υποδοχέων ssts στις μεμβράνες των κυττάρων D407 με μελέτες δέσμησης.

Οι εικόνες του ανοσοφθορισμού δεν έδωσαν μια σαφή εικόνα μεμβρανικών υποδοχέων σωματοστατίνης και αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο πολύ έντονο ενδοκυττάριο σήμα των ssts. Για να εξετάσουμε περαιτέρω την ύπαρξη μεμβρανικών υποδοχέων σωματοστατίνης προχωρήσαμε σε δοκιμασίες δέσμησης σε απομονωμένες μεμβράνες από κύτταρα D407.

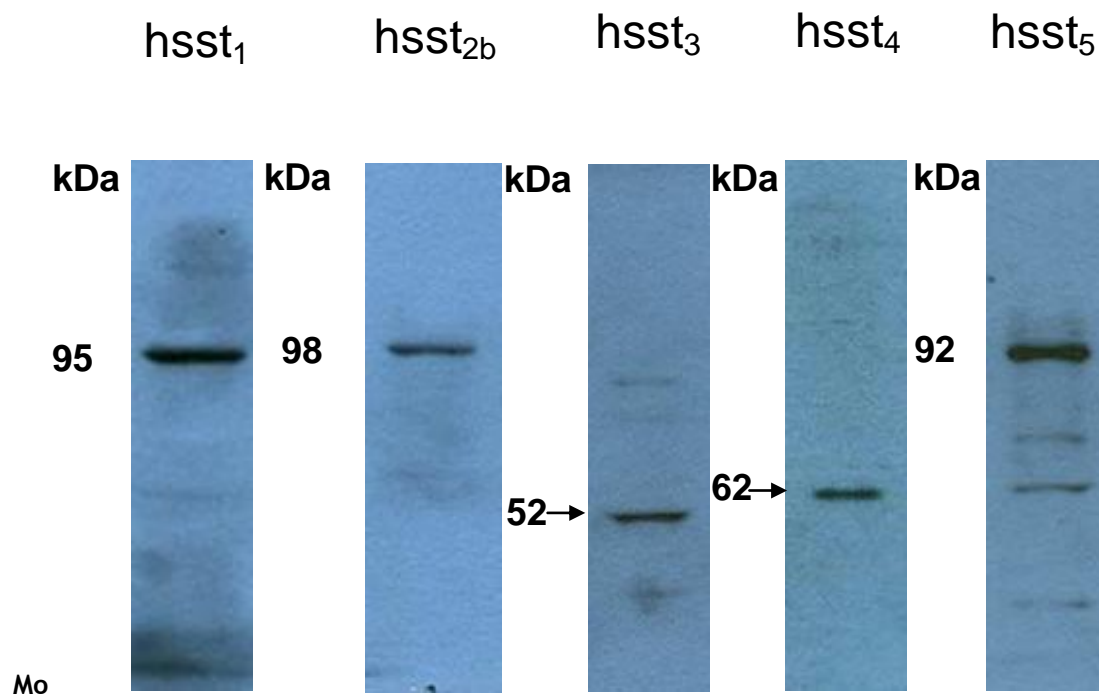
Η εκλεκτική δέσμηση της [125 I]Tyr¹¹-SRIF-14 προσδιορίστηκε παρουσία SRIF-14 (10^{-6} M). Τα μη ραδιενεργά ανάλογα της σωματοστατίνης που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό των περιοχών δέσμησης που αντιστοιχούσε στον κάθε υπότυπο sst στις μεμβράνες των κυττάρων D407 ήταν τα παρακάτω: CH275 (sst₁ ανάλογο), MK678 (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους sst₂ υποδοχείς) και L-817,818 (ανάλογο με μεγαλύτερη συγγένεια για τους sst₅ υποδοχείς και μικρότερη για τους sst₁).

Τα ειδικά για τους sst₁ και sst₅ υποδοχείς ανάλογα εκτόπισαν $76\% \pm 13\%$ και $81\% \pm 10\%$ αντίστοιχα, της ειδικής δέσμησης της σωματοστατίνης στις μεμβράνες των κυττάρων D407, ενώ το ανάλογο για τους sst₂ δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι οι υποδοχείς sst₁ και sst₅ εκφράζονται στις μεμβράνες των D407 όταν αυτά βρίσκονται σε συνθήκες ηρεμίας.

5.1.2.4 Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 με μελέτες ανοσοαποτύπωσης (Western blot).

Τελευταία, εφαρμόσαμε την τεχνική ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting) για την ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα D407.

Η τεχνική αυτή αποκάλυψε την παρουσία και των πέντε υποδοχέων της σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 (Εικόνα 5-4). Καθώς δεν υπήρχαν σχετικές πληροφορίες για το MEA, οι μοριακές μάζες των υποτύπων των υποδοχέων βρίσκονται στο εύρος των kDas που έχουν αναφερθεί για τους συγκεκριμένους υποδοχείς σε άλλους ιστούς και τύπους κυττάρων (Helboe *et al.*, 1997, Mawrin *et al.*, 2004, Xidakis *et al.*, 2007)



Εικόνα 5-4: Ανίχνευση των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπου με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Πρωτεϊνικά παρασκευάσματα των κυττάρων D407 αναλύθηκαν με SDS/PAGE (12%) και επωάστηκαν με τα ειδικά για τους υποτύπους των υποδοχέων της σωματοστατίνης αντισώματα. Στην εικόνα φαίνεται ο φθορισμός των προϊόντων της ανοσοαποτύπωσης που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση και σημανθεί με λουμινόλη. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος της κάθε ταινίας (kDa).

Συμπεράσματα

1. Στα κύτταρα D407 εντοπίζονται και οι πέντε υπότυποι υποδοχέων της σωματοστατίνης.
2. Σε συνθήκες ηρεμίας τα κύτταρα D407 συνθέτουν τους υπότυπους υποδοχέων της σωματοστατίνης sst_1 , sst_2 και sst_5 .
3. Οι υποδοχείς sst_2 είναι του τύπου sst_{2B} και εντοπίζονται στον πυρήνα, ενώ οι υποδοχείς sst_5 στο κυτταρόπλασμα.
4. Με μελέτες ανοσοαποτύπωσης εντοπίστηκαν και οι υποδοχείς sst_3 και sst_4 .
5. Η τεχνική του ανοσοφθορισμού δεν επιβεβαίωσε την παρουσία του sst_1 .
6. Όμως, οι μελέτες δέσμευσης έδειξαν ότι στην μεμβράνη των κυττάρων D407 υπάρχουν λειτουργικοί υποδοχείς σωματοστατίνης των τύπων sst_1 και sst_5 .

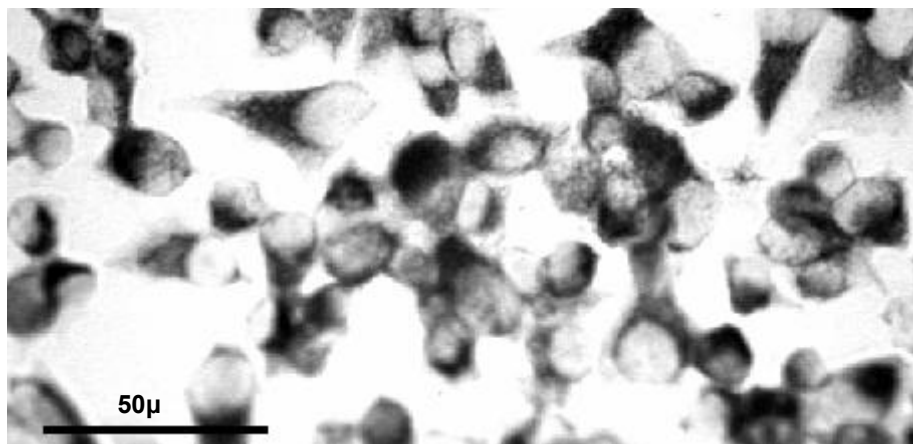
5.2 Προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης της σωματοστατίνης με το μονοξείδιο του αζώτου στα κύτταρα ΜΕΑ

Θελήσαμε να μελετήσουμε αν το σύστημα του μονοξειδίου του αζώτου υπάρχει στα κύτταρα D407 και αν αλληλεπιδρά με αυτό της σωματοστατίνης στα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου.

5.2.1 Ανίχνευση NADPH-διαφοράσης στα κύτταρα D407 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο.

Προκειμένου να διερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση του συστήματος του NO με τη σωματοστατίνη στα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου αναζητήσαμε καταρχήν την ύπαρξη του ειδικού ενζύμου συνθετάση του NO (NOS) στα κύτταρα D407. Το ένζυμο NOS καταλύει την οξείδωση της αργινίνης, αντίδραση κατά την οποία παράγεται NO. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί NADPH ως συνένζυμο. Έχει βρεθεί ότι η NOS και το NADPH συνεντοπίζονται σε πολλά νευρωνικά συστήματα, καθώς και ότι η αντίδραση της NADPH – διαφοράσης δεν λαμβάνει χώρα σε αμφιβληστροειδή ποντικών που στερούνται το γονίδιο της NOS (Dawson *et al.*, 1991, Scherer-Singler *et al.*, 1983, Vincent and Hope, 1992, Vincent and Kimura, 1992). Για τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιήσαμε την αντίδραση της NADPH – διαφοράσης προκειμένου να μελετήσουμε την ύπαρξη και την κατανομή της NOS στα κύτταρα ΜΕΑ.

Παρατηρήθηκε έντονη χρώση του κυτταροπλάσματος των κυττάρων D407 κατά την αντίδραση της NADPH – διαφοράσης γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη NOS στα κύτταρα αυτά (Εικόνα 5-5).

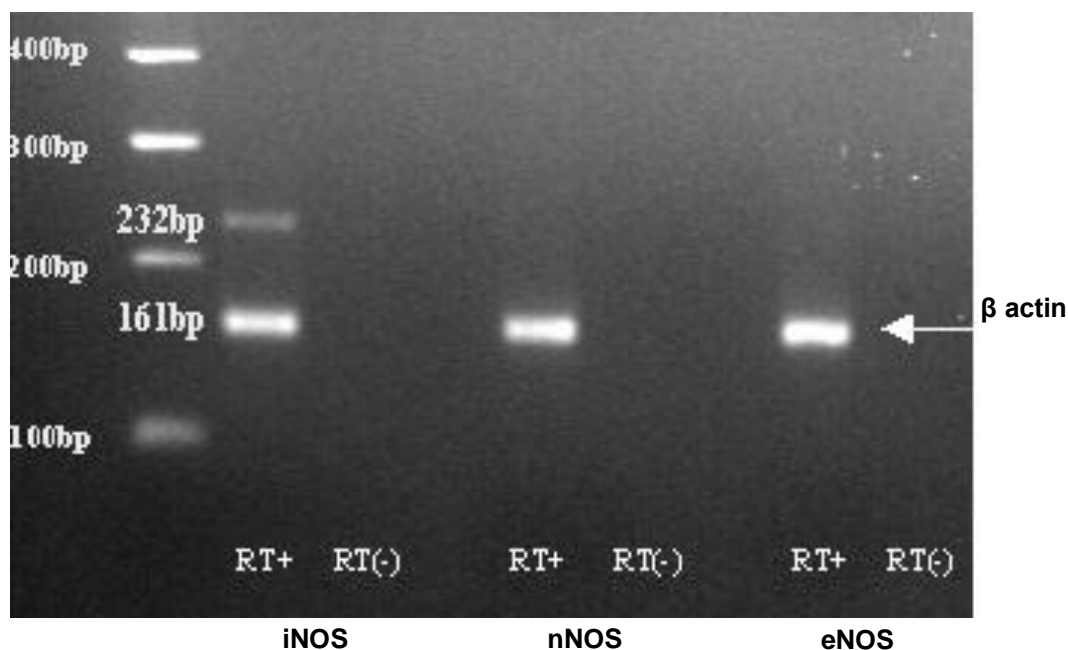


Εικόνα 5-5: Χρώση με NADPH-διαφοράση. Διακρίνεται καθαρά η χρώση του κυτταροπλάσματος των κυττάρων D407.

5.2.2 Ανίχνευση υποτύπων συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου στα κύτταρα D407 με RT-PCR

Το ένζυμο συνθετάση του NO (NOS) απαντάται σε τρεις ισομορφές (Goldstein *et al.*, 1996). Οι δύο από αυτές, η νευρωνική (nNOS) και η ενδοθηλιακή (eNOS), είναι ιδιοσυστατικές. Η σύνθεση της τρίτης ισομορφής επάγεται από ανοσολογικά σήματα και αναφέρεται ως επαγόμενη NOS (inducible, iNOS).

Μετά από τον εντοπισμό της συνθετάσης του NO στα κύτταρα D407 με την χρώση της NADPH-διαφοράσης, το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε ποια ή ποιες από τις ισομορφές της NOS εντοπίζεται στα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου. Για τον λόγο αυτό εφαρμόσαμε την μέθοδο RT-PCR. Μελετήθηκαν τουλάχιστον 2 διαφορετικά δείγματα που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα οποία έγινε επεξεργασία απομόνωσης RNA και ανάστροφης μεταγραφής ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα σε όλα τα πειράματα. Παράλληλα εκτελέστηκε PCR με RNA στο οποίο δεν είχε γίνει ανάστροφη μεταγραφή (αρνητικός δείκτης) με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης με γενωμικό DNA. Ανιχνεύτηκε με RT-PCR γονιδιακό σήμα μόνο για την ισομορφή iNOS (Εικόνα 5-6).



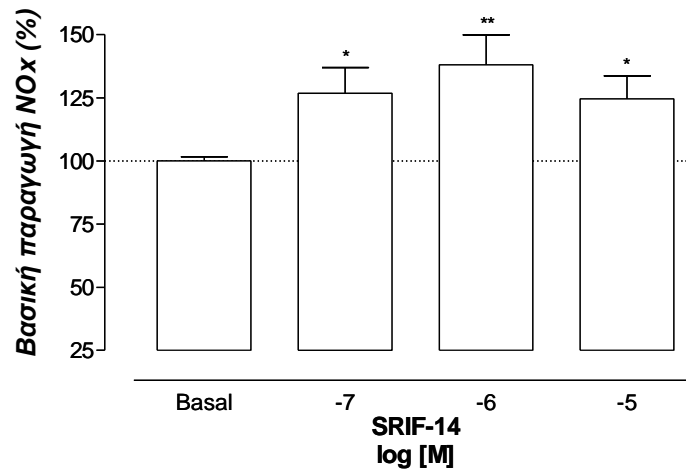
Εικόνα 5-6: Έκφραση mRNA των ισομορφών της NOS στα κύτταρα D407 με RT-PCR (35 κύκλοι). Τα κύτταρα D407 εκφράζουν την ισομορφή iNOS αλλά όχι τις eNOS και nNOS. Οι αρνητικοί δείκτες (RT-) ήταν συνέχεια αρνητικοί. Στην εικόνα φαίνεται ο φθορισμός των προϊόντων της PCR που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση και βαφεί με ethidium bromide. Οι ταινίες γονιδιακού σήματος ήταν ορατές στο υπεριώδες μήκος κύματος και η σύγκριση τους έγινε με βάση την κλίμακα μοριακού βάρους που απεικονίζεται αριστερά.

5.2.3 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην παραγωγή μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα D407 με την μέθοδο Grisham

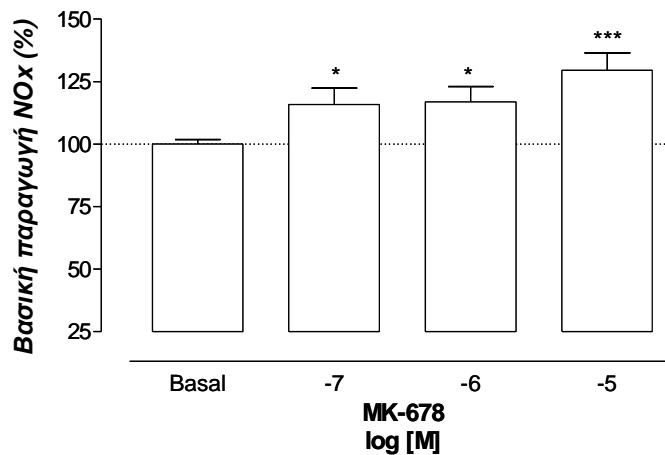
Το επόμενο βήμα μετά την διαπίστωση της συνύπαρξης του συστήματος του NO με την σωματοστατίνη στα κύτταρα D407, ήταν να διερευνήσουμε και τη λειτουργική σχέση μεταξύ των δύο αυτών συστημάτων. Έτσι μελετήσαμε την επίδραση της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στο σύστημα NO/NOS, μέσω της επίδρασής τους στην παραγωγή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού του NO (NO_x) που είναι τα νιτρικά (NO₃⁻) και νιτρώδη (NO₂⁻) ιόντα.

Η βασική παραγωγή NO_x από τα κύτταρα D407 μετρήθηκε σε 11.8±0.9 μM/mg (n=9). Η σωματοστατίνη προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της βασικής παραγωγής των NO_x με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο. (Εικόνα 5-7).

Προκειμένου να διερευνήσουμε ποιού από τους υπότυπους των υποδοχέων σωματοστατίνης ευθύνονται για την αύξηση των επιπέδων NO, χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά ανάλογα για την ενεργοποίηση όλων των υποτύπων και μελετήθηκαν οι πιθανές αλλαγές στα επίπεδα NO_x. Η MK-678 που είναι το εκλεκτικό ανάλογο για τους sst₂ υποδοχείς της σωματοστατίνης είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με την σωματοστατίνη -14 στην βασική παραγωγή NO_x. (Εικόνα 5-8).

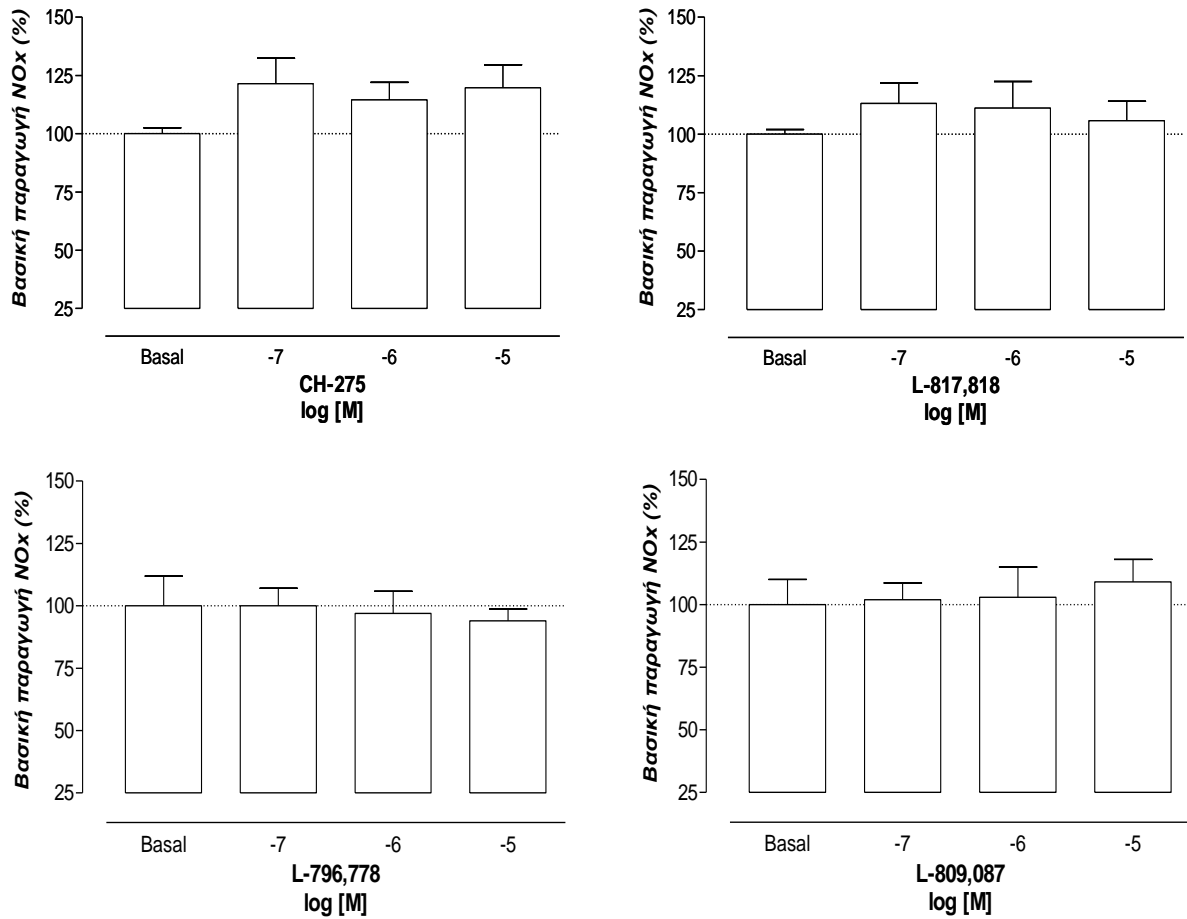


Εικόνα 5-7: Επίδραση της σωματοστατίνης-14 στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα D407 (n=7). Η σωματοστατίνη-14 προκάλεσε αύξηση της παραγωγής των μεταβολιτών του NOx εξαρτώμενη από την συγκέντρωση της δραστικής ουσίας (*P<0.05, ** P<0.01, unpaired T-test).



Εικόνα 5-8: Επίδραση των εκλεκτικών αναλόγων της σωματοστατίνης στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα D407 (n=7). Η MK-678, το εκλεκτικό ανάλογο για τους sst₂ υποδοχείς της σωματοστατίνης, προκάλεσε αύξηση της παραγωγής των μεταβολιτών του NOx εξαρτώμενη από την συγκέντρωση της δραστικής ουσίας (*P<0.05, ** P<0.01, unpaired T-test).

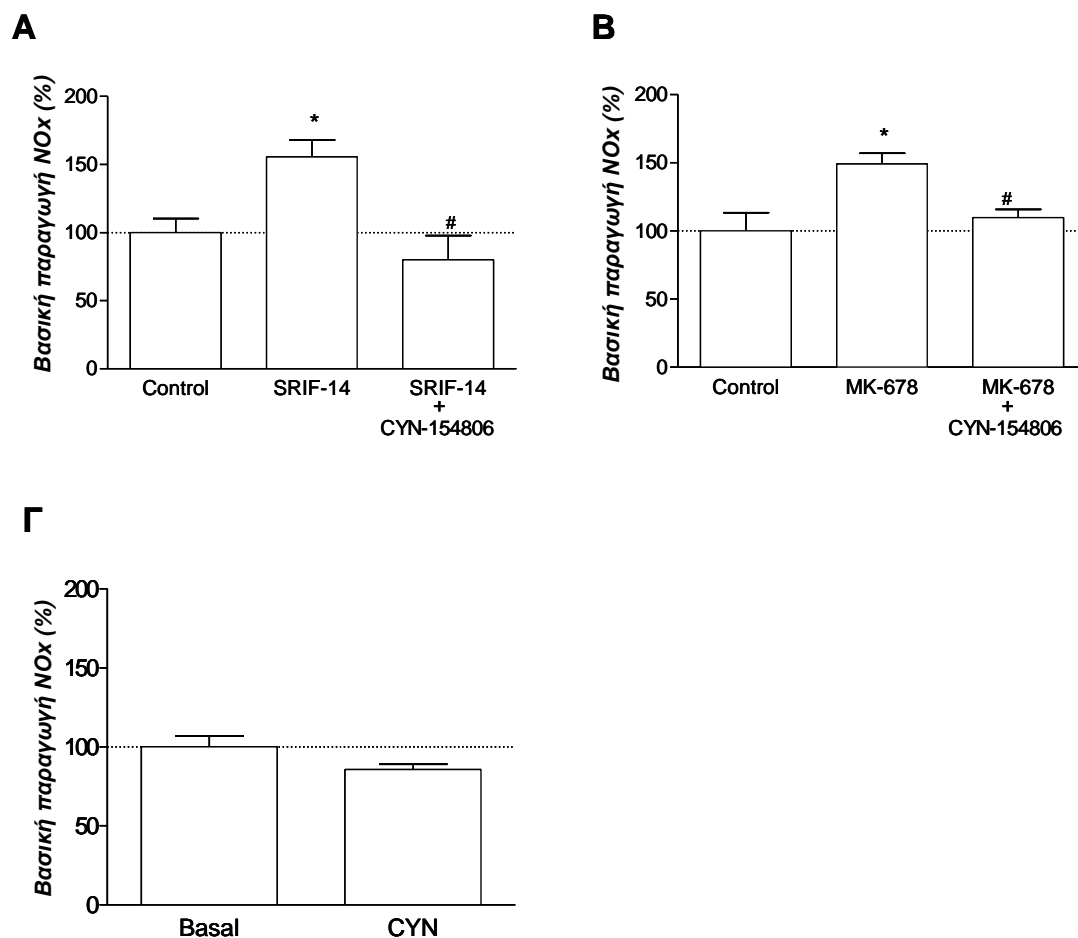
Τα εκλεκτικά ανάλογα για τους sst₁, sst₃, sst₄ και sst₅ υποδοχείς δεν είχαν καμία επίδραση στην παραγωγή των μεταβολιτών του NO από τα κύτταρα D407 (Εικόνα 5-9).



Εικόνα 5-9: Επίδραση των εκλεκτικών αναλόγων της σωματοστατίνης στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα D407 (n=7). Τα εκλεκτικά ανάλογα για τους sst₁ (CH-275, n=7), sst₅ (L-817,818, n=8), sst₃, (L-796,778, n=7) και sst₄ (L-809,087 n=7) υποδοχείς δεν είχαν καμία επίδραση στην παραγωγή των μεταβολιτών του NO από τα κύτταρα D407 (*P<0.05, ** P<0.01, unpaired T-test).

Προκειμένου να εξακριβώσουμε την ειδικότητα του αποτελέσματος της σωματοστατίνης-14 και της MK-678 στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα D407, μελετήσαμε την επίδραση των δύο αυτών ουσιών παρουσία του ειδικού sst₂ ανταγωνιστή της σωματοστατίνης, του CYN-154806.

Διαπιστώσαμε ότι, παρουσία του CYN-154806, εξουδετερώθηκε η δράση της σωματοστατίνης και του sst₂ εκλεκτικού αναλόγου της, ενώ το ίδιο το CYN-154806 από μόνο του δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου (Εικόνα 5-10).



Εικόνα 5-10: Επίδραση του sst₂ ανταγωνιστή CYN-154806 στην παραγωγή NOx, η οποία προκαλείται από την σωματοστατίνη και την MK-678, από τα κύτταρα D407. Ο sst₂ ανταγωνιστής CYN-154806 (100nM) απέκλεισε την επίδραση της σωματοστατίνης-14 (1nM, A) και του sst₂ εκλεκτικού αναλόγου MK-678 (1nM, B) στην παραγωγή των μεταβολιτών του NO. Ο ανταγωνιστής από μόνος του δεν είχε κανένα αποτέλεσμα (C) (*P<0.05 αγωνιστής σε σύγκριση με το control), # P<0.05 αγωνιστής και ανταγωνιστής σε σύγκριση με τον αγωνιστή, T-test κατά ζεύγη).

Συμπεράσματα

1. Η συνθετάση του NO και ιδιαίτερα η iNOS εντοπίζεται στο μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς.
2. Μέσω ενεργοποίησης του sst₂ υποδοχέα, η σωματοστατίνη αυξάνει την απελευθέρωση των μεταβολιτών του NO από τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο
3. Η ικανότητα της σωματοστατίνης σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις (από 0.1 ως 1nM) να επηρεάζει την παραγωγή του NO, επιτρέπει την διαμόρφωση της υπόθεσης ότι η παραγόμενη από τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου σωματοστατίνη μπορεί να ρυθμίζει *in vivo* τις λειτουργίες του μονοξειδίου του αζώτου.

5.3 Προσδιορισμός της δράσης της σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ΜΕΑ

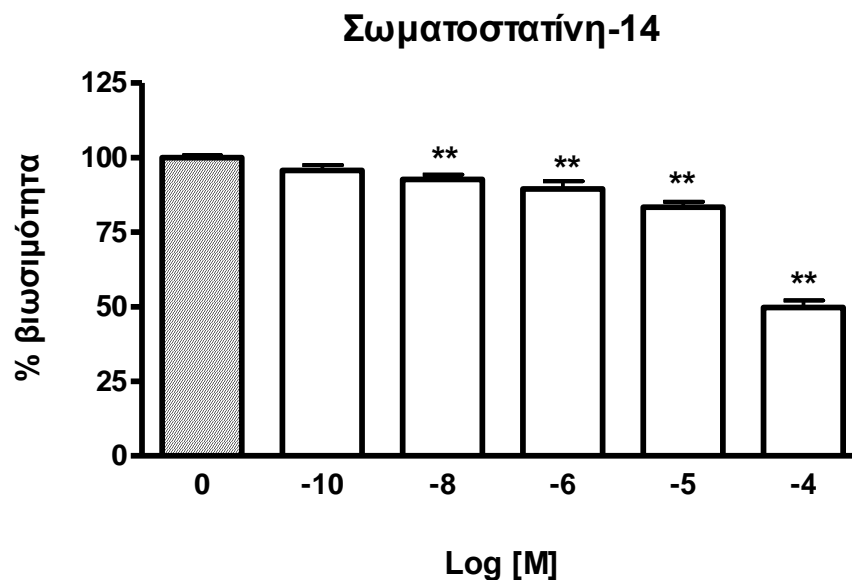
Η παρουσία υποδοχέων της σωματοστατίνης στα κύτταρα D407 επιτρέπει τη διαμόρφωση της υπόθεσης ότι η σωματοστατίνη έχει και κάποιου είδους βιολογικό αποτέλεσμα σε αυτά τα κύτταρα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το μελάγχρουν επιθήλιο είναι μη παραγωγικό, αλλά τροποποιείται σε καταστάσεις όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς και η παραγωγική υαλοειδο-αμφιβληστροειδοπάθεια. Προκειμένου να στηρίξουμε πιθανό θεραπευτικό ρόλο της σωματοστατίνης στις καταστάσεις αυτές, μας ενδιέφερε ειδικά να εξετάσουμε αν η σωματοστατίνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς ανθρώπινης προέλευσης.

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η σωματοστατίνη αναστέλλει των πολλαπλασιασμό διαφόρων κυττάρων (Olias *et al.*, 2004). Έχει δειχθεί ότι η σωματοστατίνη επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του ενζύμου τυροσινοφωσφατάση και προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωση / νέκρωση (Ferjoux *et al.*, 2000, Sharma *et al.*, 1999). Ειδικότερα, στο μελάγχρουν επιθήλιο του κουνελιού η οκτρεοτίδη που είναι sst_2 ανάλογο της σωματοστατίνης έχει δειχθεί ότι ασκεί αντιπολλαπλασιαστική δράση (Luo *et al.*, 1996), ενώ σε κυτταρικές καλλιέργειες μελάγχρου επιθηλίου βοός, ανέστειλε τον επαγόμενο από αυξητικούς παράγοντες κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Amann *et al.*, 2000).

Με βάση τα παραπάνω προχωρήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στη βιωσιμότητα των κυττάρων D407 και να προσδιορίσουμε κατά πόσο οι πιθανές αλλαγές στη βιωσιμότητα οφείλονται στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στον αποπτωτικό θάνατο ή στη νέκρωση των κυττάρων.

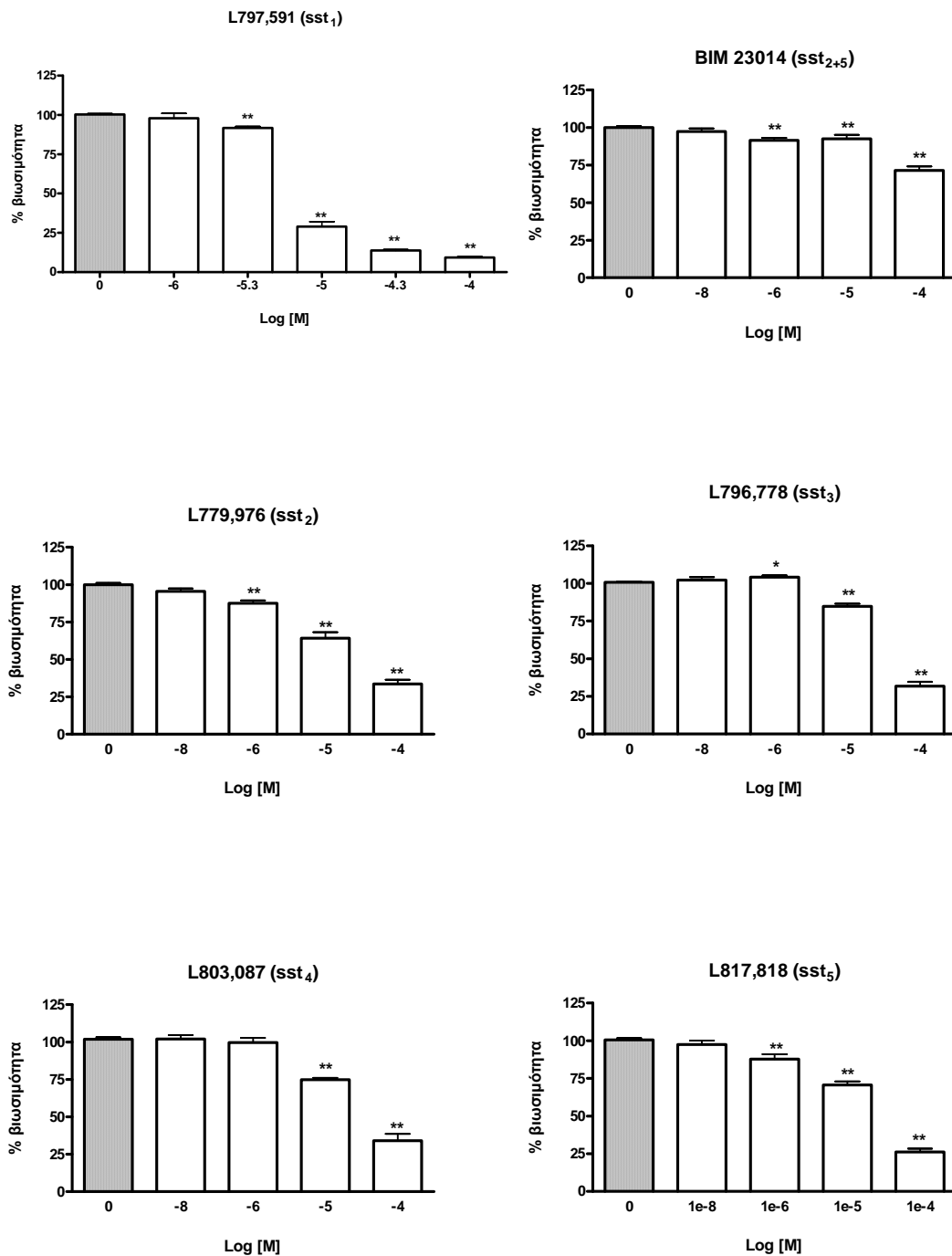
5.3.1 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην βιωσιμότητα των κυττάρων D407 με την τεχνική μεταβολισμού του MTT

Η σωματοστατίνη-14 προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων D407 σε συγκεντρώσεις της τάξης 10^{-10} M και 10^{-4} M (Εικόνα 5-11). Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και σε τετραπλέτες. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunett's post hoc ανάλυση].



Εικόνα 5-11: Επίδραση της σωματοστατίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπου όπως μετρήθηκε με την μέθοδο MTT. Η σωματοστατίνη (n =5) προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων D407 εξαρτώμενη από την συγκέντρωση. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunett's post test].

Προκειμένου να μελετηθεί η ταυτότητα του υποδοχέα της σωματοστατίνης που εμπλέκεται στη μείωση της βιωσιμότητας των D407, χρησιμοποιήθηκαν τα εκλεκτικά ανάλογα για την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Η ενεργοποίηση και των 5 υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης (sst₁₋₅) είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με αυτό της σωματοστατίνης-14, προκάλεσε δηλαδή μείωση της βιωσιμότητας των D407, εξαρτώμενη από την συγκέντρωση. (Εικόνα 5-12). Χρησιμοποιήθηκαν δύο αγωνιστές με συγγένεια για τον sst₂ υποδοχέα, τα ανάλογα L779,976 και BIM 23014. Το L-ανάλογο ήταν πιο δραστικό πιθανόν εξαιτίας της καλύτερης απορρόφησης και σταθερότητάς του.



|

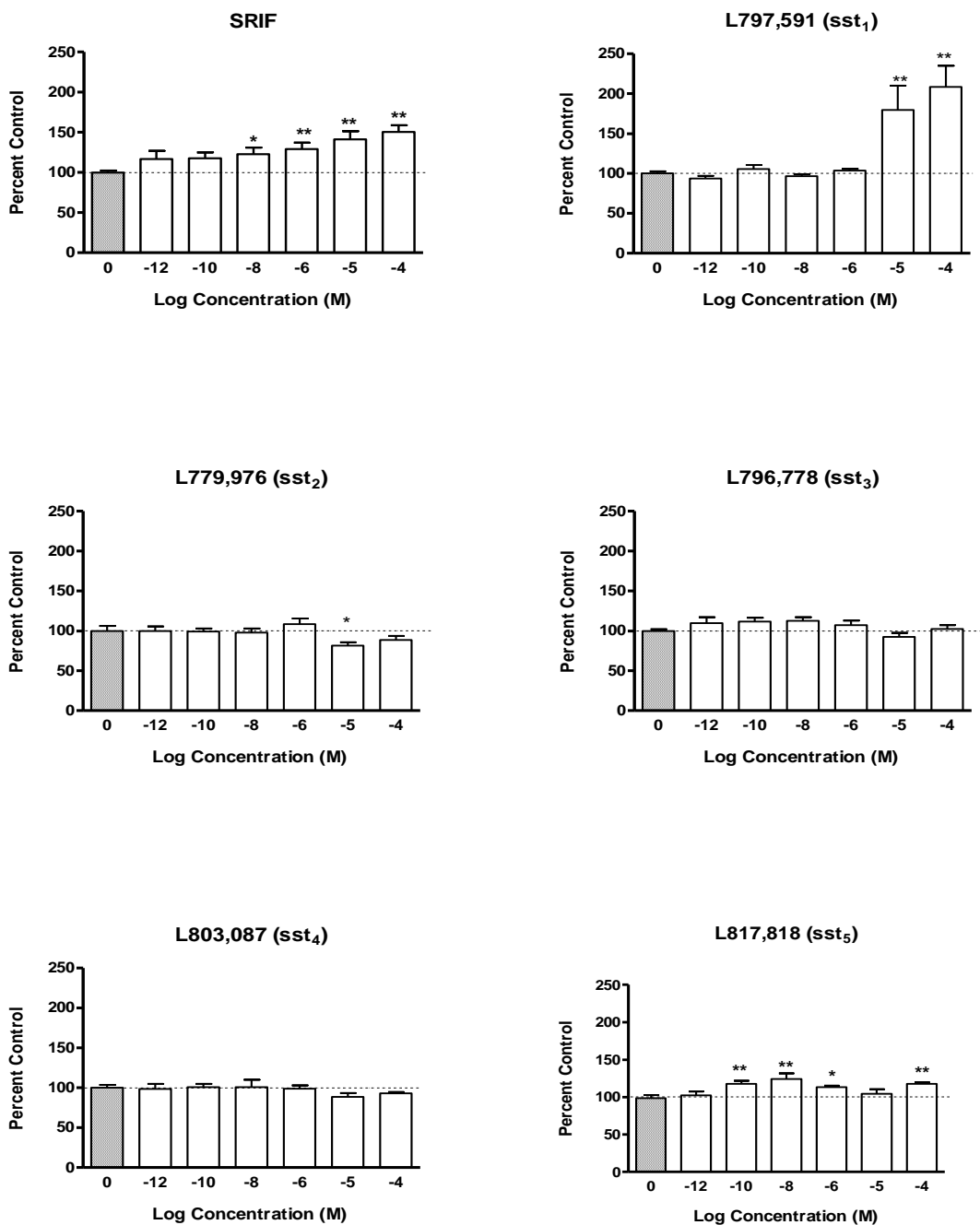
Εικόνα 5-12: Επίδραση των εκλεκτικών αναλόγων της σωματοστατίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπου όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Το ανάλογο BIM23014 (n =5) και τα sst₂, L779,976 (n=3) και sst₅, L817,818 (n=5) εκλεκτικά ανάλογα προκάλεσαν μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων D407 σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 10⁻⁶M. Τα sst₁, L797,591 (n=3), sst₃, L796,778 (n=3) και sst₄, L803,087 (n=3) εκλεκτικά ανάλογα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε μεγαλύτερες μόνο συγκεντρώσεις (≥10⁻⁵M). *P < 0.05, **P < 0.01 ***P <0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunnett's post hoc ανάλυση].

5.3.2 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην απόπτωση των κυττάρων D407 με την τεχνική APO Percentage

Με την μέθοδο MTT μπορέσαμε να μετρήσουμε την βιωσιμότητα των κυττάρων D407 μετά από επίδραση με σωματοστατίνη ή τα εκλεκτικά για τους υποδοχείς της ανάλογα. Η μείωση της βιωσιμότητας ενός κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να οφείλεται σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή / και αύξηση του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση / τοξικότητα). Για τον λόγο αυτό επαναλάβαμε τις προηγούμενες μελέτες, μετρώντας αυτήν την φορά την επίδραση της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην απόπτωση των κυττάρων D407

Η απόπτωση των κυττάρων D407 μετρήθηκε με την ποσοτική χρωματομετρική μέθοδο APO PercentageTM. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και σε τετραπλέτες. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunett's post hoc ανάλυση].

Η σωματοστατίνη αύξησε την απόπτωση των κυττάρων D407 με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο (10^{-12} - 10^{-4} M) σε ποσοστό όχι μεγαλύτερο του 50%. Ο sst₅ αγωνιστής παρουσίασε παρόμοια με την σωματοστατίνη δράση αυξάνοντας την απόπτωση κατά 25%. Ο sst₁ αγωνιστής προκάλεσε, σε πολύ υψηλή συγκέντρωση (10^{-4} M), μια εκσεσημασμένη αύξηση της απόπτωσης (>100%). Αντίθετα, ενεργοποίηση των υποδοχέων sst₂, sst₃ και sst₄ δεν είχε επίδραση στην απόπτωση των κυττάρων D407 {Εικόνα 5-13}.



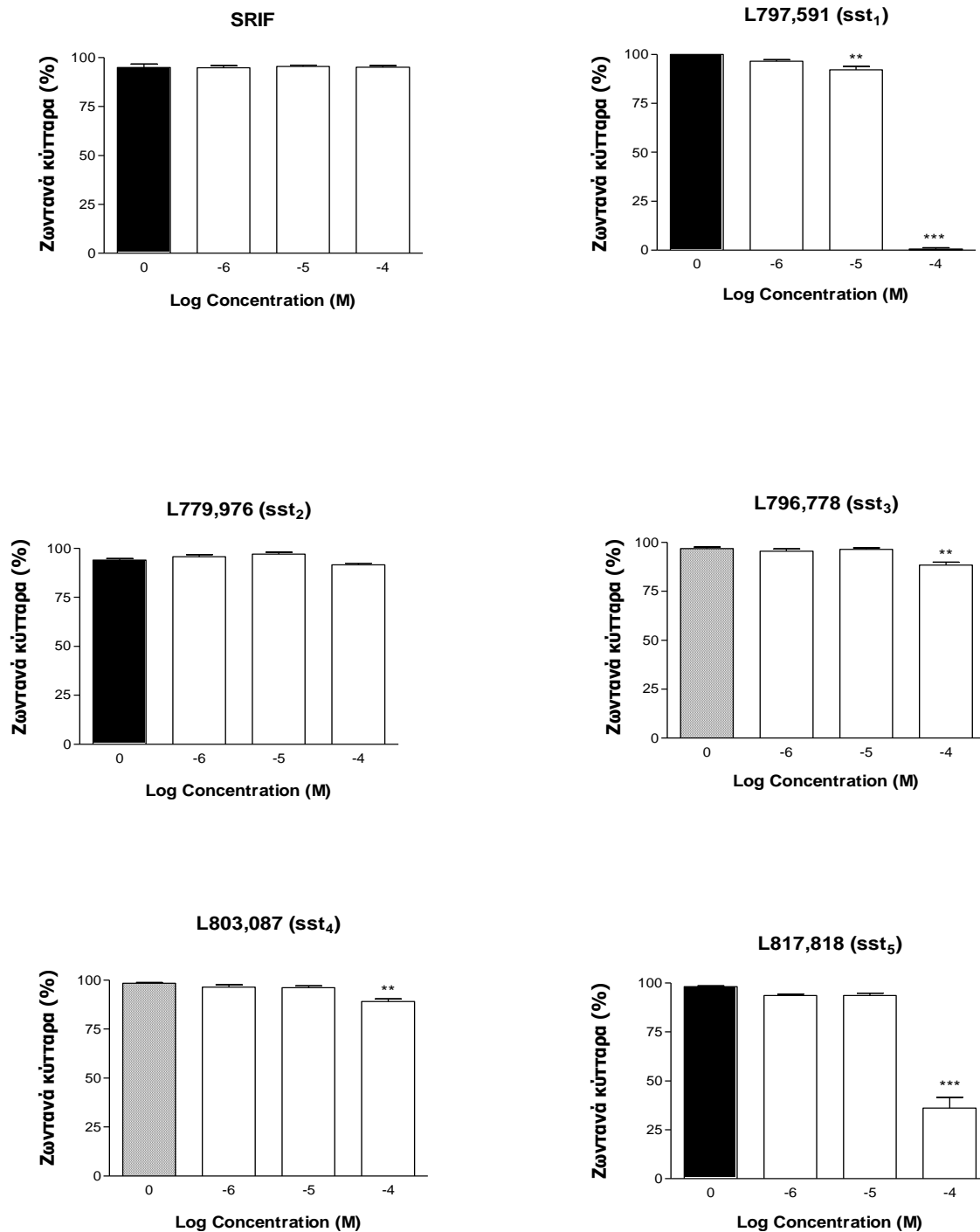
Εικόνα 5-13: Επίδραση της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στην απόπτωση των κυττάρων D407 όπως μετρήθηκε με την μέθοδο APOPercentage™. Η σωματοστατίνη (SRIF, n=3) και το sst₅ εκλεκτικό ανάλογο, L817,818 (n=3) αύξησαν την απόπτωση των D407 με τρόπο εξαρτώμενο από την συγκέντρωση. Το sst₁, L797,591 (n=3) εκλεκτικό ανάλογο προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της απόπτωσης μόνο σε συγκεντρώσεις > 10⁻⁵M. Τα sst₂, L779,976 (n=3), sst₃, L796,778 (n=3) και sst₄, L803,087 (n=3) εκλεκτικά ανάλογα δεν είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στην απόπτωση των κυττάρων D407. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunett's post hoc ανάλυση].

5.3.3 Μελέτη της τοξικότητας της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων στα κύτταρα D407 με την τεχνική χρώσης με trypan blue

Προκειμένου να συμπληρώσουμε τις προηγούμενες μελέτες εξετάσαμε την τοξικότητα της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου.

Η τοξικότητα της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της μετρήθηκε με την τυποποιημένη μέθοδο trypan blue. Όλα τα πειράματα έγιναν σε τριπλέτες και επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 3 φορές. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunett's post hoc ανάλυση].

Η σωματοστατίνη και το εκλεκτικό για τους sst₂ υποδοχείς της ανάλογο δεν ήταν τοξικές για τα κύτταρα D407 σε συγκεντρώσεις από 10⁻⁶ ως 10⁻⁴M. Τα ειδικά για τους sst₁ και sst₅ υποδοχείς ανάλογα προκάλεσαν, σε πολύ υψηλή συγκέντρωση (10⁻⁴M), μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε ποσοστό 100% και 75%, αντίστοιχα. Στην ίδια συγκέντρωση, τα sst₃ and sst₄ εκλεκτικά ανάλογα προκάλεσαν μείωση της βιωσιμότητας των D407 σε ποσοστό λιγότερο του 20%. (Εικόνα 5-14).



Εικόνα 5-14: Κυτταροτοξικά αποτελέσματα της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της σε κύτταρα μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπινης προέλευσης, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο trypan blue. Η σωματοστατίνη (SRIF, n =3) και το εκλεκτικό για τους sst₂ υποδοχείς ανάλογο, (L779,976 , n=3), δεν ήταν τοξικές για τα κύτταρα D407 σε συγκεντρώσεις από 10⁻⁶ ως 10⁻⁴M. Τα sst₁ (L797,591, n=3) και sst₅ (L817,818, n=3) εκλεκτικά ανάλογα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική τοξικότητα σε συγκεντρώσεις >10⁻⁵M. Τα sst₃ (L796,778, n=3) και sst₄ (L803,087, n=3) εκλεκτικά ανάλογα είχαν λιγότερο εκσεσημασμένη επίδραση στον κυτταρικό θάνατο και μόνο στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (10⁻⁴M). *P < 0.05, **P < 0.01 ***P <0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Dunett's post hoc ανάλυση].

Συμπεράσματα

1. Η σωματοστατίνη προκαλεί μείωση του αριθμού των κυττάρων μελάχρου επιθηλίου ανθρώπου με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο

2. Η μείωση του αριθμού των κυττάρων οφείλεται σε:
 - A. μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού μέσω των υποδοχέων sst_2 , sst_3 και sst_4
 - B. απόπτωση μέσω των υποδοχέων sst_1 και sst_5 και
 - Γ. τοξικότητα στις μεγάλες συγκεντρώσεις ($\geq 10^{-5}$) μέσω των υποδοχέων sst_1 και sst_5

5.3.4 Προσδιορισμός του μηχανισμού με τον οποίο η σωματοστατίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ΜΕΑ

Το επόμενο βήμα στην μελέτη μας ήταν η αναζήτηση των ενδοκυττάρων μηχανισμών μέσω των οποίων ασκείται η αντιπολλαπλασιαστική δράση της σωματοστατίνης. Μελέτες που αφορούν κυρίως σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου, δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της ασκούν την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση (Bousquet *et al.*, 1998, Florio *et al.*, 1999, Lopez *et al.*, 1997, Buscail *et al.*, 1994a).

Η συμμετοχή του υποδοχέα ss_{t_2} στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει μελετηθεί ιδιαίτερα εκτεταμένα (Viguerie *et al.*, 1989, Olias *et al.*, 2004, Luo *et al.*, 1996, Bousquet *et al.*, 1998). Αναφέρεται ότι η σωματοστατίνη ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μοντέλο κυττάρων CHO τα οποία συνεκφράζουν τον ss_{t_2} υποδοχέα και την φωσφατάση της φωσφοτυροσίνης SHP-1. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι η SHP-1 μπορεί να είναι ο αρχικός μεσολαβητής-κλειδί της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της σωματοστατίνης που ασκείται μέσω του ss_{t_2} υποδοχέα (Lopez *et al.*, 1997). Η νευρωνική ισομορφή της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (nNOS) βρέθηκε ότι αποτελεί υπόστρωμα της SHP-1 που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της σωματοστατίνης μέσω των ss_{t_2} όπου συμμετέχει και το σύστημα NO/cGMP (Lopez *et al.*, 2001, Ferjoux *et al.*, 2003).

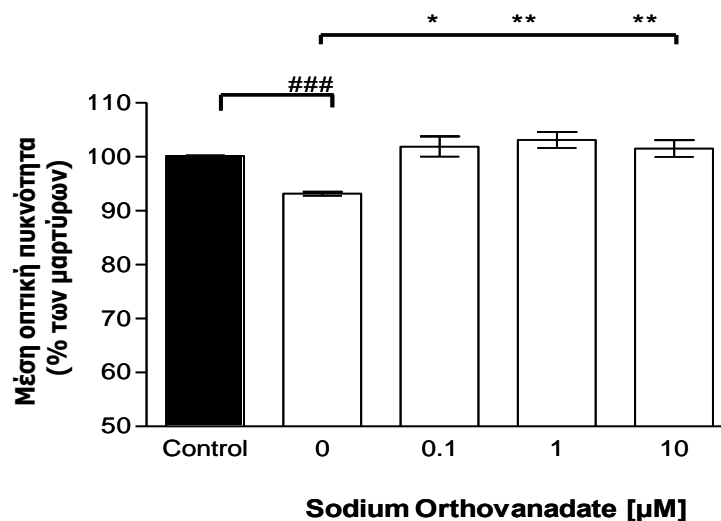
5.3.5 Μελέτη της επίδρασης της σωματοστατίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων D407 μετά από αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατασών (PTPs)

Προκειμένου να ερευνήσουμε εάν οι PTPs περιλαμβάνονται στο ενδοκυττάριο μονοπάτι που ρυθμίζει την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της σωματοστατίνης στα κύτταρα D407, μελετήσαμε εάν ο αποκλεισμός των PTPs θα μπορούσε να αντιστρέψει την επίδραση αυτή.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τον μη εκλεκτικό αναστολέα sodium orthovanadate. Εφαρμόσαμε την μέθοδο MTT όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4-11. Την ημέρα 0 στις καλλιέργειες των κυττάρων και σε θεραπευτικό μέσο που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (aprotinin 0.5μg/ml, leupeptin 1 μg/ml και PMSF 0.1mM) προστέθηκε σωματοστατίνη-14 σε συγκέντρωση 10μM μόνη ή μαζί με sodium

orthovanadate σε συγκεντρώσεις από 0.1-10 μ M. Μετά από 24 ώρες επώασης, που αντιστοιχούσαν σε 1 με 2 περίπου διπλασιασμούς των κυττάρων, έγινε μέτρηση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων με την μέθοδο του MTT. Παρόμοια πειράματα έγιναν με την προσθήκη μόνο sodium orthovanadate (0.1-10 μ M) προκειμένου να μελετήσουμε αν η ουσία αυτή έχει κάποια επίδραση στην βιωσιμότητα των κυττάρων. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και σε τετραπλέτες. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 σε σύγκριση με το control [ANOVA με Neuman Keuls post hoc ανάλυση].

Πράγματι, το sodium orthovanadate ανέστειλε πλήρως την επίδραση της σωματοστατίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ από μόνο του δεν είχε καμμία επίδραση (Εικόνα 5-15). Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει την αρχική υπόθεση ότι η αντιπολλαπλασιαστική δράση της σωματοστατίνης ασκείται μέσω των PTPs .

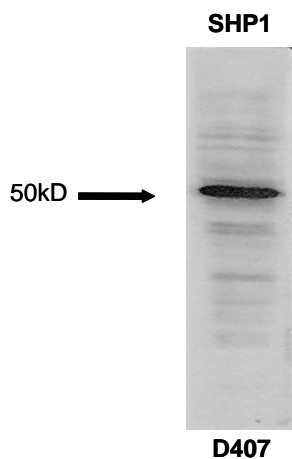


Εικόνα 5-15: Επίδραση του μη εκλεκτικού αναστολέα των πρωτεϊνικών φωσφατασών της φωσφοτυροσίνης στην ανασταλτική δράση της σωματοστατίνης στην βιωσιμότητα των κυττάρων μελαγχρόου επιθηλίου ανθρώπου. Όλα τα δείγματα έλαβαν σωματοστατίνη -14 (SRIF, 10 μ M). Το sodium orthovanadate, προκάλεσε, σε συγκεντρώσεις από 0.1 μ M - 10 μ M, πλήρη αναστροφή της δράσης της σωματοστατίνης (n=3) #P < 0.05 σωματοστατίνη σε σύγκριση με τους μάρτυρες, *P < 0.05, σωματοστατίνη+ sodium orthovanadate σε σύγκριση με την σωματοστατίνη μόνο (n = 3), One way ANOVA με Neuman Keuls post hoc ανάλυση.

5.3.6 Ανίχνευση της SHP1 φωσφοτυροσινικής φωσφατάσης στα κύτταρα D407 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (immunoblot)

Μετά από την διαπίστωση ότι το σύστημα των πρωτεϊνικών φωσφοτυροσινικών φωσφατασών συμμετέχει στην ρύθμιση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της σωματοστατίνης κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπου, θελήσαμε να εξετάσουμε αν η SHP1 φωσφοτυροσινική φωσφατάση εκφράζεται στα κύτταρα D407. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόσαμε την τεχνική ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting).

Η τεχνική αυτή αποκάλυψε την παρουσία της SHP-1 φωσφατάσης της φωσφοτυροσίνης στα κύτταρα D407 (Εικόνα 5-16).



Εικόνα 5-16: Ανίχνευση της SHP-1 στα κύτταρα μελάγχρου επιθηλίου ανθρώπου με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Πρωτεϊνικά παρασκευάσματα των κυττάρων D407 αναλύθηκαν με SDS/PAGE (12%) και επώαστηκαν με το ειδικό για την SHP-1 αντίσωμα.

Συμπέρασμα

Το μονοπάτι των Πρωτεϊνικών Φωσφοτυροσινικών Φωσφατασών (PTPs) μεσολαβεί τις αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις της σωματοστατίνης.

II. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μελέτη της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας της χρήσης λανρεοτίδης (BIM23014, sst_{2/5} αναλόγου της σωματοστατίνης) σε ασθενείς με χοριοειδική νεοαγγείωση που οφείλεται σε εκφύλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία.

A. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία

Είκοσι οφθαλμοί, είκοσι ασθενών συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Οι ασθενείς κατανεμήθηκαν τυχαία στην ομάδα μελέτης ή την ομάδα ελέγχου. Στον πίνακα 5-1 παρουσιάζεται η σύγκριση των δύο ομάδων ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους. Παρόλο που η αναλογία ανδρών:γυναικών ήταν η ίδια μεταξύ των δύο ομάδων, οι περισσότεροι από τους συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν γυναίκες. Προκειμένου να αντισταθμιστεί η διαφορά αυτή, το φύλο χρησιμοποιήθηκε ως μεταβλητή κατά τη στατιστική ανάλυση.

Οι ασθενείς που, με τυχαία επιλογή, αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης ήταν νεώτεροι από αυτούς της ομάδας ελέγχου, αλλά η διαφορά ηλικίας μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Όσον αφορά τον τύπο της χοριοειδικής νεοαγγείωσης, η αναλογία κλασσικής προς κρύφια ήταν ίση μεταξύ των δύο ομάδων. Η μέση οπτική οξύτητα και τα φλουροαγγειογραφικά χαρακτηριστικά της χοριοειδικής νεοαγγείωσης ήταν όμοια μεταξύ των δύο ομάδων κατά την έναρξη της μελέτης.

B. Συμμόρφωση ασθενών με το πρωτόκολλο και παρακολούθηση

Όλοι οι ασθενείς συμπλήρωσαν τον χρόνο παρακολούθησης που προβλεπόταν από το πρωτόκολλο. Οι ασθενείς παρέμειναν «τυφλοί» (masked) ως προς το χορηγούμενο φάρμακο ως την ολοκλήρωση του χρόνου παρακολούθησης.

Γ. Αξιολόγηση της ασφάλειας της θεραπείας

Δύο από τους 10 ασθενείς της ομάδας μελέτης ανέφεραν ήπια διάρροια μετά από τη δεύτερη ένεση της λανρεοτίδης. Και στις δύο περιπτώσεις τα συμπτώματα υποχώρησαν μετά από 2-3 ημέρες. Δεν αναφέρθηκαν άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες.

Πίνακας 5-1: Σύνοψη δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών

Ηλικία	n	Μέση τιμή ± SD	P*
Σύνολο	20	76±6	
Ομάδα ελέγχου	10	79±5	>0.05
Ομάδα μελέτης	10	75±4	

*Δοκιμασία Mann-Whitney

Φύλο	Σύνολο (n=20)	Ομάδα μελέτης (n=10)	Ομάδα ελέγχου (n=10)	P†
Άνδρες	15	8	7	>0.05
Γυναίκες	5	2	3	

†Δοκιμασία Χ²

Τύπος χοριοειδικής νεοαγγείωσης	Σύνολο (n=20)	Ομάδα μελέτης (n=10)	Ομάδα ελέγχου (n=10)	P†
Κλασσική	9	4	5	>0.05
Κρύφια	9	5	4	
Μικτή	2	1	1	

†Δοκιμασία Χ²

	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα μελέτης	P‡
Αρχική οπτική οξύτητα (δεκαδική κλίμακα)	0.086 ±0.049	0.152±0.049	>0.05
Αρχική ένταση υπερφθορισμού (αυθαίρετες μονάδες)	172.0 ± 9.3	173.5±10.7	>0.05
Αρχική επιφάνεια υπερφθορισμού (pixel)	40775 ± 8487	49765±5673	>0.05

‡ ANCOVA (Analysis of Covariance)

1. Ο έλεγχος της ομοιογένειας έγινε με την δοκιμασία Levene
2. Το φύλο χρησιμοποιήθηκε ως συμεταβλητή

Δ. Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας

Δ1. Οπτική οξύτητα

Αρχικά η μέση οπτική οξύτητα των ασθενών της ομάδας μελέτης ήταν καλύτερη από αυτών της ομάδας ελέγχου. (Πίνακας 5-2). Η διαφορά αυτή αυξήθηκε κατά τη διάρκεια του εξαμήνου της θεραπείας. (Εικόνα 5-17) γεγονός που μπορεί να ερμηνευθεί είτε ως βελτίωση της οπτικής οξύτητας της ομάδας μελέτης ή ως επιδείνωση της οπτικής οξύτητας της ομάδας ελέγχου.

Στο τέλος των 6 μηνών της θεραπείας η οπτική οξύτητα στην ομάδα ελέγχου παρουσίασε επιδείνωση κατά 113% ενώ στην ομάδα μελέτης μόλις 10%. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, στο τέλος της θεραπείας η οπτική οξύτητα στην ομάδα μελέτης παρέμεινε υψηλότερη από αυτήν της ομάδας ελέγχου ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) (Πίνακας 5-2). Κανένας ασθενής στην ομάδα μελέτης δεν παρουσίασε σημαντική απώλεια οπτικής οξύτητας (μεγαλύτερη από 3 γραμμές της κλίμακας Snellen) στους 6 μήνες, ενώ αντίθετα 5 από τους 10 ασθενείς στην ίδια ομάδα παρουσίασαν βελτίωση της οπτικής οξύτητας. Αντίστοιχα, στην ομάδα ελέγχου ένας ασθενής παρουσίασε σημαντική απώλεια και 3 από τους 10 ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση της οπτικής οξύτητας. (Εικόνα 5-18).

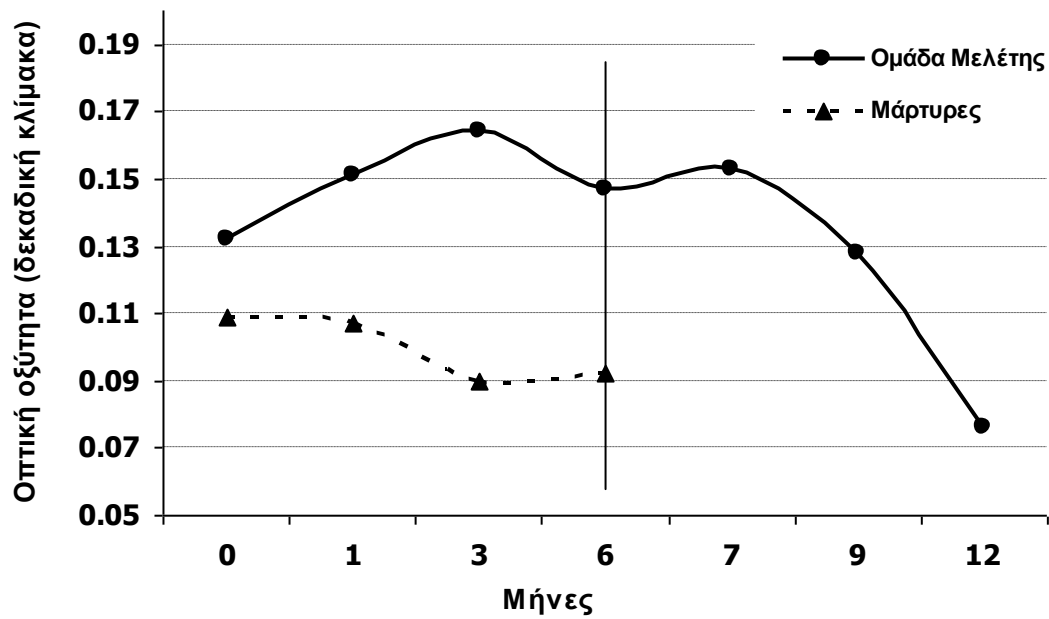
Μετά από την διακοπή της θεραπείας η ομάδα μελέτης παρουσίασε προοδευτική μείωση της οπτικής οξύτητας (Εικόνα 5-17). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην οπτική οξύτητα από τους 6 στους 12 μήνες ($p > 0.05$, Mann-Whitney test).

Πίνακας 5-2: Μεταβολή της οπτικής οξύτητας από την έναρξη ως τους 6 μήνες

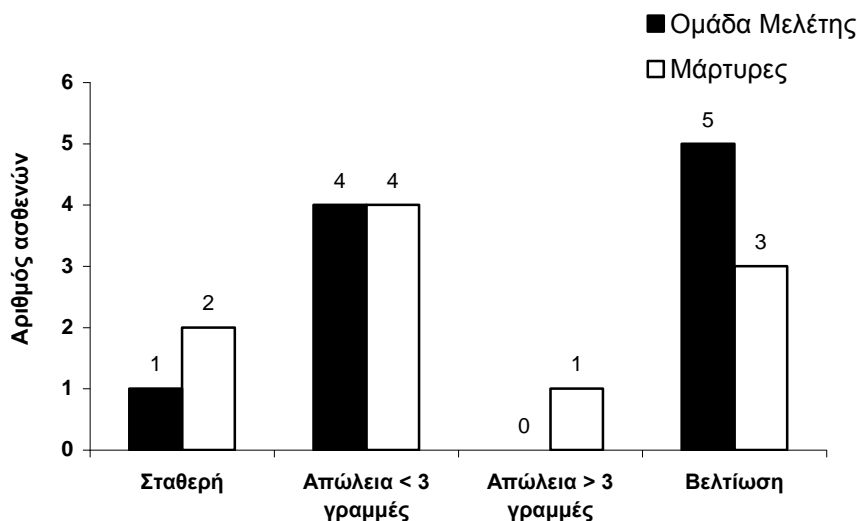
Οπτική οξύτητα (LogMAR)

Ομάδα	Έναρξη	p#	6 μήνες μετά	p#	Διαφορά	p#
Μελέτης	0.132 ± 0.04	NS	0.147 ± 0.04	NS	0.015 ± 0.02	NS
Ελέγχου	0.109 ± 0.05		0.092 ± 0.05		-0.017 ± 0.03	

Δοκιμασία Mann - Whitney



Εικόνα 5-17: Μεταβολή της μέσης οπτικής οξύτητας με τον χρόνο. Εξαιτίας της πολύ χαμηλής αρχικής οπτικής οξύτητας και στις δύο ομάδες, ο άξονας των y εκτείνεται σε πολύ μικρό εύρος της κλίμακας Snellen, από τα 20/400 (0.05) ως τα 20/80 (0.2). Η κάθετη γραμμή υποδεικνύει το τέλος της περιόδου θεραπείας (6 μήνες), οπότε έληξε και η παρακολούθηση της ομάδας των μαρτύρων.



Εικόνα 5-18: Ο απόλυτος αριθμός των ασθενών που παρουσίασαν βελτίωση ή επιδείνωση της οπτικής οξύτητας στο τέλος της περιόδου θεραπείας.

Δ2 Παράμετροι της φλουροραγγειογραφίας.

Δ2.1. Επιφάνεια υπερφθορισμού

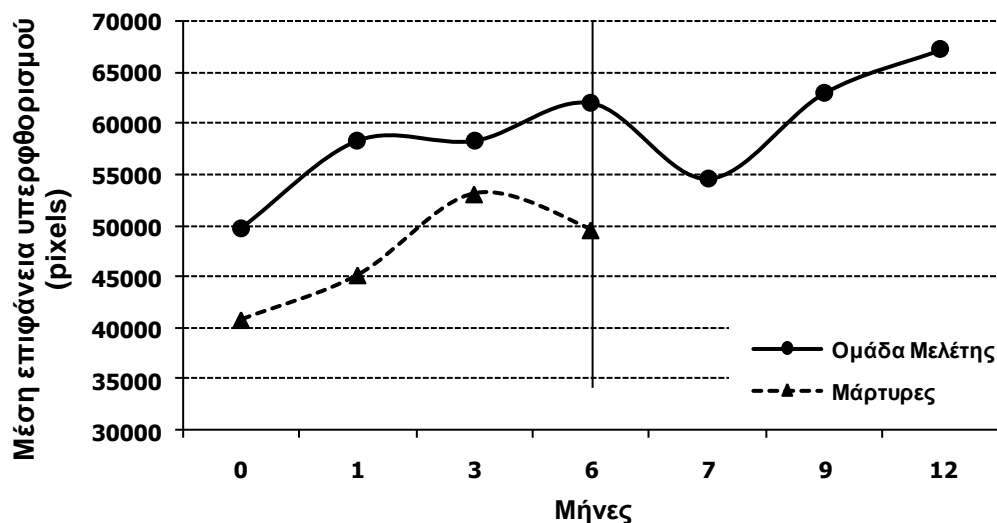
Κατά την έναρξη της μελέτης η μέση επιφάνεια υπερφθορισμού ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα μελέτης από την ομάδα ελέγχου και συνέχισε να αυξάνεται και στις δύο ομάδες.

Στο τέλος της περιόδου θεραπείας η μέση επιφάνεια υπερφθορισμού ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα της μελέτης από ότι στους μάρτυρες (Πίνακας 5-3) & (Εικόνα 5-19). Η αύξηση συνεχίστηκε και μετά την διακοπή της με γρηγορότερο ρυθμό. (Εικόνα 5-19).. Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στο διάστημα από 0 έως 6 μήνες. ($p = \text{NS}$, Mann-Whitney test) και μέσα στην ομάδα μελέτης από τους 6 έως τους 12 μήνες ($p = \text{NS}$, Mann-Whitney test).

Πίνακας 5-3: Μεταβολή στην επιφάνεια υπερφθορισμού από την έναρξη ως τους 6 μήνες
Επιφάνεια υπερφθορισμού (square pixels)

Ομάδα	Έναρξη	p#	6 μήνες μετά	p#	Διαφορά	p#
Μελέτης	49765 ± 5673	NS	62028 ± 9304	NS	12262 ± 8642	NS
Ελέγχου	40775 ± 8487		49594 ± 9642		8819 ± 10230	

Δοκιμασία Mann - Whitney



Εικόνα 5-19: Μεταβολή της μέσης επιφάνειας υπερφθορισμού με τον χρόνο. Η μέση επιφάνεια της οπτικής θηλής χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και υπολογίστηκε σε 19,000 pixels. Η κάθετη γραμμή υποδεικνύει το τέλος της περιόδου θεραπείας (6 μήνες) οπότε έληξε και η παρακολούθηση της ομάδας των μαρτύρων.

Δ2.2. Ένταση υπερφθορισμού

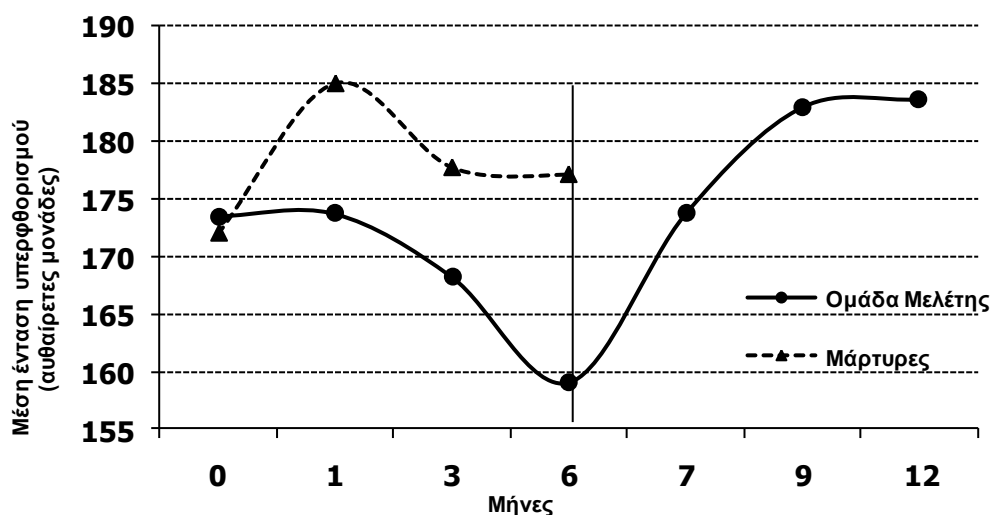
Η ένταση υπερφθορισμού αποτελεί μέτρο του βαθμού διαρροής της νεοαγγειακής μεμβράνης. Κατά την έναρξη της μελέτης οι δύο ομάδες δεν διέφεραν ως προς τη μέση ένταση υπερφθορισμού. Στο τέλος όμως της περιόδου θεραπείας, οι μεμβράνες της ομάδας μελέτης διέρρεαν λιγότερο από αυτές της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 5-20) & (Πίνακας 5-4).

Μετά τη διακοπή της θεραπείας η μέση ένταση υπερφθορισμού παρουσίασε σταδιακή αύξηση (Εικόνα 5-20). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων κατά τη διάρκεια της περιόδου θεραπείας ($p=NS$, Mann-Whitney test), και μέσα στην ομάδα μελέτης στη διάρκεια των 6 μηνών που ακολούθησαν από τη διακοπή της θεραπείας ($p = NS$, Mann-Whitney test).

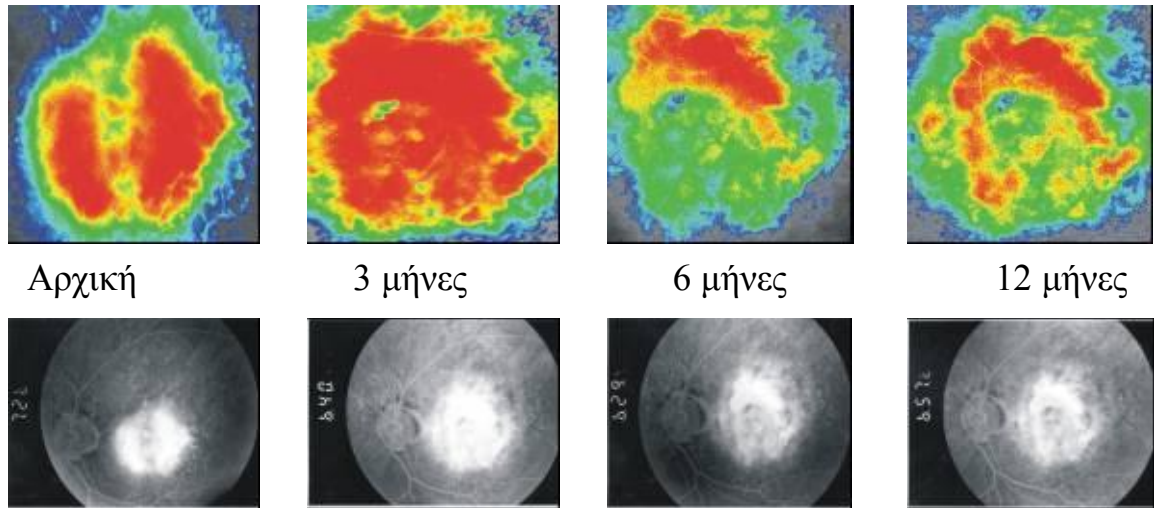
Πίνακας 5-4: Μεταβολή στην ένταση υπερφθορισμού από την έναρξη ως τους 6 μήνες Ένταση υπερφθορισμού (αυθαίρετες μονάδες)

Ομάδα	Έναρξη	p#	6 μήνες μετά	p#	Διαφορά	p#
Μελέτης	173.5 ± 10.7	NS	158.9 ± 6.1	NS	-14.5 ± 12.0	NS
Ελέγχου	172.0 ± 9.3		177.1 ± 9.9		5.1 ± 16.0	

Δοκιμασία Mann - Whitney



Εικόνα 5-20: Μεταβολή της μέσης έντασης υπερφθορισμού με τον χρόνο. Η μέση επιφάνεια της οπτικής θηλής χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και υπολογίστηκε σε 19,000 pixels. Η κάθετη γραμμή υποδεικνύει το τέλος της περιόδου θεραπείας (6 μήνες) οπότε έληξε και η παρακολούθηση της ομάδας των μαρτύρων.



Εικόνα 5-21: Σειριακοί ψευδοχρωματικοί χάρτες (άνω) και εικόνες από την όψιμη φάση της φλουροαγγειογραφίας (κάτω) από την έναρξη της μελέτης ως τους 12 μήνες για τον ασθενή με αύξοντα αριθμό 6 της ομάδας μελέτης. Εντυπωσιακή είναι η μείωση της επιφάνειας υπερφθορισμού (κόκκινο) κατά τη διάρκεια της θεραπείας με λανρεοτίδη (από την έναρξη ως τους 6 μήνες). Η σχετική επιδείνωση που εμφανίζεται μετά τη διακοπή της θεραπείας (από τους 6 ως τους 12 μήνες) μπορεί να υποδηλώνει την ανάγκη συνέχισης της θεραπείας πέραν του 6μήνου. Η οπτική οξύτητα του συγκεκριμένου ασθενούς αυξήθηκε κατά μία γραμμή της κλίμακας Snellen και διατηρήθηκε αμετάβλητη σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Συμπεράσματα:

1. Η ενδομυϊκή χορήγηση λανρεοτίδης δεν αποδείχτηκε αποτελεσματική για τη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που οφείλεται σε εκφύλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία.
2. Παρατηρήθηκε όμως τάση για σταθεροποίηση της οπτικής οξύτητας και βελτίωση της φλουροαγγειογραφικής εικόνας κατά τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου η οποία και δεν διατηρήθηκε μετά τη διακοπή του φαρμάκου.

Μέρος



Συζήτηση

Κεφ. 6^ο: Συζήτηση - Μελλοντικές Προοπτικές

Βιβλιογραφία

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανίχνευση της σωματοστατίνης στα κύτταρα ΜΕΑ

Η σωματοστατίνη έχει εντοπιστεί εδώ και 30 περίπου χρόνια στον νευροαμφιβληστροειδή διαφόρων ειδών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, (Rorstad *et al.*, 1979, Cristiani *et al.*, 2002, Elbadri *et al.*, 1991, Kirsch and Leonhardt, 1979, Rorstad *et al.*, 1980, Sagar and Marshall, 1988, Shapiro *et al.*, 1979).

Γνωρίζουμε επίσης ότι η σωματοστατίνη παράγεται τοπικά στον οφθαλμό και ιδιαίτερα στον έσω αμφιβληστροειδή. Σε αυτό το συμπέρασμα οδήγησαν παρατηρήσεις σε ζώα όπως ότι η ανοσοδραστικότητα για την σωματοστατίνη παραμένει σε παρασκευάσματα αμφιβληστροειδούς βατράχου και αρουραίου ακόμα και ένα χρόνο μετά την εκτομή του οπτικού νεύρου, ενώ χάνεται μετά από την εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων (Lake and Patel, 1980). Επιπρόσθετα, στον άνθρωπο έχει βρεθεί το γονίδιο για τη σωματοστατίνη σε παρασκευάσματα αμφιβληστροειδή φυσιολογικών οφθαλμών (van Hagen *et al.*, 2000, Yoshida *et al.*, 2002), ενώ έχει υπολογιστεί ότι η συγκέντρωση της σωματοστατίνης στο υαλώδες είναι μεγαλύτερη από ότι στον ορό του αίματος (Simo *et al.*, 2002). Τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η σωματοστατίνη παράγεται στον αμφιβληστροειδή. Η αναλογία όμως σωματοστατίνης-14 και σωματοστατίνης-28 διαφέρει ανάμεσα στα είδη, ενώ στο ίδιο είδος η συγκέντρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή παρουσιάζει εποχική διακύμανση (Larsen, 1995).

Κατά την έναρξη αυτής της διατριβής δεν υπήρχαν αναφορές σχετικές με την ύπαρξη σωματοστατίνης στο ΜΕΑ. Ανιχνεύσαμε την σωματοστατίνη-14 στα κύτταρα D407 και προσδιορίσαμε για πρώτη φορά ποσοτικά τη συγκέντρωσή της σε 0.56 ± 0.13 picomoles/mg πρωτεΐνης. Ακολούθησε η μελέτη των Carrasco και συνεργατών (Carrasco *et al.*, 2007) οι οποίοι εξέτασαν με RT-PCR και ανοσοϊστοχημεία πτωματικούς οφθαλμούς φυσιολογικών και διαβητικών ασθενών για να βρουν ότι και στις δύο ομάδες το mRNA αλλά και η ανοσοδραστικότητα για την σωματοστατίνη ήταν υψηλότερα στο ΜΕΑ από ότι στον αμφιβληστροειδή.

Τα επίπεδα της σωματοστατίνης έχουν μετρηθεί με ραδιοανοσοανίχνευση και στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Kiagiadaki *et al.*, 2008, Mastrodimou and Thermos, 2004). Η σύγκριση των τιμών αυτών με την τιμή που βρήκαμε για τα κύτταρα του πειραματικού μας μοντέλου δεν είναι δυνατή, λόγω της διαφορετικότητας των ιστών, των ειδών και των μονάδων μέτρησης. Επίσης, η σύγκριση αυτής της συγκέντρωσης της σωματοστατίνης με την συγκέντρωση άλλων νευροπεπτιδίων (Bagnoli *et al.*, 2003, Elbadri *et al.*, 1991, Tervo

et al., 1982), δεν είναι δυνατή καθώς δεν έχουν γίνει υπολογισμοί αποκλειστικά για το MEA.

Μελέτη της έκφρασης και παρουσίας υποδοχέων σωματοστατίνης στην κυτταρική σειρά D407

Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης είναι μεμβρανικοί υποδοχείς υψηλής συγγένειας που ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων των συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες (Patel, 1999). Η έκφραση των υποδοχέων της σωματοστατίνης διαφέρει ανάμεσα στους ιστούς και τα είδη και ο $ss2_2$ είναι ο υπότυπος που απαντάται συχνότερα (Patel, 1999, Reubi *et al.*, 1997). Στα κύτταρα των θηλαστικών η ενεργοποίηση των υποδοχέων της σωματοστατίνης οδηγεί, μέσα από πολύπλοκους μηχανισμούς μετάδοσης σήματος, σε αναστολή λειτουργιών όπως είναι η έκκριση αυξητικών παραγόντων, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων (Grant *et al.*, 1993, Patel, 1999, Schindler *et al.*, 1996).

Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στη θεραπευτική του οφθαλμού είχαμε, κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής, πολύ λίγα στοιχεία σχετικά με την κατανομή και τη λειτουργία των διαφόρων υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης στον οφθαλμό του ανθρώπου και ιδιαίτερα στο MEA.

Χρησιμοποιώντας συνδυασμό μεθόδων (RT-PCR, ανοσοϊστοχημεία, ανοσοαποτύπωση και φαρμακολογικές μελέτες δέσμησης) μπορέσαμε να εντοπίσουμε όλους τους υποτύπους των υποδοχέων σωματοστατίνης στα κύτταρα MEA.

Ο υποδοχέας $ss1_1$

Η RT-PCR ανίχνευσε το ειδικό mRNA για τον $ss1_1$ υποδοχέα αλλά η τεχνική του ανοσοφθορισμού δεν ανέδειξε την παρουσία του υποδοχέα αυτού στα κύτταρα D407. Εντούτοις, με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη του $ss1_1$ υποδοχέα. Τέλος, οι μελέτες δέσμησης έδειξαν ότι το $ss1_1$ εκλεκτικό ανάλογο CH275 εκτόπισε την ειδική δέσμηση της [125 I]Tyr 11 -SRIF-14, εύρημα το οποίο υποδεικνύει την παρουσία $ss1_1$ υποδοχέων στην μεμβράνη των κυττάρων D407.

Οι Klisovic και συνεργάτες οι οποίοι μελέτησαν καλλιέργειες κυττάρων MEA, εντόπισαν τον υποδοχέα $ss1_1$ στην κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα, το επιπυρήνιο και τον πυρήνα των κυττάρων αυτών (Klisovic *et al.*, 2001). Άλλες μελέτες σε MEA αρουραίου και ιστό MEA ανθρώπου αναφέρουν επίσης ανοσοδραστικότητα για τον $ss1_1$ υποδοχέα (van Hagen *et al.*, 2000, Vasilaki *et al.*, 2002). Η αδυναμία εντοπισμού $ss1_1$ ανοσοδραστικότητας στη δική μας μελέτη, μπορεί να οφείλεται σε τεχνικές διαφορές

μεταξύ των μελετών (κυτταρική σειρά D407 στην παρούσα μελέτη σε αντίθεση με την ATCC-2303, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι διαφορές ανάμεσα στα είδη).

Ο υποδοχέας sst_2

Με την RT-PCR ανιχνεύσαμε mRNA για τον υποδοχέα sst_2 , και με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης βρήκαμε την πρωτεΐνη του sst_2 υποδοχέα στα κύτταρα D407. Επίσης εντοπίσαμε και ανοσοδραστικότητα για τον sst_{2B} , κυρίως γύρω και μέσα στον πυρήνα του κυττάρου MEA.

Η RT-PCR και ανοσοϊστοχημικές μελέτες κατέδειξαν την παρουσία sst_{2A} σε ιστό MEA ανθρώπου και σε πρωτογενείς καλλιέργειες MEA (Lambooij *et al.*, 2000). Εντούτοις, δεν είδαμε ανοσοδραστικότητα για τον sst_{2A} στην παρούσα μελέτη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται, όπως και στην περίπτωση του sst_1 υποδοχέα, σε τεχνικές διαφορές μεταξύ των δύο μελετών. Ενδοκυττάρια εντόπιση ανοσοδραστικότητας για τον sst_2 υποδοχέα αναφέρεται και από τους Klisovic και συνεργάτες (Klisovic *et al.*, 2001) οι οποίοι μελέτησαν κύτταρα MEA (σειρά ATCC-2303) με ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα κοινό για τους sst_{2A} και sst_{2B} . Παρατήρησαν μάλιστα ότι η ανοσοδραστικότητα για τον sst_2 στη μελέτη τους ήταν πολύ εντονότερη από την αναφερόμενη για τον sst_{2A} σε προηγούμενες μελέτες (Lambooij *et al.*, 2000). Επομένως είναι πολύ πιθανό στη μελέτη αυτή, όπως και στη δική μας, το μεγαλύτερο μέρος της ανοσοδραστικότητας για τον sst_2 στο MEA να οφείλεται στην παρουσία του υποδοχέα sst_{2B} .

Παρόλο που οι υποδοχείς σωματοστατίνης είναι μεμβρανικοί υποδοχείς, διαπιστώσαμε ενδοπυρηνική κυρίως ανοσοδραστικότητα για τον sst_{2B} στα κύτταρα MEA. Το σύμπλεγμα υποδοχέα σωματοστατίνης-αγωνιστή μετά τον σχηματισμό του υφίσταται εσωτερίκευση (internalization) (Hukovic *et al.*, 1996). Μετατίθεται δηλαδή προοδευτικά από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, και η διαδικασία αυτή της μετάθεσης είναι ειδική για το κύτταρο και τον υποδοχέα (Dournaud *et al.*, 1998, Hornick *et al.*, 2000, Hukovic *et al.*, 1996). Η ενδοπυρηνική εντόπιση του υποδοχέα sst_2 στα κύτταρα MEA μπορεί να σημαίνει ότι η σωματοστατίνη που βρίσκεται στα κύτταρα αυτά ρυθμίζει τους μεμβρανικούς υποδοχείς της προκαλώντας την εσωτερίκευση τους. Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή, οι Reubi και συνεργάτες (Reubi *et al.*, 2000) ανακοίνωσαν ότι η σωματοστατίνη που παράγεται από όγκους δρα αυτοκρινικά προκαλώντας εσωτερίκευση των υποδοχέων της, ενώ οι Dournaud και συνεργάτες (Dournaud *et al.*, 1998) έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα ενδογενούς σωματοστατίνης στον εγκέφαλο αρουραίου προκαλούν εσωτερίκευση των sst_{2A} υποδοχέων της. Επιπλέον οι Koenig και συνεργάτες (Koenig *et al.*, 1998) αναφέρουν

ότι οι αγωνιστές της σωματοστατίνης καθώς και ο υποδοχέας sst_2 κυκλοφορούν ακολουθώντας έναν διαρκή κύκλο από την επιφάνεια στο εσωτερικό του κυττάρου. Η σημασία των ευρημάτων μας και αυτών των Klisovic και συνεργατών (Klisovic *et al.*, 2001) σχετικά με τον εντοπισμό των sst_1 και sst_2/sst_{2B} μέσα και γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου MEA, πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο.

Ο υποδοχέας sst_3

Ανοσοδραστικότητα για τον sst_3 δεν έχει αναφερθεί ως τώρα στο MEA ή των αμφιβληστροειδή θηλαστικών. Εντούτοις, mRNA για τον υπότυπο αυτό έχει ανιχνευτεί με RT-PCR σε αμφιβληστροειδή αρουραίου (Mori *et al.*, 1997) και ανθρώπου (Klisovic *et al.*, 2001). Στην παρούσα μελέτη δεν εντοπίσαμε mRNA για τον sst_3 με RT-PCR στα κύτταρα D407 και το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τους Klisovic και συνεργάτες (Klisovic *et al.*, 2001) οι οποίοι επίσης δε βρήκαν sst_3 mRNA στο MEA (κύτταρα ATCC-2303). Στις μελέτες ανοσοαποτύπωσης όμως ανιχνεύσαμε την πρωτεΐνη του sst_3 , εύρημα ενδεικτικό της παρουσίας του υποδοχέα αυτού στα κύτταρα D407.

Ο υποδοχέας sst_4

Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι έχουν δείξει την παρουσία του sst_4 στα γαγγλιακά κυρίως κύτταρα του αμφιβληστροειδή ποντικού και αρουραίου (Cristiani *et al.*, 2002, Vasilaki *et al.*, 2002). Το γονίδιο για τον sst_4 έχει επίσης εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Mori *et al.*, 1997), ποντικού (Cristiani *et al.*, 2002) και ανθρώπου (Klisovic *et al.*, 2001). Στην παρούσα μελέτη δεν εντοπίσαμε mRNA για τον sst_4 με RT-PCR στα κύτταρα D407 και το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τους Klisovic και συνεργάτες (Klisovic *et al.*, 2001), οι οποίοι επίσης δε βρήκαν sst_4 mRNA στο MEA (κύτταρα ATCC-2303). Στις μελέτες ανοσοαποτύπωσης όμως εντοπίσαμε την πρωτεΐνη του sst_4 , εύρημα ενδεικτικό της παρουσίας του υποδοχέα αυτού στα κύτταρα D407.

Ο υποδοχέας sst_5

Ανοσοδραστικότητα για τον sst_5 υποδοχέα εντοπίστηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η ύπαρξη των sst_5 επιβεβαιώθηκε με όλες τις τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε. Η μελέτη μας έδωσε για πρώτη φορά δεδομένα για την εντόπιση των sst_5 υποδοχέων της σωματοστατίνης στα κύτταρα MEA. Οι Mori και συνεργάτες (Mori *et al.*, 1997) είχαν ανιχνεύσει mRNA για τους sst_5 σε παρασκευάσματα οπισθίου διαμερίσματος οφθαλμών αρουραίου από τα

οποία είχε αφαιρεθεί ο αμφιβληστροειδής. Οι Stroh και συνεργάτες (Stroh *et al.*, 2000) μελέτησαν την ενδοκυττάρια δυναμική των υποδοχέων sst_5 σε κύτταρα COS-7, την εσωτερίκευση και την ανακύκλωση τους. Περιέγραψαν λοιπόν την κινητική των υποδοχέων αυτών οι οποίοι από την κυτταρική μεμβράνη εσωτερικεύονται στο κυτταρόπλασμα σε σχηματισμούς που μοιάζουν με σωμάτια Golgi. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με την ενδοκυττάρια ανοσοδραστικότητα για τον sst_5 που παρατηρήσαμε στην δική μας μελέτη, υποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας αυτός ακολουθεί και στα κύτταρα MEA παρόμοια διαδικασία εσωτερίκευσης και ανακύκλωσης.

Η ταυτόχρονη παραγωγή της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της από κύτταρα MEA υποδεικνύει την αυτοκρινική δράση της σωματοστατίνης στον ιστό αυτό. Η ακριβής φυσιολογική σημασία των ευρημάτων μας πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, όμως με βάση τα αποτελέσματα μας αυτά και τα αποτελέσματα άλλων μπορούμε να διαμορφώσουμε ορισμένες υποθέσεις σχετικά με το ρόλο της σωματοστατίνης στο MEA. Η σωματοστατίνη μπορεί να επιδρά στην φυσιολογία του MEA ενεργοποιώντας διαφορετικούς υποτύπους υποδοχέων. Δεν αποκλείεται όμως η σωματοστατίνη που παράγεται στο MEA να επιδρά στο νευροαμφιβληστροειδή και ειδικότερα στους υποδοχείς της που βρίσκονται στη στιβάδα των φωτουποδοχέων, (Akorian *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 1999, Vasilaki *et al.*, 2001, Vasilaki *et al.*, 2002) ασκώντας έτσι παρακρινική δράση και επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση MEA και νευροαμφιβληστροειδή. Είναι επίσης πιθανόν κάποιοι από τους υποδοχείς σωματοστατίνης να δεσμεύονται και από άλλα συγγενή νευροπεπτίδια όπως η κορτιστατίνη (Siehler *et al.*, 1998).

Η αλληλεπίδραση της σωματοστατίνης με το μονοξείδιο του αζώτου στα κύτταρα MEA

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του αμφιβληστροειδούς (Goldstein *et al.*, 1996, Becquet *et al.*, 1997) . Εντούτοις, κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής δεν είχε μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος του NO και αυτού της σωματοστατίνης.

Θελήσαμε να εξετάσουμε τον πιθανό ρόλο της σωματοστατίνης στη ρύθμιση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα κύτταρα MEA ανθρώπου. Αρχικά αναζητήσαμε στα κύτταρα αυτά την παρουσία NADPH διαφοράσης, που αποτελεί δείκτη της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (Dawson *et al.*, 1991). Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν συνεντοπισμό της NADPH διαφοράσης με τους υποτύπους sst_1 , $sst_{2A/2B}$ και sst_4 των υποδοχέων της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Vasilaki *et al.*,

2001, Vasilaki *et al.*, 2002). Ανιχνεύσαμε την NADPH διαφοράση, ενώ η RT-PCR κατέδειξε την παρουσία της iNOS, της επαγόμενης ισομορφής της συνθετάσης του NO στα κύτταρα D407. Τα ευρήματα μας συμφωνούν με αυτά των Faure και συνεργατών, οι οποίοι επίσης εντόπισαν την iNOS σε κύτταρα MEA διαφόρων ειδών (Faure *et al.*, 1999).

Η σωματοστατίνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις (10^{-10} - 10^{-9}), προκάλεσε αύξηση της παραγωγής μεταβολιτών του NO (NOx) από τα κύτταρα MEA με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Χρησιμοποιήσαμε ειδικούς αγωνιστές για κάθε υπότυπο των υποδοχέων της σωματοστατίνης. Από αυτούς, μόνο το sst₂ ανάλογο MK678, μιμήθηκε το αποτέλεσμα της σωματοστατίνης στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα D407. Το ειδικό για τους sst₅ ανάλογο (L-817,818), παρουσίασε μια τάση αύξησης των επιπέδων NOx η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αναμέναμε να παρατηρήσουμε αύξηση των επιπέδων του NOx- με το ανάλογο αυτό το οποίο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50nM δεσμεύεται επίσης και με τους sst₂ υποδοχείς (Rohrer *et al.*, 1998). Ο sst₂ ανταγωνιστής CYN-154806 (Feniuk *et al.*, 2000) αναίρεσε την επίδραση της σωματοστατίνης και της MK-678, αποδεικνύοντας έτσι ότι η δράση της σωματοστατίνης στην παραγωγή NOx από τα κύτταρα MEA, προκαλείται από ενεργοποίηση των sst₂ υποδοχέων, όπως συμβαίνει και στον αμφιβληστροειδή (Vasilaki *et al.*, 2002).

Η ικανότητα της σωματοστατίνης σε μικρές συγκεντρώσεις της τάξης των 0.1 και 1.0nM να επηρεάζει την παραγωγή NOx από τα κύτταρα MEA, υποδεικνύει ότι η σωματοστατίνη που παράγεται από τα κύτταρα αυτά (0.56pmoles/mg protein) μπορεί και ρυθμίζει την παραγωγή NO *in vivo*.

Έχει δειχθεί ότι η παραγωγή NOx στο MEA ανθρώπου επάγεται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Goureau *et al.*, 1994, Kutty *et al.*, 1995). Επιπλέον το NO σταθεροποιεί τις διεπιθηλιακές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων MEA συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση του αίματο-οφθαλμικού φραγμού (Zech *et al.*, 1998) και τη ρύθμιση της ανοσολογικής και της φλεγμονώδους απάντησης του οφθαλμού (Cai and Boulton, 2002, Dezsi *et al.*, 1997, Holtkamp *et al.*, 2001). Τα αποτελέσματα από τη μελέτη μας υποδεικνύουν ότι η σωματοστατίνη μπορεί να επηρεάζει τις παραπάνω λειτουργίες ρυθμίζοντας την παραγωγή NO από τα κύτταρα MEA. Η ακριβής φυσιολογική σημασία αυτής της δράσης της σωματοστατίνης όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Επίδραση της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ΜΕΑ

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το μελάγχρουν επιθήλιο είναι μη παραγωγικό, αλλά τροποποιείται σε καταστάσεις όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς και η παραγωγική υαλοειδο-αμφιβληστροειδοπάθεια. Προκειμένου να στηρίξουμε πιθανό θεραπευτικό ρόλο της σωματοστατίνης στις καταστάσεις αυτές, μας ενδιέφερε ειδικά να εξετάσουμε αν η σωματοστατίνη επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς ανθρώπινης προέλευσης.

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η σωματοστατίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό διαφόρων κυττάρων (Olias *et al.*, 2004). Έχει δειχθεί ότι η σωματοστατίνη επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω ενεργοποίησης του ενζύμου τυροσινοφωσφατάση και προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωση / νέκρωση (Ferjoux *et al.*, 2000, Sharma *et al.*, 1999). Ειδικότερα, στο μελάγχρουν επιθήλιο του κουνελιού η οκτρεοτίδη που είναι sst_2 ανάλογο της σωματοστατίνης έχει δειχθεί ότι ασκεί αντιπολλαπλασιαστική δράση (Luo *et al.*, 1996), ενώ σε κυτταρικές καλλιέργειες μελάγχρου επιθηλίου βοός, ανέστειλε τον επαγόμενο από αυξητικούς παράγοντες κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Amann *et al.*, 2000).

Με βάση τα παραπάνω προχωρήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της στη βιωσιμότητα των κυττάρων ΜΕΑ ανθρώπου και να προσδιορίσουμε κατά πόσο οι πιθανές αλλαγές στη βιωσιμότητα οφείλονται στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τον αποπτωτικό θάνατο ή τη νέκρωση των κυττάρων. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η σωματοστατίνη μειώνει τον αριθμό των κυττάρων ΜΕΑ με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο (10^{-8} - 10^{-4} M) με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν απόπτωση, νέκρωση και μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η δράση της αυτή φαίνεται ότι γίνεται μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των φωσφατασών της τυροσίνης (SHPs), εφόσον αναστρέφεται παρουσία του αναστολέα των φωσφατασών της τυροσίνης sodium orthovanadate. Η ανίχνευση της SHP-1 στα κύτταρα ΜΕΑ με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, στήριξε περαιτέρω την υπόθεση αυτή.

Τα ευρήματά μας έρχονται σε συμφωνία με τα στοιχεία άλλων μελετών, κυρίως σε κύτταρα παγκρεατικών όγκων, όπου φαίνεται ότι η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της αναστέλλουν τη μιτογόνο δράση αυξητικών παραγόντων με τη συμμετοχή των φωσφατασών της τυροσίνης (Bousquet *et al.*, 1998, Florio *et al.*, 1999, Liebow *et al.*, 1989, Lopez *et al.*, 1997). Πρόσφατα, ανακοινώθηκε ότι η SHP-1 συμμετέχει στο συνεργιστικό

μηχανισμό μέσω του οποίου οι υποδοχείς sst_2 και αυτοί για τον TNF- α προκαλούν απόπτωση μέσω κασπασών (Guillermet-Guibert *et al.*, 2007). Εκτός από την SHP-1 και άλλες φωσφατάσες φαίνεται ότι εμπλέκονται στις δράσεις της σωματοστατίνης στο MEA (Ferjoux *et al.*, 2003, Florio *et al.*, 1999).

Η χρήση των εκλεκτικών αναλόγων (Rohrer *et al.*, 1998) βοήθησε στο να διαπιστώσουμε ότι όλοι οι υπότυποι των υποδοχέων της συμμετέχουν στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της σωματοστατίνης. Προκειμένου να εξακριβώσουμε τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η σωματοστατίνη μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων MEA, μετρήσαμε την απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων αυτών μετά από επίδραση της σωματοστατίνης και των εκλεκτικών αναλόγων της.

Ενεργοποίηση του sst_1 υποδοχέα αύξησε την απόπτωση (ως 150%) στις ίδιες συγκεντρώσεις που μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων (10^{-5} , 10^{-4} M). Ενεργοποίηση του υποδοχέα sst_5 προκάλεσε απόπτωση των κυττάρων μικρότερη του 25%, εντούτοις το αποτέλεσμα αυτό ήταν εμφανές σε μικρότερες συγκεντρώσεις του sst_5 εκλεκτικού αγωνιστή (10^{-10} - 10^{-4} M), όπως παρατηρήθηκε και με την σωματοστατίνη. Τα παραπάνω ευρήματα, επομένως, υποδεικνύουν ότι η σωματοστατίνη προκαλεί απόπτωση με ενεργοποίηση των υποδοχέων της sst_1 και sst_5 . Τα εκλεκτικά για τους υποδοχείς αυτούς ανάλογα, προκάλεσαν επιπλέον νέκρωση των κυττάρων MEA στις υψηλότερες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (10^{-4} M).

Δεν παρατηρήθηκε αύξηση της απόπτωσης μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων sst_2 , sst_3 και sst_4 . Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα άλλων. Παλαιότερη μελέτη ανέφερε ότι ενεργοποίηση του υποδοχέα sst_3 οδήγησε σε πρόκληση απόπτωσης αλλά όχι αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά CHO (Sharma *et al.*, 1996). Στη συνέχεια, αναφέρθηκε ότι ο υποδοχέας sst_2 συμμετέχει σε αποπτωτικά γεγονότα στο προλακτίνωμα αρουραίου (Gruszka *et al.*, 2001) και σε αδενώματα της υπόφυσης που εκκρίνουν αυξητική ορμόνη (Luciani *et al.*, 2005). Η οκτρεοτίδη φάνηκε να προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου μέσω ενεργοποίησης των sst_2 και όχι των sst_5 υποδοχέων (Ferrante *et al.*, 2006). Επιπλέον, ο υποδοχέας sst_2 φάνηκε να ευαισθητοποιεί με μεταλλαγμένους ινοβλάστες ποντικού στην προκαλούμενη από τον TNF- α απόπτωση (Guillermet-Guibert *et al.*, 2007). Η ασυμφωνία των ευρημάτων μας με τις μελέτες στις οποίες αναφερθήκαμε, μπορεί να οφείλεται σε διαφορές μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα sst_2 δεν προκάλεσε ούτε απόπτωση ούτε νέκρωση των κυττάρων MEA ανθρώπου, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αγωνιστών

που χρησιμοποιήθηκαν (10^{-4}M). Επομένως, η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που παρατηρήσαμε με τη χρήση του sst_2 εκλεκτικού αναλόγου, μπορεί να αντιπροσωπεύει την επίδραση του τελευταίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η σωματοστατίνη και τα $\text{sst}_{2/5}$ ανάλογα της έχουν δείξει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε διάφορους τύπους κυττάρων (Ferjoux *et al.*, 2000, Grant *et al.*, 1993, Sharma *et al.*, 1996). Στο MEA η οκτρεοτίδη ασκεί επίσης αντιπολλαπλασιαστική δράση (Amann *et al.*, 2000, Luo *et al.*, 1996)

Η επίδραση του υποδοχέα sst_2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται έχουν μελετηθεί σε βάθος. Έχει αποδειχθεί η συμμετοχή των φωσφατασών της τυροσίνης SHP-1 and SHP-2 στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από τους sst_2 (Ferjoux *et al.*, 2003, Lopez *et al.*, 1997). Τα ευρήματα από την παρούσα μελέτη επίσης υποδεικνύουν την συμμετοχή της SHP-1 στη δράση της σωματοστατίνης πάνω στη βιωσιμότητα των κυττάρων MEA.

Η νευρωνική συνθετάση του NO αποτελεί υπόστρωμα για την SHP-1 που συμμετέχει στη ρύθμιση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της σωματοστατίνης μέσω ενός μηχανισμού μετάδοσης σήματος που περιλαμβάνει το NO και το cGMP (Lopez *et al.*, 2001). Παρόλο που δείξαμε νωρίτερα ότι η σωματοστατίνη ρυθμίζει την παραγωγή NO από τα κύτταρα MEA μέσω των sst_2 υποδοχέων της (Vasilaki *et al.*, 2004), θα ήταν πολύ απλοϊκό να υποθέσουμε ότι και η ανασταλτική της δράση στη βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών γίνεται μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει SRIF/ sst_2 /SHP-1/NO/cGMP. Αυτό γιατί η δράση του NO (ανασταλτική ή μη) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ασκείται με πολύπλοκους μηχανισμούς μετάδοσης σήματος όπου συμμετέχει πληθώρα παραγόντων (Villalobo, 2006).

Ενεργοποίηση των υποδοχέων sst_3 και sst_4 δεν οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, αλλά οι εκλεκτικοί για τους υποδοχείς αυτούς αγωνιστές, προκάλεσαν κυτταρική νέκρωση στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (10^{-4}M , 10-20% μείωση των ζωντανών κυττάρων). Στις συγκεντρώσεις αυτές τα ανάλογα για τους υποδοχείς sst_3 και sst_4 μπορεί να ενεργοποιούν επίσης και τους υποδοχείς sst_5 (Rohrer *et al.*, 1998) και να προκαλούν κυτταρική νέκρωση μέσω των υποδοχέων αυτών.

Τα ευρήματα από την παρούσα μελέτη υποστηρίζουν ότι η σωματοστατίνη, ενεργοποιώντας τους διαφορετικούς υπότυπους των υποδοχέων της, επηρεάζει με διαφορετικούς μηχανισμούς τη βιωσιμότητα των κυττάρων MEA ανθρώπου. Ασκεί αποπτωτική και νεκρωτική δράση μέσω των υποδοχέων της sst_1 και sst_5 , ενώ η ενεργοποίηση των υπόλοιπων υποτύπων (sst_{2-4}) μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων πιθανόν μέσω αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Κλινική μελέτη της χρήσης της λανρεοτίδης στην θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που σχετίζεται με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (ΗΕΩ).

Διαμορφώσαμε την υπόθεση ότι ένα ανάλογο της σωματοστατίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης, βασιζόμενοι σε πειραματικές μελέτες *in vitro* σχετικές με την αντιπολλαπλασιαστική δράση της σωματοστατίνης (Luo *et al.*, 1996, Spraul *et al.*, 1999) και σε δεδομένα για την αποτελεσματικότητα των αναλόγων της σωματοστατίνης σε άλλες μορφές οφθαλμικής νεοαγγείωσης και ιδιαίτερα στη παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Grant *et al.*, 2000, Mallet *et al.*, 1992, McCombe *et al.*, 1991, Smith *et al.*, 1997, Danesi and Del Tacca, 1996). Με βάση τα παραπάνω η σωματοστατίνη και τα ανάλογα της μπορεί να ασκούν την αντι-αγγειογενετική τους δράση είτε άμεσα, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλικών κυττάρων των αγγείων, είτε έμμεσα αναστέλλοντας τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης (insulin-like growth factor (IGF)-I).

Ως την έναρξη της παρούσας μελέτης, ήταν γνωστή η παρουσία της σωματοστατίνης στο έσω αμφιβληστροειδή πολλών ειδών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Green and Enger, 1993, Helboe and Moller, 1999, Johnson *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 1999, Klisovic *et al.*, 2001, Liapakis *et al.*, 1993, Vasilaki *et al.*, 2001). Ήταν επίσης γνωστό ότι ο νευροαμφιβληστροειδής και το ΜΕΑ συνθέτουν υποδοχείς για τη σωματοστατίνη (Grant *et al.*, 1993, Klisovic *et al.*, 2001). Εκτός από την αντι-αγγειογενετική της δράση, η παρουσία της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στο ΜΕΑ μπορεί να αποτελεί ένδειξη και για το ότι η σωματοστατίνη δρα αυτοκρινικά στον ιστό αυτό, συμβάλλοντας στην ρύθμιση της λειτουργίας του (van Hagen *et al.*, 2000). Οι Lambouij και συνεργάτες ανίχνευσαν τον υποδοχέα sst_{2A} της σωματοστατίνης σε νεοσχηματισμένες χοριοειδικές νεοαγγειακές μεμβράνες ανθρώπου (Lambouij *et al.*, 2000). Τα παραπάνω στοιχεία καθιστούν την σωματοστατίνη και ιδιαίτερα τα sst_2 ανάλογα της πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες και για τη χοριοειδική νεοαγγείωση.

Σχεδιάσαμε μια τυχαιοποιημένη, συγκριτική προδρομική κλινική μελέτη για να εξετάσουμε την αποτελεσματικότητα της Λανρεοτίδης (BIM 23014) στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που σχετίζεται με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Οι ασθενείς που συμμετείχαν τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες και έλαβαν ενδομυϊκά Λανρεοτίδη ή placebo, κάθε 15 ημέρες, επί 6 μήνες. Οι ασθενείς στην ομάδα ελέγχου παρακολούθηθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ενώ οι ασθενείς στην ομάδα μελέτης παρακολούθηθηκαν και για 6 μήνες μετά.

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, όσον αφορά τη μεταβολή στην οπτική οξύτητα και τις παραμέτρους της φλουροαγγειογραφίας. Στους 6 μήνες που διήρκεσε η θεραπεία, η οπτική οξύτητα στην ομάδα μελέτης ήταν και παρέμεινε καλύτερη από ότι στην ομάδα ελέγχου. Μετά τη διακοπή της θεραπείας όμως η οπτική οξύτητα παρουσίασε μείωση. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να σημαίνουν ότι η θεραπεία με Λανρεοτίδη συνέβαλε στην σταθεροποίηση της οπτικής οξύτητας. Σταθεροποίηση της οπτικής οξύτητας σε ασθενείς με χοριοειδική νεοαγγείωση κατά τη διάρκεια θεραπείας με ένα άλλο ανάλογο της σωματοστατίνης, την οκτρεοτίδη (Sandostatin-LAR), αναφέρθηκε και από τους van Hagen και συνεργάτες (van Hagen *et al.*, 2000)

Μεταξύ των αναλόγων της σωματοστατίνης, επιλέξαμε τη Λανρεοτίδη γιατί είναι ss_{2} αγωνιστής με παρατεταμένη δράση και ενδείκνυται για μακροχρόνια θεραπεία. Χορήγηση του φαρμάκου ανά 15ήμερο προκαλεί θεραπευτικά επίπεδα στο αίμα ασθενών με θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια (Krassas *et al.*, 1997). Βασιστήκαμε σε αυτό το δεδομένο για να καθορίσουμε το θεραπευτικό σχήμα. Δεν μετρήσαμε επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα των ασθενών μας. Ακόμα και αν είχε γίνει αυτό, η πληροφορία αυτή δεν θα μας βοηθούσε να βγάλουμε αξιόπιστα συμπεράσματα για τα επίπεδα του φαρμάκου στον οφθαλμό. Ο μόνος ακριβής τρόπος θα ήταν να μετρήσουμε τα επίπεδα της λανρεοτίδης στους οφθαλμικούς ιστούς (αμφιβληστροειδής, χοριοειδής και υαλώδες), κάτι που δεν είναι εφικτό σε οφθαλμούς ζώντων με τις μεθόδους που διαθέτουμε σήμερα.

Στην εξέλιξη της παρούσας διατριβής προέκυψαν βιβλιογραφικά δεδομένα που ενισχύουν την αρχική υπόθεση μας για την αποτελεσματικότητα της σωματοστατίνης στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης. Οι Bezerra και συνεργάτες (Bezerra *et al.*, 2005) χρησιμοποίησαν μοντέλο χοριοειδικής νεοαγγείωσης με LASER σε ποντίκια και έδειξαν ότι η ενδοβολβική έγχυση του συμπλόκου καμποθεκίνης – σωματοστατίνης 1-3 εβδομάδες μετά την εφαρμογή του LASER, ανέστειλε την ανάπτυξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης.

Η σωματοστατίνη αποδείχτηκε επίσης αποτελεσματική στη θεραπεία του κυστεοειδούς οιδήματος της ωχράς (Missotten *et al.*, 2007, Kafkala *et al.*, 2006, Kuijpers *et al.*, 1998, Papadaki *et al.*, 2005). Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη δράση της σωματοστατίνης στην πάθηση αυτή ανάμεσα στους οποίους είναι και η σταθεροποίηση του αιματο-οφθαλμικού φραγμού. Η σταθεροποίηση της οπτικής οξύτητας και της έντασης του υπερφθορισμού κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Λανρεοτίδη, μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην αποκατάσταση του διαταραγμένου έσω αιματο-

οφθαλμικού φραγμού, σύστοιχα με την χοριοειδική νεοαγγείωση (Eagle, 1984), δράση που αίρεται μετά από τη διακοπή της θεραπείας.

Επιπλέον, η έκπτωση της οπτικής οξύτητας και της έντασης υπερφθορισμού στην ομάδα μελέτης μετά τη διακοπή της θεραπείας, υποδεικνύει την ανάγκη για περισσότερο μακροχρόνια θεραπεία, η ακριβής διάρκεια της οποίας μένει να καθοριστεί.

Ένας άλλος προβληματισμός είναι και το στάδιο της χοριοειδικής νεοαγγείωσης όπου η δράση της σωματοστατίνης είναι περισσότερο αποτελεσματική. Όπως έχει φανεί από πειραματικές μελέτες, η σωματοστατίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του αμφιβληστροειδούς (Grant *et al.*, 1993). Επομένως, είναι πολύ πιθανόν η δράση της να μην είναι αποτελεσματική στο προχωρημένο στάδιο όπου η χοριοειδική μεμβράνη έχει αντικατασταθεί από ουλώδη ιστό (Eagle, 1984). Επίσης, η μελέτη των Lambooij και συνεργατών έδειξε ότι οι υποδοχείς sst_{2A} εκφράζονται σε νεοσχηματισμένες χοριοειδικές μεμβράνες (Lambooij *et al.*, 2000). Στη δική μας μελέτη δεν έγινε διαχωρισμός μεταξύ παλαιών η προσφάτα σχηματισμένων νεοαγγειακών μεμβρανών.

Η επιφάνεια υπερφθορισμού στην φλουοροαγγειογραφία, η οποία αποτελεί αδρό μέτρο της έκτασης της νεοαγγειακής μεμβράνης, έδειξε να αυξάνει περισσότερο στην ομάδα μελέτης από ότι στους μάρτυρες. Η αύξηση αυτή μπορεί να αντικατοπτρίζει εν μέρει την αύξηση στην επιφάνεια της χοριοειδικής νεοαγγείωσης, ή μπορεί να είναι και το αποτέλεσμα προοδευτικής απορρόφησης των αιμορραγιών του αμφιβληστροειδούς στην περιοχή της ενεργού χοριοειδικής νεοαγγείωσης. Το αίμα προκαλεί αποκλεισμό του φθορισμού και αποκρύπτει εν μέρει τη χοριοειδική νεοαγγείωση. Καθώς το αίμα απορροφάται, η υποκείμενη νεοαγγειακές μεμβράνη γίνεται περισσότερο εμφανής στην φλουοροαγγειογραφία γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί λανθασμένα ως αύξηση του μεγέθους της.

Στους ασθενείς της μελέτης μας δεν παρουσιάστηκαν παρενέργειες από τη χορήγηση της λανρεοτίδης. Παρόλαυτα δεν είναι εξακριβωμένο ότι η δόση που χρησιμοποιήθηκε δημιούργησε θεραπευτικά επίπεδα στον οφθαλμό, και ιδιαίτερα στο χοριοειδή και το ΜΕΑ. Στο μέλλον ίσως θα πρέπει να δοκιμαστούν και εναλλακτικές οδοί τοπικής χορήγησης του φαρμάκου όπως η διασκληρική ή η ενδοβολβική προκειμένου να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου με τις λιγότερες συστηματικές παρενέργειες (Ambati *et al.*, 2000, Robertson *et al.*, 1997).

Η παρούσα κλινική μελέτη αποτελεί την πρώτη τυχαίοποιημένη συγκριτική μελέτη της εκτίμησης της αποτελεσματικότητας ενός αναλόγου της σωματοστατίνης στη θεραπεία

της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που οφείλεται στην ΗΕΩ. Εξαιτίας του μικρού αριθμού του δείγματος, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας αυτής. Επιπλέον, ο σχετικά μικρός χρόνος παρακολούθησης και η διαφορά στην διάρκεια παρακολούθησης μεταξύ των δύο ομάδων δεν επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της ομάδας που έλαβε αγωγή με Λανρεοτίδη με την φυσική πορεία της νόσου.

Για τους παραπάνω λόγους κρίνονται απαραίτητες περαιτέρω τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και μακρύτερο χρόνο παρακολούθησης και πιθανόν και διαφορετικές οδούς χορήγησης του φαρμάκου προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης. Αν η θεραπεία αυτή αποδειχθεί αποτελεσματική, θα μπορεί να εφαρμοστεί στους περισσότερους ασθενείς με εξιδρωματικού τύπου ΗΕΩ, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει ως τώρα με τη θεραπεία με LASER. Επιπλέον, θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα με την φωτοδυναμική θεραπεία για την ενίσχυση του αποτελέσματος της τελευταίας και την πρόληψη των υποτροπών, σαν εναλλακτικό φάρμακο σε ασθενείς με φτωχή ανταπόκριση στους αναστολείς του VEGF, ή ακόμα και προληπτικά σε οφθαλμούς υψηλού κινδύνου για εμφάνιση χοριοειδικής νεοαγγείωσης (όπως είναι π.χ. ο υγιής οφθαλμός ασθενούς με ΗΕΩ στον άλλο οφθαλμό και η παρουσία συρρεόντων drusen) (MPSG., 1997).

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής:

1. μελετήθηκε συστηματικά η παρουσία της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στο ΜΕΑ ανθρώπου.
2. Για πρώτη φορά μελετήθηκε η επίδραση της σωματοστατίνης στο σύστημα του μονοξειδίου του αζώτου στο ΜΕΑ.
3. Δόθηκαν τα πρώτα στοιχεία για τη δράση της σωματοστατίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων ΜΕΑ
4. Πραγματοποιήθηκε η πρώτη τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη με ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη χρήση της σωματοστατίνης στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στις φυσιολογικές δράσεις της σωματοστατίνης στο ΜΕΑ (ενδοκυττάριοι μηχανισμοί απόπτωσης και μείωσης πολλαπλασιασμού) .

Περισσότερες μελέτες σε ζώα χρειάζονται προκειμένου να διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η σωματοστατίνη δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης.

Μελέτες τοξικότητας σε ζώα θα συμβάλλουν στο να καθοριστεί μία άλλη ασφαλής οδός τοπικής χορήγησης της σωματοστατίνης ή των αναλόγων της, περισσότερο κατάλληλης για τη θεραπεία παθήσεων του οφθαλμού.

Περαιτέρω τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και χρόνο παρακολούθησης και πιθανόν και διαφορετική οδό χορήγησης φαρμάκου χρειάζονται για να διευκρινιστεί η χρησιμότητα της σωματοστατίνης στην θεραπεία της παραγωγικής ΗΕΩ:

1. ως μονοθεραπεία ή
2. σε συνδυασμό με άλλες φαρμακευτικές θεραπείες (αντι-VEGF παράγοντες), ή φωτοδυναμική θεραπεία για την πρόληψη υποτροπών και
3. προφυλακτικά για την αποφυγή εκδήλωσης κλινικής νόσου σε οφθαλμούς υψηλού κινδύνου για να αναπτύξουν ΗΕΩ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adamis, A. P., Shima, D. T., Yeo, K. T., *et al.* (1993). Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 631-638.
- Adams, R. L., Adams, I. P., Lindow, S. W. and Atkin, S. L. (2004). Inhibition of endothelial proliferation by the somatostatin analogue SOM230. *Clin Endocrinol (Oxf)* **61**, 431-436.
- Adams, R. L., Adams, I. P., Lindow, S. W., Zhong, W. and Atkin, S. L. (2005). Somatostatin receptors 2 and 5 are preferentially expressed in proliferating endothelium. *Br J Cancer* **92**, 1493-1498.
- Akopian, A., Johnson, J., Gabriel, R., Brecha, N. and Witkovsky, P. (2000). Somatostatin modulates voltage-gated K(+) and Ca(2+) currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci* **20**, 929-936.
- Albini, A., Florio, T., Giunciuglio, D., *et al.* (1999). Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Faseb J* **13**, 647-655.
- Amann, J., Kaven, C., Spraul, C. W., Lang, G. K. and Lang, G. E. (2000). [Effect of octreotide combined with growth factors on proliferation of RPE cells in vitro]. *Ophthalmologie* **97**, 737-741.
- Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S. and Adamis, A. P. (2003). Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* **48**, 257-293.
- Ambati, J., Gragoudas, E. S., Miller, J. W., *et al.* (2000). Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 1186-1191.
- Ando, A., Yang, A., Mori, K., *et al.* (2002). Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol* **191**, 116-124.
- Arevalo Jf, Fernandez Cf and Aj., M. (2006). Normal Anatomy of the macula. In: *Age-related macular degeneration. A comprehensive textbook* (ed L. P. Alfaro Vd, Mieler Wf, Quiroz - Mercado H, Jager Rm, Tano Y), Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, PA, p 6.
- Bagnoli, P., Dal Monte, M. and Casini, G. (2003). Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol* **18**, 1219-1242.
- Baldysiak-Figiel, A., Jong-Hesse, Y. D., Lang, G. K. and Lang, G. E. (2005). Octreotide inhibits growth factor-induced and basal proliferation of lens epithelial cells in vitro. *J Cataract Refract Surg* **31**, 1059-1064.
- Baldysiak-Figiel, A., Lang, G. K., Kampmeier, J. and Lang, G. E. (2004). Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J Endocrinol* **180**, 417-424.
- Bartalena, L., Marcocci, C., Tanda, L. and Pinchera, A. (2002). Management of thyroid eye disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **29 Suppl 2**, S458-465.
- Bartalena, L., Pinchera, A. and Marcocci, C. (2000). Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev* **21**, 168-199.
- Becquet, F., Courtois, Y. and Goureau, O. (1997). Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol* **42**, 71-82.
- Bell, G. I. and Reisine, T. (1993). Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci* **16**, 34-38.
- Bell, G. I., Yasuda K, Kong H, Law F.S, Raynor K and T., R. (1995). Molecular biology of somatostatin receptors. In: *Symposium on Somatostatin and its receptors* (ed D. J. C. A. G. Cardew), Wiley, Ciba Foundation London 12-14 July 1995, pp 65-88.
- Benoit, R., Ling, N. and Esch, F. (1987). A new prosomatostatin-derived peptide reveals a pattern for prohormone cleavage at monobasic sites. *Science* **238**, 1126-1129.
- Benoit, R. P., Bohlen, P., Ling, N., *et al.* (1985). Somatostatin-28 [1-12]-like peptides. In: *Somatostatin* (eds Patel Y.C and G. S. Tannenbaum), Plenum Press, New York and London, pp 89-107.
- Bermig, J., Tylla, H., Jochmann, C., Nestler, A. and Wolf, S. (2002). Angiographic findings in patients with exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **240**, 169-175.
- Bertherat, J., Berod, A., Normand, E., *et al.* (1991). Somatostatin depletion by cysteamine increases somatostatin binding and growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic Acid in the arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* **3**, 115-118.
- Bezerra, Y., Fuselier, J. A., Peyman, G. A., Oner, H., Drouant, G. and Coy, D. H. (2005). Study of inhibitory effects of an antiangiogenic somatostatin-camptothecin conjugate on laser-induced choroidal neovascularization in rats. *Retina* **25**, 345-354.
- Bito, H., Mori, M., Sakanaka, C., *et al.* (1994). Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylate cyclase inhibition, arachidonate release and activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of biological chemistry* **269**, 12722-12730.

- Boehm, B. O., Lang, G. K., Jehle, P. M., Feldman, B. and Lang, G. E. (2001). Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* **33**, 300-306.
- Bousquet, C., Delesque, N., Lopez, F., *et al.* (1998). sst2 somatostatin receptor mediates negative regulation of insulin receptor signaling through the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* **273**, 7099-7106.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., *et al.* (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **179**, 77-79.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R. and Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714-718.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 682-685.
- Bringmann, A., Reichenbach, A. and Wiedemann, P. (2004). Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* **36**, 241-249.
- Brooks, S. E., Gu, X., Samuel, S., *et al.* (2001). Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 222-228.
- Bruns, G., Weckbecker, G., Raulf, F., Lübbert, H. and Hoyer, D. (1995). Characterization of somatostatin receptor subtypes. In: *Somatostatin and its receptors* (ed C. F. S. 190), Wiley, Chichester pp 89-110.
- Buscail, L., Delesque, N. and Esteve, J. P. (1994a). Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: Mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Medical Sciences* **91**, 2315-2319.
- Buscail, L., Delesque, N., Esteve, J. P., *et al.* (1994b). Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2315-2319.
- Bylund, D. B. and Martinez, J. R. (1980). alpha 2-Adrenergic receptors appear in rat salivary glands after reserpine treatment. *Nature* **285**, 229-230.
- Cai, J. and Boulton, M. (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* **16**, 242-260.
- Campochiaro, P. A., Hackett, S. F., Viores, S. A., *et al.* (1994). Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* **107** (Pt 9), 2459-2469.
- Carrasco, E., Hernandez, C., Miralles, A., Huguet, P., Farres, J. and Simo, R. (2007). Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care* **30**, 2902-2908.
- Casini, G., Catalani, E., Dal Monte, M. and Bagnoli, P. (2005). Functional aspects of the somatostatinergetic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histol Histopathol* **20**, 615-632.
- Catalani, E., Cervia, D., Martini, D., *et al.* (2007). Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *Eur J Neurosci* **25**, 1447-1459.
- Cattaneo, M. G., Taylor, J. E., Culler, M. D., Nisoli, E. and Vicentini, L. M. (2000). Selective stimulation of somatostatin receptor subtypes: differential effects on Ras/MAP kinase pathway and cell proliferation in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* **481**, 271-276.
- Celiker, U. and Ilhan, N. (2002). Nitric oxide and octreotide in retinal ischemia-reperfusion injury. *Doc Ophthalmol* **105**, 327-338.
- Celiker, U., Ilhan, N., Ozercan, I., Demir, T. and Celiker, H. (2002). Octreotide reduces ischaemia-reperfusion injury in the retina. *Acta Ophthalmol Scand* **80**, 395-400.
- Chang, T. C., Kao, S. C. and Huang, K. M. (1992). Octreotide and Graves' ophthalmopathy and pretibial myxoedema. *BMJ* **304**, 158.
- Chantelau, E. and Frystyk, J. (2005). Progression of diabetic retinopathy during improved metabolic control may be treated with reduced insulin dosage and/or somatostatin analogue administration -- a case report. *Growth Horm IGF Res* **15**, 130-135.
- Chiba, T. and Yamada, T. (1994). *Gut Somatostatin*. First Edition (eds J. Walsh and G. Dockrey), Raven Press, New York.
- Colquitt, J. L., Jones, J., Tan, S. C., Takeda, A., Clegg, A. J. and Price, A. (2008). Ranibizumab and pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **12**, iii-iv, ix-201.
- Cordelier, P., Esteve, J. P., Bousquet, C., *et al.* (1997). Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9343-9348.

- Cristiani, R., Fontanesi, G., Casini, G., Petrucci, C., Viollet, C. and Bagnoli, P. (2000). Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3191-3199.
- Cristiani, R., Petrucci, C., Dal Monte, M. and Bagnoli, P. (2002). Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res* **936**, 1-14.
- Dahms, P. and Mentlein, R. (1992). Purification of the main somatostatin-degrading proteases from rat and pig brains, their action on other neuropeptides, and their identification as endopeptidases 24.15 and 24.16. *Eur J Biochem* **208**, 145-154.
- Dal Monte, M., Cammalleri, M., Martini, D., Casini, G. and Bagnoli, P. (2007). Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 3480-3489.
- Dal Monte, M., Petrucci, C., Vasilaki, A., *et al.* (2003). Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergetic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology* **45**, 1080-1092.
- Dalm, V. A., Van Hagen, P. M., De Krijger, R. R., *et al.* (2004). Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**, 625-629.
- Dalm, V. A., Van Hagen, P. M. and Krenning, E. P. (2003). The role of octreotide scintigraphy in rheumatoid arthritis and sarcoidosis. *Q J Nucl Med* **47**, 270-278.
- Danesi, R. and Del Tacca, M. (1996). The effects of the somatostatin analog octreotide on angiogenesis in vitro. *Metabolism* **45**, 49-50.
- Das Evcimen, N. and King, G. L. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* **55**, 498-510.
- Dasgupta, P. (2004). Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther* **102**, 61-85.
- Davis, A. A., Bernstein, P. S., Bok, D., Turner, J., Nachtigal, M. and Hunt, R. C. (1995). A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 955-964.
- Davis, M. I., Wilson, S. H. and Grant, M. B. (2001). The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Horm Metab Res* **33**, 295-299.
- Dawson, T. M., Brecht, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M. and Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7797-7801.
- Delesque, N., Buscail, L., Esteve, J. P., *et al.* (1995). A tyrosine phosphatase is associated with the somatostatin receptor. *Ciba Found Symp* **190**, 187-196; discussion 196-203.
- Demir, T., Celiker, U. O., Kukner, A., Mogulkoc, R., Celebi, S. and Celiker, H. (1999). Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* **77**, 386-390.
- Devries, S. H. and Schwartz, E. A. (1989). Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J Physiol* **414**, 351-375.
- Dezsi, L., Dornyei, G., Szentivanyi, M., Jr., Tulassay, T. and Monos, E. (1997). Somatostatin induces vasodilatation in the cat mesenteric artery via endothelium-derived nitric oxide and prostaglandins. *Pflugers Arch* **433**, 536-538.
- Dickinson, A. J., Vaidya, B., Miller, M., *et al.* (2004). Double-blind, placebo-controlled trial of octreotide long-acting repeatable (LAR) in thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 5910-5915.
- Ding, J. D. and Weinberg, R. J. (2007). Distribution of soluble guanylyl cyclase in rat retina. *J Comp Neurol* **500**, 734-745.
- Djamgoz, M. B., Cunningham, J. R., Davenport, S. L. and Neal, M. J. (1995). Nitric oxide inhibits depolarization-induced release of endogenous dopamine in the rabbit retina. *Neurosci Lett* **198**, 33-36.
- Dournaud, P., Boudin, H., Schonbrunn, A., Tannenbaum, G. S. and Beaudet, A. (1998). Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci* **18**, 1056-1071.
- Douziech, N., Calvo, E., Coulombe, Z., *et al.* (1999). Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology* **140**, 765-777.
- Du, Y., Remmers, E. F., Goldmuntz, E. A., *et al.* (1994). Simple sequence repeat length polymorphisms mapped to rat chromosome 11. *Cytogenet Cell Genet* **65**, 186-189.
- Dulak, J., Jozkowicz, A., Dembinska-Kiec, A., *et al.* (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 659-666.
- Dunaief, J. L., Dentchev, T., Ying, G. S. and Milam, A. H. (2002). The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology* **120**, 1435-1442.
- Durak, I., Durak, H., Ergin, M., Yurekli, Y. and Kaynak, S. (1995). Somatostatin receptors in the orbits. *Clin Nucl Med* **20**, 237-242.

- Eagle, R. C., Jr. (1984). Mechanisms of maculopathy. *Ophthalmology* **91**, 613-625.
- Eagle, R. C., Jr., Lucier, A. C., Bernardino, V. B., Jr. and Yanoff, M. (1980). Retinal pigment epithelial abnormalities in fundus flavimaculatus: a light and electron microscopic study. *Ophthalmology* **87**, 1189-1200.
- Eckert, C. and Hafeman, D. (1986). Search for Fc and C3b receptors on black-eyed RCS rat RPE cells. *Current Eye Research* **5**, 911-917.
- Elbadri, A. A., Shaw, C., Johnston, C. F., Archer, D. B. and Buchanan, K. D. (1991). The distribution of neuropeptides in the ocular tissues of several mammals: a comparative study. *Comp Biochem Physiol C* **100**, 625-627.
- Elner, S. G., Elner, V. M., Nielsen, J. C., Torczynski, E., Yu, R. and Franklin, W. A. (1992). CD68 antigen expression by human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **55**, 21-28.
- Elner, V., Schaffner, T., Taylor, K. and Glagov, S. (1981). Immunophagocytic properties of retinal pigment epithelium cells. *Science* **211**, 74-76.
- Farkas, T. G., Krill, A. E., Sylvester, V. M. and Archer, D. (1971a). Familial and secondary drusen: histologic and functional correlations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **75**, 333-343.
- Farkas, T. G., Sylvester, V. and Archer, D. (1971b). The ultrastructure of drusen. *Am J Ophthalmol* **71**, 1196-1205.
- Farkas, T. G., Sylvester, V., Archer, D. and Altona, M. (1971c). The histochemistry of drusen. *Am J Ophthalmol* **71**, 1206-1215.
- Faure, V., Courtois, Y. and Goureau, O. (1999). Differential regulation of nitric oxide synthase-II mRNA by growth factors in rat, bovine, and human retinal pigmented epithelial cells. *Ocul Immunol Inflamm* **7**, 27-34.
- Feeney - Burns, L. and Ellersieck, M. (1985). Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane. *American Journal of Ophthalmology* **100**, 686-697.
- Feigl, B. (2009). Age-related maculopathy - linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis. *Prog Retin Eye Res* **28**, 63-86.
- Feniuk, W., Jarvie, E., Luo, J. and Humphrey, P. P. (2000). Selective somatostatin sst(2) receptor blockade with the novel cyclic octapeptide, CYN-154806. *Neuropharmacology* **39**, 1443-1450.
- Ferjoux, G., Bousquet, C., Cordelier, P., et al. (2000). Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* **94**, 205-210.
- Ferjoux, G., Lopez, F., Esteve, J. P., et al. (2003). Critical role of Src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation. *Mol Biol Cell* **14**, 3911-3928.
- Ferone, D., Van Hagen, P. M., Semino, C., et al. (2004). Somatostatin receptor distribution and function in immune system. *Dig Liver Dis* **36 Suppl 1**, S68-77.
- Ferrante, E., Pellegrini, C., Bondioni, S., et al. (2006). Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer* **13**, 955-962.
- Ferrara, N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* **77**, 527-543.
- Ferrara, N., Damico, L., Shams, N., Lowman, H. and Kim, R. (2006). Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* **26**, 859-870.
- Fine, S. L., Berger, J. W., Maguire, M. G. and Ho, A. C. (2000). Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **342**, 483-492.
- Firth, S. I., Kaufman, P. L., De Jean, B. J., Byers, J. M. and Marshak, D. W. (2002). Innervation of the uvea by galanin and somatostatin immunoreactive axons in macaques and baboons. *Exp Eye Res* **75**, 49-60.
- Florio, T., Arena, S., Thellung, S., et al. (2001). The activation of the phosphotyrosine phosphatase eta (r-PTP eta) is responsible for the somatostatin inhibition of PC Cl3 thyroid cell proliferation. *Mol Endocrinol* **15**, 1838-1852.
- Florio, T., Morini, M., Villa, V., et al. (2003a). Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology* **144**, 1574-1584.
- Florio, T., Rim, C., Hershberger, R. E., Loda, M. and Stork, P. J. (1994). The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. *Mol Endocrinol* **8**, 1289-1297.
- Florio, T. and Schettini, G. (1996). Multiple intracellular effectors modulate physiological functions of the cloned somatostatin receptors. *J Mol Endocrinol* **17**, 89-100.
- Florio, T., Scorizello, A., Fattore, M., et al. (1996). Somatostatin inhibits PC Cl3 thyroid cell proliferation through the modulation of phosphotyrosine activity. Impairment of the somatostatinergetic effects by stable expression of E1A viral oncogene. *J Biol Chem* **271**, 6129-6136.
- Florio, T., Thellung, S., Corsaro, A., et al. (2003b). Characterization of the intracellular mechanisms mediating somatostatin and lanreotide inhibition of DNA synthesis and growth hormone

- release from dispersed human GH-secreting pituitary adenoma cells in vitro. *Clin Endocrinol (Oxf)* **59**, 115-128.
- Florio, T., Yao, H., Carey, K. D., Dillon, T. J. and Stork, P. J. (1999). Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* **13**, 24-37.
- Fontanesi, G., Gargini, C. and Bagnoli, P. (2000). Postnatal development of somatostatin 2A (sst2A) receptors expression in the rabbit retina. *Brain Res Dev Brain Res* **123**, 67-80.
- Forloni, G., Lucca, E., Angeretti, N., Chiesa, R. and Vezzani, A. (1997). Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem* **68**, 319-327.
- Forrester J, Dick A, Mcmenamin P and W, L. (1996). Anatomy of the eye and orbit. In: *The eye. Basic sciences in practice* (ed F. J), Saunders Company Ltd, London, UK, p 35.
- Frangieh, G. T., Green, W. R. and Fine, S. L. (1982). A histopathologic study of Best's macular dystrophy. *Archives of ophthalmology* **100**, 1115-1121.
- Freund, K. B., Yannuzzi, L. A. and Sorenson, J. A. (1993). Age-related macular degeneration and choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* **115**, 786-791.
- Friedman, A. H., Pokorny, K. S., Suhan, J. P. and Kornzweig, A. L. (1980). Senile macular degeneration: clinical, histopathological, and ultrastructural studies. *Mt Sinai J Med* **47**, 227-245.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., et al. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2604-2609.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Gass, J. D. (1972). Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* **70**, 409-436.
- Ghapdrsg (2001). The effect of a growth hormone receptor antagonist drug on proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* **108**, 2266-2272.
- Goldstein, I. M., Ostwald, P. and Roth, S. (1996). Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* **36**, 2979-2994.
- Goureau, O., Hicks, D. and Courtois, Y. (1994). Human retinal pigmented epithelial cells produce nitric oxide in response to cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 120-126.
- Goureau, O., Lepoivre, M., Becquet, F. and Courtois, Y. (1993). Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor beta in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4276-4280.
- Goureau, O., Lepoivre, M. and Courtois, Y. (1992). Lipopolysaccharide and cytokines induce a macrophage-type of nitric oxide synthase in bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 854-859.
- Grant, M. B. and Caballero, S. (2002). Somatostatin analogues as drug therapies for retinopathies. *Drugs Today (Barc)* **38**, 783-791.
- Grant, M. B., Caballero, S. and Millard, W. J. (1993). Inhibition of IGF-I and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regul Pept* **48**, 267-278.
- Grant, M. B., Mames, R. N., Fitzgerald, C., et al. (2000). The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care* **23**, 504-509.
- Green, W. (1982). Clinicopathologic studies of senile macular degeneration. In: *Ocular Pathology Update* (ed D. H. Nicholson), Year Book Medical Publishers, Chicago, pp 115-144.
- Green, W. R. and Enger, C. (1993). Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* **100**, 1519-1535.
- Green, W. R. and Key, S. N., 3rd (1977). Senile macular degeneration: a histopathologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc* **75**, 180-254.
- Grindle, C. and Marshall, J. (1978). Ageing changes in Bruch's membrane and their functional implications. *Trans Ophthalmol Soc UK* **98**, 172-175.
- Grisham, M. B., Johnson, G. G. and Lancaster, J. R., Jr. (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* **268**, 237-246.
- Gruszka, A., Pawlikowski, M. and Kunert-Radek, J. (2001). Anti-tumoral action of octreotide and bromocriptine on the experimental rat prolactinoma: anti-proliferative and pro-apoptotic effects. *Neuro Endocrinol Lett* **22**, 343-348.
- Guillemet-Guibert, J., Lahlou, H., Cordelier, P., Bousquet, C., Pyronnet, S. and Susini, C. (2005a). Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest* **28**, 5-9.
- Guillemet-Guibert, J., Lahlou, H., Pyronnet, S., Bousquet, C. and Susini, C. (2005b). Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: molecular aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **19**, 535-551.

- Guillermat-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Davenne, L., *et al.* (2007). Novel synergistic mechanism for sst2 somatostatin and TNF α receptors to induce apoptosis: crosstalk between NF-kappaB and JNK pathways. *Cell Death Differ* **14**, 197-208.
- Guillermat, J., Saint-Laurent, N., Rochaix, P., *et al.* (2003). Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 155-160.
- Hattenbach, L. O., Falk, B., Nurnberger, F., Koch, F. H. and Ohrloff, C. (2002). Detection of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes. *Ophthalmologica* **216**, 209-214.
- Haverkamp, S. and Eldred, W. D. (1998). Localization of nNOS in photoreceptor, bipolar and horizontal cells in turtle and rat retinas. *Neuroreport* **9**, 2231-2235.
- Hayes, K. C. (1974). Retinal degeneration in monkeys induced by deficiencies of vitamin E or A. *Invest Ophthalmol* **13**, 499-510.
- Heintges, T., Luthen, R. and Niederau, C. (1994). Inhibition of exocrine pancreatic secretion by somatostatin and its analogues. *Digestion* **55 Suppl 1**, 1-9.
- Helboe, L. and Moller, M. (1999). Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2376-2382.
- Helboe, L., Moller, M., Norregaard, L., Schiodt, M. and Stidsen, C. E. (1997). Development of selective antibodies against the human somatostatin receptor subtypes sst1-sst5. *Brain Res Mol Brain Res* **49**, 82-88.
- Helyes, Z., Pinter, E., Nemeth, J., *et al.* (2001). Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br J Pharmacol* **134**, 1571-1579.
- Hemish, J., Nakaya, N., Mittal, V. and Enikolopov, G. (2003). Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *J Biol Chem* **278**, 42321-42329.
- Hernaiz-Ortega, M. C., Soto-Pedre, E. and Martin, J. J. (2004). Sandostatin LAR for cystoid diabetic macular edema: a 1-year experience. *Diabetes Res Clin Pract* **64**, 71-72.
- Hernandez, C., Carrasco, E., Casamitjana, R., Deulofeu, R., Garcia-Arumi, J. and Simo, R. (2005). Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care* **28**, 1941-1947.
- Higgins, R. D., Yan, Y. and Schrier, B. K. (2002). Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res* **74**, 553-559.
- Hiscott, P. and Sheridan, C. M. (1998). The retinal pigment epithelium, epiretinal membrane formation and proliferative vitreoretinopathy. In: *The Retinal Pigment Epithelium. Function and disease* (eds M. F. Marmor and T. J. Wolfensberger), Oxford University Press, New York, pp 478-488.
- Hogan, M. (1967). Bruch's membrane and disease of the macula. *Trans Ophthalmol Soc UK* **87**, 113-161.
- Hogan, M. J. (1972). Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **76**, 64-80.
- Hogewind, B. F., Pieters, G. and Hoyng, C. B. (2008). Octreotide acetate in dominant cystoid macular dystrophy. *Eur J Ophthalmol* **18**, 99-103.
- Hollenberg, M. J. and Burt, W. L. (1969). The fine structure of Bruch's membrane in the human eye. *Can J Ophthalmol* **4**, 296-306.
- Holtkamp, G. M., Kijlstra, A., Peek, R. and De Vos, A. F. (2001). Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res* **20**, 29-48.
- Holz, F. G., Bellman, C., Staudt, S., Schutt, F. and Volcker, H. E. (2001). Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1051-1056.
- Holz, F. G., Wolfensberger, T. J., Piguet, B., *et al.* (1994). Bilateral macular drusen in age-related macular degeneration. Prognosis and risk factors. *Ophthalmology* **101**, 1522-1528.
- Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M. and Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2811-2814.
- Hornick, C. A., Anthony, C. T., Hughey, S., Gebhardt, B. M., Espenan, G. D. and Woltering, E. A. (2000). Progressive nuclear translocation of somatostatin analogs. *J Nucl Med* **41**, 1256-1263.
- Hoshino, M., Mizuno, K. and Ichikawa, H. (1984). Aging alterations of retina and choroid of Japanese: light microscopic study of macular region of 176 eyes. *Jpn J Ophthalmol* **28**, 89-102.
- Hou, C., Gilbert, R. L. and Barber, D. L. (1994). Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2. *J Biol Chem* **269**, 10357-10362.
- Hughes, W. F. and Coogan, P. S. (1974). Pathology of the pigment epithelium and retina in rabbits poisoned with lead. *Am J Pathol* **77**, 237-254.
- Hukovic, N., Panetta, R., Kumar, U. and Patel, Y. C. (1996). Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology* **137**, 4046-4049.

- Hunt, R. C. and Davis, A. A. (1990). Altered expression of keratin and vimentin in human retinal pigment epithelial cells in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* **145**, 187-199.
- Ishibashi, T., Patterson, R., Ohnishi, Y., Inomata, H. and Ryan, S. J. (1986). Formation of drusen in the human eye. *Am J Ophthalmol* **101**, 342-353.
- Jaffe, G. J., Van Le, L., Valea, F., et al. (1992). Expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and an interleukin-1 receptor antagonist in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **55**, 325-335.
- Jaffrey, S. R. and Snyder, S. H. (1995). Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 417-440.
- Janssen, J. A., Jacobs, M. L., Derkx, F. H., Weber, R. F., Van Der Lely, A. J. and Lamberts, S. W. (1997). Free and total insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), and IGFBP-3 and their relationships to the presence of diabetic retinopathy and glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2809-2815.
- Janssen, J. A. and Lamberts, S. W. (2000). Circulating IGF-I and its protective role in the pathogenesis of diabetic angiopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **52**, 1-9.
- Johnson, J., Rickman, D. W. and Brecha, N. C. (2000). Somatostatin and somatostatin subtype 2A expression in the mammalian retina. *Microsc Res Tech* **50**, 103-111.
- Johnson, J., Wong, H., Walsh, J. H. and Brecha, N. C. (1998). Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol* **393**, 93-101.
- Johnson, J., Wu, V., Wong, H., Walsh, J. H. and Brecha, N. C. (1999). Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience* **94**, 675-683.
- Kafkala, C., Choi, J. Y., Choopong, P. and Foster, C. S. (2006). Octreotide as a treatment for uveitic cystoid macular edema. *Archives of ophthalmology* **124**, 1353-1355.
- Kanski, J. (1993). Diseases of the orbit. In: *Clinical Ophthalmology. A Systematic Approach*, Butterworth - Heinemann Ltd, Oxford, pp 32-37.
- Katz, M. L., Drea, C. M., Eldred, G. E., Hess, H. H. and Robison, W. G., Jr. (1986). Influence of early photoreceptor degeneration on lipofuscin in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* **43**, 561-573.
- Katz, M. L., Parker, K. R., Handelman, G. J., Bramel, T. L. and Dratz, E. A. (1982). Effects of antioxidant nutrient deficiency on the retina and retinal pigment epithelium of albino rats: a light and electron microscopic study. *Exp Eye Res* **34**, 339-369.
- Kaven, C. W., Spraul, C. W., Zavazava, N. K., Lang, G. K. and Lang, G. E. (2000). Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res* **20**, 480-487.
- Ke, J. B. and Zhong, Y. M. (2007). Expression of somatostatin receptor subtype 5 in rat retinal amacrine cells. *Neuroscience* **144**, 1025-1032.
- Kent, W. S. and Marmor, M. F. (1998). Retinal heredodegenerations with retinal pigment epithelial involvement. In: *The Retinal Pigment Epithelium. Function and disease* (eds M. F. Marmor and T. J. Wolfensberger), Oxford University Press, New York, pp 347-348.
- Kiagiadaki, F., Koulakis, E. and Thermos, K. (2008). Dopamine (D1) receptor activation and nitrinergic agents influence somatostatin levels in rat retina. *Exp Eye Res* **86**, 18-24.
- Kiagiadaki, F., Savvaki, M. and Thermos, K. Activation of somatostatin receptor (sst 5) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology* **58**, 297-303.
- Kiagiadaki, F. and Thermos, K. (2008). Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 3080-3089.
- Kim, I. B., Lee, E. J., Kim, K. Y., et al. (1999). Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the mammalian retina. *Neurosci Lett* **267**, 193-196.
- Kim, I. B., Oh, S. J. and Chun, M. H. (2000). Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina. *Microsc Res Tech* **50**, 112-123.
- Kirkegaard, C., Norgaard, K., Snorgaard, O., Bek, T., Larsen, M. and Lund-Andersen, H. (1990). Effect of one year continuous subcutaneous infusion of a somatostatin analogue, octreotide, on early retinopathy, metabolic control and thyroid function in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* **122**, 766-772.
- Kirsch, B. and Leonhardt, H. (1979). Demonstration of a somatostatin-like activity in retinal cells of the rat. *Cell Tissue Res* **204**, 127-140.
- Klein, R., Klein, B. E., Jensen, S. C. and Meuer, S. M. (1997). The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **104**, 7-21.
- Kleuss, C. (1995). Somatostatin modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in GH3 cells via a specific Go splice variant. In: *Somatostatin and its receptors*, Wiley, Chichester, pp 171-186.
- Kleuss, C., Hescheler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Schultz, G. and Wittig, B. (1991). Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* **353**, 43-48.
- Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G. and Wittig, B. (1992). Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* **358**, 424-426.

- Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G. and Wittig, B. (1993). Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Science* **259**, 832-834.
- Klisovic, D. D., O'doriso, M. S., Katz, S. E., *et al.* (2001). Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2193-2201.
- Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** (Pt 2), 249-258.
- Koch, K. W., Lambrecht, H. G., Haberecht, M., Redburn, D. and Schmidt, H. H. (1994). Functional coupling of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. *EMBO J* **13**, 3312-3320.
- Koenig, J. A., Kaur, R., Dodgeon, I., Edwardson, J. M. and Humphrey, P. P. (1998). Fates of endocytosed somatostatin sst2 receptors and associated agonists. *Biochem J* **336** (Pt 2), 291-298.
- Kowall, N. W., Beal, M. F., Ferrante, R. J. and Martin, J. B. (1985). Topography of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase staining neurons in rat striatum. *Neurosci Lett* **59**, 61-66.
- Krassas, G. E. Ophthalmic Graves' disease: clinical response to octreotide. In: *The expanding role of Octreotide II: Advances in Endocrinology and Eye diseases* (eds S. Lamberts and E. Ghigo), Bioscientifica, pp 1845-1851.
- Krassas, G. E., Dumas, A., Kaltsas, T., Halkias, A. and Pontikides, N. (1999). Somatostatin receptor scintigraphy before and after treatment with somatostatin analogues in patients with thyroid eye disease. *Thyroid* **9**, 47-52.
- Krassas, G. E., Dumas, A., Pontikides, N. and Kaltsas, T. (1995). Somatostatin receptor scintigraphy and octreotide treatment in patients with thyroid eye disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **42**, 571-580.
- Krassas, G. E., Kaltsas, T., Dumas, A., Pontikides, N. and Tolis, G. (1997). Lanreotide in the treatment of patients with thyroid eye disease. *Eur J Endocrinol* **136**, 416-422.
- Krassas, G. E., Pontikides, N., Doukidis, D., Heufelder, G. and Heufelder, A. E. (2001). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, and soluble interleukin-1 receptor antagonist in patients with thyroid eye disease undergoing treatment with somatostatin analogues. *Thyroid* **11**, 1115-1122.
- Kreienkamp, H. J., Honck, H. H. and Richter, D. (1997). Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1). *FEBS Lett* **419**, 92-94.
- Krulich, L., Dhariwal, A. P. and Mccann, S. M. (1968). Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* **83**, 783-790.
- Kuhne, W. (1877). Zur photochemie der Netzhaut. In: *Untersuchung Physiologie*, Institut Universitaet Heidelberg, Heidelberg, pp 1-14.
- Kuijpers, R. W., Baarsma, S. and Van Hagen, P. M. (1998). Treatment of cystoid macular edema with octreotide. *N Engl J Med* **338**, 624-626.
- Kung, A. W., Michon, J., Tai, K. S. and Chan, F. L. (1996). The effect of somatostatin versus corticosteroid in the treatment of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* **6**, 381-384.
- Kutty, R. K., Kutty, G., Hooks, J. J., Wiggert, B. and Nagineni, C. N. (1995). Transforming growth factor-beta inhibits the cytokine-mediated expression of the inducible nitric oxide synthase mRNA in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 386-393.
- Kuwabara, T. (1979). Photic and photothermal effects on the retinal pigment epithelium. In: *The retinal pigment epithelium* (ed M. F. Marmor, Zinn, A.K.), Harvard University Press, Cambridge, MA, pp 293-313.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahlou, H., Guillermet, J., Hortala, M., *et al.* (2004). Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* **1014**, 121-131.
- Lake, N. and Patel, Y. C. (1980). Neurotoxic agents reduce retinal somatostatin. *Brain Res* **181**, 234-236.
- Lambooij, A. C., Kuijpers, R. W., Van Lichtenauer-Kaligis, E. G., *et al.* (2000). Somatostatin receptor 2A expression in choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 2329-2335.
- Lane, P. and Gross, S. S. (1999). Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* **19**, 215-229.
- Lane, T. E., Fox, H. S. and Buchmeier, M. J. (1999). Inhibition of nitric oxide synthase-2 reduces the severity of mouse hepatitis virus-induced demyelination: implications for NOS2/NO regulation of chemokine expression and inflammation. *J Neurovirol* **5**, 48-54.
- Larsen, J. N. (1995). Somatostatin in the retina. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*, 1-24.
- Lattuada, D., Casnici, C., Venuto, A. and Marelli, O. (2002). The apoptotic effect of somatostatin analogue SMS 201-995 on human lymphocytes. *J Neuroimmunol* **133**, 211-216.

- Law, S. F., Manning, D. and Reisine, T. (1991). Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J Biol Chem* **266**, 17885-17897.
- Law, S. F. and Reisine, T. (1992). Agonist binding to rat brain somatostatin receptors alters the interaction of the receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Mol Pharmacol* **42**, 398-402.
- Law, S. F., Yasuda, K., Bell, G. I. and Reisine, T. (1993). Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2. *J Biol Chem* **268**, 10721-10727.
- Le Romancer, M., Reyl-Desmars, F., Cherifi, Y., *et al.* (1994). The 86-kDa subunit of autoantigen Ku is a somatostatin receptor regulating protein phosphatase-2A activity. *The Journal of biological chemistry* **269**, 17464-17468.
- Lee, P. C., Kibbe, M. R., Schuchert, M. J., *et al.* (2000). Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. *Microvasc Res* **60**, 269-280.
- Lepage-Lezin, A., Joseph-Bravo, P., Devilliers, G., *et al.* (1991). Prosomatostatin is processed in the Golgi apparatus of rat neural cells. *J Biol Chem* **266**, 1679-1688.
- Liapakis, G., Politou, E. and Thermos, K. (1993). Solubilization of active somatostatin receptors from rabbit retina. *Biochem Pharmacol* **45**, 1821-1828.
- Liapakis, G. and Thermos, K. (1992). Characterization of [125I]Tyr11-somatostatin binding sites in the rabbit retina. *Neuropeptides* **21**, 13-19.
- Lichtenauer-Kaligis, E. G., Van Hagen, P. M., Lamberts, S. W. and Hofland, L. J. (2000). Somatostatin receptor subtypes in human immune cells. *Eur J Endocrinol* **143 Suppl 1**, S21-25.
- Liebow, C., Crean, D. H., Lee, M. T., Kamer, A. R., Mang, T. S. and Schally, A. V. (1994). Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3804-3808.
- Liebow, C., Reilly, C., Serrano, M. and Schally, A. V. (1989). Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2003-2007.
- Lin, C. T., Li, H. Z. and Wu, J. Y. (1983). Immunocytochemical localization of L-glutamate decarboxylase, gamma-aminobutyric acid transaminase, cysteine sulfinic acid decarboxylase, aspartate aminotransferase and somatostatin in rat retina. *Brain Res* **270**, 273-283.
- Liversidge, J., Grabowski, P., Ralston, S., Benjamin, N. and Forrester, J. V. (1994). Human retinal pigment epithelial cells produce nitric oxide in the presence of activated T lymphocytes. In: *The biology of nitric oxide immunology and inflammation*, pp 378-383.
- Liversidge, J., McKay, D., Mullen, G. and Forrester, J. V. (1993). Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE2 and membrane-bound mechanisms. *Cell Immunol* **149**, 315-330.
- Lopez, F., Esteve, J. P., Buscail, L., *et al.* (1997). The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling. *J Biol Chem* **272**, 24448-24454.
- Lopez, F., Ferjoux, G., Cordelier, P., *et al.* (2001). Neuronal nitric oxide synthase: a substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. *FASEB J* **15**, 2300-2302.
- Luciani, P., Gelmini, S., Ferrante, E., *et al.* (2005). Expression of the antiapoptotic gene seladin-1 and octreotide-induced apoptosis in growth hormone-secreting and nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6156-6161.
- Luo, Q., Peyman, G. A., Conway, M. D. and Woltering, E. A. (1996). Effect of a somatostatin analog (octreotide acetate) on the growth of retinal pigment epithelial cells in culture. *Curr Eye Res* **15**, 909-913.
- Lutty, G., Grunwald, J., Majji, A. B., Uyama, M. and Yoneya, S. (1999). Changes in choriocapillaris and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Mol Vis* **5**, 35.
- Mallet, B., Vialettes, B., Haroche, S., *et al.* (1992). Stabilization of severe proliferative diabetic retinopathy by long-term treatment with SMS 201-995. *Diabete Metab* **18**, 438-444.
- Marletta, M. A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927-930.
- Marmor, M. F. (1998). Structure, function and disease of the RPE. In: *The Retinal Pigment Epithelium. Function and disease*. (eds M. F. Marmor and W. T.J.), Oxford University Press, New York, pp 3-9.
- Marmor, M. F., Abdul-Rahim, A. S. and Cohen, D. S. (1980). The effect of metabolic inhibitors on retinal adhesion and subretinal fluid resorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**, 893-903.
- Marshall, J. and Laties, A. (1985). The special pathology of the ageing macula. In: *Retinal Degeneration: experimental and clinical studies* (eds M. M. Lavail, J. G. Hollyfield and R. E. Anderson), Alan R. Liss, New York, pp 389-400.
- Massa, A., Barbieri, F., Aiello, C., *et al.* (2004). The phosphotyrosine phosphatase eta mediates somatostatin inhibition of glioma proliferation via the dephosphorylation of ERK1/2. *Ann N Y Acad Sci* **1030**, 264-274.

- Mastrodimou, N., Kiagiadaki, F. and Thermos, K. (2008). The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection against retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 342-349.
- Mastrodimou, N., Lambrou, G. N. and Thermos, K. (2005). Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**, 44-53.
- Mastrodimou, N. and Thermos, K. (2004). The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosci Lett* **356**, 13-16.
- Mastrodimou, N., Vasilaki, A., Papadioti, A., Low, M. J., Hoyer, D. and Thermos, K. (2006). Somatostatin receptors in wildtype and somatostatin deficient mice and their involvement in nitric oxide physiology in the retina. *Neuropeptides* **40**, 365-373.
- Matsumoto, B., Guerin, C. J. and Anderson, D. H. (1990). Cytoskeletal redifferentiation of feline, monkey, and human RPE cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**, 879-889.
- Mawrin, C., Schulz, S., Pauli, S. U., et al. (2004). Differential expression of sst1, sst2A, and sst3 somatostatin receptor proteins in low-grade and high-grade astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 13-19.
- Mccombe, M., Lightman, S., Eckland, D. J., Hamilton, A. M. and Lightman, S. L. (1991). Effect of a long-acting somatostatin analogue (BIM23014) on proliferative diabetic retinopathy: a pilot study. *Eye* **5** (Pt 5), 569-575.
- Mcleod, D. S., Taomoto, M., Otsuji, T., Green, W. R., Sunness, J. S. and Luty, G. A. (2002). Quantifying changes in RPE and choroidal vasculature in eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1986-1993.
- Merimee, T. J. (1978). A follow-up study of vascular disease in growth-hormone-deficient dwarfs with diabetes. *N Engl J Med* **298**, 1217-1222.
- Meriney, S. D., Gray, D. B. and Pilar, G. R. (1994). Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* **369**, 336-339.
- Meyerhof, W. (1998). The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **133**, 55-108.
- Meyerhof, W., Paust, H. J., Schonrock, C. and Richter, D. (1991). Cloning of a cDNA encoding a novel putative G-protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions. *DNA and cell biology* **10**, 689-694.
- Mills, S. L. and Massey, S. C. (1995). Differential properties of two gap junctional pathways made by All amacrine cells. *Nature* **377**, 734-737.
- Mishima, H. and Hasebe, H. (1978). Some observations in the fine structure of age changes of the mouse retinal pigment epithelium. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* **209**, 1-9.
- Missotten, T., Van Laar, J. A., Van Der Loos, T. L., et al. (2007). Octreotide long-acting repeatable for the treatment of chronic macular edema in uveitis. *Am J Ophthalmol* **144**, 838-843.
- Mitrofanis, J. (1989). Development of NADPH-diaphorase cells in the rat's retina. *Neurosci Lett* **102**, 165-172.
- Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
- Montminy, M. R., Goodman, R. H., Horovitch, S. J. and Habener, J. F. (1984). Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3337-3340.
- Mori, M., Aihara, M. and Shimizu, T. (1997). Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. *Neurosci Lett* **223**, 185-188.
- Moriarty, P., Boulton, M., Dickson, A. and Mcleod, D. (1994). Production of IGF-I and IGF binding proteins by retinal cells in vitro. *Br J Ophthalmol* **78**, 638-642.
- Moseley, H., Foulds, W. S., Allan, D. and Kyle, P. M. (1984). Routes of clearance of radioactive water from the rabbit vitreous. *Br J Ophthalmol* **68**, 145-151.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Mps (1991). Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Five-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **109**, 1109-1114.
- Mpsa (1994). Visual outcome after laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. The influence of initial lesion size and initial visual acuity. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **112**, 480-488.
- Mpsb. (1994). Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **112**, 500-509.
- Mpsg. (1997). Risk factors for choroidal neovascularization in the second eye of patients with juxtafoveal or subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **115**, 741-747.

- Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., *et al.* (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* **26**, 47-54.
- Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Shen, L. P., Bell, G. I., Rutter, W. J. and Shows, T. B. (1983). Polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2686-2689.
- Nemeth, J., Than, M., Sari, R., *et al.* (1999). Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **386**, 83-88.
- Neufeld, A. H., Shareef, S. and Pena, J. (2000). Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina. *J Comp Neurol* **416**, 269-275.
- Olias, G., Viollet, C., Kusserow, H., Epelbaum, J. and Meyerhof, W. (2004). Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* **89**, 1057-1091.
- Oomen, S. P., Hofland, L. J., Van Hagen, P. M., Lamberts, S. W. and Touw, I. P. (2000). Somatostatin receptors in the haematopoietic system. *Eur J Endocrinol* **143 Suppl 1**, S9-14.
- Ostrovsky, M. A., Sakina, N. L. and Dontsov, A. E. (1987). An antioxidative role of ocular screening pigments. *Vision Res* **27**, 893-899.
- Ozata, M., Bolu, E., Sengul, A., *et al.* (1996). Effects of octreotide treatment on Graves' ophthalmopathy and circulating sICAM-1 levels. *Thyroid* **6**, 283-288.
- Palii, S. S., Afzal, A., Shaw, L. C., *et al.* (2008). Nonpeptide somatostatin receptor agonists specifically target ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 5094-5102.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Papadaki, T., Zacharopoulos, I., Iaccheri, B., Fiore, T. and Foster, C. S. (2005). Somatostatin for Uveitic Cystoid Macular Edema (CME). *Ocul Immunol Inflamm* **13**, 469-470.
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A. and Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* **100**, 3131-3139.
- Pasquali, D., Notaro, A., Bonavolonta, G., Vassallo, P., Bellastella, A. and Sinisi, A. A. (2002). Somatostatin receptor genes are expressed in lymphocytes from retroorbital tissues in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5125-5129.
- Pasquali, D., Notaro, A., Esposito, D., *et al.* (2001). [Somatostatin receptor genes expression and effects of octreotide on orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy]. *Minerva Endocrinol* **26**, 175-179.
- Patel, Y. C. (1992a). General aspects of the biology and function of somatostatin. In: *Somatostatin. Basic and clinical aspects of neuroscience.* (eds C. Weil, E. E. Muller and M. O. Thorner), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 1-16.
- Patel, Y. C. (1992b). General aspects of the biology and function of somatostatin. In: *Basic and clinical aspects of Neuroscience* (eds E. E. Muller, M. O. Thorner and C. Weil), Springer-Verlag, Berlin, pp 1-16.
- Patel, Y. C. (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* **20**, 157-198.
- Patel, Y. C. and Galanopoulou, A. (1995). Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases. *Ciba Found Symp* **190**, 26-40; discussion 40-50.
- Patel, Y. C., Greenwood, M., Kent, G., Panetta, R. and Srikant, C. B. (1993). Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 288-294.
- Patel, Y. C. and Srikant, C. B. (1994). Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* **135**, 2814-2817.
- Patel, Y. C. and Tannenbaum, G. S. (1990). Somatostatin: Basic and clinical aspects. *Metabolism* **39**, suppl 2.
- Patel, Y. C., Wheatley, T. and Ning, C. (1981). Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and nonneural tissues and portal plasma of the rat. *Endocrinology* **109**, 1943-1949.
- Patel, Y. C., Zingg, H. H. and Srikant, C. B. (1985). Somatostatin-14 like immunoreactive forms in the rat: characterization, distribution and biosynthesis. *Adv Exp Med Biol* **188**, 71-87.
- Perez, M. T., Larsson, B., Alm, P., Andersson, K. E. and Ehinger, B. (1995). Localisation of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Exp Brain Res* **104**, 207-217.
- Pichler, R., Maschek, W. and Holzinger, C. (2001). [Therapy with somatostatin analogs in patient with orbitopathy and positive Octreoscan]. *Acta Med Austriaca* **28**, 99-101.
- Pilarska, K. and Kulig, G. (2004). [Lanreotide in the treatment of thyroid orbitopathy]. *Przegl Lek* **61**, 845-847.
- Planck, S. R., Huang, X. N., Robertson, J. E. and Rosenbaum, J. T. (1993). Retinal pigment epithelial cells produce interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to interleukin-1 alpha. *Curr Eye Res* **12**, 205-212.

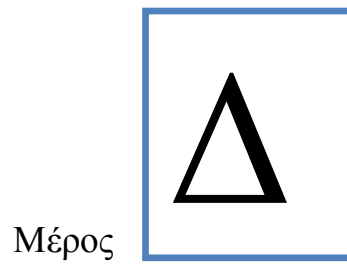
- Porta, M. and Allione, A. (2004). Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacol Ther* **103**, 167-177.
- Postema, P. T., Krenning, E. P., Wijngaarde, R., *et al.* (1994). [111In-DTPA-D-Phe1] octreotide scintigraphy in thyroidal and orbital Graves' disease: a parameter for disease activity? *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 1845-1851.
- Ramrattan, R. S., Van Der Schaft, T. L., Mooy, C. M., De Bruijn, W. C., Mulder, P. G. and De Jong, P. T. (1994). Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**, 2857-2864.
- Reese, A. B. (1960). The role of the pigment epithelium in ocular pathology. *Am J Ophthalmol* **50**, 1066-1084.
- Reisine, T. and Bell, G. I. (1995a). Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* **16**, 427-442.
- Reisine, T. and Bell, G. I. (1995b). Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience* **67**, 777-790.
- Reisine, T., Kong, H., Raynor, K., *et al.* (1993). Splice variant of the somatostatin receptor 2 subtype, somatostatin receptor 2B, couples to adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **44**, 1016-1020.
- Renstrom, E., Ding, W. G., Bokvist, K. and Rorsman, P. (1996). Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron* **17**, 513-522.
- Reubi, J. C. (1984). Evidence for two somatostatin-14 receptor types in rat brain cortex. *Neurosci Lett* **49**, 259-263.
- Reubi, J. C., Cortes, R., Maurer, R., Probst, A. and Palacios, J. M. (1986). Distribution of somatostatin receptors in the human brain: an autoradiographic study. *Neuroscience* **18**, 329-346.
- Reubi, J. C., Lang, W., Maurer, R., Koper, J. W. and Lamberts, S. W. (1987). Distribution and biochemical characterization of somatostatin receptors in tumors of the human central nervous system. *Cancer Res* **47**, 5758-5764.
- Reubi, J. C., Schaer, J. C., Markwalder, R., Waser, B., Horisberger, U. and Laissue, J. (1997). Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance. *Yale J Biol Med* **70**, 471-479.
- Reubi, J. C., Waser, B., Liu, Q., Laissue, J. A. and Schonbrunn, A. (2000). Subcellular distribution of somatostatin sst2A receptors in human tumors of the nervous and neuroendocrine systems: membranous versus intracellular location. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3882-3891.
- Reyl, F. J. and Lewin, M. J. (1982). Intracellular receptor for somatostatin in gastric mucosal cells: decomposition and reconstitution of somatostatin-stimulated phosphoprotein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 978-982.
- Ring, H. G. and Fujino, T. (1967). Observations on the anatomy and pathology of the choroidal vasculature. *Archives of ophthalmology* **78**, 431-444.
- Robertson, J. E., Westra, I., Woltering, E. A., *et al.* (1997). Intravitreal injection of octreotide acetate. *J Ocul Pharmacol Ther* **13**, 171-177.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C. and Patel, Y. C. (2000a). Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**, 154-157.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R. C. and Patel, Y. C. (2000b). Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **275**, 7862-7869.
- Rohrer, S. P., Birzin, E. T., Mosley, R. T., *et al.* (1998). Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* **282**, 737-740.
- Roosterman, D., Glassmeier, G., Baumeister, H., Scherubl, H. and Meyerhof, W. (1998). A somatostatin receptor 1 selective ligand inhibits Ca²⁺ currents in rat insulinoma 1046-38 cells. *FEBS Lett* **425**, 137-140.
- Rorstad, O. P., Brownstein, M. J. and Martin, J. B. (1979). Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in rat retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3019-3023.
- Rorstad, O. P., Senterman, M. K., Hoyte, K. M. and Martin, J. B. (1980). Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in the human retina. *Brain Res* **199**, 488-492.
- Sagar, S. M. (1986). NADPH diaphorase histochemistry in the rabbit retina. *Brain Res* **373**, 153-158.
- Sagar, S. M. and Marshall, P. E. (1988). Somatostatin-like immunoreactive material in associational ganglion cells of human retina. *Neuroscience* **27**, 507-516.
- Sagar, S. M., Rorstad, O. P., Landis, D. M., Arnold, M. A. and Martin, J. B. (1982). Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina. *Brain Res* **244**, 91-99.
- Sall, J. W., Klisovic, D. D., O'dorisio, M. S. and Katz, S. E. (2004). Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **79**, 465-476.
- Sandell, J. H. (1985). NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina. *J Comp Neurol* **238**, 466-472.
- Sarks, S. H. (1973). New vessel formation beneath the retinal pigment epithelium in senile eyes. *Br J Ophthalmol* **57**, 951-965.

- Sarks, S. H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol* **60**, 324-341.
- Sarks, S. H., Arnold, J. J., Killingsworth, M. C. and Sarks, J. P. (1999). Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol* **83**, 358-368.
- Sarna, T. (1992). Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view. *J Photochem Photobiol B* **12**, 215-258.
- Schally, A. V., Szepeshazi, K., Nagy, A., Comaru-Schally, A. M. and Halmos, G. (2004). New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1042-1068.
- Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H. and Mcgeer, E. G. (1983). Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* **9**, 229-234.
- Schindler, M., Humphrey, P. P. and Emson, P. C. (1996). Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol* **50**, 9-47.
- Schindler, M., Kidd, E. J., Carruthers, A. M., *et al.* (1998). Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *Br J Pharmacol* **125**, 209-217.
- Schonbrunn, A. and Tashjian, H., Jr. (1978). Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem* **253**, 6473-6483.
- Schouten, J. S., La Heij, E. C., Webers, C. A., Lundqvist, I. J. and Hendrikse, F. (2009). A systematic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**, 1-11.
- Sellers, L. A., Feniuk, W., Humphrey, P. P. and Lauder, H. (1999). Activated G protein-coupled receptor induces tyrosine phosphorylation of STAT3 and agonist-selective serine phosphorylation via sustained stimulation of mitogen-activated protein kinase. Resultant effects on cell proliferation. *J Biol Chem* **274**, 16423-16430.
- Sennlaub, F., Courtois, Y. and Goureau, O. (1999). Nitric oxide synthase-II is expressed in severe corneal alkali burns and inhibits neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2773-2779.
- Sennlaub, F., Courtois, Y. and Goureau, O. (2001). Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J Clin Invest* **107**, 717-725.
- Shapiro, B., Kronheim, S. and Pimstone, B. (1979). The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metab Res* **11**, 79-80.
- Sharma, K., Patel, Y. C. and Srikant, C. B. (1996). Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol* **10**, 1688-1696.
- Sharma, K., Patel, Y. C. and Srikant, C. B. (1999). C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* **13**, 82-90.
- Sharma, K. and Srikant, C. B. (1998). Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* **76**, 259-266.
- Shen, L. P. and Rutter, W. J. (1984). Sequence of the human somatostatin I gene. *Science* **224**, 168-171.
- Shima, D. T., Adamis, A. P., Ferrara, N., *et al.* (1995). Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* **1**, 182-193.
- Shumak, S. L., Grossman, L. D., Chew, E., *et al.* (1990). Growth hormone suppression and nonproliferative diabetic retinopathy: a preliminary feasibility study. *Clin Invest Med* **13**, 287-292.
- Siehler, S., Seuwen, K. and Hoyer, D. (1998). [125I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **357**, 483-489.
- Simo, R., Carrasco, E., Fonollosa, A., Garcia-Arumi, J., Casamitjana, R. and Hernandez, C. (2007). Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care* **30**, 725-727.
- Simo, R., Lecube, A., Sararols, L., *et al.* (2002). Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients: possible role in the development of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **25**, 2282-2286.
- Smalley, K. S., Feniuk, W., Sellers, L. A. and Humphrey, P. P. (1999). The pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in the human somatostatin sst(4) receptor-mediated stimulation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase and extracellular acidification. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 239-243.
- Smith, L. E., Kopchick, J. J., Chen, W., *et al.* (1997). Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* **276**, 1706-1709.
- Soubrane, G., Courtois, Y., Coscas, G. and Jeanny, J. C. (1990). [Recent findings on the etiopathogenesis of subretinal neovascularization]. *Ophthalmologie* **4**, 8-12.

- Sparrow, J. R., Nathan, C. and Vodovotz, Y. (1994). Cytokine regulation of nitric oxide synthase in mouse retinal pigment epithelial cells in culture. *Exp Eye Res* **59**, 129-139.
- Sperk, G. and Widmann, R. (1985). Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. *J Neurochem* **45**, 1441-1447.
- Spranger, J., Buhnen, J., Jansen, V., et al. (2000). Systemic levels contribute significantly to increased intraocular IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 [correction of IFG-BP3] in proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* **32**, 196-200.
- Spranger, J., Mohlig, M., Osterhoff, M., Buhnen, J., Blum, W. F. and Pfeiffer, A. F. (2001). Retinal photocoagulation does not influence intraocular levels of IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 in proliferative diabetic retinopathy-evidence for combined treatment of PDR with somatostatin analogues and retinal photocoagulation? *Horm Metab Res* **33**, 312-316.
- Spraul, C. W., Kaven, C. K., Kampmeier, J. K., Lang, G. K. and Lang, G. E. (1999). Effect of thalidomide, octreotide, and prednisolone on the migration and proliferation of RPE cells in vitro. *Curr Eye Res* **19**, 483-490.
- Strikant, C. B. and Patel, Y. C. (1985). Somatostatin receptors. In: *Somatostatin* (eds Y. C. Patel and G. S. Tannenbaum), Plenum Press, New York, pp 291-304.
- Stroh, T., Jackson, A. C., Sarret, P., et al. (2000). Intracellular dynamics of sst5 receptors in transfected COS-7 cells: maintenance of cell surface receptors during ligand-induced endocytosis. *Endocrinology* **141**, 354-365.
- Stryer, L., (1988). Hormone action In: *Biochemistry*, Freeman W.H. and Company, New York., pp 843-845.
- Stuehr, D. J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 339-359.
- Stuehr, D. J. and Ikeda-Saito, M. (1992). Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like heme proteins that contain a flavin semiquinone radical. *J Biol Chem* **267**, 20547-20550.
- Su, D. H., Chang, Y. C., Liao, S. L. and Chang, T. C. (2005). Lanreotide treatment in a patient with interferon-associated Graves' ophthalmopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**, 269-272.
- Sunness, J. S., Gonzalez-Baron, J., Bressler, N. M., Hawkins, B. and Applegate, C. A. (1999). The development of choroidal neovascularization in eyes with the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **106**, 910-919.
- Takahashi, K., Itagaki, T., Yamagishi, K., Ohkuma, H. and Uyama, M. (1990). [The role of retinal pigment epithelium in the early stage of development of subretinal neovascularization]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **94**, 3-17.
- Tallent, M., Liapakis, G., O'carroll, A. M., Lolait, S. J., Dichter, M. and Reisine, T. (1996). Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca²⁺ current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience* **71**, 1073-1081.
- Tannenbaum, G. S. and Epelbaum, J. (2000). Somatostatin. In: *Handbook of Physiology* (ed H. M. Goodman), Oxford University Press, New York, pp 221-265.
- Tannenbaum, G. S., Ling, N. and Brazeau, P. (1982). Somatostatin-28 is longer acting and more selective than somatostatin-14 on pituitary and pancreatic hormone release. *Endocrinology* **111**, 101-107.
- Tap (1999). Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. *Archives of ophthalmology* **117**, 1329-1345.
- Tap (2001). Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Archives of ophthalmology* **119**, 198-207.
- Tavianini, M. A., Hayes, T. E., Magazin, M. D., Minth, C. D. and Dixon, J. E. (1984). Isolation, characterization, and DNA sequence of the rat somatostatin gene. *J Biol Chem* **259**, 11798-11803.
- Taylor, A. (2003). A review of the influence of aqueous humor on immunity. *Ocul Immunol Inflamm* **11**, 231-241.
- Taylor, A. W. and Yee, D. G. (2003). Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 2644-2649.
- Teijeiro, R., Rios, R., Costoya, J. A., et al. (2002). Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiol Biochem* **12**, 31-38.
- Ten Bokum, A. M., Hofland, L. J., De Jong, G., et al. (1999). Immunohistochemical localization of somatostatin receptor sst2A in sarcoid granulomas. *Eur J Clin Invest* **29**, 630-636.
- Tervo, T., Tervo, K. and Eranko, L. (1982). Ocular neuropeptides. *Med Biol* **60**, 53-60.
- Thermos, K. (2003). Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res* **43**, 1805-1815.

- Thermos, K. (2008). Novel signals mediating the functions of somatostatin: The emerging role of NO/cGMP. *Mol Cell Endocrinol* **286**, 49-57.
- Thermos, K. and Reisine, T. (1988). Somatostatin receptor subtypes in the clonal anterior pituitary cell lines AtT-20 and GH3. *Mol Pharmacol* **33**, 370-377.
- Thue, T. D. and Schmutz, S. M. (1995). Localization of the somatostatin gene to bovine chromosome 1q23-q25 by in situ hybridization. *Mamm Genome* **6**, 688-689.
- Tracey, W. R., Nakane, M., Pollock, J. S. and Forstermann, U. (1993). Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 1035-1040.
- Tran, V. T., Beal, M. F. and Martin, J. B. (1985). Two types of somatostatin receptors differentiated by cyclic somatostatin analogs. *Science* **228**, 492-495.
- Uhlmann, S., Friedrichs, U., Eichler, W., Hoffmann, S. and Wiedemann, P. (2001). Direct measurement of VEGF-induced nitric oxide production by choroidal endothelial cells. *Microvasc Res* **62**, 179-189.
- Unger, R. H., Dobbs, R. E. and Orci, L. (1978). Insulin, glucagon, and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Annu Rev Physiol* **40**, 307-343.
- Uyama, M. (1991). [Choroidal neovascularization, experimental and clinical study]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **95**, 1145-1180.
- Uyama, M., Ohkuma H, Itagaki, T., Yamagishi, K., Nishimura, T. and Takahashi, K. (1987). Choroidal neovascularization and the retinal pigment epithelium. In: *Ocular circulation and neovascularization* (eds D. Benezra, N. E. Ryan, B. M. Glaser and R. P. Murhy), Martinus Nijhof, Dordrecht.
- Uyama, M., Takahashi, K., Yamagishi, K. and Ohkuma, H. (1988). Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. In: *Retinal pigment epithelium* (eds M. Zingirian and F. C. Piccolino), Kugler & Chedini, Amsterdam, pp 45-52.
- Van Hagen, P. M., Baarsma, G. S., Mooy, C. M., et al. (2000). Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol* **143 Suppl 1**, S43-51.
- Vanetti, M., Kouba, M., Wang, X., Vogt, G. and Holtt, V. (1992). Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett* **311**, 290-294.
- Vasilaki A, Sourlas V, Athanasiou V, Kouvaras E and Ek., A. (2008). Octreotide influences ischemia-induced [³H]D-aspartate release and GABA immunoreactivity changes in rat retinal and hippocampal preparations. In: *FENS Abstr*, p 051.039.
- Vasilaki, A., Gardette, R., Epelbaum, J. and Thermos, K. (2001). NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1600-1609.
- Vasilaki, A., Mouratidou, M., Schulz, S. and Thermos, K. (2002). Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* **43**, 899-909.
- Vasilaki, A., Papadaki, T., Notas, G., et al. (2004). Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1499-1506.
- Viguerie, N., Tahiri-Jouti, N., Ayril, A. M., et al. (1989). Direct inhibitory effects of a somatostatin analog, SMS 201-995, on AR4-2J cell proliferation via pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding protein-independent mechanism. *Endocrinology* **124**, 1017-1025.
- Villalobo, A. (2006). Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS J* **273**, 2329-2344.
- Vincent, S. R. and Hope, B. T. (1992). Neurons that say NO. *Trends Neurosci* **15**, 108-113.
- Vincent, S. R. and Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* **46**, 755-784.
- Wada, M., Ogata, N., Otsuji, T. and Uyama, M. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* **18**, 203-213.
- Waldbillig, R. J., Arnold, D. R., Fletcher, R. T. and Chader, G. J. (1991). Insulin and IGF-I binding in developing chick neural retina and pigment epithelium: a characterization of binding and structural differences. *Exp Eye Res* **53**, 13-22.
- Wassle, H., Chun, M. H. and Muller, F. (1987). Amacrine cells in the ganglion cell layer of the cat retina. *J Comp Neurol* **265**, 391-408.
- Watson, J. C., Balster, D. A., Gebhardt, B. M., et al. (2001). Growing vascular endothelial cells express somatostatin subtype 2 receptors. *Br J Cancer* **85**, 266-272.
- Weckbecker, G., Raulf, F., Stolz, B. and Bruns, C. (1993). Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacol Ther* **60**, 245-264.
- Wegewitz, U., Gohring, I. and Spranger, J. (2005). Novel approaches in the treatment of angiogenic eye disease. *Curr Pharm Des* **11**, 2311-2330.
- Weingeist, T. A., Kobrin, J. L. and Watzke, R. C. (1982). Histopathology of Best's macular dystrophy. *Archives of ophthalmology* **100**, 1108-1114.
- Weinstock, J. V. and Elliott, D. (1998). The substance P and somatostatin interferon-gamma immunoregulatory circuit. *Ann N Y Acad Sci* **840**, 532-539.

- Weinstock, J. V. and Elliott, D. (2000). The somatostatin immunoregulatory circuit present at sites of chronic inflammation. *Eur J Endocrinol* **143 Suppl 1**, S15-19.
- Wemeau, J. L., Caron, P., Beckers, A., *et al.* (2005). Octreotide (long-acting release formulation) treatment in patients with graves' orbitopathy: clinical results of a four-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 841-848.
- White, R. E., Schonbrunn, A. and Armstrong, D. L. (1991). Somatostatin stimulates Ca(2+)-activated K⁺ channels through protein dephosphorylation. *Nature* **351**, 570-573.
- Wilkinson-Berka, J. L., Wraight, C. and Werther, G. (2006). The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Curr Med Chem* **13**, 3307-3317.
- Wilson, S. H., Davis, M. I., Caballero, S. and Grant, M. B. (2001). Modulation of retinal endothelial cell behaviour by insulin-like growth factor I and somatostatin analogues: implications for diabetic retinopathy. *Growth Horm IGF Res* **11 Suppl A**, S53-59.
- Wink, D. A., Hanbauer, I., Krishna, M. C., Degraff, W., Gamson, J. and Mitchell, J. B. (1993). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9813-9817.
- Woltering, E. A., Watson, J. C., Alperin-Lea, R. C., *et al.* (1997). Somatostatin analogs: angiogenesis inhibitors with novel mechanisms of action. *Invest New Drugs* **15**, 77-86.
- Wu, P. C., Liu, C. C., Chen, C. H., *et al.* (2003). Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **241**, 63-69.
- Xidakis, C., Mastrodimou, N., Notas, G., *et al.* (2007). RT-PCR and immunocytochemistry studies support the presence of somatostatin, cortistatin and somatostatin receptor subtypes in rat Kupffer cells. *Regul Pept* **143**, 76-82.
- Yamada, T., Marshak, D., Basinger, S., Walsh, J., Morley, J. and Stell, W. (1980). Somatostatin-like immunoreactivity in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1691-1695.
- Yamamoto, R., Bredt, D. S., Snyder, S. H. and Stone, R. A. (1993). The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* **54**, 189-200.
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., *et al.* (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6736-6740.
- Yasuda, K., Rens-Domiano, S., Breder, C. D., *et al.* (1992). Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylcyclase. *J Biol Chem* **267**, 20422-20428.
- Yi, X., Mai, L. C., Uyama, M. and Yew, D. T. (1998). Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp Brain Res* **118**, 155-160.
- Yoshida, M., Tanihara, H. and Yoshimura, N. (1992). Platelet-derived growth factor gene expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 66-71.
- Yoshida, S., Yashar, B. M., Hirianna, S. and Swaroop, A. (2002). Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2554-2560.
- Young, R. (1971). The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *Journal of Cellular biology* **49**, 303-318.
- Young, R. and Bok, D. (1979). Metabolism of the retinal pigment epithelium. In: *The Retinal Pigment Epithelium* (ed M. M. Zinn Km), Harvard University Press, Cambridge, MA, pp 102-123.
- Young, R. W. (1987). Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* **31**, 291-306.
- Young, R. W. (1988). Solar radiation and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* **32**, 252-269.
- Zapata, P. D., Ropero, R. M., Valencia, A. M., *et al.* (2002). Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 915-926.
- Zavros, Y., Kao, J. Y. and Merchant, J. L. (2004). Inflammation and cancer III. Somatostatin and the innate immune system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G698-701.
- Zech, J. C., Pouvreau, I., Cotinet, A., Goureau, O., Le Varlet, B. and De Kozak, Y. (1998). Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 1600-1608.
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T. and Sims, P. J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* **272**, 18240-18244.
- Zhu, Z. R., Goodnight, R., Sorgente, N., Ogden, T. E. and Ryan, S. J. (1989). Morphologic observations of retinal pigment epithelial proliferation and neovascularization in the rabbit. *Retina* **9**, 319-327.
- Zinn Km and Benjamin - Henkind, J. (1982). Retinal pigment epithelium. In: *Ocular anatomy, embryology and teratology* (ed Jacobiec. Fa), Harper & Row, Philadelphia, pp 533-552.



Παράρτημα

Περίληψη

Πίνακας Συντμήσεων

Δημοσιευμένες Ανακοινώσεις

Βιογραφικό Σημείωμα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΛΑΓΧΡΟΥΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

Το Μεγάγχρουν Επιθήλιο του Αμφιβληστροειδούς (ΜΕΑ) είναι μια στοιβάδα κυβοειδών κυττάρων, πλουσίων σε χρωστική, που επικάθονται στη μεμβράνη του Bruch μεταξύ των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδή και της στιβάδας των χοριοτριχοειδών. Το ΜΕΑ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη στήριξη και λειτουργία των φωτοϋποδοχέων και εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πληθώρας οφθαλμικών παθήσεων όπως είναι η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (ΗΕΩ).

Η ΗΕΩ είναι η κυριότερη αιτία τύφλωσης ατόμων ηλικίας άνω των 65 ετών. Διακρίνεται στην ξηρά και εξιδρωματική μορφή. Η τελευταία είναι λιγότερο συχνή, έχει όμως βαρύτερη πρόγνωση καθώς μπορεί να προκαλέσει δραματική πτώση της όρασης μέσα σε λίγες μέρες. Χαρακτηρίζεται από αιμορραγική αποκόλληση του ΜΕΑ και την ανάπτυξη νεοαγγειακής μεμβράνης κάτω από το ΜΕΑ και στη συνέχεια υπό τον νευροαμφιβληστροειδή (χοριοειδική νεοαγγείωση). Για την αντιμετώπιση της δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία. Μέχρι σήμερα, έχουν δοκιμαστεί ποικίλα φαρμακευτικά σχήματα καθώς και εφαρμογή φωτοπηξίας με LASER, με στόχο πάντα την καταστροφή της νεοαγγείωσης.

Η σωματοστατίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο με ποικίλες δράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην περιφέρεια. Μια από τις κεντρικές της δράσεις είναι η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στον αμφιβληστροειδή έχει εντοπισθεί σε βραχύϊνα και γαγγλιακά κύτταρα και δρα σε πολλαπλά επίπεδα μέσω ειδικών υποδοχέων. Ο ρόλος της στα νευρωνικά κυκλώματα του αμφιβληστροειδούς αποτελεί αντικείμενο πολλών ερευνών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η σωματοστατίνη αναστέλλει την νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς που προκαλείται από ισχαιμία.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσουμε την ύπαρξη σωματοστατίνης και των υποδοχέων της καθώς και του λειτουργικού τους ρόλου στο ΜΕΑ *in vitro*, καθώς και να εξετάσουμε αν η σωματοστατίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα για τη θεραπεία ασθενών με ΗΕΩ.

Για τα όλα τα πειράματα *in vitro* χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά D407. Διαπιστώσαμε την ύπαρξη σωματοστατίνης και την παρουσία όλων των υποτύπων των υποδοχέων της σωματοστατίνης (sst₁₋₅), στα κύτταρα αυτά. Εντοπίσαμε επίσης

τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και ιδιαίτερα την ισομορφή iNOS και δείξαμε ότι η σωματοστατίνη, μέσω του sst₂ υποδοχέα της, αυξάνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την απελευθέρωση των μεταβολιτών του NO από τα κύτταρα D407.

Διαπιστώσαμε ότι η σωματοστατίνη προκαλεί μείωση του αριθμού των κυττάρων MEA με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μείωση αυτή οφείλεται σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού μέσω των υποδοχέων sst₂, sst₃ και sst₄, απόπτωση μέσω των υποδοχέων sst₁ και sst₅ και τοξικότητα στις μεγάλες συγκεντρώσεις ($\geq 10^{-5}$ M) μέσω των υποδοχέων sst₁ και sst₅. Η αναστολή του μονοπατιού των Πρωτεϊνικών Φωσφατασών της Τυροσίνης (PTPs) αναστέλλει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την δράση της σωματοστατίνης.

Προκειμένου να μελετήσουμε την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της χρήσης σωματοστατίνης στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης, σχεδιάσαμε προοπτική συγκριτική κλινική μελέτη 20 οφθαλμών, 20 ασθενών με HEΩ. Στην ομάδα μελέτης (10 ασθενείς) χορηγήθηκε συστηματικά το sst₂ εκλεκτικό ανάλογο της σωματοστατίνης Λανρεοτίδη (Somatuline, Ipsen) με μία ενδομυϊκή ένεση ανά μήνα επί 6 μήνες. Οι ασθενείς της ομάδας μελέτης παρακολουθήθηκαν για 12 μήνες ενώ αυτοί της ομάδας ελέγχου για 6 μήνες. Μελετήθηκαν οι μεταβολές στην οπτική οξύτητα (Ο.Ο) και τις παραμέτρους της φλουροαγγειογραφίας (Φ.Α). Στην ομάδα μελέτης, η Ο.Ο και η επιφάνεια υπερφθορισμού παρέμειναν σταθερές, ενώ η ένταση υπερφθορισμού αυξήθηκε, από τους 0 ως τους 6 μήνες. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Μετά από τη διακοπή της θεραπείας, παρατηρήθηκε επιδείνωση και στις τρεις παραπάνω παραμέτρους. Δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες από τη χρήση του φαρμάκου. Από την παρούσα κλινική μελέτη δεν αποδεικνύεται η αποτελεσματικότητα της Λανρεοτίδης για τη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης. Η τάση, όμως, σταθεροποίησης της οπτικής οξύτητας και των παραμέτρων της φλουροαγγειογραφίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας δικαιολογεί την μελλοντική διενέργεια μεγαλύτερων, πολυκεντρικών μελετών με διαφορετικές δόσεις ή οδούς χορήγησης του φαρμάκου.

Η παρούσα διατριβή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στις φυσιολογικές δράσεις της σωματοστατίνης στο MEA καθώς και για περαιτέρω κλινικές μελέτες για τη διαλεύκανση της χρησιμότητας της σωματοστατίνης, μόνης ή σε συνδυασμό με άλλες μορφές θεραπείας (LASER ή φωτοδυναμική), στη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης.

ABSTRACT

SOMATOSTATIN AND THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

The Retinal Pigment Epithelium (RPE) is a monolayer of cuboidal cells, rich in melanin, located between the photoreceptors and the choriocapillaries. RPE plays an important role in the function of photoreceptors and is involved in the pathophysiology of many ocular diseases such as the age-related macular degeneration (ARMD).

ARMD is the main cause of blindness in ages 65 years or older. There are two forms of the disease; the exudative and the dry form. Exudative ARMD is less common, yet carries a worse prognosis, as it may cause sudden, dramatic loss of vision. The hallmark of the disease is the development of choroidal neovascularization that grows through the RPE and under the retina. Up to now, there is no definite treatment for ARMD. Various treatment modalities have been proposed including LASER photocoagulation, photodynamic therapy and more recently, intraocular injections of anti-VEGF agents.

Somatostatin (SRIF) is a neuropeptide that exerts a diverse number of physiological actions in the peripheral and central nervous system. SRIF's actions are mediated by five subtypes (sst_1 - sst_5) of specific G-protein coupled receptors. In the retina somatostatin is located in amacrine and ganglion cells. Its role in the retinal circuitry is being extensively studied. There is experimental data to support that somatostatin inhibits the hypoxia-induced retinal neovascularization.

The purpose of the present thesis was to study the presence of SRIF and its receptors and their physiological role in human RPE. We also wanted to study if somatostatin is safe and effective in the treatment of ARMD.

The human RPE cell line D407 was used for all experiments. We detected the presence of all somatostatin receptor subtypes in these cells (sst_1 - sst_5). Of the three synthetases for nitric oxide (NOS), the iNOS was detected in D407. We demonstrated that SRIF, by activating its sst_2 receptors, increased NO's production in a concentration-dependent manner.

We demonstrated also that SRIF decreased cell viability in a concentration-dependent manner. The observed decrease in cell number was partly due to apoptosis via sst_1 , and sst_5 activation. Activation of sst_2 , sst_3 and sst_4 receptors led to inhibition of cell growth that did not involve apoptosis, but rather antiproliferative actions. SHP-

1 was detected in the human RPE cells and sodium orthovanadate reversed somatostatin's actions.

We designed a pilot, randomized, placebo-controlled, prospective trial to evaluate the role of somatostatin in the treatment of choroidal neovascularization. Twenty eyes of 20 patients were included in the study. Patients were randomly allocated to treatment with lanreotide (Somatuline, Ipsen) (10 eyes) or placebo (10 eyes). Patients received one intramuscular injection of lanreotide or placebo every 15 days for 6 months. Follow-up lasted for 6 months for the control group and for 12 months for the study group. The changes in visual acuity and fluorescein angiography at 6 months were compared between the two groups. In addition, the changes in the same parameters within the study group, from 6 to 12 months, were studied.

From baseline to 6 months the mean visual acuity and surface area of hyperfluorescence remained stable in the study group, while the intensity of hyperfluorescence decreased. After discontinuation of treatment, deterioration of all three parameters was noted in the study group. Statistical analysis, however, failed to reveal any significant difference from baseline. No adverse events were detected during treatment with lanreotide.

This clinical trial does not provide strong evidence for the effectiveness of SRIF in the treatment of ARMD. However, the trend for stabilization of visual acuity and fluorescein angiography parameters during treatment with lanreotide justifies the design of multicenter trials with larger samples and different drug dosages and/or routes of administration.

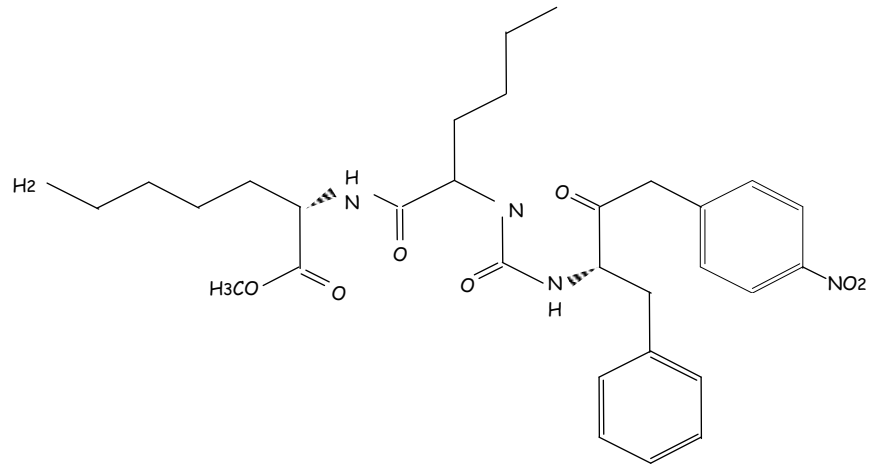
The present thesis has formed the base for further study of the mechanisms that are involved in the physiological actions of SRIF in human RPE. It has also given rationale for further study of the role of SRIF in the treatment of ARMD, alone or in combination with other agents (anti-VEGF) or other forms of treatment such as LASER or photodynamic therapy.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

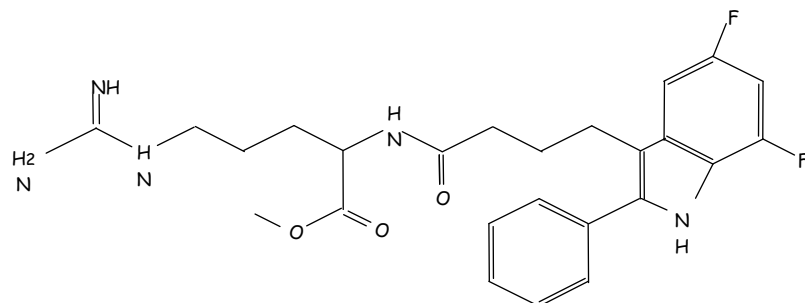
AC	Adenylate Cyclase (Αδενυλική κυκλάση)
ACh	Acetylcholine (Ακετυλοχολίνη)
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone (Αδρενοκορτικοτροπίνη)
ADP	Adenosine 5'-Diphosphate (5'-διφωσφορική αδενοσίνη)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-Isoxazole-Propionic acid (άλφα άμινο-3-υδρόξυ-5-μεθυλ-ισοξαζολ-προπιονικό οξύ)
ANOVA	Analysis of Variance (ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών)
ANCOVA	Analysis of Covariance (ανάλυση πολλαπλών συμεταβλητών)
Arg	Arginine (το αμινοξύ αργινίνη)
ao, s, i	alpha subunit of GTP binding protein o: unknown, s: stimulating, i: inhibitory (άλφα υπομονάδα των πρωτεϊνών που δεσμεύονται με τη GTP, άγνωστη, διεγερτική, ανασταλτική)
APS	Ammonium persulfate (υπερθειικό αμμώνιο)
ARMD	Age Related Macular Degeneration (εκφυλιση της ωχράς σχετιζόμενη με την ηλικία)
Asp	Aspartate (το αμινοξύ ασπαρτικό)
ATCC-2303	ATCC-2303 cell line (κυτταρική σειρά 2303 της εταιρείας ATCC)
ATP	Adenosine 5' triphosphate (Τριφωσφορική αδενοσίνη)
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2 gene (οικογένεια προαποπτωτικών ή αντιαποπτωτικών γονιδίων των θηλαστικών)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor (βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών)
BH ₄	5,6,7,8-τετραϋδροβιοπτερίνη
BIM 23014	D-Nal-c-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂ (Ανάλογο της σωματοστατίνης με προτίμηση δέσμευσης στον sst ₂ υπότυπο των υποδοχέων της)
BIM 23052	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH ₂ (Ανάλογο της σωματοστατίνης με προτίμηση δέσμευσης στον sst ₅ υπότυπο των υποδοχέων της)
BSA	Bovine Serum Albumin (Αλβουμίνη ορού βοδιού)
BSCVA	Best Spectacle-Corrected Visual Acuity (η καλύτερη οπτική οξύτητα με διόρθωση)
CaM	Calmoduline (Καλμοδουλίνη)
cAMP	3'-5' cyclic Adenocine Monophate (3'-5' κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)
CCK	Cholecystokinin (Χοληκυστοκίνηνη)
ΓΚ	Στιβάδα Γαγγλιακών Κυττάρων
cGMP	3'-5' cyclic Guanosine Monophate (3'-5' κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη)
CH 275	des-AA ^{1,2,5} [Tyr ² -DTrp ⁸ -IAmp ⁹]SRIF (Ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₁ υπότυπο των υποδοχέων της)
ChAT	Cholineacetyl Transferase (Τρανσφεράση της ακετυλοχολίνης)
CHO	Chinese Hamster Ovary cells (κύτταρα ωθηκών κινέζικου χάμστερ)
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary cells - subclone K1 (υποομάδα κυττάρων ωθηκών κινέζικου χάμστερ)
CME	Cystoid Macular Edema (κυστεοειδές οίδημα της ωχράς)
COS-7	African Green Monkey SV40 (Simian vacuolating virus 40)-transfected kidney fibroblast cell line.
cpm	counts per min (κρούσεις ανά λεπτό)
CRALBP	Cellular Retinaldehyde Binding Protein (κυτταρική πρωτεΐνη που δεσμεύει την ρετιναλδεΐδη.
CRH	Corticotropin Release Hormone [Εκλυτικός παράγοντας (ορμόνη) της Κορτικοτροπίνης]
CTP	Cytidine 5' Triphosphatase (τριφωσφατάση της κυστίνης)
Cys	Cysteine (το αμινοξύ κυστέϊνη)
ΔΑ	Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

DAPI	4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (διμεθυλικό οξείδιο του θείου)
DMEM	Dulbecco's high glucose Modified Eagle Medium
DNA	Deoxy ribonucleic Acid (δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
DNAse	DNA nuclease (ένζυμο που καταλύει την υδρολυτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στην άλυσο του DNA)
DNTPs	Deoxynucleoside triphosphatases (τριφωσφατάσες των δεοξυνουκλεοσιδίων)
DRY	(D) Aspartate - (R) Arginine - (Y) Tyrosine sequence, Asp-Arg-Tyr (Αλληλουχία των αμινοξέων ασπαρτικό-αργινίνη-τυροσίνη)
DTT	Dithiothreitol (Διθειοθρεϊτόλη)
EC ₅₀	Effective Concentration 50 (Σταθερά Αποτελεσματικής Συγκεντρώσης 50)
EDTA	Ethylen diamine tetraacetic acetic acid (Αιθυλεν-διάμινο-τετραοξικό οξύ)
EDRF	Endothelial-Derived Relaxation Factor (παράγοντας χάλασης που παράγεται από το ενδοθήλιο)
EGF	Endothelial Growth Factor (αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου)
EGTA	Ethylene Glycol-bis (β-Aminoethyl ether) - N, N, N', N' -Tetraacetic Acid (Αιθυλενο-γλυκολ-τετραοξικό οξύ)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (μέθοδος ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης)
ELM	External Limiting Membrane (έξω αφοριστική μεμβράνη)
ERK 1:2	Extracellular signal-regulated kinase 1:2 (κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα)
eNOS	endothelial Nitric Oxid Synthase (ενδοθηλιακή μορφή της συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
EOG	Electrooculogram (ηλεκτρο-οφθαλμογράφημα)
ERG	Electroretinogram (ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα)
ETDRS	Early Treatment for Diabetic Retinopathy Study (η μελέτη για την πρώιμη θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας)
Φ.A	Φλουοροαγγειογραφία
Fab	Antigen binding fragment (το μεταβλητό τμήμα του αντισώματος που συνδέεται με το αντιγόνο)
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide (Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο)
Fc	Fragment crystalizable region of an antibody (η σταθερή περιοχή ενός αντισώματος)
FGF	Fibroblast Growth Factor (αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών)
FMN	Flavin Mononucleotide (Φλαβινομονονουκλεοτίδιο)
GABA	γ-aminobutyric acid (γ-αμινοβουτυρικό οξύ)
GCL	Ganglion Cell Layer (στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων)
GDP	Guanosine 5'-Diphate (5'-διφωσφορική γουανοσίνη)
GH	Growth Hormone (Αυξητικής ορμόνης)
GHAPDRSG	Growth Hormone Antagonist for Proliferative Diabetic Retinopathy Study Group (ομάδα μελέτης του ρόλου της αυξητικής ορμόνης στην θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας)
GIP	Gastric Inhibitory Polypeptide (Γαστρικό ανασταλτικό πολυπεπίδιο)
Glu	Glutamate (γλουταμινικό οξύ)
Go, s, i	GTP binding protein ο: unknown, s: stimulating, i: inhibitory (πρωτεΐνη που δεσμεύεται με τη GTP, άγνωστη, διεγερτική, ανασταλτική)
G-protein	GTP binding protein (Πρωτεΐνη που δεσμεύεται με τη GTP)
GS	Guanylate Cyclase (Γουανιλική κυκλάση)
GTP	Guanosine 5'-Triphate (5'-τριφωσφορική γουανοσίνη)
HDL	High Density Lipoprotein (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (ρυθμιστικό διάλυμα 4-(2-υδροξαιθυλο) πιπεραζίνο-1-αιθανοσουλφονικού οξέος)
HEQ	Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς
HRP	Horseradish Peroxidase (Υπεροξειδάση ραπανιού)
hsst _{1,2A,2B,3-5}	human somatostatin receptor subtype 1,2A,2B,3-5 (Ανθρώπινος υπότυπος των υποδοχέων σωματοστατίνης 1, 2A, 2B, 3-5)

IC₅₀	Inhibitory Concentration 50 (Συγκέντρωση ημίσειας αναστολής)
IgG (H+L)	Immunoglobulin G (Heavy + Light chains) (Βαριές και ελαφριές αλυσίδες της ανοσοσφαιρίνης τύπου G)
IGF-1	Insulin Growth Factor -1 (αυξητικός παραγόντας της ινσουλίνης-1)
IL-1	Interleucine-1 (Ιντερλευκίνη-1)
ILM	Inner Limiting Membrane (έσω αφοριστική μεμβράνη)
INF-γ	Interferon-γ (Ιντερφερόνη γάμμα)
INL	Inner Nuclear Layer (έσω πυρηνική στιβάδα)
iNOS	Immuno Nitric Oxid Synthase (Ανοσολογική μορφή της συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
¹¹¹In-pentreoctide	[¹¹¹In-DTPA-D-Phe] conjugate of octreotide
IP3	Inositol triphosphate (Τριφωσφορική ινοσιτόλη)
IPL	Inner Plexiform Layer (έσω δικτυωτή στιβάδα)
kDa	Kilodalton (Χιλιάδες δάλτον)
K.N.Σ.	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
L-796,778	(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₃ υπότυπο των υποδοχών της)

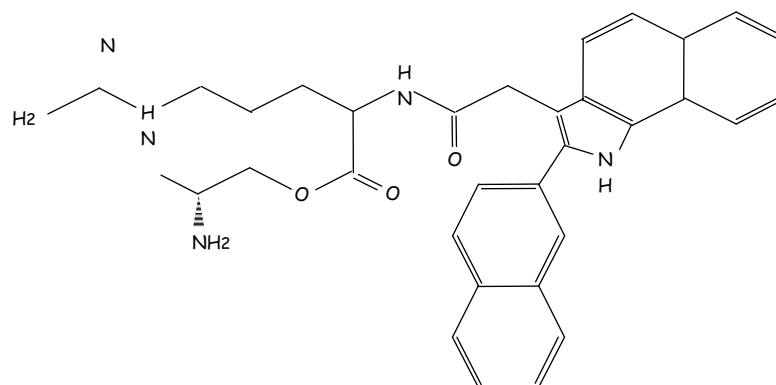


L-803,087	(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₄ υπότυπο των υποδοχών της)
------------------	---



L-817,818

(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst₅ υπότυπο των υποδοχέων της)



LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (ενίσχυση φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας)
LDH	Lactic Dehydrogonase (γαλακτική δεϋδρογονάση)
LDL	Low Density Lipoprotein (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας)
log [M]	Λογάριθμος της συγκέντρωσης σε Molar
LPS	Lipopolysaccharides (Λιποπολυσακχαρίτες)
Lys	Lysine (το αμινοξύ λυσίνη)
MAP-kinase	Microtubule Associated Protein -kinase (κινάση της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους-1 ^A)
MEA	Μελάγχουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς
MHC	Major Histocompatibility Complex (Κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας)
MK 678	c[N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe] (Ανάλογο της σωματοστατίνης με προτίμηση δέσμευσης στον sst ₂ υπότυπο των υποδοχέων της)
MPS	Macula Photocoagulation Study (η μελέτη για την φωτοπηξία της ωχράς)
MPSG	Macula Photocoagulation Study Group (η ομάδα μελέτης της φωτοπηξίας της ωχράς)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊνικό οξύ)
MTT	[3(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate- (Αναγμένη μορφή του φωσφορικού νικοταμιδο-αδενινο-δινουκλεοσιδίου)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (Μπλέ του νιτροτετραζολίου)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (το εθνικό κέντρο πληροφοριών βιοτεχνολογίας των ΗΠΑ)
NFL	Nerve Fiber Layer (στιβάδα νευρικών ινών)
NGS	Normal Goat Serum (Φυσιολογικός ορός αίγας)
NHE1	Na⁺/H⁺ exchanger-1 (η ισομορφή 1 της πρωτεΐνης ανταλλαγής ιόντων Na ⁺ /H ⁺)
NISA	Non-peptide imidazolidin-2,4-dione somatostatin receptor agonists (μη πεπτιδικά ανάλογα της σωματοστατίνης)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate (N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ)
nNOS	Nitric Oxid Synthase (Νευρωνική μορφή της συνθάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
NO⁻	Reduced (-) form of nitric oxide (Αναγμένη μορφή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
NO[•]	Nitric Oxide (Ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου)
NO⁺	Oxidized (+) form of nitric oxide (Οξειδωμένη μορφή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
NOS	Nitric Oxid Synthase (Συνθετάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
NRS	Normal Rabbit Serum (Φυσιολογικός ορός κουνελιού)
NSB	Non Specific Binding (Μη ειδική δέσμευση)

O.O.	Οπτική Οξύτητα
OPL	Outer Plexiform Layer (έξω δικτυωτή στιβάδα)
ONL	Outer Nuclear Layer (έξω πυρηνική στιβάδα)
PB	Phosphate buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων)
PFA	Paraformaldehyde (παραφορμαλδεύδη)
pH	power of Hydrogen, defined as minus the decimal logarithm of the hydrogen ion activity in an aqueous solution (μέτρο της οξύτητας ή της αλκαλικότητας ενός διαλύματος)
PIP2	Phospholipid biphosphoinositol (Φωσφολιπιδική διφωσφο-ινοσιτόλη)
PKA	Protein Kinase A (Πρωτεϊνική κινάση A)
PKC	Protein Kinase C (Πρωτεϊνική κινάση C)
PKCaM	Calmoduline dependent Protein Kinase (Πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη)
PKG	Protein Kinase G (Πρωτεϊνική κινάση G)
PLA2	Phospholipase A2 (Φωσφολιπάση A2)
PLC	Phospholipase C (Φωσφολιπάση C)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Φαινυλ-μεθυλ-σουλφονιλικό φθόριδιο)
Π.Ν.Σ.	Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
Prl	Prolactine (Προλακτίνη)
PTPs	Phosphotyrosin phosphatases (φωσφατάσες της φωσφοτυροσίνης)
PTX	PerTussis toXin (Τοξίνη του Κοκκίτη)
RC-160	(D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂) somatostatin analog
REM	Rapid Eye Movement (Ταχεία κίνηση των ματιών)
RIA	Radioimmuno Assay (Ραδιοανοσολογική ανάλυση)
RNA	Ribo Nucleic Acid (ριβονουκλεϊκό οξύ)
RNAse	RNA nuclease (ένζυμο που καταλύει την διάσπαση του RNA)
RPE	Retinal Pigment Epithelium (Μελάγχρουν Επιθήλιο του Αμφιβληστροειδή)
rpm	revolutions per minute / rounds per minute (Στροφές ανά λεπτό)
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφάσης)
SDS	Sodium Dodesyl Sulphate (Δωδεκυλοθεικού νατρίου)
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμίδιου)
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase (γλουταμική οξαλοξική τρανσαμινάση του ορού)
SGTP	Serum glutamic pyruvic transaminase (γλουταμική πυρουβική τρανσαμινάση του ορού)
SHPS	Src (sarcoma) Homology Phosphatases (πρωτεϊνικές φωσφατάσες της τυροσίνης)
SMS 201-995	D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol (Ανάλογο της σωματοστατίνης με προτίμηση δέσμευσης στον sst ₂ υπότυπο των υποδοχέων της)
SNAP	S-nitro-N-acetyl-penicillamide (S-νιτροσο-N-ακετυλ-πενικιλ-αμίνη),
SNP	Sodium Nitroprusside (Νιτροπρωσσικό νάτριο)
SRIF	Somatotropin Release Inhibitory Factor (Σωματοστατίνη)
sst _{1,2A,2B,3-5}	somatostatin receptor subtype 1,2A,2B,3-5 (Υπότυπος των υποδοχέων σωματοστατίνης 1,2A,2B,3-5)
T3	Triiodothyronine (Τριιωδοθυρονίνη)
T4	Tetraiodothyronine (Τετραϊωδοθυρονίνη, Θυροξίνη)
TAP	Treatment of AMD with Photodynamic Therapy (φωτοδυναμική θεραπεία για την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς)
Taq polymerase	Thermus aquaticus polymerase (πολυμεράση του θερμοφιλικού βακτηριδίου Thermus aquaticus)
TBS	Tris buffer Saline [Ρυθμιστικό διάλυμα τρις-(υδροξυμεθυλ)-αμινομεθανίου σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl)]
TEMED	N, N, N, N-tetramethyle diamide (N, N, N, N-τετραμεθυλ-διαμίδιο)
TER	Trans Epithelial Resistance (Διεπιθηλιακή αντίσταση)

TGF-β	Tumor Growth Factor-β (Παράγοντας αύξησης όγκων Βήτα)
TH	Tyrosine Hydroxylase (Υδροξυλάση της τυροσίνη)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α (Παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα)
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone [Εκλυτικός παράγοντας (ορμόνη) της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης]
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane [Τρις-(υδροξυμεθυλ)-αμινομεθάνιο]
TSH	Thyroid Stimulating Hormone (Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη)
TTP	Thymine Triphosphatase (τριφωσφατάση της θυμίνης)
Tyr / Tυρ	Tyrosine (το αμινοξύ Τυροσίνη)
Tyr¹¹-SRIF-14	Tyrosine¹¹-Somatotropin Release Inhibitory Factor-14 (Tυρ ¹¹ -σωματοστατίνη-14)
UniSTS	Database of sequence tagged sites (βάση δεδομένων για αλληλουχίες γονιδίων)
UV	Ultra Violet radiation (υπεριώδης ακτινοβολία)
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide (Αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων)
XNA	Χοριοειδική Νεοαγγείωση

ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

1. Papadaki T, Tsilimbaris M, Thermos K, Karavellas M, Samonakis D, Papadakis A, Linardakis M, Kouroumalis E, Pallikaris I. The role of lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: a pilot clinical trial. *Retina*. 2003 Dec;23(6):800-7.
2. Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Hoyer D, Tsilimbaris M, Kouroumalis E, Pallikaris I, Thermos K. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 May;45(5):1499-506.

B. ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (POSTERS) ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Papadaki T, Tsilimbaris M, Koutentaki M, Samonakis D, Thermos K, Kouroumalis H, Pallikaris I. The role of somatostatin in the treatment of subretinal neovascularization. A prospective clinical trial. Poster #942, *ARVO 2000*. Ft. Lauderdale FL, May 1-6, 2000.
2. Papadaki T, Tsilimbaris M, Thermos K, Markianou M, Karavellas M, Pallikaris I. The role of Lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization (CNV): a pilot clinical trial. *Aegean Retina VII, Crete- GR, July 6-8, 2001*.
3. Papadaki T, Vasilaki A, Tsilimbaris M, Pallikaris I, Thermos K. Somatostatin regulates nitric oxide production in human retinal pigment epithelial (RPE) cell cultures. Poster # 4584, *ARVO 2002*. Ft. Lauderdale FL, May 5-10 2002.
4. T. Papadaki, M. Tsilimbaris, I. Pallikaris, K. Thermos. Somatostatin receptor (sst₁₋₅) activation leads to a decrease in cell proliferation of human retinal pigment epithelium (RPE) cell cultures Poster #2518, *ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 2007*

942 THE ROLE OF SOMATOSTATIN IN THE TREATMENT OF SUBRETINAL NEOVASCULARIZATION (SRNV): A PROSPECTIVE CLINICAL TRIAL

T. Papadaki¹, M. Tsimbaris¹, M. Koutentaki¹, S. Exinger¹, D. Samonakis², K. Themos³, E. Kouroumalis², I. Palikaris¹
Dept. of Ophthalmology¹, Gastroenterology² & Pharmacology³ Medical School of University of Crete, Greece. Vardinoyannion Eye Institute of Crete, Greece.

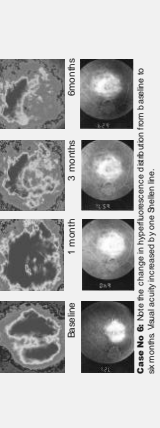
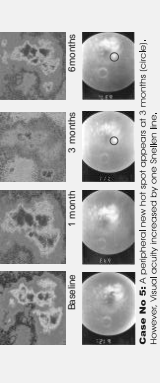
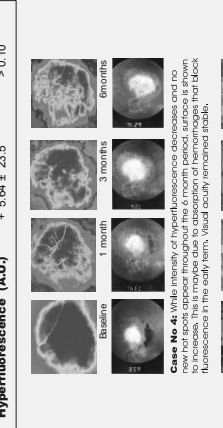
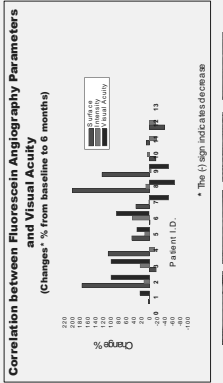
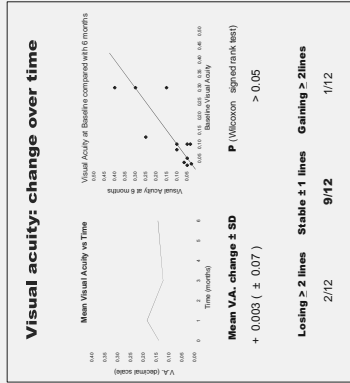
Purpose: Somatostatin belongs to the family of small regulatory peptides and has a wide spectrum of actions in the human body, including regulation of cell growth. It has been shown to inhibit angiogenesis in experimental models of neovascularization. Treatment with somatostatin was also able to reduce progression of neovascularization in diabetic patients with severe proliferative retinopathy. The purpose of this study is to evaluate the safety and efficacy of a somatostatin synthetic analogue, lanreotide, for the treatment of SRNV.

Methods: 12 eyes of 6 patients with SRNV were included in the study. All patients were given an intramuscular injection of lanreotide 30mg (Somatuline, FREN, France) every two weeks for a period of 6 months. All neovascular membranes were either subfoveal or juxtapapillary and not amenable to laser treatment. Evaluation of safety and efficacy of the treatment included visual acuity testing, ophthalmic examination, color photographs and fluorescein angiogram as well as close interval follow-up and baseline a laser by investigators at monthly intervals.

Visual acuity was tested by the EDRS protocol with EDRS charts. Baseline fluorescein angiograms and at 1-, 3 and 6 months were analyzed using an image analysis software capable of performing segmentation and mapping of the areas of interest in the fundus images. Analysis of each individual in age was performed in three steps:

1. The area of hyperfluorescence was outlined manually.
2. The background fluorescence, which was defined as the average intensity of 4 areas that were randomly selected outside the area of hyperfluorescence, was subtracted. The mean intensity and area of hyperfluorescence was calculated on the segmented images.
3. Finally, the segmented images were pseudocolored to demonstrate "hot spots" within the affected area.

Treatment Group	Sex	Age (years)	Retinal Lesions (pixels)	Mean age (± SD)	Mean baseline V.A. (20/63 to 20/600)	Prior surgical or medical treatment
Present study	12	6mo	17%	9-12mo	62%	52.6%
Stevens et al.	51	9-12mo	62%	12mo	52.6%	38%
RAD Group*	95	12mo				
PTMDS Group*	119	12mo				



Conclusions:
Visual Acuity remained unchanged throughout the treatment period. At 6 months, 9 out of the 12 eyes were within 1 Snellen line from baseline. Comparing our results regarding VA to that of control groups of other studies, it seems that treatment with Somatostatin had a positive effect on VA. In our small sample of eyes.
At the same interval, the changes in fluorescein angiography parameters were controversial. The surface of hyperfluorescence showed a statistically significant change from baseline (P<0.05); in 7 out of the 12 treated eyes, the surface was increased. The intensity of hyperfluorescence, however, remained stable. Follow-up data from 6 to 12 months post-treatment, as well as control group data analysis will clarify whether those changes are the effect of treatment with Somatostatin or can be attributed to the natural course of the disease.
Further studies that will include a larger sample of patients and will test various treatment regimens are justified. Also, the use of Somatostatin as an adjunct to other medical or surgical treatments of SRNV, remains to be tested.

References
Bhat, R., Lopez-Chavez, W., Wong, J., Kooze, C., Chan, C., Bhan, S., Bharti, S., et al. Essential role of growth hormone in retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:706-710.
Mack, T., Velez, J., Escobar, J., et al. Substitution of growth hormone for growth failure by long treatment with GH. *Endocrinology* 1992; 130:1840-1844.
Mack, T., Velez, J., Escobar, J., et al. Growth hormone therapy in growth failure by the Somatostatin analogue octreotide. *Endocrinology* 1993; 133:327-332.
RGO Study Group. An prospective, randomized, double-masked, full-concealation study for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1998; 105:2328-2347.
Pharmacological Therapy for Macular Degeneration Study Group. Retention of 20/20 visual acuity in patients with choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:854-872.
Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration. Results of a phase 3 trial. *Arch Ophthalmol* 1998; 117:161-173.
Brewer, S., Branstetter, M., Maguire, M., et al. Cholesterol Microvascularization in Age-Related Macular Degeneration. A natural history study. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:366-369.

Acknowledgement

4584

SOMATOSTATIN REGULATES NITRIC OXIDE PRODUCTION IN HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL (RPE) CELL CULTURES

T. Papadaki^{1, 2}, A. Vasiaki¹, M. Tsimbaris², I. Pallikaris², K. Themos¹

Departments of Pharmacology¹ and Ophthalmology², University of Crete, Faculty of Medicine, Greece



Purpose

Somatostatin receptors (sst₁) are found in the retina and recent evidence suggested the involvement of sst_{2A} and sst_{2B} in the regulation of nitric oxide production (Vasiaki et al., 2001).

RPE is a monolayer, which, among its complex metabolic functions, is supporting the function of photoreceptors. The exact way information is transferred to the RPE is unknown, but membrane receptors are involved. Identification of the macromolecules that are located in the RPE, will aid our understanding of the biochemistry of vision and the pathophysiology of ocular diseases.

The aim of the present study was to investigate the presence of Somatostatin (SRF), its receptors and their possible involvement in the regulation of nitric oxide production in human RPE cultures.

Methods

The ARPE-19 human cell line was used for all the experiments. SRF levels were detected by Radio Immuno Assay (polyclonal antiserum against SRF, 1:3000).

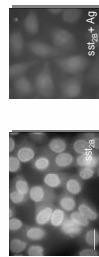
Immunoreactivity of sst receptors in cell cultures was studied with the use of human polyclonal antibodies raised against all six subtypes of sst (sst₁, sst_{2A}, sst_{2B}, sst₃, sst₄, and sst₅).

Presence of nitric oxide synthase (NOS) in the RPE cells was studied with the NADPH-diaphorase histochemical technique, a known marker of NOS.

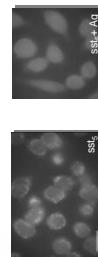
Effect of SRF and selective sst analogs on the production of nitric oxide from RPE cells: The cells were incubated for 20 min with SRF-14 and selective sst analogs, in concentrations ranging from 10⁻¹⁰M to 10⁻⁶M. NO release was measured indirectly by calculating the production of its stable metabolites NO₂⁻ and NO₃⁻ using the Griessham method.

Results

sst Immunoreactivity in Human RPE Cells

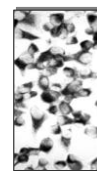


sst_{2B} immunoreactivity of human RPE cells. The signal is specific since it is abolished in the presence of antigen.



sst₄ immunoreactivity of human RPE cells. The signal is specific since it is abolished in the presence of antigen.

Presence of NOS in Human RPE Cells



NADPH-diaphorase staining of human RPE cells

SRF Levels

SRF was detected in human RPE cell cultures at a concentration of: 0.71 ± 0.21 pmole/mg protein (mean \pm SE)

Conclusions

Somatostatin is present in human RPE cells.

The receptors sst_{2B} and sst₄ are localized in the RPE cells as suggested by the immunoreactivity studies employing human anti sst_{2B} and sst₄ antibodies. NADPH-diaphorase is also present.

Somatostatin regulates nitric oxide production, by activating sst_{2B}. The effect of the sst₄ ligand cannot be explained since the human sst₄ antibody did not show immunoreactivity in the cells.

These data suggest that somatostatin may play an autocrine or paracrine role in the RPE. Its ability to regulate nitric oxide production provides for the first time a functional role of somatostatin in the RPE.

References

- Griessham MB, Johnson GG, Lancaster JR Quantification of Nitrate and Nitrite in extracellular fluids. *Methods in Enzymology*. 1996;268:237-246.
- Vasiaki A, Gardette R, Epelebaum J, Themos K. NADPH-Diaphorase Colocalization with somatostatin receptor subtypes sst_{2A} and sst_{2B} in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:1600-1609.
- Vasiaki A, Ntousis G, Schulz S, Kouroumalis E, Themos K Mapping of somatostatin receptor localization in the rat retina and colocalization with NADPH-Diaphorase: Effect of somatostatin nitric oxide production. *Abstr Soc Neurosci*, San Diego, 2001.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. S Schulz of Otto-von-Guericke Univ., Magdeburg, Germany for the kind donation of human anti-sst_{2B} antibodies and Savvas Pappachristou for excellent technical assistance.

This study was supported in part by the M. Menasassi Scholarship of the University of Crete and OIG3-CH1999-00908 to K.T.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑⁱ

Όνοματεπώνυμο: Θεοκλήτη (Θέκλα) Παπαδάκη
Διεύθυνση: Ανωπόλεως 40 , 71201 Ηράκλειο - Κρήτης
Τηλέφωνο: (Σ) 2810 – 228892 (Δ) 2810 - 392351
E-mail: theklapap@med.uoc.gr
Ημ. Γεννήσεως: 10 Οκτωβρίου 1967
Τόπος Γεννήσεως: Ηράκλειο Κρήτης
Εθνικότητα: Ελληνική
Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος (δύο παιδιά)

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΜΟΡΦΩΣΗ

1986 – 1992 Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Υπηρεσία Υπαίθρου και Ειδικότητα

1993 - 1994 Υπηρεσία υπαίθρου στον Υγειονομικό Σταθμό Ευρυτανίας και στο χωριό Άγραφα Ευρυτανίας

1994 - 1995 Ειδικευόμενη στην Οφθαλμολογία στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου, Κρήτης

1998 – 2001 Ειδικευόμενη στην Οφθαλμολογία στην Οφθαλμολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης.

10/2003 – 1/2004 Επιστημονικός Συνεργάτης Οφθαλμολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Κρήτης

2/2004 – Επιμελήτρια Β' ΕΣΥ Οφθαλμολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης

Υποειδικεύσεις – Fellowships

9/1995 – 2/1998 Διαθλαστική Χειρουργική. Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαρδινογιάννειο Εργαστήριο Μεταμοσχεύσεων και Μικροχειρουργικής Οφθαλμού (BEMMO). Επιβλέπων: Ιωάννης Παλλήκαρης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας

11/2001 – 11/2002 Ανοσολογία του Οφθαλμού και Ραγοειδίτιδα, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA. Επιβλέπων: C. Stephen Foster, MD

- 12/2002 – 6/2003** Γλαύκωμα, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA.
Επιβλέπων: Louis R. Pasquale, MD
- 9/2007 – 6/2008** Χειρουργική υαλοειδούς – αμφιβληστροειδούς, Ακαδημαϊκό
Ιατρικό Κέντρο, Πανεπιστήμιο του Άμστερνταμ, Ολλανδίας.
Επιβλέπων: Hendra Tan, MD

ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

- 1992** Άδεια ασκήσεως της Ιατρικής στον Ελλαδικό χώρο με
δυνατότητα αναγνώρισης της και στις χώρες της Ευρωπαϊκής
Ένωσης.
- 2001** Άδεια ασκήσεως της Οφθαλμολογίας στον Ελλαδικό χώρο με
δυνατότητα αναγνώρισης της και στις χώρες της Ευρωπαϊκής
Ένωσης.
- 2007** Άδεια ασκήσεως της Οφθαλμολογίας στην Ολλανδία

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 1997 – 2000** Μεταπτυχιακή υπότροφος, Βαρδινογιάννειο Εργαστήριο
Μεταμοσχεύσεων και Μικροχειρουργικής Οφθαλμού
(BEMMO), Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2000 –** Μεταπτυχιακή φοιτήτρια στα πλαίσια εκπόνησης διδακτορικής
διατριβής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου
Κρήτης.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 1987 – 1992** Υποτροφία του Πανεπιστημίου Αθηνών
- 1996 – 2000** Υποτροφία Βαρδινογιάννειου Ιδρύματος
- 1998** Βραβείο καλύτερου συνεργάτη (δεύτερη από τρεις θέσεις).
Οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης και BEMMO
- 1999 – 2000** Βραβείο καλύτερου συνεργάτη (πρώτη από μία θέση).
Οφθαλμολογική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης και BEMMO
- 2000 – 2002** Υποτροφία κληροδοτήματος «Μ. Μανασάκη» του
Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2001 - 2003** Υποτροφία Εμπειρικού Ιδρύματος για μεταπτυχιακές σπουδές
στο Εξωτερικό
- 2002 – 2003** Chief Fellow in Ocular Immunology, Massachusetts Eye and
Ear Infirmary, Boston MA.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 1995** Κατάρτιση παραϊατρικού προσωπικού στα Ιατρικά Laser. Πανεπιστήμιο Κρήτης και Πανεπιστημιακό Κέντρο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης Κρήτης.
- 1998** The Lancaster Course in Ophthalmology, Harvard Medical School. Waterville, Maine, USA. 21 Ιουνίου -14 Αυγούστου 1998
- 2000** Αγγειογένεση και Οφθαλμός. Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, FL, USA. 29 Απριλίου 2000
- 2002** Σεμινάρια Βιοστατιστικής για Κλινικούς Ερευνητές. Massachusetts General Hospital, Boston MA, USA. Απρίλιος - Μαΐος 2002.
- ALCON *CORE* (Complementary Ophthalmic Resident's Education) program, Boston, MA. 8-9 Νοεμβρίου 2002
- 2003** 2003 Vitreoretinal Course. Bascom Palmer Eye Institute, Miami, FL, USA. 2-3 Μαΐου 2003

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

- 1997 -** American Academy of Ophthalmology
2000 - Association for Research in Vision and Ophthalmology
1997 - European Society of Cataract and Refractive Surgeons
2001 - Πανελλήνια Οφθαλμολογική Εταιρεία
2003 - International Ocular Inflammation Society
2005 - Ιδρυτικό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας για την Μελέτη των Φλεγμονών & Λοιμώξεων του οφθαλμού

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- 1999** Ιδρυτικό μέλος του International Ophthalmological Training Center (IOTC), Βαρδινογιάννειο Εργαστήριο Μεταμοσχεύσεων και Μικροχειρουργικής Οφθαλμού (BEMMO), Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2001 -** Συμμετοχή στο πρόγραμμα διδασκαλίας της Οφθαλμολογίας στους φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης

2001 -

Συμμετοχή στο πρόγραμμα διδασκαλίας της Οφθαλμολογίας στους ειδικευόμενους της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά (Lower Certificate)
- Γερμανικά (Mittelstufe Sprachdiplom)
- Γαλλικά (μέτρια γραπτά και προφορικά)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Εργασίες σε περιοδικά με κριτές

1. Siganos DS, Evangelatou KA, Papadaki TG, Katsanevaki VJ, Dagos AI, Pallikaris IG. Photo-refractive keratectomy in eyes with congenital nystagmus. *J Refract Surg* 1998 ;14(6):649-52
2. Pallikaris IG, Koufala KI, Siganos DS, Papadaki TG, Katsanevaki VJ, Tourtsan V, McDonald MB Photorefractive keratectomy with a small spot laser and tracker. : *J Refract Surg* 1999 Mar-Apr; 15(2):137-44
3. Παπαδάκη Θ. Μαστοροδήμος Β, Τσιλιμπάρης Μ, Παλλήκαρης Ι. Μουκορμύκωση του οφθαλμικού κόγχου: παρουσίαση ενός περιστατικού. *ΙΑΤΡΙΚΗ* 2002; 79(1): 74-78.
4. Naoumidi I, Papadaki T, Zacharopoulos I, Siganos C, Pallikaris I. Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis: a histopathologic study in human corneas. *Arch Ophthalmol*. 2003 Jul; 121(7): 950-5.
5. Papadaki T, Tsilimbaris M, Thermos K, Karavellas M, Samonakis D, Papadakis A, Linardakis M, Kouromalis E, Pallikaris I. The role of lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: a pilot clinical trial. *Retina*. 2003 Dec;23(6):800-7.
6. Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, Mastrodimou N, Hoyer D, Tsilimbaris M, Kouromalis E, Pallikaris I, Thermos K. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 May;45(5):1499-506.
7. Androudi S, Iaccheri B, Brazitikos P, Papadaki T, Foster CS. Bilateral chronic anterior uveitis & neuro-ophthalmologic manifestations in a patient with Churg-Strauss syndrome: an

- unusual ocular presentation. *Ocul Immunol Inflamm.* 2004 Mar;12(1):59-63.
8. Iaccheri B, Roque M, Fiore T, Papadaki T, Mathew B, Baltatzis S, Emara B, Tokarewicz AC, Foster CS. Ocular cicatricial pemphigoid, keratomycosis, and intravenous immunoglobulin therapy. *Cornea.* 2004 Nov;23(8):819-22.
 9. Papadaki T, Papaliadis G, Zacharopoulos I, Christen W, Soheilian M, Zein G, Foster CS. Role of diagnostic vitrectomy in infectious uveitis. *MEJO* 2004 May;12(1):33-39
 10. Androudi S, Letko E, Meniconi M, Papadaki T, Ahmed M, Foster CS. Safety and efficacy of intravitreal triamcinolone acetonide for uveitic macular edema. *Ocul Immunol Inflamm.* 2005 Apr-Jun;13(2-3):205-12
 11. Papadaki T, Zacharopoulos I, Iaccheri B, Fiore T, Foster CS. Somatostatin for Uveitic Cystoid Macular Edema (CME). *Ocul Immunol Inflamm.* 2005 Dec;13(6):469-70
 12. Papadaki TG, Siganos CS, Zacharopoulos IP, Panteleontidis V, Charissis SK. Human amniotic membrane transplantation for tube exposure after glaucoma drainage device implantation. *J Glaucoma.* 2007; 16(1):171-2.
 13. Papadaki TG, Zacharopoulos IP, Papaliadis G, Iaccheri B, Fiore T, Foster CS. Plasmapheresis for lupus retinal vasculitis. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(11):1654-6.
 14. Papadaki TG, Kafkala C, Zacharopoulos IP, Seyedahmadi B J, Dryja T, Foster CS. Conjunctival non-caseating granulomas in a human immunodeficiency virus (HIV) positive patient attributed to sarcoidosis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2006;14(5):309-11.
 15. Papadaki TG, Zacharopoulos I, Pasquale L, Christen W, Netland P, Foster CS. Long-term results of Ahmed glaucoma valve implantation for uveitic glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(1):62-69
 16. Sobrin L, Kim EC, Christen W, Papadaki T, Letko E, Foster CS.. Infliximab therapy for the treatment of refractory ocular inflammatory disease. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(7):895-900
 17. Papadaki TG, el Massaoui R, van Ketel RJ, Verbraak FD, Tan H. *Capnocytophaga canimorsus* endogenous endophthalmitis in an immunocompetent host. *Br J Ophthalmol.* 2008 Nov;92(11):1566-7.
 18. Iaccheri B, Fiore T, Papadaki T, Androudi S, Janjua S, Bhaila I, Stephen Foster CS. Adverse drug reactions to treatments for ocular toxoplasmosis: a retrospective chart review. *Clin Ther.* 2008 Nov;30(11):2069-74
 19. Papadaki T, Iaccheri B, Fiore T, Zacharopoulos I, Thadani S, Christen W, Androudi S, C. Foster CS. Serum soluble interleukin-2 receptor levels do

not correlate with an associated systemic disease in patients with uveitis
Acta Ophthalmol. 2009 Jun 2. [Epub ahead of print]

20. Detorakis ET, Papadaki T, Panteleontidis V, Pallikaris IG, Tsilimbaris MK. Anterior staphyloma following an intravitreal injection of triamcinolone for the treatment of diabetic macular edema. Can J Ophthalmol. 2009 Aug;44(4):473-4.
21. Fiore T, Iaccheri B, Androudi S, Papadaki TG, Anzaar F, Brazitikos P, D'Amico DJ, Foster CS. Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy: outcome and visual prognosis. Retina. 2009 Jul-Aug;29(7):994-1001.
22. Tsilimbaris M, Diakonis VF, Naoumidi I, Charisis S, Kritikos I, Chatzithanasis G, Papadaki T, Plainis S. Evaluation of potential retinal toxicity of adalimumab (Humira). Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2009 Aug;247(8):1119-25. Epub 2009 Mar 19.
23. Zacharopoulos IP, Papadaki T, Manor RS, Briscoe D. Treatment of idiopathic orbital inflammatory disease with cyclosporine-A: a case presentation. Semin Ophthalmol. 2009 Nov-Dec;24(6):260
24. Papadaki T, Vitanova V, Zacharopoulos I, Tsilimbaris M. Central retinal vein occlusion after uncomplicated glaucoma filtering procedure combined with phacoemulsification. Semin Ophthalmol. 2009 Nov-Dec;24(6):254-5.
25. Fragkiskou S, Papadaki T, Minos E, Panteleontidis V, Tsilimbaris M. Lamellar retinal hole formation following routine cataract surgery. Semin Ophthalmol. 2009 Nov-Dec;24(6):239-40.
26. Tsilimbaris MK, Panteleontidis V, Panagiotoglou T, Arvanitaki V, Fragkiskou S, Eleftheriadou M, Tsika C, Papadaki T. Intravitreal combination of triamcinolone acetonide and bevacizumab (Kenacort-Avastin) in diffuse diabetic macular edema. Semin Ophthalmol. 2009 Nov-Dec;24(6):225-30.

Εισηγήσεις σε Συνέδρια

1. Παλλήκαρης Ι, Παπαδάκη Θ, Κατσανεβάκη Β. Ενδείξεις και αποτελέσματα διαθλαστικών επεμβάσεων. Εισηγήση στα πλαίσια του 32 Πανελληνίου Οφθαλμολογικού Συνεδρίου. Ελληνική Οφθαλμολογική Εταιρεία, 1999

Κεφάλαια σε βιβλία και ανασκοπήσεις

1. Pallikaris I, Siganos D, and Papadaki T: The Procedure. In: LASIK. Editors: I. Pallikaris and D. Siganos. Slack Inc, 1997
2. Pallikaris I, Papadaki T: Assisting Instrumentation. In: LASIK. Editors: I. Pallikaris and D. Siganos. Slack Inc, 1997

3. Pallikaris I, Papadaki T and Siganos D: Complex LASIK cases – Case Reports. In: The Art of LASIK. Editors: L. Probst, Machat J and Slade S. Slack Inc, 1998
4. Pallikaris I, Siganos D, Papadaki T: The Procedure. In: The Art of LASIK. Editors: L. Probst, Machat J and Slade S. Slack Inc, 1998
5. Pallikaris I, Papadaki T: The evolution of Lamellar Techniques. In: Refractive Surgery. Editors: Agarwald A. and Pallikaris I. Jay Pee Bros. Inc, 1999
6. Pallikaris I, Papadaki T and Siganos D: Reports on Complicated LASIK Cases. In: Complex Cases With LASIK. Editor: L. Probst, Slack Inc, 2000
7. Pallikaris I, Papadaki T: The history of LASIK. In: Manual of Refractive surgery. Editors: Siganos D. and Knorz M. ESCRS 2000.
8. Papadaki T. LASIK postoperative follow-up. Recognising and managing LASIK complications. In: The IOTC Mini Fellowships in Refractive Surgery Syllabus. Editors: Papadaki T. and Siganos C. VEIC/IOTC, 2000
9. Pallikaris I, Papadaki T. History of LASIK. In: LASIK. Editor: Azar DT. Dekker Publications, 2003.
10. Foster CS, Papadaki T. Diagnostic evaluations to guide therapy for anterior uveitis. Contemporary Ophthalmology 2002; 1(10): 1-8

Εργασίες στο Διαδύκτιο

1. Papadaki T: The use of Ahmed valve in uveitic glaucoma. May 2002. In: <http://www.uveitis.org>
2. Papadaki T: Vitreous biopsy for the diagnosis of uveitis. Sept. 2002. In: <http://www.uveitis.org>

Παρουσιάσεις - Ομιλίες

5/1997

Η χρήση των μικροκερατόμων στην LASIK. Φροντιστήριο στα πλαίσια του 30^{ου} Πανελληνίου Οφθαλμολογικού Συνεδρίου, Astir Palace, Βουλιαγμένη, Αθήνα.

5/1998

Μετεγχειρητική παρακολούθηση του διαθλαστικού ασθενή. Ομιλία στα πλαίσια φροντιστηρίου Διαθλαστικής Χειρουργικής. 30^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο Πόρτο Καράς, Χαλκιδική.

- 6/1998** Postoperative patient management. Ομιλία στα πλαίσια του πρώτου ESCRS Refractive Surgery Diploma Course, Vardinoyannion Eye Institute of Crete (VEIC).
- 9/1998** Αποκόλληση αμφιβληστροειδούς: διάγνωση και αντιμετώπιση. Ομιλία στα πλαίσια του προγράμματος συνεχιζόμενης εκπαίδευσης νοσηλευτριών. Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης.
- 1999 – 2000** “Mini Fellowships in Refractive Surgery”, IOTC, Vardinoyannion Eye Institute of Crete - GR.
- 5/2000** ISCRS – Global Refractive Surgery Education Program: “Fast track to LASIK”. 33rd Panhellenic Ophthalmological Congress, Thessaloniki, GR.
- 6/2001** Παθήσεις του ραγοειδούς. Ομιλία στα πλαίσια του εκπαιδευτικού προγράμματος ασκήσεως στην Οφθαλμολογία των φοιτητών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2/2002** The use of Ahmed valve in uveitic glaucoma. Immunology Conference. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA.
- 5/2002** Diagnostic Vitrectomy. Immunology Conference. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA.
- 9/2002** Early Intervention for Rheumatoid Arthritis. Immunology Seminar. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA
- 2/2003** Uveitic Glaucoma. Uveitis Support Group, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA
- 4/2003** Herpetic Episcleritis. Immunology Conference. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA
- 5/2003** Preliminary observations on the use of biologics in patients with otherwise treatment – resistant scleritis. Immunology Seminar. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston MA
- 2/2004** Τροποποίηση της Επούλωσης στην Χειρουργική του Γλαυκώματος. Ομιλία στα πλαίσια κλινικού φροντιστηρίου για την χειρουργική του Γλαυκώματος. 18ο Συνέδριο Ενδοφακών και Διαθλαστικής Χειρουργικής, Αθήνα, Hilton 2004
- 12/2004** Διαγνωστική προσέγγιση ασθενούς με οφθαλμική φλεγμονή. Ημερίδα Οφθαλμολογικής Εταιρείας Κρήτης, Δεκ. 2004
- 11/2004** Ραγοειδίτιδες, σύγχρονη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση. Τράπεζα στα πλαίσια του 3ου Πανελληνίου Συνεδρίου Οφθαλμικών Φλεγμονών & Λοιμώξεων, Αθήνα

- 1/2005** Κροταφική αρτηρίτιδα και οφθαλμός. Ημερίδα Ρευματολογικής Εταιρείας Κρήτης, Ιαν. 2005
- 5/ 2005** Το κόκκινο μάτι: η ταλαιπωρία ασθενών και οφθαλμιάτρων. Κλινικό φροντιστήριο. 38^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Μύκονος
- 6/ 2006** Παιδιατρική ραγοειδίτιδα. Στρογγυλή τράπεζα οφθαλμικών φλεγμονών. 39^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- 1/ 2007** Γκρίζες ζώνες των οφθαλμικών φλεγμονών. Στρογγυλή τράπεζα. 2^ο Συνέδριο Υαλοειδούς – αμφιβληστροειδούς, Αθήνα

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

1. Παλλήκαρης Ι, Σιγανός Δ, Κλώνος Γ, Δετοράκης Ε, Παπαδάκη Θ, Αστουρακάκης Ν, Mc Donald M. T-PRK για την διόρθωση χαμηλής μυωπίας με το Autonomous Technologies Excimer Laser with a small scanning beam and tracker: phase ΙΑ. 29^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 30 Μαΐου – 2 Ιουνίου 1996, Θεσσαλονίκη
2. Παπαδάκη Θ, Κατσανεβάκη Β, Σιγανός Δ, Παλλήκαρης Ι. Υποστροφή μυωπίας και haze μετά από PRK για την διόρθωση μυωπίας. 29^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 30 Μαΐου – 2 Ιουνίου 1996, Θεσσαλονίκη
3. Κουφαλά Κ, Παλλήκαρης Ι, Σιγανός Δ, Κλώνος Γ, Δετοράκης Ε, Παπαδάκη Θ, Αστουρακάκης Ν, Λαμπροπούλου Ν, Μαργαρίτης Β, Mc Donald M. T-PRK για την διόρθωση χαμηλής μυωπίας με το Autonomous Technologies Excimer Laser with a small beam and tracker: phase ΙΙΒ. 29^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 30 Μαΐου – 2 Ιουνίου 1996, Θεσσαλονίκη
4. Koufala K, Pallikaris I, Siganos D, Klonos G, Detorakis E, Papadaki T, Astyrakakis N, Lambropoulou A, Margaritis V, Tourtsan V, Mc Donald M. T-PRK for low myopia with the Autonomous Technologies Excimer Laser with a small beam and tracker: phase ΙΙΒ. Aegean Cornea III, September 6-8 1996, Samos, GR.
5. Papadaki T, Detorakis E, Houlakis V, Siganos D, Pallikaris I. Microbiological examination of therapeutic contact lenses used until reepithelialization in after laser refractive surgery. Aegean Cornea III, September 6-8 1996, Samos, GR.

6. Siganos D, Pallikaris I, Detorakis e, Papadaki T, Astyrakakis N. Topographic changes in LASIK. Aegean Cornea III, September 6-8 1996, Samos, GR.
7. Pallikaris I, Siganos D, Detorakis E, Papadaki T, Astyrakakis N. Enhancement of the PRK or LASIK ablated zone using arcuate corneal cuts. 1996 Midsummer symposium and exhibition, Minneapolis, Minnesota, USA.
8. Siganos D, Pallikaris I, Detorakis E, Papadaki T. Rotating brush vs blade removal of corneal epithelium in PRK. 1996 Midsummer symposium and exhibition, Minneapolis, Minnesota, USA
9. Siganos D, Pallikaris I, Detorakis E, Papadaki T. Corneal Topography changes in LASIK. 1996 Midsummer symposium and exhibition, Minneapolis, Minnesota, USA
10. Siganos D, Pallikaris I, Detorakis E, Klonos G, Papadaki T, Astyrakakis N. Topographic changes in LASIK. ARVO Ft. Lauderdale FL, 1996.
11. Mc Donald M, Pallikaris I, Koufala K, Siganos D, Detorakis E, Klonos G, Papadaki T, Katsanevaki V, Wyse T, Borodkin M. Clinical results of the autonomous Technologies Phase II Trials for Correction of Low Myopia. AAO, 1996.
12. I.G. Pallikaris, D.S. Siganos, E.T. Detorakis, G.G. Klonos, T.G. Papadaki, N.I. Astirakakis. Arcuate corneal cuts for the treatment of ablation zone decentration following PRK & LASIK, *Inv Ophthalmol Vis Sci*, 37(3):3039, 1996.
13. D.S. Siganos, I.G. Pallikaris, E.T. Detorakis, G.G. Klonos, T.G. Papadaki, N. I. Astirakakis. Topographic changes in LASIK. *Inv Ophthalmol Vis Sci*, 37(3):2616, 1996.
14. Ευαγγελάτου Κ, Σιγανός Δ, Κατσανεβάκη Β, Παπαδάκη Θ, Παλλήκαρης Ι. Μεταβολές στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς μετά από PRK. 30^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 28 Μαΐου – 1 Ιουνίου 1997, Αθήνα
15. Παπαδάκη Θ, Σιγανός Δ, Κατσανεβάκη Β, Αστυρακάκης Ν, Παλλήκαρης Ι, McDonald M, Gauthier C. Contrast Sensitivity μετά από PRK για την διόρθωση χαμηλής μυωπίας με το T-PRKTM Autonomous Technologies Excimer Laser. 30^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 28 Μαΐου – 1 Ιουνίου 1997, Αθήνα
16. Tsilimbaris MK, Kounalakis D, Papadaki T, Pallikaris IG: Utilization of the internet for a multi-center study data communication. Aegean Retina V, Halkidiki, June 27-29, 1997.

17. Pallikaris I, Koufala K, Siganos D, Papadaki T, Katsanevaki V, Tourtsan M, Mc Donald M. Clinical results of the Autonomous Technologies Phase II PRK trials for correction of low myopia and for correction of myopic astigmatism. The 1997 world refractive surgery symposium, June 13-15, 1997, Orlando Florida, USA.
18. D.S. Siganos, I.G. Pallikaris, M.B. McDonald, T.G. Papadaki, V.I. Katsanevaki, N.I. Astirakakis, , C.A. Gauthier. Glare Testing & Contrast Sensitivity changes after PRK for low myopia with the T-PRKTM Autonomous Technologies Excimer Laser – a one-year follow-up. ESCRS/SECOIR Winter Refractive Surgery meeting, Madrid 1997
19. Kounalakis D, Tsilimbaris MK, Papadaki T, Pallikaris IG: Availability of ERELAS Database through network. ESCRS/SECOIR Winter Refractive Surgery meeting, Madrid 1997
20. Pallikaris I, Koufala K, Siganos D, Tourstan V, Papadaki T, Katsanevaki V, Mc Donald M. T-PRK for low myopia with the Autonomous Technologies Excimer Laser: Phase II clinical results from GR. ESCRS/SECOIR Winter Refractive Surgery meeting, Madrid 1997
21. Siganos D, Papadaki T, Pallikaris I. Photorefractive Keratectomy (PTK) in the treatment of Salzmann’s nodular degeneration. ISRS Pre AAO Conference & Exhibition, October 24-26, 1997, San Francisco California, USA
22. Papadaki T, Siganos D, Katsanevaki V. Holladay’s diagnostic summary (HDS) in predicting visual acuity after photorefractive keratectomy (PRK). ISRS Pre AAO Conference & Exhibition, October 24-26, 1997, San Francisco California, USA
23. Pallikaris I, Koufala K, Siganos D, Papadaki T, Katsanevaki, Tourstan V, McDonald M. Clinical Results of the Autonomous Technologies Phase II PRK Trials for Correction of Low myopia. 1997 AAO Meeting, October 24-26, 1997, San Francisco California, USA
24. Pallikaris I, Siganos D, Papadaki T, Katsanevaki V, Evangelatou K. LASIK and PRK in the correction of myopia between 5-10 diopters. 1997 AAO Meeting, October 24-26, 1997, San Francisco California, USA
25. Pallikaris I, Katsanevaki V, Papadaki T. Technomed C-Scan Ray Tracing Analysis for the Evaluation of Objective Symptoms. Aegean Cornea IV, Santorini, GR, June 26-28, 1998

26. Siganos D, Papadaki T, Pallikaris. Glare and Contrast Sensitivity Changes Following Photorefractive Keratectomy. Aegean Cornea IV, Santorini, GR, June 26-28, 1998.
27. Papadaki T, Tsilimbaris M, Koutentaki M, Samonakis D, Thermos K, Kouroumalis H, Pallikaris I. The role of somatostatin in the treatment of subretinal neovascularization. A prospective clinical trial. Poster #942, ARVO 2000. Ft Lauderdale FL, May 1-6, 2000.
28. Papadaki T, Tsilimbaris M, Thermos K, Markianou M, Karavellas M, Pallikaris I. The role of Lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization (CNV): a pilot clinical trial. Aegean Retina VII, Crete- GR, July 6-8, 2001.
29. Papadaki T, Vasilaki A, Tsilimbaris M, Pallikaris I, Thermos K. Somatostatin regulates nitric oxide production in human retinal pigment epithelial (RPE) cell cultures. Poster # 4584, ARVO 2002. Ft. Lauderdale FL, May 5-10 2002.
30. Papadaki T. Severe retinal vasculitis associated with systemic lupus erythematosus. The 7th annual C.S. Foster Fellows meeting. ARVO 2002 Ft. Lauderdale FL, May 5th, 2002.
31. Papadaki T, Soheilian M, de la Torre A, Papaliadis G, Foster S. Pars plana vitrectomy for the diagnosis of infectious uveitis. 35th Panhellenic Ophthalmological Congress, Chalkidiki, GR, June 5-8 2002.
32. Papadaki T, Papaliadis G, Zacharopoulos I, Christen W, Soheilian M, Foster S. Infectious uveitis and te role of pars plana vitrectomy. American Uveitis Society Meeting, Wyndham Orlando Resort, Orlando FL, October 20, 2002,
33. Papadaki T, Papaliadis G, Zacharopoulos I, Christen W, Soheilian M, Foster S. Infectious uveitis and te role of pars plana vitrectomy. AAO/PAAO Joint Meeting, Orlando Fla, October 20-23 2002
34. Iaccheri B, Fiore T, Papadaki T, Androudi S, Foster CS. Adverse Reactions with Antitoxoplasma Therapy Poster #1415. ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 5, 2003
35. Papaliadis G., Iaccheri B., Fiore T., Papadaki T., Androudi S., Foster CS. Cyclosporine and Mycophenolate Mofetil: The Massachusetts Eye and Ear Infirmary Experience in the Treatment of Birdshot Retinochoroidopathy. ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 5, 2003
36. Letko E, Androudi S., Meniconi M., Papadaki T., Foster C.S. Safety and Efficacy of Intravitreal Triamcinolone Acetonide in

- Patients With Non-Infectious Uveitis. ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 6, 2003
37. Androudi S, Meniconi M, Christen W, Iaccheri B, Fiore T, Papadaki T, Foster CS. Outcomes of Early Versus Late Immunomodulatory Treatment in Patients With HLA-B27-Associated Chronic Uveitis Poster # 2414. ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 6, 2003
 38. Papadaki T, Iaccheri B, Fiore T, Androudi S, Thadani S, Meniconi M, Christen W, Foster CS. Soluble Interleukin 2 Receptor (sIL-2R) Levels in Patients With Ocular Inflammation. Poster #4603. ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 8, 2003
 39. Papadaki T. Juvenile idiopathic arthritis (JIA) – associated uveitis and cataract: report of a case. The 9th annual C.S. Foster Fellows meeting. ARVO 2003 Ft. Lauderdale FL, May 4th, 2002.
 40. Papadaki T, Foster CS. Preliminary observations on the efficacy of biologic therapy in patients with otherwise treatment-resistant scleritis. VII international symposium on ocular inflammation. May 25-30, 2003, Padova, Italy
 41. Iaccheri B., Fiore T., Papalioidis G., Papadaki T., Androudi S., Foster CS. Cyclosporine and Mycophenolate Mofetil: The Massachusetts Eye and Ear Infirmary Experience in the Treatment of Birdshot Retinochoroidopathy. Poster #55. VII international symposium on ocular inflammation. May 25-30, 2003, Padova, Italy
 42. Παπαδακη Θ., Pasquale RL, Foster CS. Μακροπρόθεσμα αποτελέσματα από την χρήση της βαλβίδας τύπου Ahmed στην αντιμετώπιση του γλαυκώματος που οφείλεται σε ραγοειδίτιδα. 36^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 4-8 Ιουνίου 2003, Χερσόνησος, Κρήτη
 43. Papadaki T, Pasquale RL, Christen WG, Netland PA, Foster CS. Long-term results of Ahmed valve implantation for uveitic glaucoma. Poster # PO057, 2003 AAO Annual Meeting, November 15-18, 2003, Anaheim CA
 44. Παπαδάκη Θ., Ζαχαρόπουλος I, Παπαδάκης E, CS Foster. Πρόδρομα αποτελέσματα από την χρήση βιολογικών παραγόντων για την θεραπεία της σκληρίτιδας. Αναρτημένη ανακοίνωση, Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, 2004
 45. Παπαδάκη Θ., Καραβέλα M, Iaccheri B, Fiore F, Thadani S, Foster CS. Τα επίπεδα των διαλυτών υποδοχέων IL2 σε ασθενείς με οφθαλμική φλεγμονή. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οφθαλμικών Φλεγμονών & Λοιμώξεων Αθήνα 2004

46. Iaccheri B, Fiore T, Androudi S, Papadaki T, Loewenstein J, Miller J, Young L, D'Amico D, Foster CS. Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy (APMPPE): final outcome and visual prognosis. Poster #2692 ARVO Ft. Lauderdale, FL, Apr 2004
47. Sobrin L, Kim E.C., Papadaki T, Letko E, Foster C.S. Infliximab for the Treatment of Refractory Ocular Inflammatory Disease. Poster #589. ARVO Ft. Lauderdale, FL, Apr 2006
48. T. Papadaki, M. Tsilimbaris, I. Pallikarisi, K. Thermos. Somatostatin receptor (sst1- 5) activation leads to a decrease in cell proliferation of human retinal pigment epithelium (RPE) cell cultures Poster #2518 ARVO Ft. Lauderdale, FL, May 2007