



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

***IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΙΑΓΙΑΔΑΚΗ ΦΩΤΕΙΝΗ
Βιολόγος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

....Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αυτή η διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου της καθηγήτριας Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Θερμού Κυριακής σχετικά με τη διαλεύκανση των ευεργετικών δράσεων του νευροπεπτιδίου σωματοστατίνη σε παθήσεις του αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού.

Μετά από ένα μεγάλο αριθμό δημοσιευμένων εργασιών, στο εργαστήριο της κ. Θερμού, με αντικείμενο τη χαρτογράφηση του σωματοστατινεργικού συστήματος στον αμφιβληστροειδή και την αποσαφήνιση του ρόλου που κατέχει η σωματοστατίνη υπό φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες, η παρούσα εργασία έρχεται να προσφέρει νέες πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής της σωματοστατίνης ως νευροπροστατευτικό φάρμακο σε εκφυλιστικές αμφιβληστροειδικές νόσους.

Η διατριβή αυτή υποστηρίχθηκε οικονομικά από το εγκεκριμένο ευρωπαϊκό Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού - "ΠΕΝΕΔ 2003" με τίτλο: «Πειραματικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών και ο ρόλος της σωματοστατίνης ως νευροπροστατευτικό», με επιστημονική υπεύθυνη την κ. Θερμού.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω ολόψυχα την Καθηγήτριά μου κ. Θερμού που μου έδειξε απόλυτη εμπιστοσύνη, με ενθάρρυνε, με υποστήριξε και με αγκάλιασε φιλικά από την πρώτη κιόλας συνεργασία μας, ενώ ήμουν ακόμη σε προπτυχιακό επίπεδο. Όλα αυτά τα χρόνια, δουλεύοντας μαζί της έμαθα πώς πρέπει να σκέφτεται, να δραστηριοποιείται και να δημοσιεύει το έργο του ένας σωστός ερευνητής, καθώς και πώς πρέπει να συμπεριφέρεται γενικά ένας σωστός επαγγελματίας. Οι συμβουλές και οι γνώσεις που απλόχερα μου προσέφερε οποιαδήποτε στιγμή το θέλησα σίγουρα θα με συνοδεύουν και θα με βοηθήσουν στη μετέπειτα ζωή και σταδιοδρομία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα:

Τον κ. Τσιλιμπάρη Μιλτιάδη, Επίκουρο Καθηγητή Οφθαλμολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την πολύ χρήσιμη κριτική του σε διάφορα ουσιαστικά θέματα σχετικά με τη διατριβή, καθώς και τη βοήθεια και στήριξη του όποτε τη χρειάστηκα, αλλά και την προτροπική πάντα διάθεσή του απέναντί μου με σκοπό να μπορέσω να εξελιχθώ και να προχωρήσω παραπέρα.

Τον κ. Σιγανό Χαράλαμπο, Επίκουρο Καθηγητή Οφθαλμολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής,

για τις δικές του χρήσιμες συμβουλές και τη στήριξή του σε όλη την πορεία της διατριβής.

Την κ. Βασιλάκη Άννα, Λέκτορα Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, συνεργάτιδα της κ. Θερμού και μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τη συνεχή στήριξη και αστείρευτη διάθεσή της να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε θέμα με απασχόλησε στη διάρκεια της διατριβής.

Τον κ. Καστελλάκη Ανδρέα, Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχοφυσιολογίας του τμήματος Ψυχολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και συνεργάτη της κ. Θερμού, για την πολύτιμη βοήθειά του σε τεχνικά ζητήματα που κατά καιρούς προέκυπταν και για την ψυχολογική του στήριξη.

Στο σημείο αυτό οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Μαστροδήμου Νίκη, υποψήφια Διδάκτωρ και συνεργάτιδα της κ. Θερμού, για την πάντα άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο, το χρόνο που αφιέρωσε στην εκπαίδευσή μου, τις συμβουλές της και τη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας.

Ακόμη, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω θερμά ορισμένους σπουδαιούς συναδέλφους, από το εργαστήριο ή όχι της κ. Θερμού, για τις πολύ καλές σχέσεις αλληλεγγύης και συνεργασίας και την ευχάριστη ατμόσφαιρα που αναπτύξαμε στην καθημερινή μας συνύπαρξη: Μαραζιώτη Αντωνία, Ρενιέρη Ελένη, Σαββάκη Μαρία, Γκουντέλιας Κώστας, Ψηφογεώργου Κάσση, Τσόκα Παυλίνα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Κωστή και Σοφία Κιαγιαδάκη, και την αδερφή μου, Μαρία, για τις αρχές και τις αξίες που μου μετέδωσαν, το σεβασμό τους στις μέχρι τώρα επιλογές μου, καθώς και την πολύτιμη υποστήριξή τους, ηθική και υλική, όλα τα χρόνια σπουδών μου μέχρι και σήμερα. Η οικογένειά μου αποτελεί για μένα κυρίαρχο πρότυπο και χωρίς τη συμβολή της δεν θα ήμουν τώρα σε αυτή τη θέση. Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στο σύντροφο της ζωής μου Κώστα Γιακουμάκη, που με μεγάλη αγάπη, αφοσίωση και υπομονή είναι δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

Νοέμβριος 2009

Ηράκλειο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

◆ Πρόλογος.....	I
-----------------	---

◆ Συντομογραφίες.....	VIII
-----------------------	------

◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΕΣ

1. A. 1. Αμφιβληστροειδής χιτώννας: Δομή & Λειτουργία.....	2
1. A. 2. Αμφιβληστροειδική ισχαιμία & κυτταρικός θάνατος.....	5
1. A. 3. Αμφιβληστροειδική ισχαιμία & νεοαγγείωση	9
1. A. 4. Αμφιβληστροειδοπάθειες στο σύγχρονο κόσμο.....	10
1. A. 5. Σύγχρονες θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών	13

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΩΝ

15

Γ. ΤΟ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1. Γ. 1. Γλουταμινικό οξύ.....	18
1. Γ. 2. Υποδοχείς γλουταμινικού: Δομή & Λειτουργία.....	20
1. Γ. 3. Οι υποδοχείς του γλουταμινικού στον αμφιβληστροειδή.....	23

Δ. ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

1. Δ. 1. Σωματοστατίνη: Χαρακτηριστικά & Φυσιολογία του μορίου.....	26
1. Δ. 2. Υποδοχείς σωματοστατίνης: Δομή & Λειτουργία στον αμφιβληστροειδή	28

Ε. Η ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΩΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΣΕ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

36

◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	39
--	----

◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3. 1. Πειραματόζωα	42
3. 2. Πειραματική διαδικασία ενδοφθάλμιας χορήγησης ουσιών	42
3. 3. Ανοσοϊστοχημεία	43
3. 4. Τεχνική TUNEL.....	47
3. 5. Μικροσκοπία	47
3. 6. Ραδιοανοσοανάλυση	47
3. 7. Ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford.....	50
3. 8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών.....	51
3. 9. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	54

◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. 1. Δημιουργία in vivo μοντέλου αμφιβληστροειδοπαθειών

4. 1. 1. Δόσο- και χρόνο- εξαρτώμενη επίδραση του AMPA στην έκφραση της ChAT.....	59
4. 1. 2. Χρόνο-εξαρτώμενη επίδραση του AMPA στην έκφραση της bNOS... ..	61
4. 1. 3. Επίδραση του AMPA στην έκφραση της Calbindin	61
4. 1. 4. Επίδραση του AMPA στην έκφραση άλλων κυτταρικών δεικτών.....	64
4. 1. 5. Επίδραση του AMPA στο βαθμό απόπτωσης στον αμφιβληστροειδή	64

4. 2. Μελέτη της επίδρασης της διεγερτοτοξικότητας στο σωματοστατινεργικό σύστημα

4. 2. 1. Επίδραση του AMPA στην ανοσοδραστικότητα και τα επίπεδα απελευθέρωσης της σωματοστατίνης	72
4. 2. 2. Επίδραση του AMPA στην ανοσοδραστικότητα και τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα sst _{2A}	72

4. 2. 3. Επίδραση του AMPA στην ανοσοδραστικότητα των υποδοχέων sst ₁ , sst ₄ και sst ₅	73
--	----

4. 3. Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στο μοντέλο της διεγερτοτοξικότητας

4. 3. 1. Επίδραση της σωματοστατίνης συγχωρηγούμενης με το AMPA στα χολινεργικά κύτταρα	81
4. 3. 2. Επίδραση του sst _{2/5} εκλεκτικού αναλόγου BIM23014 συγχωρηγούμενου με το AMPA στα χολινεργικά κύτταρα	81
4. 3. 3. Επίδραση του sst ₂ εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το AMPA στα χολινεργικά και bNOS κύτταρα	84
4. 3. 4. Επίδραση του sst ₂ εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το AMPA στα οριζόντια κύτταρα	84
4. 3. 5. Επίδραση του sst ₂ εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το AMPA στην απόπτωση του αμφιβληστροειδή	87
4. 3. 6. Επίδραση των sst ₁ (L-797,591) και sst ₄ (L-803,087) εκλεκτικών αναλόγων συγχωρηγούμενων με το AMPA στα χολινεργικά κύτταρα	87
4. 3. 7. Επίδραση του sst ₅ (L-817,818) εκλεκτικού αναλόγου συγχωρηγούμενου με το AMPA στην αμφιβληστροειδική τοξικότητα.....	90
4. 3. 8. Επίδραση του sst ₂ εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 χορηγούμενου <u>μετά</u> την έγχυση του διεγερτικού AMPA.....	94

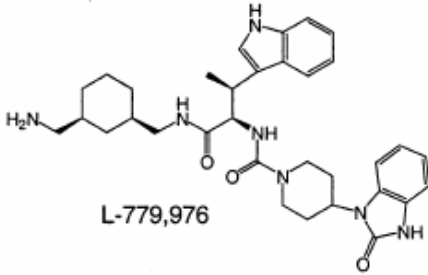
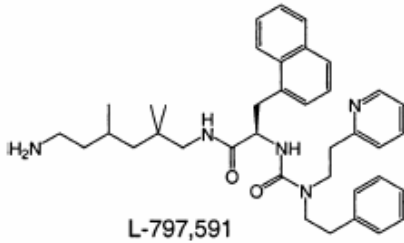
4. 4. Μελέτη του μηχανισμού της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στο μοντέλο της διεγερτοτοξικότητας

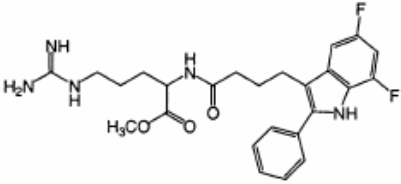
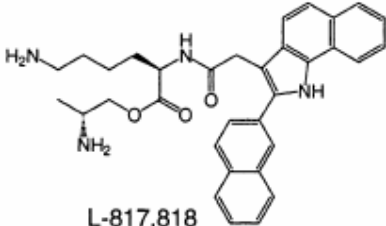
4. 4. 1. Εμπλοκή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης	98
4. 4. 2. Εμπλοκή του cGMP στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης	103
4. 4. 3. Μελέτη της μεταβολής των επιπέδων απελευθέρωσης γλουταμινικού οξέος.....	108
4. 4. 4. Συνεντοπισμός του υποδοχέα sst ₂ με ChAT	108

◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	112
◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	135
◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	138
◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ABSTRACT	141
◆ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	144
◆ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	166
◆ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	172

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ab	Antibody , αντίσωμα
AC	Amacrine Cell , αμακρινικό κύτταρο
ACPD	1- amino-<i>cis</i>-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid , 1-αμινοκυκλοπεντανο-1,3-δικαρβοξυλικό οξύ
AMPA	α- amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid , α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλ-4-ισοξαζολπροπιονικό οξύ
ARMD	Age-Related Macular Degeneration , γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology , οργανισμός έρευνας στην όραση και οφθαλμολογία
ATP	Adenosine 5' triphosphate , Τριφωσφορική αδενοσίνη
ATPase	Adenosine 5' triphosphate-ase , ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του ATP
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor , βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
BIM23014	D-Nal-c-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂ (ονομάζεται και λανρεοτίδη ή, στο εμπόριο, σωματουλίνη): ανάλογο της σωματοστατίνης με προτίμηση δέσμευσης στον sst ₂ υπότυπο των υποδοχέων της
BRAO	Branch Retinal Artery Occlusion , απόφραξη κλάδου της αμφιβληστροειδικής αρτηρίας
BSA	Bovine Serum Albumin , αλβουμίνη ορού βοδιού
C	Cone , κωνίο
CaBP	Calbindin Protein , καλβινδίνη
cAMP	3'-5' cyclic Adenocine Monophosphate , 3'-5' κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CBC	Cone Bipolar Cell , δίπολο κύτταρο που συνδέεται με τα κωνία
ChAT	Choline Acetyltransferase , ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης
CICR	Calcium-Induced Calcium Release , απελευθέρωση ασβεστίου επαγόμενη από το ασβέστιο
CME	Cystoid Macular Edema , κυστοειδές οίδημα της ωχράς
CNQX	6- ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione , 6-κυανο-7-νιτροκινόξαλινο-2,3-διόνη
CNV	Choroidal Neovascularisation , χοριοειδής νεοαγγείωση
cpm	counts per minute , κρούσεις ανά λεπτό
CRAO	Central Retinal Artery Occlusion , απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή
D1, 2	Dopamine receptor subtype 1,2 , ντοπαμινεργικός υποδοχέας τύπου 1, 2
DAG	Diacylglycerol , διακυλογλυκερόλη
DME	Diabetic Macular Edema , διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας
DR	Diabetic Retinopathy , διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια
EDTA	Ethylen Diamine Tetraacetic acid , Αιθυλεν-διάμινο-τετραοξικό οξύ
ER	Endoplasmic Reticulum , ενδοπλασματικό δίκτυο
FDA	Food and Drug Administration , οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων
GABA	gamma-aminobutyric acid , γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GC	Ganglion Cell , γαγγλιακό κύτταρο
GCL	Ganglion Cell Layer , Στιβάδα των Γαγγλιακών Κυττάρων
GH	Growth Hormone , αυξητική ορμόνη

GLAST	G lutamate A spartate T ransporter, μεταφορέας γλουταμινικού-ασπαρτικού
GLT	G lutamate T ransporter, μεταφορέας του γλουταμινικού
Glu	G lutamate, γλουταμινικό οξύ
GluR	G lutamate R ecceptor, υποδοχέας γλουταμινικού
Gly	G lycine, γλυκίνη
GPCRs	G - P rotein C oupled R ecceptors, υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες
GSNO	S -nitrosoglutathione, S-νιτροζογλουταθειόνη
GTP	G uanosine 5'- t riphosphate, 5'-τριφωσφορική γουανοσίνη
HPLC	H igh- P erformance L iquid C hromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HRP	h orseradish p eroxidase, υπεροξειδάση ραπανιού
IGF	I nsulin-like G rowth F actor, αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με ινσουλίνη
IgG	I mmunoglobulin G (Heavy + Light chains), ανοσοσφαιρίνη τύπου G (Βαριές και ελαφριές αλυσίδες)
IHC	I mmunohistochemistry, ανοσοϊστοχημεία
INL	I nnner N uclear L ayer, Εσωτερική Πυρηνική Στιβάδα
IP ₃	I nositol t riphosphate, Τριφωσφορική ινοσιτόλη
IPL	I nnner P lexiform L ayer, Εσωτερική Δικτυωτή Στιβάδα
KA	K ainite, καϊνικό οξύ
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginine methyl ester, νιτρομεθυλεστέρας της L-αργινίνης
L-779,976	(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₂ υπότυπο του υποδοχέα της)
	 <p style="text-align: center;">L-779,976</p>
L-797,591	(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₁ υπότυπο του υποδοχέα της)
	 <p style="text-align: center;">L-797,591</p>
L-803,087	(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₄ υπότυπο του υποδοχέα της)

	 <p style="text-align: center;">L-803,087</p>
L-817,818	(Μη πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης εκλεκτικό για τον sst ₅ υπότυπο του υποδοχέα της)
	 <p style="text-align: center;">L-817,818</p>
MAP ^{1A}	Microtubule Associated Protein -1^A , πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους-1 ^A
mGluR	metabotropic Glutamate Receptor , μεταβολοτροπικός υποδοχέας γλουταμινικού
MPT	Mitochondrial Permeability Transition , διαπερατότητα μιτοχονδριακής μεσόφασης
mRNA	messenger Ribonucleic Acid , αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊνικό οξύ
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate , ανηγμένη μορφή του φωσφορικού νικοταμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου
NF-L	Neurofilament-Light , χαμηλού μοριακού βάρους υπομονάδα της τριπλέτας νευροϊνιδίων
NGS	Normal Goat Serum , φυσιολογικός ορός κατσίκας
NISAs	non peptide imidazolidin-2,4-dione SRIF receptor agonists , μη πεπτιδικοί αγωνιστές του υποδοχέα της SRIF
NMDA	N-methyl-D-aspartate , N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase , νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
NO	Nitric Oxide , μονοξείδιο του αζώτου
NO ⁻	Reduced (-) form of nitric oxide, Ανηγμένη μορφή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου
NO ⁺	Oxidized (+) form of nitric oxide, Οξειδωμένη μορφή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου
NR	NMDA Receptor , NMDA υποδοχέας
ODQ	1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin -1-one, 1H-[1,2,4] οξαδιαζολο[4,3-α]κουινοξαλίνη
ONL	Outer Nuclear Layer , Εξωτερική Πυρηνική Στιβάδα
OPL	Outer Plexiform Layer , Εξωτερική Δικτυωτή Στιβάδα
PB	Phosphate Buffer , φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
PBS	Phosphate-Buffered Saline , ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού με φωσφορικά άλατα
PCP	Phencyclidine , φαινοκυκλιδίνη
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor , αυξητικός παράγοντας παραγόμενος από τα αιμοπετάλια

PI	Phosphoinositide , φωσφοϊνοσιτίδιο
PKC	Protein Kinase C , πρωτεϊνική κινάση C
PLC	Phospholipase C , φωσφολιπάση C
R	Rod , ραβδίο
RBC	Rod Bipolar Cell , δίπολο κύτταρο που σχετίζεται με ραβδίο
RIA	Radioimmunoassay , ραδιοανοσοανάλυση
RPE	Retinal Pigment Epithelium , μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδή
rpm	rounds per minute , στροφές ανά λεπτό
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction , αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-αντίστροφης μεταγραφής
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis , αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρική πολυακρυλαμίδης που περιέχει θειϊκό δωδεκακυλικό νάτριο
sGC	soluble Guanylate Cyclase , διαλυτή μορφή της γουανυλικής κυκλάσης
SHP1	PTPase containing two Src homology 2 (SH2) domains, tyrosine phosphatase , φωσφατάση τυροσίνης
SRIF	Somatotropin Release Inhibitory Factor , ανασταλτικός παράγοντας απελευθέρωσης της σωματοτροπίνης
sst	somatostatin receptor subtype , υπότυπος του υποδοχέα της σωματοστατίνης
TBS	Tris Buffer Saline , Ρυθμιστικό διάλυμα τρις-(υδροξυμεθυλ)-αμινομεθανίου σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl)
TCA	Trichloroacetic acid , τριχλωροοξικό οξύ
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta , μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β
Tris-HCL	Tris (hydroxymethyl) aminomethane- Hydrochloric acid , Τρις (υδροξυμεθυλ)-αμινομεθάνιο- υδροχλωρικό οξύ
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling , σήμανση του τελικού άκρου (θραυσμάτων DNA) μέσω φθοριζόντων νουκλεοτιδίων UTP που μεταφέρονται εκεί και κολλάνε με την κατάλληλη μεταφοράση
V	Vessel , αγγείο
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor , αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων
VSCC	Voltage Sensitive Calcium Channels , τάση-ευαίσθητα κανάλια ασβεστίου
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter , μεταφορέας των διεγερτικών αμινοξέων
H	Horizontal cell , οριζόντιο κύτταρο
IAA	Iodoacetic Acid , Ιωδοοξικό οξύ
TH	Tyrosine Hydroxylase , υδροξυλάση της τυροσίνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

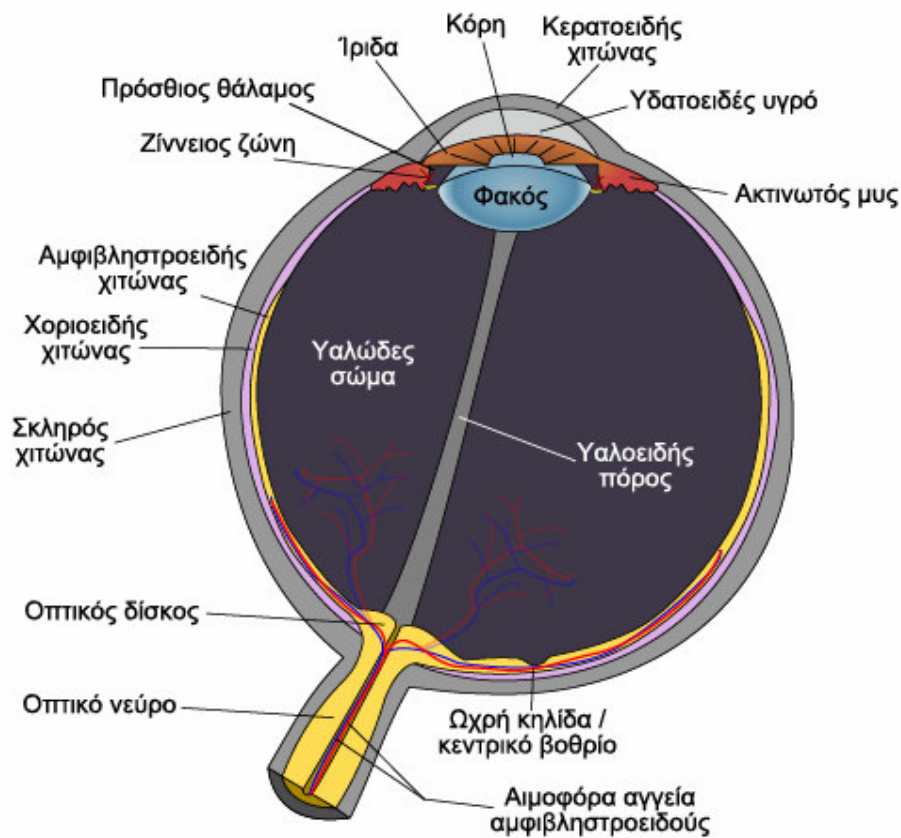
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΕΣ

1. A. 1. Αμφιβληστροειδής χιτώνας: Δομή & Λειτουργία

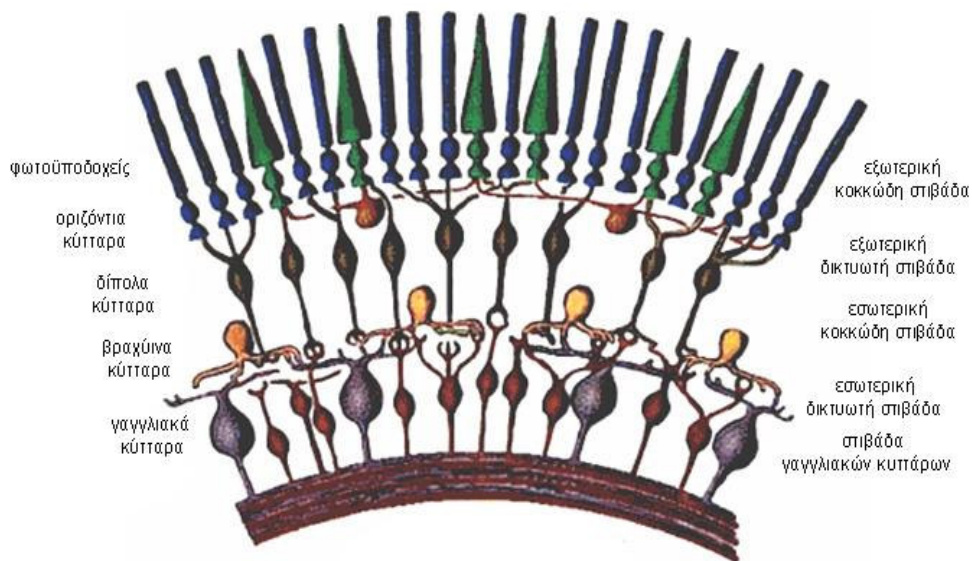
Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του οφθαλμού είναι ένα πολύ λεπτό στρώμα νευρικού ιστού και αποτελεί το εξειδικευμένο αισθητήριο όργανο που μετατρέπει το φως σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα αυτό, έπειτα, μεταβιβάζεται μέσω του οπτικού νεύρου σε ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου (οπτικός φλοιός) για περαιτέρω επεξεργασία,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

Ο αμφιβληστροειδής δεν είναι περιφερικό όργανο, αλλά μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος μιας και αναπτύσσεται απευθείας από το νευρικό εξώδερμα από όπου προέρχεται ο εγκέφαλος. Χαρακτηρίζεται, ωστόσο, από μια σχετικά απλή δομική οργάνωση συγκριτικά με άλλες εγκεφαλικές περιοχές. Περιλαμβάνει μόνο πέντε μεγάλες κατηγορίες νευρώνων που συνδέονται κατά ένα πολύπλοκο τρόπο.



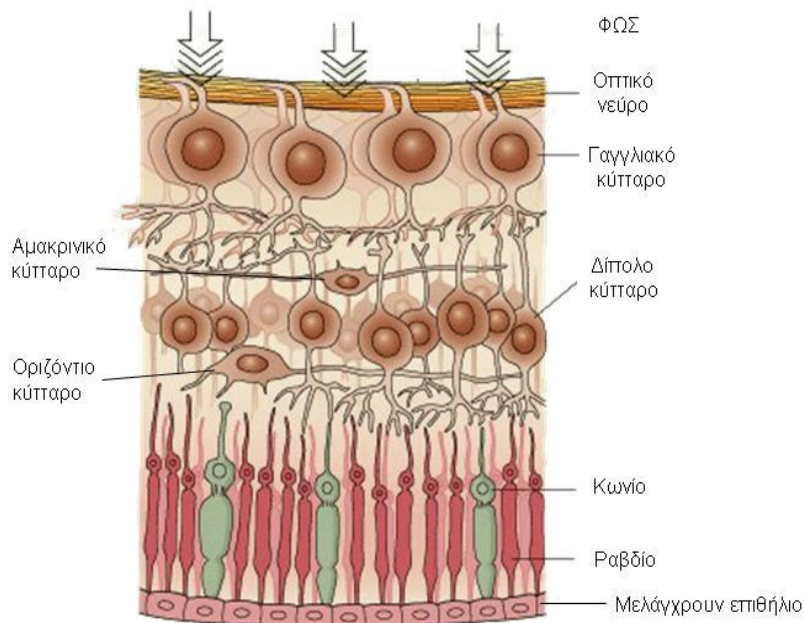
Σχήμα 1.1: Ανατομία του οφθαλμού. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας (με κίτρινο χρώμα) επενδύει προς τα πίσω την υαλοειδική κοιλότητα.

Στη βασική δομή αυτού του χιτώνα (σχ. 1.2) συμβάλλουν οι εξής πέντε κύριοι τύποι νευρικών κυττάρων: τα φωτοϋποδοκτικά (ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα) κύτταρα στην εξωτερική κοκκώδη στιβάδα (Outer Nuclear Layer, ONL), οι διάμεσοι νευρώνες (οριζόντια, δίπολα και βραχύινα ή αμακρινικά κύτταρα) στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα (Inner Nuclear Layer, INL) και τα γαγγλιακά κύτταρα στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Ganglion Cell Layer, GCL). Τα φωτοϋποδοκτικά, τα οριζόντια και τα δίπολα κύτταρα συνάπτονται στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (Outer Plexiform Layer, OPL). Τα δίπολα, τα βραχύινα και τα γαγγλιακά κύτταρα συνάπτονται στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (Inner Plexiform Layer, IPL). Η σύνδεση των δύο δικτυωτών στιβάδων γίνεται μέσω των δίπολων κυττάρων.



Σχήμα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής δομής του αμφιβληστροειδή. (τροποποίηση από διδ. διατριβή Α. Βασιλάκη, 2001)

Η οπτική πληροφορία μεταφέρεται κατακόρυφα, από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα και από εκεί στα γαγγλιακά κύτταρα, αλλά και πλάγια μέσω των οριζόντιων κυττάρων και των βραχύνων κυττάρων. Έτσι, υπάρχει το **κάθετο** και το **οριζόντιο** μονοπάτι μεταβίβασης του σήματος. Βέβαια, το φως πρέπει πρώτα να διέλθει διαμέσου των άλλων νευρώνων του αμφιβληστροειδή, που βρίσκονται πλησιέστερα προς το φακό, προκειμένου να φτάσει στους φωτοϋποδοχείς (σχ. 1.3). Γι' αυτό και οι εγγύς νευρικές στιβάδες του ιστού είναι αμύελες, ώστε το φως να φτάνει στους φωτοϋποδοχείς χωρίς να απορροφάται ή να διαχέεται σε μεγάλο βαθμό και να αλλοιώνεται η εικόνα.



Σχήμα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της κατεύθυνσης του φωτός προς τον αμφιβληστροειδή.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ο αμφιβληστροειδής χιτώνας συνδυάζει μια, όπως φαίνεται και πιο πάνω, σχετικά απλή δομή με μια αρκετά πολύπλοκη λειτουργία, γεγονός που τον καθιστά χρήσιμο για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα σύνθετα νευρωνικά κυκλώματα του εγκεφάλου επεξεργάζονται τις διάφορες πληροφορίες (Kandel και συν., 2003). Παρόλο που υπάρχει εκτεταμένη ηλεκτρική σύζευξη ανάμεσα στους νευρώνες του ιστού μέσω χασματοσυνδέσμων (Miyachi και συν., 1999), κυρίαρχο ρόλο κατέχει η χημική επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μέσω νευροδιαβιβαστών (Yang, 2004).

Ο αμφιβληστροειδής των σπονδυλωτών συνθέτει και χρησιμοποιεί μια ποικιλία νευροδιαβιβαστών. Ανάμεσα σ' αυτούς το γλουταμινικό οξύ (Glu) είναι ο κύριος διεγερτικός και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής. Το Glu παράγεται και απελευθερώνεται από φωτοϋποδοχείς, δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνο για την κάθετη μεταβίβαση της οπτικής πληροφορίας δρώντας μέσω εξειδικευμένων υποδοχέων σε όλα τα κύτταρα του ιστού. Το GABA, από την άλλη, συντίθεται και χρησιμοποιείται από πολυάριθμα οριζόντια και αμακρινικά κύτταρα και μετέχει στο οριζόντιο μονοπάτι μεταβίβασης του οπτικού σήματος κατέχοντας σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην επικοινωνία

μεταξύ των νευρώνων και στις δύο δικτυωτές στιβάδες (OPL, IPL) (Yang, 2004). Ωστόσο, χαρακτηριστικά παραδείγματα άλλων ουσιών που συντίθενται κυρίως από διάφορες εξειδικευμένες υποομάδες αμακρινικών κυττάρων και συμβάλλουν μέσω των υποδοχέων τους στη ρύθμιση της λειτουργίας του αμφιβληστροειδή είναι το μονοξειδίο του αζώτου, η ντοπαμίνη, η ακετυλοχολίνη, η σωματοστατίνη και η γλυκίνη. Η ισορροπημένη παραγωγή και δράση των προαναφερόμενων μορίων είναι καθοριστική για τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ομαλή λειτουργία του αμφιβληστροειδή, αλλά και απόκρισή του σε παθολογικές καταστάσεις.

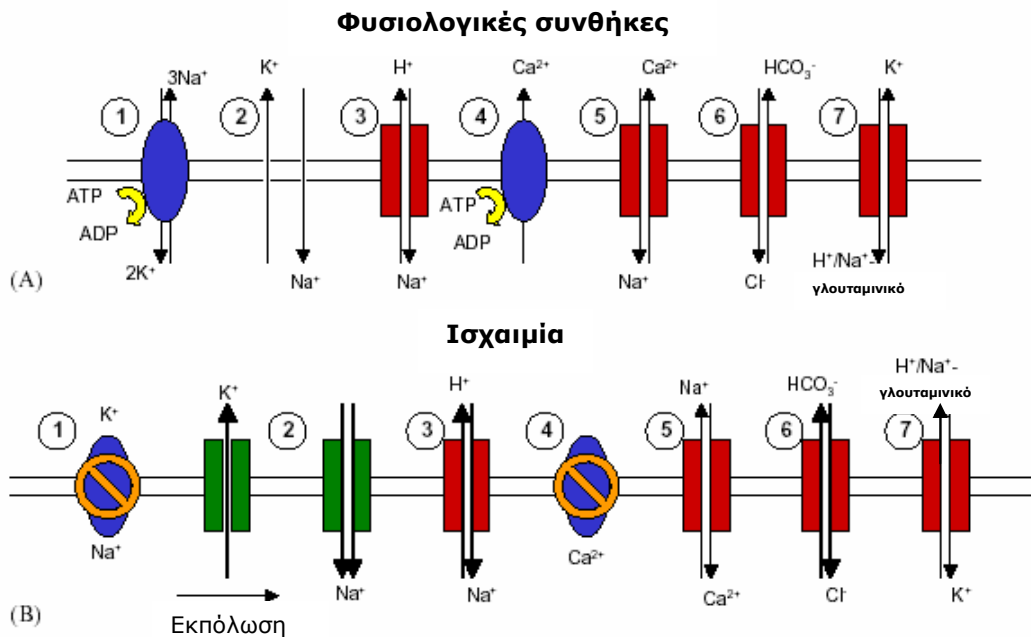
1. A. 2. Αμφιβληστροειδική ισχαιμία και κυτταρικός θάνατος

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδή είναι μια συνήθης κλινική κατάσταση που παραμένει μέχρι σήμερα, λόγω μη αποτελεσματικής θεραπείας, αιτία σημαντικών βλαβών στην όραση και τελικά τύφλωσης. Η κατάσταση της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας παρατηρείται σε πολλές σοβαρές οφθαλμικές παθήσεις, όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η αμφιβληστροειδοπάθεια των νεογνών και το γλαύκωμα.

Ισχαιμία ορίζεται ως η κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ελλιπή παροχή οξυγόνου και γλυκόζης στα κύτταρα ενός ιστού, καθώς και από μη αποτελεσματική αποβολή των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού. Το γεγονός αυτό επιφέρει κρίσιμες συνέπειες όπως τον αποτυχημένο μεταβολισμό και την πτώση των ενεργειακών αποθεμάτων (ATP), την αλλαγή στις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στην κυτταρική μεμβράνη των νευρώνων (Σχήμα 1.4), την τροποποιημένη μετακίνηση των ιόντων διαμέσου της μεμβράνης και κατεπέκταση αλλαγές στα επίπεδα διαφόρων νευροδιαβιβαστών και μεταβολιτών. Όλα τα παραπάνω αποτέλεσμα έχουν την εκτέλεση ενός πολύπλοκου και πολλές φορές δυσνόητου καταρράκτη αντιδράσεων μέσα στο κύτταρο που καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο και συχνά σε μη αντιστρεπτές μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές στον ιστό (Osborne και συν., 2004).

Συγκεκριμένα, από τις πιο σημαντικές πρώτες παρατηρούμενες συνέπειες μιας ισχαιμικής κατάστασης στον αμφιβληστροειδή είναι η εκπόλωση της νευρωνικής μεμβράνης, η αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων του γλουταμινικού και η ενεργοποίηση των ιονοτρόπων υποδοχέων του τελευταίου (Lipton & Rosenberg,

1994, Lipton, 1999, Lipton και συν., 2001). Ένας επακόλουθος καταρράκτης ενδοκυττάρων αντιδράσεων που περιλαμβάνει την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου και την επαγωγή της παραγωγής της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\cdot}) θεωρείται ότι είναι σημαντικός για τον τελικό κυτταρικό θάνατο (Osborne και συν., 2004).

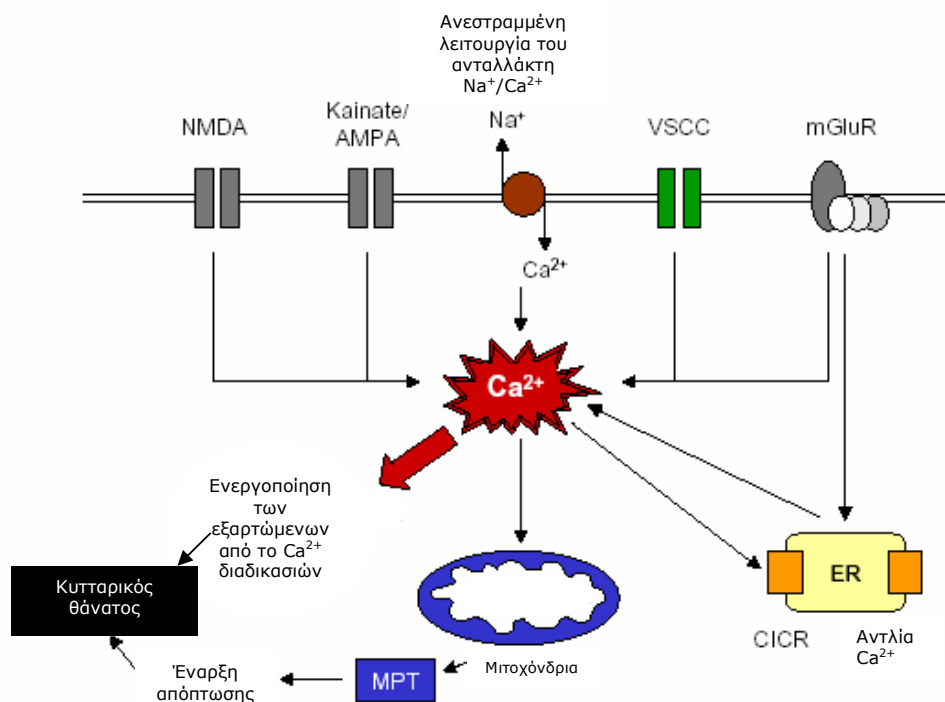


Σχήμα 1.4: Μερικά από τα πιο βασικά γεγονότα στη μεμβράνη των νευρώνων που αλλάζουν άμεσα ως αποτέλεσμα της ενεργειακής απώλειας σε καταστάσεις ισχαιμίας/υποξίας στον αμφιβληστροειδή. Υπάρχουν στη μεμβράνη πολλές διαφορετικές αντλίες, κανάλια και ανταλλάκτες ιόντων των οποίων η λειτουργικότητα συχνά συνδέεται. Υπό φυσιολογικές συνθήκες (A), η Na^+/K^+ -ATPase βγάζει έξω τα ιόντα νατρίου (Na^+) σε ανταλλαγή των ιόντων καλίου (K^+) που αντλούνται προς τα μέσα (1), ενώ διαχέονται αργά πάλι πίσω ανάλογα με τη διαβάθμιση της συγκέντρωσής τους (2). Επίσης, τα ιόντα Na^+ ανταλλάσσονται αργά με πρωτόνια (3) με ένα χαμηλό ρυθμό για να διατηρηθεί το ενδοκυττάριο pH στα φυσιολογικά επίπεδα. Η αντλία ασβεστίου (Ca^{2+}), από την άλλη, χρησιμοποιεί ATP για να απομακρύνει το ασβέστιο ενάντια στη διαβάθμιση της συγκέντρωσής του (4) και ο ανταλλάκτης ασβεστίου-νατρίου απομακρύνει και αυτός ασβέστιο σε ανταλλαγή με ιόντα νατρίου (5). Ο ανταλλάκτης των ιόντων χλωρίου - δικαρβονικών ανιόντων ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) αφαιρεί τα δικαρβονικά ανιόντα με ένα χαμηλό ρυθμό (6) σε συμφωνία με τα πρωτόνια (3) και με μηχανισμούς επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών από το συναπτικό χώρο [π.χ. μεταφορέας γλουταμινικού, (7)] μετά από ενεργοποίηση των μετασυναπτικών υποδοχέων. Στην ισχαιμική περίπτωση (B), όμως, οι αντλίες Na^+/K^+ -ATPase (1) και Ca^{2+} (4) αδυνατούν να λειτουργήσουν λόγω μειωμένου διαθέσιμου ATP. Αυτό προκαλεί το άνοιγμα των καναλιών που βγάζουν έξω από το κύτταρο κάλιο και αυτών που βάζουν μέσα στο κύτταρο νάτριο (2), όπως επίσης και την αναστροφή της λειτουργίας του ανταλλάκτη νατρίου-ασβεστίου (5), αλλά και του μεταφορέα επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστή (7). Τα πρωτόνια και δικαρβονικά ανιόντα γρήγορα απομακρύνονται από τον ενδοκυττάριο χώρο, προκειμένου να διατηρηθεί το ενδοκυττάριο pH κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ αυτές οι διαδικασίες καταλήγουν σε περαιτέρω εισαγωγή ιόντων νατρίου και χλωρίου αναγκαστικά μαζί με νερό,

με τελικό πιθανό αποτέλεσμα διόγκωση του κυττάρου και οίδημα. (τροποποίηση από Osborne και συν., 2004)

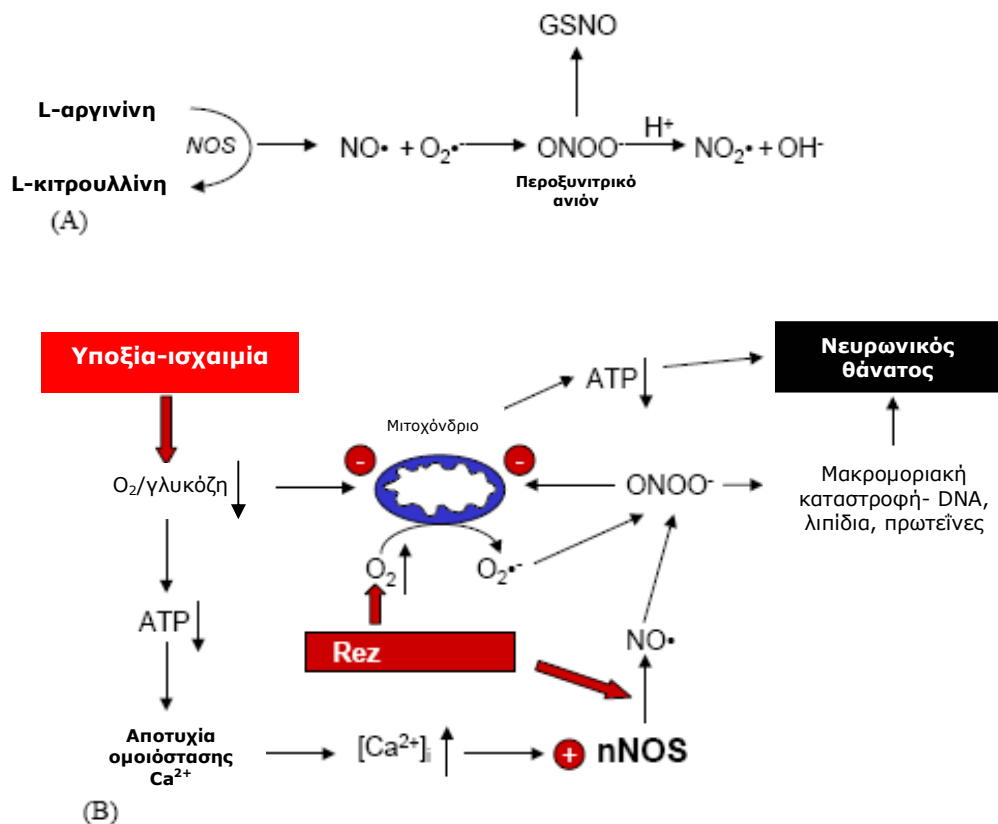
Όπως αναφέρεται και παραπάνω, το ασβέστιο κατέχει κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη μιας ισχαιμικής κατάστασης. Τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ασβεστίου μπορούν να αυξηθούν λόγω: i) καναλιών που διεγείρονται από νευροδιαβιβαστές (π.χ. γλουταμινικό) και επιτρέπουν τη διέλευση ασβεστίου (π.χ. ιονοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού NMDA ή AMPA/καϊνικού), ii) αναστροφής της ανταλλαγής νατρίου-ασβεστίου μέσω τασεο-ευαίσθητων καναλιών ασβεστίου, είτε iii) διέγερσης μεταβολοτρόπων υποδοχέων νευροδιαβιβαστών (π.χ. γλουταμινικού) που μπορούν να απελευθερώσουν ασβέστιο από ενδοκυτταρικές αποθήκες (σχ. 1.5).

Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Ca^{2+} έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών ενζύμων των οποίων η δράση εξαρτάται από αυτό το κατιόν (π.χ. πρωτεϊνική κινάση C, καλπαΐνες, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου). Αυτά τα ένζυμα προκαλούν αλλαγές τέτοιες που οδηγούν σε παρακώλυση σημαντικών ομοιοστατικών μηχανισμών, βλάβη της δομικής ακεραιότητας και τελικά κυτταρικό θάνατο. Τα μιτοχόνδρια, επιπρόσθετα, προσπαθούν να προσλάβουν αυτό το κατιόν, ενώ η διαπερατότητά τους έχει επηρεαστεί δραματικά από την ισχαιμία και τελικά το γεγονός αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα παραγόντων που προωθούν τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) (Osborne και συν., 2004).



Σχήμα 1.5: Ο κεντρικός ρόλος του Ca^{2+} στις διαδικασίες του ισχαιμικού νευρωνικού θανάτου. NMDA=N-methyl-D-aspartate/ N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ, AMPA=a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid/ α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλ-4-ισοξαζολπροπιονικό οξύ, kainate= καϊνικό οξύ, VSCC= Voltage Sensitive Calcium Channels/ τασσο-ευαίσθητα κανάλια ασβεστίου, mGluR= metabotropic Glutamate Receptor/ μεταβολοτροπικός υποδοχέας γλουταμινικού, ER= Endoplasmic Reticulum/ ενδοπλασματικό δίκτυο, MPT= Mitochondrial Permeability Transition/ διαπερατότητα μιτοχονδριακής μεσόφασης, CICR= Calcium-Induced Calcium Release/ απελευθέρωση ασβεστίου επαγόμενη από το ασβέστιο (τροποποίηση από Osborne και συν., 2004)

Σημαντικότατο, επίσης, ρόλο κατέχει η παραγωγή και απελευθέρωση των ελεύθερων ριζών κατά τη διάρκεια των ισχαιμικών γεγονότων. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.6A, η συνθάση του NO (NOS, Nitric Oxide Synthase) καταλύει την αντίδραση παραγωγής ριζών μονοξειδίου του αζώτου κατά τη μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη. Το μονοξείδιο του αζώτου υπό φυσιολογικές συνθήκες δρα ως αγγειοδιασταλτικός και αντιοξειδωτικός παράγοντας, αλλά και ενάντια στα αιμοπετάλια και τα ουδετερόφιλα κύτταρα του αίματος προκειμένου για ομοιοστατικούς σκοπούς. Όταν εμφανιστούν ρίζες υπεροξειδίου (O_2^-) - συχνά ως άμεση συνέπεια της ισχαιμίας - σχηματίζεται το περοξυνιτρικό (ONOO^-) το οποίο γρήγορα αποσυντίθεται σε πολύ δραστικές οξειδωτικές ρίζες που βλάπτουν τον ιστό. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει, φυσικά, μια ισορροπία μεταξύ όλων των παραπάνω μορίων, αλλά σε ισχαιμικές συνθήκες (σχ. 1.6B) παρατηρείται μια προτίμηση στο σχηματισμό του ONOO^- , γεγονός που τελικά οδηγεί σε καταστροφές στο DNA, στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου (Osborne και συν., 2004).



Σχήμα 1.6: Η παραγωγή και οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Α) Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μια κρίσιμη ισορροπία ανάμεσα στις συγκεντρώσεις NO[•], O₂⁻ και τη δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, με μια μεγαλύτερη προτίμηση προς την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου. Στην ισχαιμία η προτίμηση στρέφεται προς την παραγωγή του περοξυνιτρικού ανιόντος (ONOO⁻), το οποίο μπορεί γρήγορα να χάσει τις τοξικές του ιδιότητες όταν αντιδρώντας με γλουταθειόνη σχηματίζει S-νιτροζογλουταθειόνη (GSNO) γεγονός που εξαρτάται από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας του κυττάρου και κατά πόσο αυτός είναι λειτουργικός στη χρονική περίοδο μετά τη λήξη του ισχαιμικού ερεθίσματος. Β) Η παραγωγή των ριζών του μονοξειδίου του αζώτου σε συνδυασμό με αποτυχημένη αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου θα οδηγήσει σε εκτεταμένη καταστροφή μακρομορίων και κυτταρικό θάνατο στους νευρώνες. (τροποποίηση από Osborne και συν., 2004)

1. A. 3. Αμφιβληστροειδική ισχαιμία και νεοαγγείωση

Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ισχαιμία μπορεί να οδηγήσει και σε αγγειογένεση (ή νεοαγγείωση) στον αμφιβληστροειδή, γεγονός που αρχικά επεσήμανε ο Michaelson το 1948 (Michaelson, 1948) που μίλησε για χημικά ελεγχόμενο σχηματισμό νέων αγγείων ως απόκριση στην ισχαιμία. Μετά και από άλλες μελέτες (McLeod και συν., 1987, McLeod και συν., 1996), η συνέπεια αυτή της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας επιβεβαιώθηκε. Η αγγειογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από αγγειοδιαστολή των υπαρχόντων αγγείων, αυξανόμενη αγγειακή διαπερατότητα και αποικοδόμηση της περιβάλλουσας μεσοκυττάριας ουσίας ώστε να επιτραπεί η ενεργοποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων για το σχηματισμό νέων αγγείων (Witmer και συν., 2003).

Συγκεκριμένα, αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων που περιβάλουν τα αγγεία του αμφιβληστροειδή και πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα μπαίνουν στην κυκλοφορία του αίματος (Afzal και συν., 2007). Στη συνέχεια, ρυθμιστικά μόρια όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ο οποίος μάλιστα θεωρείται ως ο πιο σημαντικός παίκτης στην παθοφυσιολογία των εν λόγω ασθενειών (Chen & Chen, 1987, Miller και συν., 1994) ή ο ινσουλινό-εξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας IGF (Insulin Growth Factor), η αυξητική ορμόνη (GH, growth hormone), αλλά και οι κυτοκίνες, δρουν ως τροποποιητές των πρόδρομων αυτών κυττάρων καθώς και της λειτουργίας των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι, μια ισχαιμική κατάσταση οδηγεί και σε αγγειογενετικές διαδικασίες στον αμφιβληστροειδή (Adamis και συν., 1994, Grant, 1996, Ziche και συν., 1997).

1. A. 4. Αμφιβληστροειδοπάθειες στο σύγχρονο κόσμο

Παρακάτω περιγράφονται μερικά από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά τριών συχνών και σοβαρών αμφιβληστροειδικών παθήσεων των οποίων η παθοφυσιολογία βασίζεται στο φαινόμενο ισχαιμία και οδηγεί είτε σε νεοαγγείωση είτε σε κυτταρικό θάνατο των νευρώνων του αμφιβληστροειδή. Γι' αυτό και οι καταστάσεις αυτές μπορεί, τελικά, να αποβούν σε σημαντικές βλάβες στην όραση, ακόμα και τύφλωση.

◆ Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (diabetic retinopathy, DR) είναι συχνά εμφανιζόμενη επιπλοκή της νόσου του διαβήτη (diabetes mellitus), επηρεάζει τα αγγεία του αμφιβληστροειδή και αποτελεί σημαντική αιτία τύφλωσης στην παραγωγική ηλικία ανθρώπων σε βιομηχανοποιημένες χώρες. Εμφανίζεται στο 90% των ατόμων με διαβήτη τύπου I (ινσουλινο-εξαρτώμενος) και στο 65% των ατόμων με διαβήτη τύπου II (μη εξαρτώμενος από ινσουλίνη). Το ρίσκο ανάπτυξης της DR σε κάποιον είναι μεγαλύτερο όσο πιο μεγάλο είναι το διάστημα που αυτός έχει διαβήτη. Η νόσος μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια: μη πολλαπλασιαστική (ή μη παραγωγική) DR και πολλαπλασιαστική (ή παραγωγική) DR.

Η μη πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από μικροανευρύσματα και μικρές αιμορραγίες, που αν δεν επηρεάσουν την ωχρά κηλίδα δεν προκαλούν βλάβες στην όραση.

Η πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου, από την άλλη, είναι αποτέλεσμα μιας πιο εκτεταμένης ισχαιμικής κατάστασης και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων στην επιφάνεια του ιστού ή του οπτικού δίσκου και αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες. Τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία μπορούν να αιμορραγήσουν και να εμφανιστεί αιμορραγία στο υαλώδες σώμα, ακολούθως να εμφανιστεί ίνωση (σχηματισμός υπερβολικού ινώδους συνδετικού ιστού) και αποκόλληση του αμφιβληστροειδή. Το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας (diabetic macular edema, DME) είναι, επίσης, ένα επακόλουθο σύμπτωμα του διαβήτη και χαρακτηρίζεται από αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και εναπόθεση σκληρών υπολειμμάτων στο κέντρο του αμφιβληστροειδή. Το DME είναι κύρια αιτία απώλειας της όρασης στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Cuilla και συν., 2003, Porta & Allione, 2004, Pemp & Schmetterer, 2008, Aiello, 2008).

Πέρα από τις παρατηρούμενες αγγειακές αλλαγές στην περίπτωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι πρόκειται για μια νευροεκφυλιστική νόσο του οφθαλμού (για ανασκόπηση βλ. Barber, 2003), που εκδηλώνει λειτουργικές αλλαγές στην όραση πριν και ανεξάρτητα από τον ανώμαλο σχηματισμό νέων αγγείων (Lieth και συν., 2000). Αυτές οι αλλαγές έχουν άμεσες συνέπειες στους νευρώνες του αμφιβληστροειδή και καταλήγουν σε απόπτωση. Η ομάδα του Barber το 1998 χρησιμοποιώντας το μοντέλο της στρεπτοζοτοκίνης για επαγωγή διαβήτη τύπου I σε αρουραίους παρατήρησε αύξηση στα αποπτωτικά νευρικά και/ή γλοιακά κύτταρα, αλλά όχι και αλλαγές σε επίπεδο αγγειακών κυττάρων (Barber και συν., 1998). Επίσης, στην ίδια μελέτη σε αμφιβληστροειδείς διαβητικών ασθενών παρατήρησαν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα δεν περιορίζονταν μόνο στις περιοχές με αγγειακές βλάβες. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα αυτά έδειξαν ότι η αμφιβληστροειδική απόπτωση είναι μια γενικευμένη απόκριση των νευρώνων του ιστού στην περίπτωση του διαβήτη.

◆ Γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και χοριοειδής νεοαγγείωση

Η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (age-related macular degeneration, ARMD) προσβάλλει πάνω από 500.000 ανθρώπους στις ΗΠΑ. Περίπου 10% των ασθενών στα 66 με 74 χρόνια τους θα παρουσιάσουν συμπτώματα της νόσου, ενώ οι πιθανότητες αυτές αυξάνονται στα 75 με 85 χρόνια. Η εκφύλιση της ωχράς στο προχωρημένο πια στάδιο, όπου ευθύνεται για έντονη απώλεια όρασης αλλά όχι και τύφλωση, διακρίνεται σε δύο μορφές.

Στην ξηρή της μορφή (ατροφική ή μη εκκριτική) κίτρινα εναποθέματα στην ωχρά κηλίδα που καλούνται «drusen» συγκεντρώνονται ανάμεσα στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και τον υποκείμενο χοριοειδή χιτώνα, οδηγώντας σε αποκόλληση αμφιβληστροειδή. Στην υγρή (εκκριτική ή αγγειογενετική) μορφή της νόσου, αιμοφόρα αγγεία αναπτύσσονται ανώμαλα στα χοριοτριχοειδή (ανάπτυξη χοριοειδούς νεοαγγείωσης, CNV), διαμέσου της μεμβράνης του Bruch (το πιο έσω τμήμα του χοριοειδούς) καταλήγοντας σε διαρροή αίματος και πρωτεϊνών κάτω από την ωχρά. Η αιμορραγία και η διαρροή από αυτά τα αγγεία τελικά προκαλούν μη αντιστρεπτή βλάβη στους φωτοϋποδοχείς και απώλεια της όρασης, εάν δεν αντιμετωπιστούν (McCombe και συν., 1991, Jager και συν., 2008).

Η ακεραιότητα του μελάχρου επιθηλίου παίζει σημαντικότερο ρόλο στη χοριοειδή νεοαγγείωση. Το RPE συμπεριφέρεται με διαφορετικό τρόπο στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης της CNV κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της ARMD. Το αρχικό στάδιο εξέλιξης της CNV φαίνεται να σχετίζεται με μια αποτυχία του RPE να φαγοκυτώσει σωστά τη μεμβράνη του εξωτερικού τμήματος των φωτοϋποδοχέων. Αυτό προκαλεί πάχυνση της μεμβράνης του Bruch, το RPE και οι φωτοϋποδοχείς ατροφούν και τα υποκείμενα χοριοτριχοειδή κλείνουν. Καθώς τα κύτταρα του μελάχρου επιθηλίου επανακατοικούν τη μεμβράνη του Bruch, αναπτύσσεται η εκκριτική μορφή και νέα χοριοειδή αγγεία διαπερνούν τη μεμβράνη του Bruch καταλήγοντας στη CNV. Σε αυτό το στάδιο, η έκφραση του VEGF, bFGF και TGF- β στο RPE και των υποδοχέων τους στον χοριοειδή φαίνεται να ενισχύεται (Wada και συν., 1999, Υι και συν., 1998).

◆ Οίδημα της ωχράς κηλίδας

Το οίδημα της ωχράς κηλίδας είναι η συγκέντρωση υγρού μέσα στον αμφιβληστροειδικό ιστό. Αυτή η περίπτωση νόσου και, ιδιαίτερα, το κυστοειδές οίδημα της ωχράς (cystoid macular edema, CME) αποτελεί κύρια επιπλοκή μιας ποικιλίας οφθαλμικών παθήσεων, τραυματισμών και πιο σπάνια επεμβάσεων, π.χ. εγχείρηση καταρράκτη ή αποκατάσταση αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή. Το CME συχνά συνδέεται με ενδοθφαλμίτιδα, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, απόφραξη της αμφιβληστροειδικής φλέβας και μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Bringmann και συν., 2004).

Η παθογονική επίδραση της εξω- και ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης υγρού μέσα στον αμφιβληστροειδή κατά την ανάπτυξη του CME παραμένει απροσδιόριστη. Στο έσω τμήμα του αμφιβληστροειδή νερό μεταφέρεται από τα κύτταρα Müller (Moseley και συν., 1984, Nagelhus και συν., 1999), ενώ η μετακίνηση υγρών από τον αμφιβληστροειδή προς τον χοριοειδή χιτώνα απαιτεί τη μεταφορά ιόντων από το RPE (Strauss, 2005). Δυσλειτουργία του RPE οδηγεί σε συγκέντρωση εξωκυττάριου υγρού και θεωρείται ως η κύρια αιτία σχηματισμού κύστης. Από την άλλη, υπάρχουν ενδείξεις ότι η διόγκωση των κυττάρων Müller μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη του CME (Bringmann και συν., 2004).

1. A. 5. Σύγχρονες θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών

Οι μέχρι τώρα σπουδαιότερες θεραπείες για τις αμφιβληστροειδικές αγγειογενετικές παθήσεις έχουν εστιαστεί στην αντιμετώπιση της ανώμαλης ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων. Αυτές οι θεραπείες είναι μη ειδικές, περιλαμβάνουν την επέμβαση με laser και διακρίνονται στην εστιασμένη και σκεδασμένη “φωτοθρόμβωση” (photocoagulation). Η εστιασμένη φωτοθρόμβωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή των διαρρέοντων αιμοφόρων αγγείων, ενώ η σκεδασμένη φωτοθρόμβωση για τον έλεγχο της ανάπτυξης μη φυσιολογικών αγγείων. Η θεραπεία με laser φωτοθρόμβωση εφαρμόζεται μόνη της ή σε συνδυασμό με την verteporfin, μια φωτοευαίσθητη πορφυρίνη.

Η τεχνική της φωτοθρόμβωσης με laser έχει, ωστόσο, περιορισμούς. Για παράδειγμα, δεν αποκαθιστά τη χαμένη όραση και υπάρχει μια περίπου 50% πιθανότητα η διαρροή των αιμοφόρων αγγείων να ξαναεμφανιστεί μέσα σε διάστημα δύο ετών μετά την επέμβαση (Fine και συν., 2000). Η φωτοδυναμική θεραπεία, από την άλλη, είναι αποτελεσματική ως προς την αντιμετώπιση των ήδη δημιουργημένων μη φυσιολογικών αγγείων, ενώ δεν μπορεί να εμποδίσει το σχηματισμό νέων (van Wijngaarden και συν., 2005). Το φωτοευαίσθητο φάρμακο παραμένει στο σώμα μέχρι 48 ώρες και ως εκ τούτου ο ασθενής δεν πρέπει να έρχεται σε άμεση επαφή με το φως για όλο αυτό το διάστημα. Επιπλέον, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις του φαρμάκου, ενώ η υπερβολική παροχή είτε φαρμάκου είτε laser μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μια μόνιμη και μη αντιστρεπτή απώλεια όρασης (Meads και συν., 2001).

Τη στιγμή που όλες οι προαναφερόμενες θεραπευτικές μέθοδοι εφαρμόζονται σε κλινικό επίπεδο, νέοι θεραπευτικοί στόχοι με λιγότερες παρενέργειες και μεγαλύτερη αποδοτικότητα είναι υπό μελέτη. Τα τελευταία πέντε χρόνια, νέα φάρμακα με στόχο το σύστημα του VEGF παράγοντα δοκιμάζονται σε ασθενείς για την αντιμετώπιση αμφιβληστροειδοπαθειών. Αυτά τα φάρμακα εμποδίζουν την αγγειογένεση και χορηγούνται ενδοφθάλμια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι τα ranibizumab (Lucentis), bevacizumab (Avastin) και pegaptanib (Macugen).

Το ranibizumab είναι ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει και προσδένεται στον VEGF-A, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την ανάπτυξη νέων αγγείων (Ferrara και συν.,

2006). Το bevacizumab όντας και αυτό μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον VEGF-A έχει παρόμοια με το ranibizumab φαρμακολογική δράση (Vasilaki & Thermos, 2009). Το pegaptanib είναι ένα τροποποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο που προσδένεται σε μια ειδική ισομορφή του VEGF, την VEGF165, η οποία εμπλέκεται στην οφθαλμική νεοαγγείωση κι έτσι εμποδίζει την ανάπτυξη νέων αγγείων (Ng και συν., 2006). Από τα φάρμακα αυτά, το ranibizumab, από το 2006, και το pegaptanib, από το 2004, έχουν λάβει έγκριση για την κυκλοφόρηση και χρήση τους στη θεραπεία της ARMD από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων στις ΗΠΑ (FDA, Food and Drug Administration). Αντίθετα, το bevacizumab είναι προς το παρόν εγκεκριμένο από τον FDA, ήδη από το 2004, μόνο για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του κόλου εντέρου, ενώ πρόσφατες έρευνες δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με τη θεραπεία ασθενών με γεροντική εκφύλιση ή οίδημα της ωχράς (Kaiser, 2006).

Παρόλο που οι νέες anti-VEGF προσεγγίσεις είναι ελπιδοφόρες για θεραπεία στους ασθενείς με γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας ή χοριοειδή νεοαγγείωση, σημαντικές αρνητικές παρενέργειες έχουν παρατηρηθεί. Για παράδειγμα, οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με το ranibizumab απέκτησαν τέτοια οπτική οξύτητα ανίκανη να τους επιτρέψει να οδηγήσουν ή να διαβάσουν κανονικά (Ferrara και συν., 2006). Επίσης, παρουσιάστηκαν παρενέργειες όπως η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, η αιμορραγία του επιπεφυκότα, ο πόνος και η ενδοφθάλμια φλεγμονή. Πολλοί ασθενείς λόγω της ενδοφθάλμιας χορήγησης παρουσιάζουν τραυματισμό που χαρακτηρίζεται από ενδοφθαλμίτιδα, αποκόλληση του αμφιβληστροειδή και τραυματικό καταρράκτη.

Περισσότερες, λοιπόν, κλινικές δοκιμές απαιτούνται προκειμένου να εκτιμηθούν η βέλτιστη χορηγούμενη δόση των anti-VEGF φαρμάκων, οι όποιες εμφανιζόμενες παρενέργειες καθώς και η αποτελεσματικότητα σε σχέση με το χρόνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναστροφή της δημιουργίας νέων αγγείων είναι σπάνια μόνιμη. Γι' αυτό, ουσίες που μπορούν να εμποδίσουν τα δραματικά γεγονότα της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας και θα μπορούσαν να χορηγούνται σε συνδυασμό με τα anti-VEGF φάρμακα ή τις laser ή φωτοδυναμικές επεμβάσεις ίσως, τελικά, είναι ικανές να φέρουν πιο χρήσιμες και ωφέλιμες θεραπείες για σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες που ταλαιπωρούν όλο και μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΩΝ

Για τη μελέτη της ισχαιμίας του αμφιβληστροειδή, εδώ και πολλές δεκαετίες, έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός *in vivo* και *ex vivo* μοντέλων θηλαστικών. Η χρήση αυτών των μοντέλων έχει διευκολύνει την εξέταση των επιδράσεων της ισχαιμίας στη βιωσιμότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδή και τη διαλεύκανση των μονοπατιών που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, τόσο κυρίως των γαγγλιακών όσο και των υπόλοιπων νευρικών κυττάρων του ιστού, ή στη νεοαγγείωση.

Προφανώς, το γεγονός ότι τα δεδομένα που μπορούν να αποκτηθούν με τη βοήθεια ενός ζωικού μοντέλου πρέπει να προσεγγίσουν μια κλινική κατάσταση δημιουργεί την ανάγκη χρήσης ενός μοντέλου ισχαιμίας που να μοιάζει αρκετά με αυτήν στον άνθρωπο. Περιοριστικός παράγοντας σε αυτό το σημείο στέκεται η μεγάλη ποικιλία μεταξύ των ειδών ως προς το μοτίβο της αγγείωσης του αμφιβληστροειδή. Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα μικρά εργαστηριακά ζώα όπως ο αρουραίος, το κουνέλι και το ινδικό χοιρίδιο έχουν το καθένα διαφορετικό τύπο παροχής αίματος, με αυτόν του αρουραίου να πλησιάζει περισσότερο τον ανθρώπινο. Φυσικά, ανώτερα πρωτεύοντα ζώα μπορεί να έχουν πανομοιότυπο πρότυπο αγγείωσης με τον άνθρωπο, αλλά οικονομικοί, πρακτικοί και ηθικοί λόγοι εμποδίζουν την ευρεία χρήση αυτών ως μοντέλα (Osborne και συν., 2004).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά μοντέλα μελέτης ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών.

Πειραματική μέθοδος	Αντίστοιχη ανθρώπινη ασθένεια	Βιβλιογραφικές αναφορές
Υψηλή ενδοφθάλμια πίεση	CRAO, γλαύκωμα, απόφραξη οφθαλμικής αρτηρίας	Smith & Baird (1952) και Buchi και συν. (1991)
Επίδεση δέσμης οπτικού νεύρου	CRAO, απόφραξη οφθαλμικής αρτηρίας	Stefansson και συν. (1988)
Επίδεση οφθαλμικών αγγείων	CRAO, απόφραξη οφθαλμικής αρτηρίας	Otori και συν. (1997) και Vidal-Sanz και συν. (2001)
Δίπλευρη απόφραξη της κοινής καρωτιδικής αρτηρίας (2-vessel occlusion)	CRAO, απόφραξη οφθαλμικής αρτηρίας, καρωτιδική ανεπάρκεια	Osborne και συν. (1991) και Block και συν. (1992)
Δίπλευρη απόφραξη της σπονδυλικής και κοινής καρωτιδικής αρτηρίας (4-vessel occlusion)	Καρδιακή ανακοπή	Osborne και συν. (1991) και Block και συν. (1992)
Φωτοδυναμική αποκόλληση	BRAO	Mosinger & Olney (1991) και Daugeliene και συν. (2000)
Καρδιακή ανακοπή	Καρδιακή ανακοπή	Feher & Antal (1979) και

Μεταθανάτια ισχαιμία	-	Strosznajder και συν. (1998) Johnson & Grierson (1976) και Napper & Kalloniatis (1999)
Ενδοφθάλμια χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων γλουταμινικού	CRAO	Schwarzc & Coyle (1977) και Siliprandi και συν. (1992)

Πίνακας 1.1: Ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας. CRAO= Central Retinal Artery Occlusion, απόφραξη κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή. BRAO= Branch Retinal Artery Occlusion, απόφραξη κλάδου της αρτηρίας του αμφιβληστροειδή. (τροποποίηση από Osborne και συν., 2004)

Για παράδειγμα, το μοντέλο της **αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης** χρησιμοποιείται από πολλές ερευνητικές ομάδες (π.χ. Osborne και συν., 2002, Gehlbach & Purple, 1994) και έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ίδιων παθολογικών χαρακτηριστικών με αυτά που παρατηρούνται μετά από απόφραξη της κεντρικής αμφιβληστροειδικής αρτηρίας ή στο γλαύκωμα. Συνήθως, στο μοντέλο αυτό το πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού του ζώου συνδέεται με ένα δοχείο αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού το οποίο ανυψώνεται σε τέτοιο ύψος ώστε η ενδοφθάλμια πίεση να φτάσει τα 110mmHg. Η μέθοδος αυτή παράγει μια σφαιρική ισχαιμία και για την απόκτηση μόνιμων και μη αντιστρεπτών αποτελεσμάτων θα πρέπει η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση να διατηρηθεί για τουλάχιστον 20 λεπτά.

Η **περίσφυξη αγγείων** είναι μια άλλη συνήθης μέθοδος πρόκλησης ισχαιμίας. Στην πιο απλή της μορφή περιλαμβάνει την τοποθέτηση ενός δακτυλιδιού γύρω από τη δέσμη του οπτικού νεύρου με αποτέλεσμα την ένωση των τριχοειδών αγγείων. Έτσι στενεύει το οπτικό νεύρο, αυξάνεται η ενδοφθάλμια πίεση και πιθανώς καταστρέφονται άξονες των γαγγλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η περίσφυξη διαφόρων αρτηριών μπορεί να παράγει ισχαιμία ποικίλου βαθμού ανάλογα με το είδος του πειραματόζωου ή των αρτηριών στις οποίες γίνεται η επέμβαση. Ωστόσο, τα μοντέλα αυτά παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα και κυρίως όσον αφορά στο γεγονός ότι με τέτοιες παρεμβάσεις προκύπτει ισχαιμία και 'εγκεφαλική' και 'οπτικού νεύρου', πράγμα που καθιστά δύσκολη τη διάκριση των άμεσων συνεπειών της ισχαιμίας του αμφιβληστροειδή (Wakita και συν., 2002).

Η **ενδοβολβική χορήγηση διεγερτικών αμινοξέων** και ειδικότερα αναλόγων (π.χ. NMDA, AMPA, καϊνικό οξύ) των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος, που είναι και ο κύριος νευροδιαβιβαστής στον αμφιβληστροειδή, αποτελεί επίσης ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο *in vivo* μοντέλο. Σε πολύ σοβαρές παθήσεις όπως η

διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, το γλαύκωμα και η αμφιβληστροειδική αποκόλληση (Deng και συν., 2000, Diederer και συν., 2006, Honkanen και συν., 2003) καθώς και σε πειραματικά μοντέλα που προσομοιάζουν τις καταστάσεις αυτές (Lieth και συν., 1998, Puro, 2002) έχουν ανιχνευθεί αυξημένα ενδοϋαλοειδικά επίπεδα γλουταμινικού σε σχέση με υγιείς περιπτώσεις. Εξάλλου, παθολογική διέγερση των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος θεωρείται ότι αποτελεί την τελική κοινή οδό που οδηγεί σε καταστροφή των νευρώνων σε πολλές εκφυλιστικές νευρολογικές νόσους.

Φυσικά η διαθεσιμότητα μοντέλων όπως τα παραπάνω επιτρέπει και απαιτείται για την περαιτέρω μελέτη των τυχόν νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων διαφόρων μορίων και παραγόντων που δύνανται να οδηγήσουν σε ολοένα και πιο αποτελεσματικές θεραπείες των σοβαρότατων οφθαλμικών ασθενειών που προαναφέρονται. Εν προκειμένω, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο αμφιβληστροειδοπαθειών η ενδοβολβική χορήγηση διεγερτικών αμινοξέων (AMPA), με στόχο να εξεταστούν οι νευροπροστατευτικές δράσεις της ορμόνης σωματοστατίνη.

Το νευροπεπτίδιο σωματοστατίνη είναι μια ουσία που έχει δείξει αντι-αγγειογενετικές δράσεις λόγω ανασταλατικής επίδρασής της στην παραγωγή της αυξητικής ορμόνης, σε αυξητικούς παράγοντες (IGF-1, VEGF) και στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Smith και συν., 1997, Higgins και συν., 2002, Dal Monte και συν., 2007, Catalani και συν., 2007). Επιπλέον, προστατεύει τον αμφιβληστροειδή από ισχαιμικές και διεγερτοτοξικές επεμβάσεις (Mastrodimitou και συν., 2005, Mastrodimitou και συν., 2008, Catalani και συν., 2007). Όλες οι μελέτες που μόλις αναφέρθηκαν συνιστούν *in vitro* προσεγγίσεις, ενώ και *in vivo* ερευνητικές προσπάθειες είναι απαραίτητες για την ενίσχυση των πληροφοριών γύρω από τη χρησιμότητα της σωματοστατίνης ως νευροπροστατευτικό φάρμακο έναντι του κυτταρικού θανάτου ή της αγγειογένεσης που επάγει η ισχαιμία.

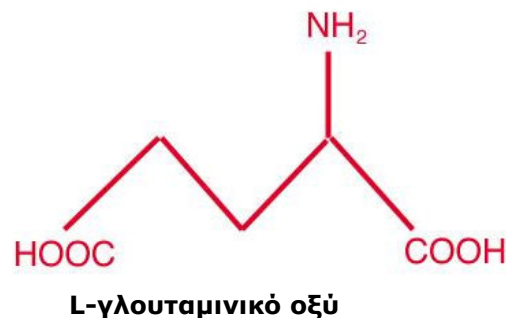
Στη συνέχεια, αναλύονται το γλουταμινεργικό και σωματοστατινεργικό σύστημα στον εν λόγω ιστό ώστε να γίνουν καλύτερα κατανοητά το αντικείμενο και ο απώτερος στόχος της μελέτης στα πλαίσια αυτής της διατριβής.

Γ. ΤΟ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1. Γ. 1. Γλουταμινικό οξύ

Ο Olney (1969) ήταν ο πρώτος ερευνητής που αναγνώρισε ότι υπάρχει μια ομάδα αμινοξέων που δρουν ως διεγερτικοί νευροδιαβιβαστές στο κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλούν άμεση και γρήγορη εκπόλωση των ευαίσθητων στο γλουταμινικό κυττάρων. Υπό μη φυσιολογικές συνθήκες, τα αμινοξέα αυτά επιφέρουν βλάβες, καταστροφές και εκφυλίσεις σε εγκέφαλο και αμφιβληστροειδή (Olney 1969, Olney & Ho 1970). Από τις πρώτες αυτές μελέτες του Olney και μετά, το γλουταμινικό και το ασπαρτικό οξύ θεωρούνται τα βασικά διεγερτικά αμινοξέα-νευροδιαβιβαστές.

Το L- γλουταμινικό οξύ (σχ. 1.7) αποτελεί για το κεντρικό νευρικό σύστημα και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα κύριο διεγερτικό συναπτικό νευροδιαβιβαστή. Ενεργοποιεί το πιο ευρέως διαδεδομένο διεγερτικό διαβιβαστικό σύστημα των σπονδυλωτών και η δράση του επηρεάζει μακροχρόνιες αλλαγές της νευρωνικής διεγερσιμότητας, καθώς επίσης και τη συναπτική δομή και λειτουργία, τη νευρωνική μετανάστευση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και τη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων.

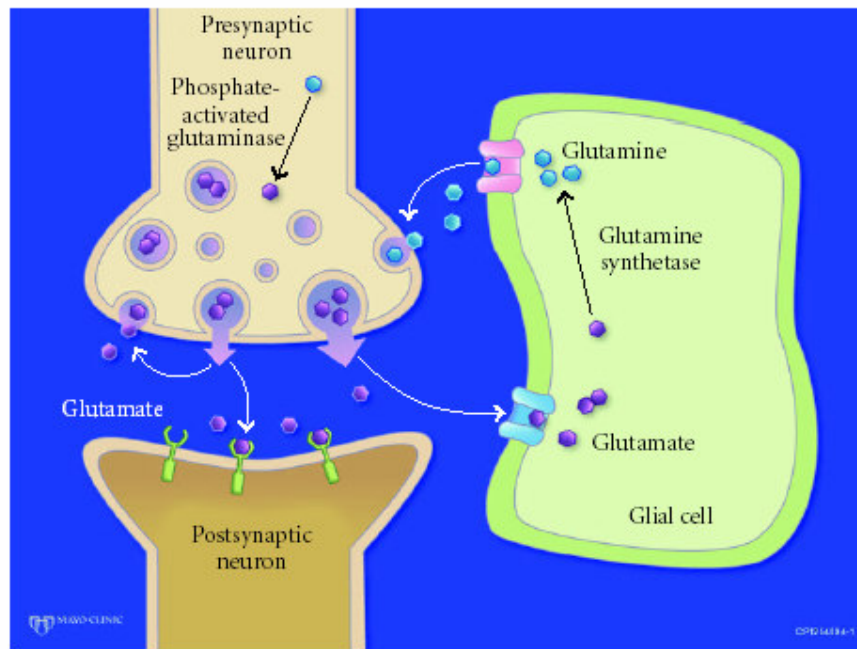


Σχήμα 1.7: Ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο ΚΝΣ και τον αμφιβληστροειδή.

Αυξημένα επίπεδα των διεγερτικών αμινοξέων στον ενδοκυττάριο χώρο μπορούν να προκαλέσουν νευρωνικό θάνατο μέσω της τοξικότητας που επιφέρει η υπερβολικά αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων. Θεωρείται ότι η παθολογική διέγερση των υποδοχέων του γλουταμινικού αποτελεί την τελική κοινή οδό για πολλές νευρολογικές νόσους, π.χ. υποξικό-ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, επιληψία,

νόσο του Huntington, νόσο του Parkinson και νόσο Alzheimer (Lipton & Rosenberg, 1994).

Εξαιτίας των σημαντικών νευροτοξικών συνεπειών του γλουταμινικού οξέος, οι συγκεντρώσεις του θα πρέπει να ρυθμίζονται πολύ αυστηρά στο χώρο της σύναψης. Η μεγαλύτερη ποσότητα γλουταμινικού από αυτήν που απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή λαμβάνεται (μέσω ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων) από τα περιβάλλοντα γλοιακά κύτταρα και το μετατρέπουν σε γλουταμίνη. Η γλουταμίνη προσλαμβάνεται από τον προσυναπτικό άξονα, όπου και μετατρέπεται ξανά σε γλουταμινικό (σχ. 1.8). Άμεση επαναπρόσληψη γλουταμινικού από τον προσυναπτικό νευρώνα συμβαίνει μόνο για μια μικρή ποσότητα απελευθερωμένου νευροδιαβιβαστή. Μια άλλη μικρή ποσότητα στην ουσία δραπετεύει από το συναπτικό χώρο και ίσως αυτή προκαλεί σημαντικές περιφερικές επιδράσεις (DeVries, 2000). Η ποσότητα που δραπετεύει είναι αυτή που φαίνεται να αυξάνεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτές που προαναφέρονται.



Σχήμα 1.8: Ο κύκλος του γλουταμινικού οξέος στη σύναψη. Presynaptic neuron= προσυναπτικός νευρώνας, postsynaptic neuron= μετασυναπτικός νευρώνας, glial cell= γλοιακό κύτταρο, phosphate-activated glutaminase= γλουταμινάση ενεργοποιούμενη από φωσφορικό, glutamine= γλουταμίνη, glutamine synthetase= συνθάση γλουταμίνης. (Από Pulido και συν., 2007)

Για το γλουταμινικό υπάρχουν 5 γνωστοί **μεταφορείς**: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 και EAAT5 (Arriza και συν., 1997, Fairman και συν., 1995, Kanai & Hediger, 1992, Pines και συν., 1992, Storck και συν., 1992). Η πρόσληψη του γλουταμινικού από τα αστροκύτταρα γίνεται μέσω του GLAST (που βρίσκεται επίσης στα Müller κύτταρα του αμφιβληστροειδή) και του GLT-1, ενώ από τους νευρώνες μέσω των EAAT1, EAAT4 και EAAT5, από τους οποίους ο τελευταίος βρίσκεται κυρίως στους φωτοϋποδοχείς.

1. Γ. 2. Υποδοχείς γλουταμινικού: Δομή & Λειτουργία

Οι υποδοχείς γλουταμινικού χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: i) τους **ιονοτρόπους** υποδοχείς, που λειτουργούν μέσω διαύλων ιόντων που σχηματίζουν και ελέγχουν άμεσα και ii) τους **μεταβολοτρόπους** υποδοχείς, που ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των συζευγμένων με G- πρωτεΐνες υποδοχέων (G-Protein Coupled Receptors, GPCRs) και διεκπεραιώνουν τις δράσεις τους μέσω δευτέρων μηνυμάτων (Watkins και συν., 1990, Orlando και συν., 2002, Madden, 2002).

Οι ιονοτρόποι υποδοχείς ταξινομούνται περαιτέρω σε δύο μεγάλες υποομάδες: i) **τους υποδοχείς NMDA** και ii) **τους υποδοχείς μη-NMDA**, ανάλογα με τους αγωνιστές που τους ενεργοποιούν και τους ανταγωνιστές που αναστέλλουν τη δράση τους. Οι NMDA υποδοχείς ενεργοποιούνται από το ανάλογο αμινοξέος N-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ (NMDA, N-methyl-D-aspartate) και η δράση τους αναστέλλεται από τη φαρμακευτική ουσία 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ [APV, (2*R*)-amino-5-phosphonovaleric acid]. Οι μη-NMDA υποδοχείς ενεργοποιούνται από τις φαρμακευτικές ουσίες α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολο-προπιονικό οξύ (AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid), καϊνικό οξύ και κισκαλικό οξύ, ενώ η δράση τους αναστέλλεται από την 6-κυανο-7-νιτροκινόξαλινο-2,3-διόνη (CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione). Από την άλλη, οι μεταβολοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού ενεργοποιούνται από το 1-αμινοκυκλοπεντανο-1,3-δικαρβοξυλικό οξύ (ACPD, 1-Amino-*cis*-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid).

Όσον αφορά στη δομική τους οργάνωση, έχει αποσαφηνιστεί πλέον ότι οι υποομάδες των ιονοτρόπων γλουταμινεργικών υποδοχέων αποτελούνται από τρεις διαμεμβρανικές περιοχές (M1, M3 και M4) και ένα εισερχόμενο τμήμα στη μεμβράνη από την κυτταροπλασματική πλευρά που σχηματίζει ένα βρόχο μέσα σ' αυτή (M2)

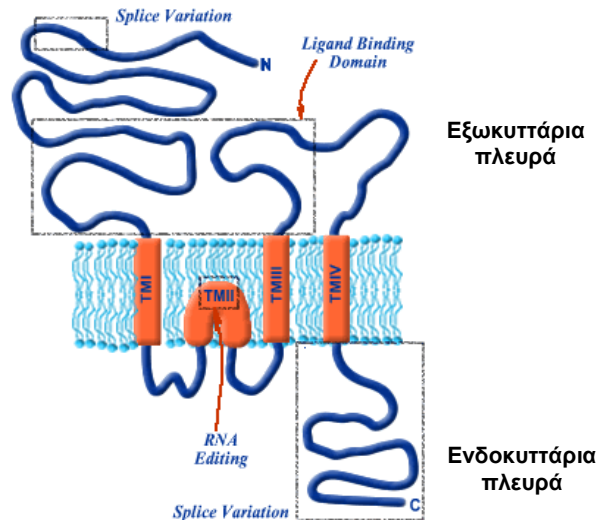
(σχ. 1.9). Οι NMDA υποδοχείς είναι τετραμερή κανάλια ιόντων που συνίστανται από 5 διαφορετικές υπομονάδες, NR1 και NR2A-D και, σε κάποιες περιπτώσεις, NR3A ή B. Οι AMPA υποδοχείς είναι και αυτοί ομομερή ή ετερομερή κανάλια που σχηματίζονται από 4 διαφορετικές υπομονάδες (GluR1-GluR4). Οι υποδοχείς καϊνικού συγκροτούνται από τις υπομονάδες KA1 και/ή KA2 σε συνδυασμό με τις GluR5-GluR7.

Το γλουταμινικό οξύ έχει για τους NMDA μεγαλύτερη συγγένεια από ότι για τους AMPA υποδοχείς. Οι NMDA και AMPA υποδοχείς καταλαμβάνουν μετασυναπτικές θέσεις κοντά σε πλούσιες σε γλουταμινικό ενεργές ζώνες, ενώ οι υποδοχείς καϊνικού βρίσκονται και σε προ- και σε μετασυναπτικές θέσεις (Chittajallu και συν., 1996).

Σχήμα 1.9: Γενική δομή μιας υπομονάδας ενός **ιονοτροπικού** υποδοχέα του γλουταμινικού.

Το αμινοτελικό άκρο και ένας μεγάλος βρόγχος στην εξωκυττάρια πλευρά μαζί σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (ligand binding domain).

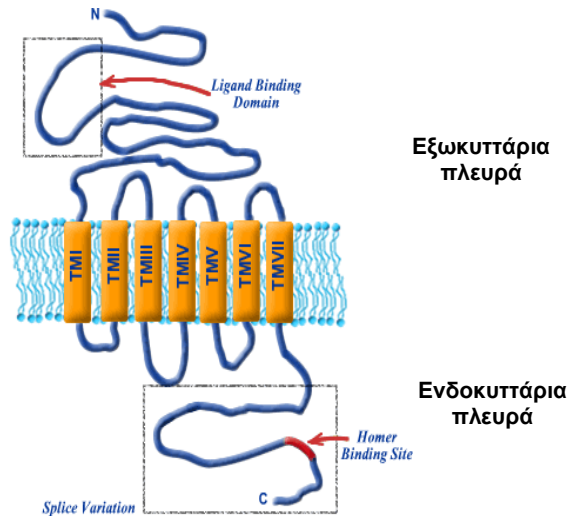
Το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται ενδοκυττάρια, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνά ποικιλία και σχηματίζει τη θέση αλληλεπίδρασης με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.



Υπάρχουν 8 διαφορετικοί μεταβολοτροπικοί υποδοχείς (mGluR1-mGluR8) που με βάση την ομολογία τους και την ικανότητά τους να συζεύγνυνται με συγκεκριμένα ένζυμα τοποθετούνται σε 3 ομάδες (Conn & Pin, 1997). Στην ομάδα I συμπεριλαμβάνονται οι mGluR1 και mGluR5. Στην ομάδα II οι mGluR2 και mGluR3 και όλοι οι υπόλοιποι συγκαταλέγονται στην ομάδα III. Κάθε ομάδα παρουσιάζει περίπου 70% ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας. Η ομάδα I συζεύγνεται με το σύστημα φωσφολιπάσης C/ινοσιτόλης, ενώ οι ομάδες II και III με το σύστημα της αδενυλικής κυκλάσης/cAMP. Οι μεταβολοτρόποι υποδοχείς του γλουταμινικού βρίσκονται και σε προ- και σε μετασυναπτικές θέσεις (Pin & Duvoisin, 1995).

Σχήμα 1.10: Η γενική δομή των μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού.

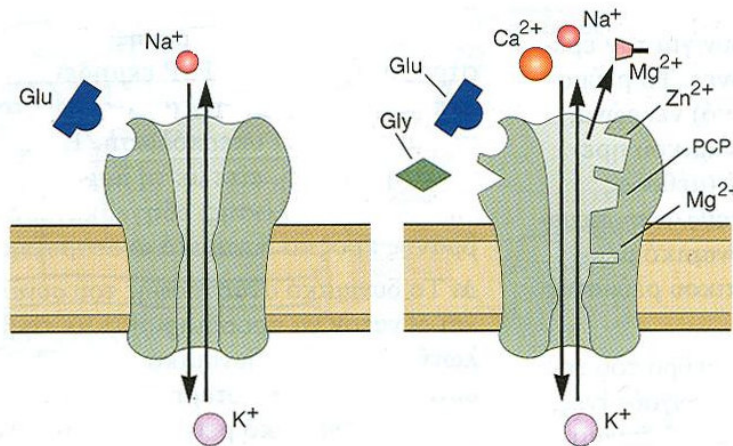
7 διαμεμβρανικές α-έλικες, μεγάλο το αμινοτελικό άκρο στην εξωκυττάρια περιοχή σχηματίζει την περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη και το καρβοξυτελικό άκρο ενδοκυττάρια γενικά υπόκειται στη μεγαλύτερη ποικιλία.



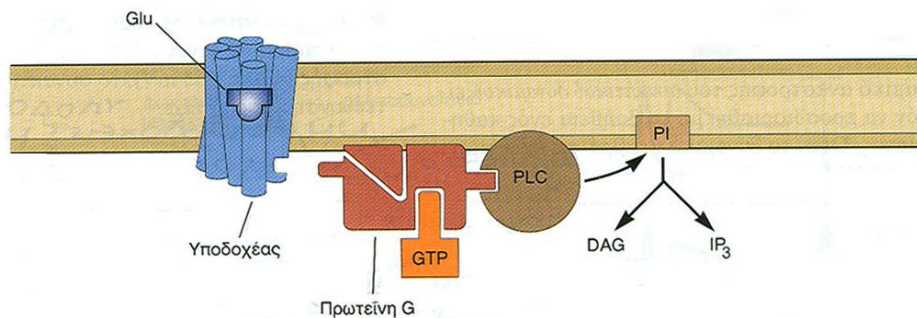
Στο αμέσως επόμενο σχήμα (σχ. 1.11) φαίνονται τα πιο σημαντικά λειτουργικά χαρακτηριστικά των ιονοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος.

α) Μη-NMDA υποδοχείς

β) NMDA υποδοχείς



γ) Μεταβολοτροπικοί υποδοχείς



Σχήμα 1.11: α) Μη-NMDA υποδοχέας. Ο διάυλος ιόντων που περιέχει είναι πιο διαπερατός για τα κατιόντα Na^+ (νατρίου) και K^+ (καλίου), παρά για τα κατιόντα Ca^{2+} (ασβεστίου). **β) NMDA υποδοχέας.** Ο διάυλος του είναι διαπερατός για Ca^{2+} , Na^+ και K^+ και έχει διάφορες θέσεις πρόσδεσης της γλυκίνης (Gly), του ψευδαργύρου (Zn^{2+}), της φαινοκυκλιδίνης (PCP), πολυαμινών και του Mg^{2+} (μαγνησίου) που ρυθμίζουν τη λειτουργία του διαύλου με διαφορετικούς τρόπους. **γ) Παράδειγμα μεταβολοτρόπου υποδοχέα.** Η πρόσδεση του γλουταμινικού σε αυτόν διεγείρει τη δραστηριότητα του ενζύμου φωσφολιπάση C (PLC) οδηγώντας στο σχηματισμό δύο φωσφοϊνοσιτιδίων (PI) που δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι (IP_3 και DAG). Glu= γλουταμινικό οξύ, IP_3 = 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη, DAG= διακυλογλυκερόλη. (από Kandel και συν., 2003)

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συνοπτικά οι διάφορες ισομορφές και λειτουργίες των γλουταμινεργικών υποδοχέων.

		ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Ιονοτροπικοί	NMDA	NR1,NR2A-D,NR3A-B	Αύξηση εισροής ενδοκυτταρικού $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$
	AMPA	GluR1,GluR2,GluR3,GluR4	Αύξηση εισροής ενδοκυτταρικού $\text{Na}^+ / (\text{Ca}^{2+})$
	Καϊνικού	GluR5,GluR6,GluR7,KA1,KA2	Αύξηση εισροής ενδοκυτταρικού $\text{Na}^+ / (\text{Ca}^{2+})$
Μεταβολοτροπικοί	Τύπου I	mGluR1,mGluR5	Αύξηση ενδοκυτταρικής PI και DAG
	Τύπου II	mGluR2,mGluR3	Μείωση ενδοκυτταρικής cAMP
	Τύπου III	mGluR4,mGluR6,mGluR7,mGluR8	Τροποποίηση ενδοκυτταρικής cAMP

Πίνακας 1.2: Γλουταμινεργικοί υποδοχείς. PI= inositol phosphate (φωσφορική ινοσιτόλη), DAG= diacylglycerol (διακυλογλυκερόλη), cAMP= cyclic adenosine monophosphate (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη). (μετάφραση από Pulido και συν., 2007)

1. Γ. 3. Οι υποδοχείς του γλουταμινικού στον αμφιβληστροειδή

Το γλουταμινικό οξύ είναι η κύρια νευροδιαβιβαστική ουσία του αμφιβληστροειδή και εκτελεί τις δράσεις του μέσω ενεργοποίησης ιονοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων που εντοπίζονται στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του ιστού. Παρακάτω παρατίθενται βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την έκφραση των GluRs στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου, με τον οποίο και ασχολήθηκε η παρούσα μελέτη.

Φωτοϋποδοχείς: Δεδομένα από μορφολογικές και φυσιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει την παρουσία μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού (mGluRs) στα άκρα των φωτοϋποδοχέων. Συγκεκριμένα, ο mGluR8 της ομάδας III έχει ξακάθαρα παρατηρηθεί στα σημεία αυτά στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών (Brandstätter και συν., 1998, Koulen και συν., 1999). Μάλιστα, υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ένα μηχανισμό αρνητικής ανάδρομης ρύθμισης των επιπέδων απελευθέρωσης του γλουταμινικού στο φως και το σκοτάδι μέσω των mGluRs και μείωσης των επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου (Koulen και συν., 1999, Hirasawa και συν., 2002). Με τον τρόπο αυτό, κατά την τονική απελευθέρωση του γλουταμινικού από τα τελικά κομβία των φωτοϋποδοχέων, προστατεύεται η σύναψη από υπερενεργοποίηση των GluRs των μετασυναπτικών νευρώνων και διεγερτοτοξικότητα.

Οριζόντια κύτταρα: Μελέτες *in situ* υβριδισμού έχουν δείξει την έκφραση, σε επίπεδο mRNA, υπομονάδων των ιονοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων στην OPL του αμφιβληστροειδή των θηλαστικών. Ωστόσο, με περαιτέρω εξέταση του εντοπισμού και της λειτουργικότητας των γλουταμινεργικών υποδοχέων, αποδείχθηκε ότι στη μεταβίβαση του οπτικού σήματος από τους φωτοϋποδοχείς στα οριζόντια κύτταρα μεσολαβητές είναι κυρίως οι AMPA υποδοχείς. Οι AMPA υποδοχείς στα κύτταρα αυτά μπορεί να υπάρχουν σε διαφορετικούς υποτύπους με διακριτά χαρακτηριστικά ως προς π.χ. τη διαπερατότητά τους σε ασβέστιο, έτσι ώστε να διαχωρίζουν μεταξύ τους τα οριζόντια κύτταρα που συνεργάζονται με διαφορετικούς τύπους φωτοϋποδοχέων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ακόμα και μεταβολοτροπικοί υποδοχείς μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη νευροδιαβίβαση των οριζόντιων κυττάρων (Yang, 2004).

Δίπολα κύτταρα: Πολλές ανοσοκυτταροχημικές και μελέτες *in situ* υβριδισμού προτείνουν ότι ποικίλες υπομονάδες ιονοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων (GluR1-7, KA1-2, NR1, NR2D και οι ομάδες I, II και III των mGluRs) εκφράζονται σε διαφορετική έκταση στα δίπολα κύτταρα των θηλαστικών και κατώτερων σπονδυλωτών, με κάποιες διαφορές μεταξύ των ειδών. Πάντως, η γενική ιδέα είναι ότι ενώ στη νευροδιαβίβαση των OFF δίπολων κυττάρων εμπλέκονται υποδοχείς AMPA/KA, τα ON δίπολα κύτταρα χρησιμοποιούν και NMDA ή μη-NMDA και mGluRs για τις αποκρίσεις στο φως (Yang, 2004).

Αμακρινικά κύτταρα: Βάσει φυσιολογικών, βιοχημικών και μορφολογικών δεδομένων τα αμακρινικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή διακρίνονται σε 20 και πλέον τύπους που περιέχουν μια ποικιλία νευροδιαβιβαστών (Masland, 1988, 2001). Την ίδια ποικιλία δείχνει και η έκφραση των υπομονάδων των διαφόρων υποδοχέων του γλουταμινικού στα αμακρινικά κύτταρα των θηλαστικών (Yang, 2004). Σε γενικές γραμμές, NMDA και AMPA/KA υποδοχείς έχουν εντοπιστεί με διάφορες τεχνικές σε όλα τα αμακρινικά κύτταρα, όπου μετέχουν σε διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες. Επίσης, υπομονάδες των mGluRs όλων των ομάδων έχουν ανιχνευθεί ανοσοκυτταροχημικά στα κύτταρα αυτά (Koulen και συν., 1997, Brandstätter και συν., 1998, Duvoisin και συν., 1995, Hartveit και συν., 1995).

Γαγγλιακά κύτταρα: Όπως τα αμακρινικά, έτσι και τα γαγγλιακά κύτταρα εκφράζουν όλους τους ιονοτρόπους και μεταβολοτρόπους υποδοχείς, αν και υπάρχουν ελάχιστα ως τώρα δεδομένα σχετικά με την παρουσία και λειτουργία των τελευταίων. Οι AMPA υποδοχείς, για παράδειγμα, εκφράζονται σε όλα τα γαγγλιακά θηλαστικών και μη οργανισμών. Μάλιστα, όλοι οι ιονοτρόποι υποδοχείς των γαγγλιακών κατέχουν κάποιο λειτουργικό ρόλο, σύμφωνα με φυσιολογικές μελέτες.

ΤΥΠΟΣ ΝΕΥΡΩΝΑ	ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ			
	iGluRs			mGluRs
	AMPA	KA	NMDA	
Φωτοϋποδοχέας	?	?	?	Ομάδα II, Ομάδα III (+)
Οριζόντιο κύτταρο	+	-	-	Ομάδα I (+), Ομάδα III (?)
Δίπολο κύτταρο				
ON	+	?	?	Ομάδα I, ομάδα III (+)
OFF	+	+	-	Ομάδα I, ομάδα III (+), ομάδα II (?)
Αμακρινικό κύτταρο	+	+	+	Ομάδα I, ομάδα II, ομάδα III (+)
Γαγγλιακό κύτταρο	+	?	+	Ομάδα I (+), ομάδα III (?)

Πίνακας 1.3: Οι υποδοχείς του γλουταμινικού στους νευρώνες του αμφιβληστροειδή. (+): ισχυρή θετική ένδειξη για έκφραση, (-): ισχυρή αρνητική ένδειξη για έκφραση, (?): είτε υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα είτε υπάρχουν μόνο λίγες αναφορές για την ύπαρξη του υποδοχέα σε μικρό πληθυσμό νευρώνων ή σε μερικά μόνο ζωικά είδη. (τροποποίηση από Yang, 2004)

Ο παραπάνω πίνακας συνοψίζει τα όσα αναφέρονται προηγούμενα για την παρουσία κάθε τύπου GluR σε κάθε διαφορετικό τύπο αμφιβληστροειδικού νευρώνα. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστή η διαφορετική έκφραση των υπομονάδων κάθε υποδοχέα στους διαφορετικούς τύπους αμφιβληστροειδικών νευρώνων.

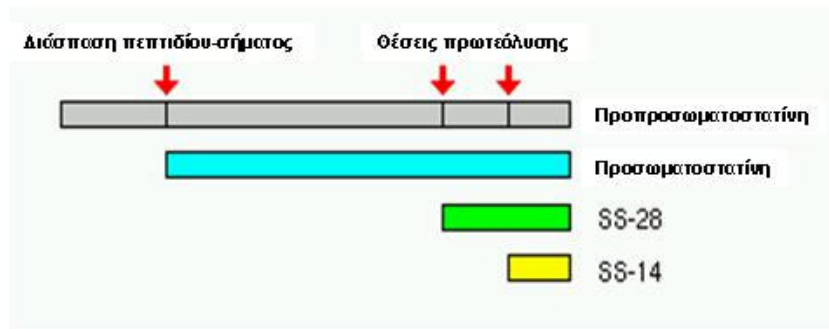
Δ. ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

1. Δ. 1. Σωματοστατίνη: Χαρακτηριστικά & Φυσιολογία του μορίου

Η σωματοστατίνη είναι ένα ενδιαφέρον ρυθμιστικό πεπτιδίο που αρχικά αναγνωρίστηκε το 1973 από τον Brazeau και τους συνεργάτες του ως ο υποθαλαμικός ανασταλτικός παράγοντας απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης ή σωματοτροπίνης (Somatotropin Release Inhibitory Factor, SRIF) από την υπόφυση. Στον αμφιβληστροειδή η παρουσία ανοσοδραστικότητας του μορίου αυτού πρώτη φορά εντοπίστηκε σε αρουραίο (Shapiro B και συν., 1979). Εν συνεχεία, παρατηρήθηκε στον αμφιβληστροειδή πολλών ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου (Thermos, 2003, Cervia και συν., 2008). Η σωματοστατίνη εντοπίζεται κυρίως σε βραχύινα κύτταρα ευρέως πεδίου με απολήξεις που διακλαδίζονται στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, σε κύτταρα της γαγγλιακής στιβάδας και σε νευρώνες της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας (Shapiro και συν., 1979, Yamada και συν., 1980, Sagar και συν., 1982, Sagar, 1987, Sagar & Marshall, 1988, Larsen και συν., 1990, White και συν., 1990, Akopian και συν., 2000).

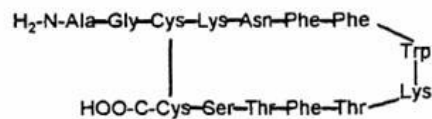
Σήμερα είναι γνωστό ότι το νευροπεπτιδίο αυτό απαντά σε δύο βιολογικά ενεργές μορφές, τη σωματοστατίνη-14 και τη σωματοστατίνη-28 (αποτελούνται από 14 και 28 αμινοξέα, αντίστοιχα), οι οποίες παράγονται κυρίως από νευρώνες και εκκριτικά κύτταρα στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και το γαστρεντερικό σωλήνα. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί και άλλες θέσεις έκφρασης της σωματοστατίνης, όπως ο πλακούντας, τα νεφρά, τα επινεφρίδια, ο αμφιβληστροειδής, ο θυρεοειδής αδένας και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Oliás και συν., 2004).

Στα θηλαστικά οι δυο μορφές της σωματοστατίνης, SRIF-14 και SRIF-28, παράγονται με ενδοπρωτεόλυση δύο περιοχών του καρβοξυτελικού άκρου της προσωματοστατίνης (πολυπεπτιδίο 92 αμινοξέων), που προκύπτει από ταχεία πρωτεολυτική διάσπαση της προ-προσωματοστατίνης η οποία αποτελεί και το αρχικό προϊόν έκφρασης του γονιδίου (σχ. 1.12). Η SRIF-28 αποτελεί αμινοτελική προέκταση της SRIF-14. Η σωματοστατίνη είναι κυκλικό μόριο που περιέχει δύο κυστεΐνες ενωμένες με δισουλφιδικό δεσμό σημαντικό για τη δράση της (σχ. 1.13). Η SRIF-14 είναι ο κυρίαρχος τύπος που εκφράζεται στο νευρικό σύστημα, ενώ το έντερο εκκρίνει κυρίως τη SRIF-28.

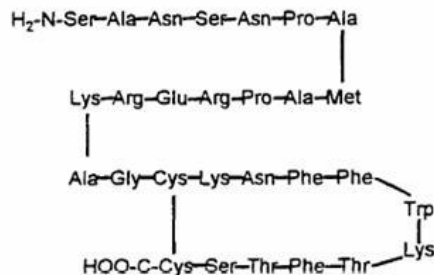


Σχήμα 1.12: Και οι δύο βιολογικά δραστικές μορφές της σωματοστατίνης παράγονται με κατάλληλη πρωτεολυτική διάσπαση ενός πρόδρομου μορίου.

Σωματοστατίνη-14



Σωματοστατίνη-28



Σχήμα 1.13: Απεικόνιση της αλληλουχίας και βασικής δομής των δύο μορφών της σωματοστατίνης.

Η απελευθέρωση της SRIF από νευρικά και εκκριτικά κύτταρα συνήθως εξαρτάται από την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης ή τις αυξημένες συγκεντρώσεις του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και προκαλείται από ιόντα, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, θρεπτικά στοιχεία κ.ά.

Στις κύριες δράσεις της περιλαμβάνονται η αναστολή της έκκρισης ορμονών από την υπόφυση, κυρίως της αυξητικής ορμόνης, από το πάγκρεας και άλλες ενδοκρινείς θέσεις, καθώς και η αναστολή της εξωκρινούς έκκρισης σε μια ποικιλία

οργάνων. Επιπλέον, εκδηλώνει αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις και αποτελεί έναν ευρέως καταμεμημένο νευροδιαβιβαστή στα εγκεφαλικά και περιφερικά νευρικά κύτταρα (Olias και συν., 2004).

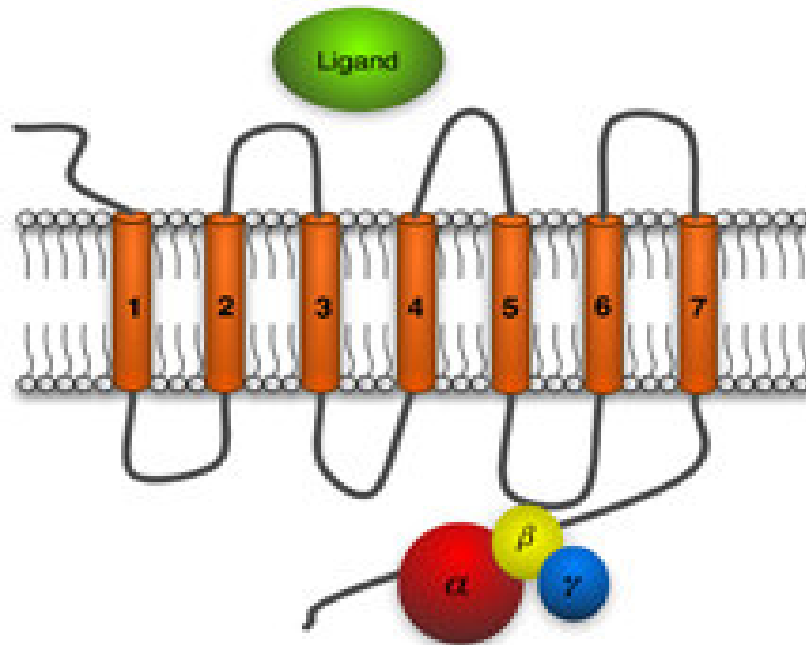
Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, η σωματοστατίνη στον αμφιβληστροειδή λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής, νευροτροποιητής ή τροφικός παράγοντας (Akorian και συν., 2000, Ferriero & Sagar, 1987, Ferriero, 1992, Zalutsky & Miller, 1990, Petrucci και συν., 2001). Αρχικά, η σωματοστατίνη δείχθηκε ότι ενισχύει την αυθόρμητη πυροδότηση και την επαγόμενη από το φως δραστηριότητα των γαγγλιακών κυττάρων της χελώνας (Adolph, 1989). Επίσης, οι Zalutsky και Miller (Zalutsky & Miller, 1990) σε μια εκτεταμένη ηλεκτροφυσιολογική μελέτη αναφέρουν ότι η επίδραση σωματοστατίνης ή οκτρεοτιδης (sst_2 αγωνιστής) οδήγησε σε γενική διέγερση των γαγγλιακών κυττάρων του κουνελιού. Με βάση αυτά τα πρώτα ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα η σωματοστατίνη δρα σε διαφορετικούς νευρώνες του κυκλώματος του αμφιβληστροειδή (άμεση δράση στα γαγγλιακά και βραχύινα κύτταρα) προκειμένου να παράγει τις παραπάνω δράσεις. Κατεπέκταση, ο Akorian και συν. (Akorian και συν., 2000) παρουσίασαν ενδείξεις που υποστηρίζουν την τροποποιητική δράση της σωματοστατίνης στα τασεο-ελεγχόμενα ρεύματα K^+ και Ca^{2+} στους φωτοϋποδοχείς, ενώ άλλη ομάδα ερευνητών (Petrucci και συν., 2001) παρουσίασε δεδομένα για την τροποποιητική δράση της σωματοστατίνης στο ρεύμα K^+ και την εισροή ασβεστίου σε απομονωμένα ραβδιοφόρα δίπολα κύτταρα.

1. Δ. 2. Υποδοχείς σωματοστατίνης: Δομή & Λειτουργία στον αμφιβληστροειδή

Δομή των υποδοχέων σωματοστατίνης

Οι δράσεις της σωματοστατίνης στον εν λόγω ιστό μεσολαβούνται από ειδικούς υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-στόχων. Φαρμακολογικές μελέτες (Liarakis & Thermos 1992, Liarakis και συν., 1993, Vasilaki και συν., 2003) έχουν επιτρέψει τον προσδιορισμό τους, ενώ πρόσφατες ανοσοϊστοχημικές και μελέτες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έχουν επιτρέψει τη λειτουργική χαρτογράφηση των υποδοχέων αυτών στο αμφιβληστροειδικό κύκλωμα (για ανασκόπηση βλ. Thermos 2003, 2008, Cervia και συν., 2008).

Οι σωματοστατινεργικοί υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των GPCRs (G-Protein Coupled Receptors), δηλ. των υποδοχέων που συζεύγνυνται με ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες και διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές α-έλικες (σχ. 1.14), ενώ επηρεάζουν και τροποποιούν την ενεργότητα της αδενυλικής κυκλάσης, των καναλιών ασβεστίου και καλίου, καθώς και άλλα ενδοκυτταρικά συστήματα (Reyl & Lewin, 1982, Mahy και συν., 1988, Wang και συν., 1989, Law και συν., 1991, Tallent & Reisine, 1991, Kleuss και συν., 1992).

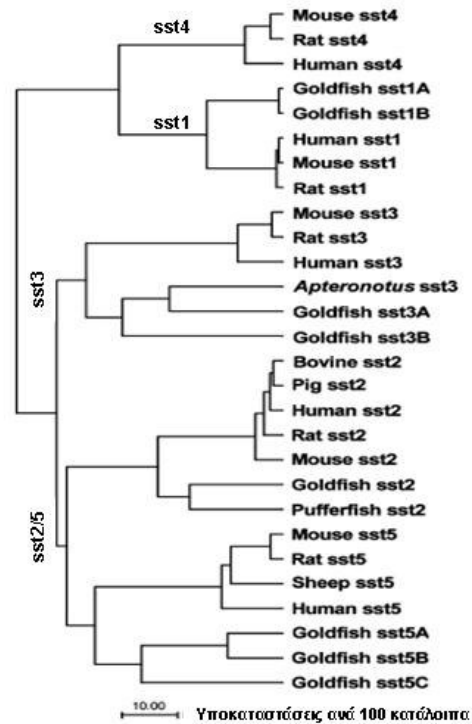


Σχήμα 1.14: Μοντέλο της δομής των υποδοχέων που συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Ligand= προσδέτης.

Έχουν κλωνοποιηθεί 5 υπότυποι των υποδοχέων της σωματοστατινης και ονομάζονται sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 και sst_5 (sst : somatostatin receptor subtype) (Yamada και συν., 1992, Hoyer και συν., 1995). Ειδικά ο sst_2 υποδοχέας υπάρχει στο ποντίκι και τον αρουραίο με δύο ισομορφές, τους sst_{2A} και sst_{2B} , που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του sst_2 γονιδίου.

Η ομολογία των υποδοχέων της σωματοστατινης ανέρχεται στο 70%, ενώ με βάση τη συγγένεια της δομής τους και το φαρμακολογικό τους προφίλ διακρίνονται (σχ. 1.15) στην ομάδα των sst_1 και sst_4 , από τη μια και στην ομάδα των sst_2 , sst_3 και sst_5 , από την άλλη (Vanetti και συν., 1992, Bruns και συν., 1995, Schindler και συν., 1998).

Οι sst υποδοχείς εκδηλώνουν μεγάλη συγγένεια και για τις δυο ενδογενείς μορφές της σωματοστατίνης (SRIF-14 και SRIF-28), αλλά εκφράζονται με διαφορετικό πρότυπο στους διάφορους ιστούς, συνδέονται με διαφορετικές G-πρωτεΐνες (ευαίσθητες ή όχι στην τοξίνη του κοκκίτη) και τροποποιούν τις δράσεις ποικίλων δευτερογενών μηνυμάτων.



Σχήμα 1.15: Η φυλογενετική ταξινόμηση των σωματοστατινεργικών υποδοχέων. Mouse= ποντίκι, rat= αρουραίος, human= άνθρωπος, goldfish= χρυσόψαρο, bovine= βοδινό, pig= χοίρος, pufferfish= το ψάρι *Fugu rubripes*, sheep= πρόβατο. (τροποποίηση από Olias G και συν., 2004)

Με την κλωνοποίηση των σωματοστατινεργικών υποδοχέων, το 1992, η μελέτη τους στον αμφιβληστροειδή διάφορων οργανισμών κατέστη πιο εύκολη και αποδοτική. Τα επίπεδα έκφρασης κάθε υποτύπου στον εν λόγω ιστό διαφέρουν από είδος σε είδος και αυτό έχει διαπιστωθεί με τη βοήθεια της τεχνικής RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

Στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου, για παράδειγμα, ο sst₂ φαίνεται να είναι ο επικρατέστερος (Mori και συν., 1997, Vasilaki και συν., 2003), ενώ σ' αυτόν του κουνελιού ο sst₁ αναφέρεται να έχει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (Cristiani και συν., 2000). Στο ποντίκι οι sst₂ και sst₄ εμφανίζονται με τα υψηλότερα επίπεδα mRNA, ενώ μέτρια έως χαμηλά είναι αυτά των sst₁ και sst₅ (Cristiani και συν., 2002).

Στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή αναφέρεται η παρουσία των sst_1 , sst_{2A} και sst_3 mRNAs, ενώ έχει εντοπιστεί και η έκφραση του sst_5 γονιδίου (Lambooij και συν., 2000, Klisovic και συν., 2001).

Με την ανάπτυξη αντισωμάτων ειδικών για όλους τους υποδοχείς της σωματοστατίνης, ανοσοϊστοχημικές μελέτες από πολλούς ερευνητές έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για την ταυτότητα και τον εντοπισμό κάθε υποτύπου στα αμφιβληστροειδικά κύτταρα διαφόρων ειδών οργανισμών. Παρακάτω δίνονται κάποιες από αυτές όσον αφορά στον αρουραίο.

Ⓢ **Sst₁**: Εντοπίστηκε, πρώτα, σε βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν σωματοστατίνη και βρίσκονται στην INL, σε εκτοπισμένα βραχύινα κύτταρα στην GCL και σε ένα μικρό αριθμό γαγγλιακών κυττάρων (Helboe & Moller, 1999). Όμως, η sst_1 ανοσοδραστικότητα έχει παρατηρηθεί και σε κυτταρικές απολήξεις στην IPL, σε αιμοφόρα αγγεία του εσώτερου αμφιβληστροειδή, καθώς και στο μελάγχρουν επιθήλιο (RPE, Retinal Pigment Epithelium) (Vasilaki και συν., 2002).

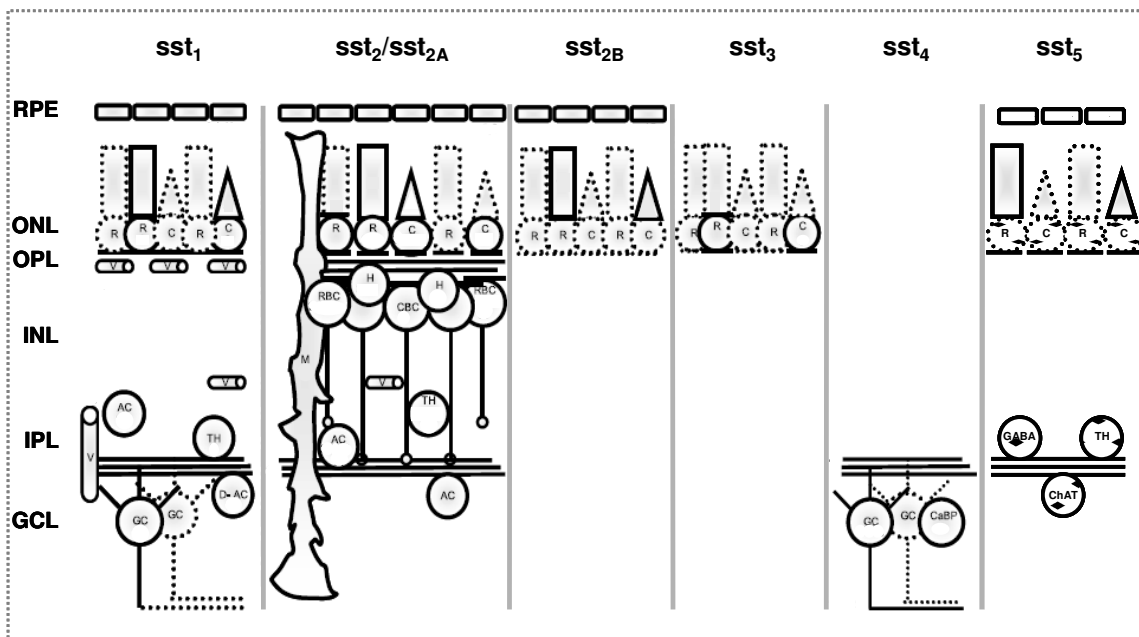
Ⓢ **Sst₂**: Η ανοσοδραστικότητα της sst_{2A} ισομορφής έχει εντοπιστεί στον εξωτερικότερο αμφιβληστροειδή σε κωνιοφόρα φωτοϋποδοκτικά κύτταρα, σε οριζόντια και σε δίπολα που σχετίζονται με ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα, ενώ στο εσωτερικότερο τμήμα του ιστού σε βραχύινα κύτταρα μεσαίου ως μεγάλου μεγέθους που εκφράζουν το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης (TH, Tyrosine Hydroxylase-σημαντικό για τη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης) (Johnson και συν., 1999). Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές που να υποστηρίζουν την παρουσία του sst_{2B} στον αμφιβληστροειδή, γενικά. Η ανοσοδραστικότητά του, πάντως, στον αρουραίο έχει εντοπιστεί σε ραβδιοφόρους και κωνιοφόρους φωτοϋποδοχείς (Vasilaki και συν., 2001), ενώ σύμφωνα με τον Johnson και συν. (1999) το αντίστοιχο mRNA δεν μπορεί να ανιχνευτεί.

Ⓢ **Sst₃**: Παρόλο που το mRNA του έχει ανιχνευτεί μέσω RT-PCR μελέτης στον αρουραίο και τον άνθρωπο, η ανοσοδραστικότητά του δεν έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών (Mori και συν., 1997, Van Hagen και συν., 2000, Klisovic και συν., 2001).

ⓐ **Sst₄**: Η ανοσοδραστικότητα του υπότυπου αυτού έχει βρεθεί σε κυτταρικές απολήξεις σε πολλά στρώματα της IPL, στην πλασματική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των κυτταρικών σωμάτων στην GCL, αλλά και σε ομάδες μακρών απολήξεων στην ίδια στιβάδα (των γαγγλιακών). Επίσης, ίνες του οπτικού νεύρου επιλεκτικά εκφράζουν ανοσοδραστικότητα για τον sst₄ (Vasilaki και συν., 2002).

ⓐ **Sst₅**: Ο υποδοχέας αυτός εντοπίστηκε πολύ πρόσφατα με ανοσοκυτταροχημεία στα αμακρινικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή του αρουραίου και συγκεκριμένα στα GABAεργικά, ντοπαμινεργικά και χολινεργικά κύτταρα (Ke & Zhong, 2007).

Τα παραπάνω δεδομένα σχετικά με τη χαρτογράφηση των υποδοχέων της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου παρουσιάζονται συνοπτικά στην απεικόνιση του σχήματος 1.16.



Σχήμα 1.16: Σχηματική απεικόνιση του εντοπισμού των υποδοχέων της σωματοστατίνης sst₁, sst_{2A}, sst_{2B}, sst₄ και sst₅ στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου. Οι συνεχείς γραμμές δείχνουν την παρουσία των διαφόρων υποτύπων υποδοχέων σε διαφορετικά κυτταρικά σώματα ή/και απολήξεις κυττάρων. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν σώματα και απολήξεις όπου δεν εντοπίζονται sst υποδοχείς. AC= Amacrine Cell/ αμακρινικό κύτταρο, D AC=Displaced Amacrine Cell/ εκτοπισμένο αμακρινικό κύτταρο, RBC= Rod Bipolar Cell/ δίπολο κύτταρο που συνδέεται με ραβδί, CBC= Cone Bipolar Cell/ δίπολο κύτταρο που συνδέεται με κωνίο, R= Rod Photoreceptor/ ραβδιοφόρος φωτοϋποδοχέας, C= Cone Photoreceptor/ κωνιοφόρος φωτοϋποδοχέας, H= Horizontal cell/ οριζόντιο κύτταρο, GC= Ganglion Cell/ γαγγλιακό κύτταρο, v= blood Vessel/ αιμοφόρο αγγείο, M= Müller cell/ γλοιακό κύτταρο Müller, TH= Tyrosine Hydroxylase/ υδροξυλάση της τυροσίνης, ChAT=

Choline Acetyltransferase/ ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης, GABA= γ-aminobutyric acid/ γ-αμινοβουτυρικό οξύ, CaBP= Calbindin Protein/ πρωτεΐνη Calbindin. (τροποποίηση από Thermos, 2003)

Λειτουργία των σωματοστατινεργικών υποδοχέων

Η παρουσία των υποδοχέων της σωματοστατίνης σε διαφορετικούς τύπους νευρώνων στον αμφιβληστροειδή υποδηλώνει ποικίλες λειτουργίες γι' αυτούς τους υποδοχείς στον εν λόγω ιστό. Η οπτική πληροφορία μεταδίδεται από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα κύτταρα και από αυτά στα γαγγλιακά κύτταρα και τελικά μέσω του οπτικού νεύρου φτάνει στον οπτικό φλοιό του εγκεφάλου για περαιτέρω επεξεργασία. Σε αυτό το κάθετο οπτικό μονοπάτι βασικό ρόλο παίζει ο κύριος νευροδιαβιβαστής του ιστού, γλουταμινικό οξύ (Glu), που συντίθεται στους προαναφερόμενους νευρώνες του μονοπατιού. Τα στοιχεία που παρουσιάζονται παρακάτω προτείνουν ότι η ενεργοποίηση των σωματοστατινεργικών υποδοχέων επηρεάζει τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος άμεσα ή έμμεσα μέσω της ρύθμισης άλλων νευροδιαβιβαστικών μορίων, π.χ. ντοπαμίνη και μονοξειδίου του αζώτου.

Μάλιστα, η σωματοστατίνη έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την ίδια τη σύνθεσή της μέσω του αυτοϋποδοχέα της sst_1 . Ο sst_1 έχει εντοπιστεί ανοσοϊστοχημικά σε αμακρινικά κύτταρα που συνθέτουν σωματοστατίνη (Helboe & Moller, 1999), γεγονός που έδειξε ότι πιθανότατα ο sst_1 λειτουργεί ως αυτοϋποδοχέας. Στη συνέχεια αυτό επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες όπου παρατηρήθηκε μείωση από το sst_1 εκλεκτικό ανάλογο CH275 των επιπέδων απελευθέρωσης της σωματοστατίνης σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή (Mastrodimou & Thermos, 2004, Thermos και συν., 2006) και αυξανόμενη ανοσοδραστικότητα για SRIF σε sst_1 knockout ποντίκια (Dal Monte και συν., 2003a).

Ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα που δείχνουν την παρουσία των $sst_{2B/3}$, sst_{2A} και sst_4 στους φωτοϋποδοχείς, ραβδιοφόρα δίπολα κύτταρα και γαγγλιακά κύτταρα, αντίστοιχα, (Vasilaki και συν., 2003, Helboe & Moller, 1999, Johnson και συν., 1998, Johnson και συν., 1999, Vasilaki και συν., 2001, Vasilaki και συν., 2002, Grigoryan και συν., 2003) υποδηλώνουν ότι η SRIF ρυθμίζει την απελευθέρωση του γλουταμινικού. Η ενεργοποίηση του sst_2 υποδοχέα σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή ποντικού οδήγησε σε αναστολή της K^+ -επαγόμενης απελευθέρωσης γλουταμινικού (Dal Monte και συν., 2003b). Παρομοίως, η αναστολή της απελευθέρωσης του γλουταμινικού ήταν σημαντικά πιο αισθητή στα ποντίκια

που δεν είχαν το γονίδιο για τον sst_1 υποδοχέα και παράλληλα υπερέκφραζαν τον sst_2 (Bigiani και συν., 2004).

Οι sst_1 και sst_2 υπότυποι έχουν εντοπιστεί σε ντοπαμινεργικούς αμακρινικούς νευρώνες (Johnson και συν., 1999, Christiani και συν., 2000). Η ενεργοποίηση αυτών των υποτύπων σε έκτοπες καλλιέργειες αρουραίου οδήγησε σε αύξηση της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης (Kouvidi και συν., 2006). Η ντοπαμίνη είναι και αυτή ένας από τους βασικούς νευροδιαβιβαστές στον αμφιβληστροειδή (Witkovsky, 2004). Συντίθεται και απελευθερώνεται από τα αμακρινικά κύτταρα που εκφράζουν την υδροξυλάση της τυροσίνης και δρα πάνω στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται σε νευρώνες του ιστού (Witkovsky, 2004). Συγκεκριμένα, ο D1 υποδοχέας έχει εντοπιστεί σε οριζόντια, αμακρινικά, γαγγλιακά και δίπολα που σχετίζονται με ραβδιοφόρα κύτταρα (Veruki & Wassle, 1996), ενώ ο D2 έχει εντοπιστεί σε ραβδία και κωνία (Witkovsky, 2004). Ο D2 μάλιστα έχει χαρακτηριστεί ως αυτοϋποδοχέας μιας και έχει εντοπιστεί και σε ντοπαμινεργικούς αμακρινικούς νευρώνες (Veruki, 1997). Η εκτεταμένη παρουσία των ντοπαμινεργικών υποδοχέων υποδηλώνει και τη μεγάλη σπουδαιότητα της ντοπαμίνης στη φυσιολογία του ιστού αυτού. Πράγματι, είναι πολύ σημαντικό μηνυματοφόρο μόριο στη διαδικασία της προσαρμογής στο φως, καθώς επίσης εμπλέκεται και στις τροφικές λειτουργίες του αμφιβληστροειδή (Witkovsky, 2004). Η SRIF μπορεί να επηρεάσει την ντοπαμίνη με άμεσους ή έμμεσους μηχανισμούς. Είναι πιθανό η SRIF να επηρεάζει άμεσα την απελευθέρωση της ντοπαμίνης μέσω sst_1 και sst_2 υποδοχέων που υπάρχουν σε ντοπαμινεργικά κύτταρα. Παράλληλα, είναι επίσης πιθανό η SRIF να επηρεάζει την απελευθέρωση του γλουταμινικού από τα σχετιζόμενα με ραβδία δίπολα κύτταρα κι έτσι να μεταβάλει τη γλουταμινεργική είσοδο στο ντοπαμινεργικό κύτταρο (Bigiani και συν., 2004).

Άλλος σημαντικός νευροτροποποιητής στο αμφιβληστροειδικό κύκλωμα είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) (Bredt & Snyder, 1992, Neal και συν., 1998), το οποίο ενεργοποιεί τη διαλυτή μορφή της γουανυλικής κυκλάσης και αυτή με τη σειρά της καταλύει την παραγωγή του cGMP από GTP. Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων στον αμφιβληστροειδή εκφράζουν τη συνθάση του NO (NOS) (Alderton και συν., 2001) ή την NADPH διαφοράση (δείκτης για την ύπαρξη της NOS, Dawson και συν., 1991a) (Haverkamp & Eldred, 1998, Roufaiil και συν., 1995). Έχει ήδη παρατηρηθεί σε ορισμένα είδη ο συνεντοπισμός υποδοχέων της σωματοστατίνης με την NADPH

διαφοράση σε κύτταρα του αμφιβληστροειδή και του μελάχρου επιθηλίου. Ειδικότερα, η NADPH διαφοράση βρέθηκε να συνεντοπίζεται στον αρουραίο με τον sst_1 κυρίως στο RPE και τα αιμοφόρα αγγεία του έσω αμφιβληστροειδή, στο κουνέλι με τον sst_{2A} στα σχετιζόμενα με ραβδία δίπολα κύτταρα, με τον sst_{2B} στον άνθρωπο στα RPE και στον αρουραίο στους φωτοϋποδοχείς, ενώ με τον sst_4 στα σώματα των γαγγλιακών κυττάρων του αρουραίου και με τον sst_5 στα ανθρώπινα RPE κύτταρα (Vasilaki και συν., 2001, Vasilaki και συν., 2002, Vasilaki και συν., 2004). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ένα πιθανό ρόλο της σωματοστατίνης στη ρύθμιση του μονοξειδίου του αζώτου στον αμφιβληστροειδή. Εξαιρεση αποτελεί η περίπτωση του ποντικού όπου δεν έχει διαπιστωθεί συνεντοπισμός κάποιου υποδοχέα με τη συνθάση του NO, οπότε εκεί η SRIF δεν φαίνεται να είναι σημαντικός ρυθμιστής αυτού του μορίου (Mastrodimou και συν., 2006).

Όπως φαίνεται από όλα τα παραπάνω, η ύπαρξη κυττάρων που συνθέτουν σωματοστατίνη, ο εντοπισμός υποδοχέων της σωματοστατίνης σε όλα τα κύτταρα στον αμφιβληστροειδή και η αποδεδειγμένη αλληλεπίδραση της SRIF με άλλους σημαντικούς νευροδιαβιβαστές (γλουταμινικό οξύ, ντοπαμίνη, μονοξείδιο του αζώτου) συνεισφέρουν στο χαρακτηρισμό της σωματοστατίνης ως νευροδιαβιβαστή που συμβάλλει σημαντικά στη ρύθμιση της φυσιολογίας του αμφιβληστροειδή. Το ενδιαφέρον των ερευνητών, μάλιστα, την τελευταία δεκαετία έχει στραφεί προς τη μελέτη και των αντι-πολλαπλασιαστικών ή αντι-ισχαιμικών δράσεων που έχει επιδείξει η SRIF σε παθολογικές καταστάσεις του αμφιβληστροειδή και, έτσι, έχει αποδειχθεί νευροπροστατευτική. Τέτοιες περιπτώσεις περιγράφονται παρακάτω.

Ε. Η ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗ ΩΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΩΝ

Με τη χρήση διαφορετικών *in vivo* και *in vitro* μοντέλων ισχαιμίας και νεοαγγείωσης στον αμφιβληστροειδή επιτυγχάνεται η μελέτη των βιοχημικών μορίων-παικτών σε αυτές τις διαδικασίες καθώς και η εξέταση άλλων, όπως η σωματοστατίνη, που θα μπορούσαν να δράσουν ευεργετικά και να χρησιμεύσουν ως νέες θεραπευτικές λύσεις. Ακολουθούν ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα που αποδεικνύουν ότι η σωματοστατίνη έχει νευροπροστατευτική δράση στον αμφιβληστροειδή σε παθολογικές συνθήκες.

Η θετική επίδραση της σωματοστατίνης στη νεοαγγείωση που επάγεται από ισχαιμία στα νεογνά αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Smith και συν. (1997) σε ένα μοντέλο επαγόμενης από το οξυγόνο αμφιβληστροειδοπάθειας στο ποντίκι. Σε αυτή τη μελέτη, η αναστολή της νεοαγγείωσης από το sst_2 εκλεκτικό ανάλογο MK678 βρέθηκε να πραγματοποιείται μέσω άμεσης μείωσης των επιπέδων της αυξητικής ορμόνης και κατά συνέπεια μείωσης του αυξητικού παράγοντα IGF-I. Συγκρίσιμα αποτελέσματα αποκτήθηκαν από τη χρήση των $sst_{2/5}$ αναλόγων οκτρεοτίδη και Woc4D (Higgins και συν., 2002). Οι θετικές δράσεις της SRIF μέσω sst_2 υποδοχέα στη μείωση της αμφιβληστροειδικής νεοαγγείωσης εξετάστηκαν επιπλέον και με τη χρήση των sst_1 knockout ποντικών, τα οποία υπερεκφράζουν τον sst_2 υποδοχέα. Τα ποντίκια αυτά (Dal Monte και συν., 2003a) έδειξαν αντιαγγειογενετική ικανότητα στο μοντέλο της επαγόμενης από το οξυγόνο νεοαγγείωσης (Dal Monte και συν., 2007).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη των Palii και συν. (2008), εξετάστηκαν οι πιθανές αντιαγγειογενετικές δράσεις των μη πεπτιδικών σωματοστατινεργικών αναλόγων NISAs (non peptide imidazolidin-2,4-dione SRIF receptor agonists) στο μοντέλο της επαγόμενης από το οξυγόνο αμφιβληστροειδοπάθειας και στο μοντέλο της επαγόμενης από το laser χοριοειδούς νεοαγγείωσης, σε ποντίκια. Οι ερευνητές αυτής της ομάδας ανέφεραν ότι αυτά τα μόρια όπως και η οκτρεοτίδη είχαν αντιαγγειογενετική δραστηριότητα μετά τη συστηματική χορήγησή τους σε συγκεντρώσεις της τάξης των μM . Προκειμένου, μάλιστα, να είναι βέβαιη η αποτελεσματικότητα της χρήσης τους επεσήμαναν ότι σε μελλοντικές κλινικές μελέτες είναι προτιμότερη η ενδοφθάλμια ή η χορήγηση μέσω σκληρού χιτώνα.

Επίσης, σε μια άλλη μελέτη με σκοπό την εξέταση της ανασταλτικής/προστατευτικής δράσης του συζευγμένου μορίου σωματοστατίνης - καμποθεσίνης σε μοντέλο χοριοειδούς νεοαγγείωσης με laser σε αρουραίο (Bezerra και συν., 2005) βρέθηκε ότι πράγματι αυτό το μόριο είναι αποτελεσματικό και, μάλιστα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς τοξικές παρενέργειες στη συγκέντρωση των $10^{-5}M$ μία έως τρεις εβδομάδες μετά την επίδραση με laser.

Με τη χρήση του μοντέλου της *in vitro* χημικής ισχαιμίας στον αρουραίο, δηλ. την έκθεση του αμφιβληστροειδή σε κυανιούχο νάτριο/ιωδοοξικό οξύ (NaCN/IAA) αποδείχθηκε η νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης και sst_2 αναλόγων της (Mastrodimitou και συν., 2005). Σε αυτό το μοντέλο οι χρησιμοποιούμενες χημικές ενώσεις μιμούνται την υποξία (NaCN) και την υπογλυκαιμία (IAA), δηλ. τα χαρακτηριστικά πρώιμα ισχαιμικά γεγονότα (Reiner και συν., 1990, Ferreira και συν., 1998). Ειδικότερα, στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του sst_2 υποδοχέα ανέστειλε σημαντικά την λόγω ισχαιμίας μείωση της ανοσοδραστικότητας για ορισμένους νευρώνες του ιστού (PKC, ChAT, TH, bNOS αμακρινικά κύτταρα) και την απόπτωση σε όλο τον ιστό. Σε συμφωνία με τα δεδομένα αυτά, στα sst_1 knockout ποντίκια (Dal Monte και συν., 2003a), που υπερκφράζουν τον sst_2 υπότυπο, με την εφαρμογή του *ex vivo* μοντέλου ισχαιμίας (υποξία/ιωδοοξικό οξύ) παρουσιάστηκε μειωμένος κυτταρικός θάνατος και σημαντικά χαμηλότερη λόγω ισχαιμίας αύξηση στα επίπεδα απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος (Catalani και συν., 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όλα τα προαναφερόμενα δεδομένα καθιστούν τη σωματοστατίνη και τους διαθέσιμους για τους υποδοχείς της αγωνιστές ολοένα και πιο ενδιαφέροντα προς περαιτέρω μελέτη, προκειμένου για τη μελλοντική χρήση τους ως έστω επικουρικά φάρμακα στην αγωγή ασθενών που πάσχουν από σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες.

Κλινικές και εργαστηριακές μελέτες που έχουν ήδη γίνει ή βρίσκονται σε εξέλιξη προσφέρουν ελπιδοφόρες ενδείξεις σχετικά με την ευεργετική δράση σωματοστατινεργικών αναλόγων σε επίπεδο αγγείων ή νευρώνων στο κύκλωμα του αμφιβληστροειδή, γεγονός που αποτελεί πρόκληση στο πλαίσιο της εύρεσης νέων πιο αποτελεσματικών θεραπειών κρίσιμων οφθαλμικών παθήσεων που οδηγούν σε τύφλωση.

Η πλειοψηφία των ερευνών μέχρι σήμερα έχει στοχεύσει συγκεκριμένα στις αντι-αγγειογενετικές δράσεις της σωματοστατίνης. Επίσης, σε επίπεδο μελέτης των αντι-αποπτωτικών δράσεων της, έχουν πραγματοποιηθεί μόνο *in vitro* μελέτες (Mastrodimou και συν., 2005, Catalani και συν., 2007). Κατά συνέπεια, αναγκαία κατέστη η *in vivo* μελέτη της σωματοστατίνης και η εξέταση του προστατευτικού της ρόλου ενάντια σε βλαβερές συνέπειες της ισχαιμίας όπως η διεγερτοτοξικότητα.

Απώτερος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων της σωματοστατίνης ή αναλόγων μορίων της στον αμφιβληστροειδή με τη χρήση ενός *in vivo* μοντέλου αμφιβληστροειδοπάθειας στον αρουραίο. Οι επιμέρους στόχοι που τέθηκαν για την επίτευξη αυτού του αποτελέσματος αναφέρονται παρακάτω:

A) Η δημιουργία του *in vivo* μοντέλου αμφιβληστροειδοπάθειας με εφαρμογή της ενδοϋαλοειδικής έγχυσης διεγερτικών αμινοξέων και συγκεκριμένα του AMPA, αγωνιστή για τους ομώνυμους ιονοτρόπους υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος.

B) Η μελέτη της επίδρασης της διεγερτοτοξικότητας που προκαλείται από το AMPA στο σύστημα της σωματοστατίνης, δηλαδή στα επίπεδα έκφρασης και

απελευθέρωσης της σωματοστατίνης καθώς και έκφρασης των υποδοχέων της στον αμφιβληστροειδή.

Γ) Ο προσδιορισμός της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στις συνθήκες της διεγερτοτοξικότητας και συγκεκριμένα η εξέταση με την ενδοφθάλμια χορήγηση της σωματοστατίνης/αναλόγου τυχόν επαναφοράς της όποιας βλάβης προκαλείται λόγω παρουσία και δράσης του AMPA.

Δ) Η μελέτη των σηματοδοτικών μηχανισμών ή μονοπατιών μέσω των οποίων η σωματοστατίνη/ανάλογα εκδηλώνουν τις προστατευτικές τους δράσεις στα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή που υφίστανται τοξικότητα από το AMPA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

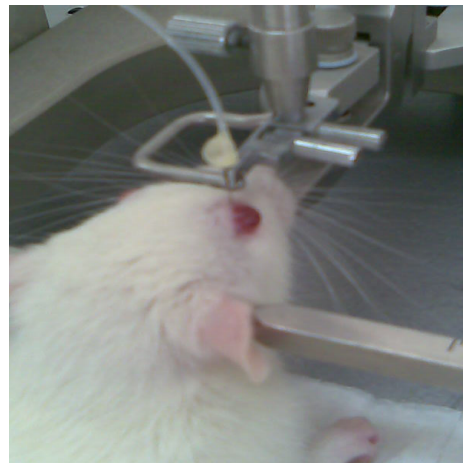
3.1. Πειραματόζωα

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτής της μελέτης ήταν αρσενικοί και θηλυκοί ενήλικες Sprague-Dawley επίμυες (αρουραίοι), βάρους 250-350g, με προέλευση από τα εργαστήρια Charles Rivers (Ιταλία) και Ινστιτούτο Παστέρ (Αθήνα). Οι αρουραίοι εκτρέφονταν (2-3 άτομα/κλουβί) σε θερμοκρασία δωματίου με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή και με ένα κύκλο ημέρας-νύκτας 12 ωρών. Η ευθανασία των ζώων έγινε με εισπνοή διαιθυλαιθέρα. Γενικά, όλες οι διαδικασίες χειρισμού των ζώων ήταν σύμφωνες με τους ελληνικούς νόμους (Animal Act., P.D. 160/91) και τις διατάξεις της εταιρείας ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) για τη χρήση πειραματόζωων στην έρευνα της Οφθαλμολογίας.

3.2. Πειραματική διαδικασία ενδοφθάλμιας χορήγησης ουσιών

Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ενδομυϊκή ένεση ατροπίνης (0.73mg/kg), ξυλαζίνης (14.55mg/kg) και κεταμίνης (200mg/kg) και τοποθετήθηκαν σε στερεοταξικό εξοπλισμό για τη σταθεροποίηση του κεφαλιού. Για τις ενδοφθάλμιες ενέσεις χρησιμοποιήθηκαν βελόνες 27 ή 30G που συνδέονταν μέσω λεπτού σωλήνα πολυαιθυλενίου με σύριγγα Hamilton προσαρμοσμένη σε κατάλληλη συσκευή προώθησης υγρού (minipump, CMA Microdialysis Ltd).

Κάθε έγχυση πραγματοποιήθηκε με είσοδο της βελόνας πίσω από το όριο σκληρού χιτώνα-κερατοειδούς χιτώνα, μέσα στο υαλώδες σώμα του οφθαλμού, με ένα σταθερό ρυθμό ροής 1μl/min και διάρκεια 5min.



Ο οφθαλμός – μάρτυρας (δεξιός ή αριστερός) έλαβε PBS 50mM (phosphate-buffered saline 50mM K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.9% NaCl, pH 7.4), ενώ ο άλλος έλαβε:

- είτε για την πρόκληση διεγερτοτοξικότητας, το διεγερτικό αμινοξύ (RS)-α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA, Tocris) [21, 42 ή 84nmol/οφθαλμό (4.2, 8.4 ή 16.8mM, αντίστοιχα, διαλυμένο σε PBS 50mM)],

- είτε για την πρόκληση νευροπροστασίας, το AMPA συγχωρηγούμενο ή σε εναλλακτικό συνδυασμό με τη σωματοστατίνη ($10^{-5}M$, $10^{-4}M$, Bachem, Germany) ή το $sst_{2/5}$ εκλεκτικό οκταπεπτιδίο BIM23104/λανρεοτιδία ($10^{-5}M$, $10^{-4}M$, Bachem) ή το καθένα από τα λιπόφιλα πεπτιδο-μιμητικά εκλεκτικά ανάλογα (Rohrer και συν., 1998, ευγενική χορηγία από την εταιρεία Merck, New Jersey, USA), δηλ. το sst_2 εκλεκτικό ανάλογο L-779,976 ($10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$), το sst_1 εκλεκτικό ανάλογο L-797,591 ($10^{-4}M$), το sst_4 εκλεκτικό ανάλογο L-803,087 ($10^{-4}M$) ή το sst_5 εκλεκτικό ανάλογο L-817,818 ($10^{-5}M$, $10^{-4}M$), ή για τα πειράματα επιβεβαίωσης της λειτουργικής παρουσίας του sst_5 υποτύπου, το L-817,818 μαζί με τον sst_2 εκλεκτικό ανταγωνιστή CYN-154806 ($10^{-4}M$).

Στα πειράματα που σκοπό είχαν τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της σωματοστατίνης στη διεγερτοτοξικότητα του αμφιβληστροειδή, πραγματοποιήθηκε στον ένα οφθαλμό (-μάρτυρα) η έγχυση PBS 50mM ή AMPA (42nmol/οφθαλμό) και στον άλλο οφθαλμό η συγχωρήγηση AMPA (42nmol/οφθαλμό), sst_2 εκλεκτικού αναλόγου και του αναστολέα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (L-NAME, Sigma, 3, 30nmol/οφθαλμό) ή αναστολέα της γουανυλικής κυκλάσης (ODQ, Tocris, 0.1, 1, 10nmol/οφθαλμό) ή η συγχωρήγηση AMPA και αναλόγου του cGMP (8-Bromo-cGMP, Tocris, 0.5, 1, 10mM).

3.3. Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry-IHC)

■ Παρασκευή ιστών

Οι οφθαλμοί αμέσως μετά την εξόρυξή τους βυθίσθηκαν σε 0.1M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-χλωριούχου νατρίου (PBS, Phosphate buffered saline: 0.1M NaH_2PO_4 , / K_2HPO_4 , 0.9% NaCl). Ο πρόσθιος πόλος των οφθαλμών (κερατοειδής χιτώνας, υδατοειδές υγρό και κρυσταλλοειδής φακός) απομακρύνθηκε, ενώ ο οπίσθιος πόλος (σκληρός, χοριοειδής και αμφιβληστροειδής χιτώνας) μονιμοποιήθηκε στους 4°C για μια ώρα σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης σε 0.1M PB. Μετά τη μονιμοποίηση τους οι ιστοί επωάστηκαν στους 4°C για 16-18 ώρες σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 0.1M PB για την επίτευξη κρυστοπροστασίας. Στη συνέχεια, έγινε ταχεία ψύξη των ιστών, με βύθισή τους για ένα λεπτό σε ισοπεντάνιο στους -45°C. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, κόπηκαν κάθετα ως προς τις στιβάδες του αμφιβληστροειδή, τομές πάχους 10μm σε κρυστόμο (Leica) και τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

■ Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

Η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιήθηκε με την εμπάπτισμά τους σε μίγμα 0.5% w/v ζελατίνης (~300 bloom, Merck) και 1mM θειϊκού χρωμιούχου καλίου ($\text{K}[\text{Cr}(\text{SO}_6\text{H}_4)(\text{H}_2\text{O})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AlCrO_3 , Merck) σε θερμοκρασία 62°C και στέγνωμα στους 30°C για 16-18 ώρες.

■ Μελέτες ανοσοφθορισμού

Για τη μελέτη της τοξικής επίδρασης του ενδοφθάλμια χορηγούμενου διεγερτικού αμινοξέος στα διαφορετικά νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή, καθώς και την εξέταση της όποιας νευροπροστατευτικής δράσης από τη σωματοστατίνη ή τα ανάλογά της, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μονοκλωνικά πρωτογενή αντισώματα, ανεπτυγμένα σε ποντίκι, ενάντια:

- στην ακετυλο-τρανσφεράση της χολίνης (ChAT), για τη σήμανση των χολινεργικών αμακρινικών κυττάρων (σε αραιώση 1:100, Chemicon, Temecula, CA)

- ο στην πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους-1^A (MAP-1^A), για τη σήμανση των γαγγλιακών κυττάρων (σε αραιώση 1:100, Sigma, St. Louis, MO)
- ο στην πρωτεΐνη Calbindin (CB D-28K) που προσδένει ασβέστιο, για τη σήμανση των οριζόντιων κυττάρων (σε αραιώση 1:5000, Swant, Switzerland)
- ο στην πρωτεϊνική κινάση C (PKC), για τη σήμανση των δίπολων κυττάρων που συνάπτονται με τους ραβδιοφόρους φωτοϋποδοχείς (σε αραιώση 1:50, Leinco Technologies Inc., St. Louis, MO)
- ο στη χαμηλού μοριακού βάρους υπομονάδα της τριπλέτας νευροϊνιδίων (NeuroFilament-Light), για τη σήμανση των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων (σε αραιώση 1:500, Chemicon), καθώς και τα παρακάτω πολυκλωνικά πρωτογενή αντισώματα, ανεπτυγμένα σε κουνέλι, ενάντια:
 - ο στην υδοξυλάση της τυροσίνης (TH)- ένζυμο για τη σύνθεση της ντοπαμίνης, για τη σήμανση των ντοπαμινεργικών κυττάρων (σε αραιώση 1:1000, Chemicon)
 - ο στην πρωτεΐνη που προσδένει ασβέστιο και παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην προσαρμογή του ματιού σε συνθήκες φωτός/σκότους, Recoverin AB, για τη σήμανση των φωτοϋποδοχέων και δίπολων κυττάρων που συνδέονται με τους κωνιοφόρους φωτοϋποδοχείς (σε συγκέντρωση 0.044mg/ml, ευγενική χορηγία από την Elenora N. Grigoryan)
 - ο στην εγκεφαλική-νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (bNOS), για τη σήμανση των κυττάρων που συνθέτουν NO (σε αραιώση 1:2000, Sigma)

Για τη μελέτη της επίδρασης της διεγερτοτοξικότητας στο σύστημα της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρωτογενή αντισώματα:

- ο μονοκλωνικό, ανεπτυγμένο σε ποντίκι, αντίσωμα ενάντια στη σωματοστατίνη, για τη σήμανση των σωματοστατινεργικών κυττάρων (σε συγκέντρωση 2μg/ml, Abcam, Cambridge, UK), καθώς και τα
- ο πολυκλωνικά, ανεπτυγμένα σε κουνέλι, πρωτογενή αντισώματα ενάντια στους υποδοχείς της σωματοστατίνης [sst₁ (σε αραιώση 1:1000), sst₂ (σε

αραίωση 1:10), sst₄ (σε αραιώση 1:1000) και sst₅ (σε αραιώση 1:1000) (ευγενική χορηγία του καθ. Stefan Schulz, Γερμανία), καθώς και sst_{2A} (σε αραιώση 1:1000, Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Germany)].

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας που ακολουθήθηκε, όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές των ιστών δέχτηκαν, αρχικά, 2 δεκάλεπτα ξεπλύματα με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (0.1M Tris-HCl, και 0.9% NaCl, pH 7.4) και επώστηκαν 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 δευτέρων αντισωμάτων. Στη συνέχεια και μετά από 3 πεντάλεπτα ξεπλύματα με TBS οι ιστοί επώστηκαν για 16-18 ώρες με το πρωτογενές αντίσωμα που προηγουμένως είχε αραιωθεί σε διάλυμα 0.1M TBS που περιείχε 0.5% NGS και 0.3% Triton X-100. Μετά από αυτό, οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 0.1M TBS και επώστηκαν για 1½ ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με φθορίζον δευτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη [αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού, σε αραιώση 1:400, Molecular Probes, USA] ή με ροδαμίνη [αντίσωμα αίγας έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού, σε αραιώση 1:400, Molecular Probes, USA]. Οι τομές αφού ξεπλύθηκαν με TBS, καλύφθηκαν με μέσο κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium with DAPI, Vectashield[®], Vector Laboratories, USA) και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού.

■ Μελέτες διπλού ανοσοφθορισμού

Προκειμένου για την ανίχνευση συνεντοπισμών δύο διαφορετικών πρωτεϊνών (κάποιου υποτύπου του σωματοστατινεργικού υποδοχέα με κάποιο κυτταρικό δείκτη) στον αμφιβληστροειδή, πραγματοποιήθηκαν μελέτες διπλού ανοσοφθορισμού. Στις μελέτες αυτές, ακολουθήθηκε το παραπάνω πρωτόκολλο (με ακριβώς τις ίδιες συνθήκες, χρόνους και αραιώσεις των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων), με μόνη διαφορά ότι μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα που αντιστοιχεί στο πρωτογενές αντίσωμα της μιας πρωτεΐνης, ακολούθησε η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για την άλλη

πρωτεΐνη για 16-18 ώρες, κατόπιν η επώαση με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα για 1½ ώρα και τέλος η κάλυψη του ιστού.

3.4. Τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

Η TUNEL είναι μία συνήθης μέθοδος για τον εντοπισμό της θραυσμάτωσης του DNA σε κύτταρα ή ιστούς στην οποία και καταλήγουν τα αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η τεχνική βασίζεται στην παρουσία εγκοπών (λόγω απόπτωσης) στο DNA που μπορεί να εντοπίσει η τελική δεοξυριβονουκλεοτιδική τρανσφεράση, ένα ένζυμο που καταλύει την προσθήκη σε αυτά τα σημεία του DNA των dUTPs κατάλληλα σημασμένων ώστε να ανιχνεύονται με μικροσκόπιο φθορισμού. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο kit της Roche (Germany).

3.5. Μικροσκοπία

Τα παρασκευάσματα των ανοσοϊστοχημικών και ιστοχημικών μελετών παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75] και μικροσκόπιο συνεστίασης [συνεστιακό μικροσκόπιο laser, Leica DM RE (Leica,), (He/Ne laser) με ελαιοκαταδυτικό φακό Plan Fluotar x40/1.00]. Η ρύθμιση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Adobe Photoshop 5.0.

3.6. Ραδιοανοσοανάλυση (RadioImmunoAssay-R.I.A.)

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της σωματοστατίνης σε δείγματα, που ελήφθησαν από αμφιβληστροειδή ζώων που υπέστη επίδραση με

διεγερτοτοξικές ή προστατευτικές ουσίες, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της ραδιοανοσολογικής τεχνικής.

■ Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των αμφιβληστροειδικών δειγμάτων, που επρόκειτο να μετρηθούν με ραδιοανοσοανάλυση, πραγματοποιήθηκε ως εξής: τα ζώα, μετά την ενδοφθάλμια χορήγηση που δέχτηκαν, θανατώθηκαν και οι οφθαλμοί τους αφαιρέθηκαν. Ο πρόσθιος πόλος των οφθαλμών (κερατοειδής χιτώνας, υδατοειδές υγρό και κρυσταλλοειδής φακός) απομακρύνθηκε και ο αμφιβληστροειδής στην εσωτερική επιφάνεια του σκληρού χιτώνα αποκολλήθηκε μηχανικά (με σπάτουλα) και αφού διαχωρίστηκε από το υαλώδες σώμα προστέθηκε σε 500μl θρεπτικού μέσου M-199 (Gibco). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15min με 12.000 στροφές το λεπτό (rpm), στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου. Στο ίζημα του ιστού προστέθηκαν 300μl 2N οξικού οξέος και βρασμός (100°C) για 10min. Στη συνέχεια, για την ομογενοποίησή τους τα δείγματα ηχοβολήθηκαν (για περίπου 10sec) και, μετά τη φύλαξη μικρής ποσότητας (περίπου 60μl) για την εκτέλεση της πρωτεϊνικής ποσοτικοποίησης, φυλάχθηκαν στους -80°C για 24-48 ώρες. Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20min με 13.000rpm στους 4°C και τα υπερκείμενα μοιράστηκαν σε διπλέτες των 100μl. Μετά τη λυοφιλοποίησή τους τα δείγματα φυλάχθηκαν ξανά στους -80°C μέχρι την περαιτέρω μέτρηση της συγκέντρωσης της σωματοστατίνης σε αυτά με τη χρήση της ραδιοανοσοανάλυσης.

■ Ανάλυση των δειγμάτων

Η τεχνική της ραδιοανοσοανάλυσης βασίζεται στην αντίδραση:



όπου

[S]: Συγκέντρωση ελεύθερης σωματοστατίνης πριν την αντίδραση

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

Μετά την αντίδραση, προστίθεται διάλυμα charcoal/dextran, οπότε πραγματοποιείται κατακρήμνιση της ελεύθερης ραδιοσημασμένης σωματοστατίνης (S*') και διαχωρισμός της από αυτή που έχει προσδεθεί στο αντίσωμα της σωματοστατίνης AbS*, η οποία και μετριέται 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.

Για τις μελέτες αυτές ακολουθήθηκε πρωτόκολλο βασισμένο στους Sperk και Widmann (1985). Κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με χρήση διαλυμάτων σωματοστατίνης σε R.I.A. buffer I (0.15M NaCl, 0.1% ζελατίνη, 0.1% B.S.A., 0.02% βακιτρακίνη, 0.02% NaN₃ / 0.1 M NaNa₂) (NaNa₂: Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄) και σε συγκεντρώσεις: 400pgr/100μl, 300pgr/100μl, 200pgr/100μl, 150pgr/100μl, 100pgr/100μl, 50pgr/100μl, 25pgr/100μl, 12.5pgr/100μl, 6.25pgr/100μl, 3.125pgr/100μl, 1.56pgr/100μl, 0.78pgr/100μl και 0pgr/100μl.

Σε σωληνάρια πολυστυρενίου 55x12mm, εις διπλούν, προστέθηκαν 100μl από τα παραπάνω δείγματα της πρότυπης καμπύλης ή λυοφιλοποιημένο αμφιβληστροειδικό δείγμα που επαναδιαλυτοποιήθηκε με 100μl R.I.A. buffer I.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl διαλύματος ραδιενεργής σωματοστατίνης [¹²⁵I]-Tyr¹¹-SRIF-14 (2000 Ci/mmol; Amersham, UK) που περιείχαν περίπου 20000 κρούσεις ανά λεπτό (cpm), 100μl αντισώματος για τη σωματοστατίνη (ευγενική προσφορά του Dr Günther Sperk) σε συγκέντρωση 1:3000 και R.I.A. buffer I, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υγρού επώασης να είναι 500μl. Το μίγμα επώαστηκε για 24 ώρες στους 4°C. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε δείγμα 900μl διαλύματος 2.5% charcoal/0.25% dextran T-70 σε R.I.A. buffer II (0.15M NaCl, 0,1% B.S.A., 0.02% βακιτρακίνη, 0.02% NaN₃ / 0.1M NaNa₂) και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στους 4°C στις 3000rpm. 700μl από το υπερκείμενο κάθε δείγματος μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (LKB-Wallak MiniGamma 1275, απόδοσης 75%).

Η ανάλυση των μετρήσεων 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 molarity) και στον άξονα των y, τις τιμές των κρούσεων ανά λεπτό του συμπλόκου του αντισώματος με τη ραδιοσημασμένη σωματοστατίνη. Από αυτές τις καμπύλες προέκυψαν οι τιμές της ποσότητας της σωματοστατίνης σε pgr/100μl και στη συνέχεια διαιρώντας με την τιμή της αντίστοιχης πρωτεϊνικής ποσότητας ελήφθη η τιμή της συγκέντρωσης της σωματοστατίνης σε κάθε δείγμα σε pgr σωματοστατίνης / μg πρωτεΐνης.

3.7. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του ομογενοποιημένου αμφιβληστροειδή πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck), που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη τεχνική, συζεύγνεται με τις πρωτονιωμένες αμινοομάδες των υπολειμμάτων των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γεγονός που προκαλεί την μετατροπή του μέγιστου απορρόφησής της από τα 465nm στα 595nm. Η σύνδεση πρωτεΐνης-χρωστικής πραγματοποιείται πολύ γρήγορα

(περίπου σε δύο λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα του χρώματος για περίπου μια ώρα μετά την προσθήκη της χρωστικής. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης, γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών.

Σε σωληνάρια erpendorf (1.5ml, εις διπλούν) προστέθηκαν 200μl δειγμάτων γνωστών ποσοτήτων αλβουμίνης ορού βοδιού B.S.A. (0, 5, 10, 20, 30, 40 και 50 μg) ή ομογενοποιημένου αμφιβληστροειδή σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 0.1M και 800μl διαλύματος Bradford. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (Bio-Rad) σε μήκος κύματος 595nm.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα δείγματα αμφιβληστροειδή υπολογίστηκε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία προκύπτει από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης B.S.A. Η ελάχιστη διακριτική ικανότητα της μεθόδου ήταν 5μg/ml. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μg πρωτεΐνης ανά ml διαλύματος.

3.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

■ Παρασκευή πρωτεϊνικών δειγμάτων από αμφιβληστροειδή ζώων που δέχτηκαν ενδοφθάλμια χορήγηση ουσιών

Μετά τη θανάτωση των ζώων, που είχαν υποστεί ενδοφθάλμιες εγχύσεις, αφαιρέθηκαν οι οφθαλμοί και απομονώθηκαν με μηχανική αποκόλληση οι αμφιβληστροειδείς τους οι οποίοι και προστέθηκαν ο καθένας χωριστά σε 500μl lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 250mM sucrose, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton, 2μg/ml leupeptin, 2μg/ml aprotinin). Ακολούθησε η ομογενοποίηση των ιστών κυρίως σε ομογενοποιητή (Ultra-Turrax; IKA Works) και για λίγα δευτερόλεπτα επιπλέον σε σύστημα ηχοβόλησης. Εξαιτίας της ευαισθησίας του αμφιβληστροειδή σε περαιτέρω επεξεργασία και ταυτόχρονα της ευκολίας που προσφέρει το χαμηλό ιξώδες του, προτιμήθηκε η χρήση ολόκληρου του ομογενοποιημένου ως πρωτεϊνικό δείγμα για την ηλεκτροφόρηση-ανοσοαποτύπωση. Μικρή

ποσότητα από κάθε ιστό φυλάχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

■ Παρασκευή μεμβρανών αμφιβληστροειδή

Φυσιολογικοί ενήλικες Sprague-Dawley αρουραίοι θανατώθηκαν και οι αμφιβληστροειδείς τους απομονώθηκαν και ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια ομογενοποιητή (Ultra-Turrax; IKA Works) σε Tris-Cl pH 7.4. Το ομογενοποίημα κάθε ιστού φυγοκεντρήθηκε σε 1.000g για 10min και το παραγόμενο υπερκείμενο φυλάχθηκε. Το ίζημα, από την άλλη, επαναδιαλύθηκε και ξαναφυγοκεντρήθηκε. Κατόπιν, το παραγόμενο αυτό δεύτερο υπερκείμενο ενώθηκε με το προηγούμενο και το μίγμα αυτό φυγοκεντρήθηκε στα 11.000g για 20min. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris και φυγοκεντρήθηκε στα 27.000g για 10min. Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1% Triton, 2μg/mL leupeptin, 2μg/mL aprotinin). Όλα τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν στους 4°C. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

■ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένες θετικά ή αρνητικά εξαιτίας των θετικά ή αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων τους. Όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο μετακινούνται προς το θετικό ή αρνητικό 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 παρασκευασμάτων αμφιβληστροειδή έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πήγμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, (SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) σύμφωνα με τον Laemmli (1970). Ως μέσο υποστήριξης χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (8% ή 10%) όπου, κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, η

μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύθηκε σε διάλυμα (sample buffer: 0.1M Tris-Cl, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol) δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS, Sodium Dodecyl 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. Τα πρωτεϊνικά δείγματα έβρασαν σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 100°C για την μετουσίωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος επιστίβαξης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με, αρχικά, σταθερή τάση 80V και κατόπιν 110V, μετά το πέρασμα του μετώπου των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

■ Τεχνική ανοσοαποτύπωσης (Western blot)

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου μεταφέρθηκαν με αποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose membranes 0.45μm, Sigma) με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος εντάσεως 310mA. Έπειτα, προστέθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού ειδικό για τον sst_{2A} υπότυπο (1:2500, Gramsch Laboratories) ή για τον sst₅ υπότυπο (1:1500, ευγενική προσφορά από τον καθ. Stephan Schulz, Γερμανία) του υποδοχέα της σωματοστατίνης.

Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύθηκε με την προσθήκη δευτέρου 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 κουνελιού συζευγμένο με HRP (1:5000), (Chemicon)]. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ανιχνεύθηκε με την τεχνική της χημειοφωταύγειας και την προσθήκη, ως υπόστρωμα του ενζύμου, λουμινόλης (luminol, Chemiluminescence Reagent Plus, NEN, Η.Π.Α.) γεγονός που έχει σαν

αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός το οποίο αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ (ECL, Hyperfilm, Amersham).

Για την ποσοτικοποίηση του σήματος που έδωσε η ανοσοαποτύπωση για τον εκάστοτε υποδοχέα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση των αντίστοιχων μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με αντίσωμα για την ακτίνη (1:5000, Chemicon). Ακολούθησε η εμφάνιση σε φιλμ και η απόκτηση των αντίστοιχων ζωνών για την ακτίνη. Τελικά, υπολογίστηκε ο λόγος των οπτικών πυκνοτήτων των πρωτεϊνικών ζωνών υποδοχέα/ακτίνης, προκειμένου να γίνει σωστά η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων αμφιβληστροειδή από τα διαφορετικά ζώα.

Ειδικά για την ανίχνευση της πρωτεϊνικής ζώνης (μοριακού βάρους) που αντιστοιχεί στον sst_{2A} υποδοχέα του αμφιβληστροειδή του αρουραίου χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες φυσιολογικού αμφιβληστροειδή που παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω. Συγκεκριμένα, ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου (32μg πρωτεΐνης) δείγματα φορτώθηκαν σε 10% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με τον ορό anti- sst_{2A} (1:2500) στους 4°C για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Συγχρόνως, ένα sst_{2A} αντιγόνο σε συγκέντρωση $10^{-4}M$ προεπώαστηκε με τον ορό για 2 ώρες στους 25 °C. Ακολούθησε η ανοσοαποτύπωση στο φωτογραφικό φιλμ, όπως περιγράφεται προηγούμενα. Αυτά τα πειράματα έγιναν 2 με 4 φορές για ίδια ή διαφορετικά μεμβρανικά παρασκευάσματα αμφιβληστροειδή.

3.9. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων του γλουταμινικού οξέος που απελευθερώνεται από τον αμφιβληστροειδή ζώνων που δέχονται ενδοφθάλμια έγχυση PBS (ως μάρτυρα) ή AMPA (για την πρόκληση νευροτοξικότητας) ή μίγμα AMPA και sst_2 εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 (για την επίτευξη νευροπροστασίας) και την περαιτέρω διαλεύκανση του μηχανισμού της προστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στις τοξικές

συνθήκες, εκτελέστηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε εκχυλίσματα αμφιβληστροειδή από τις παραπάνω διαφορετικές ομάδες.

■ Προετοιμασία δειγμάτων

Μία μέρα μετά την ενδοφθάλμια χορήγηση είτε PBS (50mM, n=3), είτε AMPA (42nmol, n=4), είτε AMPA (42nmol) + L-779,976 (10^{-4} M) (n=3), τα ζώα θανατώθηκαν και οι αμφιβληστροειδείς τους αποκολλούμενοι μηχανικά από τους οφθαλμούς απομονώθηκαν και προστέθηκαν ο καθένας χωριστά σε 300μl κρύου ρυθμιστικού διαλύματος PB (50mM). Ακολούθησε ομογενοποίηση των ιστών με ηχοβόληση και, αφού απομακρύνθηκαν 60μl από το ομογενοποίημα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford, προστέθηκαν 24μl πυκνού τριχλωροοξικού οξέος (TCA). Μετά από επακόλουθη φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές/λεπτό (rpm) για 10min, στους 4°C, ελήφθη το υπερκείμενο από κάθε δείγμα που φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του.

■ Ανάλυση των δειγμάτων με HPLC

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας, Ανάλυσης και Πληροφοριών Φαρμάκων του Πανεπιστημίου των Βρυξελλών, από την ερευνητική ομάδα της καθ. Ilse Smolders. Για την ανάλυση των επιπέδων γλουταμινικού, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάστροφης φάσης στενής οπής με διαβαθμισμένη έκλουση και ανίχνευση φθορισμού («reversed phase narrow bore assay with gradient elution and fluorescence detection»). Παράλληλα, προκειμένου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν διαλύματα γλουταμινικού γνωστής συγκέντρωσης (standards) με διαλύτη όμοιο με αυτόν των δειγμάτων του αμφιβληστροειδή. Πρώτο βήμα στη διαδικασία ανάλυσης ήταν η αναγωγή (15μl) των δειγμάτων με ορθο-οφθαλδεΐδης παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης στους 4°C. Ακολούθησε η έγχυση δείγματος (10μl) σε κολώνα C18 στενής οπής (μέγεθος σωματιδίων 5 μm, διαστάσεις 250 x 2 mm, Carcell Pak MG®, Shiseido, Japan) και η έκλουση των δειγμάτων με μια αντλία Dionex P680

HPLC (Dionex, Benelux), μέσω της κινητής φάσης (mobile phase) και του προγράμματος διαβάθμισης (Van Hemelrijck και συν., 2005). Η τελική ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ένα ανιχνευτή φθορισμού RF10A XL (Shimazu, Japan).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ 1η

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ *IN VIVO* ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΩΝ

Ενδοφθάλμια χορήγηση AMPA

Προκειμένου να δημιουργηθεί *in vivo* μοντέλο διεγερτοτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε ο διεγερτικός αγωνιστής AMPA χορηγούμενος ενδοβολβικά στον αρουραίο. Η επίδραση του αγωνιστή αυτού στα αμφιβληστροειδικά κύτταρα μελετήθηκε με εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι δεικτών των διαφόρων κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδή, όπως ChAT (Choline Acetyltransferase / ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης - δείκτης για τα χολινεργικά αμακρινικά κύτταρα), bNOS (brain Synthase of Nitric Oxide / νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου – δείκτης για τα κύτταρα που συνθέτουν μονοξείδιο του αζώτου), calbindin (δείκτης για τα οριζόντια και GABAεργικά αμακρινικά κύτταρα), PKC (δείκτης για τα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία) κ.ά. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση του AMPA σε επίπεδο απόπτωσης γενικά στον ιστό με εφαρμογή της τεχνικής TUNEL.

4. 1. 1. Δόσο- και χρόνο- εξαρτώμενη επίδραση του AMPA στην έκφραση της ChAT

Η ανοσοδραστικότητα της ChAT εντοπίζεται χαρακτηριστικά στους χολινεργικούς νευρώνες του αμφιβληστροειδή που ανήκουν στην κατηγορία των βραχύνιων (αμακρινικών) κυττάρων του ιστού. Στους ιστούς-μάρτυρες, που έλαβαν ενδοφθάλμια PBS, η ChAT ανοσοδραστικότητα παρατηρήθηκε σε σώματα και απολήξεις χολινεργικών νευρώνων οι οποίοι βρίσκονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα (INL) και τη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL) (σχ. 4.1A, 4.2A).

Στα πλαίσια μελέτης της **δόσο-εξαρτώμενης** επίδρασης του διεγερτικού αμινοξέος AMPA στα χολινεργικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή μια μέρα μετά τη χορήγηση, το AMPA χορηγούμενο σε τρεις δόσεις (21, 42, 84nmol/οφθαλμό) προκάλεσε μια αντίστοιχη όλο και μεγαλύτερη μείωση στην ανοσοδραστικότητα της ChAT. Συγκεκριμένα, η δόση των 21nmol/οφθαλμό προκάλεσε μια μερική μείωση στο σήμα μιας και μόνο οι απολήξεις των χολινεργικών κυττάρων ήταν ορατές (σχ. 4.1B), ενώ οι δόσεις των 42 και 84nmol/οφθαλμό προκάλεσαν μια ολοκληρωτική μείωση στο σήμα για αυτόν τον τύπο κυττάρων (σχ. 4.1Γ, Δ).

Σχήμα 4.1

Στα πλαίσια μελέτης της **χρονο- εξαρτώμενης** επίδρασης του AMPA στα χολινεργικά κύτταρα με χρήση της μικρότερης αποτελεσματικής δόσης των 42nmol/οφθαλμό, η απώλεια της ChAT ανοσοδραστικότητας επέμεινε να εμφανίζεται όχι μόνο μετά το πρώτο 24ωρο αλλά και μετά από 8, 16 ή 30 μέρες (σχ. 4.2B-E). Η εικόνα που έδωσε η ανοσοϊστοχημεία για τις 2 και 4 μέρες μετά την ενδοφθάλμια επέμβαση ήταν ίδια με τις υπόλοιπες γι' αυτό και δεν συμπεριλαμβάνεται στο σχήμα.

4. 1. 2. Χρόνο- εξαρτώμενη επίδραση του AMPA στην έκφραση της bNOS

Η ανοσοδραστικότητα της νευρωνικής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (brain Nitric Oxide Synthase) χαρακτηρίζει τους νευρώνες του αμφιβληστροειδή που συνθέτουν NO και εντοπίζονται στις έσω στιβάδες του ιστού και κυρίως στην εσωτερική κοκκώδη (INL) και δικτυωτή στιβάδα (IPL), δηλ. κυρίως σε αμακρινικά κύτταρα (σχ. 4.3A).

Με την ενδοφθάλμια χορήγηση του διεγερτικού AMPA στη μικρότερη και ταυτόχρονα αποτελεσματικότερη δόση (42nmol/οφθαλμό) όπως αποδείχθηκε και από τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε αλλαγή μόνο του συνολικού αριθμού των σωμάτων των κυττάρων που συνθέτουν NO. Συγκεκριμένα, ο αριθμός αυτός 24 ώρες μετά τη χορήγηση του AMPA μειώθηκε κατά 70-75% συγκριτικά με τους ιστούς-μάρτυρες, ενώ 8, 16 και 30 μέρες μετά ο αριθμός των σωμάτων bNOS επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα (σχ. 4.3B).

4. 1. 3. Επίδραση του AMPA στην έκφραση της Calbindin

Η Calbindin_{D-28K} είναι μια νευρωνική πρωτεΐνη που προσδένει ασβέστιο και αποτελεί κλασσικό κυτταρικό δείκτη για τα οριζόντια κύτταρα του αμφιβληστροειδή (Hamano και συν., 1990). Ωστόσο, γι' αυτήν την πρωτεΐνη σημαίνουνται και τα GABAεργικά αμακρινικά κύτταρα του ιστού. Δεδομένου ότι τα οριζόντια κύτταρα του αμφιβληστροειδή διαθέτουν ως επί το πλείστον AMPA υποδοχείς (Gründer και συν., 2000, Dijk & Kamphuis, 2004), θεωρήθηκε αναγκαία η μελέτη της επίδρασης στο συγκεκριμένο τύπο

Σχήμα 4.2

Σχήμα 4.3

κυττάρων του AMPA (42nmol), μέσα στο πρώτο 24ωρο μετά τη χορήγηση. Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.4, μία μέρα μετά τη χορήγηση του AMPA τα οριζόντια κύτταρα είναι φανερά προσβεβλημένα, μιας και τα σώματά τους εμφανίστηκαν μικρότερα (μεγάλα βέλη, σχ. 4.4), ενώ οι απολήξεις τους είχαν χάσει σχεδόν ολοκληρωτικά το σήμα για calbindin.

4. 1. 4. Επίδραση του AMPA στην έκφραση άλλων κυτταρικών δεικτών (Recoverin, PKC, TH, MAP^{1A}, NF-L)

Η επίδραση του ενδοβολβικά χορηγούμενου διεγερτικού αμινοξέος AMPA εξετάστηκε ανοσοϊστοχημικά και σε άλλους τύπους νευρώνων του αμφιβληστροειδή του αρουραίου, όπως είναι οι φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία ή τα κωνία, τα ντοπαμινεργικά αμακρινικά κύτταρα και τα γαγγλιακά κύτταρα.

Συγκρίνοντας με την εικόνα στους ιστούς-μάρτυρες, το AMPA εγχυόμενο στα 42nmol/οφθαλμό και εξετάζοντας το αποτέλεσμα 24 ώρες μετά την έγχυση, δεν επηρέασε το σήμα για κανένα από τα πιο πάνω αναφερόμενα νευρικά κύτταρα (σχ. 4.5-4.8).

4. 1. 5. Επίδραση του AMPA στο βαθμό απόπτωσης στον αμφιβληστροειδή

Με τη βοήθεια της τεχνικής TUNEL εξετάστηκε η πρόκληση τυχόν αυξημένου κυτταρικού θανάτου υπό την παρουσία του AMPA, καθώς και πού αυτός εστιάστηκε. Πράγματι, όπως φαίνεται και στο σχ. 4.9, παρατηρήθηκε αυξημένος βαθμός απόπτωσης 24 ώρες μετά τη χορήγηση 42nmol/οφθαλμό του AMPA. Μάλιστα, η απόπτωση αυτή εντοπίστηκε και στις τρεις κύριες στιβάδες του αμφιβληστροειδή, εξωτερική κοκκώδη (ONL), εσωτερική κοκκώδη (INL) και στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (GCL).

Συμπερασματικά, το μοντέλο της ενδοφθάλμιας έγχυσης του διεγερτικού αμινοξέος AMPA στη δόση των 42nmol/οφθαλμό και η απομόνωση του ιστού για περαιτέρω μελέτη 24 ώρες μετά, αποτελεί ένα καλό in vivo μοντέλο για αμφιβληστροειδοπάθειες που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση είτε, στην προκειμένη περίπτωση, της σωματοστατίνης είτε άλλων μορίων ως υποψήφια μελλοντικά αποτελεσματικότερα φάρμακα.

Σχήμα 4.4

Σχήμα 4.5

Σχήμα 4.6

Σχήμα 4.7

Σχήμα 4.8

Σχήμα 4.9

ΕΝΟΤΗΤΑ 2η

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

Προκειμένου να μελετηθεί η νευροπροστατευτική δράση της σωματοστατίνης έναντι της AMPA-διεγερτοτοξικότητας, αναγκαία κατέστη πρωτύτερα η μελέτη της επίδρασης του διεγερτικού αμινοξέος στο σωματοστατινεργικό σύστημα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του AMPA στα επίπεδα έκφρασης της σωματοστατίνης και των υποδοχέων της στον «πάσχοντα» αμφιβληστροειδή. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της ανοσοϊστοχημείας, ραδιοανοσολογίας και ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

4. 2. 1. Επίδραση του AMPA στην ανοσοδραστικότητα και τα επίπεδα απελευθέρωσης της σωματοστατίνης

Τα νευρικά κύτταρα που συνθέτουν σωματοστατίνη στον αμφιβληστροειδή ανήκουν στην ομάδα των αμακρινικών κυττάρων. Εξετάστηκε η ανοσοδραστικότητα της σωματοστατίνης και συγκρίνοντας με τον ιστό-μάρτυρα δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στον αριθμό ή τη μορφή των σωματοστατινεργικών κυττάρων (σχ. 4.10A,B). Στο συγκεκριμένο σχήμα ίσως φαίνεται ότι υπάρχει διαφορά στο σήμα για SRIF ανάμεσα στις διαφορετικές επιδράσεις. Όμως, θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπήρχαν συχνά τεχνικά προβλήματα (π.χ. αναδιπλώσεις ή μερικές καταστροφές των ιστών) που είχαν ως αποτέλεσμα μια μεγαλύτερη απορρόφηση φθορίζοντος δευτερογενούς αντισώματος από κάποιον ιστό σε σχέση με κάποιον άλλο.

Επιπλέον, εξετάστηκαν τυχόν διαφορές στα επίπεδα απελευθέρωσης της σωματοστατίνης λόγω της παρουσίας του AMPA με τη βοήθεια της ραδιοανοσολογικής τεχνικής. Όπως φαίνεται και στο σχετικό διάγραμμα (σχ. 4.11), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της σωματοστατίνης με την ενδοφθάλμια χορήγηση του διεγερτικού αμινοξέος.

4. 2. 2. Επίδραση του AMPA στην ανοσοδραστικότητα και τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα sst_{2A}

Μεταξύ των ιστών που έλαβαν ρυθμιστικό διάλυμα PBS (μάρτυρες) και αυτών που έλαβαν το διεγερτικό αμινοξύ AMPA (42nmol) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανοσοδραστικότητα για τον sst_{2A} υπότυπο του υποδοχέα της σωματοστατίνης. Όπως φαίνεται και στις αντίστοιχες φωτογραφίες (σχ. 4.12

A,B), ο υποδοχέας αυτός εντοπίζεται σε κυτταρικά σώματα, νευράξονες και απολήξεις κυρίως δίπολων νευρώνων του αμφιβληστροειδή.

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση του μοριακού βάρους του υποδοχέα sst_{2A} στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου. Όπως φαίνεται στο σχ. 4.12Γ, με χρήση εκλεκτικού για τον sst_{2A} αντισώματος ανιχνεύθηκε μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 77kDa, η οποία εξαλείφθηκε παρουσία του αντιγόνου. Επίσης, με περαιτέρω μελέτες ανοσοαποτύπωσης φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα sst_{2A} δεν επηρεάστηκαν από τις συνθήκες τοξικότητας που προκάλεσε η ύπαρξη του AMPA. Όπως φαίνεται στο σχ. 4.12Δ, πρωτεϊνική ζώνη, στα 72kDa, ίδιας οπτικής πυκνότητας εντοπίστηκε στα δείγματα-μάρτυρες και στα δείγματα-AMPA.

4. 2. 3. Επίδραση του AMPA στην ανοσοδραστικότητα των υποδοχέων sst_1 , sst_4 και sst_5

Εκτός από τον sst_{2A} που είναι και η επικρατέστερη μορφή σωματοστατινεργικού υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου, εξετάστηκαν, ακόμη, τυχόν αλλαγές, λόγω διεγερτοτοξικότητας, στα επίπεδα έκφρασης των υπόλοιπων υπότυπων sst_1 , sst_4 και sst_5 .

Όσον αφορά στον αυτοϋποδοχέα της σωματοστατινής sst_1 (Mastrodimitou & Thermos, 2004), μέσα από την παρούσα μελέτη και μετά από μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (σε τουλάχιστον $n=5$) της ανοσοϊστοχημείας για sst_1 , δεν υπάρχουν σαφή αποτελέσματα που να ικανοποιούν το ερώτημα αν υπάρχει αλλαγή και σε ποιο μέγεθος στην έκφραση του συγκεκριμένου υπότυπου παρουσία του AMPA.

Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.13, ο sst_4 υπότυπος που παρατηρείται σε απολήξεις στην IPL και GCL έχει φανερά μειωμένο σήμα ανοσοδραστικότητας μετά από την έγχυση του AMPA (σχ. 4.13B) συγκριτικά με τον ιστό-μάρτυρα (σχ. 4.13A).

Από την άλλη, ο sst_5 υπότυπος του υποδοχέα σωματοστατινής φάνηκε να μην επηρεάζεται από τη δράση του διεγερτικού αμινοξέος και να εμφανίζεται, όπως και στο φυσιολογικό ιστό, σε απολήξεις και κάποια σώματα αμακρινικών κυττάρων στην IPL, στα εξωτερικά άκρα των φωτοϋποδοχέων,

καθώς και κάπως αχνότερα στην OPL (βέλη, σχ. 4.14 Β,Γ). Μελέτες ανοσοαποτύπωσης επιβεβαίωσαν αυτό το γεγονός, καθώς πρωτεΐνη μοριακού βάρους 97kDa που αντιπροσωπεύει τον sst₅ εντοπίστηκε στα δείγματα-μάρτυρες και στα δείγματα-AMPA (σχ. 4.14Α).

Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτής της ενότητας συμπεραίνεται ότι, οι εφαρμοζόμενες συνθήκες στα πλαίσια του χρησιμοποιούμενου in vivo μοντέλου διεγερτοτοξικότητας στον αρουραίο δεν επηρεάζουν σημαντικά το σωματοστατινεργικό σύστημα σε επίπεδο έκφρασης του πεπτιδίου και των υποδοχέων sst₂ και sst₅. Έτσι, επιτρέπεται η μελέτη της σωματοστατίνης και εκλεκτικών αναλόγων για τους παραπάνω υποδοχείς ως νευροπροστατευτικά μόρια σε τοξικές καταστάσεις του αμφιβληστροειδή.

Σχήμα 10

Σχήμα 11

Σχήμα 12

Σχήμα 13

Σχήμα 14

ΕΝΟΤΗΤΑ 3η

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η εξέταση των νευροπροστατευτικών δράσεων της σωματοστατίνης ή των εκλεκτικών για τους υποδοχείς της μορίων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας για τη μελέτη τυχόν επαναφοράς της ανοσοδραστικότητας για τους διάφορους κυτταρικούς δείκτες που επηρεάστηκαν με επίδραση του AMPA και της τεχνικής TUNEL προκειμένου για τη μελέτη τυχόν μείωσης της απόπτωσης στον ιστό.

4. 3. 1. Επίδραση της σωματοστατίνης συγχρηγούμενης με το AMPA στα χολινεργικά κύτταρα

Αρχικά, εξετάστηκε η τυχόν προστατευτική δράση της ίδιας της σωματοστατίνης στις διεγερτοτοξικές συνθήκες επαγόμενες από το AMPA εφαρμόζοντας συγχρηγήση AMPA (42nmol) και σωματοστατίνης (10^{-5} , 10^{-4} M) στο υαλώδες σώμα του οφθαλμού και απομονώνοντας τον ιστό μία μέρα μετά. Τα χολινεργικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή, που είναι από τα πιο ευαίσθητα σε τέτοιες συνθήκες, φάνηκε να προστατεύονται μόνο μερικώς από τη σωματοστατίνη. Συγκεκριμένα, λιγότερο στη συγκέντρωση των 10^{-5} M (σχ. 4.15Γ) και περισσότερο στα 10^{-4} M (σχ. 4.15Δ), φαίνονται μόνο οι απολήξεις των κυττάρων αυτών που σχηματίζουν δύο χαρακτηριστικές παράλληλες σειρές στην IPL.

4. 3. 2. Επίδραση του $sst_{2/5}$ εκλεκτικού αναλόγου BIM23014 συγχρηγούμενου με το AMPA στα χολινεργικά κύτταρα

Μελετώντας τη δράση του εκλεκτικού $sst_{2/5}$ οκταπεπτιδικού αναλόγου της σωματοστατίνης (BIM23014, λανρεοτιδή), παρατηρήθηκε, σε αντίθεση με τη σωματοστατίνη, μια πολύ αποτελεσματική επαναφορά του σήματος για τους χολινεργικούς νευρώνες με χρήση του BIM23014 στη δόση των 10^{-4} M (σχήμα 4.16Δ). Ωστόσο, στη μικρότερη δόση (10^{-5} M, σχ. 4.16Γ) το αποτέλεσμα της δράσης του αναλόγου αυτού ήταν παρόμοιο με αυτό της σωματοστατίνης στα 10^{-4} M (φάνηκαν μόνο κάποιες απολήξεις).

Σχήμα 15

Σχήμα 16

4. 3. 3. Επίδραση του sst_2 εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το AMPA στα χολινεργικά και bNOS κύτταρα

Το μη πεπτιδικό, αλλά πεπτιδο-μιμητικό ανάλογο L-779,976 είναι ένα μικρό, αρκετά σταθερό και λιπόφιλο μόριο που μπορεί να μιμηθεί τις δράσεις της σωματοστατίνης στους sst_2 υποδοχείς (Rohrer και συν., 1998).

Μελετώντας τη δράση του sst_2 εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το διεγερτικό AMPA (42nmol/οφθαλμό) ως προς την ανοσοδραστικότητα των χολινεργικών νευρώνων του αμφιβληστροειδή, παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη απόκριση του ιστού. Συγκεκριμένα, παρουσία του L-779,976 στη δόση των $10^{-6}M$ (σχ. 4.17Γ), δεν παρατηρήθηκε καμία επαναφορά του σήματος για αυτήν την κατηγορία κυττάρων, ενώ στη δόση των $10^{-5}M$ (σχ. 4.17Δ) και ακόμα καλύτερα στη μεγαλύτερη δόση των $10^{-4}M$ (σχ. 4.17Ε) η ChAT ανοσοδραστικότητα επανήλθε κανονικά.

Εξετάζοντας, κατόπιν, τη δράση του ίδιου σωματοστατινεργικού αναλόγου ($10^{-4}M$) συγχωρηγούμενου με το AMPA (42nmol/οφθαλμό) ως προς τα bNOS αμφιβληστροειδικά κύτταρα, παρατηρήθηκε μια πλήρης επαναφορά του αριθμού των νευρώνων αυτών (σχ. 4.17ΣΤ).

4. 3. 4. Επίδραση του sst_2 εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το AMPA στα οριζόντια κύτταρα

Εκτός από τα χολινεργικά και τα κύτταρα που συνθέτουν NO, η διεγερτοτοξικότητα με AMPA επηρέασε και τα οριζόντια κύτταρα (βλ. σχ. 4.4). Το L-779,976 ($10^{-4}M$, σχ. 4.18Γ) συγχωρηγούμενο με το AMPA παρατηρήθηκε ότι επανέφερε το σήμα για calbindin σχεδόν στο 100% του σήματος του ιστού-μάρτυρα (σχ. 4.18Α). Τα οριζόντια κύτταρα, καθώς και οι GABAεργικοί αμακρινικοί νευρώνες θετικοί για calbindin φάνηκε να προστατεύονται από το sst_2 εκλεκτικό ανάλογο.

Σχήμα 17

Σχήμα 18

4. 3. 5. Επίδραση του sst_2 εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 συγχωρηγούμενου με το AMPA στην απόπτωση του αμφιβληστροειδή

Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του σωματοστατινεργικού αναλόγου στην απόπτωση που επάγεται σε καταστάσεις τοξικότητας από το AMPA, εφαρμόστηκε η τεχνική TUNEL. Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.19, η απόπτωση φαίνεται αυξημένη στον ιστό που έλαβε μόνο AMPA (σχ. 4.19B), ενώ υπάρχει σε ελάχιστο βαθμό στον ιστό που έλαβε AMPA μαζί με L-779,976 ($10^{-4}M$, σχ. 4.19Γ), σχεδόν όπως και στον ιστό-μάρτυρα (σχ. 4.19Α). Μάλιστα, η δράση του αναλόγου της σωματοστατίνης συνέβαλε στην προστασία όλων των στιβάδων του ιστού που έδειξαν προσβεβλημένες από τη δράση του διεγερτικού αμινοξέος.

4. 3. 6. Επίδραση των sst_1 (L-797,591) και sst_4 (L-803,087) εκλεκτικών αναλόγων συγχωρηγούμενων με το AMPA στα χολινεργικά κύτταρα

Από τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι η σωματοστατίνη εκδηλώνει προστατευτικές δράσεις στον αμφιβληστροειδή μέσω του sst_2 υποδοχέα της. Στα πλαίσια μελέτης της πιθανής εμπλοκής των επίσης υπαρχόντων στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου υποδοχέων sst_1 και sst_4 σε αυτή τη διαδικασία, εξετάστηκε η επαναφορά της ChAT ανοσοδραστικότητας μετά τη συγχωρήγηση (με το AMPA) των αντίστοιχων για κάθε υποδοχέα εκλεκτικών αναλόγων. Μάλιστα, τα ανάλογα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη μεγαλύτερη δόση των $10^{-4}M$ που φάνηκε να είναι η αποτελεσματικότερη για τα sst_2 ανάλογα L-779,596 και BIM23014.

Τα L-797,591 (sst_1) και L-803,087 (sst_4) συγχωρηγούμενα με το διεγερτικό αμινοξύ δεν κατάφεραν να αποτρέψουν την απώλεια της ανοσοδραστικότητας για τα χολινεργικά κύτταρα που επάγει το AMPA. Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.20, η εικόνα του ιστού με την επίδραση μόνο του διεγερτικού αμινοξέος (σχ. 4.20B) είναι ίδια με την εικόνα του ιστού που του έχει συγχωρηγηθεί επίσης το ένα ή το άλλο εκλεκτικό ανάλογο (σχ. 4.20Γ,Δ).

Σχήμα 19

Σχήμα 20

4. 3. 7. Επίδραση του sst_5 (L-817,818) εκλεκτικού αναλόγου συγχωρηγούμενου με το AMPA στην αμφιβληστροειδική τοξικότητα

Το L-817,818 (sst_5) συγχωρηγούμενο με το AMPA κατόρθωσε να προστατεύσει τουλάχιστον μερικώς τους χολινεργικούς νευρώνες, μιας και όπως φαίνεται και στις αντίστοιχες φωτογραφίες (σχ. 4.21Δ) παρατηρήθηκε κάποιο αχνό σήμα για κυτταρικά σώματα και απολήξεις των νευρώνων αυτών όταν το sst_5 ανάλογο χορηγήθηκε στα $10^{-4}M$. Αντιθέτως, στη μικρότερη χρησιμοποιούμενη δόση των $10^{-5}M$ (σχ. 4.21Γ), δεν επετεύχθη καμία προστασία.

Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και μέσω της χρώσης TUNEL (σχ. 4.22), αφού φάνηκε ότι το sst_5 ανάλογο στα $10^{-4}M$ (σχ. 4.22Γ) επέφερε εμφανώς μειωμένη, αλλά όχι μηδενική, απόπτωση στον ιστό, στις αντίστοιχες στιβάδες όπου εμφανίζεται αυξημένος κυτταρικός θάνατος με AMPA (σχ. 4.22B).

Η προστατευτική δράση της σωματοστατίνης και μέσω του sst_5 υποτύπου σε συνθήκες διεγερτοτοξικότητας χρειάστηκε επιπλέον επιβεβαίωση με τη συγχωρήγηση και ενός sst_2 εκλεκτικού ανταγωνιστή. Αυτό γιατί από τη μια δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής μελέτες σχετικά με τη λειτουργικότητα του sst_5 στον αμφιβληστροειδή και από την άλλη το L-817,818 έχει μέτρια συγγένεια και για τον sst_2 υπότυπο (Rohrer και συν., 1998), έτσι ώστε το L-817,818 στη μεγάλη δόση των $10^{-4}M$ να μπορεί να υποτεθεί ότι ίσως δρα και μέσω του sst_2 υποτύπου και τελικά το παρατηρούμενο αποτέλεσμα να οφείλεται στον sst_2 . Το L-817,818 συγχωρηγούμενο με τον sst_2 ανταγωνιστή CYN-154806 (σχ. 4.23Δ) δεν έδειξε να δίνει διαφορετικό αποτέλεσμα από ότι το sst_5 ανάλογο μόνο του (σχ. 4.23Γ).

Σχήμα 21

Σχήμα 22

Σχήμα 23

4. 3. 8. Επίδραση του $ss2_2$ εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 χορηγούμενου ΜΕΤΑ την έγχυση του διεγερτικού AMPA

Στα πλαίσια πιλοτικής μελέτης της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης, χορηγούμενης μετά την πρόκληση διεγερτοτοξικότητας, γεγονός που πλησιάζει περισσότερο πραγματικές κλινικές καταστάσεις και τη θεραπευτική τους προσέγγιση, δημιουργήθηκαν διαφορετικές ομάδες ζώων στα οποία χορηγήθηκε το L-779,976 ($10^{-4}M$) 1, 2, 4 ή 8 ημέρες μετά την έγχυση του AMPA (42nmol). Οι ιστοί από κάθε ομάδα ζώων απομονώθηκαν μία μέρα μετά την τελευταία έγχυση. Το αποτέλεσμα σε αυτά τα χρονικά διαστήματα ήταν παρόμοιο, διότι όπως φαίνεται και στο σχ. 4.24 το $ss2_2$ ανάλογο προσέφερε μια μερική προστασία, συγκριτικά με την πολύ καλή προστασία που έδωσε με τη συγχρήγηση με το AMPA (βλ. σχ. 4.17). Συγκεκριμένα, ενώ οι απολήξεις των χολινεργικών νευρώνων του ιστού απουσίαζαν, κάποια από τα σώματά τους άρχισαν να εμφανίζονται (βέλη σχ. 4.24Γ-ΣΤ).

Επίσης, στην προσπάθεια ανίχνευσης νευροπροστασίας στα πλαίσια κάποιας «χρόνιας» χορήγησης του σωματοστατινεργικού αναλόγου μετά την πρόκληση τοξικότητας, πραγματοποιήθηκαν διπλές εγχύσεις του L-779,976 ($10^{-4}M$), 24 και 48 ώρες, μετά την έγχυση του AMPA και απομόνωση των ιστών για ανοσοϊστοχημεία μία μέρα μετά την τελευταία έγχυση. Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.25, και πάλι το L-779,976 κατάφερε να προσφέρει μια μερική προστασία σε κάπως όμως μεγαλύτερο βαθμό από ότι με τη μία μόνο χορήγηση του 24 ώρες μετά (βλ. σχ. 4.24Γ), μιας και εμφανίστηκαν περισσότερα σώματα χολινεργικών νευρώνων.

Βασικό συμπέρασμα και παράλληλα σημαντικό εύρημα αυτής της ενότητας της διατριβής είναι ότι για πρώτη φορά ενδοφθάλμια χορηγούμενα, εν μέρει η ίδια η σωματοστατίνη, αλλά κυρίως σωματοστατινεργικά ανάλογα για τους $ss2_2$ και $ss5_5$ υπότυπους μπορούν να προσφέρουν πολύ καλή νευροπροστασία, όπως φάνηκε από την απόκριση των νευρώνων (χολινεργικοί, bNOS και οριζόντιοι) που προσβάλλονται από το AMPA, καθώς και από τα επίπεδα εμφάνισης του κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης).

Σχήμα 24

Σχήμα 25

ΕΝΟΤΗΤΑ 4η

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ
ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι κύριοι παίκτες στον προκαλούμενο από την ισχαιμία κυτταρικό θάνατο είναι το γλουταμινικό οξύ και τα ενδοκυττάρια ιόντα ασβεστίου (Osborne και συν., 2004). Παλιότερες μελέτες υποστηρίζουν το ρυθμιστικό ρόλο της SRIF στη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Reisine, 1990, Tallent και συν., 1996) και των ιοντικών ρευμάτων ασβεστίου σε καλλιεργούμενους νευρώνες του ακτινωτού γαγγλίου. Στην τελευταία μελέτη η αναστολή των ρευμάτων ασβεστίου διεκπεραιώθηκε μέσω μιας πρωτεϊνικής κινάσης εξαρτώμενης από το cGMP (Meriney και συν., 1994). Μετέπειτα μελέτες υποστήριξαν ότι η SRIF και sst_2 ανάλογα προστάτευσαν από NMDA τοξικότητα καλλιέργειες νευρώνων του φλοιού του εγκεφάλου μέσω ενός cGMP-εξαρτώμενου ενδοκυτταρικού μηχανισμού (Forloni και συν., 1997).

Το cGMP είναι πλέον γνωστό δευτερογενές αγγελιοφόρο μόριο με σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο ειδικότερα σε σχέση με το κλείσιμο μεμβρανικών καναλιών ιόντων, π.χ. Ca^{2+} . Η σύνθεση αυτού του μορίου από GTP καταλύεται από το ένζυμο γουανυλική κυκλάση (διαλυτή μορφή), η οποία ενεργοποιείται από το μονοξείδιο του αζώου (NO).

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή αρουραίου έδειξαν ότι η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα του NO (Vasilaki και συν., 2002) και του cGMP (Mastrodimitou και συν., 2006) μέσω του sst_2 υπότυπου. Επίσης, πρόσφατη μελέτη της Mastrodimitou και συν. (2008) απέδειξε την εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού NO/cGMP στις νευροπροστατευτικές δράσεις της SRIF σε *in vitro* προκαλούμενη αμφιβληστροειδική ισχαιμία στον αρουραίο (μοντέλο χημικής υποξίας-υπογλυκαιμίας).

Έχοντας υπόψη τα προαναφερόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη της συμμετοχής των NO/cGMP στις προστατευτικές δράσεις της SRIF ενάντια στην AMPA τοξικότητα.

4. 4. 1. Εμπλοκή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης

Στα πλαίσια διαλεύκανσης της εμπλοκής του μονοξειδίου του αζώτου στο μηχανιστικό μονοπάτι της προστατευτικής δράσης της σωματοστατινης στο in vivo μοντέλο της διεγερτοτοξικότητας μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής της συνθάσης του NO και της επακόλουθης σύνθεσης του NO στην sst_2 -εξαρτώμενη προστασία. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις με AMPA (42nmol) μαζί με το σωματοστατινεργικό ανάλογο είτε $sst_{2/5}$ (BIM23014, $10^{-4}M$) είτε sst_2 (L-779,976, $10^{-4}M$) και το μη εκλεκτικό αναστολέα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου L-NAME (3 ή 30nmol/ οφθαλμό).

Όπως φαίνεται και στα σχ. 4.26, 4.27, η προστατευτική δράση του σωματοστατινεργικού αναλόγου ανεστάλη παρουσία του L-NAME. Ειδικότερα, η προστασία που προσέφερε το L-779,976 ($10^{-4}M$, σχ. 4.26Γ) φάνηκε να αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό από το L-NAME (3nmol), αφού μόνο οι χολινεργικές απολήξεις και ελάχιστα σώματα χολινεργικών κυττάρων παρατηρήθηκαν (σχ. 4.26Δ).

Η προστασία που προσέφερε το BIM23014 ($10^{-4}M$, σχ. 4.27Γ) φάνηκε να μην επηρεάζεται το ίδιο εύκολα με αυτήν του L-779,976 ($10^{-4}M$, σχ. 4.26Γ). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση στο σήμα για ChAT, αφού παρουσία 3nmol L-NAME (σχ. 4.27Δ) ήταν αρκετά εμφανείς οι χολινεργικές απολήξεις καθώς και κάποια χολινεργικά σώματα, ενώ παρουσία 10πλάσιας συγκέντρωσης του αναστολέα της NOS (σχ. 4.27E) φαινόταν μόνο ελάχιστα σώματα χολινεργικών νευρώνων σε όλο τον ιστό.

Η επίδραση του L-NAME στις δράσεις του BIM23014 έδειξε να επιβεβαιώνεται και από τη χρώση TUNEL (σχ. 4.28), κατά την οποία παρουσία του L-NAME στα 3nmol η απόπτωση φάνηκε να είναι σε ένα επίπεδο μεταξύ της παρατηρούμενης απόπτωσης μόνο με AMPA (σχ. 4.28B) και αυτής με AMPA και BIM23014 (σχ. 4.28Γ), ενώ παρουσία του L-NAME στα 30nmol η απόπτωση στον ιστό έφτασε να είναι μεγαλύτερη από αυτήν που προκάλεσε το διεγερτικό αμινοξύ από μόνο του (σχ. 4.28E).

Σχήμα 26

Σχήμα 27

Σχήμα 28

4. 4. 2. Εμπλοκή του cGMP στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενοχοποιούν τη σηματοδότηση μέσω NO/cGMP στο μηχανισμό δράσης της σωματοστατίνης. Προκειμένου για την επιβεβαίωση της άμεσης συμμετοχής του cGMP στη νευροπροστασία, ακολουθήθηκε η ιδέα της αναστολής της γουανυλικής κυκλάσης και, κατά συνέπεια, η αναστολή της σύνθεσης του cGMP. Γι αυτό πραγματοποιήθηκαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις με AMPA (42nmol), BIM23014 (10^{-4} M) και τον αναστολέα της γουανυλικής κυκλάσης ODQ (0.1, 1 ή 10nmol/ οφθαλμό) και μελετήθηκαν η ανοσοδραστικότητα για ChAT και bNOS.

Η ανοσοϊστοχημεία για ChAT έδειξε ότι το ODQ (σχ. 4.29) μείωσε τη δράση του BIM23014 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Στη δόση του 1nmol επιτύχθει η μεγαλύτερη μείωση στη δράση του σωματοστατινεργικού αναλόγου, αφού οι χολινεργικές απολήξεις δεν ήταν ορατές και κάποια μόνο χολινεργικά σώματα παρατηρήθηκαν (σχ. 4.29E). Ωστόσο, με τη μικρότερη (0.1nmol, σχ. 4.29Δ) και τη μεγαλύτερη δόση (10nmol, σχ. 4.29ΣΤ) του ODQ το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο, αλλά σίγουρα ενδεικτικό της μείωσης της δράσης του BIM23014.

Η ανοσοϊστοχημεία για bNOS έδειξε ότι, παρουσία όλο και πιο μεγάλης δόσης ODQ ο αριθμός των κυττάρων που συνθέτουν NO μειώθηκε σταδιακά (σχ. 4.30), με αποτέλεσμα να φτάσει σε επίπεδα ακόμα χαμηλότερα από αυτά παρουσία του AMPA.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγχορήγησης AMPA και ενός αναλόγου του cGMP (8-Bromo-cGMP, 0.5, 1, 10mM), με σκοπό να ενισχυθεί η υπόθεση της εμπλοκής του cGMP στη νευροπροστασία από τη διεγερτοτοξικότητα. Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.31Γ-E, τα χολινεργικά κύτταρα έδειξαν να έχουν προστατευτεί από το 8-Bromo-cGMP και, ιδιαίτερα, στη μεσαία χρησιμοποιούμενη δόση του αναλόγου (1mM). Αυτό σημαίνει ότι το αγγελιοφόρο μόριο cGMP έχει θετικές δράσεις, τέτοιες που μπορούν να εμπλακούν στις προστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης έναντι της τοξικότητας.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα σε σχέση με το μηχανισμό νευροπροστασίας της σωματοστατίνης στη διεγερτοτοξικότητα του αμφιβληστροειδή του αρουραίου ενισχύουν την υπόθεση ότι η SRIF ενεργοποιώντας τους sst_2 υποδοχείς λειτουργεί μέσω του ενδοκυτταρικού μονοπατιού NOS – NO - sGC – cGMP και παρέχει προστασία έναντι της διεγερτοτοξικότητας.

Σχήμα 29

Σχήμα 30

Σχήμα 31

4. 4. 3. Μελέτη της μεταβολής των επιπέδων απελευθέρωσης γλουταμινικού οξέος

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, το γλουταμινικό οξύ αποτελεί κύριο παίκτη στην εξέλιξη του φαινομένου διεγερτοτοξικότητα. Η ενεργοποίηση του sst_2 υποδοχέα σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή ποντικού οδήγησε σε αναστολή της K^+ -επαγόμενης απελευθέρωσης γλουταμινικού (Dal Monte και συν., 2003b). Επομένως, κρίθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί η εμπλοκή της σωματοστατίνης στη μείωση των επιπέδων του γλουταμινικού ως πιθανός μηχανισμός προστασίας των νευρώνων του αμφιβληστροειδή στις τοξικές συνθήκες.

Με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος ανάμεσα στις ομάδες ζώων που έλαβαν είτε PBS (control), είτε AMPA (42nmol), είτε AMPA (42nmol) και L-779,976 ($10^{-4}M$) (σχ. 4.32).

4. 4. 4. Συνεντοπισμός του υποδοχέα sst_2 με ChAT

Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί αν ο sst_2 υπότυπος του υποδοχέα της σωματοστατίνης εντοπίζεται σε χολινεργικούς νευρώνες. Για το λόγο αυτό χρειάστηκε να εξεταστεί εάν ισχύει ο συνεντοπισμός sst_2 και ChAT, ώστε να δικαιολογηθεί μια άμεση ίσως εμπλοκή της σωματοστατίνης στην προστασία των χολινεργικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή. Όπως φαίνεται και στο σχ. 4.33 (Α-Γ, βλ. μικρά βέλη), ο sst_2 πράγματι εντοπίζεται μόνο στα σώματα των χολινεργικών νευρώνων του ιστού. Στις χολινεργικές απολήξεις συνεντοπισμός sst_2 και ChAT δεν παρατηρήθηκε.

Σχήμα 32

Σχήμα 33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής στόχος ήταν η εξέταση της προστατευτικής δράσης του νευροπεπτιδίου σωματοστατίνη ή εκλεκτικών αναλόγων της σε *in vivo* μοντέλο αμφιβληστροειδοπαθειών, καθώς και η διαλεύκανση του μηχανισμού αυτής της δράσης. Το κυριότερο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι η σωματοστατίνη και εκλεκτικά για τους sst_2 και sst_5 ανάλογα, ενδοφθάλμια χορηγούμενα, παρέχουν νευροπροστασία σε καταστάσεις διεγερτοτοξικότητας του αμφιβληστροειδή του αρουραίου. Μάλιστα, η ευεργετική αυτή δράση προς τους νευρώνες του ιστού φαίνεται να μεσολαβείται από τα σηματοδοτικά μόρια μονοξειδίου του αζώτου και cGMP.

Πρώτο βήμα στην επίτευξη του παραπάνω στόχου ήταν η δημιουργία του *in vivo* πειραματικού μοντέλου αμφιβληστροειδοπαθειών, το οποίο βασίστηκε στην ενδοφθάλμια χορήγηση του διεγερτικού αμινοξέος AMPA. Μέχρι σήμερα, μόνο οι Andrés N και συν. (2003) έχουν χρησιμοποιήσει σε ζώα την ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA για την πρόκληση διαφορετικού μεγέθους διεγερτοτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή και την ταυτόχρονη εξέταση αλλαγών σε επίπεδο συγκεκριμένων νευρώνων και γλοιακών κυττάρων, καθώς και γενικά αλλαγών στην ομοιόσταση του Ca^{2+} . Στην προκειμένη περίπτωση, στα πλαίσια αρχικά μιας αναγκαίας πιλοτικής μελέτης εξετάστηκαν οι συνέπειες της δράσης του AMPA, ώστε στη συνέχεια να εφαρμοστεί μια ορισμένη δόση που μέσα σε ορισμένο χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση να δίνει ικανοποιητικό βαθμό τοξικότητας.

Η κυριότερη λοιπόν συνέπεια της ενδοβολβικής χορήγησης του AMPA (42nmol/οφθαλμός) μέσα στο πρώτο 24ωρο είναι η 100% απώλεια των χολινεργικών κυττάρων και η περίπου 80% απώλεια των κυττάρων που εκφράζουν τη συνθάση του NO, ενώ παράλληλα είναι αρκετά αυξημένη η απόπτωση σε όλες σχεδόν τις στιβάδες του ιστού. Μέχρι και την ολοκλήρωση ενός μήνα μετά τη χορήγηση, η απώλεια των χολινεργικών κυττάρων διατηρείται, αλλά τα κύτταρα που εκφράζουν τη NOS φαίνονται να ανακάμπτουν από την 8^η ημέρα και μετά. Επίσης, μετά την πρώτη ημέρα από τη χορήγηση του AMPA μειωμένο φαίνεται να είναι και το σήμα για τα κύτταρα που εκφράζουν calbindin που είναι δείκτης για τα οριζόντια κύτταρα, ενώ εκφράζεται και από GABAεργικά αμακρινικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή. Όσον αφορά στην ανοσοδραστικότητα δεικτών για άλλους κυτταρικούς τύπους στον ιστό, π.χ. φωτοϋποδοχείς, δίπολα κύτταρα συνδεδεμένα είτε με ραβδία είτε με κωνία,

ντοπαμινεργικά αμακρινικά και γαγγλιακά κύτταρα, αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το AMPA (στην ίδια δόση και στο ίδιο χρονικό διάστημα).

Γενικά, το γλουταμινικό οξύ, καθώς απελευθερώνεται από τους φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα, δεσμεύεται και ενεργοποιεί τους ιονοτροπικούς και μεταβολοτροπικούς υποδοχείς του πάνω σε διαφορετικούς αμφιβληστροειδικούς νευρώνες (Brandstätter και συν., 1998, Massey & Miller, 1988, Yang, 2004). Οι παραπάνω παρατηρήσεις μπορούν να αιτιολογηθούν με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης που έχουν εντοπίσει την έκφραση του AMPA υποδοχέα και των διαφορετικών υπομονάδων του στους διάφορους νευρώνες του αμφιβληστροειδή (Brandstätter και συν., 1998, Yang, 2004, Jakobs και συν., 2007). Μάλιστα, είναι γνωστό ότι οι AMPA υποδοχείς που στερούνται της GluR2 υπομονάδας έχουν αυξημένη διαπερατότητα στα ιόντα Ca^{2+} κι, επομένως, καθιστούν τους αντίστοιχους νευρώνες πιο ευάλωτους στην παρουσία περίσσειας γλουταμινικού στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Liu & Zukin, 2007, Lu και συν., 1996, Geiger και συν., 1995).

Σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα, η ανοσοδραστικότητα για την ακετυλοτρανφεράση της χολίνης (ChAT) έχει δειχθεί ότι εξαφανίζεται μετά από ενδοφθάλμια ένεση καϊνικού (Osborne και συν., 1995) και κισκαλικού οξέος (Fischer και συν., 1998) που συνιστούν αγωνιστές μη-NMDA υποδοχέων. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι με πειράματα διπλής σήμανσης, η ομάδα της Gründer (2000) εντόπισε όλες τις υπομονάδες του AMPA υποδοχέα σε χολινεργικούς αμακρινικούς νευρώνες στον αρουραίο. Εξάλλου, η παρουσία και λειτουργία των AMPA υποδοχέων στα χολινεργικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή έχει αποδειχθεί και με μελέτες απελευθέρωσης. Για παράδειγμα, το επιλεκτικό μπλοκάρισμα των AMPA υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή του κουνελιού ανέστειλε την αύξηση που προκαλούσε το φως στην απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης, ενώ οι υπομονάδες GluR2/3 και GluR4 εντοπίστηκαν σε χολινεργικές απολήξεις (Firth και συν., 2003). Ωστόσο, στη μελέτη των Osborne και συν. (1995) προτείνεται ότι η δραστική μείωση της ChAT ανοσοδραστικότητας οφείλεται στην υπερδιέγερση των υποδοχέων καϊνικού και τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενζύμου. Κάτι τέτοιο ίσως ευθύνεται και για το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης.

Όσον αφορά στην επιρροή πάνω στα αμακρινικά bNOS κύτταρα, δεν υπάρχει μέχρι στιγμής οποιοδήποτε ανοσοϊστοχημικό δεδομένο που να επιβεβαιώνει ότι στα κύτταρα αυτά του αμφιβληστροειδή υπάρχουν AMPA υποδοχείς ώστε να δικαιολογηθεί άμεσα το παρατηρούμενο αποτέλεσμα. Πάντως, NMDA και υποδοχείς καϊνικού έχουν συνεντοπιστεί με NADPH-διαφοράση, το δείκτη για την ύπαρξη της NOS, στα εν λόγω αμακρινικά κύτταρα του κουνελιού (Sagar SM, 1990). Επίσης, στον αμφιβληστροειδή της χελώνας αναστολείς της NOS ανταγωνίστηκαν την επαγόμενη από το καϊνικό οξύ αύξηση της ανοσοδραστικότητας της cGMP, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων καϊνικού επάγει την παραγωγή του NO στους αντίστοιχους νευρώνες (Blute TA και συν., 1998). Και στα δύο προηγούμενα παραδείγματα, η δράση του καϊνικού που είναι αγωνιστής και για τους AMPA υποδοχείς έμμεσα υποστηρίζει, στην παρούσα μελέτη, την ύπαρξη των AMPA υποδοχέων στα bNOS κύτταρα και τη συμμετοχή αυτών στην παρατηρούμενη απώλεια τουλάχιστον σε πρώιμο στάδιο μετά τη χορήγηση του διεγερτικού.

Σε μια άλλη εκτεταμένη ανοσοκυτταροχημική μελέτη, των Dijk και Kamphuis (2004), εξετάστηκαν οι επιδράσεις της αύξησης για 60min της ενδοφθάλμιας πίεσης, στην περίοδο της επαναιμάτωσης (reperfusion period), στους διαφορετικούς υπότυπους των αμακρινικών νευρώνων. Παρατηρήθηκε μείωση της ανοσοδραστικότητας για Glyt1 (γλυκινεργικά κύτταρα), ουσία P (υποπληθυσμός GABAεργικών κυττάρων) και CR (υποπληθυσμός χολινεργικών κυττάρων) στις 2 πρώτες ώρες μετά την πρόκληση ισχαιμίας, ενώ η ανοσοδραστικότητα αυτή επανήλθε μέχρι το κλείσιμο του πρώτου 12ωρου. Ωστόσο, η ανοσοκυτταροχημική έκφραση της ChAT είχε μειωθεί από τις πρώτες ώρες και παρέμεινε σχεδόν μηδενική μέχρι και 4 εβδομάδες μετά την αύξηση της πίεσης.

Συνεπώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προαναφερόμενης και της παρούσας μελέτης, μετά την πρόκληση ισχαιμίας ή τοξικότητας με το διεγερτικό αμινοξύ AMPA παρατηρούνται διαφορετικού μεγέθους αλλαγές στα βραχύινα κύτταρα του αμφιβληστροειδή. Το γεγονός της προσωρινής απώλειας ανοσοδραστικότητας μπορεί να οφείλεται σε αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης των αντίστοιχων κυτταρικών δεικτών και σε επακόλουθη ανάκαμψη της, ενώ για την απώλεια της ChAT ανοσοδραστικότητας ίσως ευθύνεται η ενεργοποίηση πρωτεασών (π.χ. αποπτωτικών κασπασών) με πιο μακροπρόθεσμα αποτελέσματα (Dijk &

Kamphuis, 2004). Μάλιστα, έχει ήδη δειχθεί η ενεργοποίηση διαφορετικών κασπασών, κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης μετά από αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης, ανάλογα με τον νευρωνικό φαινότυπο, με τις κασπάσες 2 και 3 να δρουν παράλληλα σε αμακρινικά κύτταρα (Singh και συν., 2001).

Η τοξική επίδραση πάνω στα οριζόντια κύτταρα του αμφιβληστροειδή ήταν σε μεγάλο βαθμό αναμενόμενη, μιας και όπως έχει ήδη αναφερθεί στην "εισαγωγή" τα κύτταρα αυτά είναι πλούσια σε AMPA υποδοχείς. Στον αρουραίο, τη γάτα, το χρυσόψαρο και τον πίθηκο έχει παρατηρηθεί ισχυρή ανοσοϊστοχημική χρώση για τις υπομονάδες GluR2/3 και GluR4 στα σώματα και τους δενδρίτες των οριζόντιων κυττάρων (Yang, 2004). Επιπλέον, ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έρχονται να συνηγορήσουν στο ότι τα οριζόντια κύτταρα ρυθμίζουν τη μεταβίβαση του οπτικού σήματος από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα κύτταρα σχεδόν αποκλειστικά μέσω AMPA υποδοχέων. Σε απομονωμένο αμφιβληστροειδή σαλαμάνδρας βρέθηκε ότι μόνο τα AMPA και καϊνικό οξύ (KA) μπορούν και εκπολώνουν, αλλά και καταργούν τις αποκρίσεις στο φως αυτών των κυττάρων (Yang & Wu, 1991). Ακόμη, με τη χρήση τεχνικών 'patch-clamp', απομονωμένα οριζόντια κύτταρα φάνηκαν να απευαισθητοποιούνται παρουσία AMPA και KA, ενώ παρουσία ανταγωνιστών για τους AMPA υποδοχείς μπλοκάρονται εντελώς τα ρεύματα ιόντων που επάγει το γλουταμινικό (Yang, 2004).

Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη η ανοσοδραστικότητα για τους δείκτες των φωτοϋποδοχέων, των δίπολων κυττάρων που συνδέονται είτε με ραδιοφόρα είτε με κωνιοφόρα κύτταρα, καθώς και των γαγγλιακών κυττάρων και αξόνων τους δεν επηρεάζεται από το AMPA είναι ίσως σχετικά αναμενόμενο και πιθανόν δικαιολογείται από την απουσία ή τα χαμηλά επίπεδα ή το είδος των υπομονάδων που συνθέτουν τον AMPA υποδοχέα στις θέσεις αυτές. Ως γνωστόν, η υπομονάδα GluR2 καθιστά τον υποδοχέα αδιαπέραστο στα ιόντα ασβεστίου κι επομένως κατά κάποιο τρόπο προστατεύει το νευρώνα, όπου βρίσκεται, από την περίσσεια γλουταμινικού οξέος ή AMPA στην προκειμένη περίπτωση. Παρομοίως, στη μελέτη τους οι Fischer και συν. (1998) διαπίστωσαν ότι το κισκαλικό οξύ ενδοφθάλμια χορηγούμενο σε κοτόπουλο δεν επηρέασε κανένα τύπο κυττάρων, εκτός από τα TH-εκφραζόμενα (ντοπαμινεργικά) κύτταρα, στο κεντρικό τμήμα του ιστού, που εμφάνισαν μικρή απώλεια.

Σύμφωνα με ανοσοκυτταροχημικές μελέτες (Gründer και συν., 2000, Dijk & Kamphuis, 2004), όπου χρησιμοποιήθηκαν ειδικά για κάθε υπομονάδα του AMPA υποδοχέα αντισώματα και σκοπός ήταν η μελέτη της κατανομής και ρύθμισης του υποδοχέα στη διάρκεια της ανάπτυξης μέχρι και την ενηλικίωση και η μελέτη των αλλαγών που επέφερε η ισχαιμία λόγω αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης στο πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων του υποδοχέα, αντίστοιχα, η κατανομή της ανοσοδραστικότητας των διαφόρων υπομονάδων (GluR1-GluR4) στον αμφιβληστροειδή του φυσιολογικού ενήλικου αρουραίου έχει αναλυτικά ως εξής:

(i) η GluR1 υπομονάδα εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό έντονο στρωματοποιημένο πρότυπο έκφρασης στην έσω δικτυωτή στιβάδα (IPL), ασθενή χρώση σε μικρό αριθμό κυτταρικών σωμάτων στην έσω πυρηνική στιβάδα (INL) και ισχυρή χρώση σε υποομάδα των γαγγλιακών κυττάρων, ενώ στην έξω δικτυωτή στιβάδα (OPL) το σήμα γι' αυτήν την υπομονάδα είναι σαν ασθενή μικρά στίγματα.

(ii) οι GluR2 και GluR3 υπομονάδες εμφανίζουν πολύ παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στον αμφιβληστροειδή, ενώ η GluR2 είναι επικρατέστερη της GluR3 στον αρουραίο. Οι υπομονάδες, λοιπόν, αυτές εμφανίζουν ισχυρή σήμανση με τη μορφή στιγμάτων στην OPL, έντονη και ομοιόμορφα κατανεμημένη σήμανση στην IPL, ενώ σε όλη την INL παρατηρούνται και βαμμένα κυτταρικά σώματα. Επίσης, στα περισσότερα σώματα γαγγλιακών νευρώνων παρατηρείται χρώση διαφορετικής έντασης.

(iii) Όσον αφορά στο πρότυπο έκφρασης της GluR4 υπομονάδας, οι δύο παραπάνω μελέτες συμφωνούν στο ότι το σήμα για την υπομονάδα αυτή εντοπίζεται έντονο στην OPL, όπου μάλιστα παρατηρούνται 'βαμμένα' οριζόντια κύτταρα (Gründer και συν., 2000). Επίσης, χρώση για την GluR4 εμφανίζεται και στην IPL, καθώς και στα περισσότερα γαγγλιακά αλλά και υποπληθυσμούς αμακρινικών κυττάρων κατά την Gründer και συν. (2000).

Επισημαίνεται ότι παρόλο που ορισμένες από τις υπομονάδες του AMPA υποδοχέα έχουν εντοπιστεί σε σώματα συγκεκριμένων νευρώνων (π.χ. γαγγλιακά για τις GluR2/3 ή GluR4), γενικά δεν είναι γνωστή η ταυτότητα των κυττάρων στις στιβάδες (OPL, IPL, INL) που ήδη αναφέρθηκε ότι παρατηρείται έκφραση των διαφόρων υπομονάδων. Επίσης, δεν είναι γνωστό το είδος των υπομονάδων που συνθέτουν τους AMPA υποδοχείς στις διάφορες θέσεις (κυτταρικά σώματα ή απολήξεις) στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τις παραπάνω πληροφορίες από τη βιβλιογραφία (βλ. και "εισαγωγή"), τα κύτταρα που αναμένεται κυρίως να έχουν προσβληθεί στο παρόν *in vivo* μοντέλο είναι αμακρινικά, π.χ. χολινεργικά, καθώς και οριζόντια και γαγγλιακά. Από την άλλη, στα δίπολα κύτταρα που εκφράζουν την PKC (ON και OFF δίπολα που συνδέονται με ραδιοφόρους φωτοϋποδοχείς) εντοπίστηκε η GluR2 στον αρουραίο (Kamphuis W και συν., 2003), ενώ παράλληλα θεωρείται ότι τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούν κυρίως μεταβολοτροπικούς υποδοχείς γλουταμινικού για την ενεργοποίησή τους και συνεπώς μια σηματοδότηση μέσω cGMP (Shiells & Falk, 1992, de la Villa και συν., 1995), ενδείξεις οι οποίες μπορούν να αιτιολογήσουν την ακεραιότητα των PKC νευρώνων στην παρούσα μελέτη, ενώ με τη μέθοδο της RT-PCR έχει δείχθει η έκφραση των GluR1/GluR2 στα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με ραβδία ή κωνία (Jakobs και συν., 2007). Επίσης, η έκφραση σε επίπεδο mRNA για καμία από τις παραπάνω υπομονάδες δεν βρέθηκε στους φωτοϋποδοχείς (Jakobs και συν., 2007), οπότε η παρουσία του AMPA στον ιστό δεν θα ἔπρεπε να επηρεάσει τους νευρώνες αυτούς. Πιστεύεται, τέλος, ότι τα γαγγλιακά κύτταρα λόγω του μεγάλου κυτταροπλασματικού όγκου τους κατορθώνουν και ισοσταθμίζουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} , ενώ ταυτόχρονα είναι προσαρμοσμένα να αντιμετωπίζουν μεγάλα ιοντικά ρεύματα ή απλά μπορεί τασσο-ελεγχόμενα κανάλια ασβεστίου να απουσιάζουν από τα σώματά τους· πράγμα που τα καθιστά λιγότερο ευάλωτα σε συνθήκες διεγερτοτοξικότητας (Fischer και συν., 1998). Αυτό ίσως αποτελεί καλή εξήγηση του τι συμβαίνει και στο παρόν μοντέλο διεγερτοτοξικότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προαναφερθέντα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με τις αλλαγές στους δείκτες που χαρακτηρίζουν τους διάφορους τύπους ή ομάδες κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, θα ήταν ίσως μεγαλύτερη η πιθανότητα να παρατηρηθεί μέσω της χρώσης TUNEL απόπτωση σε πολύ μικρότερο βαθμό από ότι τελικά φάνηκε στην πραγματικότητα, δηλαδή σε όλες τις στιβάδες του αμφιβληστροειδή. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχουν AMPA υποδοχείς και σε άλλες θέσεις από όσες μέχρι τώρα είναι γνωστές ή ότι η υπερενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων στα γνωστά σημεία του ιστού προξενεί την ενεργοποίηση κασπασών και σε άλλους νευρώνες (Tezel & Wax, 1999, Katai & Yoshimura, 1999). Το γεγονός ότι η σήμανση TUNEL δε συμβαδίζει με την ανοσοδραστικότητα των κυτταρικών δεικτών έχει παρατηρηθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες που

ασχολούνται με τη διερεύνηση των φαινομένων ισχαιμία και διεγερτοτοξικότητα στον αμφιβληστροειδή.

Για παράδειγμα, στο ποντίκι η εφαρμογή ενός *in vitro* μοντέλου χημικής ισχαιμίας (ιωδοοξικό οξύ και υποξία) είχε ως αποτέλεσμα τη σήμανση TUNEL στις ONL, INL, και GCL μετά την έκθεση του ιστού στις ισχαιμικές συνθήκες για 1 μόλις ώρα, τη στιγμή που κυτταρικοί δείκτες όπως η αρρεστίνη (για τους κωνιοφόρους φωτοϋποδοχείς) δεν επηρεάστηκαν ακόμα και μετά από 6ωρη ισχαιμία και γενικά οι διάφοροι τύποι κυττάρων προσβλήθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης στο ισχαιμικό περιβάλλον (Catalani και συν., 2007). Στην ίδια μελέτη, μάλιστα, το σήμα για ChAT και Calbindin φάνηκε να εξαλείφεται αμέσως μετά τη μια ώρα ισχαιμίας, ενώ η χρώση TUNEL σταδιακά αυξανόταν με το χρόνο της ισχαιμικής επώασης. Επίσης, στον αρουραίο με την εφαρμογή παρόμοιου *in vitro* μοντέλου χημικής ισχαιμίας (ιωδοοξικό οξύ, κυανιούχο νάτριο), ενώ η χρώση TUNEL εντοπίστηκε κυρίως στις ONL και INL, παρατηρήθηκε ότι είχαν προσβληθεί τα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία, τα χολινεργικά, τα ντοπαμινεργικά και τα αμακρινικά κύτταρα που εκφράζουν τη bNOS (Mastrodimou και συν., 2005). Επιπλέον, στη μελέτη των Fischer και συν. (1998) στο κοτόπουλο, μετά από επώαση του αμφιβληστροειδή με NMDA, παρατηρήθηκε θραυσμάτωση του DNA στα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία, στα οποία όμως η ανοσοδραστικότητα για PKC ανιχνεύθηκε κανονικά. Έτσι, προτάθηκε ότι κάποια κύτταρα που προσβάλλονται από NMDA ή κισκαλικό οξύ (QA) και φαίνεται να έχουν βλάβες στη χρωματίνη τους ίσως δεν πεθαίνουν τελικά λόγω απόπτωσης, γιατί είτε το DNA τους δεν έχει υποστεί σοβαρή και αρκετή ζημιά για αποπτωτικό θάνατο είτε τελικά η όποια μικρή βλάβη επιδιορθώνεται και μπορούν να επιβιώσουν.

Τα μέχρι τώρα αναφερόμενα αποτελέσματα συμβάλλουν στο γεγονός ότι η ενδοβολβική έγχυση στον αρουραίο 42nmol του διεγερτικού αμινοξέος AMPA μέσα στις πρώτες 24 ώρες προκαλεί τέτοιες συνέπειες σε επίπεδο απώλειας αμφιβληστροειδικών νευρώνων, ώστε να συντελέσει στη δημιουργία ενός καλού *in vivo* μοντέλου για αμφιβληστροειδοπάθειες, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης διαφόρων παραγόντων, εν προκειμένω της σωματοστατίνης, ενάντια στη διεγερτοτοξικότητα που αποτελεί τη βάση για πολλές ισχαιμικές οφθαλμικές παθήσεις. Προηγουμένως, απαιτούνταν να

εξεταστεί εάν τα επίπεδα έκφρασης της σωματοστατίνης και κυρίως των υποδοχέων της στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου αλλάζουν με την παρουσία και δράση του AMPA.

Με τις μελέτες ανοσοϊστοχημείας και ραδιοανοσολογίας που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ιστών που δέχτηκαν ενδοβολβικές εγχύσεις PBS (για τους ιστούς-μάρτυρες) ή AMPA, φάνηκε ότι τα σωματοστατινεργικά (αμακρινικά ή μετατοπισμένα αμακρινικά) κύτταρα δεν προσβάλλονται, καθώς επίσης ότι τα επίπεδα απελευθέρωσης της σωματοστατίνης (SRIF) από τις δύο ομάδες ιστών δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Πιθανόν, οι αμακρινικοί νευρώνες του αμφιβληστροειδή που συνθέτουν και περιέχουν σωματοστατίνη δεν έχουν AMPA υποδοχείς κι έτσι δεν μπορούν να επηρεαστούν άμεσα από το διεγερτικό μόριο. Σημαντικότερο καθίσταται το αποτέλεσμα ότι τα επίπεδα της απελευθερωμένης σωματοστατίνης παρουσία του AMPA ενώ εμφάνισαν μια ελαφρώς πτωτική τάση δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά από τα φυσιολογικά.

Προκειμένου να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων της σωματοστατίνης (sst_1 , sst_2 , sst_4 , sst_5 στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου) και να συγκριθούν μεταξύ ιστών-μαρτύρων και ιστών που υπέστησαν την επίδραση του AMPA, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοϊστοχημείας και/ή ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για την ανίχνευση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Αρχικά, η έκφραση της επικρατέστερης ισομορφής του sst_2 υπότυπου στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου, sst_{2A} (Thermos, 2003), μέσω της οποίας η SRIF εκτελεί τις κυριότερες δράσεις της (Olias και συν., 2004), έδειξε να μην επηρεάζεται από τις συνθήκες διεγερτοτοξικότητας γεγονός που ενθαρρύνει την περαιτέρω εξέταση της δράσης του νευροπεπτιδίου στις συνθήκες αυτές. Συγκεκριμένα, η έκφραση της sst_{2A} ισομορφής εντοπίστηκε ανοσοϊστοχημικά, και στις δύο ομάδες ιστών, στην κυτταρική μεμβράνη των σωμάτων, καθώς και στους άξονες και τις τελικές απολήξεις δίπολων κυττάρων, τα οποία σύμφωνα και με τους Vasilaki και συν. (2001) είναι δίπολα που συνδέονται με ραβδιοφόρα κύτταρα. Η ανάλυση κατά Western επιβεβαίωσε το παραπάνω αποτέλεσμα με ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του sst_{2A} , αφού εντόπισε στα 72kDa την πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε αυτόν τον υποδοχέα.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η έκφραση του sst_5 υποτύπου του υποδοχέα της SRIF, ο οποίος μέχρι πριν τη δημοσίευση της δουλειάς των Ke και Zhong (2007) δεν είχε ανιχνευθεί στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου. Σε συμφωνία με τη μελέτη αυτή, το σήμα για το συγκεκριμένο σωματοστατινεργικό υπότυπο εντοπίστηκε σε σώματα αμακρινικών κυττάρων και απολήξεις στην έσω δικτυωτή στιβάδα, καθώς και σε εξωτερικά τμήματα των φωτουποδοχέων και στην έξω δικτυωτή στιβάδα. Η έκφραση του sst_5 σε επίπεδο ανοσοδραστικότητας δεν φάνηκε διαφορετική ανάμεσα στα δύο είδη επίδρασης (PBS ή AMPA). Η ανάλυση κατά Western επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα αυτό ανιχνεύοντας την πρωτεΐνη για τον sst_5 στα 97kDa σε ζώνες ίδιας οπτικής πυκνότητας (έντασης) για τους ιστούς των διαφορετικών ομάδων.

Σχετικά με τον sst_4 υπότυπο του υποδοχέα της σωματοστατίνης, τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα έδειξαν μειωμένα τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης, μετά την ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA. Ο sst_4 εντοπίστηκε σε νευρωνικές απολήξεις στην έσω δικτυωτή και γαγγλιακή στιβάδα, αλλά σε μικρότερο βαθμό στον αμφιβληστροειδή που δέχθηκε την επίδραση του διεγερτοτοξικού μορίου. Η ανοσοϊστοχημεία δεν βοήθησε στην προσπάθεια ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του sst_1 υποτύπου που εντοπίζεται σε αμακρινικά κύτταρα και απολήξεις της έσω δικτυωτής στιβάδας, αλλά και σε αγγεία (Vasilaki και συν., 2002). Εάν και μελετήθηκε σε ιστούς από περισσότερα από τρία διαφορετικά ζώα δεν ελήφθη σαφής εικόνα, ίσως λόγω έλλειψης ειδικότητας του χρησιμοποιούμενου πρωτογενούς αντισώματος, για το αν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση του sst_1 . Ίσως, μια ανάλυση κατά Western είναι αναγκαία για την απόκτηση πιο σαφούς και ακριβούς εικόνας σχετικά με την έκφραση των sst_1 και sst_4 στις συνθήκες του χρησιμοποιούμενου *in vivo* μοντέλου.

Σύμφωνα με τις προαναφερόμενες ενδείξεις, το σωματοστατινεργικό σύστημα στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου δείχνει να παραμένει λειτουργικό και να μην επηρεάζεται σε επίπεδο έκφρασης των υποδοχέων sst_2 και sst_5 υπό τις διεγερτοτοξικές συνθήκες που επιβάλλει το AMPA. Κατά συνέπεια, επετράπη η παραπέρα χρήση της σωματοστατίνης ή εκλεκτικών για τους $ssts$ αναλόγων της προκειμένου για την επίτευξη νευροπροστασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι πραγματοποιήθηκαν ως επί το πλείστον πειράματα συγχορήγησης της SRIF ή των αναλόγων της με το AMPA με βάση τα οποία μελετήθηκε περαιτέρω και ο

μηχανισμός δράσης της σωματοστατίνης. Σχετικά με τον περιορισμένο αριθμό πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια μελέτης της σωματοστατινεργικής δράσης μετά την επίδραση με το AMPA, σχετική αναφορά παρατίθεται παρακάτω.

Η ίδια η σωματοστατίνη συγχωρηγούμενη με το διεγερτικό αμινοξύ, σύμφωνα με την ανοσοϊστοχημεία για ChAT, και μόνο στη μέγιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση ($10^{-4}M$) μπόρεσε να αναστρέψει σε μικρό βαθμό το αποτέλεσμα δράσης του AMPA, να επαναφέρει δηλαδή το σήμα της ChAT μόνο στις χολινεργικές απολήξεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αστάθεια και μεγάλη πιθανότητα αποικοδόμησης του πεπτιδίου πριν ακόμα αυτό προλάβει να φτάσει στον ιστό, δεδομένου ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής του μορίου είναι μόλις περίπου 3 λεπτά. Παρόλο που πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα παρουσία ή απουσία αναστολέων πρωτεασών (PMSF, leupeptin) ελήφθησαν παρόμοια αποτελέσματα. Επίσης, άλλοι παράγοντες, π.χ. ο βαθμός απορρόφησης από τον ιστό στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, μπορεί να επηρεάζουν τη δράση της σωματοστατίνης.

Ο υπότυπος 2 του υποδοχέα της σωματοστατίνης (sst_2) έχει ήδη αναφερθεί ότι είναι ο επικρατέστερος στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου. Σύμφωνα με τους Helboe και Moller (1999), στον αρουραίο ο sst_2 έχει εντοπιστεί σε αμακρινικά κύτταρα, ανάμεσά τους και τα ντοπαμινεργικά, καθώς και σε έσω τμήματα των κωνιοφόρων φωτοϋποδοχέων. Επίσης, η sst_{2A} ισομορφή έχει εντοπιστεί σε δίπολα κύτταρα που συνδέονται με ραβδία, οριζόντια κύτταρα, κωνιοφόρους φωτοϋποδοχείς και ντοπαμινεργικά κύτταρα (Johnson και συν., 1999, Vasilaki και συν., 2001). Στα πλαίσια αυτής της διατριβής, ανοσοϊστοχημικές μελέτες συνεντοπισμού απέδειξαν για πρώτη φορά ότι ο sst_2 υπότυπος, που εμφανίζει έντονη έκφραση σε σώματα της INL και απολήξεις της IPL και GCL, εντοπίζεται στα σώματα των χολινεργικών νευρώνων του αμφιβληστροειδή. Το νέο αυτό εύρημα σε συνδυασμό με όλα τα παραπάνω ενθάρρυνε τη μελέτη της προστατευτικής δράσης εκλεκτικών για τον sst_2 μορίων στα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή που προσβάλλονται από το AMPA (ChAT-, bNOS- και Calbindin- εκφράζοντα κύτταρα).

Η λανρεοσίδη ή BIM23014, $sst_{2/5}$ ανάλογο, καθώς και το πεπτιδομιμητικό sst_2 ανάλογο L-779,976 συγχωρηγούμενα ενδοφθάλμια με το AMPA επανέφεραν την έκφραση της ChAT στα φυσιολογικά επίπεδα και, μάλιστα, κατά ένα δοσο-

εξαρτώμενο τρόπο, κατορθώνοντας την πλήρη επαναφορά των χολινεργικών κυττάρων στη δόση των 10^{-4}M . Ακόμα και τα αμακρινικά κύτταρα που συνθέτουν μονοξειδίο του αζώτου (NO) επανήλθαν πλήρως, αλλά και γενικά η εικόνα της σήμανσης TUNEL για όλα τα αποπτωτικά κύτταρα ήταν παρουσία του L-779,976 (10^{-4}M) πολύ κοντά σε αυτήν του ιστού-μάρτυρα. Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι ότι όλοι οι νευρώνες θετικοί στο σήμα για Calbindin, οριζόντιοι και GABAεργικοί, παρουσία του L-779,976 (10^{-4}M) επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα ως προς τον αριθμό και την ένταση της ανοσοδραστικότητας σε σώματα και απολήξεις.

Μερική προστασία, καλύτερη αυτής της σωματοστατίνης, σύμφωνα με την ChAT ανοσοδραστικότητα και τη χρώση TUNEL, προσέφερε το sst_5 εκλεκτικό ανάλογο L-817,818 στη δόση των 10^{-4}M συγχորηγούμενο και αυτό με το AMPA. Μάλιστα, η δράση μέσω του sst_5 υποδοχέα επιβεβαιώθηκε με τα πειράματα συγχορήγησης και του sst_2 ανταγωνιστή CYN-154806, αφού το L-817,818 έχει, σύμφωνα με τους Rohrer και συν. (1998), καλή συγγένεια όχι μόνο για τους sst_5 ($K_i = 0.4\text{nM}$) και sst_1 ($K_i = 3.3\text{nM}$), αλλά και μέτρια για τον sst_2 ($K_i = 52\text{nM}$).

Η προστατευτική δράση ενός sst_5 αναλόγου της σωματοστατίνης χορηγούμενου *in vivo* παρατηρείται για πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη και δίνει επιπλέον πληροφορίες στο ερώτημα γύρω από την άγνωστη μέχρι σήμερα λειτουργικότητα του sst_5 υπότυπου του σωματοστατινεργικού υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή. Οι Ke και Zhong στη μελέτη τους υποθέτουν ότι ο sst_5 ίσως παίζει το ρόλο αυτοϋποδοχέα, αφού τον ανίχνευσαν σε σωματοστατινεργικά αμακρινικά κύτταρα ή εμπλέκεται στη ρύθμιση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών GABA, ντοπαμίνη ή ακετυλοχολίνη, αφού παρατήρησαν συνεντοπισμό του υποδοχέα με GABA, TH και ChAT. Ο εντοπισμός των sst_2 και sst_5 στους χολινεργικούς νευρώνες σε συνδυασμό με το γεγονός του διαφορετικού μεγέθους νευροπροστασίας που οι δύο υπότυποι προσφέρουν σε συνθήκες διεγερτοτοξικότητας ενισχύει την υπόθεση δράσης της σωματοστατίνης στα ίδια κύτταρα μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Τα έως τώρα διαθέσιμα στοιχεία δίνουν το έναυσμα για παραπέρα μελέτη του ρόλου του sst_5 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τις νευροπροστατευτικές δράσεις τις σωματοστατίνης μέσω ενεργοποίησης των $\text{sst}_{2/5}$ υποδοχέων επιβεβαιώνονται από τις ακόλουθες μελέτες. Η οκτρεοτίδη, $\text{sst}_{2/5}$ ανάλογο, δείχθηκε

ότι ενδοπεριτοναϊκά χορηγούμενη προστατεύει τον αμφιβληστροειδή του ινδικού χοιριδίου από τις ισχαιμικές συνέπειες της αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης (Celiker & Ilhan, 2002). Στον αρουραίο, η σωματοστατίνη μέσω του sst_2 υποδοχέα προσέφερε προστασία στον αμφιβληστροειδή έναντι της χημικής ισχαμίας (Mastrodimou και συν., 2005), ενώ μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε knockout για τον sst_1 υποδοχέα ποντίκια η ενδογενής υπερέκφραση του sst_2 υποδοχέα προστατεύει από ισχαιμία (ιωδοοξικό οξύ και υποξία, Catalani και συν., 2007).

Το γεγονός ότι ο sst_4 υπότυπος δεν έδειξε να παίζει διαμεσολαβητικό ρόλο στην προστατευτική δράση της σωματοστατίνης πάνω στους χολινεργικούς νευρώνες του αμφιβληστροειδή, αφού το sst_4 εκλεκτικό ανάλογο L-803,087 στα 10^{-4} M δεν ανέστρεψε το αποτέλεσμα του AMPA, πιθανόν οφείλεται στη μειωμένη έκφραση του συγκεκριμένου υπότυπου του υποδοχέα της SRIF παρουσία του AMPA.

Σε ότι αφορά τη δράση του AMPA στην έκφραση του sst_1 υπότυπου, είναι απαραίτητη η επέκταση της μελέτης με τη χρήση άλλων πιο εκλεκτικών πρωτογενών αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία ή τεχνικών (π.χ. ανοσοαποτύπωση κατά Western) με σκοπό να διερευνηθεί εάν και ποιας φύσεως αλλαγές αυτός ο υπότυπος υφίσταται στην έκφρασή του στις διεγερτοτοξικές συνθήκες. Ο υποδοχέας αυτός είναι ο αυτοϋποδοχέας της σωματοστατίνης και η ενεργοποίησή του οδηγεί στη μείωση της απελευθέρωσης της σωματοστατίνης (Mastrodimou & Thermos, 2004). Η μείωση αυτή των επιπέδων σωματοστατίνης ενδεχομένως να μην οδηγούσε σε νευροπροστασία του αμφιβληστροειδή.

Η μέχρι αυτό το σημείο συζήτηση αφορούσε τα πειράματα πρόκλησης νευροπροστασίας μέσω συγχορήγησης με το AMPA της SRIF ή του SRIF-εργικού αναλόγου και μελέτη των αντίστοιχων ιστών μία μέρα μετά τη χορήγηση. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα πρόκλησης νευροπροστασίας με ενδοφθάλμια χορήγηση του sst_2 εκλεκτικού αναλόγου L-779,976 (10^{-4} M) μετά την πρόκληση διεγερτοτοξικότητας με ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA. Είναι βέβαιο ότι θετικά αποτελέσματα σε μια τέτοια προσπάθεια είναι ακόμα πιο ενδιαφέροντα και προσεγγίζουν περισσότερο πραγματικές καταστάσεις κλινικής θεραπείας. Οι μελέτες ChAT ανοσοδραστικότητας έδειξαν (σχ. 4.25) ότι καλύτερη προστασία αποκτήθηκε κατά τη διπλή χορήγηση του L-779,976, στις 24 και 48 ώρες, μετά τη χορήγηση του AMPA, αφού άρχισαν να εμφανίζονται περισσότερα χολινεργικά σώματα σε σχέση με

την περίπτωση της μοναδικής χορήγησης του αναλόγου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση του AMPA (σχ. 4.24).

Η χορήγηση σε χρόνια βάση του σωματοστατινεργικού αναλόγου είναι προφανώς ευεργετική για τα κύτταρα του αμφιβληστροειδή που προσβάλλονται σε τοξικές καταστάσεις. Όμως, εμπόδιο αποτελούν οι λόγω συχνών ενέσεων τραυματισμοί του οφθαλμού που από τη μια δυσκολεύουν περισσότερο τη συγκεκριμένη μελέτη και από την άλλη απειλούν την όποια θετική απόκριση στο φάρμακο του πειραματόζωου. Γι' αυτό και θα μπορούσε να δοκιμαστεί η χορήγηση του σταθερού, μικρού σε μέγεθος, λιπόφιλου sst_2 αναλόγου L-779,976 ενδοπεριτοναϊκά και για περισσότερες από δύο φορές με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της δράσης του φαρμάκου μετά την πρόκληση τοξικότητας. Ωστόσο, σε μια τέτοια προσπάθεια θα έπρεπε πρώτα να λυθεί το πρόβλημα της απαιτούμενης επαρκούς διαθεσιμότητας του αναλόγου L-779,976.

Όσον αφορά στους μηχανισμούς δράσης των σωματοστατινεργικών αναλόγων ως νευροπροστατευτικά ενάντια στη διεγερτοτοξικότητα ή την ισχαιμία, αυτοί είναι πολύπλοκοι λόγω της δυνατότητας δράσης της SRIF σε πολλαπλά επίπεδα και παραμένουν υπό μελέτη. Η έρευνα μέχρι στιγμής έχει στραφεί γύρω από το κατά πόσο η σωματοστατίνη ή ανάλογά της μπορούν να μειώσουν τα αυξημένα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο ή τα αυξημένα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος που απελευθερώνεται στο συναπτικό χώρο γεγονός που ευθύνονται κυρίως για την τοξικότητα των νευρώνων και τον τελικό κυτταρικό θάνατο (Osborne και συν., 2004). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η SRIF μπορεί αναστέλλοντας αντίστοιχα μεμβρανικά κανάλια μέσω των sst_2 και sst_5 να μειώσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ιόντων ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$) (Tallent και συν., 1996). Επίσης, η σωματοστατίνη έχει την ικανότητα ενεργοποιώντας τους sst_2 σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή να αναστέλλει την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος (Dal Monte και συν., 2003b) που επάγει το K^+ και να προστατεύει τον αμφιβληστροειδή ποντικών που δεν εκφράζουν τον sst_1 , αλλά υπερεκφράζουν τον sst_2 σε συνθήκες χημικής ισχαιμίας (Catalani και συν., 2007). Ακόμα, υπάρχει από παλιότερα η πληροφορία ότι η SRIF σε νευρώνες του ακτινωτού γαγγλίου στο κοτόπουλο αναστέλλει τα ιοντικά ρεύματα ασβεστίου μέσω μιας πρωτεϊνικής κίνησης εξαρτώμενης από το cGMP (Meriney και συν., 1994), καθώς επίσης ότι προστατεύει

καλλιέργειες εγκεφαλικού φλοιού από τη διεγερτοτοξικότητα που προκαλεί το NMDA μέσω ενός συγκεκριμένου ενδοκυτταρικού μονοπατιού που περιλαμβάνει την παραγωγή cGMP (Forloni και συν., 1997). Οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν ότι το cGMP είναι ένας ενδιάμεσος παίκτης στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης.

Το cGMP παράγεται από το νουκλεοτίδιο GTP με τη βοήθεια της γουανυλικής κυκλάσης η οποία ενεργοποιείται από το μονοξειδίο του αζώτου. Επομένως, είναι εύλογο το ερώτημα κατά πόσο τα NO/ cGMP εμπλέκονται στα μηχανιστικά μονοπάτια προστατευτικής δράσης της SRIF στον αμφιβληστροειδή. Από μελέτες στον εγκέφαλο, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον γύρω από την προστατευτική φύση του μονοξειδίου του αζώτου ενισχύεται όλο και περισσότερο, παρόλο που κατά κύριο λόγο το μόριο αυτό θεωρείται σημαντικός 'παίκτης' στον καταρράκτη των αντιδράσεων που επάγονται από τα διεγερτικά αμινοξέα και καταλήγουν στον κυτταρικό θάνατο (Dawson και συν., 1991b, Osborne και συν., 2004).

Το μονοξειδίο του αζώτου, γενικά, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δράσει κατά τρόπο εξαρτώμενο ή ανεξάρτητο από το cGMP. Η εμπλοκή αυτών των δύο μονοπατιών στις νευροπροστατευτικές δράσεις του NO έναντι της διεγερτοτοξικότητας έχει γίνει το αντικείμενο πολλών ανασκοπήσεων (Ahern και συν., 2002, Nelson και συν., 2003, Jayakar & Dikshit, 2004). Ένα παράδειγμα cGMP-εξαρτώμενης δράσης δείχνει η μελέτη των Lei και συν. (2000) κατά την οποία η αύξηση στο ενδοκυτταρικό cGMP κατέστειλε τις δράσεις των AMPA υποδοχέων και τη μετέπειτα συναπτική διαβίβαση στον ιππόκαμπο. Στον αμφιβληστροειδή οι AMPA υποδοχείς δείχθηκε ότι ρυθμίζονται αρνητικά από το cGMP, ενώ στα οριζόντια κύτταρα του ιστού οι υποδοχείς καϊνικού κατεστάλησαν από το cGMP και από το NO κατά τρόπο εξαρτώμενο από την PKG (πρωτεϊνική κινάση G, ενεργοποιείται από το cGMP) (MacMahon & Ponomavera, 1996). Τέλος, χαρακτηριστική είναι η μελέτη των Sakagami και συν. (2001) κατά την οποία φάνηκε ότι μια σηματοδότηση μέσω NO/cGMP είναι υπεύθυνη για την παρεμπόδιση της εισροής Ca^{2+} στα περικύτταρα (=λεία μυϊκά κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια του σωλήνα των αιμοφόρων αγγείων) του αμφιβληστροειδή αναστέλλοντας τα αντίστοιχα κανάλια.

Προηγούμενες μελέτες σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδή αρουραίου έδειξαν ότι η σωματοστατίνη αυξάνει τα επίπεδα του NO (Vasilaki και συν., 2002) και

του cGMP (Mastrodimitou και συν., 2006) και συγκεκριμένα μέσω του sst_2 υπότυπου. Πολύ πρόσφατα, στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας με κυανιούχο νάτριο (NaCN, υποξία) και ιωδοοξικό οξύ (IAA, υπογλυκαιμία) εφαρμοζόμενης στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου *in vitro*, δείχθηκε ότι οι δότες του NO, SIN-1 και NONOate, και το ανάλογο του cGMP, 8-Bromo-cGMP, προστάτευσαν με συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο τον ιστό, σύμφωνα με την ChAT ανοσοδραστικότητα και τη χρώση TUNEL (Mastrodimitou και συν., 2008). Επίσης, στην ίδια μελέτη αναστολείς της NOS και της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (sGC) επιβεβαίωσαν τη συμμετοχή των NO/cGMP στις νευροπροστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης, αφού ανέστρεψαν τη θετική δράση της λανρεοτιδής ($sst_{2/5}$ ανάλογο, BIM23014).

Με βάση τα προαναφερόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα, μελετήθηκε η εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τα μόρια NO/cGMP στη νευροπροστασία που επιδεικνύει η SRIF στο χρησιμοποιούμενο *in vivo* μοντέλο διεγερτοτοξικότητας. Πράγματι, από τα αντίστοιχα πειράματα με τους αναστολείς της NOS (L-NAME) ή της γουανυλικής κυκλάσης (ODQ) φάνηκε ότι οι ευεργετικές δράσεις του sst_2 αναλόγου της σωματοστατίνης παρουσία του AMPA αντιστράφηκαν, μιας και ούτε οι χολινεργικοί ούτε οι bNOS αμακρινικοί νευρώνες προστατεύτηκαν πλήρως, αλλά ούτε και η απόπτωση μειώθηκε. Οι ουσίες L-NAME και ODQ έδρασαν με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι στο εν προκειμένω *in vivo* μοντέλο η SRIF ενδοκυτταρικά λειτουργεί μέσω του μονοπατιού που περιλαμβάνει ενεργοποίηση της NOS και παραγωγή από αργινίνη του NO, έπειτα ενεργοποίηση από το NO της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης και παραγωγή από GTP του cGMP. Το μονοξείδιο του αζώτου ως αέριο, διαχεόμενο μόριο, είναι δυνατόν να επάγει την παραγωγή του cGMP σε γειτονικά κύτταρα ως ένας νευροδιαβιβαστής που δρα με παρακρινή τρόπο και παρέχει προστασία (Thermos, 2008). Σε αυτήν την υπόθεση ενισχυτικό ρόλο παίζει και το γεγονός ότι παρουσία του AMPA το μεμβρανοδιαπερατό ανάλογο του cGMP, 8-Bromo-cGMP, μόνο του κατόρθωσε να προστατεύσει έστω μερικώς τα χολινεργικά κύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη, συνεπώς, η νευροπροστασία που επιδεικνύει η σωματοστατίνη έναντι της διεγερτοτοξικότητας που προκαλεί το AMPA μεσολαβείται ενδοκυττάρια από το σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει τη διαδοχική

παραγωγή και δράση των μορίων NO και cGMP, τα οποία μπορούν είτε να κλείσουν κανάλια ασβεστίου, είτε να επηρεάσουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, συμπεριλαμβανομένου και του γλουταμινικού, στα ίδια ή σε γειτονικά κύτταρα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η παρεμπόδιση των αποπτωτικών διαδικασιών και, γενικά, η εξασθένιση των τοξικών δράσεων του AMPA. Αυτός είναι κι ένας μηχανισμός που επιδεικνύει για μια ακόμη φορά τον εναλλακτικό, θετικό ρόλο του μονοξειδίου του αζώτου που ως τώρα θεωρούνταν ένας σημαντικός παίκτης στη αλυσίδα των αντιδράσεων που οδηγεί στο κυτταρικό θάνατο σε καταστάσεις ισχαιμίας.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι το μονοξείδιο του αζώτου σε ισχαιμικές ή διεγερτοτοξικές συνθήκες αντιδρά με ρίζες οξυγόνου ($\cdot\text{O}_2^-$) και γρήγορα μεταβολίζεται σε περοξυνιτρικό (ONOO^-) (Osborne και συν., 2004). Το ONOO^- με τη σειρά του έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τα τασεοελεγχόμενα κανάλια ασβεστίου (VDCCs- Voltage Dependent Calcium Channels) (Ohkuma και συν., 2001), καθώς και την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Ohkuma και συν., 1995). Πρόσφατη μελέτη υποστήριξε ότι τα NO, cGMP και ο δότης NO και περοξυνιτρικού SIN-1 διεγείρουν την απελευθέρωση του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA στον αμφιβληστροειδή (Yu & Eldred, 2005).

Συμπερασματικά, τα NO/cGMP και πιθανώς το περοξυνιτρικό μπορούν να μεσολαβήσουν στις προστατευτικές δράσεις της σωματοστατίνης. Τούτο δεν αποκλείει και την εμπλοκή άλλων μορίων στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση που πυροδοτείται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων της SRIF κατά την εξέλιξη της νευροπροστασίας έναντι της διεγερτοτοξικότητας.

Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον μελέτες για τον προσδιορισμό των επιπέδων του γλουταμινικού οξέος στον αμφιβληστροειδή σε συνθήκες διεγερτοτοξικότητας και προστασίας. Τα δεδομένα που ελήφθησαν από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έδειξαν ότι δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων: ιστών-μαρτύρων, ιστών που είχαν υποστεί διεγερτοτοξικότητα με AMPA και ιστών που είχαν δεχθεί AMPA και sst_2 εκλεκτικό ανάλογο. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι λόγω μεγάλης συγκέντρωσης του γλουταμινικού που παράγεται συνολικά από όλον τον ιστό δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της όποιας μεταβολής παρουσία του διεγερτικού μορίου AMPA. Επομένως, η συγχορήγηση και του σωματοστατινεργικού αναλόγου

είναι λογικό να μην μπορεί να δώσει διαφορετική εικόνα για τα επίπεδα του απελευθερωμένου γλουταμινικού. Ωστόσο, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η σωματοστατίνη προάγει την απελευθέρωση του GABA ενεργοποιώντας τους sst_2 υποδοχείς της στα οριζόντια κύτταρα (Johnson και συν., 2000) και το GABA με τη σειρά του ως ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής καταστέλλει τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος που απελευθερώνεται από τα δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα του ιστού. Αυτός θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός μηχανισμός δράσης της σωματοστατίνης μέσω μείωσης των επιπέδων του γλουταμινικού στον εξωκυττάριο χώρο και εξασθένησης της διεγερτοτοξικότητας.

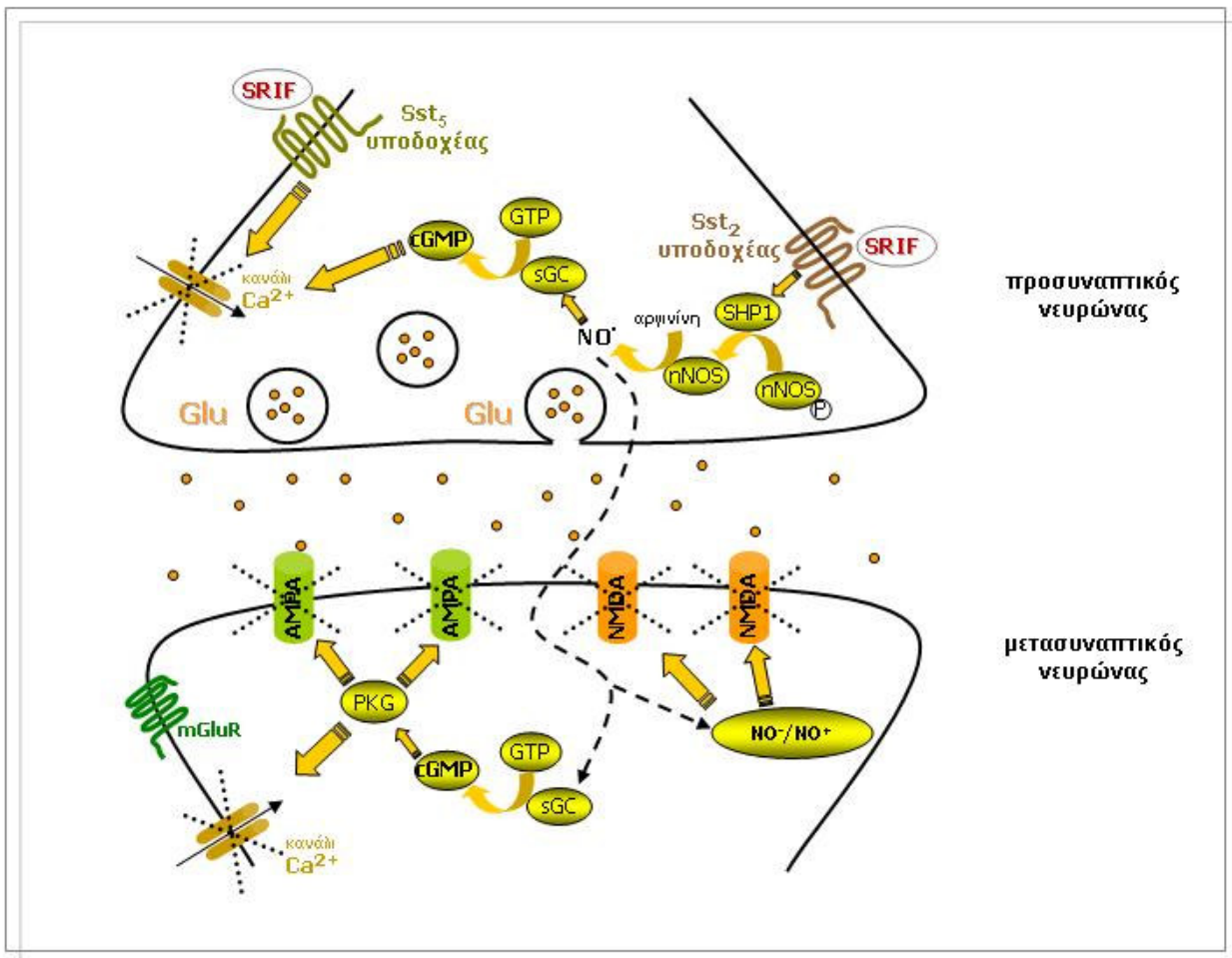
Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτής της μελέτης και λαμβάνοντας υπόψη τη μέχρι σήμερα γνωστή βιβλιογραφία, όσον αφορά στους μηχανισμούς προστασίας που προσφέρει το σωματοστατινεργικό σύστημα στο μοντέλο της διεγερτοτοξικότητας με χορήγηση του AMPA, είναι δυνατόν να υποστηριχθεί ότι η σωματοστατίνη:

- i. ενεργοποιεί τους sst_2 υποδοχείς της στη μεμβράνη των νευρώνων που αυτός εντοπίζεται (π.χ. δίπολα κύτταρα) και ενισχύει σε αυτά την παραγωγή του NO. Το NO, με τη σειρά του, προάγει την παραγωγή του cGMP είτε στα ίδια κύτταρα είτε ως αέριο διαχεόμενο μόριο σε γειτονικά κύτταρα κι έτσι μέσω cGMP κλείνει μεμβρανικά κανάλια ιόντων Ca^{2+} , που εισάγουν Ca^{2+} στο κύτταρο και ρυθμίζονται από το cGMP, είτε
- ii. μέσω cGMP, περοξυνιτρικού ή GABA επηρεάζει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμινικό, με τελικό αποτέλεσμα να περιορίζει τη διεγερτοτοξικότητα και τις καταστροφικές συνέπειές της.

Αποτελέσματα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στον εγκέφαλο υποστηρίζουν ότι το NO ρυθμίζει αρνητικά τόσο τους υποδοχείς AMPA όσο και τους NMDA. Το NO μέσω του cGMP και τη συμμετοχή της πρωτεϊνικής κινάσης G (Protein Kinase G, PKG) επηρεάζει τους υποδοχείς AMPA (μειωρύθμιση), ενώ μέσω ενός ανεξάρτητου από το cGMP μηχανισμού, χωρίς τη μεσολάβηση κάποιου ενζύμου, επηρεάζει τους υποδοχείς NMDA (μειωρύθμιση). Το τελευταίο γίνεται με απευθείας δράση του NO, υπό την μορφή NO^- ή NO^+ , σε συγκεκριμένη κυστεΐνη στην περιοχή του διαύλου και μέσω S-νιτροσυλίνωσης (Gow και συν., 2000, Choi και συν., 2000,

Lipton και συν., 2001). Ο δότης του μονοξειδίου του αζώτου SIN-1 δείχθηκε ότι μπλοκάρει τα ρεύματα ιόντων που επάγει το NMDA και κατεπέκταση μπλοκάρει την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σε καλλιεργούμενους νευρώνες (Manzoni και συν., 1992), ενώ οι συγγραφείς πρότειναν ότι το NO επηρεάζει τους NMDA υποδοχείς μέσω ανάδρομης αναστολής. Επίσης, η ομάδα του Vidwans και συν. (1999) εφαρμόζοντας δότες του NO σε νευρώνες του φλοιού ποντικού που προσβάλλονται από το NMDA, παρατήρησαν ότι οι βλάβες περιορίζονται κατά ένα cGMP- ανεξάρτητο τρόπο.

Ένα σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά τον προτεινόμενο μηχανισμό δράσης της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή που υφίσταται τοξικότητα από το AMPA απεικονίζεται παρακάτω.



Σχήμα 5.1: Σχηματική απεικόνιση του υποθετικού μηχανισμού προστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης μέσω των σηματοδοτικών μορίων NO και cGMP με τελικό αποτέλεσμα την εξασθένιση της διεγερτοτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή. SHP1= PTPase containing two Src homology 2 (SH2) domains, tyrosine phosphatase.

Συνοψίζοντας, οι πιο σημαντικές πληροφορίες που προσφέρει η παρούσα μελέτη είναι ότι sst_2 και sst_5 εκλεκτικά ανάλογα του νευροπεπτιδίου σωματοστατίνη ενδοβολβικά χορηγούμενα επιδεικνύουν θεραπευτικές δράσεις στον αμφιβληστροειδή όταν αυτός υφίσταται τις εκφυλιστικές συνέπειες της δράσης του διεγερτικού αγωνιστή AMPA. Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το γεγονός ότι ο sst_5 υπότυπος του υποδοχέα της SRIF για πρώτη φορά φάνηκε να είναι όχι μόνο λειτουργικός, αλλά και προστατευτικός στον αμφιβληστροειδή που προσβάλλεται από διεγερτοτοξικότητα, ενώ μέσα από τα δεδομένα αυτής της διατριβής ενισχύεται η θεωρία γύρω από τη νευροπροστατευτική φύση του NO. Φυσικά, σημαντικό είναι το γεγονός ότι το συγκεκριμένο *in vivo* μοντέλο αμφιβληστροειδοπαθειών είναι τόσο απλό από τεχνικής άποψης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και άλλων φαρμάκων, εκτός από τη σωματοστατίνη, σε οφθαλμικές παθήσεις που έχουν ως βάση τη διεγερτοτοξικότητα.

Όσον αφορά στις προσπάθειες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί ή βρίσκονται σε εξέλιξη και σκοπό έχουν την κλινική εφαρμογή της σωματοστατίνης ή αναλόγων της, αξίζει να αναφερθούν ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα μελετών σε ασθενείς με σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες.

Σε ασθενείς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (DR) το σωματοστατινεργικό ανάλογο λανρεοτίδη (BIM23104) έχει δείχθει ότι παρουσιάζει αντιαγγειογενετική δράση, ενώ αναστέλλει την αυξητική ορμόνη (McCombe και συν., 1991). Η μακροχρόνια χρήση, ωστόσο, του $sst_{2/5}$ εκλεκτικού αναλόγου οκτρεοτίδη σταθεροποιεί την DR στους ασθενείς με προχωρημένη DR (Mallet και συν., 1992). Επίσης, στη μελέτη των Grant και συν. (2000) αναφέρεται ότι η θεραπεία με υποδόρια ένεση οκτρεοτίδης σε ασθενείς με προχωρημένη μη πολλαπλασιαστική και πρώιμη πολλαπλασιαστική DR επιβραδύνει την πρόοδο της νόσου και επιμηκύνει το χρονικό διάστημα μέχρι το χειρουργείο. Οι Boehm και συν. (2001) ανέφεραν ότι η οκτρεοτίδη μειώνει την αιμορραγία και την απώλεια της οπτικής οξύτητας σε ασθενείς με πολλαπλασιαστική DR υψηλού κινδύνου μετά από φωτοθρόμβωση με laser. Σε ασθενείς με μη πολλαπλασιαστική DR, η χορήγηση επί οκτώ εβδομάδες της οκτρεοτίδης βελτίωσε την οπτική οξύτητα και είχε μόνο εν μέρει επιδράσεις στα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης (Shumak και συν., 1990).

Η χορήγηση αναλόγων της SRIF έχει δοκιμαστεί και σε ασθενείς με κυστοειδές οίδημα της ωχράς (CME). Για παράδειγμα, οι Kuijpers και συν. (1998) αναφέρουν ότι η οκτρεοτίδη βελτίωσε την οπτική οξύτητα ασθενών με επικρατή CME. Επίσης, σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η θεραπεία για ένα χρόνο με το sandostatin-LAR (άλλη μορφή της οκτρεοτίδης) μείωσε σημαντικά την παρουσία οιδημάτων, σταθεροποίησε την οπτική οξύτητα και μείωσε την ενδοφθάλμια πίεση σε διαβητικό ασθενή με CME (Hernaiz-Ortega και συν., 2004). Στη μελέτη των Papadaki και συν. (2005) αναφέρεται ότι σε ασθενή με αμφίπλευρο κυστοειδές οίδημα της ωχράς που σχετίζεται με ενδοφθάλμια φλεγμονή και είναι ανθεκτικό στη θεραπεία τα δύο χρόνια θεραπείας με οκτρεοτίδη είχαν ως αποτέλεσμα μια εν μέρει επίλυση του προβλήματος και βελτίωση της οπτικής οξύτητας. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη των Missotten και συν. (2007) αναφέρεται ότι το sandostatin-LAR μείωσε το οίδημα σε ασθενείς με χρόνια κυστοειδές οίδημα της ωχράς και, μάλιστα, οι επιτυχείς αποκρίσεις στο φάρμακο είχαν σχέση με τη διάρκεια εμφάνισης της ασθένειας πριν την έναρξη της θεραπείας. Τέλος, σε μια ακόμη κλινική δοκιμή της οκτρεοτίδης για θεραπεία ενός χρόνου φάνηκε ότι επτά στα οκτώ μάτια τεσσάρων ασθενών με πρώιμη επικρατή κυστοειδή εκφύλιση της ωχράς παρουσίασαν βελτίωση σύμφωνα με αποτελέσματα της φλουραγγειογραφίας και σταθεροποίηση της οπτικής οξύτητας (Hogewind και συν., 2008).

Αξίζει, ακόμη, να αναφερθούν ορισμένα παραδείγματα μελετών χρήσης σωματοστατινεργικών αναλόγων σε περιπτώσεις ασθενών με γεροντική εκφύλιση της ωχράς - χοριοειδή νεοαγγείωση. Η οκτρεοτίδη, λόγω χάρη, εκδηλώνει ανασταλτικές δράσεις στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μελάχρωου επιθηλίου (RPE) του βοδιού, καθώς και στον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό του ανθρώπινου RPE όταν αυτός επάγεται από αυξητικούς παράγοντες όπως VEGF, bFGF και PDGF (Baldysiak-Figiel και συν., 2004, Spraul και συν., 1999). Επίσης, η χρήση, σε πιλοτική κλινική βάση, του sandostatin-LAR (van Hagen και συν., 2000) και της λανρεοτίδης (Papadaki και συν., 2003) μία ή δύο φορές το μήνα σταθεροποίησε την οπτική οξύτητα ασθενών με χοριοειδή νεοαγγείωση. Επιπλέον, η ομάδα του Lambouij (2000) αναφέρει ότι ο υποδοχέας sst_{2A} εκφράζεται ισχυρά στα νεοσχηματισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα ομοιάζοντα με ινοβλάστες κύτταρα των νέων παθολογικών αγγείων σε ασθενείς με χοριοειδή νεοαγγείωση.

Όλα τα προαναφερόμενα κλινικά δεδομένα καθιστούν τη σωματοστατίνη και τους διαθέσιμους για τους υποδοχείς της αγωνιστές ολοένα και πιο ενδιαφέροντα προς περαιτέρω μελέτη, προκειμένου για τη μελλοντική χρήση τους ως έστω επικουρικά φάρμακα στην αγωγή ασθενών που πάσχουν από σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες. Κατά συνέπεια, η παρούσα μελέτη στον αρουραίο με πρόκληση *in vivo* διεγερτοτοξικότητας με χορήγηση του AMPA και νευροπροστασίας με ενδοφθάλμια χορήγηση της SRIF ή αναλόγων της έρχεται να συνηγορήσει υπέρ των θεραπευτικών χαρακτηριστικών του σωματοστατινεργικού συστήματος και να ενθαρρύνει την αξιοποίησή τους στην αντιμετώπιση σοβαρών παθήσεων του αμφιβληστροειδή που οδηγούν σε τύφλωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή κατόρθωσε να δημιουργήσει ένα εύχρηστο in vivo μοντέλο αμφιβληστροειδοπαθειών με πρόκληση διεγερτοτοξικότητας και να μελετήσει τον προστατευτικό ρόλο του νευροπεπτιδίου σωματοστατίνη ή αναλόγων του χορηγούμενα ενδοφθάλμια. Επιπλέον, έγινε σημαντική προσπάθεια προσέγγισης του μηχανισμού με τον οποίο επετεύχθει η προστασία των νευρώνων του αμφιβληστροειδή. Ακολουθούν μελλοντικές εργασίες που προκύπτουν και θα μπορέσουν να προσφέρουν ακόμα περισσότερες πληροφορίες γύρω από τη θεραπευτική χρησιμότητα της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή.

➤ Η περαιτέρω εξερεύνηση των μηχανιστικών μονοπατιών που ενεργοποιεί ή στα οποία εμπλέκεται η σωματοστατίνη μέσω των sst_2 και sst_5 υποτύπων του υποδοχέα της (π.χ. κασπάσες ή άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις αποπτωτικές διαδικασίες) και προσφέρει νευροπροστασία σε τοξικές συνθήκες θα δώσουν σημαντικές πληροφορίες γύρω από τη θεραπευτική χρησιμότητα των αναλόγων της σε πραγματικές οφθαλμικές εκφυλιστικές παθήσεις.

➤ Επιπλέον, σημαντική πρόκληση αποτελεί η μελέτη της χρόνιας χορήγησης αναλόγων της σωματοστατίνης μετά την πρόκληση της διεγερτοτοξικότητας ακόμα και με συστηματική (π.χ. ενδοπεριτοναϊκή) χορήγηση στο ζώο.

➤ Μελλοντικές φαρμακολογικές και βιοχημικές μελέτες με σκοπό τη διαλεύκανση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και των συνθηκών στις οποίες τα σωματοστατινεργικά ανάλογα, που χρησιμοποιήθηκαν και φάνηκαν ευεργετικά στην παρούσα μελέτη, μπορεί να είναι τοξικά για τους οφθαλμικούς ιστούς είναι απαραίτητες.

Υπάρχει ολοένα και μεγαλύτερη ανάγκη για αποτελεσματικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις σε παθήσεις του αμφιβληστροειδή που πλήττουν

μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού και προσβάλλουν την ποιότητα ζωής του. Έτσι, ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα καθίσταται η μελλοντική χρήση των αναλόγων της σωματοστατίνης είτε μόνων τους είτε σε συνδυασμό με τις σημερινές ευρέως χρησιμοποιούμενες θεραπείες, όπως είναι τα αντι-VEGF φάρμακα ή μικροεπεμβάσεις που πολλές φορές προσφέρουν προσωρινές λύσεις στα οφθαλμικά προβλήματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες κλινικές και εργαστηριακές ενδείξεις οδηγούν σταδιακά προς τη διαλεύκανση της παθοφυσιολογίας και θεραπείας σοβαρών, συχνά αθεράπευτων, παθήσεων του αμφιβληστροειδή όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, το γλαύκωμα και η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Βασική αιτία των περισσότερων αμφιβληστροειδοπαθειών έχει αποδειχθεί ότι είναι η ισχαιμία.

Η ισχαιμία είναι γνωστό ότι μπορεί να καταλήξει σε νεοαγγείωση ή κυτταρικό θάνατο με κύριους παίκτες στη δεύτερη περίπτωση το βασικό διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του αμφιβληστροειδή, γλουταμινικό οξύ, τα ενδοκυττάρια ιόντα ασβεστίου και το μονοξειδίο του αζώτου (NO, Osborne και συν., 2004). Το νευροπεπτίδιο σωματοστατίνη αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο λόγω της γνωστής ανασταλτικής δράσης του σε διαύλους ιόντων ασβεστίου (Reisine, 1990, Tallent και συν., 1996).

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η δημιουργία ενός *in vivo* μοντέλου αμφιβληστροειδοπαθειών με πρόκληση διεγερτοτοξικότητας μέσω ενδοφθάλμιας χορήγησης του διεγερτικού αγωνιστή AMPA και η μελέτη των προστατευτικών δράσεων της σωματοστατίνης στο μοντέλο αυτό.

Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση του AMPA στα 42ημοι ανά οφθαλμό του αρουραίου έδειξε ότι μπορεί μέσα σε τουλάχιστον 24 ώρες να οδηγήσει σε βλάβες κυττάρων του αμφιβληστροειδή, όπως αμακρινικά χολινεργικά κύτταρα, αμακρινικά κύτταρα που εκφράζουν τη συνθάση του NO και οριζόντια κύτταρα. Παρατηρήθηκε, επιπλέον, αυξημένη απόπτωση γενικά στον ιστό σε αυτές τις συνθήκες. Το διεγερτικό οξύ AMPA δεν παρουσίασε σημαντική δράση στο σωματοστατινεργικό σύστημα. Τα επίπεδα έκφρασης της σωματοστατίνης και των υποδοχέων sst_2 και sst_5 δεν είχαν καμία σημαντική διαφορά στις ομάδες του μάρτυρα και του διεγερτικού αμινοξέος.

Η σωματοστατίνη και κυρίως τα εκλεκτικά ανάλογα για τους sst_2 και sst_5 υποδοχείς της προστάτευσαν τον ιστό από τη διεγερτοτοξικότητα όταν συγχρηγήθηκαν ενδοβολβικά με το AMPA. Την καλύτερη προστασία πρόσφεραν

συγκεκριμένα τα $ss2_2$ ανάλογα, καθώς ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η εικόνα των διαφόρων νευρώνων που βλάπτονται από τη δράση του AMPA επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα. Σε συμφωνία είναι και τα αποτελέσματα από μελέτες TUNEL που έδειξαν ότι η απόπτωση περιορίζεται ή εξαλείφεται παρουσία του σωματοστατινεργικού αναλόγου. Επίσης, θετικά ήταν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν στα πλαίσια μελέτης της νευροπροστασίας μετά την πρόκληση τοξικότητας με ένεση του AMPA, με το $ss2_2$ εκλεκτικό ανάλογο να εξακολουθεί έστω μερικώς να προστατεύει τους χολινεργικούς νευρώνες του ιστού.

Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η σωματοστατίνη προστατεύει τον αμφιβληστροειδή από τη διεγερτοτοξικότητα, μελετήθηκε η εμπλοκή του ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού NO/cGMP. Αναστολή της συνθάσης του NO και διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης, ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση του NO και του cGMP, αντίστοιχα, ανέστρεψε τις προστατευτικές δράσεις των $ss2_2$ εκλεκτικών αναλόγων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν ότι τα σωματοστατινεργικά ανάλογα ενδοφθάλμια χορηγούμενα, για πρώτη φορά, παρέχουν νευροπροστασία αποτρέποντας το θάνατο νευρώνων του αμφιβληστροειδή υπό διεγερτοτοξικές συνθήκες. Επιπλέον, ενισχύουν τη θεωρία σχετικά με την εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού NO/cGMP στον προστατευτικό ρόλο της σωματοστατίνης.

Η μελέτη αυτή ενθαρρύνει ακόμα περισσότερο τη θεραπευτική εφαρμογή της σωματοστατίνης είτε μόνης της είτε σε συνδυασμό με τις ήδη ευρέως χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές αγωγές ή μικροεπεμβάσεις που συνήθως στοχεύουν μόνο στον περιορισμό της νεοαγγείωσης και πολλές φορές προσφέρουν προσωρινά θετικά αποτελέσματα. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για μια εκτενέστερη εξέταση της νευροπροστατευτικής δράσης των σωματοστατινεργικών αναλόγων όταν χορηγούνται μετά την πρόκληση της βλάβης στον ιστό. Επίσης, αναγκαία είναι η εξέταση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των αναλόγων σε συνδυασμό με τους διαφορετικούς τρόπους χορήγησης, με σκοπό τον καθορισμό της βέλτιστης αποτελεσματικότητάς τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8:

ABSTRACT

IN VIVO STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE ACTIONS OF SOMATOSTATIN
IN A MODEL OF RETINAL EXCITOTOXICITY

An increasing number of clinical and laboratory studies have focused on the investigation of the pathophysiology and therapy of retinal diseases, such as diabetic retinopathy, glaucoma and age-related macular degeneration, that lead to visual impairment and blindness. Ischemia has been shown to be the underlying cause of these diseases. It leads to neovascularization and neuronal cell death.

The cascade of events leading to the ischemia induced cell death involves increases in glutamate, the major excitatory neurotransmitter in retina, intracellular calcium ions and nitric oxide (NO) levels (Osborne et al., 2004). The neuropeptide somatostatin has been considered as a possible therapeutic target because of its well known inhibitory actions on Ca²⁺ channels and intracellular calcium levels (Reisine, 1990, Tallent et al., 1996).

The aim of the present study was to investigate the neuroprotective effects of somatostatin in an *in vivo* model of retinal excitotoxicity, employing the excitatory amino acid AMPA.

The intravitreal administration of AMPA (42nmol per rat eye) resulted in a loss of retinal neurons such as cholinergic amacrine, bNOS expressing amacrine and horizontal cells, 24 hours after its administration. An increase in apoptosis was also observed in the AMPA treated samples. Somatostatin levels and the expression of the sst₂ and sst₅ somatostatin receptor subtypes were not affected by the AMPA treatment.

Intravitreal co-injection of AMPA with somatostatin or sst₂ and sst₅ selective analogs protected the retina from the AMPA induced toxicity in a dose dependent manner. The best protection was afforded by sst₂ selective ligands since immunohistochemical studies showed that AMPA induced retinal cell loss was fully reversed. TUNEL studies confirmed the above results. The increase in apoptosis observed in the AMPA treated samples was drastically reduced in the presence of the somatostatinerigic sst₂ analogs. Intravitreal

injection of the sst₂ selective analogs after the administration of AMPA afforded partial protection.

In order to study the mechanism involved in somatostatin's neuroprotective actions against excitotoxicity, the involvement of the intracellular signaling pathway NO/cGMP was studied. The blockade of NO synthase and guanylate cyclase, the enzymes that catalyze the synthesis of nitric oxide and cGMP respectively, reversed the actions of the somatostatinergic analogs.

These results offer new *in vivo* evidence supporting that sst₂ and sst₅ selective ligands, for the first time injected intravitreally, protect the retina from excitotoxic insults, and reinforce the theory of the involvement of NO/cGMP signaling in somatostatin's protective effects.

The present data encourage the therapeutic use of somatostatin either alone or in combination with other treatments presently applied (photocoagulation, anti-VEGFs) in the therapeutics of retinal diseases whose pathophysiology involves ischemia induced neurodegeneration or ischemia induced neovascularization. Further investigations are essential to study the pharmacokinetic properties of sst₂ and sst₅ selective analogs to assess the best conditions for optimum efficacy.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9:

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1994;118:445-450.

Adolph AR. Pharmacological actions of peptides and indoleamines on turtle retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* 1989;3:411-423.

Afzal A, Shaw LC, Ljubimov AV, Boulton ME, Segal MS, Grant MB. Retinal and choroidal microangiopathies: therapeutic opportunities. *Microvasc Res.* 2007;74:131-144.

Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 2002;25:510-517.

Aiello LP. Targeting intraocular neovascularization and edema — one drop at a time. *N Engl J Med.* 2008;359:967-969.

Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P. Somatostatin modulates voltage-gated K⁺ and Ca⁺⁺ currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci.* 2000;20:929-936.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.

Andrés N, Malpesa Y, Rodríguez MJ, Mahy N. Low sensitivity of retina to AMPA-induced calcification. *J Neurosci Res.* 2003;72:543-548.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1997;94:4155-4160.

Baldysiak-Figiel A, Lang GK, Kampmeier J, Lang GE. Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J Endocrinol.* 2004;180:417-424.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest.* 1998;102:783-791.

Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuro-Psychophacol Biol Psychiatry*. 2003;27:283–290.

Bezerra Y, Fuselier JA, Peyman GA, Oner H, Drouant G, Coy DH. Study of inhibitory effects of an antiangiogenic somatostatin–camptothecin conjugate on laser-induced choroidal neovascularization in rats. *Retina*. 2005;25:345–354.

Bigiani A, Petrucci C, Ghiaroni V, et al. Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. *Brain Res*. 2004;1025:177–185.

Block F, Schwarz M, Sontag KH. Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neuroscience*. 1992;144:124-126.

Blute TA, Velasco P, Eldred WD. Functional localization of soluble guanylate cyclase in turtle retina: modulation of cGMP by nitric oxide donors. *Vis Neurosci*. 1998;15:485–498.

Boehm BO, Lang GK, Jehle PM, Feldman B, Lang GE. Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res*. 2001;33:300–306.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.

Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vis Res*. 1998;38:1385–1397.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 1973;179:77–79.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992;8:3–11.

Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. Pathomechanisms of Cystoid Macular Edema. *Ophthalmic Res*. 2004;36:241-249.

Bruns C, Weckbecker G, Raulf F, Lübbert H, Hoyer D. Characterization of somatostatin receptor subtypes. *Ciba Found Symp.* 1995;190:89-101.

Buchi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica.* 1991;203:138-147.

Catalani E, Cervia D, Martini D, et al. Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *Eur J Neurosci.* 2007;25:1447–1459.

Celiker U, Ilhan N. Nitric oxide and octreotide in retinal ischemia reperfusion injury. *Doc Ophthalmol.* 2002;105:327–338.

Cervia D, Casini G, Bagnoli P. Physiology and pathology of Somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286:112-122.

Chen CH, Chen SC. Evidence of the presence of specific vascular endothelial growth factor in fetal bovine retina. *Exp Cell Res.* 1987;169:287-295.

Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, Barnes JM, Collingridge GL, Henley JM. Regulation of glutamate release by presynaptic kainite receptors in the hippocampus. *Nature.* 1996;379:78-81.

Choi YB, Tenneti L, Le DA, et al. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 2000;3:15–21.

Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:205-37.

Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3191-3199.

Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res.* 2002;936:1-14.

Cuilla TA, Amador AG, Zinman, B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Diabetic Care.* 2003;26:2653–2664.

Dal Monte M, Petrucci C, Vasilaki A, et al. Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology*. 2003a;45:1080–1092.

Dal Monte M, Petrucci C, Cozzi A, Allen JP, Bagnoli P. Somatostatin inhibits potassium-evoked glutamate release by activation of the sst(2) somatostatin receptor in the mouse retina. *N-S Arch Pharmacol*. 2003b;367:188–192.

Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:3480–3489.

Daugeliene L, Niwa M, Hara A, et al. Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2743-2747.

Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991a;88:7797-7801.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991b;88:6368-6371.

de la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A. L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J Neurosci*. 1995;15:3571–3582.

Deng J, Wu DZ, Gao R. Detection of glutamate and γ -aminobutyric acid in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Yan Ke Xue Bao*. 2000;16:199-202.

DeVries SH. Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*. 2000;28:847-856.

Diederer RMH, La Heij EC, Deutz NEP, et al. Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Exp Eye Res*. 2006;83:45-50.

Dijk F, Kamphuis W. An immunocytochemical study on specific amacrine cell subpopulations in the rat retina after ischemia. *Brain Res.* 2004;1026:205–217.

Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci.* 1995;15:3075–3083.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 1995;375:599-603.

Feher J, Antal M. Ischemic retinal alterations in cardiac arrest. *Ann Ophthalmol.* 1979;11:909-913.

Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina.* 2006;26:859–870.

Ferreira IL, Duarte CB, Neves AR, Carvalho AP. Culture medium components modulate retina cell damage induced by glutamate, kainate or “chemical ischemia”. *Neurochem Int.* 1998;32:387–396.

Ferriero DM, Sagar SM. Development of somatostatin immunoreactive neurons in rat retina. *Dev Brain Res.* 1987;34:207–214.

Ferriero DM. Developmental expression of somatostatin receptors in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 1992;67:309–315.

Fine SI, Berger KW, Maguire MG, Ho AC. Age-related macular degeneration. *New Engl J Med.* 2000;342:483–492.

Firth SI, Li W, Massey SC, Marshak DW. AMPA receptors mediate acetylcholine release from starburst amacrine cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 2003;466:80–90.

Fischer AJ, Seltner RL, Poon J, Stell WK. Immunocytochemical characterization of quisqualic acid- and N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the retina of chicks. *J Comp Neurol.* 1998;393:1–15.

Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiessa R, Vezzani A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem.* 1997;68:319–327.

Gehlbach P, Purple RL. Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:669-676.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, et al. Relative abundance of subunits mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* 1995;15:193–204.

Gow AJ, Chen Q, Gole M, Themistocleous M, Lee VM, Ischiropoulos H. Two distinct mechanisms of nitric oxide-mediated neuronal cell death show thiol dependency. *Am J Physiol.* 2000;278:C1099–C1107.

Grant MB. Insulin like growth factor-I in diabetic vascular complications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 1996;3:335-345.

Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, et al. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabet Care.* 2000;23:504–509.

Grigoryan E, Vasilaki A, Mastrodimou N, Thermos K. Somatostatin receptor immunoreactivity in the eye of the adult newt (*Pleurodeles waltlii* Michan). *Neurosci Lett.* 2003;337:143– 146.

Gründer T, Kohler K, Guenther E. Distribution and developmental regulation of AMPA receptor subunit proteins in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3600-3606.

Hamano K, Kiyama H, Emson PC, Manabe R, Nakauchi M, Tohyama M. Localisation of two calcium-binding proteins, calbindin (28kD) and parvalbumin (12kD), in the vertebrate retina. *J Comp Neurol.* 1990;302:417-424.

Hartveit E, Brandstätter JH, Enz R, Wässle H. Expression of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR1 to 7) in the rat retina. An in situ hybridization study on tissue sections and isolated cells. *Eur J Neurosci.* 1995;7: 1472–1483.

Haverkamp S, Eldred WD. Localization of nNOS in photoreceptor, bipolar and horizontal cells in turtle and rat retinas. *Neuroreport*. 1998;9:2231–2235.

Helboe L, Moller M. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2376–2382.

Hernaez-Ortega MC, Soto-Pedre E, Martin JJ. Somatostatin LAR for cystoid diabetic macular edema: a 1-year experience. *Diabet Res Clin Pract*. 2004;64:71–72.

Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularisation. *Exp Eye Res*. 2002;74:553–559.

Hirasawa H, Shiells R, Yamada M. A metabotropic glutamate receptor regulates transmitter release from cone presynaptic terminals in carp retinal slices. *J Gen Physiol*. 2002;119:55–68.

Hogewind BF, Pieters G, Hoyng CB. Octreotide acetate in dominant cystoid macular dystrophy. *Eur J Ophthalmol*. 2008;18:99–103.

Honkanen RA, Baruah S, Zimmerman MB, et al. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:183–188.

Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:86–88.

Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2008;358:2606–2617.

Jakobs TC, Ben Y, Masland RH. Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol Vis*. 2007;13:933–948.

Jayakar SS, Dikshit J. AMPA receptor regulation mechanisms: future target for safer neuroprotective drugs. *Int J Neurosci*. 2004;6:695–734.

Johnson NF, Grierson I. Post-mortem changes in the rabbit retina. A study by light microscopy. *Acta Ophthalmol.* 1976;54:529-541.

Johnson J, Wong H, Walsh J, Brecha NC. Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 1998;393:93–101.

Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience.* 1999;94:675–683.

Johnson J, Rickman DW, Brecha NC. Somatostatin and somatostatin subtype 2A expression in the mammalian retina. *Micr Res Techn.* 2000;50: 103–111.

Kaiser PK. Antivasular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Amer J Ophthalmol.* 2006;142:660-668.

Kamphuis W, Klooster J, Dijk F. Expression of AMPA-type glutamate receptor subunit (GluR2) in ON-bipolar neurons in the rat retina. *J Comp Neurol.* 2003;455:172–186.

Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 1992;360:467-471.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Essentials of Neural Science and Behavior.* 3^η έκδοση-μεταφρασμένη στα ελληνικά, 2003. Κεφ. 14:270, 22:429-447.

Katai N, Yoshimura N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia- reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2697–2705.

Ke JB, Zhong YM. Expression of somatostatin receptor subtype 5 in rat retinal amacrine cells. *Neuroscience.* 2007;144:1025–1032.

Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B. Assignment of G protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature.* 1992;353:43-48.

Klisovic DD, O' Dorisio MS, Katz SE, et al. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2193-2201.

Koulen P, Kuhn R, Wässle H, Brandstätter JH. Group I metabotropic glutamate receptors mGluR1_ and mGluR5a: localization in both synaptic layers of the rat retina. *J Neurosci.* 1997;17:2200–2211.

Koulen P, Kuhn R, Wässle H, Brandstätter JH. Modulation of intracellular calcium concentration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96:9909–9914.

Kouvidi E, Papadopoulou-Daifoti Z, Thermos K. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci Lett.* 2006;391:82–86.

Kuijpers RW, Baarsma S, van Hagen PM. Treatment of cystoid macular edema with octreotide. *N Engl J Med.* 1998;338:624–626.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.

Lambooij AC, Kuijpers RWAM, van Lichtenauer-Kaligis EGR, et al. Somatostatin receptor 2A expression in choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2329-2335.

Larsen JN, Bersani M, Olcese J, Holst JJ, Moller, M. Somatostatin and prosomatostatin in the retina of the rat: an immunohistochemical, in-situ hybridization, and chromatographic study. *Vis Neurosci.* 1990;5:441–452.

Law F, Manning D, Reisine T. Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J Biol Chem.* 1991;266:17885-17897.

Lei S, Jackson MF, et al. Cyclic GMP-dependent feedback inhibition of AMPA receptors is independent of PKG. *Nat Neurosci.* 2000;3:559–565.

Liapakis G, Thermos K. Characterization of [¹²⁵I] Tyr¹¹- Somatostatin binding sites in the rabbit retina. *Neuropeptides*. 1992;21:13–19.

Liapakis G, Politou E, Thermos K. Solubilization of somatostatin receptors from rabbit retina. *Biochem Pharmacol*. 1993;45:1821–1828.

Lieth E, Barber AJ, Xu B et al. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1998;47:815-820.

Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA, Penn State Retina Research Group. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2000;28:3–8.

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 1994;330:613-622.

Lipton SA. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999;79:1431-1568.

Lipton AJ, Johnson MA, Macdonald T, Lieberman MW, Gozal D, Gaston B. S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature*. 2001;413:171-174.

Liu SJ, Zukin RS. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci*. 2007;30:126–134.

Lu YM, Yin HZ, Chiang J, Weiss JH. Ca⁽²⁺⁾-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca²⁺ influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci*. 1996;16:5457–5465.

Lutty G, Grunwald J, Majji AB, Uyama M, Yoneya S. Changes in choriocapillaris and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 1999;5:35.

Madden DR. The inner workings of the AMPA receptors. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2002;5:741-8.

Mahy N, Woolkalis M, Thermos K, Carlsson K, Manning D, Reisine T. Pertussis toxin modified the somatostatin receptor in anterior pituitary tumor cells. *Pharmacol Exp Ther*. 1988;246:779-785.

Mallet B, Vialettes B, Haroche S, et al. Stabilization of severe proliferative diabetic retinopathy by long-term treatment with SMS 201–995. *Diabet Metab.* 1992;18:438–444.

Manzoni O, Prezeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J, Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron.* 1992;8:653–662.

Masland RH. Amacrine cells. *Trends Neurosci.* 1988;11:405–410.

Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 2001;4:877–886.

Massey SC, Miller RF. Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. *J Physiol.* 1988;405:635–655.

Mastrodimou N, Thermos K. The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosci Lett.* 2004;356:13–16.

Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K. Effect of Somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *N-S Arch Pharmacol.* 2005;371:44–53.

Mastrodimou N, Vasilaki A, Papadioti A, Low MJ, Hoyer D, Thermos K. Somatostatin receptors in wildtype and somatostatin deficient mice and their involvement in nitric oxide physiology in the retina. *Neuropeptides.* 2006a;40:365–373.

Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Hodjarova M, Karagianni E, Thermos, K. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. *Regul Pept.* 2006b;133:41–46.

Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection of retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:342–349.

McCombe M, Lightman S, Eckland DJ, Hamilton AM, Lightman SL. Effect of a long acting somatostatin analogue (BIM23014) on proliferative diabetic retinopathy: a pilot study. *Eye.* 1991;5:569–575.

McLeod DS, Luttly GA, Wajer SD, Flower RW. Visualization of a developing vasculature. *Microvasc Res.* 1987;33:257–269.

McLeod DS, Crone SN, Luttly GA. Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1322-1333.

McMahon DG, Ponomareva LV. Nitric oxide and cGMP modulate retinal glutamate receptors. *J Neurophysiol.* 1996;76:2307–2315.

Meads C, Salas C, Roberts T, Moore D, Fry-Smith A, Hyde C. Clinical effectiveness and cost-utility of photodynamic therapy for wet age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Asses.* 2001;7:9.

Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature.* 1994;369:336–339.

Michaelson I. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1948;68:137-180.

Miller JW, Adamis AP, Shima DT et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol.* 1994;145:574-584.

Missotten T, van Laar JA, van der Loos TL, et al. Octreotide long-acting repeatable for the treatment of chronic macular edema in uveitis. *Am J Ophthalmol.* 2007;144:838–843.

Miyachi E, Hidaka S, Murakami M. Electrical couplings of retinal neurons. In: Toyoda J et al. (Eds.), *The Retinal Basis of Vision.* Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 1999;171-184.

Mori M, Ahara M, Schimizu T. Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. *Neurosci Lett.* 1997; 223:185-188.

Moseley H, Foulds WS, Allan D, Kyle PM. Routes of clearance of radioactive water from the rabbit vitreous. *Br J Ophthalmol.* 1984;68:145–151.

Mosinger JL, Price MT, Bai HY, Xiao H, Wozniak DF, Olney JW. Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp Neurol*. 1991;113:10-17.

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, et al. 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*. 1999;26:47-54.

Napper GA, Kalloniatis M. Neurochemical changes following postmortem ischemia in the rat retina. *Neurosci*. 1999;16:1169-1180.

Neal M, Cunningham J, Matthews K. Selective release of nitric oxide from retinal amacrine and bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:850-853.

Nelson EJ, Connolly J, McArthur P. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol Cell*. 2003;95:3-8.

Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Rev. Drug Discov*. 2006;5:123-132.

Okhuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T, Kuriyama K. Nitric oxide-induced [3H]GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. *J Neurochem*. 1995;65:1109-1114.

Ohkuma S, Katsura M, Higo A, et al. Peroxynitrite affects Ca²⁺ influx through voltage-dependent calcium channels. *J Neurochem*. 2001;76:341-350.

Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*. 2004;89:1057-1091.

Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropath Exp Neurology*. 1969;28:455-474.

Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature*. 1970;227:609-611.

Orlando LR, Dunah AW, Standaert DG, Young AB. Tyrosine phosphorylation of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in striatal neurons. *Neuropharmacology*. 2002;43:161-73.

Osborne NN, Block F, Sontag KH. Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal muller cells. *Vis Neurosci*. 1991;7:637-639.

Osborne NN, McCord RJ, Wood JPM. The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina in vivo. *Neurochemistry*. 1995;20:635-641.

Osborne NN, Wood JP-M, Cupido A, Melena J, Childlow G. Topical flunarizine reduces IOP and protects the retina against ischemia-excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:1456-1464.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23:91-147.

Otori Y, Shimada S, Morimura H, Ishimoto I, Tohyama M, Tano Y. Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: an approach using ligation of the retinal central artery in the rat. *Surv Ophthalmol*. 1997;42:S96-S104.

Palii SS, Afzal A, Shaw LC, et al. Nonpeptide somatostatin receptor agonists specifically targeting ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:5094-5102.

Papadaki T, Tsimbaris M, Thermos K, et al. The role of lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. A Pilot Clinical Trial. *Retina-J Ret Vit Dis*. 2003;23:799-807.

Papadaki T, Zacharopoulos I, Iaccheri B, Fiore T, Foster CS. Somatostatin for uveitic cystoid macular edema (CME). *Ocul Immunol Inflamm*. 2005;13:469-470.

Pemp B, Schmetterer L. Ocular blood flow in diabetes and age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol*. 2008;43:295-301.

Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P. Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. *N-S Arch Pharmacol*. 2001;363:680–694.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*. 1995;34:1-26.

Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 1992;360:464-467.

Porta M, Allione A. Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacol Ther*. 2004;103:167–177.

Pulido JE, Pulido JS, Erie JC, et al. A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp Diab Res*. 2007.

Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of retinal Müller cells. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2002;100:339-352.

Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci Lett*. 1990;119:175–178.

Reisine T. Cellular mechanisms of somatostatin inhibition of calcium influx in the anterior pituitary cell line AtT-20. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;254:646-651.

Reyl FJ, Lewin MJM. Intracellular receptor for somatostatin in gastric mucosal cells: decomposition and reconstitution of somatostatin-stimulated phosphoprotein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:978-982.

Rohrer SP, Birzin ET, Mosley R, et al. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science*. 1998;282:737–740.

Roufail E, Stringer M, Rees S. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining are co-localised in neurons closely associated with the vasculature in rat and human retina. *Brain Res.* 1995;684:36–46.

Sagar SM, Rorstad OP, Landis DMD, Arnold MA, Martin JB. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina. *Brain Res.* 1982;244:91–99.

Sagar SM. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina: immunohistochemical staining using monoclonal antibodies. *J Comp Neurol.* 1987;266:291–299.

Sagar SM, Marshall PE. Somatostatin-like immunoreactive material in associational ganglion cells of human retina. *Neuroscience.* 1988;27:507–516.

Sagar SM. NADPH-diaphorase reactive neurons of the rabbit retina: differential sensitivity to excitotoxins and unusual morphologic features. *J Comp Neurol.* 1990; 300:309–319.

Sakagami K, Kawamura H, Wu DM, Puro DG. Nitric oxide/cGMP induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvasc Res.* 2001;62:196–203.

Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, et al. Molecular cloning and functional characterization of a rat Somatostatin sst2(B) receptor splice variant. *Brit J Pharmacol.* 1998;25:209–217.

Schwarcz R, Coyle JT. Kainic acid: neurotoxic effects after intraocular injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16:141-148.

Shapiro B, Kronheim S, Pimstone B. The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metab Res.* 1979;11:79–80.

Shiells RA, Falk G. The glutamate-receptor linked cGMP cascade of retinal on-bipolar cells is pertussis and cholera toxin-sensitive. *Proc Biol Sci.* 1992;247:17–20.

Shumak SL, Grossman LD, Chew E, Kozousek V, George SR, Singer W, et al. Growth hormone suppression and nonproliferative diabetic retinopathy: a preliminary feasibility study. *Clin Invest Med.* 1990;13:287–292.

Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci.* 1992;8:567-573.

Singh M, Savitz SI, Hoque R, et al. Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J Neurochem.* 2001;466-475.

Smith GG, Baird CD. Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure. *Am J Ophthalmol.* 1952;35:133-136.

Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science.* 1997;276:1706-1709.

Sperk S, Widmann R. Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. *J Neurochem.* 1985;45:1441-1447.

Spraul CW, Kaven CK, Kampmeier JK, Lang GK, Lang GE. Effect of thalidomide, octreotide, and prednisolone on the migration and proliferation of RPE cells in vitro. *Curr Eye Res.* 1999;19:483-490.

Stefansson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T. Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29:1050-1055.

Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1992;89:10955-10959.

Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev.* 2005;85:845-881.

Strosznajder J, Chalimoniuk M, Strosznajder RP, et al. Arachidonate transport through the blood-retina and blood-brain barrier of the rat after reperfusion of varying duration following complete cerebral ischemia. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16:103-113.

Tallent M, Reisine T. G_{ia}1 selectively couples somatostatin receptors to adenylyl cyclase in pituitary-derived AtT-20 cells. *Mol Pharmacol.* 1991;41:452-455.

Tallent MK, Liapakis G, O' Carroll AM, Lolait SJ, Dichter M, Reisine T. Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience*. 1996;71:1073-1081.

Tezel G, Wax MB. Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2660-2667.

Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res*. 2003;43:1805-1815.

Thermos K, Bagnoli P, Epelbaum J, Hoyer D. The somatostatin sst1 receptor: an autoreceptor for somatostatin in brain and retina? *Pharmacol Ther*. 2006;110:455-464.

Thermos K. Novel signals mediating the functions of somatostatin: The emerging role of NO/cGMP. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286:49-57.

Van Hagen PM, Baarsma GS, Mooy CM, et al. Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol*. 2000;143:S43-S51.

Van Hemelrijck A, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Determination of amino acids associated with cerebral ischaemia in rat brain microdialysates using narrowbore liquid chromatography and fluorescence detection. *J Neurosci Meth*. 2005;144:63-71.

Van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA*. 2005;293:1509-1513.

Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Holtt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *Fed Eur Biochem Soci Lett*. 1992;311:290-294.

Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:1600-1609.

Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin influences nitric oxide production in the rat retina. *Neuropharmacology*. 2002;43:899-909.

Vasilaki A, Georgoussi Z, Thermos K. Somatostatin receptors (sst2) are coupled to Go and modulate GTPase activity in the rabbit retina. *J Neurochem.* 2003;84:625–632.

Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, et al. Effect of Somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1499–1506.

Vasilaki A, Thermos K. Somatostatin analogues as therapeutics in retinal disease. *Pharmacol Therap.* 2009;122:324-333.

Veruki ML, Wässle H. Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina. *Eur J Neurosci.* 1996;8:2286-2297.

Veruki ML. Dopaminergic neurons in the rat retina express dopamine D2/3 receptors. *Eur J Neurosci.* 1997;9:1096-1100.

Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas-Perez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. Neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol.* 2001;45:S261-S267.

Vidwans A, Kim S, Coffin DO, Wink DA, Hewet SJ. Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. *J Neurochem.* 1999;72:1843–1852.

Wada M, Ogata N, Otsuji T, Uyama M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res.* 1999;18:203–213.

Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Matsuo A, Lin JX, Ihara M, McGeer PL. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res.* 2002;924:63-70.

Wang HL, Bogen C, Reisine T, Dichter M. Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:9616-9620.

Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honoré T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11:25-33.

White CA, Chalupa LM, Johnson D, Brecha NC. Somatostatin-immunoreactive cells in the adult cat retina. *J Comp Neurol.* 1990;293:134–150.

Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *D Ophthalmol.* 2004;108:17–40.

Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:1-29.

Yamada T, Marshak D, Basinger S, Walsh J, Morley J, Stell W. Somatostatin-like immunoreactivity by frog retinas in vitro. *J Neurochem.* 1980;39:1539–1546.

Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager H, Bell G, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastro-intestinal tract and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:251-255.

Yang XL, Wu SM. Coexistence and function of glutamate receptor subtypes in the horizontal cells of the tiger salamander retina. *Vis Neurosci.* 1991;7:377-382.

Yang XL. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol.* 2004;73:127-150.

Yi X, Mai LC, Uyama M, Yew DT. Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp Brain Res.* 1998;118:155–160.

Yu D, Eldred WD. Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. *J Comp Neurol.* 2005;483:278–291.

Zalutsky RA, Miller RF. The physiology of somatostatin in the rabbit retina. *J Neurosci.* 1990;10:383–393.

Ziche M, Maglione D, Ribatti D et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic. *Lab Invest.* 1997;76:517-531.

Βασιλάκη Α. Διδακτορική Διατριβή: Μοριακή προσέγγιση των υποδοχέων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή. 2001.

Ηλεκτρονικές διευθύνσεις:

www.webvision.med.utah.edu/

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α:

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Όνοματεπώνυμο	Κιαγιαδάκη Φωτεινή
Ημερ. γέννησης	15 Δεκεμβρίου 1981
Τόπος γέννησης	Ηράκλειο Κρήτης
Εθνικότητα	Ελληνική
Οικ. Κατάσταση	Έγγαμη
Διεύθυνση κατοικίας	Αρχάνες, Τ.Κ. 70 100, Ηράκλειο Κρήτης
Τηλ. επικοινωνίας	2810-751383/Κινητό:6944598199,6906451918

ΣΠΟΥΔΕΣ

2001-2005	Φοιτήτρια στο Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2005	Πτυχίο Βιολογίας (με βαθμό 8,08), Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2003 (3 μήνες)	Πρακτική Άσκηση στα πλαίσια του προγράμματος Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ., Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Υπεύθυνος Εργαστηρίου: κος Χ. Τσατσάνης, Επ. Καθηγ. Κλινικής Χημείας)
2005 (6 μήνες)	Διπλωματική Εργασία με θέμα: «Μελέτη του ρόλου της σωματοστατίνης και αναλόγων της στον αμφιβληστροειδή αρουραίου», Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας)
2006-2009	Εκπόνηση Διδακτορικής διατριβής με τίτλο: «In vivo μελέτη της προστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στην αμφιβληστροειδική

διεγερτοτοξικότητα», Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (First Certificate, Michigan. Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας επίπεδο B2)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2005 (4 μήνες) Ερευνήτρια
Συμμετοχή σε ερευνητικά πρωτόκολλα στα πλαίσια του προγράμματος ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ, για τη μελέτη του ρόλου του μονοξειδίου του αζώτου και της ντοπαμίνης στην ρύθμιση των επιπέδων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή (Υπεύθυνη: Κ. Θερμού).
- 2006-2008 (36 μήνες) Εκπόνηση Διδακτορικής διατριβής με τίτλο: «In vino μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στην αμφιβληστροειδική διεγερτοτοξικότητα», Εργαστήριο Φαρμακολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, με σύμβαση ανάθεσης έργου στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ (Υπεύθυνη: Κ. Θερμού).

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΗ ΟΜΙΛΗΤΡΙΑ

- 2007 Aegean Retina X, Rhodes, July 2007

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- 2007 Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας
2008 Ελληνική Εταιρεία Νευροεπιστημών
Federation of European Neuroscience Societies

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Mastrodimou, N., **Kiagiadaki, F.**, Hodjarova, M., Karagianni, E. and Thermos, K. Somatostatin modulates cGMP levels in the rat retina. Involvement of nitric oxide synthase. *Regulatory Peptides* 133: 41-46, 2006.
- **Kiagiadaki, F.**, Koulakis, E. and Thermos, K. Dopamine (D1) receptor activation and nitrinergic agents influence somatostatin levels in rat retina. *Experimental Eye Research* 86: 18-24, 2007.
- Mastrodimou N., **Kiagiadaki F.** and Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection of retinal ischemia. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49: 342-349, 2007.
- **Kiagiadaki F.** and Thermos K. Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49: 3080-3089, 2008.
- **Kiagiadaki F.**, Savvaki M, Thermos K. Activation of somatostatin receptor (sst₅) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology* 58: 297-303, 2010.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. Μαστροδήμου Ν., Hodjarova Μ., Καραγιάννη Ε., **Κιαγιαδάκη Φ.**, Παπάζογλου Μ., Θερμού Κ. Η σωματοστατίνη ρυθμίζει τα επίπεδα του cGMP στον αμφιβληστροειδή αρουραίου. 7^η Επιστημονική Ημερίδα Φαρμακολογίας, Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής, Τόμος 23, σ.78-79 2005.
2. Kouvidi E., Mastrodimou N., **Kiagiadaki F.**, Thermos K. SRIF modulates dopamine and cGMP levels in rat retina. 35th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, D.C., November 2005
3. Mastrodimou N., **Kiagiadaki F.**, Thermos K. Somatostatin modulates cGMP levels in rat retina. Hellenic Society Neuroscience, Patras, September 2005.

4. **F. Kiagiadaki**, M. Koulakis and K. Thermos. D1 receptor activation and cGMP modulate somatostatin release in the rat retina. 20th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, Heraklion, September 2006.
5. **Φ. Κιαγιαδάκη** και Κ. Θερμού. Πρόκληση *in vivo* ισχαιμίας με διεγερτικά αμινοξέα και μελέτη της προστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου. 8^η Ημερίδα Φαρμακολογίας της Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακολογίας, Αθήνα 2007. (Η παρουσίαση αυτή έλαβε έπαινο από την Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας)
6. **Φ. Κιαγιαδάκη**, Μ. Κουλάκης και Κ. Θερμού. Η ενεργοποίηση του D1 υποδοχέα και η cGMP τροποποιούν την απελευθέρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου. 8^η Ημερίδα Φαρμακολογίας της Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2007.
7. **F. Kiagiadaki** and K. Thermos. Somatostatin as a neuromodulator and neuroprotectant in retina. Aegean Retina X, Rhodes, July 2007.
8. **F. Kiagiadaki** and K. Thermos. Intravitreal administration of somatostatin and sst₂ analogs protect the retina from AMPA-induced excitotoxicity. 6th FENS Forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, July 2008.
9. **F. Kiagiadaki** and K. Thermos. Somatostatin and sst₂ analogs protect the retina from AMPA-induced excitotoxicity. 33rd FEBS Congress, Athens, June-July 2008.
10. De Bundel D., **Kiagadaki F.**, Thermos K., Michotte Y. & Smolders I. Insulin-regulated aminopeptidase: a potential target for alternative anti-epileptic therapies? 8th European Congress on Epileptology, Berlin, September 2008.
11. **F. Kiagiadaki** and Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in the somatostatin analog induced protection of the retina from AMPA-induced Excitotoxicity. 22nd Annual Meeting of Neuroscience, Athens, October 2008.
12. Georgiou P.C., **Kiagiadaki F.**, Thermos K. Cannabinoids protect the retina from chemical ischemia. Annual Meeting of Neuroscience, Athens, October 2008.
13. N. Mastrodimitou, **F. Kiagiadaki**, K. Thermos. Somatostatin analogues as therapeutics in retinal disease. Aegean Retina XI, Chania, July 2009.
14. **Kiagiadaki F**, Thermos K. Activation of somatostatin receptor (sst₅) protects the rat retina. 23rd Annual Meeting of Neuroscience, Rhodes, September 2009.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- | | |
|------|--|
| 2008 | FENS / IBRO for attending the FENS Forum in Geneva, July 12-16 |
| 2009 | Υποτροφία του κληροδοτήματος « Μαρία Μιχαήλ Μανασσάκη» ως |

επιβράβευση της υψηλής επίδοσης, για το ακαδημαϊκό έτος 2008-09

ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

2008 Πιστοποιημένη παρακολούθηση σειράς σεμιναρίων διάρκειας 102 ωρών, με θέματα:

- ερευνητική μεθοδολογία
- διοίκηση της έρευνας και της καινοτομίας
- αποτίμηση της τεχνολογίας
- εκμετάλλευση E & T γνώσης και ενσωμάτωσή της στη διαδικασία της οικονομικής και κοινωνικής ανάπτυξης στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 της ΓΓΕΤ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Ανοσοϊστοχημεία
- Χρώση ιστών
- Χρήση μικροσκοπίου
- Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- Ηλεκτροφόρηση DNA
- Ραδιοανοσοανάλυση (RIA)
- Ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA)
- Πρωτογενείς καλλιέργειες αμφιβληστροειδή
- Κυτταροκαλλιέργειες

ΆΛΛΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ

- Χρήση Η/Υ (Windows, Word, Excel, PowerPoint, Internet) - κάτοχος πιστοποιητικού ECDL Progress Certificate
- Χρήση προγράμματος επεξεργασίας εικόνας (Adobe Photoshop) και στατιστικού προγράμματος (Prism)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β:

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Activation of somatostatin receptor (sst₅) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity

Foteini Kiagiadaki^a, Maria Savvaki^b, Kyriaki Thermos^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110, Greece

^b Laboratory of Neuroscience, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2009

Received in revised form

10 June 2009

Accepted 24 June 2009

Keywords:

Neuropeptides

Somatostatin

Somatostatin receptors

Neuroprotection

ABSTRACT

In a recent study, we employed an *in vivo* model of retinal excitotoxicity to investigate the neuroprotective effect of somatostatinergic agents. Intravitreal administration of somatostatin and sst₂ selective agonists protected the retina from (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA) induced excitotoxicity. The sst₁ and sst₄ selective ligands had no effect (Kiagiadaki and Thermos, 2008). The presence of sst₅ receptors in rat retina was only recently reported (Ke and Zhong, 2007). Synthetic agonists that activate sst₂ receptors also bind with high affinity to the sst₅ subtype. In the present study the putative neuroprotective effects of sst₅ receptor activation were investigated. Adult female and male Sprague–Dawley (250–350 g) rats were employed. Groups of animals received intravitreally PBS (50 mM) or AMPA (42 nmol/eye) alone or in combination with L-817,818 (sst₅, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M). To exclude neuroprotective effects via the activation of sst₂ receptors, L-817,818 (10⁻⁴ M) was coinjected with the sst₂ antagonist CYN-154806 (10⁻⁴ M). Immunohistochemistry (IHC) studies using the anti-retinal marker choline acetyltransferase (ChAT) and TUNEL staining were employed to examine retinal cell loss and protection. IHC and Western blot analysis were also employed to assess whether the sst₅ receptors are viable in the AMPA treated tissue as compared to control retina. sst₅ receptors were not affected by AMPA. L-817,818 protected the retina from the AMPA insult in the dose of 10⁻⁴ M, while CYN-154806 (10⁻⁴ M) had no effect on the sst₅ neuroprotection. TUNEL staining confirmed the AMPA-induced retinal toxicity and the L-817,818 neuroprotection. These results demonstrate for the first time that sst₅ receptors are functional in the retina, and that sst₅ analogs administered intravitreally protect the retina from excitotoxicity. Further studies are essential to ascertain the therapeutic relevance of these results.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Glutamate excitotoxicity has been implicated in retinal ischemia, the underlying cause of many ocular diseases that lead to blindness (for review see, Osborne et al., 2004). In retina, glutamate is the leading neurotransmitter. It is released from photoreceptors, bipolar and ganglion cells in the vertical signal pathway and plays a major role in vision transduction by activating different receptor subtypes belonging to the ionotropic (NMDA, kainate and AMPA receptors) and metabotropic receptor families (Brandstätter et al., 1998; Liu and Zukin, 2007).

Evidence from both *in vitro* and *in vivo* studies has suggested a leading role for NMDA receptors in retinal excitotoxicity (Zeevalk and Nicklas, 1990; Sucher et al., 1997; Osborne et al., 2004). The

activation of NMDA receptors, the increase in calcium ions and the subsequent activation of nitric oxide radical formation are believed to be the underlying mechanisms involved in excitotoxicity (Osborne et al., 2004). The non-NMDA receptors, kainate and AMPA, have also been implicated in retinal ischemic insults (Huang et al., 1991; Cui and Harvey, 1995; Osborne and Larsen, 1996). Kainate-induced cultured chick amacrine-like cell damage was shown to be mediated by AMPA (Ferreira et al., 1998). Also, intra-ocular injections of kainate caused changes in GABA and ChAT containing cells (Osborne et al., 1995a,b).

Many strategies have been employed in order to develop therapeutic agents for the successful treatment of ischemia-induced retinopathies and the prevention of blindness, but with minimum success. There is still a need for pharmacological agents that are efficacious and lack adverse effects. Recently, we focused on the use of the neuropeptide somatostatin as a putative neuroprotective agent in retinal ischemia (Vasilaki and Thermos, 2009).

* Corresponding author. Tel.: +30 2810 394533; fax: +30 2810 394530.

E-mail address: thermos@med.uoc.gr (K. Thermos).

Somatostatin (somatotropin release inhibitory factor, SRIF, Brazeau et al., 1973) is found in the retina (Shapiro et al., 1979), where it activates somatostatin receptors (ss_{1-5} , Hoyer et al., 1995), found in retinal neurons and the retinal pigment epithelium (RPE) (see review by Thermos, 2003). SRIF and its ss_2 analogs were shown to inhibit the ischemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen induced retinopathy (Smith et al., 1997; Higgins et al., 2002) and depicted neuroprotective effects against NMDA and kainate-induced excitotoxicity in the central nervous system (Forloni et al., 1997; Braun et al., 1998).

In rat retina, $ss_{2/5}$ selective ligands (BIM23014, MK678 and cortistatin) protected the retina from ischemic insult (Mastrodimo et al., 2005) in an *in vitro* model of chemical ischemia (NaCN/iodoacetic acid; Reiner et al., 1990). Octreotide ($ss_{2/5}$ ligand) was also shown to protect the guinea pig retina from ischemia reperfusion injury (Celiker and Ilhan, 2002). To complement the above-mentioned studies, experiments in mice showed that overexpression of ss_2 receptors, in mice lacking the ss_1 subtype, prevented retinal ischemia produced by iodoacetic acid and hypoxia (Catalani et al., 2007). Most recently, we investigated whether the excitatory amino acid AMPA could be used as a model of excitotoxicity *in vivo* to test the neuroprotective properties of somatostatin and analogs. AMPA completely eliminated ChAT immunoreactivity, while it had no effect on photoreceptor, rod bipolar or ganglion cell markers. ss_2 selective ligands (BIM23014 and L-779,976) afforded protection, while the selective ss_1 and ss_4 ligands had no effect (Kiagiadaki and Thermos, 2008). The latter *in vivo* study confirmed the importance of the ss_2 receptor in the neuroprotective properties of SRIF. However, it does not negate the possibility that ss_5 may also play an important role in SRIF's actions as a neuroprotectant.

While the presence of ss_1 , ss_2 and ss_4 receptors on specific retinal neurons has been established in the rat (for review see: Thermos, 2003), the location of the ss_5 subtype was only recently reported in rat retina (Ke and Zhong, 2007). These investigators presented evidence to support the presence of ss_5 receptors on retinal GABAergic, dopaminergic and cholinergic amacrine cells. ss_5 belongs to the SRIF 1 receptor group which comprises subtypes ss_2 , ss_3 and ss_5 (Olias et al., 2004). As mentioned above, many ss_2 ligands such as BIM23014, MK678 and octreotide also display high affinity for the ss_5 receptor subtype (Olias et al., 2004). Therefore, the aim of the present study was to examine the involvement of ss_5 in SRIF's and possibly the ss_2 analogs' neuroprotective actions against AMPA excitotoxicity in the retina.

2. Methods

2.1. Animals

Adult male and female Sprague–Dawley rats (250–350 g) were housed 2–3 animals per cage with free access to food and water at room temperature. A 12-hour light–dark cycle was maintained. Euthanasia was performed with ether inhalations. All procedures that were performed on the animals were in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and in compliance with Greek National Laws (Animal Act, P.D. 160/91).

2.2. AMPA excitotoxicity and neuroprotection

The animals were anesthetized with intramuscular injections of xylazine (14.5 mg/kg) and ketamine (200 mg/kg) and placed in a stereotaxic instrument to stabilize the head and facilitate the intravitreal administration. Injections were made with 30-gauge needles connected to a Hamilton syringe adapted to a mini-pump. The tip of the needle was inserted behind the sclera–cornea border into the vitreous humor. Each intravitreal injection was performed with a flow rate of 1 μ l/min for 5 min.

One eye received phosphate-buffered saline (50 mM K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.9% NaCl, pH = 7.4) as control and the other eye received AMPA (Tocris) 42 nmol/eye diluted in PBS 50 mM. Neuroprotection experiments involved the injection of AMPA (42 nmol/eye) in combination with L-817,818 [ss_5 selective analog, (0.05 nmol/eye, $n = 3$),

(0.5 nmol/eye, $n = 6$)]. To examine the possible involvement of the ss_2 receptor in the neuroprotective effects of L-817,818, the ss_2 antagonist CYN-154806 (0.5 nmol/eye, $n = 6$) was coinjected with AMPA (42 nmol/eye) and L-817,818 (0.5 nmol/eye). All animals were killed 24 h after treatment.

2.3. Immunohistochemical studies

2.3.1. Tissue preparation

After each treatment, the eyes were removed and the eyecups were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 1 h at 4 °C. After fixation, eyecups were rinsed in PB and incubated in 30% sucrose overnight, at 4 °C for cryoprotection. Tissues were frozen in isopentane at –45 °C for 1 min and kept at –80 °C until further use. Eyecups were sectioned vertically at 10 μ m thickness using a cryostat, thaw mounted on super frost slides and stored at –20 °C. Slices were cut near the optic nerve, every 100 μ m. Nine slices were put on every slide.

2.3.2. Immunohistochemistry

A mouse monoclonal antibody raised against ChAT (1:100, Chemicon, Temecula, CA) was employed as a retinal marker to assess cholinergic neuron viability. Rabbit polyclonal antisera (kindly provided by Prof. S. Schulz) for somatostatin receptor subtypes ss_2 (1:10) and ss_5 (1:1000) were also used for the detection of ss_2 and ss_5 expression patterns in rat retina, respectively.

Cryostat sections were incubated in 0.1 M Tris–HCl buffer; TBS, pH 7.4 containing 3.3% normal goat serum for 30 min, washed in 0.1 M TBS and incubated with the primary antibodies in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1.5 h with the appropriate secondary antibody, Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (H + L) (1:400, Molecular Probes, Eugene, U.S.A.) for the monoclonal antibody or AlexaFluor546 goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:400, Molecular Probes, Eugene, U.S.A.) for the polyclonal antibodies. Finally, the sections were washed and coverslipped with mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Negative controls were included by omitting the primary antibody. The ss_5 localization studies in control and AMPA treated retinas were repeated three times ($n = 3$).

To examine whether the ss_2 receptor is localized in cholinergic rat retinal neurons, colocalization (double labeling) studies were performed ($n = 2$). Sections from tissues treated with PBS were initially incubated with anti-ChAT antibody (1:100) overnight, followed by incubation with the appropriate secondary antibody (anti-mouse, AlexaFluor488). Subsequently, the sections were incubated overnight with the anti- ss_2 antibody (1:10) followed by incubation with the corresponding secondary antibody (anti-rabbit, AlexaFluor546) and coverslipped.

2.3.3. TUNEL staining

To determine cell loss, enzymatic *in situ* labeling of apoptosis induced DNA strand breaks was performed ($n = 2$) using the terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated TMR-dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (Roche, Germany).

2.4. Western blotting

Animals were euthanized and retinas were removed and homogenised using an Ultra-Turrax homogeniser in Tris–HCl, pH 7.4. Due to the scarcity of the tissues the whole membrane preparation (homogenate) was employed. Retinal samples (13 μ g) were subjected to 8% SDS-PAGE and immunoblotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated with a rabbit polyclonal antibody against SRIF receptor subtype ss_5 (1:1500, kindly provided by Prof S. Schulz, Germany) overnight at 4 °C. In addition, immunoblotting was performed using an antibody against actin (1:4000, Chemicon). Blots were developed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence. These experiments were performed twice using different preparations of retinas ($n = 2$). To measure the optical density of the bands in each blot the TinaScan 2.0 program was employed. Ratios of the ss_5 /actin bands were evaluated in the control and AMPA treated samples.

2.5. Microscopy

Light microscopy images were taken with a Zeiss Axioskop with Plan-Neofluar $\times 40/0.75$. Confocal microscopy images were taken with a Leica DM RE laser-scanning microscope (He/Ne Laser) with HP Plan APO $\times 40/0.75$. Optic sections were taken with a z-axis resolution of 1.1 μ m through the immunolabeled cells. Light and contrast adjustment of images were processed with the use of Adobe Photoshop software (version 5.0).

3. Results

3.1. Effect of AMPA on ss_5 expression

Immunohistochemistry studies were performed to identify the localization of ss_5 receptors in the retina. In addition, the effect of

AMPA treatment on *sst5* immunoreactivity was investigated. *sst5* immunoreactivity is localized on neuronal processes and some cell somata in the inner plexiform layer (IPL, Fig. 1A, see arrows and arrowheads), and in the outer segments of photoreceptors (see black arrows). The AMPA treatment did not affect *sst5* immunoreactivity as compared to the control retinas (Fig. 1B).

In addition, western blot analysis was performed using crude protein preparations of PBS and AMPA treated retinas ($n = 2$). A protein of apparent molecular mass of approximately 97 kDa was observed in the control and AMPA treated retinas (Fig. 1C). Actin immunoblots were also examined in the two samples in order to substantiate that equal protein concentrations were applied. The optical density of the 97 kDa band in control and AMPA samples was measured and the ratio of *sst5*/actin was calibrated. No differences were evident between the PBS and AMPA treated retinas.

3.2. Effect of the *sst5* selective analog L-817,818 on AMPA-induced retinal excitotoxicity

AMPA (42 nmol/eye) reduced ChAT immunoreactivity in the retina (Fig. 2B) as compared to control (Fig. 2A). The *sst5* ligand L-817,818, infused with AMPA at the dose of 0.05 nmol/eye had no effect (Fig. 2C). At the higher dose of 0.5 nmol/eye it protected the retina from AMPA toxicity (Fig. 2D). ChAT immunoreactivity was recovered partially in processes and cell somata (approximately 20%) (Fig. 2D, see arrows and arrowheads). A higher dose of L-817,818 was not employed in order to avoid nonspecific actions.

TUNEL staining was also used to assess retinal cell death by AMPA and protection by the L-817,818 analog. As shown in Fig. 3, AMPA (B) increased the number of apoptotic cells in the retina as compared to control tissue (A). L-817,818 (0.5 nmol/eye) acted in an anti-apoptotic manner, reversing AMPA's apoptotic effects (Fig. 3C). The results confirm the excitotoxic effect of AMPA and the protection afforded by L-817,818.

3.3. Effect of the *sst2* antagonist CYN-154806 on the L-817,818 dependent protection from AMPA-induced retinal excitotoxicity

L-817,818 is a selective *sst5* agonist, yet at the dose of 0.5 nmol/eye (10^{-4} M) it may activate *sst2* receptors (Rohrer et al., 1998). In order to exclude this possibility, blockade of the *sst2* receptors was accomplished by coinjecting the *sst2* antagonist CYN-154806

(0.5 nmol/eye) with L-817,818 (10^{-4} M) and AMPA (Fig. 4). CYN-154806 had no effect on the neuroprotective effect of the *sst5* ligand against the AMPA-induced retinal excitotoxicity (Fig. 4D). The photos in panels A–D were taken under the exact conditions even though panels A, B, and C appear to have a higher background. The presence of ChAT immunoreactive somata (Fig. 4A, C and D, arrow heads) was substantiated by DAPI staining (data not shown). These results suggest that *sst5* activation, independently of *sst2* actions, protects the retina from AMPA neurotoxicity.

3.4. The *sst2* and ChAT colocalization studies

No reports have been published to date to suggest *sst2* receptor localization on cholinergic amacrine retinal neurons. Therefore, colocalization studies were performed to investigate this possibility. ChAT immunoreactivity (somata and processes, Fig. 5A) and *sst2* immunoreactivity (somata, Fig. 5B) were localized in the IPL. ChAT immunoreactivity was colocalized with the *sst2* receptor only on cell somata (Fig. 5C, see arrowheads). No colocalization was observed in the processes of cholinergic neurons (Fig. 5C, see arrows). These data suggest the presence of this receptor subtype on cholinergic neurons. Therefore, activation of the *sst2* receptor by somatostatin or selective ligands may influence acetylcholine release and cholinergic amacrine cell physiology.

4. Discussion

SRIF is released from a subclass of amacrine cells in the retina (Shapiro et al., 1979) and plays a neuromodulatory role in retinal circuitry by activating its receptors (*sst1–5*) found in different retinal neurons (Thermos, 2003). In the rat, *sst1* is the autoreceptor for SRIF in retina (Thermos et al., 2006), and also influences dopamine release (Kouvidi et al., 2006). The *sst2* receptor regulates dopamine (Kouvidi et al., 2006), nitric oxide (Vasilaki et al., 2002) in rat, and glutamate release in mouse retina (Bigiani et al., 2004). The *sst4* receptors have been located on rat ganglion cells (Vasilaki et al., 2002) and may influence glutamate release from these cells. However, no neurochemical data are available to substantiate this hypothesis. Till recently, these three *sst*s (*sst1,2,4*) were believed to be responsible for SRIF's actions in mammalian retina. However, Ke and Zhong (2007) recently reported the presence of *sst5* receptors in retinal amacrine cells that express GABA, dopamine and

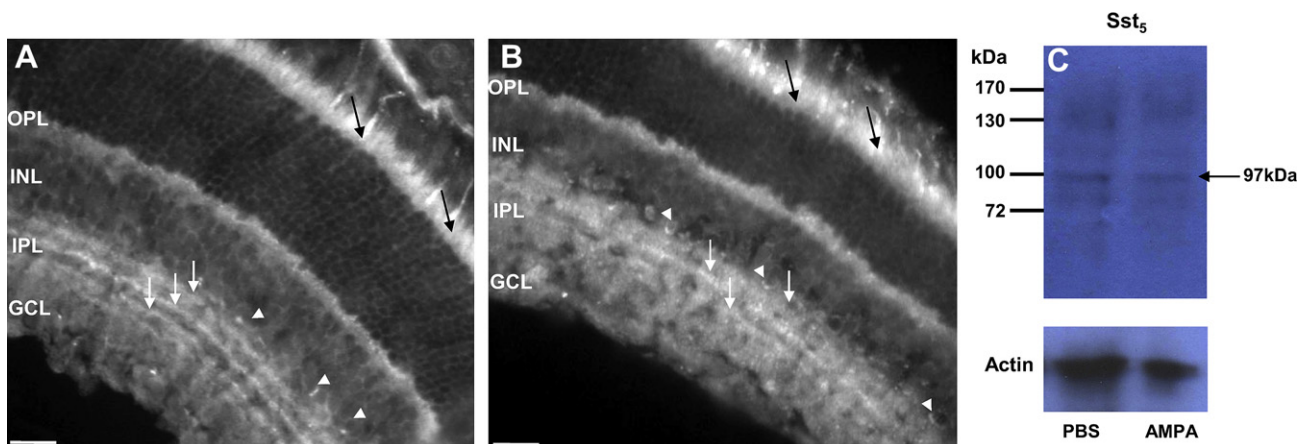


Fig. 1. Effect of AMPA on *sst5* expression. *Sst5* immunoreactivity in (A) PBS- (control; $n = 3$) and (B) AMPA (42 nmol; $n = 3$)-treated rat retinas. The *sst5* immunoreactive processes are shown by "white" arrows and cell somata by arrowheads. *Sst5* immunoreactivity was also observed on the outer segments of photoreceptors (black arrows). ONL – outer nuclear layer, INL – inner nuclear layer, IPL – inner plexiform layer, and GCL – ganglion cell layer. Scale bars = 20 μ m. Western blot studies on PBS and AMPA treated retinal homogenates ($n = 2$). A protein of approximate molecular mass of 97 kDa was detected in the control retina and AMPA treated retinas (C). No differences in the expression of the receptor protein were observed in the two retinal groups. This was established by the ratio of *sst5*/actin immunodetection.

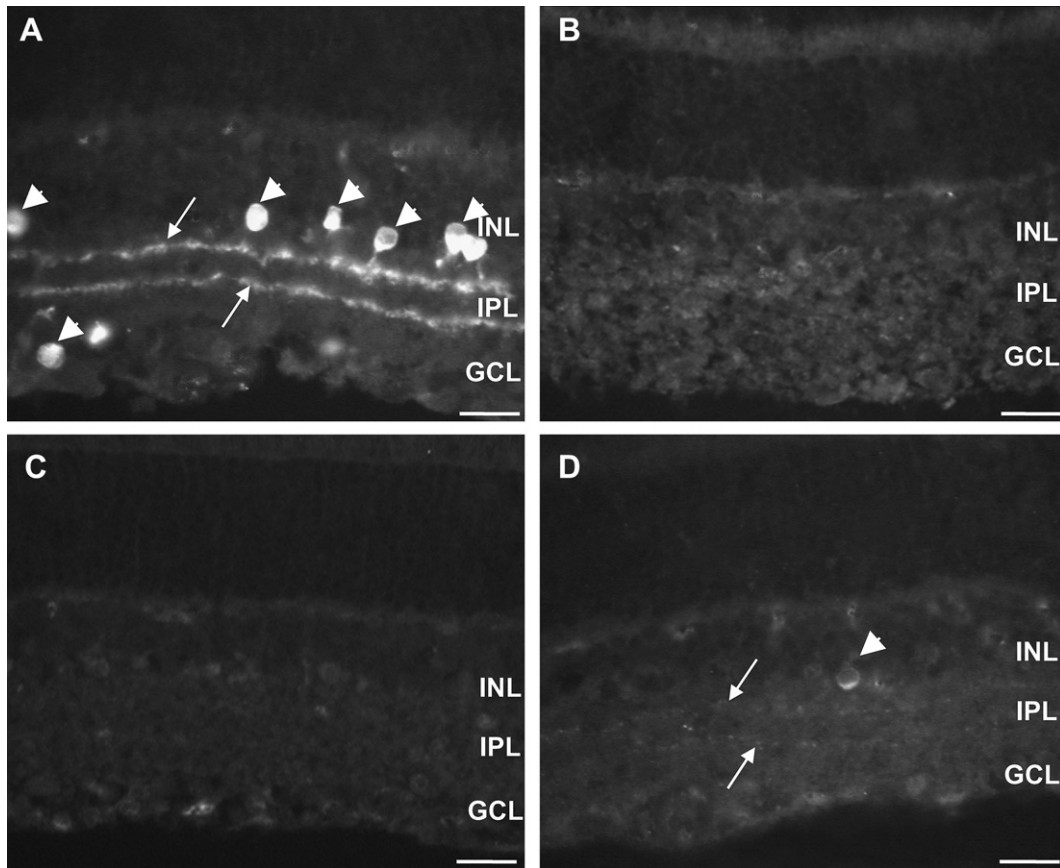


Fig. 2. Effect of the sst_5 selective analog L-817,818 on AMPA-induced retinal excitotoxicity. ChAT immunoreactivity in (A) PBS- (control; $n = 6$) and (B) AMPA (42 nmol; $n = 6$)-treated rat retinas. (C) Coinjected with AMPA (42 nmol), the sst_5 selective analog L-817,818 (10^{-5} M; $n = 3$) did not offer any protection, while (D) L-817,818 (10^{-4} M; $n = 6$) partially protected amacrine cholinergic neurons. ChAT immunoreactive processes are shown by arrows and cell somata by arrowheads. INL – inner nuclear layer, IPL – inner plexiform layer, and GCL – ganglion cell layer. Scale bars = 20 μ m.

acetylcholine. These investigators also suggested that the sst_5 may also play an autoreceptor role in addition to its “conventional” receptor actions. However, no functional evidence has been reported to substantiate either the autoreceptor role of this subtype or its involvement in the release of GABA, dopamine or acetylcholine.

The presence of sst_5 in the retina raises important questions as to which receptor is responsible for the actions of the $sst_{2/5}$ ligands. Agonists such as octreotide, BIM23014, and MK678 have high affinity for both sst_2 and sst_5 receptors (Olias et al., 2004). The findings of the present study confirm the conjecture that the sst_5

receptor also affords neuroprotection to the retina. The sst_5 specific ligand (L-817,818) administered intravitreally protected the retina from AMPA excitotoxicity. In a previous study, we showed that sst_2 analogs were also protective against AMPA excitotoxicity. ChAT immunoreactivity was fully reversed in the presence of BIM23014 and L-779,976 (10^{-4} M, Kiagiadaki and Thermos, 2008), yet only partial reversal was observed when the sst_5 specific ligand L-817,818 was employed in the same concentration (present study). This was also substantiated by TUNEL staining. The differences in efficacy between the two ligands may be due to a lower maximum

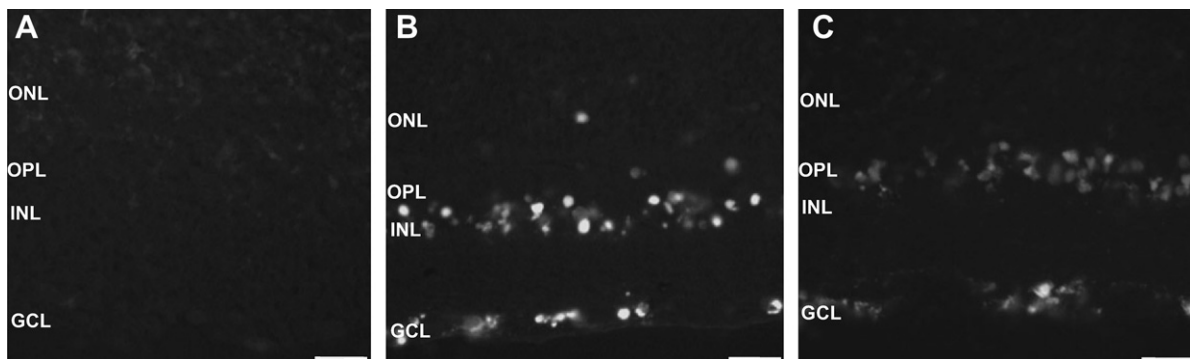


Fig. 3. Effect of the sst_5 selective analog L-817,818 on AMPA-induced retinal apoptosis. TUNEL staining in (A) PBS- (control; $n = 2$), (B) AMPA 42 nmol ($n = 2$)- and (C) AMPA 42 nmol + L-817,818 (10^{-4} M; $n = 2$)- treated retinas. AMPA afforded excitotoxic effects as compared to control. L-817,818 partially protected the retina from AMPA-induced apoptosis. ONL – outer nuclear layer, OPL – outer plexiform layer, INL – inner nuclear layer, GCL – ganglion cell layer. Scale bars = 20 μ m.

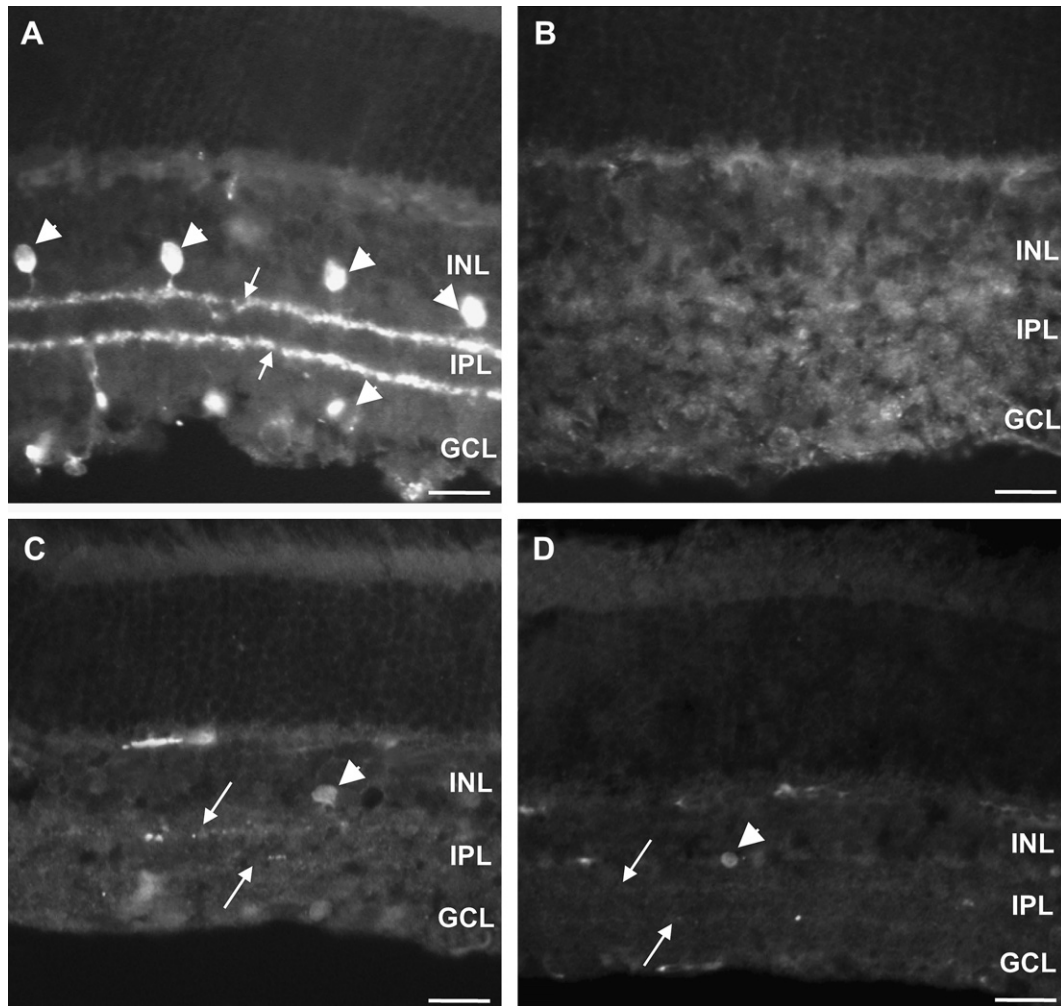


Fig. 4. Effect of the sst_2 antagonist CYN-154806 on the L-817,818 dependent protection from AMPA-induced retinal excitotoxicity. ChAT immunoreactivity in (A) PBS- (control; $n = 6$) and (B) AMPA (42 nmol; $n = 6$)- treated rat retinas. (C) Coinjected with AMPA (42 nmol) the sst_5 selective analog L-817,818 (10^{-4} M; $n = 6$) partially protected the amacrine cholinergic neurons. (D) The sst_2 selective antagonist CYN-154806 (10^{-4} M; $n = 6$) had no effect on the L-817,818 protection. ChAT immunoreactive processes are shown by arrows and cell somata by arrowheads. INL – inner nuclear layer, IPL – inner plexiform layer, and GCL – ganglion cell layer. Scale bars = 20 μ m.

number of sst_5 receptor binding sites (B_{max}) in the retina. In an earlier study, we reported that L-817,818 (1 μ M) failed to inhibit [125 I]Tyr11-somatostatin binding to rabbit retinal membranes (Vasilaki et al., 2003). Radioligand binding assays ([125 I]octreotide, [125 I]Tyr11-somatostatin) either in retinal membranes or in retinal sections with subsequent autoradiography may provide answers regarding the B_{max} of these receptors in the retina. However, due to the fact that the sst_2 subtype is the predominant one in the retina (Thermos, 2003) and that the available radioligands label both sst_2 and sst_5 receptors, it is critical to employ the appropriate selective ligands to define sst_2 and sst_5 specific binding.

The sst_5 receptor immunoreactivity was reported to be diffusely distributed throughout the inner plexiform layer (IPL) and formed two distinct fluorescence bands in the distal part of the IPL (Ke and Zhong, 2007). In agreement with this study, we detected sst_5 receptor immunoreactivity in neuronal processes and some cell somata in the IPL. In addition, we also noted sst_5 receptor immunoreactivity in the outer plexiform layer (OPL) and in the outer segments of photoreceptors. AMPA had no effect on the viability of the sst_5 receptors. This was further substantiated by western blot analysis (Fig. 1C). A 97 kDa protein was immunodetected for the sst_5 receptor in the retina. A protein of a similar molecular mass, namely 92 kDa, was observed in a membrane preparation of human

retinal pigment epithelium cells (Papadaki et al., unpublished data). A broad set of bands spreading between 30 and 75 kDa was detected by a sst_5 antibody in membranes prepared from COS-7 cells transfected with cDNA encoding the rat sst_5 receptor (Stroh et al., 1999). However, there are very few reports in the literature on the expression of sst_5 and its physical characteristics in different tissues where a variability of molecular masses may be observed.

Ke and Zhong (2007) also performed double labeling experiments and reported the expression of this receptor subtype on the cell membrane and somatodendritic compartments of GABAergic, dopaminergic and cholinergic amacrine cells. Weak sst_5 immunoreactivity was also noted on cholinergic processes.

As mentioned earlier, sst_2 analogs protected the retina from AMPA excitotoxicity (10^{-4} M) as detected by ChAT immunoreactivity (Kiagiadaki and Thermos, 2008). The sst_2 subtype is the predominant one in rat retina. sst_2 receptors have been localized on medium sized amacrine cells in the INL, large amacrine cells of the IPL coexpressing TH, and inner segments of cone photoreceptors (Helboe and Moller, 1999). The use of specific antibodies raised against the two isoforms of the sst_2 receptor, namely sst_{2A} and sst_{2B} , depicted the presence of the sst_{2A} in rod bipolar cells, horizontal cells and cone photoreceptors as well as TH-containing amacrine cells in the rat (Johnson et al., 1999; Vasilaki et al., 2001). The sst_{2B} receptors

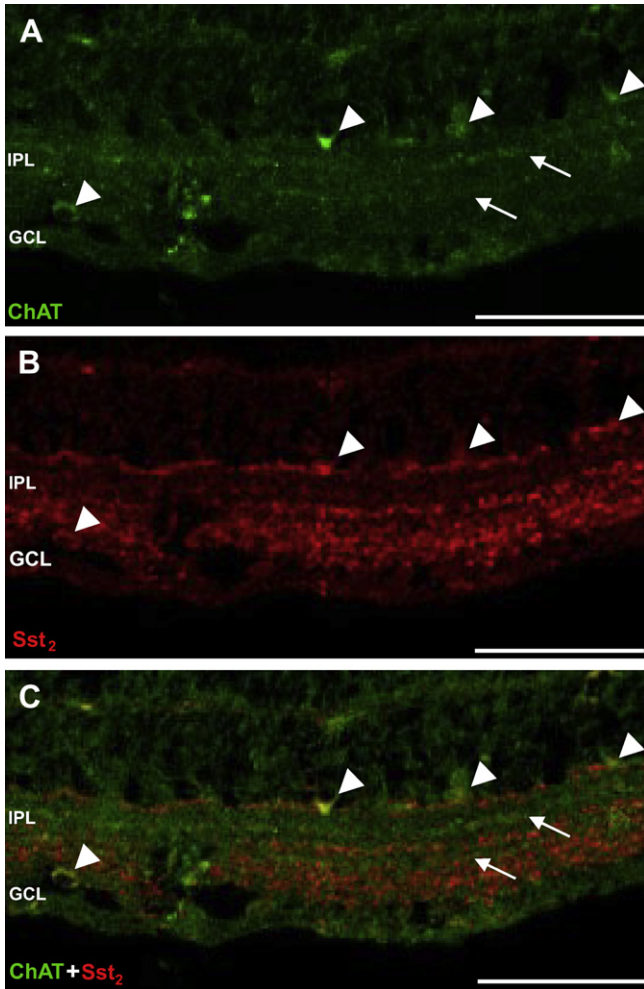


Fig. 5. ss_{t2} and ChAT colocalization studies. Confocal images of colocalization study (double labeling) of somatostatin receptor 2 on cholinergic neurons in rat retina. (A) ChAT immunoreactivity is shown in somata (arrowheads) and processes (arrows) of cholinergic neurons. (B) ss_{t2} immunoreactivity is shown in somata (arrowheads) (C) Arrowheads show the cell somata of ChAT-expressing amacrine neurons where the ss_{t2} staining is also observed. Arrows show the ChAT immunoreactive processes where the ss_{t2} staining is not observed. IPL – inner plexiform layer, and GCL – ganglion cell layer. The study was performed using PBS-treated retinas ($n = 2$). Scale bars = 20 μ m.

were found to be localized only in the outer segments of photoreceptors (Vasilaki et al., 2001). No reports were available to suggest the presence of ss_{t2} receptors on cholinergic neurons. To investigate this possibility double labeling experiments were performed in the present study and the results confirmed the presence of ss_{t2} receptors on ChAT immunoreactive amacrine cells. Therefore, cholinergic amacrine cells express both ss_{t2} and ss_{t5} receptors.

L-817,818 has high affinity and specificity for the ss_{t5} receptor (Rohrer et al., 1998). However, at the concentrations employed in the present study it could bind to the ss_{t2} receptors located on cholinergic cells. We examined this possibility by coinjecting the ss_{t2} antagonist CYN-154806 with the L-817,818 analog. The results showed that blockade of the ss_{t2} receptor did not affect the ss_{t5} neuroprotective effects. Therefore, ss_{t5} receptor activation provides neuroprotection in the retina against excitotoxicity when the ss_{t5} selective ligand is administered intravitreally, *in vivo*.

Some studies in the literature have focused on the use of $ss_{t2/5}$ analogs in the therapeutics of retinal diseases. In a case study octreotide (100 μ g, s.c.) was administered three times daily for eight months to a 52-year-old female with cystoid macular edema

(CME) (Papadaki et al., 2005), and an improvement of the patient's visual acuity and the partial resolution of CME was observed. Also, the $ss_{t2/5}$ analog BIM23014 (Somatuline) was administered (sc, twice/month for 6 months) to patients with age related maculopathy and found to stabilize the patients' visual acuity (Papadaki et al., 2003). The intravitreal administration of $ss_{t2/5}$ analogs may provide better results.

Very few studies in the literature have shown the intravitreal effects of $ss_{t2/5}$ analogs in animal models of retinopathies. Octreotide acetate was injected into the vitreous cavity of kitten eyes and the long acting octreotide-LAR was also injected into the mid-vitreous of rabbit eyes (Robertson et al., 1997). This study concluded that intravitreal doses of up to 1.1 mg of the long acting analog could provide sustained high concentrations of the drug that would render it useful as a potential treatment of proliferative eye disease.

The present study offers new *in vivo* evidence to suggest that the ss_{t5} receptors are functional in the retina. Due to the paucity of the ss_{t5} selective agents only the L-817,818 analog (Rohrer et al., 1998) was employed. While a partial protection from AMPA neurotoxicity was noted, the results (ChAT and TUNEL immunoreactivity data) recommend that ss_{t5} ligands are promising neuroprotectants in retinal diseases whose pathophysiology involves excitotoxic insults. Also, this study provides evidence to support the localization of both ss_{t2} and ss_{t5} on cholinergic amacrine cells. Further investigations involving techniques other than immunohistochemistry are essential in order to examine whether a combination of ss_{t2} and ss_{t5} ligands would provide better protection.

The mechanisms via which SRIFergic ligands act as neuroprotectants are still under investigation. SRIF may reduce excitotoxicity by influencing glutamate or calcium levels in the retina (Vasilaki and Themos, 2009). SRIF is known to inhibit voltage-gated calcium channels via its activation of both ss_{t2} and ss_{t5} receptors (Tallent et al., 1996), and neuronal calcium currents, the latter via a mechanism involving a cGMP-dependent protein kinase (Meriney et al., 1994). In a recent study, we showed that NO/peroxynitrite and cGMP are important mediators in the protection of rat retina from chemical ischemia, and that a NO/sGC/cGMP signaling pathway is involved in the neuroprotective effects bestowed on the retina by the ss_{t2} SRIF ligands in the same model (Mastrodimou et al., 2008). However, ss_{t5} receptor activation did not lead to increases in NO levels in the retina, as was observed with ss_{t2} activation (Vasilaki et al., 2002). Thus, this is not a plausible mechanism for the ss_{t5} neuroprotective effects in the present model. The inhibitory neurotransmitter GABA, however, may be involved in the ss_{t5} receptor mediated protection. ss_{t5} expression was reported on somatodendritic compartments of GABAergic amacrine cells (Ke and Zhong, 2007). Activation of these receptors by SRIF may lead to the increase of GABA levels and neuroprotection via the activation of GABAergic receptors (Osborne et al., 2004). Further experiments are essential to provide the necessary data to substantiate this hypothesis.

In conclusion, these results emphasize the need and recommend the synthesis of new ss_{t5} selective agents to further study their role in retinal circuitry and their importance in the therapeutics of retinal disease.

Acknowledgements

This work was co-financed by E.U. European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%) [Program PENED to K.T]. The L-analog was kindly provided by Merck Research Laboratories (Rahway, N.J., USA) and the CYN-154806 analog by Dr D. Hoyer (Novartis Institutes of Biomedical Research, Basel, CH).

References

- Bigiani, A., Petrucci, C., Ghiaroni, V., Dal Monte, M., Cozzi, A., Kreienkamp, H.J., Richter, D., Bagnoli, P., 2004. Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. *Brain Research* 29, 177–185.
- Brandstätter, J.H., Koulen, P., Wässle, H., 1998. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Research* 38, 1385–1397.
- Braun, H., Schulz, S., Becher, A., Schroder, H., Holtt, V., 1998. Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Research* 803, 54–60.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77–79.
- Catalani, E., Cervia, D., Martini, D., Bagnoli, P., Simonetti, E., Timperio, A.M., Casini, G., 2007. Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *European Journal of Neuroscience* 25, 1447–1459.
- Celiker, U., Ilhan, N., 2002. Nitric oxide and octreotide in retinal ischemia-reperfusion injury. *Documenta Ophthalmologica* 105, 327–338.
- Cui, Q., Harvey, A.R., 1995. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *Journal of Neuroscience* 15, 8143–8155.
- Ferreira, I.L., Duarte, C.B., Carvalho, A.P., 1998. Kainate-induced retina amacrine-like cell damage is mediated by AMPA receptors. *Neuroreport* 26, 3471–3475.
- Forloni, G., Lucca, E., Angeretti, N., Chiessa, R., Vezzani, A., 1997. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *Journal of Neurochemistry* 68, 319–327.
- Helboe, L., Moller, M., 1999. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 40, 2376–2382.
- Higgins, R.D., Yan, Y., Schrier, B.K., 2002. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularisation. *Experimental Eye Research* 74, 553–559.
- Hoyer, D., Bell, G.I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.P.A., O'Carroll, A.-M., Patel, Y.C., Schonbrunn, A., Taylor, J.E., Reisine, T., 1995. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends in Pharmacological Science* 16, 86–88.
- Huang, J.C., Salt, T.E., Voaden, M.J., Marshall, J., 1991. Non-competitive NMDA-receptor antagonists and anoxic degeneration of the ERG B-wave in vitro. *Eye* 5, 476–580.
- Johnson, J., Wu, V., Wong, H., Walsh, J.H., Brecha, N.C., 1999. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience* 94, 675–683.
- Ke, J.B., Zhong, Y.M., 2007. Expression of somatostatin receptor subtype 5 in rat retinal amacrine cells. *Neuroscience* 144, 1025–1032.
- Kiagiadaki, F., Thermos, K., 2008. Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst₂ analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49, 3080–3089.
- Kouvidi, E., Papadopoulou-Daifoti, Z., Thermos, K., 2006. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neuroscience Letters* 391, 82–86.
- Liu, S.J., Zukin, R.S., 2007. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in Neuroscience* 30, 126–134.
- Mastrodimou, N., Lambrou, G.N., Thermos, K., 2005. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn-Schmiedebergs' Archives of Pharmacology* 371, 44–53.
- Mastrodimou, N., Kiagiadaki, F., Thermos, K., 2008. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection against retinal ischemia. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49, 342–349.
- Meriney, S.D., Gray, D.B., Pilar, G.R., 1994. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369, 336–339.
- Olias, G., Viollet, C., Kusserow, H., Epelbaum, J., Meyerhof, W., 2004. Regulation and function of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry* 89, 1057–1091.
- Osborne, N.N., Larsen, A.K., 1996. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochemistry International* 29, 263–270.
- Osborne, N.N., Larsen, A., Barnett, N.L., 1995a. Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 36, 1692–1700.
- Osborne, N.N., McCord, R.J., Wood, J.P.M., 1995b. The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina in vivo. *Neurochemistry* 20, 635–641.
- Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P., Chidlow, G., Graham, M., Melena, J., 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress of Retinal and Eye Research* 21, 91–147.
- Papadaki, T., Tsilimbaris, M., Thermos, K., Karavellas, M., Samonakis, D., Papadakis, A., Linardakis, M., Kouroumalis, E., Pallikaris, I., 2003. The role of lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: a pilot clinical trial. *Retina* 23, 800–807.
- Papadaki, T., Zacharopoulos, I., Iaccheri, B., Fiore, T., Foster, C.S., 2005. Somatostatin for uveitic cystoid macular edema (CME). *Ocular Immunology and Inflammation* 13, 469–470.
- Reiner, P.B., Laycock, A.G., Doll, C.J., 1990. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neuroscience Letters* 119, 175–178.
- Robertson, J.E., Westra, I., Woltering, E.A., Winthrop, K.L., Barrie, R., O'Dorisio, T.M., Holmes, D., 1997. Intravitreal injection of octreotide acetate. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 13, 171–177.
- Rohrer, S.P., Birzin, E.T., Mosley, R.T., Berk, S.C., Hutchins, S.M., Shen, D.M., Xiong, Y., Hayes, E.C., Parmar, R.M., Foor, F., Mitra, S.W., Degrado, S.J., Shu, M., Klopp, J.M., Cai, S.J., Blake, A., Chan, W.W., Pasternak, A., Yang, L., Patchett, A.A., Smith, R.G., Chapman, K.T., Schaeffer, J.M., 1998. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 282, 737–740.
- Shapiro, B., Kronheim, S., Pimstone, B., 1979. The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Hormone and Metabolic Research* 11, 79–80.
- Smith, L.E.H., Kopchick, J.J., Chen, W., Knapp, J., Kinose, F., Daley, D., Foley, E., Smith, R.G., Schaeffer, J.M., 1997. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 276, 1706–1709.
- Stroh, T., Kreienkamp, H.J., Beaudet, A., 1999. Immunohistochemical distribution of the somatostatin receptor subtype 5 in the adult rat brain: predominant expression in the basal forebrain. *Journal of Comparative Neurology* 412, 69–82.
- Sucher, N.J., Lipton, S.A., Dreyer, E.B., 1997. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Research* 37, 3483–3493.
- Tallent, M., Liapakis, G., O'Carroll, A.M., Lolait, S.J., Dichter, M., Reisine, T., 1996. Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple agonists to an L-type Ca²⁺ current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience* 71, 1073–1081.
- Thermos, K., 2003. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Research* 43, 1805–1815.
- Thermos, K., Bagnoli, P., Epelbaum, J., Hoyer, D., 2006. The somatostatin sst1 receptor: an autoreceptor for somatostatin in brain and retina? *Pharmacology and Therapeutics* 110, 455–464.
- Vasilaki, A., Thermos, K., 2009. Somatostatin analogues as therapeutics in retinal disease. *Pharmacology and Therapeutics* 122, 324–333.
- Vasilaki, A., Gardette, R., Epelbaum, J., Thermos, K., 2001. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42, 1600–1609.
- Vasilaki, A., Mouratidou, M., Schulz, S., Thermos, K., 2002. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* 43, 899–909.
- Vasilaki, A., Georgoussi, Z., Thermos, K., 2003. Somatostatin receptors (sst2) are coupled to Go and modulate GTPase activity in the rabbit retina. *Journal of Neurochemistry* 84, 625–632.
- Zeevalk, G.D., Nicklas, W.J., 1990. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 253, 1285–1292.

Effect of Intravitreal Administration of Somatostatin and sst₂ Analogs on AMPA-Induced Neurotoxicity in Rat Retina

Foteini Kiagiadaki and Kyriaki Thermos

PURPOSE. The aim of the present study was to use an in vivo model of retinal excitotoxicity to investigate the neuroprotective effect of somatostatin (SRIF)-ergic agents.

METHODS. Adult Sprague-Dawley rats (weight range, 250–300 g) intravitreally received (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA; 21, 42, 84 nmol/eye) or PBS (50 mM). Time-dependent responses were examined in animals that received AMPA (42 nmol/eye). Animals received AMPA (42 nmol) alone or in combination with SRIF (10⁻⁵, 10⁻⁴ M) or the sst-selective ligands lanreotide (sst₂, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M), L-779976 (sst₂, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M), L-797591 (sst₁, 10⁻⁴ M), and L-803087 (sst₄, 10⁻⁴ M). Immunohistochemistry and TUNEL studies were used to examine retinal cell loss and protection. Immunohistochemistry, Western blot analysis, and radioimmunoassay assessed the viability of sst_{2A} receptors and SRIF levels, respectively, in control and AMPA-treated tissue.

RESULTS. AMPA (42 nmol) treatment resulted in total and major loss of ChAT and bNOS immunoreactivity, respectively, 24 hours after its administration. This loss was sustained up to 30 days for ChAT- and 8 days for bNOS-expressing amacrine cells. SRIF and the sst₂ receptors were not affected by AMPA. SRIF and the sst₂ analogs protected the retina from the AMPA insult in a dose-dependent manner, whereas activation of the sst₁ and sst₄ subtypes had no effect. TUNEL staining confirmed AMPA-induced retinal ischemia and L-779976 neuroprotection.

CONCLUSIONS. These results demonstrate for the first time that SRIF and the sst₂ analogs, administered intravitreally, protect the retina from excitotoxicity. Further studies are essential to ascertain the therapeutic relevance of these results. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3080–3089) DOI:10.1167/iovs.07-1644

Ischemia is the underlying cause of many ocular diseases that lead to blindness. A large volume of evidence has implicated glutamate excitotoxicity as a leading player in retinal ischemia.¹ Glutamate is the leading neurotransmitter in the retina. It is released from photoreceptors, bipolar cells, and ganglion cells in the vertical signal pathway and plays a major role in vision transduction by activating different receptor subtypes belonging to the ionotropic (N-methyl-D-aspartate [NMDA], kainate, and (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropi-

onic acid hydrobromide [AMPA] receptors) and metabotropic receptor families.^{2,3}

Overstimulation of glutamate receptors leads to retinal toxicity. The NMDA receptor family has been widely studied, and evidence from in vitro and in vivo studies has suggested a leading role for NMDA receptors in retinal excitotoxicity.^{1,4,5} Intravitreal injection of NMDA into the adult rat eye caused primarily ganglion but also amacrine cell loss, whereas agents that act as antagonists have protected these retinal neurons.^{6,7} It is accepted that the activation of NMDA receptors, the increase in calcium ions, and the subsequent activation of nitric oxide radical formation is the underlying mechanism involved in excitotoxicity.¹ The non-NMDA receptors kainate and AMPA have also been implicated in retinal ischemic insult.^{8–10} Kainate induced cultured chick amacrine-like cell damage, and this was shown to be mediated by AMPA.¹¹ Intraocular injections of kainate caused changes in GABA and choline acetyltransferase (ChAT)-containing cells,^{12,13} whereas kainate/AMPA receptor blockade was effective in retinal neuroprotection.^{1,14}

Many strategies have been used to develop therapeutic agents for the successful treatment of ischemia-induced retinopathies and the prevention of blindness. However, the lack of success so far in attaining this goal makes more evident the complexity of the systems involved in the pathophysiology of these diseases and, therefore, their therapeutics. Recently, we focused on the use of the neuropeptide SRIF as a putative neuroprotective agent in retinal ischemia.

SRIF¹⁵ is found in the retina,¹⁶ where it activates SRIF receptors,¹⁷ ssts, found in retinal neurons and the retinal pigment epithelium (RPE; for a review, see Thermos¹⁸). Specifically, sst_{2A} receptors are localized in rod bipolar, amacrine, and photoreceptor neurons in the retina,^{19–24} and sst_{2B} receptors are localized in photoreceptors and the RPE.^{22,24} In addition, sst₁ and sst₄ receptors are present in amacrine (SRIF and TH-containing)²⁵ and ganglion cells,^{26,27} respectively.

SRIF and its analog, sst₂, inhibit ischemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy^{28,29} and depict neuroprotective effects against different paradigms of neurotoxicity in the central nervous system, such as NMDA, kainate-induced neurotoxicity,^{30,31} and middle cerebral artery.³² We used an in vitro model³³ of chemical ischemia in the retina to assess the neuroprotective actions of SRIF.³⁴ Chemical ischemia involves the blockade of oxidative phosphorylation and glycolysis and is believed to be useful in the understanding of the early events underlying the pathophysiology of ischemia. In this model, SRIF analogs selective for the sst₂ subtype protected the retina from the ischemic insult.³⁴ In a subsequent study using transgenic mice, Catalani et al.³⁵ showed that increased levels of the sst₂ subtype protected the retina from ischemia (hypoxia and iodoacetic acid). This study is in agreement with our previous data.³⁴ It indirectly showed the involvement of the sst₂ subtype and recommended that sst₂ receptor agonists may be useful in retinal diseases.

The aim of the present investigation was to examine SRIF actions in vivo. To this end, an in vivo model of excitotoxicity

From the Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

Supported by the European Social Fund and National Resources, Program PENED (KT), with the support of Novartis Pharma AG.

Submitted for publication December 21, 2007; revised February 7, 2008; accepted May 9, 2008.

Disclosure: F. Kiagiadaki, None; K. Thermos, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Kyriaki Thermos, Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110, Greece; thermos@med.uoc.gr.

was used, and the assessment of the ability of SRIF and sst₂ analogs to protect the retina, when administered intravitreally, was attempted. AMPA was chosen as the excitotoxic agent, and initial studies focused on the experimental conditions necessary for AMPA-induced retinal cell loss.

METHODS

Animals

Adult male and female Sprague-Dawley rats (weight range, 250–350 g) were housed at room temperature two to three animals per cage and had free access to food and water. A 12-hour light/12-hour dark cycle was maintained. Euthanization was performed with ether inhalation. All procedures were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and in compliance with Greek national laws (Animal Act, P.D. 160/91).

AMPA Excitotoxicity and Neuroprotection

The animals were anesthetized with intramuscular injections of xylazine (14.5 mg/kg) and ketamine (200 mg/kg) and were placed in a stereotaxic instrument to stabilize the head and facilitate intravitreal administration. Injections were made with 27- or 30-gauge needles connected to a Hamilton syringe adapted to a minipump. The tip of the needle was inserted behind the sclera-cornea border into the vitreous humor. Each intravitreal injection was performed with a flow rate of 1 μ L/min for 5 minutes.

One eye received phosphate-buffered saline (50 mM K₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.9% NaCl, pH 7.4) as control, and the other eye received AMPA (Tocris) 21, 42, or 84 nmol/eye, respectively, diluted in PBS 50 mM. Rats administered AMPA (42 nmol/eye) were humanely killed at different times (1, 2, 4, 8, 16, and 30 days) after treatment. Neuroprotection experiments involved the injection of AMPA (42 nmol/eye) alone and in combination with SRIF (10⁻⁵, 10⁻⁴ M) or the sst-selective ligand lanreotide (sst₂ 10⁻⁵, 10⁻⁴ M), L-779976 (sst₂ 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M), L-797591 (sst₁ 10⁻⁴ M), or L-803087 (sst₄ 10⁻⁴ M). Control retinas received PBS (50 mM).

Immunohistochemical Studies

Tissue Preparation. After each treatment, the eyes were removed and the eyecups were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 1 hour at 4°C. After fixation, eyecups were rinsed in phosphate buffer and were incubated in 30% sucrose overnight at 4°C for cryoprotection. Tissues were frozen in isopentane at -45°C for 1 minute and kept at -80°C until further use. Eyecups were sectioned vertically at 10- μ m thickness using a cryostat, thaw mounted on slides (Superfrost; Erie Scientific, Portsmouth, NH), and stored at -20°C. Slices were cut near the optic nerve every 100 μ m. Nine slices were put on every slide.

Immunohistochemistry. A mouse monoclonal antibody raised against ChAT (1:100; Biotrend, Cologne, Germany) and a rabbit polyclonal antibody raised against bNOS (1:1000; Sigma, St. Louis, MO) were used as markers for, respectively, acetylcholine and neuronal nitric oxide synthase containing retinal cells. Mouse monoclonal antibodies for protein kinase C (PKC; 1:50; Leinco Technologies, St. Louis, MO) and for microtubule associating protein (MAP)-1 (1:100; Sigma) were used as markers for rod bipolar cells and ganglion cells, respectively. Rabbit polyclonal antibodies for tyrosine hydroxylase (TH) (1:1000; Chemicon, Temecula, CA) and for recoverin (0.044 mg/mL; gift from Eleonora N. Grigoryan) were used as markers for dopamine-containing amacrine cells and photoreceptors/cone bipolar cells, respectively. A mouse monoclonal antibody raised against SRIF (2 μ g/mL; Abcam, Cambridge, UK) and a rabbit polyclonal antibody for the SRIF receptor subtype sst_{2A} (1:1000; Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Germany) were also used for the detection of SRIFergic- and sst_{2A}-expressing retinal cells, respectively.

Cryostat sections were incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 3.3% normal goat serum for 30 minutes, washed in 0.1 M Tris-buffered saline (TBS), and incubated with the primary antibodies in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1 hour with the appropriate secondary antibody, Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L; 1:400; Molecular Probes, Eugene, OR) for the monoclonal antibodies or Alexa-Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L; 1:400; Molecular Probes) for the polyclonal antibodies. Finally, the sections were washed and coverslipped with mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Negative controls were included by omitting the primary antibody.

TUNEL Staining. To determine cell loss, enzymatic in situ labeling of apoptosis-induced DNA strand breaks was performed on tissue sections obtained from retinas 1 day after AMPA treatment. The terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated TMR-dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (Roche, Germany) was used.

Microscopy. Light microscopy images were taken with a camera (Axioskop with Plan-Neofluar \times 40/0.75; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Optic sections were taken with a z-axis resolution of 1.1 μ m through the immunolabeled cells. Light and contrast adjustments of images were processed with the use of commercial software (Photoshop ver. 7.0; Adobe Systems, San Jose, CA).

Quantification

For the quantification of bNOS-expressing retinal cells, each section of control or treated retina was studied by means of a \times 40/0 lens (Planapo; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). The total number of bNOS-immunoreactive neurons in each retinal section was counted. As mentioned in Tissue Preparation, for the immunohistochemistry studies, all slices used were cut near the optic nerve. Nine slices were put on every slide. bNOS-expressing cells were counted on all nine sections per slide. Therefore, the maximum number of sections that could be examined was n (number of retinas) \times 9. Given that some slices were not appropriate for cell counting (e.g., because of tissue folding or damage during cutting), the actual number of sections used for the quantification was equal to or less than $n \times 9$.

The numbers of sections used were as follows: control groups: 1-day group, 41 sections were used from 5 different retinas ($n = 5$); 8-day group, 20 sections were used from 3 different retinas ($n = 3$); 16-day group, 27 sections were used from 3 different retinas ($n = 3$); 30-day group, 27 sections were used from 3 different retinas ($n = 3$); AMPA-treated groups: 1-day group, 26 sections were used from 4 different retinas ($n = 4$); 8-day group, 23 sections were used from 3 different retinas ($n = 3$); 16-day group, 20 sections were used from 3 different retinas ($n = 3$); 30-day group, 25 sections were used from 3 different retinas ($n = 3$). Twenty-seven sections from 3 different retinas ($n = 3$) were used for the AMPA+L-779976-treated group (neuroprotection studies).

Radioimmunoassay

SRIF levels were examined in retinas that were removed from eyes treated with PBS (50 mM; $n = 6$) or AMPA (42 nmol/eye; $n = 7$) 1 day after treatment. Samples were prepared according to the method described by Mastrodimou and Thermos.³⁶ In short, retinas were centrifuged for 15 minutes at 12,000 rpm and 4°C. Acetic acid (2 N) was added to the precipitant, and the mixture was boiled for 10 minutes, homogenized with a sonicator, and stored at -80°C for 24 to 48 hours. Subsequently, the mixture was centrifuged for 20 minutes at 13,000 rpm, and the supernatant was lyophilized and kept at -80°C. The assay mixture contained the SRIF antiserum (kindly provided by Günther Sperk) at a final dilution of 1:3000, [¹²⁵I]-Tyr¹¹-SRIF (20,000 cpm), and SRIF standards (0–400 pg/100 μ L) or samples in a final assay volume of 0.5 mL, according to Sperk and Windmann.³⁷ Incubation was carried out at 4°C for 24 hours. Separation of bound and free peptide was achieved by the addition of 900- μ L aliquots of a mixture

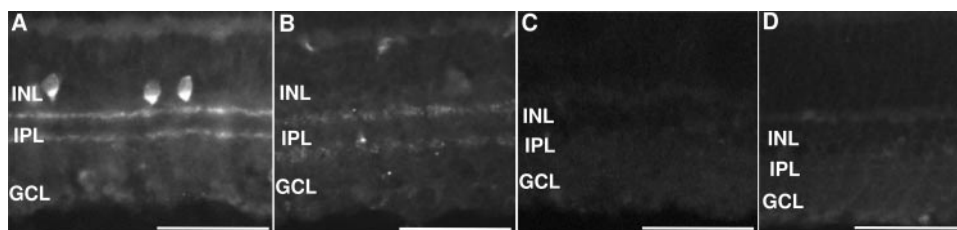


FIGURE 1. Dose-dependent effect of AMPA treatment on ChAT immunoreactivity in the retina. ChAT immunoreactivity in control rat retina (A) and in retina that received 21 (B), 42 (C), and 84 (D) nmol AMPA 1 day after injection. Partial loss of ChAT I-R was observed with 21 nmol/eye (only some processes of the cholinergic neurons appear), whereas the larger doses caused the complete loss of ChAT I-R. Scale bar, 50 μ m.

containing 2.5% charcoal and 0.25% dextran T70 and subsequent centrifugation.

Western Blotting

Retinal Membrane Preparation. Sprague-Dawley rats were anesthetized, and retinas were removed and homogenized (Ultra-Turrax homogenizer; IKA Works, Staufen, Germany) in Tris-HCl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 1000g for 10 minutes, and the supernatant was aspirated and stored. The pellet was resuspended, rehomogenized, and centrifuged as described. The two supernatants were combined and centrifuged at 11,000g for 20 minutes. The pellet was resuspended in Tris buffer and centrifuged at 27,000g for 10 minutes. Finally, the pellet was resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton, 2 μ g/mL leupeptin, 2 μ g/mL aprotinin). All steps of this procedure were performed at 4°C. The protein content was determined according to Bradford,³⁸ and aliquots of each sample containing equal amounts of protein (32 μ g) were subjected to 10% SDS-PAGE and immunoblotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated with anti-sst_{2A} (1:2500) overnight at 4°C. For adsorption controls, sst_{2A} antigen at concentrations of 10⁻⁴ M were incubated with the antisera for 2 hours at room temperature. Blots were developed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence. These experiments were performed two to four times from the same or different preparations of retinas.

Retinal Protein Samples from Treated Animals. Animals were humanely killed, and retinas were removed and homogenized (Ultra-Turrax homogenizer; IKA Works) in lysis buffer. Because of the scarcity of the tissues, the whole membrane preparation was used. Retinal samples (60 μ g) were subjected to 10% SDS-PAGE and immunoblotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated with a rabbit polyclonal antibody against SRIF receptor subtype sst_{2A} (1:2500; Gramsch Laboratories) overnight at 4°C. Blots were developed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence. These experiments were performed two to four times using protein samples from the same or different preparations of retinas.

Statistical Analysis

Analysis of data was performed using a one-way ANOVA with post hoc analysis (Dunnett; GraphPad Prism 2.01; GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Effect of AMPA on ChAT Immunoreactivity: Dose- and Time-Response Experiments

ChAT immunoreactivity was observed in amacrine cells located in the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL) and in processes in the inner plexiform layer of PBS-treated retinas (Fig. 1A). Intravitreal administration of the

excitatory amino acid AMPA (21, 42, 84 nmol/eye) caused a dose-dependent loss of ChAT expression. The intravitreal injection of AMPA (21 nmol/eye) caused a partial loss of ChAT immunoreactivity because processes were still visible 1 day after injection. AMPA (42 nmol/eye) caused a complete loss of ChAT expression, whereas a higher concentration of 84 nmol/eye gave similar results (Fig. 1). ChAT immunoreactivity loss was sustained for 8, 16, or 30 days after AMPA administration (Fig. 2). The effect of AMPA on ChAT immunoreactivity was also examined 2 and 4 days after injection, and similar results were obtained (data not shown).

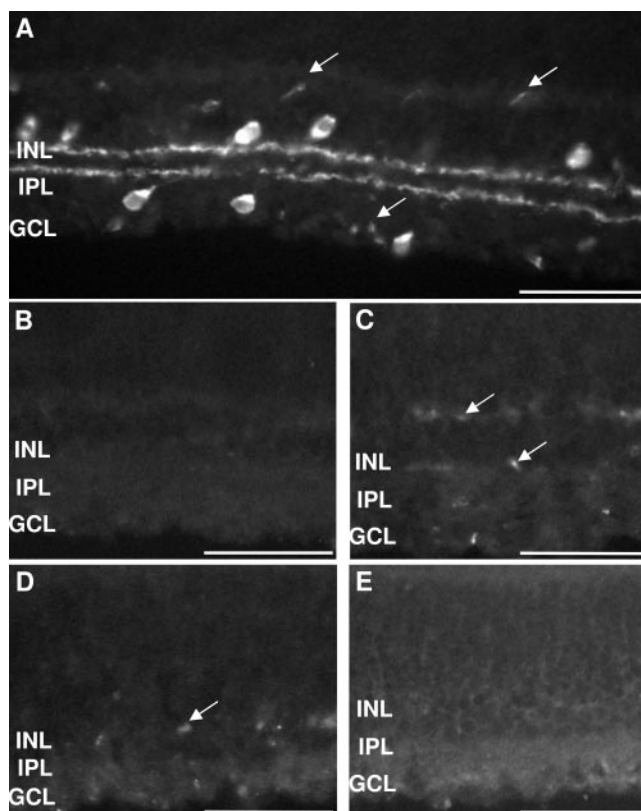


FIGURE 2. Time-dependent effect of AMPA treatment on ChAT immunoreactivity in the retina. ChAT immunoreactivity in rat retina that intravitreally received PBS (50 mM, control tissue; A) or AMPA (42 nmol/eye) 1 (B), 8 (C), 16 (D), and 30 (E) days after treatment. The complete loss of choline acetyltransferase expression from the first until the thirtieth day after treatment was observed. Arrows: nonspecific binding of the secondary antibody to blood vessels. Scale bar, 50 μ m.

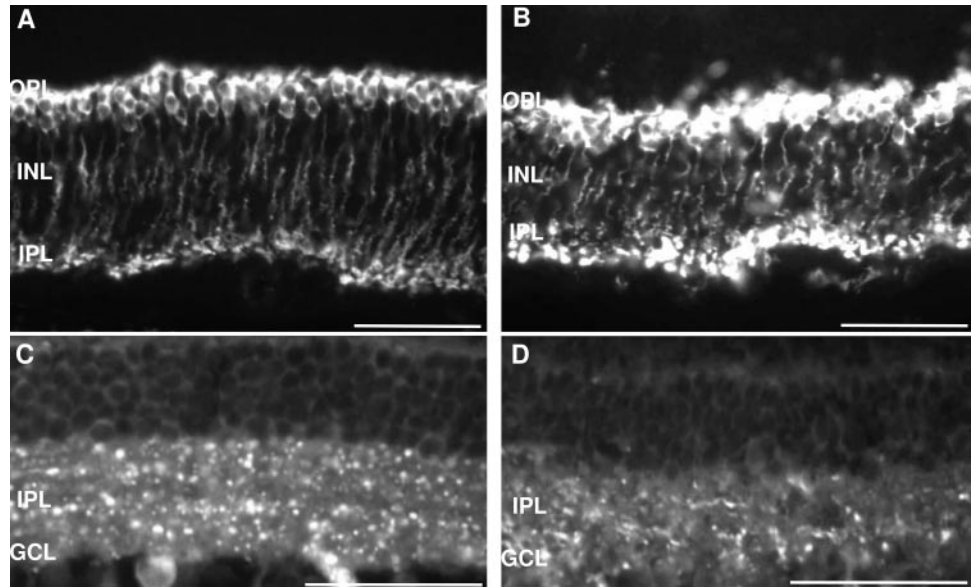


FIGURE 3. Effect of AMPA treatment on PKC and MAP expression in the retina. PKC immunoreactivity in control (A) and AMPA (42 nmol/eye)-treated tissue (B), MAP^{1A} immunoreactivity in control (C), and AMPA-treated tissue 1 day after injection (D). Scale bar, 50 μ m.

Effect of AMPA on PKC, TH, bNOS, Recoverin, and MAP^{1A} Immunoreactivity

To examine the effect of the AMPA treatment (42 nmol/eye) on other retinal cell types, immunoreactivity studies were performed using antibodies against retinal markers that recognize photoreceptors and rod and cone bipolar, amacrine, and ganglion cells. Figure 3 depicts the PKC and MAP^{1A} immunoreactivities in retinal tissues isolated 1 day after AMPA treatment. PKC immunoreactivity was not different in the two groups of retinas ($n = 2$), even though the staining pattern in Figure 3B might have suggested more dense staining in rod bipolar cells of the AMPA-treated retinas. Similarly, MAP^{1A} immunoreactiv-

ity was rich in the processes and some cell bodies of ganglion cells (Figs. 3C, 3D), but no differences were observed between control and AMPA-treated retinas ($n = 3$). TH immunoreactivity in amacrine cells was not affected by the AMPA treatment ($n = 3$; Figs. 4A, 4B). Recoverin immunoreactivity was evident in the outer nuclear layer (ONL) and the INL in control and AMPA-treated retinas ($n = 2$; Figs. 4C, 4D). Immunohistochemical studies using the same antibodies were performed on tissues obtained 8, 16, and 30 days after AMPA treatment. Results were similar to those described for the 1-day groups (data not shown).

bNOS immunoreactivity studies showed that NOS-containing neurons were decreased 1 day after AMPA administration. However, the signal returned to control levels 8 days after AMPA injection. To avoid the repetition of immunoreactivity staining patterns, bNOS-containing amacrine cells were counted in PBS- and AMPA-treated retinal sections, and the results are shown in Figure 5.

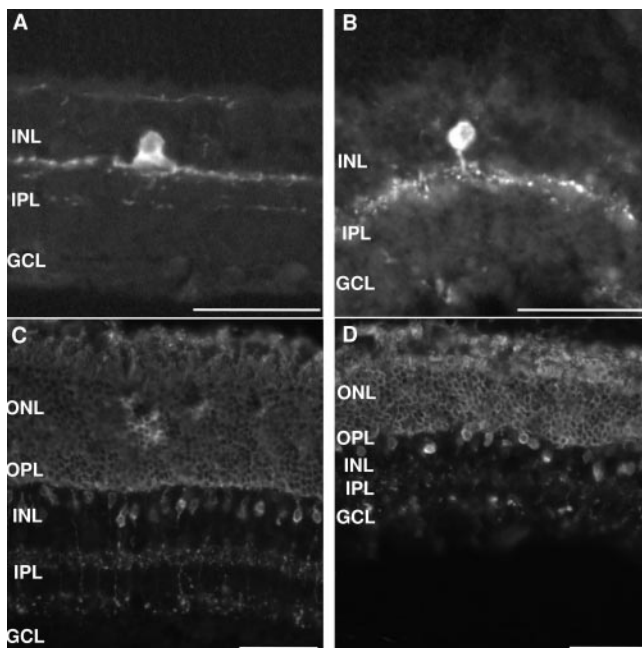


FIGURE 4. Effect of AMPA treatment on TH and recoverin expression in the retina. TH immunoreactivity in control (A) and AMPA (42 nmol/eye)-treated tissue and (B) recoverin immunoreactivity in control (C) and AMPA-treated tissue (D) 1 day after injection. Scale bar, 50 μ m.

Effect of AMPA on SRIF and sst_{2A} Levels

The most significant changes in ChAT and bNOS immunoreactivities were observed as early as 1 day after AMPA (42 nmol/eye) treatment. Therefore, we examined whether SRIF levels and the expression of the sst₂ receptor, the most predominant

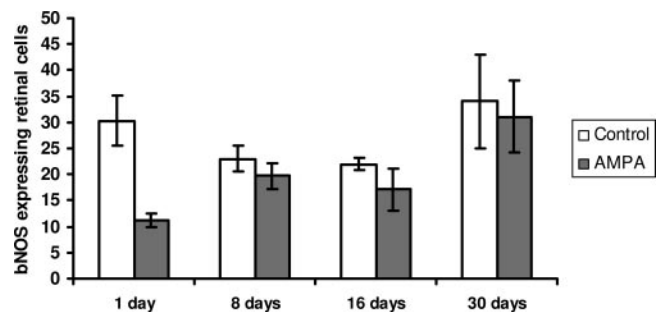


FIGURE 5. Effect of AMPA on bNOS immunoreactivity. bNOS-containing amacrine cells were counted in PBS and AMPA (42 nmol/eye)-treated retinal sections at 1, 8, 16, and 30 days. NOS-containing neurons were decreased 1 day after AMPA administration. However, the signal returned to control levels 8 days after AMPA injection. Results are presented as mean \pm SEM.

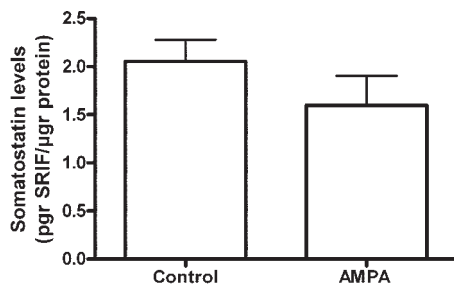


FIGURE 6. Effect of AMPA on SRIF levels. SRIF levels were measured by radioimmunoassay. No statistically significant changes were observed between the control and the AMPA (42 nmol/eye)-treated retinas 1 day after injection.

receptor subtype in the retina, were affected in the same paradigm. SRIF levels were measured by radioimmunoassay. No statistically significant changes were observed between the control and the AMPA-treated retinas (Fig. 6). The presence of the sst_2 receptor in the retina was examined by immunoreactivity and Western blot methodologies. Immunoreactivity differences with sst_{2A} were not apparent between the PBS- and AMPA-treated retinas (Figs. 7A, 7B). To analyze further the retinal samples under study, Western blot analysis was performed. Initially, we performed control studies to examine the presence of the receptor in retinal membranes. A protein (molecular mass, approximately 77 kDa) was detected in the retina that was not visible in the presence of the sst_2 antigen (Fig. 7C). Therefore, we concluded that the 77-kDa protein represented the sst_2 receptor subtype.

Western blot analysis using crude protein preparations of PBS- and AMPA-treated retinas depicted a protein of apparent molecular weight of approximately 72 kDa (Fig. 7D). We presumed this protein to be the equivalent of the 77-kDa protein in the control blots. Actin immunoblots were also examined in the two samples to substantiate that equal protein concentrations were applied, and no differences were evident between the PBS- and AMPA-treated retinas.

Effect of Somatostatin on AMPA-Induced Loss of ChAT Immunoreactivity

To examine whether SRIF could protect the retina from the AMPA-induced loss of ChAT immunoreactivity, SRIF was coin-fused with AMPA (42 nmol/eye). ChAT immunoreactivity was assayed 1 day after the treatment. SRIF protected the cholinergic neurons in a dose-dependent manner (10^{-5} , 10^{-4} M; Fig. 8), but it did not afford full protection.

Effect of the Selective Agonists Lanreotide ($sst_{2/5}$) and L-779976 (sst_2) on AMPA-Induced Loss of ChAT and bNOS Immunoreactivity

The putative neuroprotective action of selective analogs of SRIF receptors was also studied (Fig. 9). Lanreotide (10^{-5} M) coin-fused with AMPA (42 nmol/eye) mimicked the effects of SRIF at 10^{-4} M (Fig. 9C). ChAT immunoreactivity completely recovered at the higher lanreotide concentration of 10^{-4} M (Fig. 9D). The sst_2 -selective ligand L-779976 was also examined. As shown in Figure 10, L-779976 protected the retina in a dose-dependent manner, with full recovery at the highest dose used (10^{-4} M). bNOS immunoreactivity was also examined in retinas treated with L-779976 (10^{-4} M). The viable cells observed in the presence of L-779976 were comparable to the control samples, suggesting full recovery (Fig. 10F).

TUNEL staining was used to assess retinal cell death by AMPA (42 nmol/eye) and protection by the L-779976 analog 1 day after treatment. The results, shown in Figure 11, confirm the excitotoxic effect of AMPA and the protection afforded by L-779976 (10^{-4} M).

Effect of the sst_1 - and sst_4 -Selective Analogs on AMPA-Induced Loss of ChAT Immunoreactivity

Receptor subtypes sst_1 and sst_4 have also been detected in amacrine and ganglion cells, respectively, of rat retina.²⁶ Therefore, the putative neuroprotective effect of selective sst_1 and sst_4 analogs was examined. The AMPA-induced loss of ChAT immunoreactivity was not reversed by the presence of

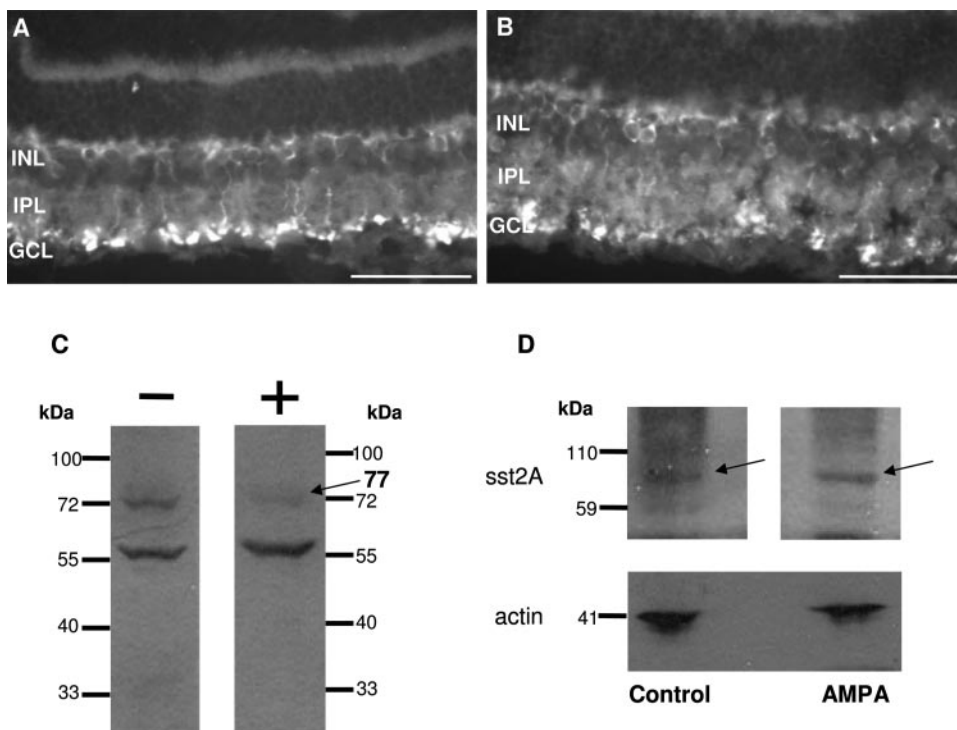


FIGURE 7. Effect of AMPA on sst_{2A} expression levels. sst_{2A} Immunoreactivity in PBS-treated and AMPA (42 nmol/eye)-treated retina 1 day after injection (A, B). sst_{2A} Immunoreactivity is located in somata, axons, and processes of bipolar cells, and no differences between control and excitotoxic tissue were observed. Scale bar, 50 μ m. Western blot studies on control retinal membranes (C). A protein of approximate molecular mass of 77 kDa was detected in the retina that was not visible in the presence of the sst_2 antigen. No differences in the expression of the receptor protein (72 kDa) were observed in the PBS- and AMPA-treated retinas (D).

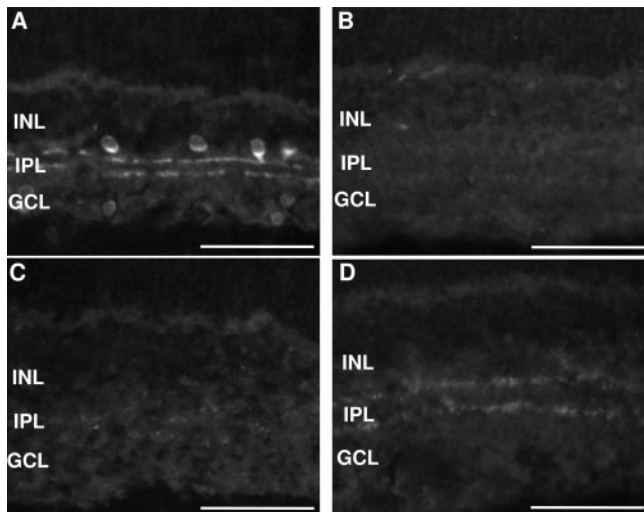


FIGURE 8. Effect of somatostatin on the AMPA-dependent loss of ChAT immunoreactivity in the retina. ChAT immunoreactivity in PBS-treated retina (A) and in retina that received AMPA (42 nmol) alone (B) or in combination with SRIF (10^{-5} M; C, 10^{-4} M; D) 1 day after injection. Partial protection was afforded by SRIF 10^{-4} M. Scale bar, 50 μ m.

L-797591 (ss_{t1} selective) or L-803087 (ss_{t4} selective) at the concentration of 10^{-4} M, a concentration that was effective for the ss_{t2} ligands (Fig. 12).

DISCUSSION

The main finding of this study is that SRIF and its analogs, lanreotide and L-779976, provide neuroprotection against excitatory insults *in vivo*. Injected intravitreally, these agents reduce the retinal damage induced by the excitatory amino acid AMPA.

Glutamate, the major neurotransmitter in the retina, is responsible for the transfer of visual information from the retina to the brain. It is released by photoreceptors, bipolar cells, and ganglion cells and acts on ionotropic and metabotropic glutamate receptors found in retinal neurons.^{2,39,40} Excess glutamate release and overactivation of its ionotropic receptors is believed to be associated with toxicity and cell death. Therefore, the use of glutamate and other excitatory amino acids with high affinity for the ionotropic receptor family, such as

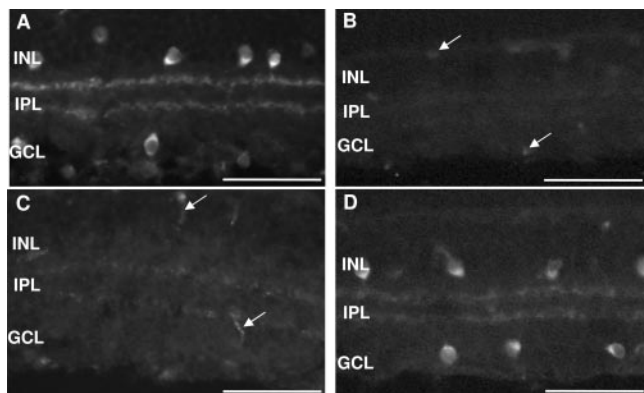


FIGURE 9. Effect of lanreotide ($ss_{t2/5}$ analog) on the AMPA-dependent loss of ChAT immunoreactivity in the retina. ChAT immunoreactivity in PBS-treated retina (A) and in retina that received AMPA (42 nmol) alone (B) or in combination with lanreotide (10^{-5} M; C, 10^{-4} M; D) 1 day after injection. Lanreotide protected the retina in a dose-dependent manner. Scale bar, 50 μ m.

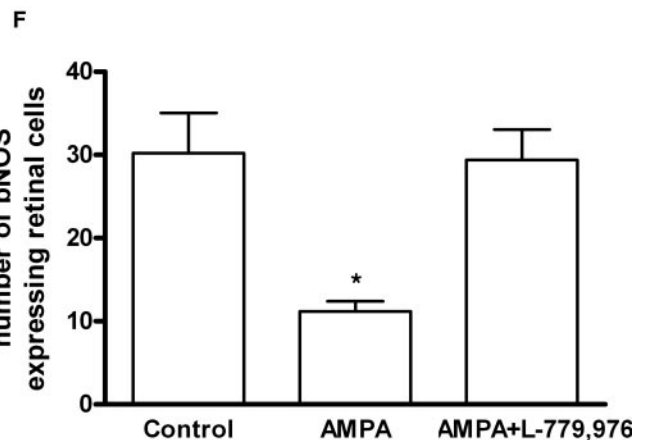
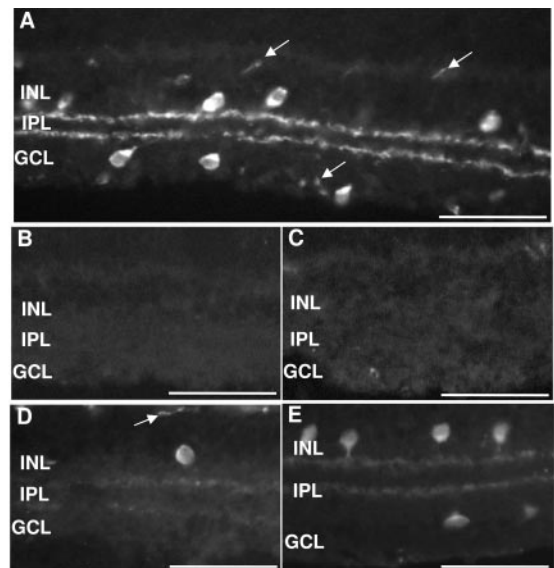


FIGURE 10. Effect of L-779976 (ss_{t2} analog) on the AMPA-dependent loss of ChAT immunoreactivity in the retina. ChAT immunoreactivity in PBS-treated retina (A) and in retina that received AMPA (42 nmol) alone (B) or in combination with L-779976 (10^{-6} M; C, 10^{-5} M; D, 10^{-4} M; E) 1 day after injection. L-779976 protected the retina in a dose-dependent manner. Scale bar, 50 μ m. (F) Effect of AMPA (42 nmol) alone or in combination with L-779976 (10^{-4} M) on the number of bNOS expressing retinal cells. The AMPA effect is statistically different when compared to the control (* $P < 0.05$).

NMDA, kainate, and AMPA, have been used as models of excitotoxicity. These studies have been instrumental in the evaluation of the events leading to toxicity caused by ischemic insults because excitotoxicity is believed to be responsible for the ischemia-related cell death.¹

In the present study, we used AMPA and examined its effects when given intravitreally in the retina. Subsequently, we studied whether the neuropeptide SRIF could reverse the toxic insult. AMPA receptors belong to the non-NMDA family of ionotropic glutamate receptors. They are composed of four subunits, GluR1 to GluR4, that are differentially expressed in retina.^{41,42} AMPA receptors lacking GluR2 have an increased permeability to intracellular calcium ions, making the neurons that express these receptors more vulnerable.^{3,43,44}

The present data showed that AMPA differentially influenced retinal cell viability. It eliminated, in a dose-dependent manner, ChAT immunoreactivity 24 hours after its injection into the rat eye. This loss persisted 30 days after the AMPA intravitreal injection. Similarly, it reduced the number of bNOS-

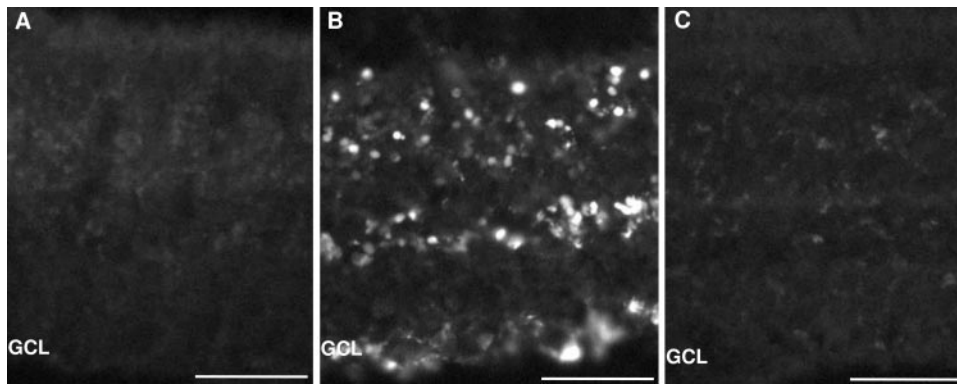


FIGURE 11. Effect of L-779976 (ss_2 analog) on AMPA-induced apoptosis. TUNEL staining used to assess retinal cell death by AMPA and protection by the L-779976 analog 1 day after injection. AMPA afforded excitotoxic effects (B) compared with control (A). L-779976 (10^{-4} M) protected the retina from AMPA-induced apoptosis (C). Scale bar, 50 μ m.

containing amacrine cells. However, the signal recovered 8 days after injection, in contrast to what was observed for the ChAT immunoreactivity signal. No changes were observed in the retinal markers used to label photoreceptors or cone and rod bipolar, TH-containing amacrine and ganglion cells.

The degree of loss observed in the different cell types is directly coupled to the presence of the AMPA receptor subtype. mRNA and protein studies support the localization of AMPA receptors in all retinal cell types of different animal species,^{2,40,45} but a differential localization of the AMPA receptor subunits has been reported.⁴⁵ In agreement with the present findings, ChAT immunoreactivity was shown to be obliterated after intravitreal kainic¹³ and quisqualic acid injection.⁴⁶ The presence and function of AMPA receptors on cholinergic neurons was also shown by release studies. Selective blockade of AMPA receptors in rabbit retina inhibited the light-evoked increase in acetylcholine release, whereas the subunits GluR2 and GluR3 were found to be localized on ChAT immunoreactive processes.⁴⁷ A drastic reduction in ChAT immunoreactivity was also observed after exposure of the retinas to kainate and in a model of high intraocular pressure. The authors suggested that in paradigms in which the ischemia is of sufficient severity, kainate receptors associated with cholinergic neurons are overstimulated, leading to membrane disruption and enzyme (ChAT) release.¹³ This may reflect the changes observed in the present paradigm in which AMPA receptors are activated, leading to ChAT immunoreactivity loss.

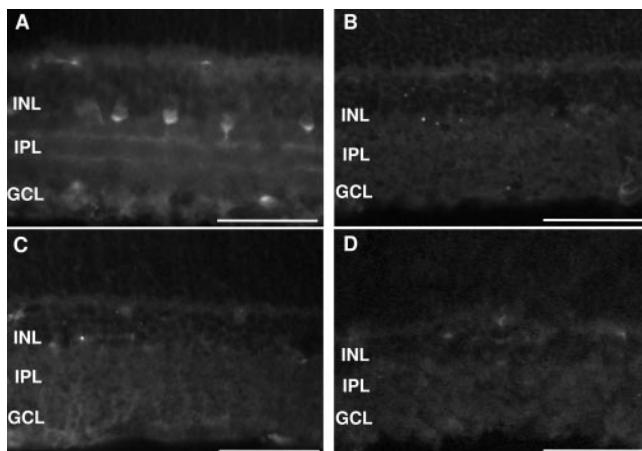


FIGURE 12. Effect of L-797591 (ss_1 analog) and L-803087 (ss_4 analog) ligands on the AMPA-dependent loss of ChAT immunoreactivity in the retina. ChAT immunoreactivity in PBS-treated retina (A) and in retina that received AMPA (42 nmol) alone (B) or in combination with L-797591 (10^{-4} M; C) or L-803087 (10^{-4} M; D) 1 day after injection. Activation of ss_1 and ss_4 receptors had no effect on the AMPA-induced loss of ChAT expression. Scale bar, 50 μ m.

An earlier study, examining the effect of excitotoxicity in the rabbit retina, indicated that NADPH-diaphorase (marker for NOS) amacrine cells contained NMDA and kainic acid receptors.⁴⁸ In addition, in turtle retina, NOS inhibitors antagonized the kainic acid increase in cGMP-like immunoreactivity, suggesting that the activation of kainic acid receptors in NOS-containing neurons stimulate NO release.⁴⁹ To our knowledge, there are no immunohistochemical data to support the localization of AMPA receptors on NOS-containing amacrine cells in the retina. However, these data pertaining to the use of kainic acid (also an agonist of AMPA receptors) indirectly support the presence of AMPA receptors and their implication in the loss of bNOS immunoreactivity in the present study. In contrast to ChAT immunoreactivity, bNOS immunoreactivity reappeared 8 days after AMPA treatment. The morphology of the bNOS-expressing cells was the same as in the control samples (data not shown).

In an extensive immunocytochemical study, the differential effects of ischemia/reperfusion on different amacrine cell subtypes was examined. Loss of immunoreactivity was observed in amacrine cells expressing Glyt1 (glycinergic), substance P, and CR (subpopulation of cholinergic cells) at 2 hours after ischemia, but the immunoreactivity recovered to a large extent between 4 and 12 hours after ischemia. ChAT immunoreactivity in this paradigm was reduced with no subsequent recovery.⁵⁰ This latter study and the present results support differential changes in amacrine cells as a result of ischemia/reperfusion and excitatory amino acid receptor activation, respectively. The transient loss of immunoreactivity may be the result of the inhibition of protein synthesis and its subsequent restoration, whereas the ChAT immunoreactivity loss may be a result of the stimulation of protease activity (caspases) and long-term effects.⁵⁰ Ischemia-reperfusion injury was shown to activate different caspases depending on the neuronal phenotype in the retina, with caspases 2 and 3 acting in parallel in amacrine neurons.⁵¹

In agreement with the present data, intravitreal infusion of quisqualic acid did not affect photoreceptors, bipolar cells, or ganglion cells, and only a small loss of TH-containing amacrine cells from the central retina was reported.⁴⁶ Furthermore, GluR1–4 expression was not found in photoreceptors,⁴⁵ suggesting that AMPA administration should have no effect on these retinal neurons. Further evidence in the literature supports the lack of effect of AMPA on rod and cone bipolar and ganglion cells. Electrophysiological studies have shown 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB)-sensitive functional responses on the activation of rod and cone ON-bipolar cells.⁵² These bipolar cells are activated by glutamate primarily through the APB-type metabotropic receptor and involve cGMP signaling.⁵³ However, recent colocalization immunohistochemical studies supported the presence of AMPA-type glutamate receptors (GluR2) in PKC-containing cells (rod and

cone ON-bipolar) in the rat retina,⁵⁴ whereas single-cell RT-PCR showed the presence of GluR1/GluR2 in rod and cone bipolar cells.⁴⁵ As stated, the presence of GluR2 renders the receptor impermeable to calcium ions; thus, its presence in neurons should spare them from toxicity. Kainate and NMDA receptors are expressed in ganglion cells,^{55,56} and GluR4 mRNA has also been detected.⁴⁵ The relative survival of photoreceptors, bipolar cells, and ganglion cells after AMPA exposure may be attributed to the absence or low levels of the receptor, as mentioned, or to their ability to deal with sustained depolarization and ionic fluctuation. It was suggested that the large cytosolic volume of ganglion cells might buffer the accumulation of intracellular calcium and thus make these cell less vulnerable to excitotoxicity.⁴⁶

The findings thus far suggested that AMPA is a good model of retinal cell loss (subtypes of amacrine cells) and support its use for the testing of agents as neuroprotectants of retinal neurons against toxicity. To this end, the subsequent studies investigated whether SRIF and specific sst analogs could be useful in the reversal of the actions of AMPA. SRIF is released from a subclass of amacrine cells in the retina^{16,36} and activates its receptors, sst₁ to sst₅, found in different retinal neurons.²⁰ The sst₂ subtype appears to be the predominant one in vertebrate retina.

AMPA did not have any effect on SRIF levels, as measured by radioimmunoassay (Fig. 6). This suggests that AMPA receptors are not present in SRIF-containing amacrine neurons. In addition, the intravitreal injection of AMPA did not influence the sst₂ receptors, as shown by immunohistochemical and Western blot analysis studies (Fig. 7). The presence of viable sst₂ receptors enabled us to proceed with the investigation of whether SRIF itself and the specific sst₂ analogs could protect the retina from AMPA excitotoxicity. As shown by ChAT immunoreactivity, intravitreal administration of SRIF was able to partially reverse the damage imposed by AMPA on the retina (Fig. 8). The lack of full recovery of the signal may be attributed to peptide degradation. However, similar results were obtained in the presence or absence of protease inhibitors (data not shown). Thus, other factors (e.g., absorption) may influence SRIF action. The sst₂-selective ligands lanreotide and L-779976 were able to reverse the AMPA damage and bring ChAT immunoreactivity to control levels (Figs. 9, 10).

TUNEL staining was in agreement with the ChAT immunoreactivity data, showing increased apoptosis only in the AMPA-treated tissue and providing further support for the neuroprotective actions of the sst₂ analog (Fig. 11). However, TUNEL labeling was observed in all retinal layers. This may suggest that AMPA receptor expression, which has not been detected in some retinal cells to date, may actually exist or that AMPA activation of caspases may lead to cell death in other retinal cell layers.^{57,58} The extensive TUNEL labeling, however, does not correlate with the lack of change of expression in retinal markers other than ChAT. This is in partial agreement with a recent study in the mouse that used iodoacetic acid and hypoxia to develop a retinal ischemia model.³⁵ TUNEL labeling was observed in the three retinal layers—ONL, INL, and GCL—1 hour after exposure of the retina to the ischemia mixture, yet markers such as cone arrestin (marker for cone photoreceptors) were not affected up to 6 hours (maximum exposure) of ischemic treatment. In the same study, it was observed that different retinal markers were differentially affected according to the time of exposure to the ischemia mixture. ChAT immunoreactivity was completely lost as early as 1 hour and remained low, TH immunoreactivity was decreased but was still evident after 6 hours of ischemia, and TUNEL labeling increased as a function of time.³⁵ In a model of chemical ischemia (iodoacetic acid and sodium cyanide), rod bipolar, ChAT, TH, and bNOS-expressing amacrine cells were

mostly affected. However, TUNEL labeling was observed predominantly in the ONL and INL layers.³⁴

Retinal ischemia models involving hypoxia and hypoglycemia lead to the release of glutamate and the activation of NMDA and non-NMDA receptors and to subsequent toxicity and cell death.^{1,34,35} A lack of concordance between TUNEL labeling and retinal marker expression was also observed in a study that characterized quisqualic acid and NMDA-induced excitotoxicity in chick retina. In this study, DNA fragmentation was observed in rod bipolar cells in which no detectable loss of PKC immunoreactivity was detected. The authors suggested that some cells damaged by the excitatory amino acid, though labeled by the TUNEL technique, were either not committed to apoptosis or were rescued by DNA repair.⁴⁶ The lack of concordance between TUNEL labeling and retinal marker proteins and between protein and retinal marker transcripts⁵⁹ has been observed in more paradigms than can be cited in this study. Future investigations focusing on the elucidation of the mechanisms involved in these processes will be important in providing specific answers to the questions posed.

The present data support that the neuroprotective effect of SRIF is mediated by its activation of sst₂ receptors, because sst₁- and sst₄-selective ligands had no effect on drug concentrations that afforded protection by lanreotide and L-779976 (Fig. 12). These results are in agreement with previous data from our laboratory that showed sst₂-selective ligands to be neuroprotective in a chemical model of retinal ischemia.³⁴ Octreotide (sst_{2/5} ligand) was also shown to protect the guinea pig retina from ischemia reperfusion injury.⁶⁰ A more recent study³⁵ complemented these data by showing that the overexpression of sst₂ receptors in mice lacking the sst₁ subtype prevented the retinal ischemia produced by iodoacetic acid and hypoxia.

The mechanisms by which SRIFergic ligands act as neuroprotectants are still under investigation. SRIF is known to inhibit voltage-gated calcium channels⁶¹ and neuronal calcium currents, the latter through a mechanism involving a cGMP-dependent protein kinase.⁶² cGMP was also important in SRIF-protective actions against NMDA-induced neuronal death in cortical cultures.³⁰ In a recent study, we showed that NO/peroxynitrite and cGMP are important mediators in the protection of rat retina from chemical ischemia and that a NO/sGC/cGMP signaling pathway is involved in the neuroprotective effects bestowed on the retina by the sst₂ SRIF ligands in the same model.⁶³ Studies are in progress to examine whether such a mechanism is involved in SRIF protection of the retina against the AMPA insult.

The importance of the present data lies in the fact that SRIF, particularly the two ligands tested (lanreotide and L-779976), afforded neuroprotection against excitotoxicity when administered intravitreally in vivo. Lanreotide is known to have a high affinity for sst₂ and sst₅ receptors.⁶⁴ Until recently, the sst₅ subtype was not localized in the retina; thus, we assumed that the neuroprotective effects of lanreotide were restricted to its activation of the sst₂ subtype. Nevertheless, a recent study supported the presence of the sst₅ receptor in dopaminergic and cholinergic amacrine cells,⁶⁵ and the possible contribution of this receptor to lanreotide's effects cannot be excluded. L-779976 is a selective sst₂ ligand.⁶⁶ However, one may criticize the concentrations of lanreotide and L-779976 (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M) that were shown to be efficacious as neuroprotectants as high and possibly nonspecific. Similar concentrations were shown to be efficacious in the chemical ischemia model³⁴ and in an experimental paradigm of choroidal neovascularization.⁶⁷ Although these cited data do not justify the protocol, we can support the present findings for two reasons. First, we cannot conjecture about the actual drug concentration reaching the retina (possibly small) because we have no means of measuring drug levels after intravitreal injection. Second, the lack of

neuroprotective effects of the sst₁- and sst₄-selective ligands⁶⁶ and the absence of the sst₃ receptor in vertebrate retinas¹⁸ suggest that lanreotide and L-779976 mediate their neuroprotective effects through activation of the sst₂ and possibly the sst₅ receptors.

Many investigations in the literature have focused on the study of the use of SRIF analogs in the therapeutics of retinal diseases. Proliferative diabetic retinopathy (PDR) is a major cause of visual loss. Its pathophysiology involves increased vascularization or angiogenesis. SRIF has been shown to have antiangiogenic properties^{28,29} and possibly to be useful in the treatment of PDR. A recent study reported that SRIF-28 is attenuated in the vitreous fluid of patients with PDR, adding further support to the significance of SRIF analogs in the treatment of this disease.⁶⁸ A similar deficit of SRIF was detected in the vitreous of patients with diabetic macular edema.⁶⁹ SRIF analogs have been used in a small number of ocular clinical studies. Recently, in a case study, octreotide (100 µg) was administered subcutaneously three times a day for 8 months to a 52-year-old woman with cystoid macular edema (CME).⁷⁰ This treatment resulted in improvement of the patient's visual acuity and partial resolution of CME. In addition, lanreotide (Somatuline; Ipsen, Paris, France) was administered subcutaneously twice a month for 6 months to patients with age-related maculopathy and was found to stabilize the patients' visual acuity.⁷¹

The present in vivo data support the pharmacologic and possible therapeutic significance of the intravitreal administration of lanreotide and L-779976. Further studies are essential to examine whether the intravitreal injection of these analogs is devoid of pharmacokinetic problems associated with systemic administration, such as proper drug absorption and distribution. Octreotide acetate was injected into the vitreous cavity of kitten eyes, the long-acting octreotide-LAR was injected into the mid-vitreous of rabbit eyes, and the pharmacokinetics and toxicity of the ligands were examined.⁷² This study concluded that intravitreal doses up to 1.1 mg octreotide-LAR could provide sustained high concentrations of the drug that would render it useful as a potential treatment of proliferative eye diseases. Another study evaluated the ocular toxicity of intravitreal octreotide and came to a similar conclusion as to the safety of octreotide at a concentration of less than 1 mg.⁷³ More recently, a SRIF-camptothecin conjugate was examined for its ocular toxicity and efficacy after intravitreal administration in rabbits. It was found to be safe at the concentration of 10⁻⁵ M or less and to be efficacious in the treatment of age-related macular degeneration.⁶⁷

In conclusion, the present study offers new in vivo evidence suggesting that the SRIFergic ligands lanreotide and L-779976 protect the retina from excitatory amino acid damage. The pharmacologic profile of these agents renders them promising therapeutic agents in retinal diseases whose pathophysiologies involve ischemic and excitotoxic insult. There is still a great need for new, effective drugs for the treatment of retinopathies. Therefore, further investigations to substantiate the proper pharmacokinetics and the lack of toxicity of these agents in ocular tissues may render them useful in the treatment of retinopathies.

Acknowledgments

The authors thank Anna Vasilaki and Miltiadis Tsilimbaris for the constructive discussions on this work, Eleni Renieri for excellent technical assistance, and Merck for kindly providing the selective sst₂-analog.

References

- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23:91-147.

- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vis Res.* 1998;38:1385-1397.
- Liu SJ, Zukin RS. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 2007;30:126-134.
- Zeevalk GD, Nicklas WJ. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253:1285-1292.
- Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vis Res.* 1997;37:3483-3493.
- Olney J, Price M, Salles KS, Labryere J, Friedrich G. MK-801 powerfully protects against N-methyl aspartate neurotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 1987;141:357-361.
- Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, et al. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci.* 1992;8:567-573.
- Huang JC, Salt TE, Voaden MJ, Marshall J. Non-competitive NMDA-receptor antagonists and anoxic degeneration of the ERG B-wave in vitro. *Eye.* 1991;5:476-580.
- Cui Q, Harvey AR. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J Neurosci.* 1995;15:8143-8155.
- Osborne NN, Larsen AK. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem Int.* 1996;29:263-270.
- Ferreira IL, Duarte CB, Carvalho AP. Kainate-induced retina amacrine-like cell damage is mediated by AMPA receptors. *Neuroreport.* 1998;26:3471-3475.
- Osborne NN, McCord RJ, Wood JPM. The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina in vivo. *Neurochemistry.* 1995;20:635-641.
- Osborne NN, Larsen A, Barnett NL. Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:1692-1700.
- Osborne NN, Herrera AJ. The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neuroscience.* 1994;59:1071-1081.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* 1973;179:77-79.
- Shapiro B, Kronheim S, Pimstone B. The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metab Res.* 1979;11:79-80.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16:86-88.
- Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res.* 2003;43:1805-1815.
- Helboe L, Moller M. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2376-2382.
- Johnson J, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 1998;393:93-101.
- Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience.* 1999;94:675-683.
- Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1600-1609.
- Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P. Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2001;363:680-694.
- Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, et al. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1499-1506.
- Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3191-3199.
- Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology.* 2002;43:899-909.

27. Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res.* 2002; 936:1-14.
28. Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science.* 1997;276:1706-1709.
29. Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularisation. *Exp Eye Res.* 2002;74:553-559.
30. Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiessa R, Vezzani A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem.* 1997;68:319-327.
31. Braun H, Schulz S, Becher A, Schroder H, Hollt V. Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Res.* 1998;803:54-60.
32. Rauca C, Schafer K, Hollt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol.* 1999;360:633-638.
33. Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci Lett.* 1990;119:175-178.
34. Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol.* 2005;371:44-53.
35. Catalani E, Cervia D, Martini D, et al. Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *Eur J Neurosci.* 2007;25:1447-1459.
36. Mastrodimou N, Thermos K. The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosci Lett.* 2004;356:13-16.
37. Sperk, S, Widmann, R. Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. *J Neurochem.* 1985; 45:1441-1447.
38. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
39. Massey SC, Miller RF. Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. *J Physiol.* 1988;405:635-655.
40. Yang XL. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol.* 2004;73:127-150.
41. Hughes TE, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S. Differential expression of glutamate receptor genes (GluR1-5) in the rat retina. *Vis Neurosci.* 1992;8:49-55.
42. Peng YW, Blackstone CD, Haganir RL, Yau KW. Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience.* 1995;66:483-497.
43. Lu YM, Yin HZ, Chiang J, Weiss JH. Ca(2+)-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca2+ influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci.* 1996;16: 5457-5465.
44. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, et al. Relative abundance of subunits mRNAs determines gating and Ca2+ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* 1995;15:193-204.
45. Jakobs TC, Ben Y, Masland RH. Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol Vis.* 2007; 13:933-948.
46. Fischer AJ, Seltner RL, Poon J, Stell WK. Immunocytochemical characterization of quisqualic acid- and N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the retina of chicks. *J Comp Neurol.* 1998;393:1-15.
47. Firth SI, Li W, Massey SC, Marshak DW. AMPA receptors mediate acetylcholine release from starburst amacrine cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 2003;466:80-90.
48. Sagar SM. NADPH-diaphorase reactive neurons of the rabbit retina: differential sensitivity to excitotoxins and unusual morphologic features. *J Comp Neurol.* 1990;300:309-319.
49. Blute TA, Velasco P, Eldred WD. Functional localization of soluble guanylate cyclase in turtle retina: modulation of cGMP by nitric oxide donors. *Vis Neurosci.* 1998;15:485-498.
50. Dijk F, Kamphuis W. An immunocytochemical study on specific amacrine cell subpopulations in the rat retina after ischemia. *Brain Res.* 2004;1026:205-217.
51. Singh M, Savitz SI, Hoque R, et al. Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J Neurochem.* 2001;466-475.
52. de la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A. L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J Neurosci.* 1995;15:3571-3582.
53. Shiells RA, Falk G. The glutamate-receptor linked cGMP cascade of retinal on-bipolar cells is pertussis and cholera toxin-sensitive. *Proc Biol Sci.* 1992;247:17-20.
54. Kamphuis W, Klooster J, Dijk F. Expression of AMPA-type glutamate receptor subunit (GluR2) in ON-bipolar neurons in the rat retina. *J Comp Neurol.* 2003;455:172-186.
55. Lin B, Martin PR, Grunert U. Expression and distribution of ionotropic glutamate receptor subunits on parasol ganglion cells in the primate retina. *Vis Neurosci.* 2002;19:453-465.
56. Brandstätter JH, Hartveit E, Sasso-Pognetto M, Wässle H. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci.* 1994;6:1100-1112.
57. Tezel G, Wax MB. Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2660-2667.
58. Katai N, Yoshimura N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2697-2705.
59. Dijk F, Van Leeuwen S, Kamphuis W. Differential effects of ischemia-reperfusion on amacrine-cell subtype specific transcript levels in rat retina. *Brain Res.* 2004;1026:194-204.
60. Celiker U, Ilhan N. Nitric oxide and octreotide in retinal ischemia-reperfusion injury. *Doc Ophthalmol.* 2002;105:327-338.
61. Tallent M, Liapakis G, O'Carroll A-M, Lolait SJ, Dichter M, Reisine T. Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca²⁺ current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience.* 1996;71:1073-1081.
62. Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature.* 1994;369:336-339.
63. Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection against retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:342-349.
64. Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem.* 2004; 89:1057-1091.
65. Ke JB, Zhong YM. Expression of somatostatin receptor subtype 5 in rat retinal amacrine cells. *Neuroscience.* 2007;144:1025-1032.
66. Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, et al. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science.* 1998;282:737-740.
67. Bezerra Y, Fuselier JA, Peyman GA, Oner H, Drouant G, Coy DH. Study of inhibitory effects of an antioangiogenic somatostatin-camptothecin conjugate on laser-induced choroidal neovascularization in rats. *Retina.* 2005;25:345-354.
68. Hernandez C, Carrasco E, Casamitjana R, Deulofeu R, García-Arumí J, Simó R. Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care.* 2005;28:1941-1947.
69. Simo R, Carrasco E, Fonollosa A, García-Arumí J, Casamitjana R, Hernández C. Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care.* 2007;30:725-727.
70. Papadaki T, Zacharopoulos I, Iaccheri B, Fiore T, Foster CS. Somatostatin for uveitic cystoid macular edema (CME). *Ocul Immunol Inflamm.* 2005;13:469-470.
71. Papadaki T, Tsilimbaris M, Thermos K, et al. The role of lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: a pilot clinical trial. *Retina.* 2003;23:800-807.
72. Robertson JE, Westra I, Woltering EA, et al. Intravitreal injection of octreotide acetate. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1997;13:171-177.
73. Liang C, Peyman GA, Conway MD, Woltering EA. Retinal toxicity of intravitreal octreotide in the rabbit. *Can J Ophthalmol.* 1997; 32:229-232.

The Role of Nitric Oxide and cGMP in Somatostatin's Protection against Retinal Ischemia

Niki Mastrodimou, Foteini Kiagiadaki, and Kyriaki Thermos

PURPOSE. To investigate whether nitric oxide (NO) and/or cGMP protects the retina from chemical ischemia and underlie somatostatin's neuroprotective effects.

METHODS. Eyecups of female Sprague-Dawley rats were incubated with PBS or the chemical ischemia mixture [iodoacetic acid (5 mM)/sodium cyanate (25 mM)] in the absence or presence of (1) arginine (0.05–2.0 mM), the substrate of nitric oxide synthase (NOS); (2) the NO donors sodium nitroprusside (SNP; 0.25–4.0 mM), 3-morpholinonyldimethylamine (SIN-1; 0.1, 0.3, 1.0 mM), SIN-1 (0.1 mM)/L-cysteine (5 mM, peroxyxynitrite scavenger), and NONOate (1, 5, 10 μ M, slow NO releaser); (3) 8-Br-cGMP (0.1, 0.5, 1.0 mM); (4) BIM23014 (sst₂ receptor agonist; 1 μ M), alone or in the presence of (5) the NOS inhibitor N^ω-monomethyl-L-arginine (NMMA; 0.5 mM); or (6) the guanylyl cyclase inhibitors 1H-[1,2,4]oxadiazolol [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 100 μ M) and NS2028 (50 μ M) for 60 minutes, at 5%CO₂/air in 37°C. The effect of SIN-1 (0.1, 0.3, 1.0, or 3.0 mM) on the retina was also examined. Subsequently, the eyecups were fixed and sectioned for choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity and TUNEL staining.

RESULTS. Arginine and SNP had no effect on the chemical ischemia-induced toxicity. SIN-1, NONOate, and 8-Br-cGMP produced a concentration-dependent protective effect, as shown by ChAT immunoreactivity. TUNEL staining also confirmed the neuroprotective effect of these agents. L-cysteine partially reduced the SIN-1-induced protective effect. SIN-1 alone was toxic only at the highest concentration used (3 mM). NMMA, ODQ, and NS2028 reversed the protective effect of BIM23014.

CONCLUSIONS. The results suggest that a NO/peroxyxynitrite/cGMP mechanism may be important in the protection of the retina from ischemic insult. Furthermore, the NO/sGC/cGMP pathway is involved in the neuroprotective effects of sst₂ ligands against retinal ischemia. (*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:342–349) DOI:10.1167/iovs.07-0341

The neuropeptide somatostatin¹ is found in the retina,² where it activates the somatostatin receptors³ (sst) found in retinal neurons and the retinal pigment epithelium (RPE) (see review by Thermos⁴). Specifically, sst_{2A} receptors are localized in rod bipolar, amacrine, and photoreceptor neurons in the retina,^{5–9} whereas sst_{2B} receptors are localized in photoreceptors and the RPE.^{8,10} In addition, sst₁ and sst₄ receptors

were found to be present in amacrine¹¹ and ganglion cells,^{12,13} respectively.

Retinal ischemia is the underlying cause of many ocular diseases and leads to neuronal damage and blindness. The importance of somatostatin ligands in the inhibition of ischemia-induced neovascularization, one of the major causes of retinal diseases that results in visual loss has been investigated. Somatostatin and its sst₂ agonists inhibited the ischemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy.^{14,15}

In a recent study, an in vitro model¹⁶ of chemical ischemia was used in the retina.¹⁷ Chemical ischemia involves the blockade of oxidative phosphorylation and glycolysis and is believed to be useful in the understanding of the early events underlying the pathophysiology of ischemia. In this model, somatostatin analogues selective for the sst₂ subtype protect the retina from ischemic insult.¹⁷ The mechanisms by which the somatostatin analogues prevent the damage produced by chemical ischemia or other neurotoxic insults are not known. However, somatostatin's ability to inhibit voltage-gated Ca²⁺ channels may be responsible for the lowering of the intracellular calcium ion concentrations,¹⁸ responsible for the toxic effects. The rise in intracellular calcium levels resulting from ischemia-induced activation of voltage-gated calcium channels and ionotropic glutamate receptors is believed to be the underlying cause of retinal cell death.¹⁹

A study by Mastrodimou et al.¹⁷ suggested that protein kinase C (PKC) and tyrosine hydroxylase (TH)-sst₂-containing neurons^{5–8,13,20,21} were protected from ischemic insult, possibly by sst₂ involvement in the attenuation of calcium levels. However, the neuroprotection afforded to the ChAT- and bNOS-containing neurons, which lack sst₂ receptors, could not be explained.

Somatostatin and the novel neuropeptide cortistatin,²² which resembles somatostatin structurally and binds to somatostatin receptors,²³ have been shown to have neuroprotective effects against different paradigms of neurotoxicity in the central nervous system, such as NMDA, and kainate-induced neurotoxicity^{24,25} and middle cerebral artery.²⁶ The somatostatin reduction of NMDA-induced neuronal death in cortical neurons was mediated by a cGMP-dependent mechanism.²⁴

Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ currents has been suggested to be mediated via a cGMP-dependent protein kinase.²⁷ Recent studies in our laboratory have shown that somatostatin increases NO¹² and cGMP levels in rat retinal explants²⁸ via an sst₂ mechanism. Therefore, one can conjecture that NO triggers the synthesis of cGMP in neighboring cells that do not contain somatostatin receptors and provides neuroprotection.

The purpose of the present study was to investigate whether NO and/or cGMP protects the retina from chemical ischemia insult and whether this effect represents a putative mechanism for somatostatin's neuroprotection of the retina.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Sprague-Dawley rats (250–300 g) were housed two to three animals per cage with free access to food and water. A 12-hour

From the Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

Supported by the European Social Fund and National Resources, Program Pythagoras (KT).

Submitted for publication March 21, 2007; revised August 7 and September 13, 2007; accepted November 12, 2007.

Disclosure: N. Mastrodimou, None; F. Kiagiadaki, None; K. Thermos, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Kyriaki Thermos, Department of Basic Sciences, Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110, Greece; thermos@med.uoc.gr.

light-dark cycle was maintained. Euthanasia was performed with ether inhalations. All procedures that were performed on the animals were in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and in compliance with Greek National Laws (Animal Act, P.D. 160/91).

Effect of Arginine, Nitroprusside, NONOate, SIN-1, or 8-Br-cGMP on Chemical Ischemia

After dissecting the eyes, the anterior poles were cut away, and the eyecups were immersed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). To produce chemical ischemia and study the possible protection by the different agents, we used the protocol previously used by Mastrodimou et al.¹⁷ Eyecups were incubated with (1) PBS, (2) a chemical ischemia mixture (5 mM IAA/25 mM NaCN), and (3) arginine, the NOS substrate (0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, or 2.0 mM), or the NO donors sodium nitroprusside (SNP; 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, or 4.0 mM), spermine NONOate (slow-release NO donor; 1, 5, or 10 μ M), SIN-1 (0.1, 0.3, or 1 mM) or 8-Br-cGMP (0.1, 0.5, or 1 mM), together with the chemical ischemia mixture, for 60 minutes (two times for 30 minutes), followed by incubation two times for 30 minutes in PBS (control and ischemia groups) or arginine/nitroprusside/NONOate/SIN-1/8-Br-cGMP, respectively, in PBS (neuroprotection groups) at the concentrations used earlier. All incubations were performed at 37°C and 5% CO₂/95% air. These experiments were performed three times.

Effect of SIN-1/L-Cysteine on Chemical Ischemia

Eyecups were incubated in (1) PBS or in the presence of (2) chemical ischemia mixture, and (3) SIN-1 (0.1 mM)/L-Cysteine, a peroxyxynitrite scavenger (5 mM),²⁹ together with the chemical ischemia mixture for 60 minutes (two times for 30 minutes each), followed by incubation two times for 30 minutes each in PBS (control and ischemia groups) or SIN-1/L-cysteine in PBS (neuroprotection groups) at the concentrations used earlier. All incubations were performed at 37°C and 5% CO₂/95% air. These experiments were performed three times.

Effect of SIN-1 Alone

The effect of SIN-1 alone on the retina was also examined. The eyecups were incubated either in PBS or in PBS containing SIN-1 (0.1, 0.3, 1, or 3 mM) for 120 minutes (four times for 30 minutes each). The experiments were performed twice.

Effect of the NO Synthase Inhibitor NMMA on the BIM23014-Induced Neuroprotective Effect

Eyecups were incubated in the presence of the chemical ischemia mixture alone or in the presence of the somatostatin sst₂ analogue BIM23014 (1 μ M) and BIM23014 (1 μ M) plus N^g-monomethyl-L-arginine (NMMA; 0.5 mM) for 60 minutes (two times for 30 minutes each), followed by incubation two times for 30 minutes each in BIM23014 (1 μ M) in the absence or presence of NMMA (0.5 mM), respectively. Control samples received PBS. These experiments were performed three times.

Effect of the Guanylate Cyclase Inhibitors ODQ and NS2028 on the BIM23014-Induced Neuroprotective Effect

Eyecups were incubated in the presence of the chemical ischemia mixture, alone or in the presence of (1) the somatostatin sst₂ analogue BIM23014 (1 μ M) and (2) BIM23014 (1 μ M) and ODQ (100 μ M) or NS2028 (50 μ M) for 60 minutes (two times for 30 minutes each), followed by incubation two times for 30 minutes each in BIM23014 (1 μ M), in the absence or presence of ODQ (100 μ M) or NS2028 (50 μ M) respectively. ODQ is the most widely used soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor, yet we also examined the effect of NS2028, chosen for its better potency and specificity.³⁰ Control samples received PBS. These experiments were performed three times.

Immunohistochemical Studies

Tissue Preparation. After completion of the chemical ischemia protocol, the eyecups were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 1 hour at 4°C. After fixation, eyecups were rinsed in PB and incubated in 30% sucrose overnight, at 4°C for cryoprotection. Tissues were frozen in isopentane at -45°C for 1 minute and kept at -80°C until further use. Eyecups were sectioned vertically at 10 μ m thickness using a cryostat, thaw mounted on slides (Superfrost; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and stored at -20°C. Slices were cut near the optic nerve, every 100 μ m. Nine slices were put on every slide.

ChAT Immunoreactivity. A mouse monoclonal antibody raised against ChAT (1:100; Biotrend, Cologne, Germany), was used as a marker for acetylcholine amacrine cells. Cryostat sections were incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer; TBS (pH 7.4), containing 3.3% normal goat serum for 30 minutes, washed in 0.1 M TBS and incubated with the primary antibodies in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 2 hours with the secondary antibody, Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG(H+L) (1:300; Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR) Finally, the sections were washed and coverslipped with mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

TUNEL Staining. To determine cell loss, enzymatic in situ labeling of apoptosis-induced DNA strand breaks was performed using the terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated TMR-dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (Roche, Mannheim, Germany).

Microscopy

Light microscopy images were taken with a microscope equipped with a $\times 20/0.50$ or $\times 40/0.75$ lens (Axioskop with a Plan-Neofluar lens; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany). Confocal images were taken with a laser-scanning microscope (model DM RE with a He/Ne Laser; Leica, Wetzlar, Germany; with HP Plan APO; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Optic sections were taken with a z-axis resolution of 1.1 μ m through the immunolabeled cells. Light and contrast adjustment of images were processed with image analysis software (Photoshop, ver. 7.0; Adobe Systems, San Jose, CA).

RESULTS

The chemical ischemia model was successful in producing cholinergic cell loss (Figs. 1A, 1B), as previously shown.¹⁷ To examine whether NO could provide neuroprotection against chemical ischemia in the retina, arginine, and NO donors were used in different concentrations. Neither arginine nor SNP protected the retina from the ischemic insult when these agents were co-incubated with the chemical ischemia mixture. In Figure 1, the effect of a low and a high concentration of arginine (0.05, 2.0 mM; Figs. 1C, 1D, respectively) and SNP (0.5, 4 mM; Fig. 1E, 1F, respectively) is shown, while similar results were obtained with the other concentrations used (data not shown).

The slow NO releaser NONOate afforded protection from chemical ischemia in a concentration-dependent manner (Figs. 2C-E). The concentration of 5 μ M (Fig. 2D) gave the best protection, yet it did not reach control levels. TUNEL staining (Figs. 2F-I) was in agreement with the ChAT immunoreactivity data depicting an attenuation of apoptotic cells in the presence of NONOate (5 μ M).

Similar results were also obtained in the presence of SIN-1 (Fig. 3). ChAT immunoreactivity was brought to control levels when SIN-1 (0.1 mM) was co-incubated with the chemical ischemia mixture. The protection was attenuated at higher concentrations of SIN-1 (0.3 and 1.0 mM) (Figs. 3C-E). To assess whether this effect is due to peroxyxynitrite, we incubated

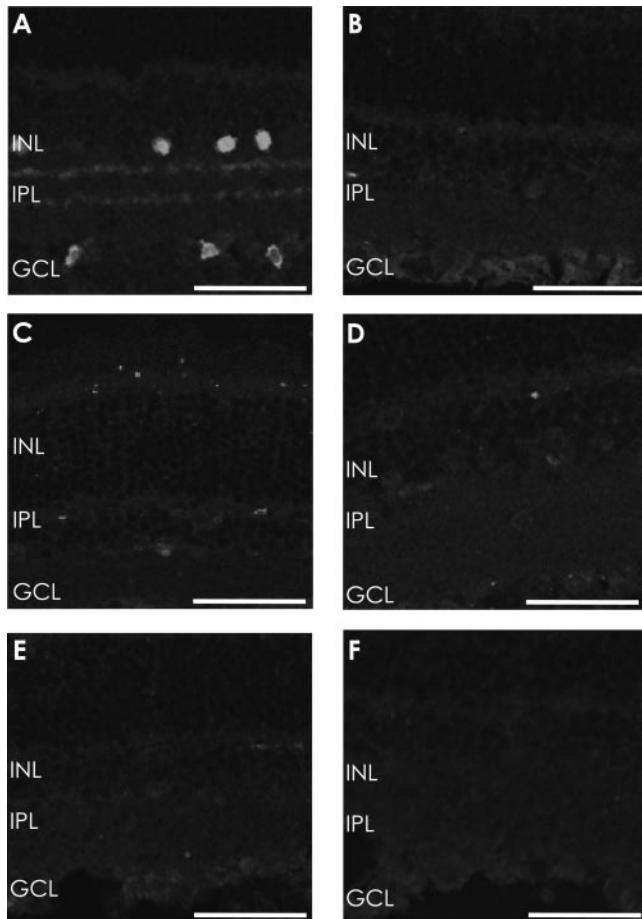


FIGURE 1. Effect of Arg and SNP on the chemical ischemia (CI) induced damage of ChAT containing neurons in the retina. (A) ChAT immunoreactivity was localized in amacrine cells in the inner nuclear layer (INL), in displaced amacrine cells in the ganglion cell layer (GCL), and in processes in the inner plexiform layer (IPL) in retinas treated with PBS (control). No immunoreactivity was observed in retinas treated with the CI mixture (B) or with the CI mixture and Arg (0.05 mM, C; 2 mM, D), and SNP (0.5 mM, E; 4 mM, F). Bars, 40 μ m.

SIN-1 in the presence of the chemical ischemia mixture and the peroxynitrite scavenger L-cysteine. As shown in Figure 3F, L-cysteine partially reduced the protective effect of SIN-1. The immunohistochemistry data were substantiated by TUNEL staining (Figs. 3G–J).

To examine whether SIN-1 alone is toxic to the retina, eyecups were incubated with SIN-1 at the concentrations of 0.1, 0.3, 1.0, and 3 mM, and for the total time used in the neuroprotection protocol (120 min). As shown in Figure 4, ChAT immunoreactivity was not affected at the concentrations used in the protection experiment (0.1, 0.3, and 1.0 mM). However, a decrease in cholinergic neurons, but not in the processes, became evident at the higher concentration of 3 mM. TUNEL immunostain also showed an increase in apoptotic cells in retinas treated with SIN-1 (3 mM; Fig. 4).

While arginine/nitroprusside at the concentrations used do not support a role for NO in the neuroprotection from chemical ischemia insults, the NONOate and SIN-1 data support NO/cGMP-mediated neuroprotection. To study the direct involvement of cGMP in the neuroprotection, the cell-permeable analogue of cGMP, 8-Br-cGMP was co-incubated with the chemical ischemia mixture. 8-Br-cGMP produced a concentration dependent protective effect. The concentration of 0.5 mM gave maximum protection, as shown by ChAT immunoreactiv-

ity (Fig. 5). The neuroprotective effect of 8-Br-cGMP was also observed with TUNEL staining (Fig. 5), substantiating the concentration-dependent protection.

To examine whether NOS and sGC are involved in somatostatin's *sst*₂-mediated neuroprotection of the retina, eyecups were incubated with the chemical ischemia mixture and the *sst*₂-selective analogue BIM23014, in the absence and presence of the NOS inhibitor NMMA and the soluble guanylate cyclase inhibitors ODQ and NS2028. If NO and cGMP are critical in neuroprotection, inhibition of the NOS and guanylate cyclase activity would reverse the protective effect of BIM23014. As shown in Figure 6, NMMA and the sGC inhibitors reversed the BIM23014-induced neuroprotection against chemical ischemia. The involvement of cGMP in the mediation of BIM23014's protective effects in the chemical ischemia model was also suggested by TUNEL staining. Retinas that were incubated with BIM23014 in the presence of ODQ were characterized by an increase in apoptotic cells, mimicking the retinas that received the chemical ischemia insult.

DISCUSSION

The major findings of this study are the following: (1) the slow NO donor NONOate, the NO/peroxynitrite donor SIN-1, and 8-Br-cGMP protected the retina from chemical ischemia and (2) a NO/sGC/cGMP pathway was involved in the neuroprotective effects of the *sst*₂ analogue BIM23014 in the same model.

Ischemia is the underlying cause of retinal neovascularization, the major cause of many ocular diseases that lead to blindness. Ischemia induces the activation of voltage-gated calcium channels and ionotropic glutamate receptors, which results in an increase in intracellular calcium levels and the subsequent formation of NO. These events are believed to be the underlying cause of cell death.¹⁹ The neuropeptide somatostatin and its *sst*₂-specific analogues inhibited ischemia-induced neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy.^{14,15} Also, somatostatin depicted neuroprotective actions in different paradigms of neurotoxicity in the brain.^{24–26} In a recent study, a chemical model of ischemia, initially used in hippocampal slices,¹⁶ was used in the retina¹⁷ and found to be a good model for examining putative neuroprotective agents.

Incubation of the rat eyecup with the chemical ischemia mixture (IAA/NaCN) for 60 minutes affected several retinal cell populations, including cholinergic, rod bipolar and TH- and NOS-positive amacrine cells. However, the viability of photoreceptors and ganglion cells remained intact.¹⁷ These data are in agreement with other studies showing that incubation of specific retinal cell types to chemical (KCN) and environmental hypoxia has no effect on photoreceptors.³¹ Also, in a model of simulated ischemia, the removal of oxygen and N₂ replacement of 95% O₂ resulted in the degeneration of retinal neurons in the INL.³²

Somatostatin analogues specific for the *sst*₂ subtype were successful in reversing retinal cell death in this ischemia model.¹⁷ The mechanisms by which somatostatinergic ligands act as neuroprotectants is still under investigation. The ability of somatostatin and analogues to inhibit the release of growth factors such as GH and IGF have implicated somatostatin as an antiangiogenic agent.^{14,15} Somatostatin inhibits IGF-1-mediated induction of VEGF in hRPE cells,³³ and octreotide has been shown to prevent growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia.³⁴

Somatostatin is also known to inhibit voltage-gated calcium channels,¹⁸ and neuronal calcium currents, the latter via a mechanism involving a cGMP-dependent protein kinase.²⁷ cGMP was also important in somatostatin's protective actions

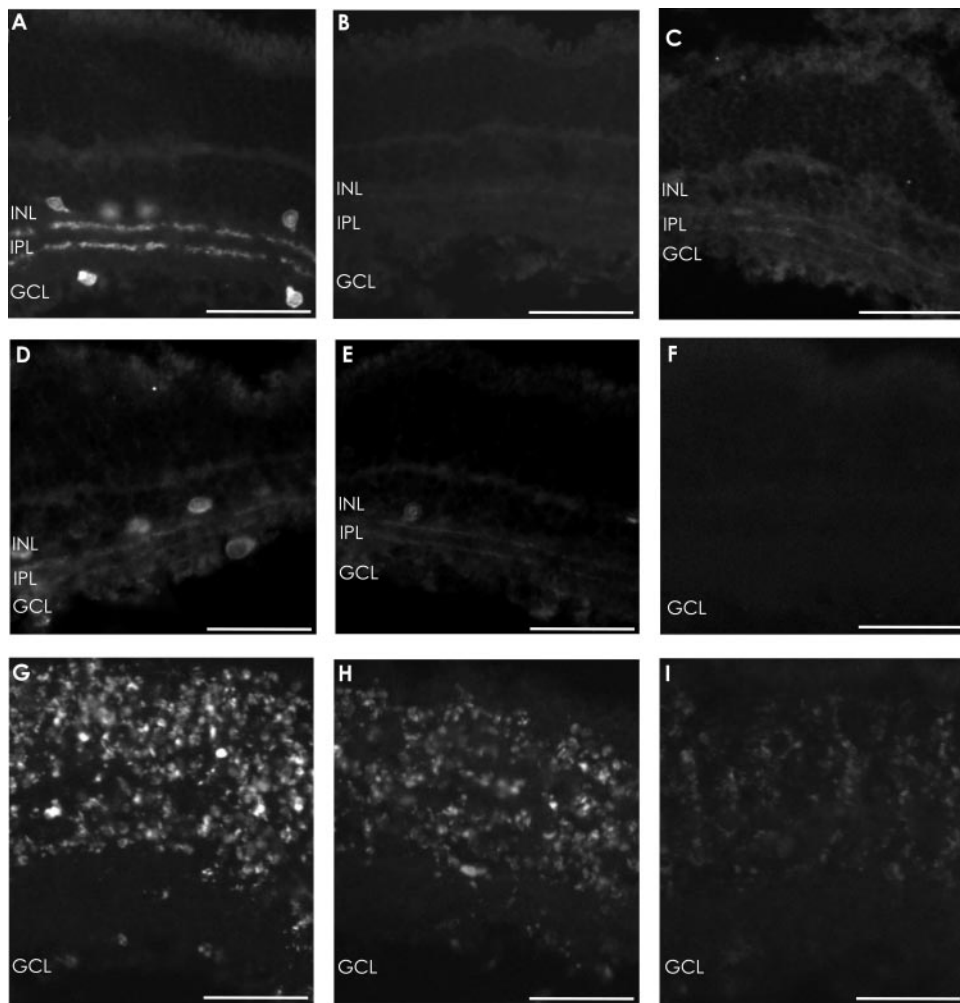


FIGURE 2. Effect of NONOate on the chemical ischemia (CI)-induced damage of ChAT-containing neurons and TUNEL staining in the retina. ChAT immunoreactivity was present or absent in (A) control and (B) CI-treated retinas, respectively. In retinas treated with the CI mixture and NONOate (1 μ M, C; 5 μ M, D; 10 μ M, E), a concentration-dependent recovery of ChAT immunoreactivity was observed. TUNEL staining depicted major cell loss in retinas treated with CI (G) compared with control retinas (F). NONOate (1 μ M, H; 5 μ M, D) reduced the apoptotic damage in a concentration-dependent manner compared with (G). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 50 μ m.

against NMDA-induced neuronal death in cortical cultures.²⁴ The second-messenger cGMP is the product of the catalysis of GTP by the cytosolic enzyme sGC.^{35,36} sGC is the physiological target of NO and NO donors such as SIN-1.^{36,37} NO binds with high affinity to the heme iron of sGC which leads to its stimulation.³⁶

NO has been found to promote but also antagonize ocular neovascularization. Pharmacologic inhibition of NOS reduced choroidal neovascularization and VEGF-induced neovascularization but did not reduce ischemia-induced retinal neovascularization. These studies, complemented with a genetic approach—namely, the employment of mice lacking individual or all three NOS isoforms—suggest that iNOS and/or nNOS in cells adjacent to endothelial cells in the presence of retinal ischemia has an antiangiogenic effect.³⁸ Also, in the developing rat retina, it has been shown that arginine and the NO donor SNAP block cell death induced by the protein synthesis inhibitor anisomycin. The antiapoptotic effect is partially mediated by cGMP.³⁹

In the present study, a wide range of concentrations of arginine and the NO donor SNP were used to induce NO release that would be beneficial against chemical ischemia, but not toxic to the tissue. However, no protection was observed at any of the concentrations used. It may be that higher concentrations than the 2 mM arginine and 4 mM SNP, used in this study, are needed. Arginine at concentrations of 1, 3, and 10 mM and the NO donor SNAP (10 mM) protect the developing retina from anisomycin-induced cell death, suggesting a paracrine neuroprotective effect of nitric oxide.³⁹

NaCN, an inhibitor of oxidative phosphorylation, is used for its ability to produce hypoxia. One must take into consideration the known effects of hypoxia on the arginine transporter.^{40,41} It has been shown that hypoxia inhibits L-arginine uptake, an effect that would influence NO production. The lack of effect of SNP may be due to abrupt and rapid release of NO, which would enhance NaCN's toxic effects. Alternatively, the formation of NO by SNP, which is accompanied by cyanide (CN⁻) formation, may be inhibited by the exogenous cyanide.^{37,42}

The slow NO donor NONOate protected the retina from chemical ischemia, but it did not offer full protection under the experimental paradigm. SIN-1 protected the retina from chemical ischemia in a concentration-dependent manner and offered maximum retinal protection at a concentration of 0.1 mM. No protection was observed at the higher concentration of 1.0 mM. SIN-1, the vasoactive metabolite of molsidomine,^{37,43} is metabolized in two steps to SIN-1A and subsequently to NO and nitrite, nitrate, superoxide anions, and peroxynitrite.^{43,44}

To examine whether the SIN-1 neuroprotective effect is due to peroxynitrite,²⁹ we examined whether the peroxynitrite scavenger L-cysteine would reverse its actions. The data show that L-cysteine only partially decreased the neuroprotective effects, suggesting that an NO and a peroxynitrite mechanism may be involved in SIN-1's actions. The putative toxic effect of SIN-1 on the retina was also examined. Eyes cups were treated with PBS in the absence and presence of different concentrations of SIN-1. SIN-1 did not influence ChAT immunoreactivity or TUNEL staining in the retina when used at the concentra-

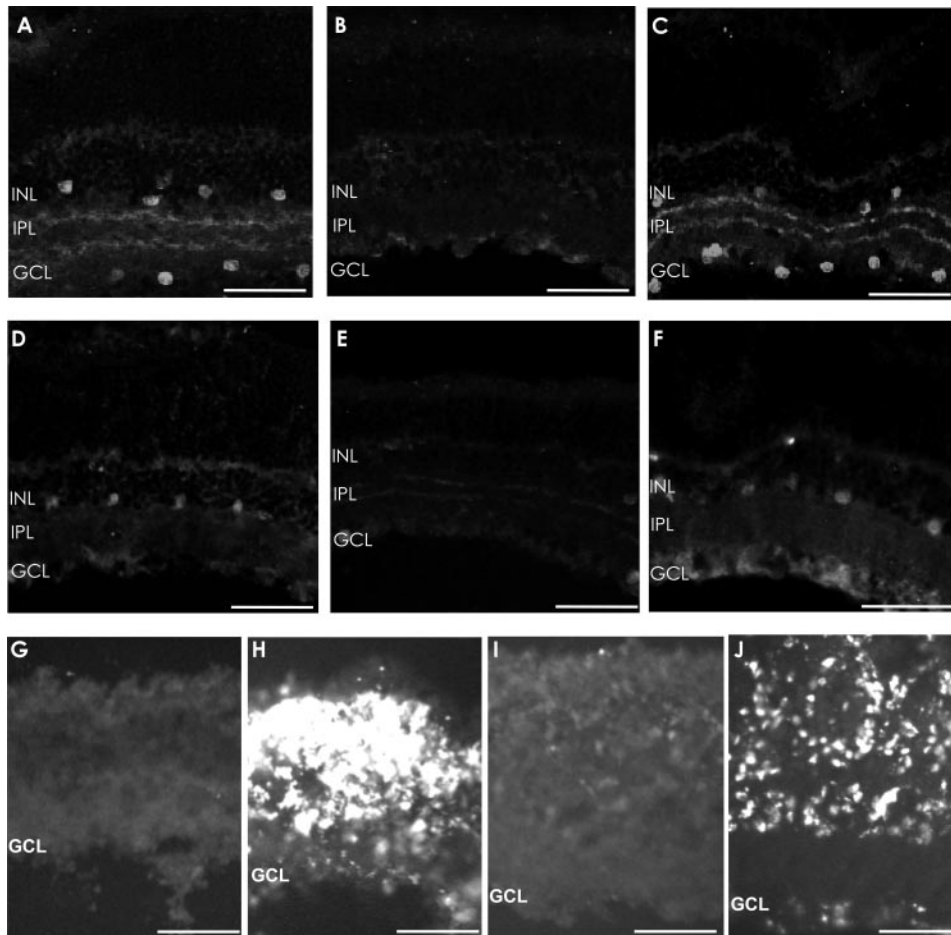


FIGURE 3. Effect of SIN-1 and SIN-1+l-cysteine on the chemical ischemia(CI)-induced damage of ChAT containing neurons and TUNEL staining in the retina. ChAT immunoreactivity was present and absent in control (A) and CI-treated (B) retinas, respectively. In retinas treated with the CI mixture and SIN-1 (0.1 mM, C; 0.3 mM, D; 1 mM, E) a concentration-dependent recovery of ChAT immunoreactivity was observed. l-Cysteine (5 mM) partially reversed the protective effect of 0.1 mM SIN-1 (F). TUNEL staining in PBS (G), CI (H), CI/SIN (I), and CI/SIN/l-Cys (J). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 50 μ m.

tions of 0.1, 0.3, and 1 mM, concentrations that were used for the protection study. However, at the higher concentration of 3 mM a reduction of cholinergic and an increase in apoptotic cells were evident.

It is obvious from these studies that SIN-1 at low concentrations (0.1 mM) provides protection against chemical ischemia, whereas at high concentrations (3 mM), it leads to cell

death (Fig. 3). It is impossible to make any suggestions as to the resultant concentrations of NO that may play a role in the actions of SIN-1. In a recent study in which an NO electrode and in vivo microdialysis were used, SIN-1 (1 mM) did not increase NO levels in the striatum.⁴⁵ There are reports suggesting that SIN-1 has a direct stimulant effect on the soluble guanylate cyclase.^{44,46,47} The present data suggest that at low

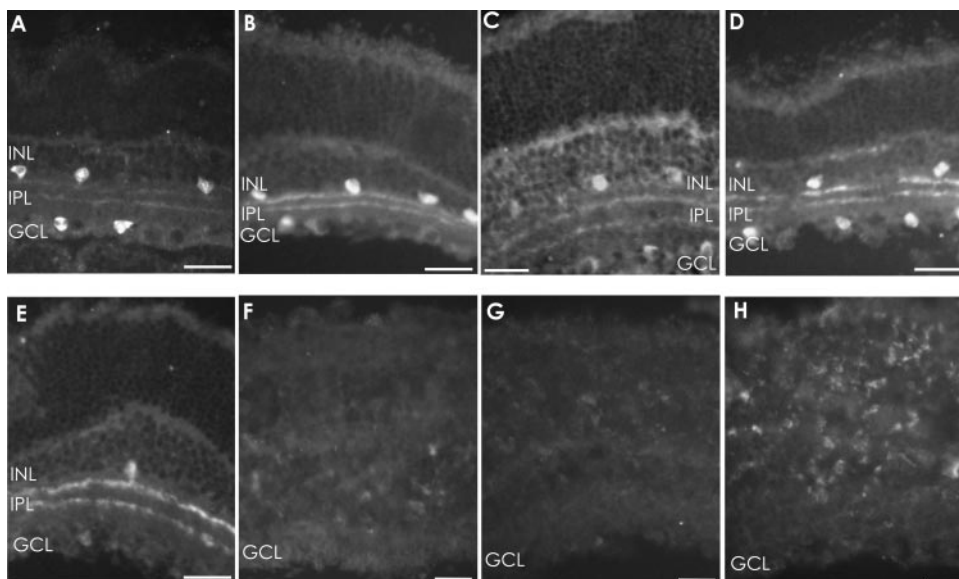


FIGURE 4. Effect of SIN-1 on ChAT immunoreactivity and TUNEL staining in the retina. Retinas were treated with (A) PBS, (B) 0.1 mM SIN-1, (C) 0.3 mM SIN-1, (D) 1 mM SIN-1, and (E) 3 mM SIN-1. Only at the highest concentration, SIN-1 (3 mM) alone produced loss of ChAT-stained cell bodies (E), and an increase in TUNEL staining (H). No TUNEL staining was observed in control retinas (F) and in retinas treated with the lower concentration of 0.1 mM SIN-1 (G). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 20 μ m.

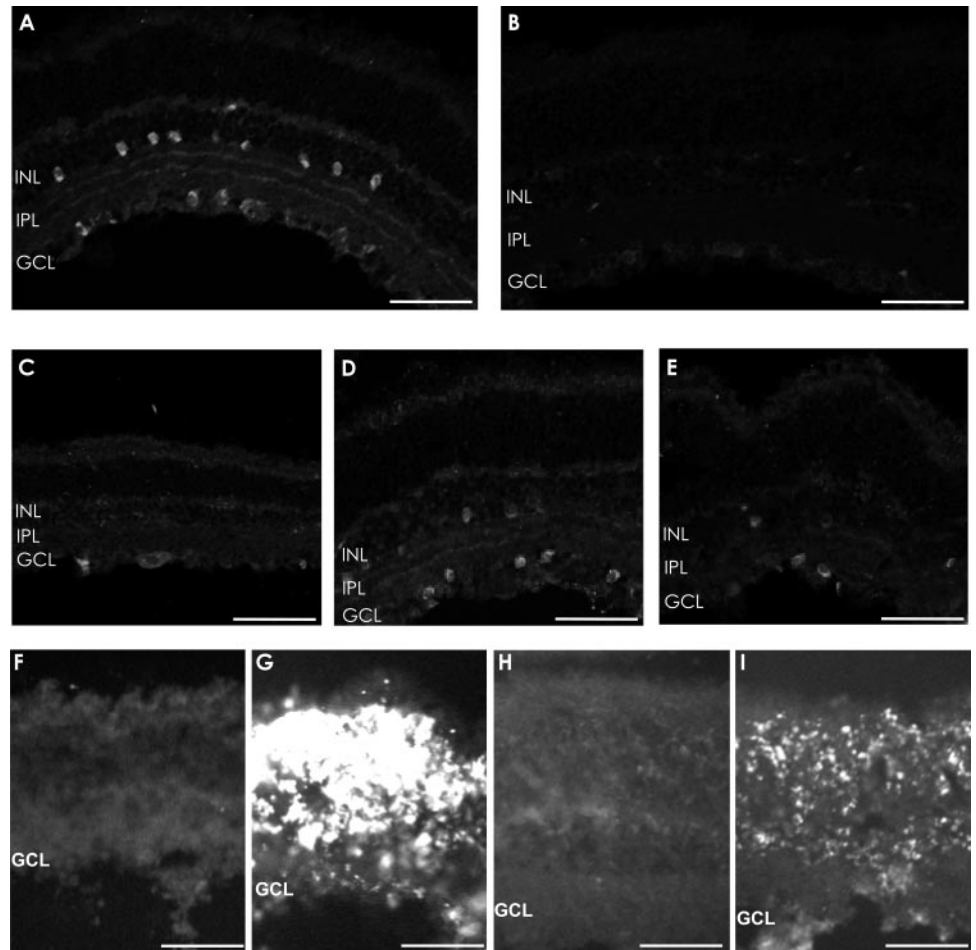


FIGURE 5. Effect of 8-Br-cGMP on the chemical ischemia (CI)-induced damage of ChAT-containing neurons and TUNEL staining in the retina. ChAT immunoreactivity in control (A) and CI-treated (B) retinas. A concentration-dependent recovery of ChAT immunoreactivity was observed in the presence of the CI mixture and 8-Br-cGMP (0.1 mM, C; 0.5 mM, D; 1 mM, E). No TUNEL staining was observed in control retinas (F), whereas a major cell loss was found in retinas treated with CI (G). Retinas treated with CI and 8-Br-cGMP (0.5 mM, H; or 0.1 mM, I) displayed no cell death or minimal cell death, respectively. INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 50 μ m.

concentrations, SIN-1 may promote neuroprotection via a cGMP mechanism, whereas at higher concentrations, it can be toxic. Whether the toxic effects are mediated by its metabolite peroxynitrite, known to induce toxicity in different paradigms,^{48,49} could not be ascertained by the present experiments. Instead, a peroxynitrite mechanism may be partially involved in the protective actions of SIN-1, as suggested by the experiments with the peroxynitrite scavenger L-cysteine. Both NO and peroxynitrite have the ability to activate a soluble guanylyl cyclase and increase cGMP levels that may be neuroprotective.^{44,50}

The involvement of cGMP in the protection of the retina from chemical ischemia was substantiated by the direct use of 8-Br-cGMP. This cell-permeable analogue of cGMP protected the retina from chemical ischemia in a concentration-dependent manner with maximum protection at 0.5 mM and partial protection at 1 mM. 8-Br-cGMP (1 mM) was also shown to have a partial protective effect against anisomycin-induced cell death in the developing retina.³⁹

It is evident from the present study that a cGMP mechanism is involved in the protection of the retina from chemical ischemia. As stated earlier, somatostatin has been shown to increase NO and cGMP levels in the retina by activating the sst_2 receptor subtype,^{12,28} whereas sst_2 selective ligands were found to protect the retina from chemical ischemia,¹⁷ as SIN-1 and 8-Br-cGMP did in the present study. In paradigms of neurotoxicity in the brain, somatostatin was shown to have neuroprotective effects by a cGMP dependent mechanism.²⁴ To examine whether a NO/cGMP mechanism mediates the neuroprotection offered by the sst_2 receptor activation to the retina,¹⁷ we examined whether the inhibition of NOS and the

soluble guanylyl cyclase was able to reverse the protective effect of the sst_2 agonist. NMMA and the two sGC inhibitors ODQ and NS 2028 reversed the protective effect of BIM23014, thus implicating NO/sGC and cGMP in the neuroprotection. To further ascertain the importance of cGMP, assays were performed to assess cGMP levels in retinas treated with PBS or chemical ischemia alone or in the presence of BIM23014 and BIM23014 plus NS 2028. However, no statistically significant differences in cGMP levels were observed, perhaps for technical reasons or because of the abundance of sGC in the vasculature. Under the experimental conditions used, the isolation of the latter may have yielded differences in cGMP levels.

The subsequent signaling by which cGMP offers protection may involve the regulation of calcium channels²⁷ and the reduction of the toxic high levels of intracellular calcium induced by ischemia.¹⁹ Although there are no relevant reports in retinal circuitry to support this conjecture, it has been shown that NO/cGMP mediates the inhibition of calcium channels in retinal pericytes and reduces calcium influx.⁵¹

In addition, it has been shown that peroxynitrite activates voltage-dependent calcium channels (VDCCs)⁵² and influences neurotransmitter release.⁵³ Recent studies have indicated that NO, cGMP and SIN-1 can stimulate the release of GABA.⁵⁴ Inhibitory neurotransmitters such as GABA could counteract the toxic influence of glutamate on retinal neurons during retinal ischemia and would be expected to provide protection.¹⁹ Actually, GABA has been suggested as a neuroprotective agent in brain acute ischemic stroke.⁵⁵ Therefore, one cannot exclude the possibility that NO, cGMP, and SIN-1 increase GABA levels in rat retina and assist in the neuroprotection in

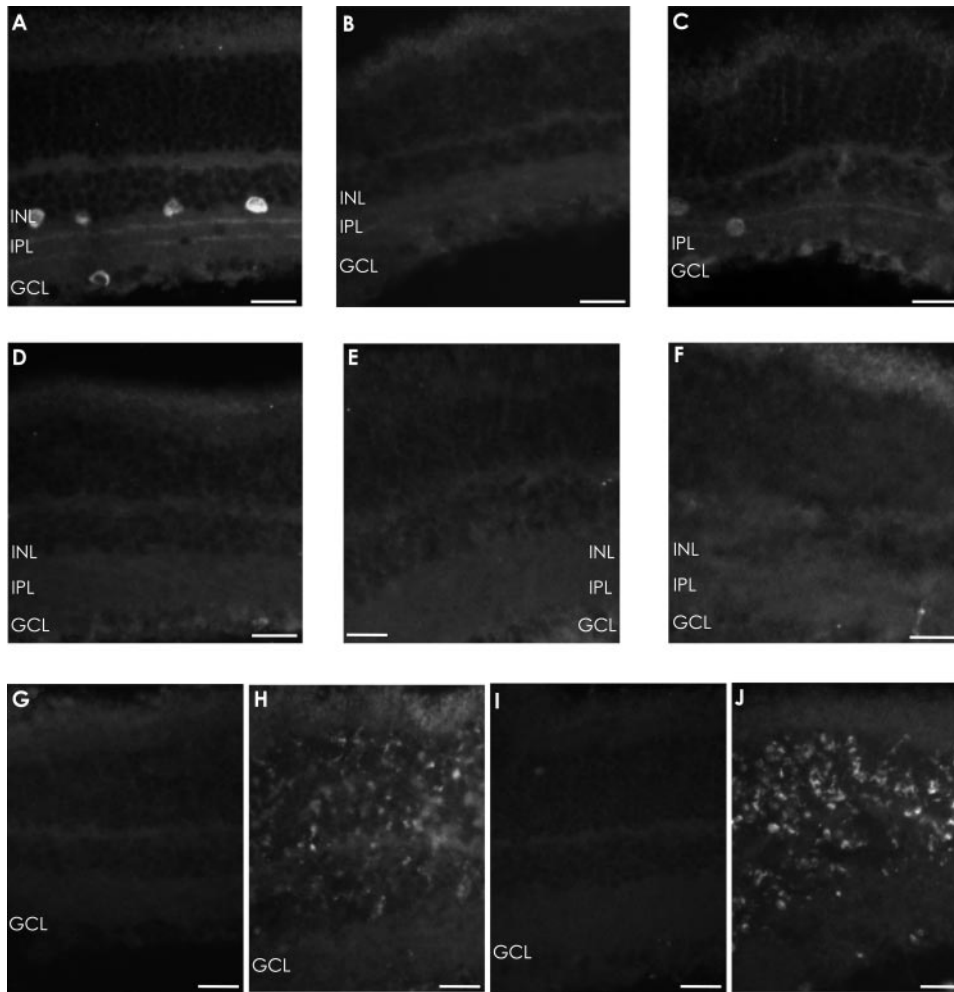


FIGURE 6. Effect of ODQ, NS 2028, and NMMA on the neuroprotective actions of BIM23014. ChAT immunoreactivity is present in retinas treated with PBS (A) and BIM23014 in the presence of the CI mixture (C). It is absent in retinas treated with the CI mixture alone (B) or with the CI mixture and BIM23014/ODQ (D), BIM23014/NS2028 (E), and BIM23014/NMMA (F). No TUNEL staining is observed in control retinas (G) and in retinas treated with BIM23014 (I), in contrast to retinas treated with CI mixture alone (H) or with BIM23014/ODQ (J). INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Bars, 20 μ m.

the present paradigm. However, this conjecture must be substantiated.

In conclusion, the present study reports for the first time that NO/peroxynitrite and cGMP are important mediators in the protection of rat retina from chemical ischemia. Furthermore, the data support the involvement of the NO/sGC/cGMP signaling pathway in the neuroprotective effects bestowed on the retina by the sst₂ somatostatin ligands in the same model.

References

1. Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 1973;179:77-79.
2. Shapiro B, Kronheim S, Pimstone B. The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metab Res*. 1979;11:79-80.
3. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:86-88.
4. Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res*. 2003;43:1805-1815.
5. Helboe L, Moller M. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2376-2382.
6. Johnson J, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 1998;393:93-101.
7. Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience*. 1999;94:675-683.
8. Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:1600-1609.
9. Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P. Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2001;363:680-694.
10. Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, et al. Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:1499-1506.
11. Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:3191-3199.
12. Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology*. 2002;43:899-909.
13. Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res*. 2002;936:1-14.
14. Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science*. 1997;276:1706-1709.
15. Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularisation. *Exp Eye Res*. 2002;74:553-559.
16. Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci Lett*. 1990;119:175-178.
17. Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2005;371:44-53.

18. Tallent M, Liapakis G, O'Carroll A-M, Lolait SJ, Dichter M, Reisine T. Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience*. 1996;71:1073-1081.
19. Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23:91-147.
20. Kouvidi E, Papadopoulou-Daifoti Z, Thermos K. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci Lett*. 2006;391:82-86.
21. Fontanesi G, Gargini C, Bagnoli P. Postnatal development of somatostatin 2A(ss_{2A}) receptors expression in the rabbit retina. *Dev Brain Res*. 2000;123:67080.
22. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 1996;381:242-245.
23. Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. [¹²⁵I]Tyr10-cortistatin 14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998;357:483-489.
24. Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Chiessa R, Vezzani A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem*. 1997;68:319-327.
25. Braun H, Schulz S, Becher A, Schroder H, Hollt V. Protective effects of cortistatin (CST-14) against kainate-induced neurotoxicity in rat brain. *Brain Res*. 1998;803:54-60.
26. Rauca C, Schafer K, Hollt V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999;360:633-638.
27. Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*. 1994;369:336-339.
28. Mastrodimitou N, Kiagiadaki F, Hodjarova M, Karagianni E, Thermos K. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. *Regul Pept*. 2006;133:41-46.
29. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Navilliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Rad Biol Med*. 2001;30:463-488.
30. Olesen S-P, Drejer J, Axelsson O, et al. Characterization of NS2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol*. 1998;123:299-309.
31. Luo X, Lambrou GN, Sabel JA, Hicks D. Hypoglycemia induces general neuronal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2695-2705.
32. Izumi Y, Benz AM, Kurby CO, et al. An ex vivo rat retinal preparation for excitotoxicity studies. *J Neurosci Methods*. 1995;60:219-225.
33. Sall JW, Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE. Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2004;79:465-476.
34. Baldsiak-Figiel A, Lang GK, Kampmeier J, Lang GE. Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J Endocrinol*. 2004;180:417-424.
35. Koesling D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J*. 1991;5:2785-2791.
36. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*. 2003;93:96-105.
37. Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide donors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;225:200-206.
38. Ando A, Yang A, Nambu H, Campochiaro PA. Blockade of nitric oxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol Pharmacol*. 1992;62:539-544.
39. Guimaraes CA, Assrey J, Linden R. Paracrine neuroprotective effect of nitric oxide in the developing retina. *J Neurochem*. 2001;76:1233-1241.
40. Block ER, Herrera H, Couch M. Hypoxia inhibits L-arginine uptake by pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol*. 1995;269:L574-580.
41. Zhakarikov SI, Block ER. Association of L-arginine transporters with fodrin; implication for hypoxic inhibition of arginine uptake. *Am J Physiol*. 2000;278:L111-L117.
42. Bates JN, Baker MT, Guerra R, Harrison DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(suppl):S157-S165.
43. Feelisch M, Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*. 1989;139:19-30.
44. Schrammel A, Pfeiffer S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholininosydnonimine involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol*. 1998;54:207-212.
45. Rocchitta G, Migheli R, Mura MP, et al. Signalling pathways in the nitric oxide donor-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: evidence that exogenous nitric oxide promotes Ca^{2+} entry through store-operated channels. *Brain Res*. 2004;1023:243-252.
46. Kukovetz WR, Holzmann S. Mechanism of vasodilation by molsidomine. *Am Heart J*. 1985;109:637-640.
47. Trakranungsie N, Will JA. Comparative vasodilation of peroxynitrite and 3-morpholininosydnonimine. *Life Sci*. 2001;69:2349-2359.
48. Estevez AG, Radj R, Barbeito I, Shin JT, Thompson J, Beckman JS. Peroxynitrite induces apoptosis in PC12 cells and alters responses to neurotrophic factors. *J Neurochem*. 1995;65:1543-1550.
49. Villa LM, Salas E, Darly-Usmar VM, Radomski MV, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:12383-12387.
50. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;211:1-6.
51. Sakagami K, Kawamura H, Wu DM, Puro DG. Nitric oxide/cGMP-induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvasc Res*. 2001;62:196-203.
52. Ohkuma S, Katsura M, Higo A, et al. Peroxynitrite affects Ca^{2+} influx through voltage-dependent calcium channels. *J Neurochem*. 2001;76:341-350.
53. Okhuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T, Kuriyama K. Nitric oxide-induced [³H]GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. *J Neurochem*. 1995;65:1109-1114.
54. Yu D, Eldred WD. Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. *J Comp Neurol*. 2005;483:278-291.
55. Green AR, Hainsworth AH, Jackson DM. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology*. 2000;39:1483-1494.

Dopamine (D1) receptor activation and nitrinergic agents influence somatostatin levels in rat retina

Foteini Kiagiadaki, Emmanuel Koulakis, Kyriaki Thermos*

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71110 GR, Greece

Received 8 June 2007; accepted in revised form 4 September 2007

Available online 14 September 2007

Abstract

Somatostatin (SRIF) influences the release of two important neuromodulators of retinal circuitry, dopamine (DA) and nitric oxide (NO). The aim of the present study was to examine whether DA and NO modulate SRIF release in rat retina, and the mechanisms involved in their actions. Retinas of adult female Sprague–Dawley rats (250–300 g) were mechanically detached from the eyecup and *ex vivo* experiments were performed. Retinal explants were incubated in the presence of dopaminergic [DA (10 μ M, 100 μ M and 200 μ M), apomorphine (nonselective D1/D2 agonist, 0.50 μ M, 1.0 μ M and 10 μ M), A68930 (D1 selective agonist, 0.50 μ M, 1.0 μ M and 10 μ M), quinpirole (D2 selective agonist, 0.50 μ M, 1.0 μ M and 10 μ M), SCH 23390 (D1 selective antagonist, 250 nM and 500 nM) and sulpiride (D2 selective antagonist, 100 μ M and 200 μ M)], and nitrinergic agents [arginine (62.5 μ M–5 mM), SIN-1 (50 μ M, 100 μ M and 500 μ M) and 8-Br-cGMP (50 μ M, 250 μ M and 500 μ M)]. SRIF levels were quantified using radioimmunoassay (RIA). Dopamine had no effect on SRIF levels. Apomorphine produced a concentration dependent decrease and increase in SRIF levels, suggestive of pre- and postsynaptic effects. A68930 (10 μ M) and SCH 23390 (250 nM and 500 nM) mimicked and reversed apomorphine's postsynaptic actions, respectively. Quinpirole had no effect, but blockade of D2 autoreceptors by sulpiride (200 μ M) afforded an increase in SRIF levels. Arginine and SIN-1 increased, and 8-Br-cGMP attenuated SRIF levels. These results show that dopamine D1 receptors, and NO/peroxynitrite agents modulate SRIF release in the retina suggesting that the triad SRIF–DA–NO have reciprocal interactions via which they regulate retinal circuitry and vision transduction.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: D1/D2 dopamine receptor ligands; arginine; SIN-1; 8-Br-cGMP

1. Introduction

The neuropeptide somatostatin (Somatotropin Release Inhibitory Factor, SRIF, Brazeau et al., 1973) is present in the retina (Shapiro et al., 1979) of many species where it is found in amacrine, ganglion, and interplexiform cells and believed to function as a neurotransmitter, neuromodulator or trophic factor (for a review see Thermos, 2003). The actions of somatostatin in the retina are mediated by specific receptors as substantiated by pharmacological (Vasilaki et al., 2003) and reverse transcriptase–polymerase chain reaction studies (Mori et al., 1997).

Five SRIF receptor subtypes (sst₁–sst₅) have been cloned (for classification and nomenclature see Hoyer et al., 1995)

and recent immunohistochemical studies have permitted the mapping of the sst's present in retinal circuitry (Thermos, 2003). The function of these receptors is still under investigation, yet release studies in rat retinal explants supported the role of sst₁ as an autoreceptor (Mastrodimitou and Thermos, 2004), in agreement with data from sst₁ KO mice (Dal Monte et al., 2003). The sst₂ receptor has been shown to regulate nitric oxide and cGMP production (Vasilaki et al., 2002; Mastrodimitou et al., 2006) and glutamate release (Bigiani et al., 2004; Dal Monte et al., 2003). While glutamate is the major neurotransmitter in the retina (Bloomfield and Dowling, 1985a,b; Brandstatter et al., 1998), the role of NO as a neuronal messenger and neuromodulator in retina is also well established (Goldstein et al., 1996). It activates a soluble guanylyl cyclase (Koch et al., 1994; Ding and Weinberg, 2007) with important actions on visual transduction and adaptation events.

* Corresponding author. Tel.: +30 2810 394533; fax: +30 2810 394530.

E-mail address: thermos@med.uoc.gr (K. Thermos).

In rabbit retina, sst₁ immunoreactivity was reported in non-tyrosine hydroxylase (TH) and TH immunoreactive amacrine cells, in displaced amacrine cells and in the ganglion cell layer (GCL) (Cristiani et al., 2000) and sst₂ immunoreactivity was also reported to be present in TH containing amacrine cells in rat (Helboe and Moller, 1999) and rabbit retina (Fontanesi et al., 2000). The reported colocalization of the sst₁ and sst₂ receptors and TH in the retina suggested that SRIF may be a regulator of dopamine release. To address this issue, Kouvidi et al. (2006) investigated the effect of SRIF and selective sst analogs on dopamine release in functional ex vivo experiments employing rat retinal explants. It was shown that somatostatin via its activation of sst₁ and sst₂ receptors increased dopamine levels.

Dopamine is one of the major neuromodulators of retinal circuitry (Witkovsky and Schutte, 1991; Witkovsky, 2004). It is synthesized and released by a subset of dopaminergic amacrine and interplexiform cells (Kramer, 1971; Dowling and Ehinger, 1978), and acts on dopamine receptors that are found in target neurons distributed throughout the retina (Nguyen-Legros et al., 1999; Witkovsky, 2004). The D1 receptor has been localized in rod bipolar, horizontal, amacrine and ganglion neurons (Veruki and Wässle, 1996), and the D2 receptor acts as an autoreceptor for dopamine (Veruki, 1997).

SRIF, dopamine and nitric oxide are neuromodulators of retinal circuitry implicated in light adaptation processes (Zalutsky and Miller, 1990; Witkovsky, 2004; Greenstreet and Djamgoz, 1994). From the studies presented above it appears that SRIF influences both dopamine and NO release, while NO has been shown to decrease DA release in the bovine retina (Bugnon et al., 1994) and to inhibit the depolarization-induced release of endogenous dopamine in the rabbit retina (Djamgoz et al., 1995). In addition, DA has recently been shown to increase NO release in carp retina (Sekaran et al., 2005) (Table 1).

Therefore, the above triad may provide a feedback loop for the regulation of each others synthesis and release that could result in the fine tuning of retinal circuitry and light adaptation

Table 1
The triad somatostatin, dopamine and nitric oxide (via ONOO⁻ or cGMP) reciprocally modulate each other's release

Agent	Effect on neurotransmitter release	Putative signaling involved	Reference
Somatostatin	↑ Dopamine	Sst ₁ , Sst ₂ receptors	Kouvidi et al. (2006)
Somatostatin	↑ Nitric oxide	Sst ₂ receptors	Vasilaki et al. (2002)
Somatostatin	↑ cGMP	Sst ₂ receptors	Mastrodimou et al. (2006)
Dopamine	↑ Somatostatin	D1 receptors	Present study
Dopamine	↑ Nitric oxide	D1 receptors	Sekaran et al. (2005)
Nitric oxide	↑ Somatostatin	ONOO ⁻ /VDCC ^a	Present study
Nitric oxide	↓ Dopamine	cGMP independent mechanism [b] and Ca ⁺⁺ dependent K ⁺ channels [c]	[b] Bugnon et al. (1994) [c] Djamgoz et al. (1995)
cGMP	↓ Somatostatin	PKG/VDCC ^b	Present study

^a Ohkuma and Katsura (2001).

^b Gray et al. (1999).

processes. To study this hypothesis, the present study focused on the reciprocal interaction not yet studied, namely the effect of DA and NO in the modulation of SRIF release.

2. Methods

2.1. Animals

Adult female Sprague–Dawley rats (250–300 g) were employed, and the housing conditions and all procedures that were performed on the animals were in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2. Effect of dopaminergic and nitrinergic systems on somatostatin levels in rat retinal explants

Retinas were mechanically detached from the eyecup, incubated in Medium-199 with bacitracin (1 mg/ml) for 1 h at 37 °C and 5% CO₂ and ex vivo experiments were performed (Mastrodimou and Thermos, 2004). To examine the effect of DA on SRIF release, retinal explants were incubated in fresh medium for one hour in the absence (control, *n* = 15) or presence of DA [10 μM (*n* = 7), 100 μM (*n* = 10) and 200 μM (*n* = 6)], apomorphine [nonselective D1/D2 agonist, 0.50 μM (*n* = 10), 1.0 μM (*n* = 13) and 10 μM (*n* = 13)], A68930 [D1 selective agonist, 0.50 μM (*n* = 9), 1.0 μM (*n* = 7) and 10 μM (*n* = 7), (Kebabian et al., 1990)], quinpirole [D2 selective agonist, 0.50 μM (*n* = 10), 1.0 μM (*n* = 8) and 10 μM (*n* = 7)], SCH 23390 [D1 selective antagonist, 250 nM (*n* = 5) and 500 nM (*n* = 6)] and sulpiride [D2 selective antagonist, 100 μM (*n* = 7) and 200 μM (*n* = 6)]. To examine the effect of the nitric oxide system on SRIF release, retinal explants were incubated in fresh medium for one hour in the presence of arginine [62.5 μM (*n* = 4), 125 μM (*n* = 8), 250 μM (*n* = 10), 500 μM (*n* = 8) and 5 mM (*n* = 9)], the NO and peroxynitrite donor SIN-1 [50 μM (*n* = 8), 100 μM (*n* = 8) and 500 μM (*n* = 6)] and 8-Br-cGMP [50 μM (*n* = 6), 250 μM (*n* = 8) and 500 μM (*n* = 7)]. The concentrations of the dopaminergic and nitrinergic ligands employed are in agreement with other studies in the literature (Schroder et al., 1990; Bugnon et al., 1994; Guimaraes et al., 2001; Huppé-Gourgues et al., 2005; Sekaran et al., 2005).

After the centrifugation of the retinas (12,000 rpm, 4 °C for 15 min), acetic acid (300 μl) was added to the precipitant and the samples were boiled for 10 min. The samples were subsequently sonicated, and aliquots were taken for protein quantification (Bradford assay). The rest were stored at –80 °C for 24–48 h, centrifuged at 13,000 rpm, 4 °C for 20 min and the supernatants were aliquoted (100 μl), lyophilized and stored at –80 °C till RIA assay was performed.

2.3. Radioimmunoassay

The lyophilized samples were diluted in radioimmunoassay buffer containing NaCl (0.15 M), gelatin (0.1%), BSA (0.1%), bacitracin (0.02%), NaN₃ (0.02%)/NaN₂ (0.1 M) (NaN₂: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄). For the determination of somatostatin

levels, a rabbit antiserum raised against SRIF was used at a final concentration of 1:3000 (kindly provided by Dr. Sperk, Sperk and Widmann, 1985). Synthetic SRIF (Bachem, Bubendorf, Switzerland) at a range of 0.78–400 pg/100 μ l and [125 I]Tyr 11 -SRIF (20,000 cpm; 2000 Ci/mmol, Amersham, Vienna, Austria) were used as standard and radiolabelled tracer, respectively. The mixture was incubated at 4 °C for 24 h. Bound somatostatin was separated from free by addition of 2.5% charcoal/0.25% dextran in radioimmunoassay buffer and subsequently centrifuged at 12,000 rpm, 4 °C for 10–15 min. The supernatant of each sample was counted in a gamma counter (LKB-Wallac, Turku, Finland, 75% efficiency).

2.4. Statistical analysis

Analysis of data was performed using a one-way ANOVA with post hoc analysis (Dunnett; GraphPad Prism 2.01).

3. Results

3.1. Dopaminergic agents influence somatostatin levels in rat retinal explants

The concentration of basal SRIF levels in rat retina was 1.3 ng/mg protein. Dopamine had no effect on SRIF levels (Fig. 1). However, the nonselective agonist apomorphine influenced SRIF levels in a concentration dependent manner. As shown in Fig. 2A, apomorphine at the lowest concentration (0.5 μ M) employed had no effect on SRIF levels. At the concentration of 1.0 μ M, apomorphine produced a statistically significant decrease, while at the higher concentration of 10 μ M it increased SRIF levels. The selective D1 antagonist SCH 23390 (250 nM and 500 nM) reversed the actions of apomorphine (10 μ M) to control levels (Fig. 2C).

To examine further whether the apomorphine mediated increase in SRIF levels was mediated by the D1 receptor, selective agonists for both dopamine receptor subtypes (D1 and D2) were used. The selective D1 agonist A68930 increased SRIF levels in a concentration dependent manner, while the D2 selective agonist quinpirole had no effect (Fig. 3A, B). The D2 selective antagonist sulpiride increased SRIF levels in

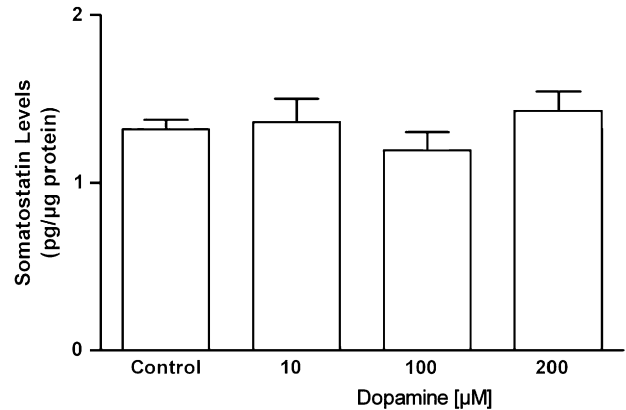


Fig. 1. Effect of DA on SRIF levels in the retina. DA had no effect on somatostatin levels.

a statistically significant manner at the concentration of 200 μ M (Fig. 4).

3.2. Nitric oxide agents increase somatostatin levels in rat retinal explants

In order to examine the effect of NO on somatostatin release in the rat retina, agents that increase NO levels were employed. Arginine, the starting material for the synthesis of NO, was employed in different concentrations. As shown in Fig. 5A, it increased SRIF levels in a statistically significant manner only at the very high concentration of 5 mM. SIN-1, a NO and peroxynitrite donor, also increased SRIF levels in a concentration dependent manner (Fig. 5B).

3.3. 8-Br-cGMP attenuates somatostatin levels in rat retinal explants

To examine whether the actions of arginine and SIN-1 on SRIF levels were mediated by a cGMP mediated mechanism, the effect of the membrane permeable molecule 8-Br-cGMP was examined. As shown in Fig. 5C, 8-Br-cGMP displayed the exact opposite effect, namely it attenuated SRIF levels.

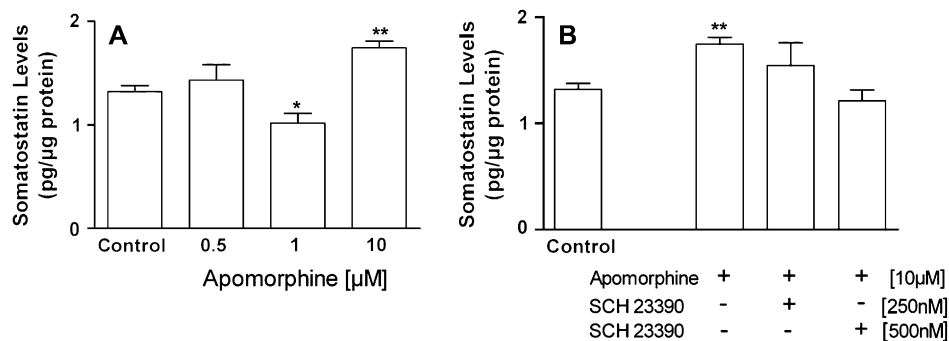


Fig. 2. Effect of apomorphine on SRIF levels in rat retina. (A) The D1/D2 nonselective agonist apomorphine influenced somatostatin levels at a concentration dependent manner. (B) The D1 selective antagonist SCH 23390 reversed the action of apomorphine (10 μ M). * p < 0.05, ** p < 0.01 as compared to control values.

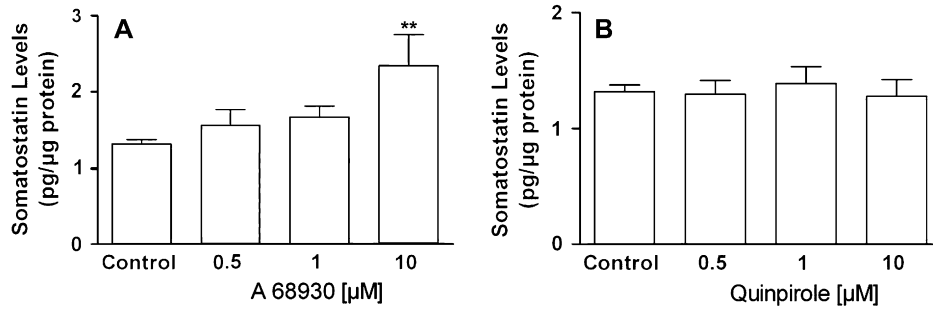


Fig. 3. Effect of D1 and D2 selective agonists on SRIF levels in the retina. (A) A68930, the selective D1 agonist, increased somatostatin levels in a concentration dependent manner, while (B) the D2 selective agonist, quinpirole, had no effect. ** $p < 0.01$ as compared to control values.

4. Discussion

SRIF, DA and NO are neuromodulators of retinal circuitry. Each neuromodulator in this triad may influence the regulation of the others' synthesis and release that could result in the fine tuning of retinal circuitry. In previous studies, we have shown that SRIF influences the release of both DA (via sst_1 and sst_2 activation) and NO (via sst_2 activation) in rat retina (Vasilaki et al., 2002; Kouvidi et al., 2006). Other investigators have shown that DA enhances NO release in carp retina (Sekaran et al., 2005), while NO attenuates DA release in bovine and rabbit retina (Bugnon et al., 1994; Djamgoz et al., 1995). The present study focused on the reciprocal interaction not yet studied, namely the effect of DA and NO in the modulation of SRIF release.

Dopamine released in the retina (Dowling and Ehinger, 1978; Witkovsky and Schutte, 1991) affects the physiology of the retina by activating two major families of DA receptors, namely D1 and D2 (Nguyen-Legros et al., 1999; Witkovsky, 2004). In the present study, we assessed in *ex vivo* experiments the ability of dopamine itself, and the nonselective and selective D1 and D2 receptor ligands to influence somatostatin levels in rat retina. Dopamine had no effect on SRIF levels under the conditions used. We presume that this may be due

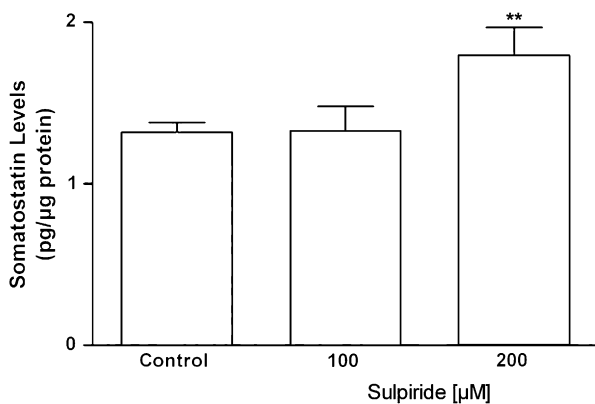


Fig. 4. Effect of D2 selective antagonist on SRIF levels in the retina. Sulpiride, the D2 selective antagonist, increased somatostatin levels in a statistically significant manner at the concentration of 200 μM. ** $p < 0.01$ as compared to control values.

to its hydrophilic nature, limited absorption, and possible metabolism. However, the nonselective agonist apomorphine displayed a decrease and an increase of SRIF levels, reminiscent of its activation of presynaptic D2 autoreceptors and postsynaptic D1 receptors, respectively (Mereu et al., 1985; Meller et al., 1986).

To examine further the identity of the DA receptor involved in the increase of SRIF levels, we initially examined the effect of the specific D1 antagonist SCH 23390 on apomorphine's actions. SCH 23390, used at a concentration that binds with high specificity to the D1 receptor (Seeman and Van Tol, 1994), reversed apomorphine's actions. These results suggested the involvement of the D1 dopamine receptor in the release of SRIF. This finding was further verified by the examination of the direct action of the selective D1 agonist A68930 (Kebabian et al., 1990). This agent mimicked the effect of apomorphine at the concentration of 10 μM, agreeing with its postsynaptic effects. In contrast, quinpirole the D2 agonist had no effect on the SRIF levels at any of the concentrations tested. Unlike apomorphine, it did not reduce SRIF levels at the concentration of 1 μM. However, the use of the D2 selective antagonist sulpiride alone produced an increase in SRIF levels suggesting a blockade of D2 autoreceptors, the subsequent increase of dopamine levels and postsynaptic D1 receptor activation.

The pharmacokinetic properties of the drugs employed and their absorbance in the retina are not known, thus large concentrations were used in order to ensure receptor activation in retinal cells. This may raise questions regarding selectivity. For instance, the selective D1 agonist A68930 (10 μM), shown to increase SRIF levels, also has an affinity for D2 (EC_{50} 3910 nM; Kebabian et al., 1990). However, it is unlikely that its effects are due to the activation of D2 receptors, since the selective D2 agonist quinpirole had no effect on SRIF's release. Similar or higher concentrations of dopaminergic agents (selective D1 and D2 agonists and antagonists) have been used in other studies in the retina (Sekaran et al., 2005; Huppé-Gourgues et al., 2005).

Recently, D1 receptor activation was shown to provoke a reduction in ERG b-wave amplitude in the rabbit, with no effect observed by D2 activation. The D2 antagonist sulpiride, suggested to act on D2 autoreceptors, also produced a reduction in b-wave (Huppé-Gourgues et al., 2005). This paradigm

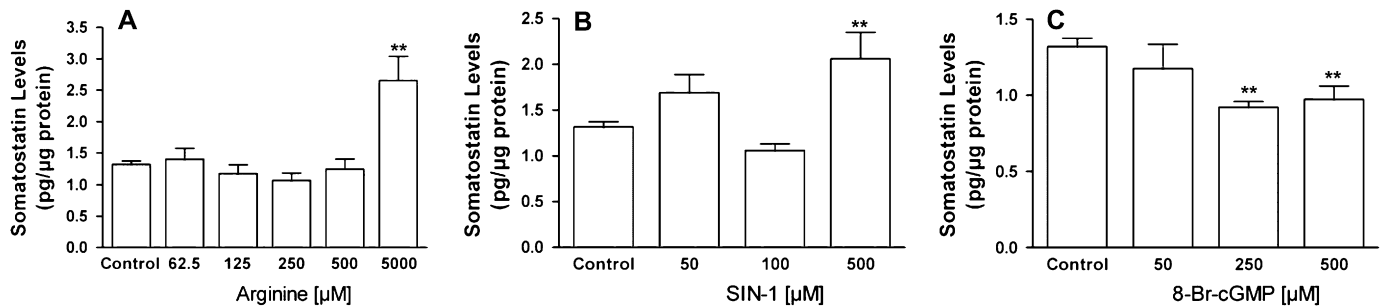


Fig. 5. Effect of arginine, SIN-1 and 8-Br-cGMP on SRIF levels in the retina. (A) Arginine and (B) NO/peroxynitrite donor SIN-1 produced a statistically significant increase in SRIF levels. (C) The cGMP analog 8-Br-cGMP reduced somatostatin levels in a concentration dependent manner. $**p < 0.01$ as compared to control values.

supports that the D1 receptors are involved in the transmission of information within the inner and the middle parts of the retina. The pharmacology presented in this work is in full agreement with the results of our study, and shows the involvement of the D1 receptor in different functions of DA in the retina.

The present results provide new evidence regarding the modulatory role of DA on SRIF release. To ascertain whether this effect is a result of a direct activation of the D1 receptor, possibly located on the SRIF amacrine neurons, immunohistochemistry studies were essential. We employed a number of commercially available D1 receptor antibodies with variable specificity and resolution of signal, none of which substantiated the localization of the D1 receptor as previously shown by Veruki and Wässle (1996). In the latter study, it was shown that the D1 receptors are localized mainly to horizontal and cone bipolar cells but also to a small number of non identified amacrine cells. Therefore, we cannot conclude whether the effect of the dopamine agents on SRIF release is mediated by a direct or an indirect mechanism. Activation of the D1 receptors found on retinal neurons may induce the release of another neurotransmitter that subsequently mediates the release of SRIF. In agreement to this conjecture, a recent investigation showed that dopamine increased nitric oxide release during illumination and this effect was mediated by the activation of D1 receptors (Sekaran et al., 2005).

In the present study, the effect of NO on SRIF release was also examined. Arginine the starting material for NO synthesis (Palmer et al., 1988) was employed to increase the levels of NO in the retina. The quantification of NO levels produced by arginine is not easy to assess, therefore a range of arginine concentrations was employed. The levels of SRIF were influenced by arginine in a positive manner only at the high concentration of 5 mM. Arginine concentrations of up to 10 mM have been used to provide appropriate concentrations of NO (Guimaraes et al., 2001). A similar increase was observed when SIN-1 was incubated with the retinal explants.

SIN-1 is considered a NO and peroxynitrite (ONOO^-) donor (Schrammel et al., 1998; Bohn and Schonafinger, 1989). Peroxynitrite is formed by the reaction of NO with superoxide (Huie and Padmaja, 1993). Therefore, SIN-1 is metabolized to NO/superoxide (Bohn and Schonafinger, 1989; Feilish et al., 1989) and subsequently to ONOO^- . In vitro experiments showed that SIN-1 (1.0 mM) did not yield any appreciable

NO concentration (Rocchitta et al., 2004), suggesting a major involvement of ONOO^- in the actions of SIN-1.

Both NO and peroxynitrite have been shown to influence neurotransmitter release in a positive and negative manner (Gray et al., 1999; Okada et al., 2001; Yu and Eldred, 2005). In turtle retina, NO and ONOO^- stimulated GABA and glycine release. The neurotransmitter release was dependent on specific cell types and through multiple mechanisms (Yu and Eldred, 2005). In this very elegant study using immunohistochemistry, it was shown that in horizontal cells NO increases GABA release primarily through a cGMP mediated mechanism. ONOO^- played a larger role in amacrine cells where its excitatory actions on GABA release were calcium dependent. The investigators proposed that this was mediated by ONOO^- activation of voltage dependent calcium channels (VDCCs; Ohkuma and Katsura, 2001).

Therefore, it can be conjectured that the increase of SRIF by SIN-1 may also be mediated via the activation of VDCCs by ONOO^- , as was suggested for GABA release. It is less plausible that the increase in SRIF levels by SIN-1 could be mediated by the inhibitory neurotransmitter GABA.

Both NO and peroxynitrite have the ability to activate a soluble guanylyl cyclase and increase cGMP levels (Bohme et al., 1978; McDonald and Murad, 1996; Schrammel et al., 1998). We examined whether the membrane permeable cGMP analog, 8-Br-cGMP, could mimic the effects of arginine and SIN-1 on SRIF release. As shown in Fig. 5C, the exact opposite was observed. 8-Br-cGMP produced a concentration dependent attenuation of SRIF levels. In a recent study, it was shown that SIN-1 (5 mM) induced a long-lasting increase in dopamine concentrations in the striatum of freely moving rats, but this increase was not reversed by the sGC inhibitor ODQ. These results suggested that the actions of SIN-1 on DA levels were not cGMP mediated (Rocchitta et al., 2004). In agreement with these data, Yu and Eldred (2005) showed that NO inhibits glycine release in turtle retina, an effect mimicked by SIN-1 but not by 8-Br-cGMP, providing further support for NO and SIN-1 cGMP independent actions.

In the present study both arginine and SIN-1 increased SRIF levels, an effect not mimicked by 8-Br-cGMP. The increase in SRIF levels by these two agents may be due to increased levels of peroxynitrite and subsequent activation of VDCCs, as previously suggested (Ohkuma and Katsura,

2001; Yu and Eldred, 2005). However, cGMP can modulate VDCCs in an inhibitory fashion by its activation of cGMP-dependent kinases (Carabelli et al., 2002). This would lead to the attenuation of neurotransmitter release (Gray et al., 1999) in agreement with the data shown in this study.

In summary, DA and NO both influence SRIF levels in rat retina. DA's actions are mediated by the D1 receptor. The effects of D1 activation on SRIF release may be indirect and possibly mediated by NO, something that must be further investigated. As a result of arginine addition, NO's excitatory actions on SRIF levels may act through a peroxynitrite mechanism as observed for the NO/peroxynitrite donor SIN-1. cGMP modulates SRIF release in a negative manner. These results support our original hypothesis that SRIF–DA–NO have reciprocal interactions (Table 1) via which they regulate retinal circuitry. A more detailed investigation is essential in order to: (a) examine further the interrelationship of the three modulators and their reciprocal actions in rat retina and (b) pinpoint the exact players involved in each step of the modulation process (e.g. NO, ONOO⁻, sGC, VDCCs, PKG).

Acknowledgements

This work was co funded by the European Social Fund and National Resources (Pythagoras to K.T.). We thank Ms Niki Mastrodimou and Dr Anna Vasilaki for their valuable discussions.

References

- Bigiani, A., Petrucci, C., Ghiaroni, V., Dal Monte, M., Cozzi, A., Kreienkamp, H.J., Richter, D., Bagnoli, P., 2004. Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. *Brain Res.* 29 (1025), 177–185.
- Bloomfield, S.A., Dowling, J.E., 1985a. Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. I. Outer plexiform layer. *J. Neurophysiol.* 53, 699–713.
- Bloomfield, S.A., Dowling, J.E., 1985b. Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. I. Inner plexiform layer. *J. Neurophysiol.* 53, 714–725.
- Bohme, E., Graf, H., Schultz, G., 1978. Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP-formation in smooth muscle and platelets. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 131.
- Bohn, H., Schonafinger, K., 1989. Oxygen and oxidation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14 (Suppl. 11), 6–12.
- Brandstatter, J.H., Koulen, P., Wassle, H., 1998. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38, 1385–1397.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemain, R., 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77–79.
- Bugnon, O., Schaad, N.C., Schorderet, M., 1994. Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. *Neuroreport* 5, 401–404.
- Carabelli, V., D'AscenzoCarbone, E., Grassi, C., 2002. Nitric oxide inhibits neuroendocrine Ca(V)1 L-channel gating via cGMP-dependent protein kinase in cell-attached patches of bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 541, 351–366.
- Cristiani, R., Fontanesi, G., Casini, G., Petrucci, C., Viollet, C., Bagnoli, P., 2000. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3191–3199.
- Dal Monte, M., Petrucci, C., Vasilaki, A., Cervia, D., Grouselle, D., Epelbaum, J., Kreienkamp, H.J., Richter, D., Hoyer, D., Bagnoli, P., 2003. Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology* 45, 1080–1092.
- Ding, J.D., Weinberg, R.J., 2007. Distribution of soluble guanylyl cyclase in rat retina. *J. Comp. Neurol.* 502, 734–745.
- Djamgoz, M.B., Cunningham, J.R., Davenport, S.L., Neal, M.J., 1995. Nitric oxide inhibits depolarization-induced release of endogenous dopamine in the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* 198, 33–36.
- Dowling, J.E., Ehinger, B., 1978. Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 180, 203–220.
- Feelish, M., Ostrowski, J., Noack, E., 1989. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14 (Suppl. 11), 13–22.
- Fontanesi, G., Gargini, C., Bagnoli, P., 2000. Postnatal development of somatostatin 2A (sst_{2A}) receptors expression in the rabbit retina. *Dev. Brain Res.* 123, 67–80.
- Goldstein, I.M., Ostwald, P., Roth, S., 1996. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.* 36, 2979–2994.
- Gray, D.B., Polo-Parada, L., Pilar, G.R., Eang, P., Metzger, R.R., Klann, E., Meriney, S.D., 1999. A nitric oxide/cyclic GMP-dependent protein kinase pathway alters transmitter release and inhibition by somatostatin at a site downstream of calcium entry. *J. Neurochem.* 72, 1981–1990.
- Greenstreet, E.H., Djamgoz, M.B., 1994. Nitric oxide induces light-adaptive morphological changes in retinal neurones. *Neuroreport* 6, 109–112.
- Guimaraes, C.A., Assreuy, J., Linden, R., 2001. Paracrine neuroprotective effect of nitric oxide in the developing retina. *J. Neurochem.* 76, 1233–1241.
- Helboe, L., Moller, M., 1999. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst₁ and sst₂ in the rat retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2376–2382.
- Hoyer, D., Bell, G.I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.P., O'Carroll, A.M., Patel, Y.C., Schonbrunn, A., Taylor, J.E., Reisine, T., 1995. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 86–88.
- Huie, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195–199.
- Huppé-Gourgues, F., Coudé, G., Lachapelle, P., Casanova, C., 2005. Effects of the intravitreal administration of dopaminergic ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram. *Vision Res.* 45, 137–145.
- Kebabian, J.W., Briggs, C., Britton, D.R., Asin, K., DeNinno, M., MacKenzie, R.G., McKelvy, J.F., Schoenleber, R., 1990. A68930: a potent and specific agonist for the D-1 dopamine receptor. *Am. J. Hypertens.* 3, 40S–42S.
- Koch, K.W., Lambrecht, H.G., Haberecht, M., Redburn, D., 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.
- Kouvidi, E., Papadopoulou-Daifoti, Z., Thermos, K., 2006. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci. Lett.* 391, 82–86.
- Kramer, S.G., 1971. Dopamine: A retinal neurotransmitter. I. Retinal uptake, storage and light-stimulated release of [3H] dopamine in vivo. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 10, 438–452.
- McDonald, L.J., Murad, F., 1996. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 1–6.
- Mastrodimou, N., Thermos, K., 2004. The somatostatin receptor (sst₁) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosci. Lett.* 6 (356), 13–16.
- Mastrodimou, N., Kiagiadaki, F., Hodjarova, M., Karagianni, E., Thermos, K., 2006. Somatostatin receptors (sst₂) regulate cGMP production in rat retina. *Regul. Pept.* 133, 41–46.
- Meller, E., Helmer-Matyjek, E., Bohmaker, K., Adler, C.H., Friedhoff, A.J., Goldstein, M., 1986. Receptor reserve at striatal dopamine autoreceptors: implications for selectivity of dopamine agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 123, 311–314.
- Mereu, G., Collu, M., Ongini, E., Biggio, G., Gessa, G.L., 1985. SCH 23390, a selective dopamine D1 antagonist, activates dopamine neurons but fails to prevent their inhibition by apomorphine. *Eur. J. Pharmacol.* 111, 393–396.
- Mori, M., Ahara, M., 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.

- Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., Vernier, P., 1999. Dopamine receptor localization in the mammalian retina. *Mol. Neurobiol.* 19, 181–204.
- Ohkuma, S., Katsura, M., 2001. Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 64, 97–108.
- Okada, M., Osumi, Y., Okuma, Y., Ueno, H., 2001. Nitric oxide inhibits the release of acetylcholine in the isolated retina. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 239, 217–221.
- Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251–1256.
- Rocchitta, G., Migheli, R., Mura, M.P., Esposito, G., Desole, M.S., Miele, E., Miele, M., Serra, P.A., 2004. Signalling pathways in the nitric oxide donor-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: evidence that exogenous nitric oxide promotes Ca^{2+} entry through store-operated channels. *Brain Res.* 1023, 243–252.
- Schrammel, A., Pfeiffer, S., Schmidt, K., Koesling, D., Mayer, B., 1998. Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholinopyridone involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol. Pharmacol.* 54, 207–212.
- Schroder, H., Ney, P., Woditsch, I., Schror, K., 1990. Cyclic GMP mediates SIN-1-induced inhibition of human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 182, 211–218.
- Seeman, P., Van Tol, H.H.M., 1994. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 264–270.
- Sekaran, S., Cunningham, J., Neal, M.J., Hartell, N.A., Djamgoz, M.B., 2005. Nitric oxide release is induced by dopamine during illumination of the carp retina: serial neurochemical control of light adaptation. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2199–2208.
- Shapiro, B., Kronheim, S., Pinestone, B., 1979. The presence of immunoreactive somatostatin in the rat retina. *Horm. Metab. Res.* 11, 79–80.
- Sperk, S., Widmann, R., 1985. Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. *J. Neurochem.* 45, 1441–1447.
- Thermos, K., 2003. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res.* 43, 1805–1815.
- Vasilaki, A., Mouratidou, M., Schulz, S., Thermos, K., 2002. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst_2 receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* 43, 899–909.
- Vasilaki, A., Georgoussi, Z., Thermos, K., 2003. Somatostatin receptors (sst_2) are coupled to Go and modulate GTPase activity in the rabbit retina. *J. Neurochem.* 84, 625–632.
- Veruki, M.L., Wässle, H., 1996. Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2286–2297.
- Veruki, M.L., 1997. Dopaminergic neurons in the rat retina express dopamine D2/3 receptors. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1096–1100.
- Witkovsky, P., Schutte, M., 1991. The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. *Vis. Neurosci.* 7, 113–124.
- Witkovsky, P., 2004. Dopamine and retinal function. *Doc. Ophthalmol.* 108, 17–40.
- Yu, D., Eldred, W.D., 2005. Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. *J. Comp. Neurol.* 483, 278–291.
- Zalutsky, R.A., Miller, R.F., 1990. The physiology of somatostatin in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 10, 383–393.

Somatostatin receptors (sst₂) regulate cGMP production in rat retina

Niki Mastrodimou^a, Foteini Kiagiadaki^a, Mira Hodjarova^{a,b},
Efthimia Karagianni^a, Kyriaki Thermos^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology, Department Basic Sciences, University of Crete, Faculty of Medicine, Heraklion, Crete, Greece

^b Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Kralova, Czech Republic

Received 11 May 2005; accepted 8 September 2005

Available online 8 November 2005

Abstract

The present study investigated the effect of somatostatin in the regulation of cGMP levels in rat retina and the mechanisms involved in this process. Isolated rat retinas were treated alone or in the presence of somatostatin (0.01–10 μM), BIM23014 (sst₂ agonist, 0.01–10 μM), L-796,778 (sst₃ agonist, 10 μM), somatostatin (0.1 μM) in combination with CYN154806 (sst₂ antagonist, 1 μM), N^G-methyl-L-arginine acetate salt (NMMA, inhibitor of the nitric oxide synthase (NOS), 250 μM), orthovanadate (inhibitor of tyrosine phosphatase, SHP-1, 1 μM), and arginine alone (250 μM). cGMP levels were quantified by ELISA. Immunohistochemistry studies were performed for the detection of cGMP and nNOS, while Western blot analysis was employed for the detection of SHP-1. Somatostatin increased cGMP levels in a concentration-dependent manner. This increase was inhibited by CYN154806. BIM23014 increased cGMP levels only at the concentration of 10 μM, while L-796,778 had no effect. NMMA blocked completely the somatostatin stimulated increase of cGMP levels and nNOS was detected in rat retina. cGMP immunoreactivity was observed primarily in bipolar cells only of nitroprusside-treated retinas. SHP-1 inhibition by orthovanadate reduced the somatostatin effect in a statistically significant manner. These results suggest that a SRIF/SHP-1/NO/cGMP mechanism underlies the actions of somatostatin in the retina and in its influence of retinal circuitry.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Neuropeptide; Nitric oxide; nNOS; Tyrosine-phosphatase (SHP) immunohistochemistry

1. Introduction

The neuropeptide somatostatin (somatotropin release inhibitory factor, SRIF) mediates a diverse number of physiological actions in the peripheral and central nervous system [1,2]. Five SRIF receptor subtypes have been cloned, namely sst_{1–5} [3] and are responsible for SRIF's actions. The sst₂ receptor has been demonstrated in mouse and rat to exist as two splice variants, sst_{2A} and sst_{2B} [4,5].

In the eye, SRIF was initially detected in amacrine, ganglion, and interplexiform cells of the retina, and is believed to function as a neurotransmitter, neuromodulator or trophic factor [6–9]. These actions of SRIF are mediated by specific G-protein coupled receptors, as substantiated by pharmacological [10,11] and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) studies [12]. More recent studies employing immunohistochemistry techniques resulted in the identification

and localization of the receptor subtypes in retinal cells of different species (for a review see Ref. [13]). The colocalization of sst_{2A} and sst_{2B} receptors with NADPH-diaphorase in rod bipolar and photoreceptors cells, respectively, was reported [14], while pharmacological studies showed that somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst₂ receptors in rat retina [15].

In the present study, further emphasis was given to the investigation of somatostatin–nitric oxide interactions by examining the effect of somatostatin and analogues on cGMP levels in rat retina. In addition, the involvement of nNOS and SHP-1 in somatostatin's actions was studied.

2. Methods

2.1. Animals

Female Sprague–Dawley rats weighing 250 to 350 g were housed two to three animals per cage with free access to food and water. A 12-h light–dark cycle was maintained. Euthanasia

* Corresponding author. Tel.: +30 2810 394533; fax: +30 2810 394530.

E-mail address: thermos@med.uoc.gr (K. Thermos).

was performed with ether inhalations. Housing conditions and all procedures performed on the animals were in accordance with Greek National Laws (Animal Act, P.D. 160/91) and with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

2.2. Tissue preparation

After dissecting out the eyes, the anterior poles were cut away and the eyecups were immersed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing protease inhibitors leupeptin (1 µg/ml) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.1 mM).

Retinas were mechanically detached from the rest of the eyecup and incubated in PBS buffer containing protease inhibitors and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 1 mM) for 15 min in room temperature. The retinas are incubated in fresh buffer (500 µl) for 30 min in the absence or presence of somatostatin (0.01–10 µM), BIM23014 (0.01–10 µM), somatostatin (0.1 µM) in combination with CYN154806 (1 µM, kindly provided by Dr. D. Hoyer) or *N*^G-methyl-L-arginine acetate salt (NMMA, 250 µM) or orthovanadate (1 µM). Arginine (250 µM) and the sst₃ analog L-796,778 (10 µM; [16]) were also tested. Control samples contained PBS buffer with IBMX and protease inhibitors. One retina was used for each treatment.

2.3. ELISA assay

The samples were prepared for the ELISA assay according to Blute et al. [17]. Control or treated retinas were homogenized in Phosphate Buffer (PB, 50 mM), pH 6.5. Trichloroacetic acid (TCA, 10%) was added to the homogenates, the mixture was centrifuged at 15000 rpm for 10 min and the supernatants were removed. Water saturated ether was used to extract the TCA from the supernatant. Five volumes of ether to one volume of supernatant was used and the procedure was repeated five times. Trace amounts of ether were removed by heating the samples in a water bath (70 °C) for 5 min. The samples were frozen on dry ice and stored at –80 °C until further use. The samples were analyzed by using a commercial cGMP ELISA assay (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, MI). Protein concentration was determined according to Bradford [18].

2.4. Immunohistochemistry studies

Tissue preparation and immunohistochemistry was performed according to Mastrodinou et al. [19]. Cryostat sections of rat retina were incubated in 0.1 M Tris buffer saline; TBS, pH 7.4 containing 3.3% normal goat serum for 30 min, washed in 0.1 M TBS and incubated with the a rabbit polyclonal antibody raised against bNOs (1:3000, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal goat serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1 h with a FITC-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (1:150, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

For the cGMP immunoreactivity studies, eyecups were initially treated with Eagle's medium (Gibco BRL, UK) containing protease inhibitors leupeptin (1 µg/ml) and PMSF (0.1 mM), and IBMX (1 mM) for 30 min at 37 °C in a water bath. Subsequently, the eyecups were treated in the above medium to which nitroprusside (1 mM) or somatostatin (10 µM) or the sst₂ selective agonist L-779,976 (100 µM) was added for 10 min at 37 °C. Control samples were treated only with protease inhibitors and IBMX (1 mM). Tissue preparation and immunohistochemistry was performed according to Mastrodinou et al. [19]. cGMP immunoreactivity was assayed using a sheep anti-formaldehyde-fixed cGMP antibody (1:500, kindly provided by Prof. Jan de Vente). Cryostat sections of rat retina were incubated in 0.1 M TBS, pH 7.4 containing 3.3% normal donkey serum for 30 min, washed in 0.1 M TBS and incubated with the primary antibody in 0.1 M TBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5% normal donkey serum overnight at room temperature. The sections were washed again and incubated for 1 h with an Alexa Fluor 488 Donkey anti-Sheep IgG (H+L) (1:200, Molecular Probes, Inc., USA).

To examine whether cGMP immunoreactivity is localized in rod bipolar cells, colocalization studies were performed by treating the sections from tissues treated with SNP with the cGMP antibody and a mouse monoclonal antibody against Protein Kinase C (PKC; 1:50, Leinco Technologies, St. Louis, Missouri, USA) as a marker for rod bipolar cells, overnight. Subsequently, the sections were incubated with the secondary antibody for the cGMP antiserum, washed in TBS and incubated for 1 h with a TRITC-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (1:100, Jackson Lab. Inc., West Grove, USA).

Finally, the sections were washed and coverslipped with mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Negative controls were included by omitting the primary antibody.

Light microscopy images were taken with a Zeiss Axioskop with Plan-Neofluar ×40/0.75. Confocal images were taken with a Leica DM RE laser-scanning microscope (He/Ne Laser) with HP Plan APO ×20/0.70. Optic sections were taken with a z-axis resolution of 1.1 µm through the immunolabeled cells. Light and contrast adjustment of images were processed with the use of Adobe Photoshop software (version 5.0).

2.5. Western blot

Retinal or cortical membranes (60 µg) were analyzed by SDS/PAGE (10%). Proteins were transferred from the gel to nitrocellulose overnight at 4 °C, and the residual binding sites were blocked by incubating the membrane for 2 h in 5% (w/v) Milk and 0.1% (v/v) Tween-20. The blots were subsequently incubated with primary antibody SHP-1 (1:500, Chemicon International, Inc.) in 2.5% Milk in PBS+0.1% Tween-20 in the cold-room overnight. After being washed, the blots were incubated for 1 h at RT with peroxidase-conjugated anti-Mouse IgG made in 2.5% Milk in PBS+0.1% Tween-20. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence (Chemicon International, Temecula, CA).

2.6. Statistics

Mean and standard errors of the mean (S.E.M.) were calculated for each group. An analysis of variance was performed using the GraphPad Prism software (version 2.01) to detect statistically significant differences among the groups.

3. Results

3.1. Effect of SRIF and selective analogues on cGMP levels

SRIF increased cGMP levels in rat retina in a concentration-dependent manner ($n=7-16$, Fig. 1A). Basal cGMP levels

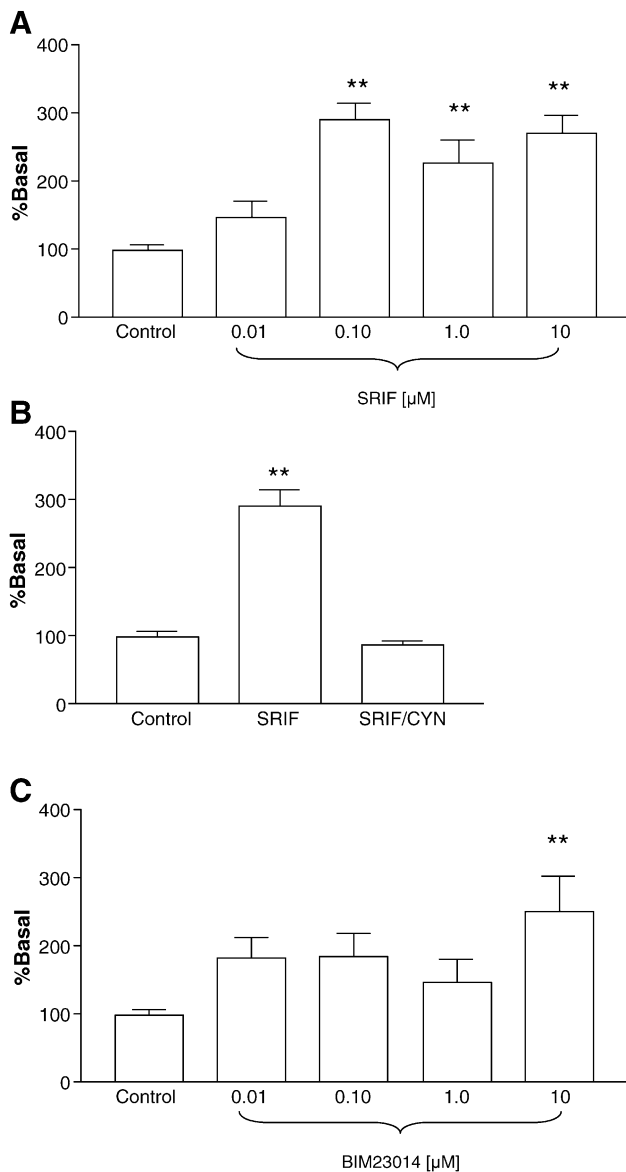


Fig. 1. Effect of somatostatin and analogues on cGMP levels. (A) SRIF increased cGMP levels in rat retina in a concentration-dependent manner ($n=7-16$). (B) The effect of SRIF ($0.1 \mu\text{M}$, $n=10$) was blocked by the sst_2 receptor antagonist CYN-154806 ($1 \mu\text{M}$). ($n=8$, B). ** $p<0.01$ Dunnett's Multiple Comparison Test. (C) The sst_2 agonist BIM23014 increased cGMP levels in a concentration-dependent manner ($n=6-16$). ** $p<0.01$ Dunnett's Multiple Comparison Test.

were found to be 39.6 ± 3.1 pmol/mg protein ($n=18$). To assess further the sst_2 involvement in SRIF's actions, the ability of the selective sst_2 antagonist CYN-154806 ($1 \mu\text{M}$) to block the SRIF ($0.1 \mu\text{M}$)-induced increase of cGMP levels was examined. As shown in Fig. 1B, CYN-154806 blocked the SRIF-induced increase of cGMP levels ($n=8$). In addition, the sst_2 agonist BIM23014 mimicked the action of SRIF and increased in a statistically significant manner the cGMP levels only at the concentration of $10 \mu\text{M}$ ($n=6-16$, Fig. 1C). The sst_3 selective agonist L-796,778 ($10 \mu\text{M}$, $n=5$), however, was not able to increase cGMP levels in a statistically significant manner (data not shown).

3.2. Involvement of nitric oxide on somatostatin actions

Arginine ($250 \mu\text{M}$) increased cGMP levels (control 36.3 pmol cGMP/mg protein, $n=8$, Arginine 53.4 pmol cGMP/mg protein, $n=5$, $p<0.05$). Incubation of the retinal explants in the presence of SRIF ($0.1 \mu\text{M}$) and the nonselective NOS inhibitor NMMA ($250 \mu\text{M}$, $n=8$) (Fig. 2A) resulted in the blockade of the SRIF effect. Immunohistochemistry data support the presence of neuronal NOS (bNOS) in rat retina (Fig. 2B), while the second antibody employed alone and used as control showed no immunostain (Fig. 2C).

3.3. Involvement of SHP-1 on somatostatin actions

The mechanisms via which SRIF increases NO and subsequent cGMP levels have not been reported to date. SHP-1 may be involved in somatostatin's actions and thus its presence in rat retina was studied. As shown in Fig. 2D, SHP-1 is expressed in the retina (cortical tissue was employed as control [20]), while the SHP-1 antagonist orthovanadate ($1 \mu\text{M}$) attenuated somatostatin's ($0.1 \mu\text{M}$) mediated increase in cGMP levels in a statistically significant manner ($n=3$, Fig. 2A).

3.4. Immunohistochemical localization of cGMP

cGMP immunoreactivity was examined in control, IBMX and nitroprusside-treated eyecups ($n=2$). Immunoreactivity was observed only in the nitroprusside-treated retinas primarily in bipolar cells (rod and cone) (Fig. 3). Activation of the SRIF receptors either with SRIF or the sst_2 selective agonist L-779,976 had no effect on the cGMP immunostain and was comparable to the control or IBMX samples (data not shown).

4. Discussion

The present study focused on the elucidation of SRIF's actions on cGMP levels and the mechanisms involved. SRIF increased cGMP levels in a concentration-dependent manner via a sst_2 receptor mechanism. This was substantiated by the blocking effect of the sst_2 antagonist on SRIF's actions. The selective sst_2 agonist, BIM23014 also increased cGMP levels, but only at the higher concentration used ($10 \mu\text{M}$). The present data complement previous evidence from our laboratory

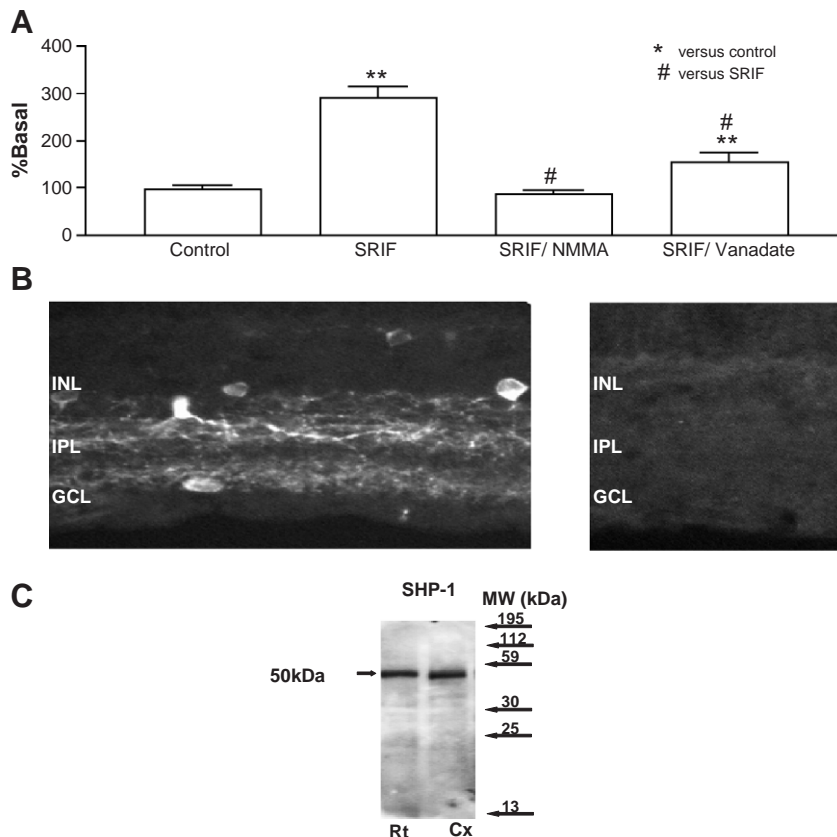


Fig. 2. Effect of NMMA and orthovanadate on SRIF-induced increase of cGMP levels. bNOS immunoreactivity and immunoblotting of SHP-1. (A) Effect of NMMA and orthovanadate on SRIF-induced increase of cGMP levels. Incubation of retinal explants in the presence of SRIF (0.1 μ M) and the nonselective NOS inhibitor NMMA (250 μ M, $n=8$) resulted in the blockade of the SRIF effect. The SHP-1 antagonist, orthovanadate (1 μ M), attenuated somatostatin's (0.1 μ M) mediated increase in cGMP levels in a statistically significant manner ($n=3$). **, # $p<0.01$ Dunnett's Multiple Comparison Test (* versus control, # versus SRIF). (B) bNOS immunoreactivity was localized in cell bodies in the inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL), as well as in processes in the inner plexiform layer (IPL). No staining was observed in absence of primary antibody (right panel). Scale bars: 20 μ m. (C) Immunoblotting of SHP-1. Retinal or cortical membranes (60 μ g) were analyzed by SDS/PAGE (10%) and immunoblotted with SHP-1 (50 kDa) antiserum as described in Methods.

showing that somatostatin and sst_2 specific ligands increase NO levels in retinal explants [15]. Specifically, the BIM23014 data are completely overlapping in the two studies, since only at the concentration of 10 μ M is the increase in both NO and cGMP levels observed. This was attributed to poor access of the agonist. The lack of effect of the sst_3 analog, which was employed as a control, was expected, since sst_3 receptors have not been reported in vertebrate retina [13].

Nitric oxide synthase (NOS) oxidizes the guanidine moiety of L-arginine to liberate NO and citrulline. Consequently, NO activates a soluble guanylate cyclase converting GTP to cGMP as reported in vascular endothelial cells and in the central nervous system [21,22].

In the retina, nNOS has been reported to be localized primarily in amacrine cells, but also in photoreceptors, horizontal, bipolar and ganglion cells [23], in agreement with previous data in our group pertaining to NADPH-diaphorase histostain in retina [14,15]. To substantiate the involvement of nitric oxide synthase in the somatostatin-mediated increase of cGMP levels, experiments focused on the ability of NMMA, a NOS antagonist, to block somatostatin's actions. NMMA fully blocked the somatostatin-mediated increase in cGMP levels, while arginine mimicked somatostatin's actions. This effect

was mediated by the neuronal NOS as supported not only by the previous cited studies [23], but also by the present bNOS immunohistochemistry findings.

SRIF is synthesized in amacrine cells, but it has never been found to be colocalized with NADPH-diaphorase or nNOS [23,24]. In the rat, it activates sst_{2A} and sst_{2B} SRIF receptors found to be localized on rod and cone bipolar cells [25] and photoreceptors [14], respectively. SRIF activation of sst_2 receptors in the rat resulted in an increase in NO_x production [15].

To examine the effect of SRIF on cGMP levels at the cellular level cGMP immunoreactivity was performed. Bipolar cells of the rat retina express soluble guanylate cyclase [26]. While no immunoreactivity was observed in control or IBMX-treated tissue, incubation with the NO donor nitroprusside (1 mM) afforded cGMP immunoreactivity primarily in rod and cone bipolar cells. These results are in agreement with Johansson et al. [27]. Treatment with somatostatin or the more lipid soluble sst_2 analog L779,976 [16] did not result in any visible cGMP immunoreactivity. This finding may be due to the solubility or stability properties of somatostatin and its agonist. The addition of these agents to the eyecup and not directly to the retina ex vivo may affect their efficacy.

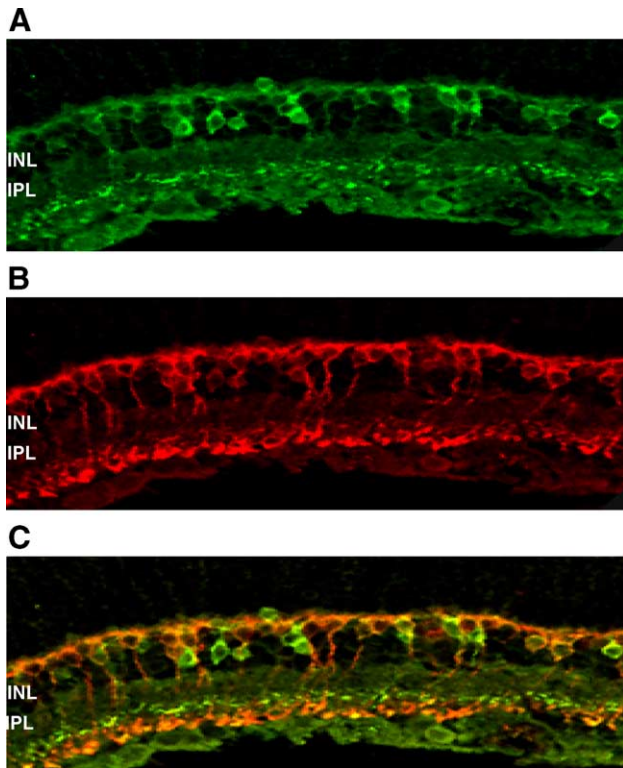


Fig. 3. cGMP immunoreactivity in rat retina. cGMP immunoreactivity in nitroprusside-treated eye cups was observed primarily in bipolar cells (A), PKC immunoreactivity was observed in rod bipolar cells (B). Double labeling of cGMP and PKC immunoreactivity was observed in a subpopulation of bipolar cells (yellow) (C). Scale bars: 20 μ m.

However, the biochemical data leave no doubt that SRIF via sst_2 activation increases cGMP levels. In retina, cGMP influences a series of biochemical substrates and it is an important regulator of cellular and retinal physiology. cGMP can modulate gap junctions between horizontal cells [28] and gap junctions between amacrine and rod bipolar cells [29]. There is a report however, stating that SRIF did not affect cGMP levels in a ciliary ganglion neuron preparation from chick embryos [30].

Meriney et al. [31] reported that besides the membrane-associated pathway involving GTP-binding proteins, a soluble pathway involving cGMP-dependent protein kinase modulates the somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current in chick ciliary ganglion neurons.

In the salamander retina, SRIF differentially modulated voltage-gated K^+ and Ca^{2+} currents in rod and cone photoreceptors, respectively, by its activation of sst_2 receptors and via a pertussis toxin-sensitive mechanism [9]. Also, in isolated rabbit rod bipolar cells that also contain the sst_2 receptor subtype, SRIF modulated K^+ and Ca^+ currents by inhibiting I_{BK} and L-type I_{Ca} channels [32]. In both paradigms, SRIF could be regulating glutamate release. It is therefore possible that a cGMP-dependent protein kinase pathway may also be involved in the effects of SRIF on ion channels and glutamate release in the retina as suggested by Meriney et al. [31] in chick ciliary ganglion neurons.

The question regarding the mechanism via which somatostatin activates the production of NO, which leads to increases

in cGMP levels in the retina was addressed. It is well established that nitric oxide synthase in the brain is dependent on the free calcium ion concentrations [22], while somatostatin as mentioned above is known to inhibit intracellular calcium levels [31,33]. However, Lopez et al. [34] reported that somatostatin sst_2 receptor activation induces the activation of nNOS in vitro by a mechanism that involves tyrosine phosphatase SHP-1. nNOS was shown to be a substrate for SHP-1, which dephosphorylates nNOS, increases NO production and subsequent cGMP levels that lead to cell growth arrest. The present findings depicted the presence of SHP-1 in the retina, while the orthovanadate effects on the SRIF-mediated increase in cGMP levels suggested the involvement of SHP-1 in somatostatin's activation of NOS.

The NO/cGMP signal transduction system is of major importance in retinal physiology. Many studies have focused on this system [17,25,35–38], and on its regulation by other neurotransmitters present in the retina (glutamate, GABA) [17,38].

This is the first study, in the rat retina, showing that somatostatin can also modulate the NO/cGMP system. Furthermore, the present data suggest a SRIF/SHP-1/NO/cGMP mechanism that may underlie somatostatin's actions, something that merits further investigation.

Acknowledgments

The authors thank Ms. M. Papazoglou for technical assistance, Dr. D. Hoyer (Novartis) for somatostatin ligands and Dr. J. de Vente for the cGMP antibody. This study was supported by grants from the Ministry of Education (EPEAEK-Neuroscience, Pythagoras), co-funded by the European Social Fund and National Resources. N.M. is a recipient of the Manasaki Scholarship. M.H. is a recipient of a Socrates Scholarship.

References

- [1] Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973;179:77–9.
- [2] Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 1986;27:63–100.
- [3] Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:86–8.
- [4] Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Holtt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *Fed Eur Biochem Soc Lett* 1992;311:290–4.
- [5] Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, et al. Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin $sst_2(B)$ receptor splice variant. *Br J Pharmacol* 1998;25:209–17.
- [6] Shapiro B, Kronheim S, Pinistone B. The presence of immunoreactive somatostatin in the rat retina. *Horm Metabol Res* 1979;11:79–80.
- [7] Sagar SM, Rorstad OP, Landis DM, Arnold MA, Martin JB. Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina. *Brain Res* 1982;244:91–9.
- [8] Zalutsky RA, Miller RF. The physiology of somatostatin in the rabbit retina. *J Neurosci* 1990;10:383–93.
- [9] Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P. Somatostatin modulates voltage-gated K^+ and Ca^+ currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci* 2000;20:929–36.

- [10] Kossut M, Yamada T, Aldrich LB, Pinto LH. Localization and characterization of somatostatin binding sites in the mouse retina. *Brain Res* 1990;476:78–84.
- [11] Vasilaki A, Georgoussi Z, Thermos K. Somatostatin receptor (sst₂) are coupled to G_o and modulate GTPase activity in the rabbit retina. *J Neurochem* 2003;84:625–32.
- [12] Mori M, Ahara M, Shimizu T. Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. *Neurosci Lett* 1997;223:185–8.
- [13] Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vis Res* 2003;43:1805–15.
- [14] Vasilaki A, Gardette R, Epelbaum J, Thermos K. NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1600–9.
- [15] Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst₂ receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* 2002;43:899–909.
- [16] Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, et al. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 1998;282:737–40.
- [17] Blute TA, De Grenier J, Eldred WD. Stimulation with *N*-methyl-D-aspartate or kainic acid increase cyclic guanosine monophosphate-like immunoreactivity in turtle retina: involvement of nitric oxide synthase. *J Comp Neurol* 1999;404:75–85.
- [18] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [19] Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005;371:44–53.
- [20] Horvat A, Schwaiger F-W, Hager G, et al. A novel role for protein tyrosine phosphatase SHP1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. *J Neurosci* 2001;21:865–74.
- [21] Moncada S, Radomski MS, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988;37:2495–501.
- [22] Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5159–62.
- [23] Haverkamp S, Kolb H, Cuenca N. Morphological and neurochemical diversity of neuronal nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the turtle retina. *Cell Tissue Res* 2000;302:11–9.
- [24] Koistinaho J, Sagar SM. Light-induced c-fos expression in amacrine cells in the rabbit retina. *Mol Brain Res* 1995;29:53063.
- [25] Johnson J, Wu V, Wong H, Walsh JH, Brecha NC. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience* 1999;94:675–83.
- [26] Ahmad I, Barnstable CJ. Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. *Exp Eye Res* 1993;56:51–62.
- [27] Johansson K, Bruun A, de Vente J, Ehinger B. Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:305–13.
- [28] DeVries SH, Schwartz EA. Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J Physiol* 1989;414:351–75.
- [29] Mills SL, Massey SC. Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. *Nature* 1995;377:734–7.
- [30] Gray DB, Polo-Parada L, Pilar GR, et al. A nitric oxide/cyclic GMP-dependent protein kinase pathway alters transmitter release and inhibition by somatostatin at a site downstream of calcium entry. *J Neurochem* 1999;72:1981–90.
- [31] Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 1994;369:336–9.
- [32] Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P. Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:680–94.
- [33] Luini A, Lewis D, Guild S, Schoufield G, Weight FF. Somatostatin, an inhibitor of ACTH secretion, decreases cytosolic free calcium and voltage-dependent calcium current in a pituitary cell line. *J Neurosci* 1986;6:3128–32.
- [34] Lopez F, Ferjoux G, Cordelier P, et al. Neuronal nitric oxide synthase: a substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. *FASEB J* 2001;15:2300–2.
- [35] Haberecht MF, Schmidt HH, Mills SL, Massey SC, Nakane M, Redburn-Johnson DA. Localization of nitric oxide synthase, NADPH diaphorase and soluble guanylyl cyclase in adult rabbit retina. *Vis Neurosci* 1998;15:881–90.
- [36] Blute TA, Velasco P, Eldred WD. Functional localization of soluble guanylate cyclase in the turtle retina: modulation of cGMP by nitric oxide donors. *Vis Neurosci* 1988;15:485–98.
- [37] Gotzes S, de Vente J, Muller F. Nitric oxide modulates cGMP levels in neurons of the inner and outer retina in opposite ways. *Vis Neurosci* 1998;15:945–55.
- [38] Yu D, Eldred WD. GABA(A) and GABA(C) receptor antagonists increase retinal cyclic GMP levels through nitric oxide synthase. *Vis Neurosci* 2003;20:627–37.