

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ Σχολή Ιατρικής UNIVERSITY OF CRETE School of Medicine



Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Laboratory of Pharmacology

Διδακτορική Διατριβή με θέμα:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣ ΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ



Δέσποινα Κοκονά, <mark>MSc</mark>

Βιολόγος

Ηράκλειο, 2015

Έναρξη Διδακτορικής Διατριβής: 16/02/2011

Υποστήριξη Διδακτορικής Διατριβής: 11/09/2015

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο:

Εργαστήριο Φαρμακολογίας Τομέας Βασικών επιστημών Σχολή Ιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Κ. Θερμού

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
- Α. Πλαϊτάκης, Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας
- Δ. Παπαχατζής, Ερευνητής Α Βαθμίδας

Μέλη επταμελούς επιτροπής:

- Κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
- Α. Πλαϊτάκης, Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας
- Δ. Παπαχατζής, Ερευνητής Ά Βαθμίδας
- Μ. Τσιλιμπάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας
- Α. Καστελλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας
- Γ. Λιαπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας
- Ι. Χαραλαμπόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας.

Η διατριβή υποστηρίχθηκε οικονομικά από το πρόγραμμα «Ηράκλειτος ΙΙ».



Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από τη Σχολή Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2).

«..Στη διάρκεια της ύπαρξής μας, ερχόμαστε πάντα αντιμέτωποι με δύσκολα προβλήματα. Θα πρέπει τότε ν' αφήσετε να δράσει η δημιουργική σας φαντασία..»

Το ημερολόγιο ενός μάγου, Paulo Coehlo

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή αποτελεί την τελευταία πράξη μιας πολυετούς πορείας που είχε ως στόχο την ολοκλήρωση ενός διδακτορικού προγράμματος. Στο πλαίσιο της ερευνητικής μου πορείας, από το προπτυχιακό κιόλας επίπεδο, είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ με αξιόλογους ανθρώπους και κατάφερα να αποκτήσω σημαντική εξοικείωση με τον επιστημονικό τρόπο σκέψης. Όλα αυτά τα χρόνια αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες, οι οποίες θα αποτελέσουν ένα στιβαρό υπόβαθρο για την οποιαδήποτε πορεία ακολουθήσω στο μέλλον. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε καρπό προσωπικής προσπάθειας που όμως δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συνεισφορά και τη στήριξη αξιόλογων ανθρώπων τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Ο πρώτος άνθρωπος που θέλω και οφείλω να ευχαριστήσω είναι η κα Κυριακή Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, επιβλέπουσα καθηγήτρια της διδακτορικής μου διατριβής και μέντορας μου όλα αυτά τα χρόνια. Η κα Θερμού αποτέλεσε για εμένα πρότυπο επιστημονικού ήθους και καταλυτικό παράγοντα στην απόκτηση επιστημονικού τρόπου σκέψης και την προσεκτική και κριτική επιλογή των ερευνητικών μου κατευθύνσεων. Η συνεργασία μου με την κα Θερμού ξεκίνησε σε προπτυχιακό επίπεδο και από τα πρώτα κιόλας χρόνια κινήθηκε σε πλαίσια εμπιστοσύνης, κατανόησης και αλληλοσεβασμού. Ήταν εκείνη που μου έμαθε να μην σταματάω την προσπάθεια παρά τις όποιες αντιξοότητες και κάποιες φορές πίστευε σε μένα περισσότερο από ότι εγώ η ίδια στον εαυτό μου. Ακόμη και σε προσωπικές της δύσκολες στιγμές ήταν πάντα εκεί όταν τη χρειαζόμουν και την ευχαριστώ βαθύτατα γι' αυτό. Ίσως σήμερα να μην ήμουν στη θέση να γράφω αυτές τις γραμμές εάν δεν είχα την τύχη να συνεργαστώ με έναν τόσο αξιόλογο επιστήμονα, δάσκαλο και άνθρωπο. Κα Θερμού σας ευχαριστώ ειλικρινά για όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας και εύχομαι να βρεθούν και άλλοι νέοι επιστήμονες τόσο τυχεροί όσο εγώ και να έχουν την ευκαιρία να συνεργαστούν με τόσο αξιόλογους επιστήμονες και ανθρώπους.

Δε θα μπορούσα φυσικά να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής κο Ανδρέα Πλαϊτάκη, Ομότιμο Καθηγητή Νευρολογίας και κο Δημήτρη Παπαχατζή, Ερευνητή Ά Βαθμίδας, για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου εξεταστικής επιτροπής κο Ανδρέα Καστελλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχοφυσιολογίας, κο Γιώργο Λιαπάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, κο Μιλτιάδη Τσιλιμπάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Οφθαλμολογίας και κο Ιωάννη Χαραλαμπόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θέλω να απευθύνω στη Νίκη Μαστροδήμου, PhD με την οποία συνεργάστηκα επίσης από προπτυχιακό επίπεδο. Η Νίκη ήταν πάντα η σανίδα σωτηρίας μου καθώς ήταν ο άνθρωπος στον οποίο απευθυνόμουν σε οποιοδήποτε πρόβλημα παρουσιαζόταν και ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει. Η καθημερινότητα στο χώρο του εργαστηρίου θα ήταν σίγουρα πιο δύσκολη χωρίς την παρουσία της Νίκης. Την ευχαριστώ βαθύτατα για όλα όσα μου δίδαξε, για τη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής με τις τεχνικές και επιστημονικές της γνώσεις, για το όμορφο κλίμα που δημιουργούσε στο εργαστήριο αλλά και για τις ωραίες στιγμές που έχουμε περάσει εκτός εργαστηρίου. Νίκη σε ευχαριστώ βαθύτατα και ελπίζω να έχω ξανά την ευκαιρία να συνεργαστώ με ανθρώπους του δικού σου ήθους και στο μέλλον.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Άννα Βασιλάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας και για την πολύτιμη βοήθεια της σε επιστημονικά θέματα. Ευχαριστώ επίσης τον Σήφη Πεδιαδιτάκη, PhD, μέλος του εργαστηρίου του κου Γραβάνη, καθηγητή Φαρμακολογίας για τη βοήθεια του σε εργαστηριακά θέματα.

Στη μακρόχρονη αυτή πορεία υπήρξαν πολλοί άνθρωποι με τους οποίους συνεργάστηκα τους οποίους όμως δε μου δίνεται η δυνατότητα να ευχαριστήσω έναν προς έναν. Δε θα μπορούσα όμως να παραλείψω τις αγαπημένες συναδέλφους και φίλες Γιώτα Ιορδανίδου, MSc, Σμαράγδα Πουλάκη, MSc και Μελίνα Τσέλιου, MSc οι οποίες έδωσαν ζωντάνια στο εργαστήριο κατά τη σύντομη παραμονή τους, δημιουργώντας ένα πολύ ευχάριστο, φιλικό και απόλυτα διασκεδαστικό περιβάλλον. Τις ευχαριστώ ολόψυχα για όλα όσα περάσαμε εντός εργαστηρίου αλλά και για τις περιπέτειες μας εκτός εργαστηρίου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ απευθύνεται στους πολύ στενούς και αγαπημένους μου φίλους Αρχόντη Βλασάκη, Γιώργο Γασπαράκη, Παναγιώτα-Χριστίνα Γεωργίου, Παναγιώτη Μωραΐτη, Ελένη Παναγιώτου και Μάρκο Σιγάλα. Κάποιοι δεν ήταν πάντα κοντά μου με τη φυσική τους παρουσία, αλλά τους ένιωθα πάντα δίπλα μου και με βοηθούσαν να αντιμετωπίσω την κάθε δυσκολία και να συνεχίσω. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Παναγιώτη για τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής. Σε όλους χρωστάω ειλικρινή ευγνωμοσύνη, χωρίς την ειλικρινή αγάπη τους όλα θα ήταν πιο δύσκολα.

Από τον κατάλογο των ευχαριστιών δε θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου Γιώργο και Ευγενία για το σεβασμό τους στις μέχρι τώρα επιλογές μου και για την πίστη που έδειξαν και δείχνουν στο πρόσωπο μου.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θέλω και οφείλω να απευθύνω στον αδερφό μου Γιάννη και τη σύντροφο του Βιργινία που ήταν δίπλα μου σε κάθε μου βήμα και σε κάθε μου πρόβλημα και αποτελούσαν πάντα ευχάριστα διαλείμματα στην καθημερινότητα μου. Επίσης ευχαριστώ τις αδερφές μου Θεοδώρα και Βαΐα που παρά τις συνεχείς διαφωνίες μας ήταν πάντα δίπλα μου και πολλές φορές με έκαναν να αισθάνομαι και πάλι παιδί. Η απέραντη κατανόηση των δικών μου ανθρώπων και η βαθιά πίστη τους προς εμένα, μου δίνει πάντα κουράγιο να συνεχίσω.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να αποχαιρετήσω το Ηράκλειο, την πόλη που με φιλοξένησε για περισσότερα από 10 χρόνια και μου έδωσε εμπειρίες τις οποίες θα κρατάω μαζί μου για μια ολόκληρη ζωή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣΙ
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣΙν
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ1
1.1 Δομή και λειτουργία αμφιβληστροειδούς 1
1.2 Αμφιβληστροειδοπάθειες4
1.3 Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή5
1.4 Γλουταμινεργικό σύστημα6
1.5 Υποδοχείς γλουταμινικού οξέος7
1.6 Υποδοχείς γλουταμινικού στον αμφιβληστροειδή11
1.7 Ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή15
1.8 Σύγχρονες θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών19
1.9 Cannabis sativa 21
1.10 Κανναβινοειδή 21
1.11 Ενδογενές κανναβινοειδικό σύστημα
1.12 Υποδοχείς κανναβινοειδών
1.13 Ενδογενή κανναβινοειδή
1.14 Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση των ενδοκανναβινοειδών
1.15 Κατανομή των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών στη σύναψη
1.16 Το ενδογενές κανναβινοειδικό σύστημα στον αμφιβληστροειδή
1.17 Μεταγωγή σήματος μέσω ενεργοποίησης των CB1 και CB2 υποδοχέων
1.18 Κανναβινοειδή ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Πειραματόζωα
3.2 Ενδοφθάλμια χορήγηση ουσιών
3.2.1 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης συνθετικών και ενδογενών κανναβινοειδών σε αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.2 Μελέτη της επίδρασης του μη-NMDA αναστολέα DNQX στις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.3 Μελέτη της εμπλοκής των κανναβινοειδικών υποδοχέων CB1 και CB2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.4 Μελέτη της εμπλοκής του TRPV1 υποδοχέα των βαννιλοειδών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.5 Μελέτη της εμπλοκής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στις νευροπροστατευτικές δράσεις που επάγονται από την ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.6 Μελέτη της εμπλοκής της κασπάσης-3 στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται μετά τη χορήγηση AMPA στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.7 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.2.8 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών παρουσία εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων
3.3 Αφαίρεση, μονιμοποίηση και προετοιμασία ιστών για ανοσοϊστοχημικές μελέτες 40
3.4 Μελέτες ανοσοφθορισμού41
3.5 Τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling)42
3.6 Ιστολογικές μελέτες αιματοξυλίνης/ηωσίνης (Η/Ε) σε αμφιβληστροειδή επίμυων43
3.7 Μικροσκοπία43
3.8 Μελέτες ποσοτικοποίησης44
3.9 Μελέτες δέσμευσης45
3.9.1 Παρασκευή μεμβρανών αμφιβληστροειδή45
3.9.2 Μέτρηση της δέσμευσης του [³ H]CP55940 στους υποδοχείς CB1 και CB2 45
3.10 Μελέτες ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot analysis)46

3.10.1 Παρασκευή πρωτεϊνικών δειγμάτων	46
3.10.2 Κάθετη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	46
3.10.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών	47
3.11 Μελέτες Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	48
3.11.1 Απομόνωση συνολικού RNA και σύνθεση cDNA	48
3.11.2 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)	49

κεφαλαίο 4. αποτελεσματα

ΕΝΟΤΗΤΑ 1: Μελέτες νευροπροστασίας 50
4.1.1 Επίδραση της ΑΕΑ συν-χορηγούμενης με ΑΜΡΑ στη bNOS-IR 52
4.1.2 Επίδραση της ΑΕΑ συν-χορηγούμενης με ΑΜΡΑ στην ChAT-IR 54
4.1.3 Επίδραση της ΑΕΑ συν-χορηγούμενης με ΑΜΡΑ στην calbindin-IR56
4.1.4 Επίδραση των 2-AG, HU-210 και MethAEA συν-χορηγούμενων με AMPA στην bNOS-IR 58
4.1.5 Επίδραση των HU-210 και MethAEA συν-χορηγούμενων με AMPA στην ChAT-IR
ΕΝΟΤΗΤΑ 2: Μελέτες κυτταρικού θανάτου62
4.2.1 Επίδραση του ΑΜΡΑ παρουσία ή απουσία HU-210 ή MethAEA στον κυτταρικό θάνατο
4.2.2 Επίδραση του ΑΜΡΑ παρουσία ή απουσία ΗU-210 στο πάχος του αμφιβληστροειδούς 64
4.2.3 Επίδραση του ΑΜΡΑ παρουσία ή απουσία 2-AG στον κυτταρικό θάνατο σε αμφιβληστροειδείς μυών67
4.2.4 Επίδραση του μη-NMDA ανταγωνιστή DNQX στις διεγερσιτοξικές δράσεις του ΑΜΡΑ 70
4.2.5 Εμπλοκή αποπτωτικών μηχανισμών στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται παρουσία ΑΜΡΑ72
ΕΝΟΤΗΤΑ 3: Μελέτες της εμπλοκής των CB1, CB2 και TRPV1 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών
4.3.1 Επίδραση των CB1 και CB2 ανταγωνιστών (AM251 και AM630, αντίστοιχα) στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών
4.3.2 Επίδραση του CB2 αγωνιστή JWH015 συν-χορηγούμενου με AMPA στον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων

4.3.3 Μελέτη της ύπαρξης των CB1 και CB2 υποδοχέων σε υγιή αμφιβληστροειδή επίμυος	78
4.3.4 Νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG σε αγρίου τύπου, CB1 ^{-/-} και CB2 ^{-/-} μύες	80
4.3.5 Εμπλοκή του TRPV1 υποδοχέα των βανιλλοειδών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών	82
ΕΝΟΤΗΤΑ 4: Μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών {	35
4.4.1 Επίδραση του αναστολέα του PI3K/Akt μονοπατιού wortmannin στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών	86
4.4.2 Επίδραση των κανναβινοειδών στη φωσφορυλίωση της Akt κινάσης	88
4.4.3 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων του 2-AG σε αμφιβληστροειδής αγρίου τύπου (WT) και Akt2 ^{-/-} μυών	88
4.4.4 Επίδραση των κανναβινοειδών στη φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών Κινασών	90
ΕΝΟΤΗΤΑ 5: Μελέτη των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών ως νέων θεραπευτικών στόχων	.92
4.5.1 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των ΑΜ6642 (αναστολέας της FAAH) και ΑΜ9928 (διπλός αναστολέας των FAAH/MGL)	.93
4.5.2 Επίδραση του αναστολέα της FAAH AM6642 στις Νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών	96
4.5.3 Επίδραση του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL AM9928 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ	120
КЕФАЛАЮ 7. ПЕРІЛНҰН	121
КЕФАЛАІО 8. ABSTRACT	123
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	125
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ1	L 44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ1	.52

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2-AG, **2-A**rachidonoyl Glycerol, 2αραχιδονοϋλγλυκερόλη

AC, Adenylyl Cyclase, αδενυλική κυκλάση

Ach, Acetylcholine, ακετυλοχολίνη

AEA, N-ArachinodoylEthnolAmine, N-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνη, μεθανανδαμίδιο

AMPA, a-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid hydrobromide, α-υδροβρομίδιο του αάμινο-3-υδρόξυ-5-μεθυλ-4ισοξαλεπροπιονικό οξύ

APV, 2-Amino-5-Phosphonovaleric acid, 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ

ATP, **A**denosine **T**ri**P**hosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

AAV, Adeno-Associated Virus, αδενοσχετιζόμενος ιός

AMT, Anandamide Membrane Transporter, μεμβρανικός μεταφορέας ανανδαμιδίου

bNOS, brain Nitric Oxide Synthase, νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

cAMP, cycle Adenosine MonoPhosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

CB1, Cannabinoid Receptor **1**, κανναβινοειδικός υποδοχέας 1

CB2, Cannabinoid Receptor **2**, κανναβινοειδικός υποδοχέας 2

CBD, CannaBiDiol, κανναβιδιόλη

cDNA, **c**omplementary **DNA**, συμπληρωματικό DNA

cGMP, cyclic Guanosine MonoPhosphate, κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη

ChAT, **ch**oline AcetylTransferase, ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης

CNQX, 6-Cyano-7-Nitro**Q**uino**X**aline-2,3-dione, 6-κυανο-7-νιτροκινοξαλινο-2,3-διόνη

COX-2, Cyclo**OX**ygenase-2, κυκλοξυγενάση-2

CP-GluAR, Ca²⁺-Permeable AMPA Receptor, AMPA υποδοχείς διαπερατοί σε ασβέστιο

CTRL, ConTRoL, ομάδα ελέγχου

DAG, DiAcylGlycerol, διακυλογλυκερόλη

DAGL, **DiA**cylGlycerol Lipase, λιπάση της διακύλογλυκερόλης

DMSO, DiMethyl SulfOxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

DOC, sodium **DeO**xy**C**holate, δεοξυχολικό νάτριο

DTT, DiThioThreitol, διθειοθρεϊτόλη

dUTP, 2'-deoxyUridine, 5'-TriphosPhate, 5'-τριφωσφορική, 2'δεοξυουριδίνη

EAAT, Excitatory Amino Acid Transporter, μεταφορέας διεγερτικών αμινοξέων

ER, Endoplasmic Reticulum, ενδοπλασματικό δίκτυο

ERK1/2, Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2, εξωκυτταρικές σηματο-ρυθμιζόμενες κινάσες 1 και 2 FAAH, Fatty Acid Amide Hydrolase, υδρολάση των αμιδίων των λιπαρών οξέων

FAK, Focal Adhesion Kinase, κινάση εστιακής προσκόλλησης

GABA, Gamma Amino Butyric Acid, γ αμινοβουτυρικό οξύ

GAPDH, GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase, Δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης

GCL, Ganglion Cell Layer, στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων

GDE1, GlycerophosphoDiEsterase 1, γλυκεροφωσφοδιεστεράση 1

Glu, Glutamate, γλουταμικό οξύ

GluR, Glutamate Receptor, γλουτεμινεργικός υποδοχέας

GP-AEA, GlyceroPhospho- N-ArachinodoylEthnolAmine, γλυκεροφωσφο- Ναραχιδονοϋλαιθανολαμίνη

GPCRs, G-Protein Coupled Receptors, υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες

GPR55, G-Protein Coupled Receptor 55, υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες-55

GRK, G protein-coupled receptor kinases, κινάση των υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες

GTP, Guanosine TriPhosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη

Η/Ε, Hematoxylin/Eosin, αιμοτοξυλίνη/ηωσίνη

iGluR, iontotropic Glutamate Receptor, ιοντοτροπικός υποδοχέας γλουταμινικού INL, Inner Nuclear Layer, εσωτερική κοκκώδης στιβάδα

IP3, Inositol 1,4,5-tris**P**hosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη

IPL, Inner Plexiform Layer, εσωτερική δικτυωτή στιβάδα

IR, ImmuniReactivity, ανοσοδραστικότητα

KA, Kainic Acid, καϊνικό οξύ

LOX, LipOXygenase, λιποξυγενάση

LPLC, LysoPhosphoLipase C, Λυσοφωσφολιπάση C

LPLD, LysoPhosphoLipase D, Λυσοφωσφολιπάση D

MethAEA, Meth- N-ArachinodoylEthnolAmine/Methanandamide, μεθ- Ν-αραχιδονοϋλ αιθανολαμίνη/ μεθανανδαμίδιο

MGL, Monoacylol Glycerol Lipase, λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης

mGluR, metabolotropic Glutamate Receptor, μεταβόλοτροπικός υποδοχέας γλουταμινικού

mRNA, messenger **RNA**, αγγελιαφόρο RNA

NAPE, N-ArachidonoylPhosphatidylEthanolami ne, Nαραχιδονοϋλφωσφατιδυλαιθανολαμίνη

NAPE-PLD, N-ArachidonoylPhosphatidylEthanolami ne -PhosphoLipase D, Φωσφολιπάση D της N-ακυλοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

NAT, **N-A**cetyl**T**ransferase, Nακετυλοτρανσφεράση

NDS, Normal Donkey Serum, φυσιολογικός ορός γαϊδάρου

NGS, Normal Goat Serum, φυσιολογικός ορός αίγας

NMDA, N-Methyl-D-Aspartate, Nμεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ

NO, Nitric Oxide, μονοξείδιο του αζώτου

NO[•], free radicals of Nitric Oxide, ελεύθερες ρίζες του μονοξειδίου του αζώτου

NP40, Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol, νονυλο φαινοξυπολυεθοξυλαιθανόλη

ONL, Outer Plexiform Layer, εξωτερική δικτυωτή στιβάδα

OPL, Outer Nuclear Layer, Εσωτερική κοκκώδης στιβάδα

p38-MAPK, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, p38 πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο

PA, **Phosphoric Acid**, φωσφορικό οξύ

PB, **P**hosphate **B**uffer, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού

PBS, Phosphate Buffered Saline, αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικό

PCP, **PhenCyclidine** or 1-(1-**Phenyl** Cyclohexyl) **Piperidine**, φαινοκυκλιδίνη

PCR, Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PFA, ParaFormAldehyde, παραφορμαλδεΰδη

PhosC, **Phos**phatidylCholine, φωσφατιδιλοχολίνη

PhosEA, **Phos**phatidyl**E**thanol**A**mine, φωσφατίδυλοαιθανολαμίνη

PI3K/Akt, PhosphatidylInositol-3-Kinase/Protein Kinase B, κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης/πρωτεϊνική κινάση B

PIP2, PhosphatidylInositol 4,5bisPhosphate, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

PKA, Protein Kinase A, πρωτεϊνική κινάση A

PLA2, **PhosphoLipase A2**, φωσφολιπάση A2

PLC, **PhosphoLipase C**, φωσφολιπάση C

PLD, **P**hosphoLipase **D**, φωσφολιπάση D

PMSF, PhenylMethylSulfonyl Fluoride, φαινυλμεθυλσουλφονυλοφθορίδιο

PTPN22, **P**rotein Tyrosine **P**hosphatase, **Non-receptor type 22**, Πρωτεΐνη φωσφατάση της τυροσίνης, μη-υποδοχέα τύπου 22

RT-PCR, **R**everse **T**ranscriptase-**PCR**, PCR αντίστροφης μεταγραφάσης

SAPK/JNK, Stress Activated Protein Kinase/Jun N-terminal Kinase, πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από το στρες

SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου

SNARE, Soluble N-ethylmaleimidesensitive factor Attachment REceptor, διαλυτός υποδοχέας προσκόλλησης ευαίσθητος σε N-αιθυλ μαλεϊμίδιο

TBS, **T**ris-**B**uffered **S**aline, αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με Tris

TRPV1, Transient Receptor Potential cation channel, subfamily V, member 1, παροδικός υποδοχέας κανάλι κατιόντων που εξαρτάται από το δυναμικό, υπεροικογένεια 5, μέλος 1

TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling, σήμανση του τελικού άκρου (θραυσμάτων DNA) μέσω φθοριζόντων νουκλεοτιδίων που μεταφέρονται στα θραύσματα και προσκολλώνται με την κατάλληλη μεταφοράση

VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VGLUT, Vesicular GLUtamate Transporter, κυστιδικός μεταφορέας γλουταμινικού

Z-DEVD-FMK, Benzyloxycarbonyl-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)fluoromethylketone, Βενζυλοξυκαρβονυλ-Asp (OMe) -Glu (OMe) -Val-Asp (OMe)φθοριομεθυλακετόνη

Δ⁸-THC, **Δ⁸-T**etra**H**ydro**C**annabinol, Δ^8 -Τετραϋδροκανναβινόλη

Δ⁹-THC, **Δ⁹-T**etra**H**ydro**C**annabinol, Δ^9 -Τετραΰδροκανναβινόλη

ΚΝΣ, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:</u>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η όραση αποτελεί τη σημαντικότερη από τις πέντε αισθήσεις μας καθώς μας δίνει τη δυνατότητα αντίληψης του εξωτερικού περιβάλλοντος. Η όραση επιτελείται από συνδυασμό πολλών επιμέρους δομών, με αρχικό αποδέκτη της οπτικής πληροφορίας τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού, ο οποίος φέρει φωτοϋποδεκτικά κύτταρα ικανά να δεσμεύουν κύματα φωτός, που στη συνέχεια μεταφέρονται με τη μορφή ηλεκτρικών σημάτων στα ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου για περαιτέρω επεξεργασία, αναγκαία για την οπτική αντίληψη. Ελαττωματική παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στον αμφιβληστροειδή μπορεί να οδηγήσει σε ισχαιμία ή/και νεοαγγείωση, γεγονότα που επάγουν την εμφάνιση σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών και προκαλούν από μείωση της οπτικής οξύτητας μέχρι και τύφλωση. Μέχρι σήμερα οι προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική θεραπεία τέτοιου είδους αμφιβληστροειδοπαθειών στοχεύουν κυρίως στη νεοαγγείωση και όχι στον επαγόμενο από την ισχαιμία κυτταρικό θάνατο (Vasilaki και Thermos, 2009) δεν είναι πλήρως αποτελεσματικές και δε στερούνται σοβαρών παρενεργειών. Επομένως, η εύρεση νευροπροστατευτικών μορίων ενάντια στον κυτταρικό θάνατο, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τις ήδη εφαρμοζόμενες θεραπείες, κρίνεται ουσιαστική για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών.

1.1 Δομή και λειτουργία αμφιβληστροειδούς

Ο αμφιβληστροειδής αν και αποτελεί μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) χαρακτηρίζεται από σχετικά απλή δομική οργάνωση σε σχέση με άλλες περιοχές του ΚΝΣ. Περιλαμβάνει μόλις πέντε (5) κατηγορίες νευρώνων [φωτοϋποδεκτικά κύτταρα-photoreceptor cells, δίπολα κύτταρα-bipolar cells, βραχύινα κύτταρα-amacrine cells, οριζόντια κύτταρα-horizontal cells και γαγγλιακά κύτταρα-ganglion cells), οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω πολύπλοκων συνάψεων. Τα κυτταρικά σώματα καθώς και οι απολήξεις αυτών διατάσσονται σε πέντε (5) διακριτές στιβάδες (Εικόνα 1.1).

Στην εξωτερική πυρηνική στιβάδα (Outer Nuclear Layer-ONL) εντοπίζονται τα εξωτερικά και εσωτερικά τμήματα των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων (κωνία ή ραβδία), στην εσωτερική πυρηνική στιβάδα (Inner Nuclear Layer-ONL) οι διάμεσοι νευρώνες (οριζόντια, δίπολα και βραχύινα κύτταρα) και στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Ganglion Cell Layer-GCL) τα γαγγλιακά κύτταρα. Τα φωτοϋποδεκτικά, τα οριζόντια και τα δίπολα κύτταρα συνάπτονται στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (Outer Plexiform Layer-OPL), ενώ τα δίπολα, τα βραχύινα και τα γαγγλιακά κύτταρα στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (Inner Plexiform Layer-IPL). Οι αρκετά μακριοί άξονες των γαγγλιακών κυττάρων εξέρχονται από τον οφθαλμό στον οπτικό δίσκο, όπου γίνονται εμμύελες και σχηματίζουν το οπτικό νεύρο. Μέσω του οπτικού νεύρου η οπτική πληροφορία από τη διέγερση του αμφιβληστροειδούς μεταφέρεται σε ανώτερα κέντρα του ΚΝΣ για περαιτέρω επεξεργασία αναγκαία για την οπτική αντίληψη.



Εικόνα 1.1 Διάγραμμα του βασικού κυκλώματος του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Το φως διέρχεται από μια σειρά κυττάρων για να φτάσει τελικά στους φωτοϋποδοχείς.

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελεί το πρωταρχικό όργανο της οπτικής αντίληψης. Τα κύματα φωτός διέρχονται από τον κερατοειδή χιτώνα και εστιάζονται από τον φακό, πριν δεσμευτούν από τα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, όπου και λαμβάνει χώρα το πρώτο και μοναδικό φωτοεξαρτώμενο γεγονός στη διαδικασία της οπτικής αντίληψης. Δύο τύποι φωτοϋποδοχέων απαντώνται στον αμφιβληστροειδή. Τα κωνιοφόρα και τα ραβδιοφόρα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα. Τα πρώτα είναι υπεύθυνα για τη διεκπεραίωση της έγχρωμης όρασης, ενώ τα τελευταία είναι ικανά να ανιχνεύουν μόνο το αμυδρό φως. Και οι δύο τύποι φωτοϋποδοχέων είναι πλούσιοι σε φωτοαπορροφητικές οπτικές χρωστικές. Το φως απορροφάται από τις εν λόγω χρωστικές και δίνει έναυσμα σε μια αλληλουχία διαδικασιών που μεταβάλλουν το μεμβρανικό δυναμικό των υποδοχέων, οι οποίοι και υπερπολώνονται. Οι υπερπολωμένοι φωτοϋποδοχείς μεταφέρουν την οπτική πληροφορία με τη μορφή χημικής πληροφορίας προς τα κύτταρα με τα οποία συνάπτονται. Η οπτική πληροφορία μεταφέρεται από τα φωτοϋποδοχείς στα δίπολα κύτταρα και από κει στα γαγγλιακά κύτταρα (κάθετο μονοπάτι), είτε μέσω της πλαγίας οδού (οριζόντιο μονοπάτι), δηλαδή μέσω των διάμεσων νευρώνων του αμφιβληστροειδούς (οριζόντια, δίπολα, βραχύινα κύτταρα). Οι κυτταρικοί τύποι που ευθύνονται για την πλάγια μεταβίβαση έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο καθώς συμβάλουν στη διατήρηση της ευαισθησίας του οπτικού συστήματος στην αντίθεση φωτεινότητας σε ένα ευρύ φάσμα εντάσεων φωτός.

Στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς που καλείται κεντρικό βοθρίο, η συγκέντρωση των κωνίων είναι υψηλή ώστε να επιτρέπεται με αυτό τον τρόπο η άφιξη της οπτικής πληροφορίας απευθείας στα κωνιοφόρα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα επιτυγχάνοντας την ελάχιστη δυνατή παραμόρφωση της εικόνας. Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων εγκαταλείπουν τον αμφιβληστροειδή στη θηλή του οπτικού νεύρου, η οποία στερείται φωτοϋποδοχέων και για το λόγο αυτό δημιουργεί ένα τυφλό σημείο στο οπτικό πεδίο. Από τα γαγγλιακά κύτταρα η οπτική πληροφορία μεταβιβάζεται με τη μορφή ηλεκτρικών σημάτων μέσω του οπτικού νεύρου προς τον έζω γονατώδη πυρήνα του θαλάμου και από εκεί στον οπτικό φλοιό για περαιτέρω επεξεργασία.

Ο αμφιβληστροειδής αν και χαρακτηρίζεται από λειτουργική πολυπλοκότητα, διαθέτει μια σχετικά απλή και στρωματοποιημένη δομή που τον καθιστά ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια μελέτης του τρόπου με τον οποίο πιο σύνθετα νευρωνικά κυκλώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος αλληλεπιδρούν και επεξεργάζονται πολύπλοκες και μη πληροφορίες.

1.2 Αμφιβληστροειδοπάθειες

Η ανάπτυξη αμφιβληστροειδοπαθειών που οδηγούν σε μείωση της οπτικής οξύτητας και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και τύφλωση αποτελεί ένα σύνηθες φαινόμενο στο σύγχρονο κόσμο. Ο καταρράκτης αποτελεί την πρώτη αιτία τύφλωσης παγκοσμίως (Resnikoff και συν., 2004) παρότι δεν συγκαταλέγεται στις ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες. Το γλαύκωμα, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς, και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) αποτελούν τη δεύτερη, τρίτη και τέταρτη αίτια τύφλωσης παγκοσμίως (Resnikoff και συν., 2004) και ανήκουν στην οικογένεια των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών. Ο σχηματισμός νέων αγγείων ή/και ο κυτταρικός θάνατος και η φλεγμονή (inflammation) αποτελούν τις κύριες συνιστώσες της εμφάνισης ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών.

Παρακάτω παρουσιάζονται εν συντομία τρεις από τις συχνότερα εμφανιζόμενες αμφιβληστροειδοπάθειες, που μπορεί να οδηγήσουν σε πολύ σοβαρή μείωση της οπτικής οξύτητας που πολλές φορές συνεπάγεται τύφλωση.

Το γλαύκωμα αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά αιτία τύφλωσης παγκοσμίως (Resnikoff και συν., 2004). Η παθοφυσιολογία της νόσου είναι πολυπαραγοντική έχοντας ως κοινό παρονομαστή την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης που στην πλειονότητα των περιπτώσεων προκαλεί σημαντικές βλάβες στο οπτικό νεύρο. Η νόσος του γλαυκώματος χαρακτηρίζεται ως νευροεκφυλιστική, καθώς παρατηρείται κυτταρικός θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων. Οι θεραπείες που στοχεύουν στη μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης αποτυγχάνουν να δράσουν αποτελεσματικά στη διατήρηση της οπτικής οξύτητας.

Η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας αποτελεί την τρίτη κατά σειρά αιτία τύφλωσης παγκοσμίως (Resnikoff και συν., 2004). Πρόκειται για μια κλινική κατάσταση που παρατηρείται συνήθως σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών και προκαλεί μείωση της οπτικής οξύτητας στο κέντρο ακριβώς του οπτικού πεδίου. Η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας μπορεί να εκδηλωθεί με δύο διαφορετικές μορφές: την ξηρή (μη εξιδρωματική, dry) και την υγρή μορφή (εξιδρωματική, wet). Στην ξηρή μορφή παρατηρείται συσσώρευση κυτταρικών θραυσμάτων μεταξύ του χοριοειδούς και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, ενώ στην υγρή (και πιο σοβαρή) μορφή παρατηρείται ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων πίσω από τον χοριοειδή χιτώνα. Και οι δύο μορφές οδηγούν συνήθως σε αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς.

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια αποτελεί μια συχνά εμφανιζόμενη επιπλοκή της νόσου του διαβήτη τύπου Ι ή τύπου ΙΙ και αποτελεί την τέταρτη αιτία τύφλωσης παγκοσμίως (Resnikoff και συν., 2004). Η νόσος της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους μορφές: την μη πολλαπλασιαστική πολλαπλασιαστική και την μορφή. Κατά την μη πολλαπλασιαστική μορφή, παρατηρούνται μικροανευρύσματα και αιμορραγίες, που ωστόσο δεν είναι ικανά να επηρεάσουν την όραση σε σημαντικό βαθμό, αφού η ωχρά κηλίδα δεν επηρεάζεται. Αντίθετα, κατά την πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου, που είναι αποτέλεσμα μιας πιο εκτεταμένης ισχαιμικής κατάστασης, παρατηρούνται νεοσχηματιζόμενα μη φυσιολογικά αγγεία (νεοαγγείωση) και εκτεταμένες αιμορραγίες. Η κατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς και πολύ σημαντικές απώλειες στην οπτική οξύτητα. Παρά τη νεοαγγείωση παρατηρείται που κατά την ανάπτυξη της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, η νόσος έχει πλέον χαρακτηριστεί και νευροεκφυλιστική, καθώς έχουν παρατηρηθεί λειτουργικές αλλαγές στην όραση ανεξάρτητα και πριν από την παρατηρούμενη νεοαγγείωση (Barber και συν., 2003). Οι αλλαγές αυτές χαρακτηρίζονται ως νευροεκφυλιστικές καθώς επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο.

1.3 Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή

Η μεταγωγή σήματος στον αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών γίνεται μέσω σύνθεσης και απελευθέρωσης πληθώρας νευροδιαβιβαστών, όπως είναι το γλουταμινικό οξύ (Glu), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η γλυκίνη, η ακετυλοχολίνη και η σωματοστατίνη. Ωστόσο, οι Glu και GABA διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο νευρωνικό κύκλωμα του αμφιβληστροειδούς, καθώς αποτελούν τον κυριότερο διεγερτικό και ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή, αντίστοιχα (Ramón y Cajal, 1911). Το Glu είναι υπεύθυνο για τη κάθετη διαβίβαση της οπτικής πληροφορίας, ενώ οι GABA-εργικές συνάψεις μεταξύ οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων είναι οι κυρίως υπεύθυνες για την οριζόντια διαβίβαση της οπτικής πληροφορίας. Ωστόσο, η ρύθμιση της ομαλής λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς συντελείται και από άλλες ουσίες (όπως το μονοξείδιο του αζώτου, nitric oxide-NO) που στερούνται των χαρακτηριστικών των κλασσικών νευροδιαβιβαστών και συντίθενται κυρίως από διάφορες υπο-ομάδες βραχύινων κυττάρων.

1.4 Γλουταμινεργικό σύστημα

Το 1969 μελέτες του Olney έδειξαν την ύπαρξη μιας ομάδας αμινοξέων που προκαλούν ταχεία και άμεση εκπόλωση των ευαίσθητων στο Glu κυττάρων συμπεραίνοντας ότι τα εν λόγω αμινοξέα έχουν δράσεις διεγερτικών νευροδιαβιβαστών στο KNΣ (Olney, 1969). Οι μελέτες αυτές έδειξαν για πρώτη φορά ότι το γλουταμινικό και το ασπαρτικό οξύ κατέχουν τη θέση των δύο βασικών διεγερτικών αμινοξέων-νευροδιαβιβαστών στο νευρικό ιστό.

Κατά τη γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση, η εκπόλωση του προσυναπτικού νευρώνα προκαλεί έκκριση Glu από τον προσυναπτικό νευρώνα στη συναπτική σχισμή. Το Glu στη συνέχεια προσδένεται και ενεργοποιεί τους υποδοχείς γλουταμινικού που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του μετασυναπτικού κυττάρου. Αφού το Glu ενεργοποιήσει τους υποδοχείς του, η μεγαλύτερη ποσότητα επαναπροσλαμβάνεται από ειδικές πρωτεΐνες μεταφορείς (υποδοχείς επαναπρόσληψης γλουταμινικού) που εντοπίζονται τόσο στον προ- και μέτασυναπτικό νευρώνα όσο και στα κύτταρα Müller· μετατρέπεται σε γλουταμίνη, μέσω της γλουταμινικής συνθετάσης και επιστρέφει στον προσυναπτικό νευρώνα, όπου μετατρέπεται και πάλι σε Glu. Δυσλειτουργία των υποδοχέων επαναπρόσληψης Glu μπορεί να οδηγήσει σε περίσσεια Glu στη συναπτική σχισμή, η οποία δρα τοξικά για τα κύτταρα και κατ' επέκταση για το σύνολο του ιστού.

Οι μεταφορείς του γλουταμινικού οξέος (Excitatory Amino Acid Transporters, EAATs) είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, που ομοιάζουν με τα μεμβρανικά ιοντικά κανάλια και χωρίζονται σε 5 κατηγορίες: 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 γλουταμινικού από τα κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδούς γίνεται μέσω GLAST μεταφορέων, ενώ από τους νευρώνες μέσω των EAAT1, 4 και 5.



Εικόνα 1.2 Ο κύκλος του γλουταμινικού οξέος στη σύναψη. Το ένζυμο γλουταμινάση μετατρέπει τη γλουταμίνη (Glutamine, Gln) σε γλουταμινικό οξύ (Glutamate, Glu) στον προσυναπτικό νευρώνα. Μέσω των κυστιδικών μεταφορέων γλουταμινικού (Vesicular Glutamate Transporters, κυστιδικοί μεταφορείς γλουταμινικού, VGLUTs) το Glu πακετάρεται σε προσυναπτικά κυστίδια και απελευθερώνεται από τον νευρώνα μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor, διαλυτοί υποδοχείς προσκόλλησης ευαίσθητοι σε N-αιθυλ μαλεϊμίδιο). Αφού δράσει πάνω στους ιοντοτροπικούς υποδοχείς που βρίσκονται στον μετασυναπτικό νευρώνα το Glu απομακρύνεται από την εξωκυττάρια περιοχή της σύναψης από τους ΕΑΑΤs (Excitatory Amino Acid Transporters, μεταφορείς του γλουταμινικού οξέος), που βρίσκονται κυρίως στη μεμβράνη των κυττάρων της γλοίας. Στα γλοιακά κύτταρα, το Glu μετατρέπεται σε Gln μέσω του ενζύμου γλουταμινική συνθετάση (Gln synthetase), η οποία προσλαμβάνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα και ξαναρχίζει ένας καινούργιος κύκλος. (Από Sanacora και συν., 2008)

1.5 Υποδοχείς γλουταμινικού οξέος

Η γλουταμινεργική διαβίβαση είναι πολύ σημαντική σε διεργασίες όπως η νευρωνική επικοινωνία, η μνήμη και η μάθηση. Ωστόσο, η ενέργοποίηση των υποδοχέων γλουταμινικού εμπλέκεται επίσης και σε μια σειρά νευρολογικών καταστάσεων, που ως κύριο συντελεστή έχουν την διεγερσιτοξικότητα που μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών στο ΚΝΣ. Οι υποδοχείς γλουταμινικού οξέος κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες, βάσει του μηχανισμού με τον οποίο η ενεργοποίηση τους προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης του μετασυναπτικού νευρώνα. Αυτές οι ομάδες είναι οι ιοντοτροπικοί (iGluRs) και οι μεταβολοτροπικοί (mGluRs) υποδοχείς γλουταμινικού (Conn και Pin, 1997, Ozawa και συν., 1998).

Οι iGluRs αποτελούν μη εκλεκτικούς διαύλους ιόντων που χωρίζονται σε δύο διαφορετικές κατηγορίες, τους NMDA και τους μη-NMDA, ανάλογα με τους αγωνιστές που τους ενεργοποιούν και τους ανταγωνιστές που αναστέλλουν τη δράση τους. Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται ως υποδοχείς δίαυλοι, καθώς πρόσδεση του Glu στον υποδοχέα επάγει την ενεργοποίηση του διαύλου που βρίσκεται μέσα στον υποδοχέα. Οι μη-NMDA περιλαμβάνουν τους υποδοχείς καϊνικού οξέος (KA) και τους υποδοχείς AMPA (Bleakman και Lodge, 1998). Οι υποδοχείς μη-NMDA ενεργοποιούνται από τις φαρμακευτικές ουσίες α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-4ισοξαζολο-προπιονικού οξέος (AMPA), καϊνικό οξύ και κισκαλικό οξύ, ενώ η δράση τους αναστέλλεται από την 6-κυανο-7-νιτροκινοξαλινο-2,3-διόνη (CNQX). Πρόκειται για υποδοχείς διαπερατούς σε ιόντα Na⁺ και K⁺, αλλά μόνο μερικοί από αυτούς είναι διαπερατοί και στα ιόντα Ca²⁺. Η διαπερατότητα ή μη των AMPA υποδογέων στα ιόντα Ca²⁺ εξαρτάται από την ύπαρξη της GluR2 υπομονάδας. Υποδοχείς που στερούνται της GluR2 υπομονάδας θεωρούνται διαπερατοί στα ιόντα Ca²⁺ και εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο των νευρώνων που επάγεται από την ισχαιμία (Liu και συν., 2007). Οι iGluRs διεκπεραιώνουν το μεγαλύτερο μέρος της διεγερτικής νευροδιαβίβασης και απαντώνται και σε άλλους ιστούς πέραν του ΚΝΣ, όπως για παράδειγμα στο πάγκρεας και στις αμύελες νευρικές απολήξεις στο δέρμα (Dingledine και συν., 1999).

Τη δεύτερη μεγάλη κατηγορία υποδοχέων γλουταμινικού οξέος συνιστούν οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς γλουταμινικού. Οι **mGluRs** ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των συζευγμένων με G- πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs) και ελέγχουν διαύλους ιόντων έμμεσα, με τη βοήθεια δεύτερων αγγελιοφόρων (Watkins και συν., 1990, Orlando και συν., 2002, Madden, 2002). Όπως όλοι οι GPCRs, έτσι και οι mGluRs αποτελούνται από εφτά (7) διαμεμβρανικές α-έλικες, με το αμινοτελικό άκρο να βρίσκεται εξωκυττάρια και να σχηματίζει τη θέση πρόσδεσης του Glu (Conn και Pin, 1997). Οκτώ (8) διαφορετικοί mGluRs έχουν χαρακτηριστεί μέχρι και σήμερα (mGluR1- mGluR8), οι οποίοι υποκατηγοριοποιούνται σε τρεις (3) ομάδες βάσει της δομικής τους ομολογίας, της εκλεκτικότητας των αγωνιστών και συν., 1997). Η ομάδα Ι περιλαμβάνει τους mGluR1και mGluR5 και ενεργοποιεί G-

πρωτεΐνες που συζεύγνυνται με το σύστημα φωσφολιπάσης C (PLC)/ινοσιτόλης. Η ομάδα ΙΙ περιλαμβάνει τους mGluR2 και mGluR3, ενώ η ομάδα ΙΙΙ περιλαμβάνει τους mGluR4, mGluR6 και mGluR8. Οι ομάδες ΙΙ και ΙΙΙ διαφέρουν ως προς την ενεργοποίηση διαφορετικών G-πρωτεϊνών, έχοντας όμως ως κοινό αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής του δεύτερου αγγελιοφόρου κυκλικό-AMP (cAMP), μέσω αναστολής της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης. Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν μείωση των επιπέδων κυκλικού-GMP (cGMP) σε δίπολα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, πιθανώς λόγω σύζευξης με τη φωσφοδιεστεράση του cGMP (Nakanishi και συν., 1998). Οι mGluRs βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο KNΣ τόσο σε προσυναπτικές όσο και σε μετασυναπτικές θέσεις (Pin & Duvoisin, 1995).



Εικόνα 1.3 Γενική δομή μιας υπομονάδας ενός μεταβολοτροπικού υποδοχέα του γλουταμινικού (αριστερά). Ο υποδοχέας αποτελείται από εφτά (7) διαμεμβρανικές α-έλικες. Το αμινοτελικό άκρο που βρίσκεται εξωκυττάρια, σχηματίζει τη θέση πρόσδεσης. Το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται εντός του κυττάρου. Γενική δομή των ιοντοτροπικών υποδοχέων γλουταμινικού (δεξιά). Το αμινοτελικό άκρο και ένας μεγάλος βρόγχος στην εξωκυττάρια πλευρά σχηματίζει τη θέση αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. (τροποποιημένη από http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/). TM: transmembrane, διαμεμβρανικός.

Οι υποδοχείς NMDA ενεργοποιούνται από το ανάλογο του αμινοξέος Ν-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ (NMDA) και η δράση τους αναστέλλεται από την φαρμακευτική ουσία 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ (APV). Όπως και οι μη-NMDA, έτσι και οι NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί στα ιόντα Na⁺, K⁺ με τη διαφορά ότι όλοι είναι διαπερατοί και σε ιόντα Ca²⁺, προκαλώντας μακροχρόνιες αλλαγές στους μετασυναπτικούς νευρώνες (Crowder και συν., 1987). Επίσης, οι NMDA υποδοχείς φέρουν ένα ιόν Mg^{2+} στο εσωτερικό του υποδοχέα, που κλείνει τον δίαυλο σε κατάσταση ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν η μεμβράνη εκπολώνεται, το Mg^{2+} εξέρχεται του πόρου και επιτρέπει στα ιόντα να περάσουν απ' τον υποδοχέα-δίαυλο (Johnson και Ascher, 1990). Αυτή η ιδιαιτερότητα των NMDA υποδοχέων φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην συναπτική ολοκλήρωση στο KNΣ.

Δεκαέξι (16) διαφορετικές πρωτεΐνες-υπομονάδες έχουν ταυτοποιηθεί, οι οποίες συγκροτούν τους iGluRs (Dani και Mayer, 1995). Οι NMDA υποδοχείς δομούνται από συνδυασμό των υπομονάδων NR1, NR2A, NR2B, NR2C και NR2D, οι υποδοχείς AMPA από τις GluR1–GluR4 και οι υποδοχείς καϊνικού από τις υπομονάδες KA1 και/ή KA2 σε συνδυασμό με τις GluR5–GluR7. Η ύπαρξη ομολογίας στην αλληλουχία των παραπάνω υπομονάδων μαρτυρά την κοινή φυλογενετική εξέλιξη των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτές (Dingledine και συν., 1999).



Εικόνα 1.4 Ο δίαυλος ιόντων που περιέχει ο μη-ΝΜDA υποδοχέας (αριστερά) είναι διαπερατός σε ιόντα νατρίου (Na⁺) και καλίου (K⁺) και λιγότερο σε ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺). Ο δίαυλος του NMDA υποδοχέα (δεξιά) είναι διαπερατός σε Na⁺, K⁺ και Ca²⁺ και έχει διάφορες θέσεις πρόσδεσης για γλυκίνη, ψευδάργυρο (Zn²⁺), φαινοκυκλιδίνη [PhenCyclidine, 1-(1-Phenyl Cyclohexyl) Piperidine (PCP)], πολυαμίνες και μαγνησίο (Mg²⁺) που ρυθμίζουν τη λειτουργία του διαύλου με διαφορετικούς τρόπους. (τροποποιημένη από Purves και συν., 2001).

Με βάση τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι υπομονάδες των ιοντοτροπικών γλουταμινεργικών υποδοχέων αποτελούνται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (M1, M2, M3 και M4), μια εκ των οποίων σχηματίζει θηλιά μέσα στην μεμβράνη, στραμμένη προς την κυτταροπλασματική πλευρά αυτής (M2), ενώ το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκονται στην εξωκυττάρια και την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, αντίστοιχα (Εικόνα 1.5). Οι περιοχές Μ2 όλων των υπομονάδων στο σύμπλοκο του υποδοχέα συγκροτούν τον πόρο του διαύλου. Οι λειτουργικές ιδιότητες του διαύλου-υποδοχέα είναι αποτέλεσμα της σύστασής του στις διάφορες υπομονάδες που συμμετέχουν στην συγκρότησή του. Κάθε μια από αυτές τις υπομονάδες μπορεί να υφίσταται μία (εναλλακτικό σειρά μετα-μεταγραφικών μάτισμα) ή μετα-μεταφραστικών (φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) τροποποιήσεων, οι οποίες προσδίδουν ακόμα δομικά, μεγαλύτερη ποικιλότητα στα λειτουργικά και φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του υποδοχέα. Η σύσταση του υποδοχέα σε υπομονάδες έχει βρεθεί ότι μπορεί να αλλάξει κατά την ανάπτυξη, όπως επίσης και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (π.χ. ισχαιμία, επιληπτικές διαταραχές) (Dingledine και συν., 1999).



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση μιας υπομονάδας των ιοντοτροπικών γλουταμινεργικών υποδοχέων.

1.6 Υποδοχείς γλουταμινικού στον αμφιβληστροειδή

Το γλουταμινικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στον αμφιβληστροειδή και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη συναπτική διαβίβαση του ιστού (Shatz & Sretavan, 1986). Όλοι οι τύποι νευρικών κυττάρων του ιστού του αμφιβληστροειδούς διαθέτουν υποδοχείς γλουταμινικού. Σήμερα, είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε σε μεγάλο βαθμό ποιες υπομονάδες των υποδοχέων γλουταμινικού εντοπίζονται σε ποιες επιμέρους κατηγορίες κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Brandstatter και συν, 1998). Η μεγάλη ποικιλία υποδοχέων γλουταμινικού στον αμφιβληστροειδή συμβάλλει στη λειτουργική ποικιλία, η οποία θεωρείται η βάση της πολύπλοκης διαδικασίας της μετάδοσης της οπτικής πληροφορίας. Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα πληθώρας μελετών που βασίζονται σε μορφολογικές, φυσιολογικές, βιοχημικές, ηλεκτροφυσιολογικές, ανοσοϊστοχημικές μεθόδους καθώς και μελέτες *in situ* υβριδοποίησης και δείχνουν την κατανομή των υποδοχέων γλουταμινικού στις διαφορετικές κυτταρικές ομάδες του αμφιβληστροειδούς.

Φωτοϋποδεκτικά κύτταρα

Τα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα βρίσκονται στην πρώτη γραμμή στο κάθετο μονοπάτι μεταβίβασης της οπτικής πληροφορίας και απελευθερώνουν γλουταμινικό οξύ προς τα δίπολα κύτταρα που βρίσκονται μετασυναπτικά. Ως εκ τούτου η ύπαρξη υποδογέων γλουταμινικού στα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα θα υποδείκνυε τη δράση τους ως αυτοϋποδοχέων, ρυθμίζοντας έτσι την απελευθέρωση γλουταμινικού απ' το ίδιο το κύτταρο. εφόσον δεν βρίσκονται νευρώνες προσυναπτικά των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων. Ο Peng και οι συνεργάτες του έδειξαν την ύπαρξη των υπομονάδων του AMPA, iGluR2 και iGluR3, σε αμφιβληστροειδή χρυσόψαρου και κουνελιού χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (Peng και συν., 1995). Ωστόσο, η αξιοπιστία των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη αμφισβητήθηκε λίγα χρόνια αργότερα (Brandstätter και συν., 1998). Υπάρχει επίσης μια αναφορά που υποστηρίζει την ύπαρξη των υπομονάδων του καϊνικού, iGluR6 και iGluR7, σε φωτοϋποδεκτικά κύτταρα αμφιβληστροειδούς πρωτευόντων (Harvey και Calkins, 2002). Όσον αφορά την ύπαρξη mGluRs υπομονάδων στα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα υπάρχουν σαφείς ενδείξεις της ύπαρξης της mGluR8 υπομονάδας, που προέργονται από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Συγκεκριμένα, ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη της mGluR8 υπομονάδας στις απολήξεις των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων σε αμφιβληστροειδείς θηλαστικών (Brandstätter και συν., 1998' Koulen και συν., 1999). Η ύπαρξη mGluRs στα φωτουποδεκτικά κύτταρα θα μπορούσε να λειτουργεί ως ένα σύστημα μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης για τη ρύθμιση των μεταβολών στην απελευθέρωση Glu που προκαλούνται στο φως ή το σκότος.

Οριζόντια κύτταρα

Μελέτες *in-situ* υβριδοποίησης (Hughes και συν., 1992' Zhang και συν., 1996' Brandstätter και συν., 1994, 1996' Akazawa και συν., 1994' Hartveit και συν., 1995), ανοσοϊστοχημικές (Peng και συν., 1995' Schultz και συν., 1997' Brandstätter και συν., 1997) και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες (Yang και Wu, 1991' Yang και Yang, 2001' O'Dell και Christensen, 1989a,b' Tachibana, 1985' Krizaj και συν., 1994) έχουν δείξει την ύπαρξη iGluRs και mGluRs σε επίπεδο mRNA αλλά και πρωτεΐνης σε οριζόντια κύτταρα θηλαστικών. Συγκεκριμένα, οι υπομονάδες του AMPA υποδοχέα GluR2, 3 και 4 και του υποδοχέα του καϊνικού GluR6 και 7 φαίνεται να είναι παρούσες στα σώματα και τους δενδρίτες των οριζοντίων κυττάρων θηλαστικών. Επιπλέον, μελέτες του Peng και των συνεργατών του έδειξαν παρουσία των υπομονάδων των ομάδων Ι και ΙΙΙ των mGluRs, στα οριζόντια κύτταρα αμφιβληστροειδή γατόψαρου, αλλά απουσία των υπομονάδων της ομάδας ΙΙ (Peng και συν., 1995). Επίσης, σε οριζόντια κύτταρα αμφιβληστροειδούς σαλαμάνδρας και κυπρίνου οι AMPA υποδοχείς και οι υποδοχείς καϊνικού φαίνεται να είναι παρούσες, ενώ οι NMDA απουσιάζουν (O'Dell και Christensen, 1989b).

<u>Δίπολα κύτταρα</u>

Τα δίπολα κύτταρα κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες βάσει της απόκρισης τους στο φως. Τα ΟΝ δίπολα κύτταρα εκπολώνονται, ενώ τα OFF δίπολα κύτταρα υπερπολώνονται όταν μια δέσμη φωτός πέσει στο υποδεκτικό τους πεδίο (Schiller, 1992). Στα θηλαστικά κάθε δίπολο κύτταρο συνδέεται αποκλειστικά με ραβδιοφόρα ή κωνιοφόρα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, και δεδομένου ότι τα δίπολα κύτταρα βρίσκονται μετασυναπτικά των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα ΟΝ και OFF δίπολα κύτταρα διαθέτουν διαφορετικούς υποδογείς γλουταμινικού που τους επιτρέπουν να αποκρίνονται διαφορετικά στο φως. Πράγματι, μορφολογικές μελέτες σε αμφιβληστροειδής θηλαστικών έχουν δείξει την ύπαρξη τόσο mGluRs όσο και iGluRs στους δενδρίτες των δίπολων κυττάρων με την κατανομή των υποδοχέων ή/και των υπομονάδων που τους συγκροτούν να διαφέρει μεταξύ ΟΝ και OFF δίπολων κυττάρων (Hughes και συν., 1992[•] Peng και συν., 1995[•] Wenzel και συν., 1997[•] Kamphuis και συν., 2003[•] Hartveit και συν., 1995). Για παράδειγμα, η έκφραση των υπομονάδων mGluR1, 5 και 6 έχει αναφερθεί σε δενδρίτες ΟΝ δίπολων κυττάρων σε αμφιβληστροειδή επίμυος (Koulen και συν., 1997' Vardi, 1998, 2000' Dhingra και συν., 2000), όπως επίσης και η έκφραση των υπομονάδων NR1 και NR2D των NMDA υποδοχέων (Hughes και συν., 1992⁻ Peng και συν., 1995⁻ Wenzel και συν., 1997). Η GluR2 υπομονάδα του AMPA υποδοχέα φαίνεται να είναι παρούσα σε ON δίπολα κύτταρα αμφιβληστροειδή αρουραίου, ενώ απουσιάζει από τα OFF δίπολα κύτταρα του αμφιβληστροειδή σαλαμάνδρας (Gilbertson και συν., 1991).

<u>Βραχύινα κύτταρα</u>

Τα βραχύινα κύτταρα αποτελούν μια ομάδα νευρώνων του αμφιβληστροειδούς που διακρίνονται σε περισσότερους από 20 διαφορετικούς τύπους, βάσει βιοχημικών κριτηρίων, χρησιμοποιούν και μορφολογικών και μια μεγάλη ποικιλία νευροδιαβιβαστών (Masland, 1988, 2001). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν εντοπιστεί τόσο mGluRs όσο και iGluRs σε όλους τους τύπους βραχύινων κυττάρων (Hughes και συν., 1992' Müller και συν., 1992' Brandstätter και συν., 1994, 1998' Duvoisin και συν., 1995' Peng και συν., 1995' Koulen και συν., 1996, 1997' Qin and Pourcho, 1996 Ghosh και συν., 2001 Grunert και συν., 2002). Συγκεκριμένα, οι υπομονάδες GluR1 έως και GluR7 και οι KA1 και KA2 εντοπίζονται σε όλους τους τύπους βραχύινων κυττάρων, επομένως όλα τα βραχύινα κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς ΑΜΡΑ και καϊνικού. Υπάρχουν ωστόσο ενδείξεις ότι εκτός από μη-NMDA, εντοπίζονται και NMDA υποδοχείς στα βραχύινα κύτταρα (Hartveit and Veruki, 1997 Dixon and Copenhagen, 1992) αν και υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των υποδοχέων γλουταμινικού στους διαφορετικούς τύπους βραχύινων κυττάρων. Για παράδειγμα, οι υπομονάδες του NMDA υποδοχέα NR1, NR2A και NR2B εντοπίζονται σε βραχύινα κύτταρα που συνάπτονται με δίπολα κύτταρα συνδεδεμένα με κωνία, αλλά όχι σε αυτά που συνάπτονται με δίπολα κύτταρα συνδεδεμένα με ραβδία (Brandstätter και συν., 1996' Fletcher και συν., 2000). Όσον αφορά τους mGluRs, έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη των υπομονάδων mGluR1, mGluR2, mGluR4, mGluR7 και mGluR8 στις μεμβράνες των βραχύινων κυττάρων (Duvoisin και συν., 1995[·] Hartveit και συν., 1995).

Γαγγλιακά κύτταρα

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες και μελέτες *in situ* υβριδοποίησης έχουν δείξει την ύπαρξη όλων των υπομονάδων που συνθέτουν τους AMPA υποδοχείς (Hughes και συν., 1992[•] Müller και συν., 1992[•] Duvoisin και συν., 1995[•] Peng και συν., 1995[•] Qin and Pourcho, 1996[•] Brandstätter και συν., 1997[•] Gründer και συν., 2000), αλλά και των υπομονάδων του NMDA υποδοχέα NR1 και NR2A-C (Hartveit και συν., 1994⁻ Brandstätter και συν., 1998⁻ Vandenbranden και συν., 2000) στα γαγγλιακά κύτταρα. Επίσης, οι υπομονάδες KA1, GluR6 και GluR7 των υποδοχέων καϊνικού είναι παρόντες στα γαγγλιακά κύτταρα (Zhang και συν., 1996⁻ Peng και συν., 1995). Όσον αφορά την παρουσία των mGluRs στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, οι πληροφορίες που βρίσκονται στη βιβλιογραφία είναι ελάχιστες. Συγκεκριμένα, μελέτες από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, δίνουν στοιχεία για την ύπαρξη των mGluR1, mGluR2, mGluR4 και mGluR7, αλλά όχι των mGluR5 και mGluR6 στα γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδή επίμυος (Akazawa και συν., 1994⁻ Hartveit και συν., 1995), ενώ μια τρίτη μελέτη κάνει λόγο για έκφραση των υπομονάδων mGluR5 και mGluR6 στη γαγγλιακή στιβάδα αμφιβληστροειδή επίμυος χωρίς όμως οι συγγραφείς να κάνουν λόγο για συγκεκριμένους τύπους νευρώνων (Tehrani και συν., 2000).

1.7 Ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία αποτελεί μια πολύ συνηθισμένη κατάσταση, που παρατηρείται σε ιδιαιτέρως σοβαρές οφθαλμικές παθήσεις και μπορεί να προκαλέσει ακόμη και τύφλωση (Osborne και συν., 2004). Ως ισχαιμία χαρακτηρίζεται η κατάσταση ελλιπούς παροχής οξυγόνου και γλυκόζης σε έναν ιστό, καθώς και μη αποτελεσματικής αποβολής των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού. Μια ισχαιμική κατάσταση μπορεί να επιφέρει δραματικές συνέπειες στον προσβεβλημένο ιστό που μπορούν να οδηγήσουν είτε σε δημιουργία νέων μη φυσιολογικών αγγείων (νεοαγγείωση) είτε σε θάνατο των προσβεβλημένων κυττάρων.

Σε επίπεδο κυττάρου, η διαταραγμένη παροχή οξυγόνου στον αμφιβληστροειδή οδηγεί σε μείωση των ενεργειακών επιπέδων του κυττάρου με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των υποδοχέων επαναπρόσληψης γλουταμινικού (EAATs) και την τροποποίηση της φυσιολογικής μεταφοράς των ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε συσσώρευση Glu στη συναπτική σχισμή και επακόλουθη ενεργοποίηση των ιοντοτροπικών υποδοχέων του (Lipton και Rosenberg, 1994[°] Lipton, 1999[°] Lipton και συν., 2001). Η ενεργοποίηση των γλουταμινεργικών υποδοχέων θεωρείται πολύ σημαντική στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου καθώς δίνει έναυσμα σε έναν καταρράκτη ενδοκυττάριων αντιδράσεων, που περιλαμβάνει την αύξηση των ενδοκυττάριων Ca²⁺ και την παραγωγή ριζών του μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]) (Osborne και συν., 2004). Η μεγάλη ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca²⁺ σε συνδυασμό με τη μείωση των επιπέδων ATP, προάγει την καταστροφή των μιτοχονδρίων, την μεταβολή του κυτταροσκελετού και την αποδόμηση του DNA (Ferreira και συν., 1997).

Σε επίπεδο ιστού, κατά την ισχαιμία διεγείρεται και η απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων – όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) - με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων αγγείων (νεοαγγείωση) στον αμφιβληστροειδή, το μελάχρουν επιθήλιο και άλλους ιστούς (Campochiaro, 2000). Η νεοαγγείωση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει αγγειοδιαστολή των ήδη υπαρχόντων αγγείων, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και αποδόμηση της περιβάλλουσας ενδοκυττάριας ουσίας, δίνοντας έτσι το έναυσμα για ενεργοποίηση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμό νέων μη φυσιολογικών αγγείων (Witmer και συν., 2003). Κατά τη νεοαγγείωση μπορεί επίσης να παρατηρηθούν μικροανευρύσματα και αιμορραγίες εντός του οφθαλμού (Osborne και συν., 2004).



Εικόνα 1.6 Συνοπτική αναπαράσταση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά την διεγερσιτοξικότητα. Η ισχαιμία προκαλεί πτώση των ενεργειακών αποθεμάτων στον ιστό και μειωμένη επαναπρόσληψη Glu (Glutamate, γλουταμινικό οξύ) με αποτέλεσμα την εκπόλωση της μεμβράνης του μετασυναπτικού κυττάρου. Η απελευθέρωση Glu αυξάνεται και η περίσσεια Glu στη συναπτική σχισμή ενεργοποιεί μεγάλο αριθμό υποδοχέων Glu. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων Ca²⁺ ενδοκυτταρικά και λόγω απελευθέρωσης Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών προκαλεί βλάβη στα μιτοχόνδρια, τα ενεργειακά αποθέματα μειώνονται ακόμη περισσότερο και το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο.

Το φαινόμενο κατά το οποίο το πλεόνασμα του γλουταμινικού οξέος στην συναπτική σχισμή επιφέρει καταστρεπτικές συνέπειες στον ιστό καλείται διεγερσιτοξικότητα (excitotoxicity). Το φαινόμενο της διεγερσι-τοξικότητας παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Lucas και Newhouse, σε αμφιβληστροειδείς νεογνών μυών, τα οποία είχαν λάβει γλουταμικό νάτριο (sodium glutamate) μέσω του στόματος (Lucas και Newhouse, 1957). Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι καταστράφηκαν οι νευρώνες στα εσωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδούς, ενώ αργότερα ο Olney παρατήρησε ότι το φαινόμενο αυτό δεν περιοριζόταν στον ιστό του αμφιβληστροειδούς αλλά ήταν εμφανές και σε πολλές ακόμη δομές του ΚΝΣ. Έτσι ο Olney επινόησε τον όρο διεγερσι-τοξικότητα (Olney, 1969).

17



Εικόνα 1.7 Ο ρόλος των ιόντων ασβεστίου στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από ισχαιμία. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca²⁺ μπορούν να αυξηθούν με διάφορους τρόπους κατά την ισχαιμία. Τα αυξημένα επίπεδα Ca²⁺ επάγουν ενεργοποίηση ενζύμων που προκαλούν διαταραχή της ομοιόστασης και της δομής του κυττάρου, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο (τροποποιημένη από Osborne και συν., 2004). ER: Endoplasmic reticulum, ενδοπλασματικό δίκτυο; CICR: Calcium-induced calcium release, ασβεστιο-επαγόμενη απελευθέρωση ασβεστίου; MPT: Mitochondrial permeability transition, μιτοχονδριακή μετάβαση διαπερατότητας.

Διεγερσι-τοξικότητα μπορεί να προκληθεί και από ουσίες πέραν του γλουταμινικού, όμως η διεγερσι-τοξικότητα μέσω γλουταμινικού αποτελεί το πιο ευρέως μελετημένο τέτοιο φαινόμενο. Σε κυτταρικό επίπεδο η αμφιβληστροειδική ισχαιμία επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό τους διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Τα γαγγλιακά και τα βραχύινα κύτταρα φαίνεται να είναι οι πιο ευπαθείς στην ισχαιμία νευρώνες στον ιστό. Βλάβη ή απώλεια γαγγλιακών κυττάρων παρατηρείται στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως μοντέλα γλαυκώματος και διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και ο θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων φαίνεται να διαδραματίζει ιδιάζοντα ρόλο στην απώλεια της όρασης που παρατηρείται σε τέτοιες καταστάσεις (Osborne και συν, 1999b). Τα βραχύινα κύτταρα φαίνεται να είναι επίσης ιδιαίτερα ευπαθή σε ισχαιμικές καταστάσεις.

1.8 Σύγχρονες θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών

Μέχρι και σήμερα οι προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών στοχεύουν κυρίως στη νεοαγγείωση και περιλαμβάνουν θεραπείες με laser (L'Esperance, 1968' Rothen και συν., 2005) καθώς και ενέσιμα σκευάσματα που στοχεύουν στην αναστολή του VEGF (Ferrara και συν., 2006). Η φωτοπηξία (photocoagulation) με laser χρησιμοποιείται για την καταστροφή των μη φυσιολογικά ανεπτυγμένων νέων αγγείων ή για την καταστροφή των διαρρεόντων αιμοφόρων αγγείων. Εφαρμόζεται είτε κατά μόνας είτε σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία με χρήση της φωτοευαίσθητης πορφυρίνης verteporfin. Η verteporfin εγχύεται ενδοφθάλμια και συσσωρεύεται στα μη φυσιολογικά αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία. Η εφαρμογή laser στις περιοχές συσσώρευσης της verteporfin, ενεργοποιεί την τελευταία η οποία προκαλεί καταστροφή των αναπτυσσόμενων αγγείων χωρίς να επηρεάζει τους επικείμενους ιστούς. Ωστόσο είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι οι θεραπείες αυτές δε στοχεύουν στη βελτίωση της όρασης αλλά στη διατήρηση της, καθώς είναι ικανές να καταστρέψουν τα ήδη υπάρχοντα μη φυσιολογικά αγγεία αλλά όχι να αποτρέψουν τη δημιουργία νέων. Επιπλέον, η διαρροή των αιμοφόρων αγγείων μπορεί να ξαναεμφανιστεί μέσα σε διάστημα δύο μόλις ετών από τη θεραπεία (Fine και συν., 2000).

Πέραν των επιδράσεων με laser, πριν μερικά χρόνια ξεκίνησε η ενδοβολβική χορήγηση ουσιών με στόχο την αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης που παρατηρείται σε ασθένειες του οφθαλμού. Ο VEGF είναι ένας αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου που εμπλέκεται στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, κυρίως κατά την ανάπτυξη ή σε ισχαιμικές καταστάσεις, καθότι απελευθερώνεται από τον ισχαιμικό ιστό. Για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών αμφιβληστροειδοπαθειών την τελευταία δεκαετία χρησιμοποιούνται θεραπείες με αντι-VEGF παράγοντες, όπως τα σκευάσματα bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) και ranibizumab (Lucentis). Πρόκειται για αντισώματα έναντι στην ισομορφή VEGF-α του VEGF [Lucentis (μονοκλωνικό αντίσωμα) και Macugen (humanized antibody fragmentθραύσμα ανθρωποποιημένου αντισώματος)] ή τροποποιημένα νουκλεοτίδια που προσδένονται στην ισομορφή VEGF165 (Macugen) (Ferrara και συν., 2006[·] Vasilaki και Thermos, 2009). Τα εν λόγω σκευάσματα στοχεύουν στην αναστολή της διέγερσης του υποδοχέα του VEGF και κατ' επέκταση στην αναστολή σχηματισμού νέων μη φυσιολογικών αγγείων. Ωστόσο, παρόλο που οι αντι-VEGF προσεγγίσεις φαίνονται ελπιδοφόρες για τη θεραπεία σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως για παράδειγμα η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, δε στερούνται σοβαρών παρενεργειών, όπως η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, η ανάπτυξη φλεγμονής ενδοϋαλοειδικά ή και η αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς λόγω συχνών ενδοφθάλμιων χορηγήσεων. Όπως και στην περίπτωση της φωτοπηξίας με laser, οι αντι-VEGF παράγοντες στοχεύουν στη διατήρηση και όχι στη βελτίωση της όρασης (βλ. ανασκόπηση: Vasilaki και Thermos, 2009).

Τα τελευταία χρόνια, ελπιδοφόρες έρευνες έχουν ξεκινήσει για την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας με στόχο την αντιμετώπιση σοβαρών κληρονομούμενων αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως το ρετινοβλάστωμα και η νόσος Stargardt's. Ο αδενο-συνδεόμενος ιός (adeno-associated virus, AAV) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος για γονιδιακή θεραπεία ιικός φορέας, ο οποίος χρησιμοποιείται και στις μελέτες γονιδιακής θεραπείας που στογεύουν στον ιστό του αμφιβληστροειδούς. Τέτοιου είδους προσεγγίσεις έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών ενώ κλινικές μελέτες έχουν ήδη ξεκινήσει για ένα ευρύ φάσμα αμφιβληστροειδοπαθειών (για μια πρόσφατη ανασκόπηση βλέπε Lipinski και συν., 2013). Παρ' όλα αυτά, αν και η εφαρμογή διαγονιδιακής θεραπείας φαντάζει ιδιαίτερα ελπιδοφόρα, δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί το κατά πόσο θα μπορούσε να βοηθήσει στην αντιμετώπιση πολυπαραγοντικών αμφιβληστροειδοπαθειών όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας.

Στις προσεγγίσεις που προαναφέρθηκαν και χρησιμοποιούνται σήμερα, ο κυτταρικός θάνατος δεν αποτελεί θεραπευτικό στόχο. Παρ' όλα αυτά ο κυτταρικός θάνατος παρατηρείται κατά την εμφάνιση σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών και μαζί με την νεοαγγείωση αποτελεί καταλυτικό παράγοντα μείωσης της οπτικής επερχόμενης τύφλωσης. Ως εκ οξύτητας και της τούτου, η εύρεση νευροπροστατευτικών παραγόντων που θα στοχεύουν μείωση στη της νευροεκφύλισης, κρίνεται απαραίτητη για τη δημιουργία σχημάτων, που σε συνδυασμό με τις ήδη εφαρμοζόμενες θεραπείες θα μπορούσαν να παρέχουν αποτελεσματικότερη θεραπεία σε ασθενείς με αμφιβληστροειδοπάθειες (Vasilaki και Thermos, 2009).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το *in vivo* μοντέλο της διεγερσιτοξικότητας επαγόμενης από AMPA (AMPA διεγερσιτοξικότητα) για τη μελέτη της δυνατότητας των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών να αποτελέσουν νευροπροστατευτικό και θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών.

1.9 Cannabis sativa

Το φυτό της *Cannabis sativa* (Linneaus., 1753) έχει προέλευση την κεντρική Ασία, ανήκει στο γένος των κνιδωδών και απαντάται στη φύση σε περισσότερες από εκατό παραλλαγές (π.χ. *Cannabis indica, Cannabis ruderalis*), που διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς την περιεκτικότητά τους σε δραστικές ουσίες. Το φυτό της κάνναβης χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν για τις ίνες του με στόχο την παραγωγή υψηλής ποιότητος χαρτιού και υφασμάτων (Li και Lin, 1974). Η χρήση του φυτού για τις ψυχοδιεγερτικές του δράσεις ξεκίνησε στην Κίνα και έφτασε στην Ευρώπη κατά τον 16° αιώνα, ενώ έως και στις μέρες μας το φυτό της κάνναβης αποτελεί την πιο ευρέως διαδεδομένη ουσία με ψυχοτρόπο δράση. Οι θεραπευτικές δράσεις της κάνναβης εισάγονται στην ιατρική του δυτικού κόσμου χάρη στον Σκωτσέζο ιατρό W.B. O' Shaunghnessy, ενώ στα επόμενα χρόνια ακολουθεί πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων σχετικά με τα ιατρικά οφέλη της (O' Shaunghnessy, 1839).



<u>Euκóva 1.8</u> Το φυτό της *Cannabis sativa*. (Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, 1887).

1.10 Κανναβινοειδή

Η κάνναβη περιέχει περισσότερες από 400 χημικές ενώσεις μεταξύ των οποίων περισσότερα από 60 αλκαλοειδή που εντοπίζονται μόνο σ' αυτό το φυτό και ονομάζονται κανναβινοειδή. Δύο εξ αυτών έχουν σωματικές και ψυχοτρόπες
επιδράσεις στον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα είναι αδρανή από βιολογική άποψη. Η Δ^9 -Τετραϋδροκανναβινόλη ή Δ^9 -THC (Gaoni και Mechoulam, 1971) είναι το κύριο δραστικό ψυχοτρόπο συστατικό της κάνναβης, ενώ η Δ^8 -Τετραϋδροκανναβινόλη ή Δ^8 -THC έχει επίσης ψυχοτρόπες ιδιότητες αλλά είναι πολύ λιγότερο δραστική από την Δ^9 -THC. Η διαδικασία για την εξαγωγή των φαρμακολογικά ενεργών ουσιών της κάνναβης ξεκίνησε το 1914 και λίγο αργότερα η κανναβινόλη (cannabinol, ελαφρώς ψυχοτρόπος ουσία) και αργότερα η κανναβιδιόλη (CBD, μη-ψυχοτρόπος ουσία) απομονώθηκαν και η χημική τους δομή προσδιορίστηκε το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα (Todd, 1940⁻ Adams και συν., 1941).

Τα κανναβινοειδή είναι μια ομάδα τερπενοφαινολικών ουσιών που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο φυτό *Cannabis sativa* και κατηγοριοποιούνται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος και ο πιο βασικός είναι σύμφωνα με τη δομή τους, και ο δεύτερος βάσει της προέλευση τους. Βάσει της δομής τους χωρίζονται στα κλασσικά (ουσίες που ομοιάζουν δομικά με την Δ⁹-THC) και μη κλασσικά, ενώ βάσει της προέλευσης τους χωρίζονται σε φυτοκανναβινοειδή, ενδοκανναβινοειδή και συνθετικά κανναβινοειδή.



Εικόνα 1.9 Μοριακή δομή του φυτοκανναβινοειδούς Δ⁹-THC.

1.11 Ενδογενές κανναβινοειδικό σύστημα

Η έρευνα γύρω από τον τρόπο δράσης των κανναβινοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό οδήγησε στην ανακάλυψη του ενδοκανναβινοειδικού συστήματος. Το ενδοκανναβινοειδικό σύστημα περιλαμβάνει ενδογενείς προσδέτες (ενδοκανναβινοειδή), υποδοχείς (υποδοχείς κανναβινοειδών), καθώς και ειδικά ένζυμα για την βιοσύνθεση και αποικοδόμησή των ενδοκανναβινοειδών. Το ενδογενές κανναβινοειδικό σύστημα φαίνεται να συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, ενώ η εμπλοκή του σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις αποτελεί το αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών.

1.12 Υποδοχείς κανναβινοειδών

Οι ειδικές θέσεις δέσμευσης των κανναβινοειδών εντοπίστηκαν για πρώτη φορά το 1988 σε εγκέφαλο μυός (Devane και συν., 1988). Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί δύο τύποι υποδοχέων κανναβινοειδών: οι υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 1 (CB1), οι οποίοι κλωνοποιήθηκαν αρχικά από εγκεφαλικό φλοιό επίμυος (Matsuda και συν., 1990) και στη συνέχεια από ανθρώπινο εγκέφαλο και όρχι (Gerard και συν., 1991), και οι υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 2 (CB2) από ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Munro και συν., 1993). Μέσω αυτών των υποδοχέων διαμεσολαβούνται οι περισσότερες δράσεις των κανναβινοειδών.

Οι CB1 και οι CB2 ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs). Έχουν την χαρακτηριστική διαμόρφωση, με επτά διαμεμβρανικές α-έλικες να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και τη θέση δέσμευσης των κανναβινοειδών να βρίσκεται σε μία κοιλότητα που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες. Το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και το καρβοξυτελικό στην κυτταροπλασματική πλευρά. Οι CB1 κανναβινοειδικοί υποδοχείς είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι υποδοχείς αυτής της υπεροικογένειας στο νευρικό σύστημα (Herkenham και συν., 1990).

Οι CB1 εντοπίζονται κυρίως σε δομές του KNΣ, όπως τα βασικά γάγγλια, η παρεγκεφαλίδα και ο ιππόκαμπος, ενώ βρίσκονται κυρίως προσυναπτικά (Herkenham και συν., 1990, 1991). Ο CB1 εντοπίζεται και στις περιφερικές νευρικές απολήξεις, αλλά και σε άλλους εξωνευρικούς ιστούς, όπως το γεννητικό σύστημα, ο σπλήνας, ο πνεύμονας, οι λείες μυϊκές ίνες, τα επινεφρίδια, κ.α., ενώ απουσιάζει από τον προμήκη μυελό, όπου βρίσκονται τα ζωτικά κέντρα ρύθμισης της αναπνοής και του καρδιακού ρυθμού, γεγονός που αιτιολογεί και συν, 2004). Οι CB2 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως σε κύτταρα (Β-λεμφοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα) και ιστούς (σπλήνας, λεμφαδένες, αμυγδαλές) του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο τους στην ανοσολογική ρύθμιση (Munro και συν., 1993⁻ Howlett και συν., 2002). Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις για ύπαρξη των CB2 υποδοχέων και σε ιστούς του νευρικού συστήματος, όπως το εγκεφαλικό στέλεχος (Van Sickle και συν., 2005) και τα νευρογλοιακά κύτταρα του

κοιλιακού ραβδωτού (Smith και Berridge, 2007). Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι προσδέτες των κανναβινοειδικών υποδοχέων CB1 και CB2, ασκούν τις δράσεις τους προσδενόμενοι και σε άλλους υποδοχείς, όπως ο ορφανός υποδοχέας GPR55 (Ryberg και συν. 2007), και ο TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) υποδοχέας των βανιλλοειδών (Howlett και συν. 2002⁻ Pertwee 2005⁻ Pertwee and Ross 2002⁻ Ross, 2003⁻ Melck και συν., 1999⁻ Zygmunt και συν., 1999⁻ Smart και συν., 2000⁻ Di Marzo και συν., 2002⁻ Iversen και Chapman, 2002⁻ Rice και συν., 2002).

1.13 Ενδογενή κανναβινοειδή

Μετά την εύρεση ειδικών υποδοχέων για τα κανναβινοειδή ξεκίνησε η προσπάθεια εύρεσης ενδογενών ουσιών που είναι ικανές να προσδένονται και να ενεργοποιούν τους υποδοχείς κανναβινοειδών, δεδομένου ότι δε θεωρούνταν πιθανό ο οργανισμός να συντηρεί υποδοχείς στους οποίους προσδένονται μόνο ουσίες φυτικής προέλευσης. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν στην ανακάλυψη μορίων με ενδογενή κανναβινεργική δράση, οι οποίες ονομάστηκαν ενδογενή κανναβινοειδή ή ενδοκανναβινοειδή.

Τα ενδοκανναβινοειδή είναι ουσίες οι οποίες παράγονται από ζωικούς οργανισμούς και μπορούν να προσδεθούν στους κανναβινοειδικούς υποδοχείς και να τους ενεργοποιήσουν. Πρόκειται για λιπιδικής φύσεως μόρια, τα οποία συντίθενται από ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (αραχιδονικό οξύ) και μία πολική κεφαλή (αιθανολαμίνη ή γλυκερόλη). Το πρώτο ενδογενές κανναβινοειδές μόριο που βρέθηκε ότι προσδένεται με υψηλή συγγένεια στους CB1 και CB2 υποδοχείς, ήταν η Ναραχιδονοϋλαιθανολαμίνη (Ανανδαμίδιο, **AEA**, Devane και συν., 1992). Πρόκειται για ένα αμίδιο που προκύπτει από ένωση αραχιδονικού οξέος και αιθανολαμίνης. Το δεύτερο ενδοκανναβινοειδές που ανακαλύφθηκε είναι η 2–αραχιδονοϋλγλυκερόλη (2-arachidonoyl glycerol, **2-AG**, Sugiura και συν., 1995, 1999b), η οποία βρίσκεται στον εγκέφαλο σε μεγάλες ποσότητες και προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στον CB1 υποδοχέα (Kondo και συν., 1998⁻ Sugiura και συν., 1999a).



Εικόνα 1.10 Χημική δομή των ενδογενών κανναβινοειδών ΑΕΑ και 2-AG.

1.14 Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση των ενδοκανναβινοειδών

Η παραγωγή των ενδοκανναβινοειδών επάγεται από την αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων Ca²⁺, μετά από εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης ή από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδογέων νευροδιαβιβαστών. Το κύριο βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής ΑΕΑ ξεκινάει με την παραγωγή του πρόδρομου Ν-αραχιδονοϋλφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (NAPE) από μορίου ένα μόριο φωσφατίδυλοαιθανολαμίνης (PhosEA) και ένα μόριο φωσφατιδιλοχολίνης (PhosC), μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της ακυλοτρανσφεράσης. Η φωσφολιπάση D της Ν-ακυλο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (NAPE-PLD) θεωρείται το βασικό βιοσυνθετικό ένζυμο (Sugiura και συν., 1996), το οποίο υδρολύει την NAPE σε AEA και φωσφατιδικό οξύ. Πρόσφατα δεδομένα ωστόσο προτείνουν και την α/β υδρολάση ως βιοσυνθετικό ένζυμο (Simon και Cravatt, 2006), καθώς και φωσφατάσες όπως η PTPN22 (Liu και συν., 2006). Υπάρχουν και άλλα δευτερεύοντα μονοπάτια βιοσύνθεσης της ΑΕΑ που παρουσιάζονται συνοπτικά στη Εικόνα 1.13. Η 2-AG παράγεται από την λιπάση της διακυλογλυκερόλης (diacylglycerol lipase, DAGL), που μετατρέπει τις διακυλογλυκερόλες σε μονοακυλογλυκερόλες, περιλαμβανομένης και της 2-AG (Bisogno και συν., 2003). Συγκεκριμένα, μέσω της δράσης της PLC παράγεται τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και διακυλογλυκερόλη (DAG) από phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). Η DAGL δρα μετατρέποντας την DAG σε 2-AG. Εναλλακτικά μονοπάτια σύνθεσης της 2-AG παρουσιάζονται συνοπτικά στη Εικόνα 1.13.

Τα ενδοκανναβινοειδή, αφού σχηματιστούν και ασκήσουν τις δράσεις τους, θα πρέπει να αποικοδομηθούν. Η ΑΕΑ προσλαμβάνεται από τη συναπτική σχισμή από νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα, είτε με ειδικό μηχανισμό πρόσληψης μέσω μεταφορέα υψηλής συγγένειας, του μεμβρανικού μεταφορέα ανανδαμιδίου (AMT) (Beltramo και συν., 1997), είτε με απλή διάχυση. Αφού εισέλθει εντός του κυττάρου, αποικοδομείται κυρίως από την υδρολάση των αμιδίων των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Amid Hydrolase, FAAH) σε αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη. Αντίστοιχα, η 2-AG προσλαμβάνεται και μεταφέρεται εντός του κυττάρου είτε μέσω του AMT είτε μέσω άλλου μεταφορέα (Wang και συν, 2007) και υδρολύεται κυρίως από τη λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (Monoacylol Glycerol Lipase, MGL) και σε πολύ μικρότερο βαθμό από την FAAH απελευθερώνοντας γλυκερόλη και αραχιδονικό οξύ (Blankman και συν., 2007). Ωστόσο έχουν ενοχοποιηθεί και άλλα ένζυμα στην αποικοδόμηση των ενδοκανναβινοειδών, όπως η κυκλοξυγενάση-2 (COX-2) (Kozak και συν., 2000) και η λιποξυγενάση (LOX) (Yazulla και συν., 2008).



Εικόνα 1.11 Εναλλακτικές οδοί σύνθεσης των ενδοκανναβινοειδών ΑΕΑ και 2-ΑG. Αριστερά. Η φωσφολιπάση D της N-ακυλο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D, NAPE-PLD) θεωρείται το βασικό βιοσυνθετικό ένζυμο, το οποίο υδρολύει την Nαραχιδονοϋλφωσφατιδυλαιθανολαμίνη (N-acyl phosphatidylethanolamine, NAPE) σε ανανδαμίδιο και φωσφατιδικό οξύ. Εναλλακτικά, από τη ΝΑΡΕ σχηματίζεται φωσφορικό άλας ανανδαμιδίου (Anandamide Phosphate, AEA-P), μέσω της δράσης της φωσφολιπάσης C (phospholipase C, PLC), το οποίο υδρολύεται από τις φωσφατάσες PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22, πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης, τύπου μη-υποδοχέα 22) και SHIP1 (SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase, ινοσιτόλη-5- φωσφατάση που περιέχει SH2 περιοχές) για να σχηματίσει ανανδαμίδιο. Η φωσφολιπάση A2 (phospholipase A2, PLA2) μπορεί επίσης να υδρολύσει την NAPE, σχηματίζοντας lysoNAPE, που υδρολύεται στη συνέχεια από την λυσοφωσφολιπάση D (lysophospholipase D, LPLD) σχηματίζοντας ανανδαμίδιο. Μια τρίτη οδός βιοσύνθεσης της ΑΕΑ περιλαμβάνει την παραγωγή γλυκεροφωσφοανανδαμιδίου (glycerophospho-anandamide, GP-AEA), μέσω της δράσης του ενζύμου abhd4 (α/β-hydrolase domain 4, α/β-υδρολάση περιοχής 4), η οποία μετατρέπεται σε ανανδαμίδιο από την γλυκεροφωσφοδιεστεράση GDE1 (Glycerophosphodiesterase 1). <u>Δεξιά.</u> Τα βασικότερα βιοσυνθετικά ένζυμα της 2-AG θεωρούνται η λιπάση της διακυλογλυκερόλης (diacylglycerol lipase, DGL) και η PLC, η δράση των οποίων οδηγεί σε σχηματισμό διακυλογλυκερόλης (diacylglycerol, DAG) και στη συνέχεια 2-AG. Ωστόσο, η DAG μπορεί να σχηματιστεί επίσης από φωσφορικό οξύ (PA) που προέρχεται από τη δράση της φωσφολιπάσης D (phospholipase D, PLD). Επιπλέον, η δράση του ενζύμου φωσφολιπάση A1 (phospholipase A1, PLA1) οδηγεί στο σχηματισμό λυσοφωσφολιπιδίου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή 2-AG είτε άμεσα, μέσω της δράσης της λυσοφωσφολιπάση C (LPLC), είτε έμμεσα, μέσω των ενζύμων λυσοφωσφολιπάση D (LPLD) και LPLC. Ωστόσο, η υδρόλυση του PA από την PLA1 μπορεί επίσης να οδηγήσει στην παραγωγή 2-AG, μέσω του ενδιάμεσου μορίου 2-AG-3-phosphate (3-φωσφορική 2-AG), το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται από τα ένζυμα φωσφατάση και LPLC (Πηγή: Alexander και Kendall, 2009).



Εικόνα 1.12 Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων αντιδράσεων σύνθεσης και καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών ΑΕΑ και 2-AG (Πηγή: Rea και συν, 2007). 2-AG: 2-Arachidonoyl Glycerol, 2-αραχιδονόλγλυκερόλη, AEA: N-ArachinodoylEthnolAmine, Nαραχιδονοϋλαιθανολαμίνη, CB₁R: Cannabinoid Receptor 1, κανναβινοειδικός υποδοχέας 1, DAG: DiAcylglycerol, διακυλογλυκερόλη, DGL: Diacylglycerol lipase, λιπάση της διακύλογλυκερόλης FAAH: Fatty Acid Amide Hydrolase, υδρολάση των αμιδίων των λιπαρών οξέων, IP₃: Inositol 1,4,5trisphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη, MGL, Monoacylol Glycerol Lipase, λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης, NAPE: N-ArachidonoylPhosphatidylEthanolamine, N-αραχιδονοϋλφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, NAT: N-AcetylTransferase, N-ακετυλοτρανσφεράση, PhosC: PhosphatidylCholine, φωσφατιδιλοχολίνη, PhosEA: PhosphatidylEthanolAmine, φωσφατίδυλοαιθανολαμίνη, PIP2: PhosphatidylInositol 4,5-bisPhosphate, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PLC: PhosphoLipase C, φωσφολιπάση C, PLD: PhosphoLipase D, φωσφολιπάση D.

1.15 Κατανομή των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών στη σύναψη

Η κατανομή των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των ενδοκανναβινοειδών έχει μελετηθεί στο επίπεδο της σύναψης και έχει δώσει πολλές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δράσης των ενδοκανναβινοειδών. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αποικοδόμησης της 2-AG, MGL, εντοπίζεται στους προσυναπτικούς νευρώνες (Dinh και συν., 2002⁻ Gulyas και συν., 2004), ενώ το ένζυμο σύνθεσης της 2-AG, DAGL, εντοπίζεται μετασυναπτικά (Katona και συν, 2006⁻ Yoshida και συν, 2006). Δεδομένου ότι οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως προσυναπτικά, η 2-AG φαίνεται να δρα ως παλίνδρομος μηνυματοφόρος, καθώς παράγεται μετασυναπτικά, και δρα προσυναπτικά, όπου και αποικοδομείται. Πράγματι, υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που υποστηρίζουν την παλίνδρομη σηματοδότηση μέσω της 2-AG (Melis και συν, 2004⁻ Makara και συν, 2005⁻ Hashimotodani και συν, 2007, 2008).

Όσον αφορά την AEA, το ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση της, NAPE-PLD, εντοπίζεται κυρίως προσυναπτικά, ενώ έχει αναφερθεί και η ύπαρξη του σε δενδρίτες μετασυναπτικών κυττάρων (Egertova και συν., 2008[°] Nyilas και συν., 2008[°] Okamoto και συν., 2007). Το ένζυμο που ευθύνεται για την αποικοδόμηση της, FAAH, εντοπίζεται κυρίως μετασυναπτικά (Elphick και συν., 2001[°] Dinh και συν., 2002[°] Gulyas και συν., 2004), όπου εντοπίζονται και οι TRPV1 υποδοχείς, που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διαμεσολαβούν κάποιες από τις δράσεις των κανναβινοειδών και συγκεκριμένα της AEA (Puente και συν., 2011).

1.16 Το ενδογενές κανναβινοειδικό σύστημα στον αμφιβληστροειδή

Ο αμφιβληστροειδής διαθέτει ένα πλήρες και λειτουργικό ενδοκανναβινοειδικό σύστημα. Έχουν εντοπιστεί τόσο ενδογενείς προσδέτες των κανναβινοειδικών υποδοχέων (ενδοκανναβινοειδή) όσο και οι ίδιοι οι υποδοχείς, αλλά και τα υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των ενδοκανναβινοειδών ένζυμα σε αμφιβληστροειδή σπονδυλωτών, αν και ο ρόλος τους δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Συγκεκριμένα, τόσο η AEA (επίπεδα pmol/gr ιστού) όσο και η 2-AG (επίπεδα nmol/gr ιστού) έχουν εντοπιστεί σε αμφιβληστροειδείς επίμυων, βοοειδών αλλά και ανθρώπων (Bisogno και συν., 1999' Chen και συν., 2005' Straiker και συν., 1999b). Ανοσοϊστογημικές μελέτες ανοσοαποτύπωπης, μελέτες, μελέτες in situ υβριδοποίησης και μελέτες RT-PCR έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξακρίβωση της ύπαρξης και της κατανομής των κανναβινοειδικών υποδοχέων, καθώς και των υπεύθυνων για το μεταβολισμό των ενδοκανναβινοειδών ενζύμων στον αμφιβληστροειδή. Συγκεκριμένα, οι CB1 υποδοχείς έχουν εντοπιστεί σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης στις στιβάδες OPL και IPL, αλλά και σε δίπολα κύτταρα, ενώ η παρουσία τους στη GCL δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί (Porcella και συν., 1998[°] Shu-Jung Hu και συν., 2010[°] Buckley και συν., 1998[°] Yazulla και συν., 1999[°] Straiker και συν., 1999a). Ο Straiker και οι συνεργάτες του έκαναν λόγω και για ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό του CB1 σε ένα μικρό πληθυσμό βραχύινων κυττάρων σε αμφιβληστροειδή κοτόπουλου και χρυσόψαρου (Straiker και συν., 1999a). Υπάρχει επίσης μια αναφορά για παρουσία του CB1 στα κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδή χρυσόψαρου (Yazulla και συν., 2000).

Όσον αφορά τον CB2 υποδοχέα, η πρώτη μελέτη που υποστηρίζει την ύπαρξη του mRNA του στον αμφιβληστροειδή ενήλικα επίμυ, κάνει λόγο για εντοπισμό του

CB2 mRNA στις στιβάδες GCL και INL, όπως και στα εσωτερικά τμήματα των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων (Lu και συν., 2000). Σε αντίθεση με την παραπάνω έρευνα βρίσκονται οι έρευνες του Porcella και των συνεργατών του, οι οποίες υποστηρίζουν απουσία του CB2 mRNA από τον αμφιβληστροειδή επίμυ και ανθρώπου (Porcella και συν., 1998, 2000). Όσον αφορά την παρουσία του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών σε επίπεδο πρωτεΐνης, ανοσοϊστοχημικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη του CB2 υποδοχέα σε οριζόντια, βραχύινα, γαγγλιακά και φωτοϋποδεκτικά κύτταρα αμφιβληστροειδούς επίμυων (López και συν., 2011). Ωστόσο, η εκλεκτικότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες των López και συν. αμφισβητήθηκε πρόσφατα από την ομάδα των Cécyre και συν. (2014). Η εν λόγω ομάδα χρησιμοποίησε μελέτες ανοσοϊστοχημείας και μελέτες ανοσοαποτύπωσης για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας διαφόρων αντισωμάτων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για τον εντοπισμό του CB2 υποδογέα. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής προτείνουν ότι μόνον ένα από τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι εκλεκτικό για τον CB2 υποδοχέα ενώ τα υπόλοιπα παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλή εκλεκτικότητα (Cécyre και συν., 2014). Η ίδια ομάδα, με χρήση ανοσοϊστοχημικών μελετών, έδειξε την ύπαρξη του CB2 υποδοχέα σε όλες τις ομάδες νευρώνων του αμφιβληστροειδούς αγρίου τύπου μυών αλλά όχι CB2-/- μυών που στερούνται τον υποδοχέα (Cécyre και συν., 2013).

Τέλος, μελέτες ανοσοαποτύπωσης και διπλού ανοσοφθορισμού υποστηρίζουν την έκφραση του CB2 υποδοχέα στα κύτταρα Müller αμφιβληστροειδή πρωτευόντων (Bouskila και συν 2013), αλλά και σε επίπεδο mRNA, με χρήση RT-PCR και ανοσοαποτύπωσης, σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων Müller (Krishnan and Chatterjee, 2012).

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη του ενζύμου FAAH στον ιστό του αμφιβληστροειδούς προέκυψαν μέσω μελετών που υποστήριζαν την ικανότητα υδρόλυσης της AEA στον αμφιβληστροειδή (Matsuda και συν., 1997⁻ Bisogno και συν., 1999⁻ Glaser και συν., 2005). Η FAAH φαίνεται να εκφράζεται σε μεγάλη έκταση στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών. Συγκεκριμένα, ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει την έκφραση της FAAH σε γαγγλιακά κύτταρα, οριζόντια κύτταρα, κύτταρα Müller, εσωτερικά τμήματα φωτοϋποδεκτικών κυττάρων, καθώς και δύο ομάδες βραχύινων κυττάρων, ντοπαμινεργικά και χολινεργικά βραχύινα κύτταρα (Hu και συν., 2010⁻ Yazulla και συν., 1999). Το υπεύθυνο για τον καταβολισμό της 2-AG

Εισαγωγή 30

ένζυμο, MGL, φαίνεται να εκφράζεται κυρίως στις στιβάδες IPL και OPL (Hu και συν., 2010), ενώ το υπεύθυνο για τη σύνθεση της ένζυμο DAGL, εντοπίζεται κυρίως στις μετασυναπτικές απολήξεις των δίπολων κυττάρων που συνδέονται με κωνία (Hu και συν., 2010). Για το ένζυμο σύνθεσης της AEA, NAPE-PLD, δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που να παρέχουν στοιχεία για την ακριβή έκφραση του στον αμφιβληστροειδή. Ωστόσο, μια έρευνα δείχνει ότι το NAPE-PLD συνεντοπίζεται με τον TRPV1 υποδοχέα, στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων κατά την ανάπτυξη (Maione και συν., 2009).

1.17 Μεταγωγή σήματος μέσω ενεργοποίησης των CB1 και CB2 υποδοχέων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι κανναβινοειδικοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων GPCRs. Η αναστολή των μονοπατιών μεταγωγής σήματος, που επάγονται από την ενεργοποίηση των CB1 και CB2, από την τοξίνη του κοκκύτη, μαρτυρά ότι οι πρωτεΐνες που συζεύγνυνται με τους εν λόγω υποδοχείς ανήκουν στην κατηγορία των Gi/o πρωτεϊνών (Howlett και συν., 1986⁻ Felder και συν., 1995). Όμως, παρόλο που οι CB1 και CB2 ανήκουν στην ίδια κατηγορία υποδοχέων, δεν ενεργοποιούν τα ίδια μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, οι CB2 δεν αλληλεπιδρούν ή αλληλεπιδρούν ασθενώς με διαύλους ιόντων, ενώ οι CB1 αλληλεπιδρούν με μία ποικιλία διαύλων ιόντων (Felder και συν., 1995). Ο CB1 υποδοχέας, έχει βρεθεί ότι συνδέεται με την αναστολή των N,P,Q και L διαύλων Ca²⁺ και την ενεργοποίηση των A καναλιών K⁺ (Caulfield και συν., 1992⁻ Mackie and Hille, 1992⁻ Mackie και συν., 1995).

Η ρύθμιση του μεμβρανικού ενζύμου αδενυλική κυκλάση (AC) αποτελεί μία από τις πιο γνωστές και μελετημένες δράσεις των κανναβινοειδών (Howlett, 1984). Η ενεργοποίηση των κανναβινοειδικών υποδοχέων οδηγεί σε αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, όπως έχει δειχθεί σε μία σειρά πειραμάτων τόσο σε νευρικά κύτταρα που εκφράζουν τον CB1, όσο και σε λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον CB2. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο βγ, που απελευθερώνεται μετά την ενεργοποίηση της G_i πρωτεΐνης, ενώνεται με την υπομονάδα α-GTP της Gs, η οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την AC. Έτσι αναστέλλεται η ενεργοποίηση της AC που διαμεσολαβείται από την α_s υπομονάδα. Αναστολή της ενεργοποίησης της AC οδηγεί σε ελάττωση της παραγωγής του κυκλικού AMP (cAMP). Το cAMP αποτελεί δεύτερο μηνυματοφόρο μόριο, που δρα σαν αλλοστερικός τροποποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Η ενεργοποιημένη κινάση με τη σειρά της φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα (κινάσες, φωσφατάσες, υποδοχείς, διαύλους ιόντων, μεταγραφικούς παράγοντες κλπ.), οδηγώντας είτε στην ενεργοποίησή τους είτε στην απενεργοποίησή τους. Η ελάττωση της παραγωγής του cAMP που διαμεσολαβείται από τα κανναβινοειδή προκαλεί τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της PKA. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν την ενεργοποίηση της AC από τους κανναβινοειδικούς υποδοχείς, μέσω αλληλεπίδρασης τους με G_s πρωτεΐνες (Bonhaus και συν., 1998). Επιπλέον, η ισομορφή της AC που εκφράζεται από συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στο αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των CB1. Για παράδειγμα, η ωχρά σφαίρα περιέχει mRNA που κωδικεύει την ισομορφή AC-II (Furuyama και συν., 1993) και στην περιοχή αυτή βρέθηκε ότι ενεργοποίηση των CB1 προκαλεί αύξηση του cAMP

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστό ότι οι GPCRs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν διμερή ή ολιγομερή (Gomes και συν, 2001), αλλά και μέλη των GPCRs που ανήκουν σε διαφορετική οικογένεια είναι δυνατό να αλληλεπιδράσουν και να δώσουν ετεροδιμερή ή ετεροπολυμερή. Το αποτέλεσμα είναι ότι το σύμπλοκο έχει μοναδικές ιδιότητες, εντελώς διαφορετικές από αυτές των μονομερών που το συνθέτουν και έτσι αυξάνεται η ποικιλία των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται. Για παράδειγμα, συνύπαρξη και ταυτόχρονη ενεργοποίηση των CB₁ και D₂ υποδοχέων στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό οδηγεί σε μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση και η συνακόλουθη δημιουργία ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ των CB₁ και D₂ υποδοχέων, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται πρωτεΐνη Gs και να αυξάνεται το cAMP (Glass και συν., 1997). Φαίνεται ότι και οι CB1 είναι ικανοί να δημιουργήσουν ομο- ή ετεροδιμερή *in vivo*, όπως δείχθηκε με χρήση ανοσοϊστοχημείας (Wager-Miller και συν., 2002).

Η ενεργοποίηση των κανναβινοειδικών CB1 και CB2 υποδοχέων οδηγεί επίσης και σε ρύθμιση ενδοκυτταρικών κινασών, που επάγουν επιβίωση. Συγκεκριμένα, ενεργοποίηση του CB1 οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK) (Derkinderen και συν., 1996, 2001[°] Karanian και συν., 2005a), και των κινασών ERK1/2, p38-MAPK και JNK, σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (Bouaboula και συν., 1996[°] Wartmann και συν., 1995). Η ενεργοποίηση των ERK1/2 από τον CB1 μπορεί να εμπλέκει μια σειρά από διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα η ενεργοποίηση της κινάσης PI3K (Galve-Roperh και συν., 2002[°]

Εισαγωγή 32

Wartmann και συν., 1995[•] Liu και συν., 2000) ή η αναστολή της AC (Davis και συν., 2003). Η ενεργοποίηση των CB1 και CB2 εμπλέκεται επίσης στην ενεργοποίηση τόσο της PLC όσο και του μονοπατιού ενεργοποίησης των PI3K/Akt (Bouaboula και συν., 1995[•] Gomez del Pulgar και συν., 2000[•] Sanchez και συν., 2003). Η ενεργοποίηση των CB2, απ' την άλλη μεριά, φαίνεται να επάγει την ενεργοποίηση του κεραμιδίου, ενός παράγωγου υδρόλυσης της σφιγγομυελίνης, που φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την απόπτωση (Howlett και συν., 2004).

1.18 Κανναβινοειδή ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες

Οι θεραπευτικές δράσεις του φυτού της κάνναβης ήταν γνωστές εδώ και χιλιάδες χρόνια, όπου και χρησιμοποιούνταν ως αναλγητικό, αντισπασμωδικό, αντιεπιληπτικό, υπνωτικό και αντιεμετικό. Σήμερα, πολλά συνθετικά κανναβινοειδή, αλλά και ανταγωνιστές των κανναβινοειδικών υποδοχέων και των ενζύμων του μεταβολισμού τους, έχουν αναπτυχθεί με στόχο τη μελέτη των φυσιολογικών καθώς και των νευροπροστατευτικών δράσεων του κανναβινοειδικού συστήματος. Τα τελευταία χρόνια πληθώρα μελετών έχουν δημοσιευτεί, όπου κάνουν λόγο για τις νευροπροστατευτικές δράσεις συνθετικών, ενδογενών κανναβινοειδών και φυτοκανναβινοειδών σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ.

Μελέτες δείχνουν ότι τα κανναβινοειδή παρέχουν προστασία σε ιστούς του ΚΝΣ, σε πειραματικά μοντέλα διεγερσιτοξικότητας. Πειράματα σε καλλιέργειες νευρώνων ιπποκάμπου επίμυων έδειξαν ότι η χορήγηση των συνθετικών κανναβινοειδών WIN55212-2, WIN55212-3 και CP55940 προστάτευσε τους διεγερσιτοξικότητα επαγόμενη από (NMDA νευρώνες από την NMDA διεγερσιτοξικότητα) (Shen και Thayer, 1998). Επίσης, το μη ψυχοδιεγερτικό κανναβινοειδές HU-211 παρείχε προστασία από NMDA διεγερσιτοξικότητα, σε κυτταροκαλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων (Nadler και συν., 1993 Eshhar και συν., 1993). Σε τομές εγκεφαλικού ιστού επίμυ, η χορήγηση ΑΕΑ ή HU-210 προκάλεσε μείωση της απελευθέρωσης Ca²⁺ που προκλήθηκε από ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων, ενώ αυτή η δράση αναστάλθηκε παρουσία αντίστροφου αγωνιστή του CB1 υποδοχέα SR141716A (Hampson και συν., 1998). Σε πιο πρόσφατη μελέτη, τα ενδογενή κανναβινοειδή AEA και 2-AG αύξησαν τη βιωσιμότητα φλοιϊκών κυττάρων, που είχαν υποστεί χημική ισχαιμία, παρ'όλο που αυτές οι επιδράσεις δεν αναιρέθηκαν παρουσία ανταγωνιστών των CB1 και CB2 υποδογέων (Sinor και συν.,

2000). H AEA φαίνεται επίσης να προστατεύει τον εγκεφαλικό ιστό από διεγερσιτοξικότητα, προκαλούμενη μέσω έγχυσης αναστολέα της αντλίας Na⁺/K⁺-ATPάσης, στο ραβδωτό σώμα επίμυων, όταν χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά, ενώ αυτή η δράση δεν αναστέλλεται παρουσία του αντίστροφου αγωνιστή του CB1 υποδοχέα (SR141716A) (van der Stelt και συν., 2001). Οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών έχουν μελετηθεί και αναδειχθεί και σε περιπτώσεις πολύ σοβαρών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι η νόσος Alzheimer, η νόσος Huntington και η νόσος Parkinson (Carroll και συν., 2004, 2012[°] Chung και συν., 2001[°] Wade και συν., 2004[°] Collin και συν., 2007[°] Krishnan και συν., 2009[°] Baty και συν., 2008[°] Price και συν., 2009[°] van der Stelt και συν., 2005).

Αν και οι βιβλιογραφικές αναφορές για το ρόλο των κανναβινοειδών στην παθοφυσιολογία και νευροπροστασία του εγκεφάλου είναι πολυάριθμες, δεν ισχύει το ίδιο και με αυτές που αναφέρονται στο ρόλο τους στην παθοφυσιολογία και νευροπροστασία του αμφιβληστροειδούς. Υπάρχουν ωστόσο στοιχεία που υποστηρίζουν τη νευροπροστατευτική δράση των κανναβινοειδών σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης, σε πειραματικά μοντέλα γλαυκώματος, μετά από χορήγηση των συνθετικών κανναβινοειδών CP-55,940 και WIN-55,212-5, η οποία αναστέλλεται παρουσία του αναστολέα του CB1 υποδοχέα SR141716A (Pate και συν., 1998' Song και συν., 2000). Επιπλέον, τα φυτοκανναβινοειδή Δ^9 -THC και CBD φαίνεται να προστατεύουν τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, σε in vivo μοντέλο NMDA- τοξικότητα (El Remessy και συν., 2003). Τέλος, πρόσφατη έρευνα των Nucci και συν. (2007) υποστηρίζει τις νευροπροστατευτικές δράσεις του συνθετικού κανναβινοειδούς R-μεθανανδαμιδίου (MethAEA) σε ένα μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ισχαιμία φαίνεται να προκαλεί αύξηση της δράσης του ενζύμου FAAH, μείωση των επιπέδων AEA και μείωση της έκφρασης των υποδοχέων CB1 και TRPV1 στον ιστό. Επιπλέον, η μείωση της βιωσιμότητας των γαγγλιακών κυττάρων που παρατηρείται σε αυτό το μοντέλο, αντιστρέφεται παρουσία του συνθετικού κανναβινοειδούς MethAEA (Nucci και συν., 2007).

Τα παραπάνω αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος των μελετών που αναδεικνύουν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών σε διάφορες δομές του ΚΝΣ. Ωστόσο, σε σύγκριση με τον εγκέφαλο, οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον ιστό του αμφιβληστροειδούς δεν έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τον αμφιβληστροειδή στοχεύουν στη μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των κανναβινοειδών στη βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων. Παρ'όλα αυτά, τα βραχύινα (Siliprandi και συν., 1992. Osborne και Herrera, 1994. Osborne και συν., 1995a,b. Barber και συν., 1998' Kapin και συν., 1999' Mastrodimou και συν., 2005' Gastinger και συν., 2006) και τα οριζόντια κύτταρα (Kuroiwa και συν., 1999' Rábl και συν., 2002) φαίνεται ότι επηρεάζονται κατά τα πρώιμα στάδια των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών και θεωρούνται σημαντικοί κυτταρικοί τύποι στην παθοφυσιολογία του αμφιβληστροειδούς. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ανάδειξης των νευροπροστατευτικών δράσεων των συνθετικών και ενδογενών κανναβινοειδών σε ομάδες βραχύινων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς.

Η ανάδειξη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης των κανναβινοειδών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς αλλά και στον ιστό γενικότερα θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική γνώση για τη δημιουργία κατάλληλων σχημάτων που θα στοχεύουν στην αντιμετώπιση σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών είτε στα πρώιμα ή στα τελικά στάδια των νόσων.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:</u>

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όλο όσα προαναφέρθηκαν καθιστούν σαφές ότι τα κανναβινοειδή αναδεικνύονται ολοένα και πιο ενδιαφέροντα για περαιτέρω μελέτη, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως θεραπευτικές προσεγγίσεις στην αγωγή ασθενών που πάσχουν από σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες. Η πλειονότητα των προσεγγίσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την αποτελεσματική θεραπεία σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών στοχεύουν κυρίως στη νεοαγγείωση και όχι στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την ισχαιμία. Επιπλέον, η πλειονότητα των μελετών που αφορούν στη νευροπροστατευτική δράση των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή στοχεύουν στη διευκρίνιση του ρόλου των εν λόγω μορίων στην προστασία των γαγγλιακών κυττάρων. Ωστόσο όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, τόσο τα βραχύινα (Siliprandi και συν., 1992. Osborne και Herrera, 1994 Osborne και συν., 1995a,b Barber και συν., 1998 Kapin και συν., 1999' Mastrodimou και συν., 2005' Gastinger και συν., 2006) όσο και τα οριζόντια κύτταρα (Kuroiwa και συν., 1999' Rábl και συν., 2002) φαίνεται ότι επηρεάζονται κατά τα πρώιμα στάδια των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών και θεωρούνται σημαντικοί κυτταρικοί τύποι στην παθοφυσιολογία του αμφιβληστροειδούς.

Ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διαλεύκανση της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής δράσης των κανναβινοειδών και των αναστολέων της αποικοδόμησης τους σε δύο τύπους βραχύινων κυττάρων (χολινεργικά και κύτταρα που εκφράζουν bNOS) σε αμφιβληστροειδή τρωκτικών, καθώς και οι μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις δράσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Η μελέτη επικεντρώνεται:

- A) στην έρευνα της νευροπροστατευτικής δράσης των συνθετικών κανναβινοειδών HU-210 και MethAEA και των ενδοκανναβινοειδών AEA και 2-AG σε ένα in vivo μοντέλο αμφιβληστροειδικής AMPA διεγερσιτοξικότητας
- B) στην έρευνα της εμπλοκής των κανναβινοειδικών υποδοχέων CB1 και CB2, καθώς και του TRPV1 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδικών μορίων
- Γ) στη μελέτη της εμπλοκής των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt και ERK1/2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις που παρατηρούνται κατά την ενεργοποίηση του κανναβινοειδικού συστήματος
- Δ) στη μελέτη της εμπλοκής αποπτωτικών μηχανισμών στις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA
- E) στη μελέτη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών, καθώς και της πιθανής συνεργιστικής νευροπροστατευτικής δράσης των εν λόγω αναστολέων όταν χορηγούνται μαζί με κανναβινοειδή

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:</u>

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας σύμφωνα με τους Kiagiadaki και Thermos (2008) για τη μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των κανναβινοειδών σε αμφιβληστροειδή τρωκτικών. Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες Sprague-Dawley επίμυες, βάρους 220-350 γραμμαρίων και ηλικίας 2 έως 3 μηνών. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης αγρίου τύπου C57/BL6J μύες και διαγονιδιακοί μύες που στερούνται των CB1 (Zimmer και συν., 1999), CB2 (Buckley και συν., 1999) ή Akt2 (Cho και συν., 1999) (C57/BL6J) (CB1^{-/-} και CB2^{-/-}, Akt2^{-/-}, αντίστοιχα), βάρους 22-30 γραμμαρίων και ηλικίας 2 έως 3 μηνών. Τα ζώα διέμεναν (2-3 ζώα/κλωβό) σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 22±2 °C, φωτοπερίοδο 12 ωρών και ad libitum πρόσβαση σε νερό και τροφή. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τις ελληνικές διατάξεις (Animal Act., P.D. 160/91) και τις διατάξεις της εταιρείας ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) για τη χρήση πειραματοζώων στην έρευνα της φαρμακολογίας.

3.2 Ενδοφθάλμια χορήγηση ουσιών

Για την ενδοφθάλμια χορήγηση τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης (100mg/kg) και ξυλαζίνης (14.55mg/kg) και τοποθετήθηκαν σε συσκευή στερεοταξικής χειρουργικής, με σκοπό τη σταθεροποίηση της κεφαλής. Για τις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις χρησιμοποιήθηκαν βελόνες 27 ή 30G (για επίμυες και μύες, αντίστοιχα) συνδεδεμένες μέσω ενός λεπτού σωλήνα πολυαιθυλενίου με σύριγγα Hamilton, προσαρμοσμένη σε κατάλληλη αντλία σταθερής ροής (mini pump, CMA Microdialysis Ltd). Κάθε έγχυση πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή της βελόνας πίσω από το όριο μεταξύ σκληρού και κερατοειδούς χιτώνα, μέσα στο υαλώδες σώμα του οφθαλμού. Κάθε ζώο έλαβε δύο διαφορετικές αγωγές, μία σε κάθε οφθαλμό. Η ροή των ουσιών ήταν σταθερή (1μl/min), διαρκούσε 5 min για τους επίμυες και 2 min για τους μύες, οπότε κάθε οφθαλμός έλαβε 5 ή 2μl, αντίστοιχα, του εκάστοτε διαλύματος. Οι ενδοϋαλοειδικές χορηγήσεις χρησιμοποιήθηκαν σε μια σειρά από πειραματικές μελέτες, όπως αυτές παρουσιάζονται παρακάτω.

3.2.1 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης συνθετικών και ενδογενών κανναβινοειδών σε αμφιβληστροειδή επίμυων και μυών

Οι οφθαλμοί επίμυων χωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες:

Ομάδα ελέγχου

Στους οφθαλμούς μάρτυρες χορηγήθηκε **PBS** 50mM (phosphate-buffered saline 50mM K2HPO4/NaH2PO4, 0.9% NaCl, pH 7.4).

Ομάδα διεγερσιτοξικότητας

Για την πρόκληση διεγερσι-τοξικότητας, στους οφθαλμούς επίμυων χορηγήθηκε 42nmol/οφθαλμό του διεγερτικού αμινοξέος (RS)-a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA, Tocris), ενώ στους μύες η δόση του AMPA ήταν 21nmol/οφθαλμό.

Ομάδα νευροπροστασίας

Για τις μελέτες νευροπροστασίας, συν-χορηγήθηκε AMPA (42nmol/οφθαλμό) με συνθετικά ή ενδογενή κανναβινοειδή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις:

Συνθετικά κανναβινοειδή	Ενδογενή κανναβινοειδή
HU-210 (Tocris, CB1/CB2 αγωνιστής, 10 ⁻⁹ ,	Ανανδαμίδιο (ΑΕΑ, CB1/CB2
10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M)	μερικός αγωνιστής 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ ,
	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ M)
Μεθανανδαμίδιο (MethAEA, Cayman,	2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη (2-AG,
CB1/CB2 αγωνιστής, 10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁵ M)	CB1 αγωνιστής, Cayman, 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ ,
	10 ⁻⁵ M)
JHW015 (CB2 αγωνιστής, Cayman, 10^{-7} ,	
10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ M)	

Ενδοβολβικές εγχύσεις PBS, AMPA (21nmoles ανά οφθαλμό) ή AMPA + 2-AG (10⁻⁷ M) πραγματοποιήθηκαν σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακούς CB1^{-/-}, CB2^{-/-} και Akt2^{-/-} μύες.

3.2.2 Μελέτη της επίδρασης του μη-NMDA αναστολέα DNQX στις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Για τη διερεύνηση του κατά πόσον οι επιπτώσεις που παρατηρούνται στον αμφιβληστροειδή παρουσία AMPA οφείλονται πράγματι στην ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων, ο μη-NMDA αναστολέα DNQX (10⁻⁶ M) συν-χορηγήθηκε μαζί με AMPA.

3.2.3 Μελέτη της εμπλοκής των κανναβινοειδικών υποδοχέων CB1 και CB2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Για τη μελέτη της εμπλοκής των υποδοχέων CB1 και CB2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή, σαν πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιήσαμε τη συν-χορήγηση AMPA με HU-210 (10⁻⁷ M) ή AEA (10⁻⁷ M) ή MethAEA (10⁻⁷ M) ή 2-AG (10⁻⁷ M) και έναν ανταγωνιστή του CB1 ή του CB2 υποδοχέα (AM251 και AM630, αντίστοιχα, 10⁻⁶ M, Cayman).

3.2.4. Μελέτη της εμπλοκής του TRPV1 υποδοχέα των βανιλλοειδών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Η μελέτη της εμπλοκής του TRPV1 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών μελετήθηκε φαρμακολογικά με τη χρήση του ανταγωνιστή των TRPV1 υποδοχέων, καψαζεπίνη (capsazepine, 10⁻⁶ M, Tocris), ο οποίος συνχορηγήθηκε με AMPA παρουσία HU-210 (10⁻⁷ M) ή AEA (10⁻⁷ M) ή 2-AG (10⁻⁷ M). Η καψαζεπίνη (10⁻⁶ M) χορηγήθηκε επίσης απουσία AMPA. Ο αγωνιστής του TRPV1 υποδοχέα, καψαϊκίνη (capsaicine, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M, Sigma), συν-χορηγήθηκε με AMPA και μελετήθηκαν οι νευροπροστατευτικές του δράσεις. 3.2.5 Μελέτη της εμπλοκής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στις νευροπροστατευτικές δράσεις που επάγονται από την ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Για τη μελέτη της εμπλοκής του PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών ως πρώτη προσέγγιση συνχορηγήθηκε AMPA με AEA (10⁻⁷ M) ή HU-210 (10⁻⁷ M) ή 2-AG (10⁻⁷ M) μαζί με έναν αναστολέα του PI3K/Akt μονοπατιού (Wortmannin, 10⁻⁶ M), παρουσία ή απουσία του ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα AM251 (10⁻⁶ M).

3.2.6 Μελέτη της εμπλοκής της κασπάσης-3 στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται μετά τη χορήγηση AMPA στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Για να ερευνήσουμε το κατά πόσο ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρείται μετά από χορήγηση AMPA εμπίπτει σε αποπτωτικούς μηχανισμούς, αρχικά μελετήσαμε την πιθανή εμπλοκή της κασπάσης-3, συν-χορηγώντας AMPA μαζί με τον μη αντιστρεπτό αναστολέα της κασπάσης-3 Z-DEVD-FMK (Tocris, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M).

3.2.7 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Για τη μελέτη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης της αναστολής των υπεύθυνων για τον καταβολισμό των ενδοκανναβινοειδών ενζύμων, FAAH και MGL, συν-χορηγήθηκε AMPA μαζί με έναν αναστολέα της FAAH (AM6642, 10⁻⁵ M), ή με ένα διπλό αναστολέα των FAAH/MGL, (AM9928, 10⁻⁵ M), [ευγενική προσφορά του Καθηγητή κ. Αλέξανδρου Μακρυγιάννη, Center for Drug Discovery, Northeastern University, USA]

3.2.8 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών παρουσία εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων

Η αναστολή των ενζύμων FAAH ή/και MGL μειώνει τον καταβολισμό των ενδογενών κανναβινοειδών, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωσή τους στη σύναψη. Θέλοντας να ενισχύσουμε ακόμη περισσότερο τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών στη σύναψη, συν-χορηγήθηκαν συνθετικά και ενδογενή κανναβινοειδή μαζί με AMPA και τους αναστολείς των ενζύμων FAAH και FAAH/MGL. Συγκεκριμένα, συν-χορηγήθηκε AMPA με AM6642 (10⁻⁵ M), παρουσία AEA (10⁻⁷ M), ή HU-210 (10⁻⁷ M), ή MethAEA (10⁻⁷ M) και AMPA με AM9928 (10⁻⁵ M), παρουσία AEA (10⁻⁷ M), ή 2-AG (10⁻⁷ M), ή HU-210 (10⁻⁷ M), ή MethAEA (10⁻⁷ M).

Όλα τα κανναβινοειδή και οι ανταγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν διαλυτοποιήθηκαν σε 100% αιθανόλη στη συγκέντρωση των 10⁻² M και χωρίστηκαν σε μικρές ποσότητες των 10 μl (aliquots) οι οποίες φυλάχθηκαν στους -20°C. Τα DNQX και Z-DEVD-FMK διαλυτοποιήθηκαν σε 100% DMSO στη συγκέντρωση των 10⁻² M. Η επαναδιαλυτοποίηση τους στην επιθυμητή συγκέντρωση έγινε με PBS 50mM ώστε να ελαχιστοποιηθεί η συγκέντρωση της αιθανόλης ή του DMSO στο τελικό διάλυμα. Μια ομάδα ζώων έλαβε 5μl εκδόχου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης ή DMSO που χρησιμοποιήθηκε στα τελικά διαλύματα (0.01% αιθανόλη ή DMSO σε 50mM PBS). Η παρουσία αιθανόλης ή DMSO δεν είχε καμία δράση στον ιστό. Κάθε ζώο έλαβε μια έγχυση σε κάθε οφθαλμό.

3.3 Αφαίρεση, μονιμοποίηση και προετοιμασία ιστών για ανοσοϊστοχημικές μελέτες

Εικοσιτέσσερις (24) ώρες μετά τις ενδοφθάλμιες χορηγήσεις, τα ζώα θανατώθηκαν με εισπνοή διαιθυλαιθέρα, οι οφθαλμοί τους αφαιρέθηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (paraformaldehyde, PFA) σε 0.1M PB (phosphate buffer) για 45 λεπτά. Αφαιρέθηκε ο πρόσθιος πόλος (κερατοειδής χιτώνας, υδατοειδές υγρό και κρυσταλλοειδής φακός), ενώ ο οπίσθιος πόλος (σκληρός, χοριοειδής και αμφιβληστροειδής χιτώνας) μονιμοποιήθηκε στους 4 °C, για 1.5 ώρα σε διάλυμα 4% PFA σε 0.1M PB. Μετά τη μονιμοποιήθηκε στους 4 °C, για 1.5 ώρα σε διάλυμα 4% PFA σε 0.1M PB. Μετά τη μονιμοποίηση τους οι ιστοί επωάστηκαν για 16-18 ώρες σε διάλυμα 30% σακχαρόζης σε 0.1M PB για την επίτευξη κρυοπροστασίας. Ακολούθησε ταχεία ψύξη των ιστών με εμβύθιση τους σε ισοπεντάνιο για 1min στους -45 °C. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Για τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες ελήφθησαν διαδοχικές τομές πάχους 10μm με χρήση κρυοτόμου (Leica). Οι τομές διανεμήθηκαν

10 ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες κάθε σε έτσι ώστε αντικειμενοφόρος περιείχε ένα αντιπροσωπευτικό τμήμα του κεντρικού αμφιβληστροειδούς, συμπεριλαμβανομένου του οπτικού νεύρου.

3.4 Μελέτες ανοσοφθορισμού

Για την ανοσοϊστοχημική χρώση των κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς που επηρεάζονται από την χορήγηση του διεγερτικού αμινοξέος AMPA, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρωτογενή πολυκλωνικά αντισώματα:

Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραίωση	Κύτταρα στόχοι	Εταιρεία
bNOS (Brain nitric oxide synthetase,	Κουνέλι	1:2000	Βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν NOS	Sigma, St. Louis, MO
Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου)				
ChAT (Choline acetyl	Αίγα	1:300	Χολινεργικά	Biotrend,
transferase, Ακετυλο			βραχύινα κύτταρα	Cologne,
τρανσφεράση της				Germany
χολίνης)				
calbindin	Κουνέλι	1:1000	Οριζόντια κύτταρα	Millipore,
			και βραχύινα	Temecula,
			κύτταρα που	CA
			εκφράζουν την	
			πρωτεΐνη calbindin	

Οι μελέτες ανοσοφθορισμού, πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Αρχικά, οι τομές ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Trisbuffered saline, pH 7.4) και επωάστηκαν για 30 min σε 3.3% φυσιολογικό ορό αίγας (normal goat serum, NGS, για το bNOS αντίσωμα) ή σε 3.3% φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (normal donkey serum, NDS, για το ChAT αντίσωμα) σε 0.1M TBS, για αποφυγή της μη ειδικής δέσμευσης του δεύτερου αντισώματος. Έπειτα οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επωάστηκαν στο διάλυμα του πρωτογενούς

αντισώματος για 16-18 ώρες. Το πρωτογενές αντίσωμα διαλύθηκε σε διάλυμα 0.5% NGS ή NDS και 0.3% Triton X-100 σε 0.1M TBS. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με TBS και επώαση με το διάλυμα του δευτερογενούς φθορίζοντος αντισώματος για 1 ώρα [αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού, Alexa Fluor 546, σε αραίωση 1:400, Molecular Probes, για τα bNOS και calbindin και αντίσωμα γαϊδάρου έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κατσίκας, Alexa Fluor 546, σε αραίωση 1:400, Molecular Probes, για την ChAT]. Ακολούθησαν άλλα τρία ξεπλύματα με TBS και οι τομές καλύφθηκαν με μέσο κάλυψης φθορισμού (Ibidi, fluorescent mounting medium) και καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού.

3.5 Τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling)

Η τεχνική TUNEL είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον εντοπισμό της θρυμμάτισης του DNA, ως αποτέλεσμα αποπτωτικού ή μη κυτταρικού θανάτου. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παρουσία εγκοπών στο DNA, οι οποίες προκύπτουν λόγω του κυτταρικού θανάτου και εντοπίζονται από το ένζυμο δεοξυριβονουκλεοτιδική τρανσφεράση (deoxynucleotidyl transferase). Το ένζυμο αυτό καταλύει την προσθήκη κατάλληλα σημασμένων dUTPs, στα σημεία κοπής του DNA, ώστε αυτά να είναι ανιχνεύσιμα από μικροσκόπιο φθορισμού. Για τη χρώση TUNEL χρησιμοποιήθηκε σύστημα in situ ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red 12 156 792 910, Roche Diagnostics GmbH), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, οι τομές ξεπλύθηκαν δύο φορές με 0.1M PBS σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα επωάστηκαν στο διάλυμα αντίδρασης TUNEL για 1 ώρα, σε υγρό περιβάλλον και θερμοκρασία 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης οι τομές ξεπλύθηκαν με 0.1M PBS, καλύφθηκαν με χρήση καλυπτρίδας και μέσου κάλυψης φθορισμού και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού. Για την τεχνική TUNEL χρησιμοποιήθηκαν τομές από τις εξής ομάδες ζώων:

Επίμυες	Αγρίου τύπου μύες
Ομάδα ελέγχου (CTRL)	Ομάδα ελέγχου (CTRL)
AMPA	AMPA
AMPA + HU-210 (10 ⁻⁷ M)	AMPA + 2-AG (10 ⁻⁷ M)
$AMPA + AEA (10^{-7} M)$	
$AMPA + DNQX (10^{-6} M)$	
$AMPA + Z-DEVD-FMK (10^{-6} M)$	

3.6 Ιστολογικές μελέτες αιματοξυλίνης/ηωσίνης (Η/Ε) σε αμφιβληστροειδή επίμυων

Η χρώση Η/Ε πραγματοποιήθηκε για την μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ιστού και του πως αυτά μεταβάλλονται κατά τη χορήγηση AMPA ή AMPA + HU-210 (10⁻⁷ M). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που έφεραν τις προς χρώση τομές, εμβαπτίστηκαν σε 100% αιθυλική αλκοόλη για 2 λεπτά, ξεπλύθηκαν σε απιονισμένο νερό και εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα της αιματοξυλίνης (Sigma). Ακολούθησε ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και εμβάπτιση στο διάλυμα τις ηωσίνης (Sigma). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε διαδοχικά υδατικά διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης (70%, 80%, 95%, 100%) και τελικά σε ξυλένιο για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η αφυδάτωση των τομών. Οι τομές καλύφθηκαν με μέσω κάλυψης Endellan και καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

3.7 Μικροσκοπία

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις ανοσοϊστοχημικές και ιστολογικές μελέτες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού/οπτικό μικροσκόπιο και φακό 32x/0.45 (AxioVert.A1 με Zeiss LD A-Plan 32x/0.45; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) ή 40x/0.75 και 20x/0.5 (Axioskop with Plan-Neofluar x40/0.75; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Η ρύθμιση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

3.8 Μελέτες ποσοτικοποίησης

Για την ποσοτικοποίηση των bNOS- και ChAT-ανοσοδραστικών κυττάρων, οι υπό μελέτη τομές παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού και ο συνολικός αριθμός των ανοσοδραστικών νευρώνων μετρήθηκε σε κάθε υπό εξέταση τομή. Δεδομένου ότι δεν ήταν όλες οι τομές κατάλληλες για ποσοτικοποίηση (λόγω π.χ. αναδίπλωσης του ιστού), σε κάθε αντικειμενοφόρο μετρήθηκαν 3 έως και 6 τομές και συνολικά μετρήθηκαν τομές από τουλάχιστον 3 διαφορετικούς ιστούς για κάθε χειρισμό.

Για την ποσοτικοποίηση της calbindin ανοσοδραστικότητας οι υπό μελέτη αντικειμενοφόρες πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού και 3 φωτογραφίες ελήφθησαν από 3 διαφορετικές τομές (σύνολο 9 φωτογραφίες για κάθε αντικειμενοφόρο). Η ποσοτική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας φωτογραφίες από την ίδια περιοχή των υπό μελέτη ιστών (κεντρικός αμφιβληστροειδής). Η περιοχή από την εγγύς INL έως και την OPL οριοθετήθηκε με χρήση του ελευθέρας χρήσεως λογισμικού ImageJ 1.44 (Schneider και συν., 2012). Η μέση τιμή του γκρι (Mean Gray Value) [ολοκληρωμένη πυκνότητα – Integrated density (πυκνότητα φθορισμού fluorescence density) / οριοθετημένη περιοχή] της περιοχής αυτής μετρήθηκε σε κάθε φωτογραφία. Τρεις διαφορετικοί ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αγωγή. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των ανοσοϊστοχημικών μελετών εκφράστηκαν επί τις εκατό του CTRL (100%).

Για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων των ιστολογικών μελετών, οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο και φακό 32x/0.45 (AxioVert.A1 με Zeiss LD A-Plan 32x/0.45; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) και φωτογραφίες ελήφθησαν από τον ίδιο φακό. Η ποσοτική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας φωτογραφίες από την ίδια περιοχή των υπό μελέτη ιστών (κεντρικός αμφιβληστροειδής). Το μήκος του ιστού από την άπω ONL έως και την GCL μετρήθηκε με τη χρήση του ελευθέρας χρήσεως λογισμικού ImageJ 1.44 (Schneider και συν., 2012). Τρεις έως εφτά ιστοί μετρήθηκαν για την κάθε χειρισμό. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των ιστολογικών μελετών εκφράστηκαν επί τις εκατό του CTRL (100%).

Για την ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL οι τομές παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού και φακό 32x/0.45 (AxioVert.A1 με Zeiss LD A-Plan 32x/0.45; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) και φωτογραφίες ελήφθησαν από τον ίδιο φακό. Δύο (2) φωτογραφίες ελήφθησαν από 2 διαφορετικές τομές (σύνολο 4 φωτογραφίες για κάθε αντικειμενοφόρο) κάθε αντικειμενοφόρου, από την ίδια περιοχή των υπό μελέτη ιστών (κεντρικός αμφιβληστροειδής). Ο συνολικός αριθμός των σημασμένων κυττάρων μετρήθηκε με χρήση του λογισμικού ImageJ 1.44 (Schneider και συν., 2012). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως TUNEL-θετικά κύτταρα ανά 100μm ιστού.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση αναλύθηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) χρησιμοποιώντας one-way ANOVA με Tukey post hoc ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκε επίσης η στατιστική ανάλυση, student t-test, για τη σύγκριση δύο ομάδων μεταξύ τους, ενώ two-way ANOVA χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από τα πειράματα σε μύες αλλά και για τη σύγκριση της μεταβολής της χρώσης TUNEL και του πάχους του ιστού στις διαφορετικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± S.E.M) όλων των τιμών σε κάθε διαφορετική ομάδα.

3.9 Μελέτες δέσμευσης

3.9.1 Παρασκευή μεμβρανών αμφιβληστροειδή

Φυσιολογικοί ενήλικες Sprague-Dawley επίμυες, θανατώθηκαν και οι αμφιβληστροειδείς τους απομονώθηκαν μηχανικά και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή (Polytron, Ultra-Turrax, IKA Works) σε ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (50mM Tris-HCl, 2.5mM EDTA, 5mM MgCl₂, pH 7.4). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 27000 rpm στους 4 °C για 20 min. Το ίζημα συλλέχθηκε, επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα επώασης και ακολούθησαν άλλες δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με τελικό στόχο την απομόνωση των αμφιβληστροειδικών μεμβρανών.

3.9.2 Μέτρηση της δέσμευσης του [3H]CP55940 στους υποδοχείς CB1 και CB2

Έχοντας ως στόχο τη διευκρίνιση της ύπαρξης των CB1 και CB2 υποδοχέων αμφιβληστροειδή, πραγματοποιήθηκαν μελέτες στον υγιή δέσμευσης χρησιμοποιώντας το ραδιενεργό [³H]CP55940, που προσδένεται με την ίδια συγγένεια στους CB1 και CB2 υποδοχείς. Το [³H]CP55940 [124Ci/mmol (0,5 και 1nM), Perkin Elmer] επωάστηκε με μεμβρανικά παρασκευάσματα αμφιβληστροειδούς (70μg) για 90 λεπτά στους 30°C, σύμφωνα με τη μελέτη των Khanolkar και συν. (1996) και Antoniou και συν. (2005). Έπειτα, εξετάστηκε η ικανότητα των CB1 και CB2 ανταγωνιστών, AM251 και AM630 (10⁻⁶ M), αντίστοιχα, να συναγωνιστούν για την ειδική δέσμευση του [³H]CP55940 στους CB1 και CB2 υποδοχείς. Η ειδική δέσμευση προσδιορίστηκε παρουσία του CB1/CB2 κανναβινοειδικού αγωνιστή WIN 55,212-2 (10⁻⁵M, Tocris).

3.10 Μελέτες ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot analysis)

3.10.1 Παρασκευή πρωτεϊνικών δειγμάτων

Τα ζώα θανατώθηκαν και ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποκολλήθηκε από τον οπίσθιο πόλο του οφθαλμού. Κάθε αμφιβληστροειδής ομογενοποιήθηκε μηχανικά σε 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης [lysis buffer, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.1% DOC, 0.1mM PMSF, μείγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (Thermo Sci., Waltham, MA USA)] και φυγοκεντρήθηκε στα 10000g 20 4°C. min То συλλέγθηκε για στους υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη, όπου και επωάστηκε στους -20 °C over night. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 10000g για 20 min στους 4 °C και το υπερκείμενο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε Laemmli sample buffer (4% SDS, 20% γλυκερόλη, 10% 2μερκαπτοαιθανόλη, 0.004% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0.125 M Tris-HCl). Για την αποφυγή δημιουργίας ενδομοριακών και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών, σε κάθε δείγμα προστέθηκε DTT (DiThioThreitol, Διθειοθρεϊτόλη 0.1 M) και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 10 min στους 70-75 °C σε υδατόλουτρο.

3.10.2 Κάθετη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis). Τα δείγματα φορτώθηκαν στο πήκτωμα επιστίβαξης [Stacking gel: 0.1 M TRIS-HCl pH 6.8, 4% ακρυλαμίδιο, 0.1% SDS, 0.1% TEMED, 0.1% APS), παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer, 2.5mM TRIS-HCl pH 8.3, 0.2% γλυκίνη, 0.1% SDS). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερή τάση 85V μέχρις ότου τα δείγματα να φτάσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel: 0.3M TRIS-HCl pH=8.8, 10-12.5% Acrylamide, 0.1% SDS, 0.1% TEMED, 0.1% APS), όπου η ηλεκτροφόρηση συνεχίστηκε στα 110V.

3.10.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν βάσει του μοριακού τους βάρους και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose membrane Macherey-Nagel, Düren, Germany), με εφαρμογή ρεύματος έντασης 310 mA για 1 ώρα στους 4 °C, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer: 2.5mM TRIS-HCl pH 8.3, 0.2% γλυκίνη). Οι μεμβράνες επωάστηκαν σε 5% άπαχο γάλα Regilait για την αποφυγή μη ειδικής πρόσδεσης του δευτερογενούς αντισώματος. Ακολούθησε επώαση των μεμβρανών σε πρωτογενή αντισώματα έναντι μιας εκ των παρακάτω φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών για 16-18 ώρες στους 4 °C.

Φωσφορυλιωμένες	Ξενιστής	Συντομογραφία	Αραίωση	Εταιρεία
Πρωτεϊνες		*-phosphorylated		
Alzt	κουνέλι	nh* Alzt	1.2000	Abcam
AKI	KUUVEAL	pn [*] -Akt	1.2000	Abcain
ERK1/2	κουνέλι	ph*-ERK1/2	1:1000	Abcam
SAPK/JNK	κουνέλι	ph*-SAPK/JNK	1:1000	Abcam

Ακολούθησε «απογύμνωση» των μεμβρανών με επώαση τους σε ήπιο stripping buffer (1.5% γλυκίνη, 0.1% SDS, 1% Tween-20) σε θερμοκρασία δωματίου, επώαση με 5% γάλα και επώαση με αντισώματα έναντι των ολικών μορφών των παραπάνω πρωτεϊνών.

Ολική	Ξενιστής	Συντομογραφία	Αραίωση	Εταιρεία
Πρωτεΐνη		*- total		
Akt	κουνέλι	t*-Akt	1:2000	Abcam
ERK1/2	κουνέλι	t*-ERK1/2	1:1000	Abcam
SAPK/JNK	κουνέλι	t-SAPK/JNK	1:1000	Abcam

Για την κανονικοποίηση ως προς την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, οι μεμβράνες «απογυμνώθηκαν» και επωάστηκαν σε ανεπτυγμένο σε κουνέλι πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GAPDH (1:1000). Οι μεμβράνες επωάστηκαν σε ανεπτυγμένο σε κουνέλι δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση (peroxidase-conjugated secondary antibody HRP goat anti-rabbit IgG, 1:4000; Invitrogen). Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με την τεχνική της *χημειοφωταύγειας* (ECL Western blotting kit. Supersignal west pico chemilluminescent substrate, Thermo Scientific, Rockford, USA) και η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Image Lab 5. Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την εταιρεία Cell Signaling.

3.11 Μελέτες Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

3.11.1 Απομόνωση συνολικού RNA και σύνθεση cDNA

Οι αμφιβληστροειδείς απομονώθηκαν, ομογενοποιήθηκαν και κάθε δείγμα διαλυτοποιήθηκε σε 1ml TRIzol και 200μl χλωροφόρμιο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και συλλέχθηκε η επάνω φάση του κάθε δείγματος. Ακολούθησε κατακρήμνιση του συνολικού RNA με προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης. Το συνολικό RNA ξεπλύθηκε με 75% αιθανόλη, αφέθηκε να στεγνώσει και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε νερό απαλλαγμένο από RNάση. Η συγκέντρωση του συνολικού RNA μετρήθηκε με χρήση φασματοφωτόμετρου (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech). Το συνολικό RNA επωάστηκε με Δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen) για 15 λεπτά για την αποφυγή πιθανής μόλυνσης λόγω παρουσίας DNA. Η DNάση Ι απενεργοποιήθηκε με προσθήκη EDTA και εφαρμογή θερμότητας. Τέλος, η σύνθεση του cDNA από το συνολικό RNA έγινε με χρήση PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.11.2 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Τα επίπεδα mRNA των CB1 και CB2 κανναβινοειδικών υποδοχέων μετρήθηκαν με εφαρμογή συμβατικής PCR και χρήση του KAPATaqTM PCR Kit (KAPABIOSYSTEMS), σύμφωνα με τις εσωκλειόμενες οδηγίες και κανονικοποιήθηκαν προς τα επίπεδα της GAPDH. Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού ήταν ως εξής: 60 sec αποδιάταξη στους 95 °C, 60 sec υβριδισμός στους 60 °C και 60 sec επιμήκυνση στους 75 °C. Οι υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Υποκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος	Βιβλιογραφική αναφορά	
GAPDH Forward	5-GGTCGGTGTGAACGGATTTG-3	350bp	Aravindan και συν.,	
GAPDH Reverse	5-GTGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3		2006	
CB1 Forward	5-CATCATCATCCACACGTCAG-3	329bp	Porcella και συν., 1998	
CB1 Reverse	5-ATGCTGTTGTCTAGAGGCTG-3			
CB2 Forward	5-TTTCCCACTGATCCCTAACG-3	328bp	Porcella και συν., 1998	
CB2 Reverse	5-AGTTAACAAGGCACAGCATG-3			

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:</u>

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

<u>ΕΝΟΤΗΤΑ 1</u> ΜΕΛΕΤΕΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Kiagiadaki και Thermos, 2008), σύμφωνα με την οποία χορήγηση AMPA σε συγκέντρωση 42nmol/οφθαλμό προκάλεσε απώλεια σε βραγύινα κύτταρα αμφιβληστροειδούς επίμυ που εκφράζουν το ένζυμο συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου [brain nitric oxide synthase, **bNOS**-ανοσοδραστικότητα – **bNOS**immunoreactivity (IR)] και σε βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν το ένζυμο ακετυλοτρασφεράση χολίνης [Choline Acetyl Trasferanse, της ChAT ανοσοδραστικότητα - ChAT immunoreactivity (IR)]. Παράλληλα παρατηρήθηκε αυξημένος κυτταρικός θάνατος σε όλο το μήκος του αμφιβληστροειδούς, 24 ώρες μετά την ενδοβολβική χορήγηση (Kiagiadaki και Thermos, 2008). Πέραν των βραχύινων κυττάρων, τα calbindin-ανοσοδραστικά κύτταρα φαίνεται επίσης να μειώνονται παρουσία του AMPA (Kokona και συν., 2012a), ενώ οι δείκτες φωτοϋποδεκτικών, ντοπαμινεργικών, και γαγγλιακών κυττάρων δεν επηρεάζονται (Kiagiadaki και Thermos, 2008).

Βασιζόμενοι στις παραπάνω μελέτες χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας για τη μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυων και μυών.

Η μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης των ενδογενών κανναβινοειδών ΑΕΑ και 2-AG και των συνθετικών κανναβινοειδών HU-210 και MethAEA πραγματοποιήθηκε με διεξαγωγή ανοσοϊστοχημικών μελετών. Μελετήθηκε η επίδραση των παραπάνω μορίων στην ανοσοδραστικότητα συγκεκριμένων κυτταρικών δεικτών, που επηρεάζονται από τη χορήγηση του διεγερτικού αμινοξέος ΑΜΡΑ (Kiagiadaki και Thermos, 2008' Kokona και συν., 2012a), όπως αναφέρεται σε προηγούμενη παράγραφο. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικοί δείκτες για τη σήμανση των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου και την τρανσφεράση της χολίνης, καθώς και για τη σήμανση βραχύινων GABAεργικών των οριζόντιων και κυττάρων (calbindin ανοσοδραστικότητα.-calbindin-IR). Ακολούθησαν μελέτες ποσοτικοποίησης για την εκτίμηση των επιπέδων νευροπροστασίας. Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

4.1.1 Επίδραση της ΑΕΑ συν-χορηγούμενης με ΑΜΡΑ στη bNOS-IR

Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) καταλύει το σχηματισμό μονοξειδίου του αζώτου (NO) από L-αργινίνη. Το NO αποτελεί πολύ σημαντικό μόριο στην κυτταρική σηματοδότηση. Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 4.1A**, στον ιστό μάρτυρα (CTRL), η bNOS-IR εντοπίζεται στα σώματα των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν NOS, στην έσω κοκκώδη στιβάδα (Inner Nuclear Layer, INL) και σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στην στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Ganglion Cell Layer, GCL) καθώς επίσης και στις απολήξεις των κυττάρων αυτών στην έσω δικτυωτή στιβάδα (Inner Plexiform Layer, IPL). Η bNOS-IR μειώθηκε δραστικά στον ιστό που έλαβε AMPA ενώ η AEA συν-χορηγούμενη με AMPA έδρασε αυξάνοντας τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Μελέτες ποσοτικοποίησης των ανοσοϊστοχημικών δεδομένων (**Εικόνα 4.1B**) έδειξαν ότι το AMPA προκάλεσε περίπου 75% μείωση του αριθμού των bNOSανοσοδραστικών κυττάρων (19.8 ± 10.6 κύτταρα ανά τομή, n=5, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (90.3 ± 11.5 κύτταρα ανά τομή, n=5). Η AEA συν-χορηγούμενη με AMPA παρείχε νευροπροστασία στον ιστό με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [10⁻⁸ M, 29.2 ± 3.2 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL⁻ 10⁻⁷ M, 50.8 ± 6.6 κύτταρα ανά τομή, n=5, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA⁻ 10⁻⁶M, 44.3 ± 12.7 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA] Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν το νευροπροστατευτικό ρόλο της AEA στα bNOS ανοσοδραστικά κύτταρα έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας και συνηγορούν υπέρ της δράσης της AEA ως μερικός αγωνιστής.



Εικόνα 4.1 Επίδραση του ενδογενούς κανναβινοειδούς ΑΕΑ στο μοντέλο της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας – Μελέτες της bNOS-IR. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της bNOS-IR. Στον ιστό μάρτυρα (CTRL), η ανοσοδραστικότητα της bNOS εντοπίζεται στα σώματα των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν NOS στην INL, σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στη GCL αλλά και στις απολήξεις των κυττάρων αυτών στην IPL. Η ανοσοδραστικότητα της bNOS μειώθηκε δραστικά στον ιστό που έλαβε AMPA ενώ η ΑΕΑ συν-χορηγούμενη με AMPA προκάλεσε αύξηση της bNOS-IR με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σώματα των bNOS-ανοσοδραστικών βραχύινων κυττάρων. Κλίμακα 20μm. INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. **Β.** Μελέτες ποσοτικοποίησης της bNOS-IR. Το AMPA προκάλεσε ραγδαία ****p<0,001 μείωση του αριθμού των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων (περίπου 75% μείωση, συγκριτικά με το CTRL). Η ΑΕΑ συν-χορηγούμενη με ΑΜΡΑ παρείχε προστασία στον ιστό αυξάνοντας των αριθμό των bNOS-θετικών κυττάρων σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA, στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 10^{-7} και 10^{-6} M (*** p<0,001 συγκριτικά με το CTRL, $\#_p<0.05$, $\#\#_p<0.001$ συγκριτικά με το AMPA). Η AEA δεν είχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση των 10^{-8} M.

4.1.2 Επίδραση της ΑΕΑ συν-χορηγούμενης με ΑΜΡΑ στην ChAT-IR

Η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT) είναι ένα ένζυμο το οποίο συντίθεται στο σώμα των νευρώνων, απ' όπου μέσω αξοπλασματικής ροής φτάνει στις απολήξεις των τελευταίων, όπου και καταλύει τον σχηματισμό του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, Ach). Το ένζυμο της ChAT αποτελεί εξειδικευμένο δείκτη χολινεργικών νευρώνων στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 4.2A, στον ιστό μάρτυρα (CTRL) η ανοσοδραστικότητα της ChAT εντοπίζεται σε σώματα χολινεργικών νευρώνων, στην INL και στη GCL και στις απολήξεις τους στην IPL. Ο αριθμός των ChAT-ανοσοδραστικών κυττάρων μειώθηκε δραστικά στον ιστό που έλαβε ΑΜΡΑ συγκριτικά με τον ιστό μάρτυρα. Συνχορήγηση ΑΕΑ (10⁻⁷ M) με ΑΜΡΑ παρείγε προστασία στην ChAT-IR. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης (Εικόνα 4.2B) επαληθεύουν τα δεδομένα των ανοσοϊστοχημικών μελετών. Το AMPA προκάλεσε περίπου 90% μείωση του αριθμού των χολινεργικών κυττάρων (10.7 \pm 3.9 κύτταρα ανά τομή, n=5, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL) συγκριτικά με το CTRL (131.8 ± 24.7 κύτταρα ανά τομή, n=6), ενώ η AEA παρείχε μερική νευροπροστασία στη συγκέντρωση των 10^{-7} M (38.3) ± 5.6 κύτταρα ανά τομή, n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA).


Εικόνα 4.2 Επίδραση του ενδογενούς κανναβινοειδούς ΑΕΑ (10⁻⁷M) στο μοντέλο της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας – Μελέτες της ChAT-IR. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ChAT-IR. Στον ιστό μάρτυρα (CTRL), η ανοσοδραστικότητα της ChAT εντοπίζεται στα σώματα των χολινεργικών κυττάρων στην INL, σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στη GCL αλλά και στις απολήξεις των κυττάρων αυτών στην IPL. Η ανοσοδραστικότητα της ChAT μειώθηκε δραστικά στον ιστό που έλαβε AMPA ενώ η AEA (10⁻⁷M) συν-χορηγούμενη με AMPA προκάλεσε αύξηση των ChAT-ανοσοδραστικών κυττάρων. Κλίμακα 20μm. INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. **Β.** Μελέτες ποσοτικοποίησης της ChAT-IR. Το AMPA προκάλεσε 90% μείωση του αριθμού των ChAT-ανοσοδραστικών κυττάρων (^{***} p<0,001 συγκριτικά με το CTRL). Η AEA συν-χορηγούμενη με AMPA παρείχε μερική προστασία στον ιστό αυξάνοντας των αριθμό των χολινεργικών κυττάρων σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA (^{***} p<0,001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0,05 συγκριτικά με το AMPA).

4.1.3 Επίδραση της ΑΕΑ συν-χορηγούμενης με AMPA στην calbindin-IR

Η calbindin είναι μια πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου η οποία αποτελεί έναν κλασσικό κυτταρικό δείκτη για τη σήμανση των οριζόντιων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, των δίπολων κυττάρων που συνδέονται με κωνία καθώς και ενός πληθυσμού βραχύινων κυττάρων. Παρότι η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στο ρόλο των κανναβινοειδών στη βιωσιμότητα των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν τη bNOS και την ChAT, τα οριζόντια και GABAεργικά βραχύινα κύτταρα φαίνεται να είναι εξίσου ευπαθή στην διεγερσιτοξικότητα από AMPA (Kokona και συν., 2012a). Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα με στόχο τη διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης της ΑΕΑ στα οριζόντια και calbindinανοσοδραστικά βραχύινα κύτταρα. Η calbindin-IR εντοπίζεται στα σώματα των οριζόντιων κυττάρων στην εγγύς ONL και τις απολήξεις τους στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL) και σε ένα πληθυσμό βραχύινων κυττάρων στην INL στον ιστό μάρτυρα (CTRL, Εικόνα 4.3A). Η χορήγηση AMPA προκάλεσε μείωση της calbindin-IR (***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL), ενώ η AEA (10⁻⁷ M), συν-χορηγούμενη με ΑΜΡΑ παρείχε προστασία στον ιστό. Μελέτες ποσοτικοποίησης (Εικόνα 4.3B) έδειξαν μείωση της calbindin-IR κατά περίπου 62% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Η ΑΕΑ προστάτευσε τον ιστό αυξάνοντας την calbindin-IR περίπου στο 66% των επιπέδων της ομάδας ελέγχου (*p<0.05 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά $\mu\epsilon$ to AMPA).



<u>Εικόνα 4.3</u> Επίδραση του ενδογενούς κανναβινοειδούς ΑΕΑ (10⁻⁷M) στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας – Μελέτες της calbindin-IR. A. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της calbindin-IR. Στον ιστό μάρτυρα (CTRL), η ανοσοδραστικότητα της calbindin εντοπίζεται στα σώματα των οριζόντιων κυττάρων στην άπω ONL, στις απολήξεις των οριζόντιων κυττάρων στην άπω ONL, στις απολήξεις των οριζόντιων κυττάρων στην απο ONL, στις απολήξεις των οριζόντιων κυττάρων στην δαφαστικότητα της calbindin μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στον ιστό που έλαβε AMPA ενώ η AEA συν-χορηγούμενη με AMPA προκάλεσε αύξηση της calbindin-IR. Κλίμακα 20μm. OPL: εξωτερική δικτυωτή στιβάδα, IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. **B.** Μελέτες ποσοτικοποίησης της calbindin-IR. Το AMPA προκάλεσε περίπου 62% μείωση της calbindin-IR (^{***}p<0,001 συγκριτικά με το CTRL). Η ΑΕΑ συν-χορηγούμενη με AMPA παρείχε προστασία στον ιστό αυξάνοντας την ανοσοδραστικότητα της calbindin σε στατιστικά σημαντικά επίπεδο συγκριτικά με το CTRL). Η ΑΕΑ συν-χορηγούμενη με AMPA παρείχε προστασία στον ιστό αυξάνοντας την ανοσοδραστικότητα της calbindin σε στατιστικά σημαντικά επίπεδο συγκριτικά με το AMPA.

4.1.4 Επίδραση των 2-AG, HU-210 και MethAEA συν-χορηγούμενων με AMPA στην bNOS-IR

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στο ρόλο των κανναβινοειδών στη βιωσιμότητα των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν τη bNOS και την ChAT. Για το λόγο αυτό, ανοσοϊστοχημικές μελέτες έναντι της bNOS ή και της ChAT χρησιμοποιήθηκαν και για τη διερεύνηση των νευροπροστατευτικών δράσεων των 2-AG, HU-210 και MethAEA. Για την αποφυγή επανάληψης των ανοσοϊστοχημικών δεδομένων, από εδώ και στο εξής παρουσιάζονται μόνον τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των ανοσοϊστοχημικών μελετών. Στην Εικόνα 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών ποσοτικοποίησης της bNOS-IR. Τόσο το ενδογενές 2-AG όσο και τα συνθετικά κανναβινοειδή HU-210 και MethAEA, συν-χορηγούμενα με AMPA, παρείχαν προστασία αυξάνοντας τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν μόνον ΑΜΡΑ, κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο [**Εικ. 4.4A**, AMPA+2-AG (10⁻⁸ M, 25.1 ± 3.1 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL $^{-1}$ 10⁻⁷ M, 74.7 ± 18.9 κύτταρα ανά τομή, n=3, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA[·] 10⁻⁶ M, 61.0 ± 26.4 κύτταρα ανά τομή, n=5, *p<0.05 συγκριτικά με το CTRL^{· ###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA), Εικ. 4.4B, AMPA+HU-210 (10^{-9} M, 48.8 ± 8 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, $^{\#\#\#}$ p<0.001 συγκριτικά με το AMPA⁻ 10⁻⁸ M, 62.8 ± 4.5 κύτταρα ανά τομή, n=3, **p<0.01 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA⁻ 10⁻⁷ M, 72.5 ± 3.2 κύτταρα ανά τομή, n=3, ^{##}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA $^{\cdot}$ 10⁻⁶ M, 78.1 ± 5.8 κύτταρα ανά τομή, n=3, # p<0.001 συγκριτικά με το AMPA), Εικ. 4.4Γ, AMPA+MethAEA (10^{-8} M, 14.3 ± 2.9 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL⁻¹⁰⁻⁷ M, 61 ± 19.5 κύτταρα ανά τομή, n=5, *p<0.01 συγκριτικά με το CTRL, $^{\#\#\#}$ p<0.001 συγκριτικά με το AMPA⁻ 10⁻⁵ M, 72.8 ± 8.7 κύτταρα ανά τομή, n=3, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA)].

Τα κανναβινοειδή 2-AG, HU-210 και MethAEA δρουν πιο αποτελεσματικά από την ΑΕΑ μειώνοντας την απώλεια των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων που προκαλείται από το AMPA και επαναφέροντας τον αριθμό των εν λόγω κυττάρων στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, δρώντας ως πλήρεις αγωνιστές. Αντιθέτως, η ΑΕΑ δρα ως μερικός αγωνιστής.

Στην Εικόνα 4.4Δ παρουσιάζεται η σύγκριση των νευροπροστατευτικών δράσεων των τεσσάρων αγωνιστών στη συγκέντρωση των 10⁻⁷ Μ.



<u>Εικόνα 4.4</u> Επίδραση των κανναβινοειδών 2-AG, HU-210 και MethAEA στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας–Μελέτες ποσοτικοποίησης της bNOS-IR. A. Νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG. Ο CB1 αγωνιστής 2-AG παρείχε νευροπροστασία έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (^{*}p<0.05, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). **B.** Νευροπροστατευτικές δράσεις του HU-210. Ο CB1/CB2 αγωνιστής HU-210 παρείχε νευροπροστασία έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας σε όλες τις χορηγούμενες δόσεις (^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). **Γ.** Νευροπροστατευτικές δράσεις της MethAEA. Η MethAEA επίσης παρείχε προστασία στον ιστό με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). **Δ.** Σύγκριση των νευροπροστατευτικών δράσεων των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών. Τα τέσσερα κανναβινοειδή που χρησιμοποιήθηκαν παρείχαν προστασία από την AMPA διεγερσιτοξικότητα. Τα HU-210 και 2-AG έδρασαν πιο αποτελεσματικά από τα AEA και MethAEA στη δόση των 10⁻⁷ M (^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA).

4.1.5 Επίδραση των HU-210 και MethAEA συν-χορηγούμενων με AMPA στην ChAT-IR

Η νευροπροστατευτική δράση των συνθετικών κανναβινοειδών HU-210 και MethAEA έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας μελετήθηκε επίσης με ανοσοϊστοχημικές μελέτες έναντι της πρωτεΐνης ChAT. Δεδομένου ότι το HU-210 παρείχε αποτελεσματική νευροπροστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα στη χαμηλή δόση των 10⁻⁸ M, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.4, μελετήθηκε μόνο η δόση των 10⁻⁸ M του HU-210 για τη μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του στα γολινεργικά βραγύινα κύτταρα. Το HU-210 προκάλεσε αύξηση του αριθμού των χολινεργικών κυττάρων φτάνοντας περίπου το 56% των επιπέδων της ομάδας ελέγχου $(58 \pm 2.1$ κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). Η MethAEA παρείχε νευροπροστασία με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο $[(10^{-8} \text{ M}, 8.6 \pm 0.2 \text{ κύτταρα ανά τομή, n=3}, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL⁻$ 10^{-7} M, 80.7 ± 13.7 κύτταρα ανά τομή, n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0,001 συγκριτικά με το AMPA[·] 10⁻⁵ M, 71.0 ± 9.2κύτταρα ανά τομή, n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0,001 συγκριτικά με το AMPA). Στις δόσεις 10^{-7} M και 10^{-5} M επανέφερε τα ChAT ανοσοδραστικά κύτταρα στο 62% και 54% των επιπέδων της ομάδας ελέγχου, αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο αποτέλεσμα των δύο δόσεων (p>0.05). Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ της δράσης της MethAEA ως μερικού αγωνιστή στη νευροπροστασία των ChAT ανοσοδραστικών κυττάρων. Καμία δράση δεν παρατηρήθηκε όταν η MethAEA συν-γορηγήθηκε με AMPA στη δόση των 10⁻⁸ M.



<u>Εικόνα 4.5</u> Επίδραση των συνθετικών κανναβινοειδών HU-210 και MethAEA στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας – Μελέτες ποσοτικοποίησης της ChAT-IR. A. Νευροπροστατευτική δράση του HU-210. Το HU-210 συν-χορηγούμενο με AMPA στη χαμηλή συγκέντρωση των 10^{-8} M προκάλεσε αύξηση των χολινεργικών βραχύινων κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA (^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###} p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###} ρ<0.001 συγκριτικά με το χολινεργικών κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA (^{**} p<0.01 συγκριτικά με το χολινεργικών κυττάρων συγκριτικά με το CTRL, ^{###} ρ<0.001 συγκριτικά με το ΔMPA). Β. Νευροπροστατευτική δράση της MethAEA. Η MethAEA συν-χορηγούμενη με AMPA παρείχε μερική προστασία αυξάνοντας τον αριθμό των χολινεργικών κυττάρων συγκριτικά με το CTRL, ^{###} ρ<0.001 συγκριτικά με το AMPA). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη νευροπροστατευτική δράση της MethAEA στις δόσεις 10^{-7} M και 10^{-5} M.

Τα αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών των μελετών και μελετών ποσοτικοποίησης έναντι των bNOS και ChAT έδειξαν αποτελεσματικότερη νευροπροστατευτική δράση των συνθετικών και ενδογενών κανναβινοειδών όσον αφορά στην bNOS ανοσοδραστικότητα. Ως εκ τούτου, μόνον ο δείκτης bNOS χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που ακολούθησαν. Από τη σύγκριση των νευροπροστατευτικών δράσεων των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών όσον αφορά στη bNOS-IR, φαίνεται ότι τα 2-AG, HU-210 και MethAEA έδρασαν ως πλήρεις αγωνιστές προσεγγίζοντας τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου στη μεγαλύτερη χορηγούμενη δόση των 10^{-6} M ή 10^{-5} M (για τα 2-AG και HU-210 και για την MethAEA, αντίστοιχα, Εικόνα 4.4A,B,Γ), ενώ η ΑΕΑ συν-χορηγούμενη με ΑΜΡΑ προστάτευσε τον ιστό από την ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητα δρώντας σαν μερικός αγωνιστής (Εικόνα 4.1B). Στις μελέτες που θα παρουσιάζονται από εδώ και στο εξής τα κανναβινοειδή AEA, 2-AG, HU-210 και MethAEA χρησιμοποιήθηκαν στη μικρότερη αποτελεσματική δόση των 10⁻⁷ Μ.

ENOTHTA 2

ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Η απώλεια ανοσοδραστικότητας των δεικτών bNOS, ChAT και calbindin που παρατηρήθηκε στους αμφιβληστροειδείς που έλαβαν ΑΜΡΑ δεν μπορεί να θεωρηθεί ως απώλεια κυττάρων καθώς μπορεί να οφείλεται σε απώλεια ενζυμικής συνθάσης μονοξειδίου δραστικότητας (της του του αζώτου ή της ακετυλοτρανσφεράσης τη χολίνης, για την bNOS και ChAT ανοσοδραστικότητα, αντίστοιχα) ή σε απώλεια πρωτεΐνης (πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου για την calbindin ανοσοδραστικότητα). Για το λόγο αυτό και για να διαπιστώσουμε αν πραγματικά προκαλείται κυτταρικός θάνατος από το διεγερτικό αμινοξύ ΑΜΡΑ και νευροπροστασία από τα κανναβινοειδή, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

4.2.1 Επίδραση του AMPA παρουσία ή απουσία HU-210 ή MethAEA στον κυτταρικό θάνατο

Η χρώση TUNEL χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου σε ιστούς επίμυων που έλαβαν AMPA και της νευροπροστασίας σε ιστούς που έλαβαν AMPA παρουσία HU-210 ή AEA, 24 ώρες μετά την ενδοφθάλμια χορήγηση. Στην Εικόνα 4.6Α παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από τις μελέτες TUNEL. Σε συνδυασμό με τις μελέτες ποσοτικοποίησης (Εικόνα 4.6B), τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν τις διεγερσιτοξικές επιπτώσεις του ΑΜΡΑ συγκριτικά με τους ιστούς ελέγχου και τις νευροπροστατευτικές δράσεις των HU-210 και AEA. Στους ιστούς της ομάδας ελέγχου (CTRL) παρουσιάστηκαν ελάχιστα TUNEL-θετικά κύτταρα (1.2 ± 0.3 κύτταρα ανά 100μm ιστού, n=5). Ο αριθμός των TUNEL-θετικών κυττάρων βρέθηκε 18.5 φορές μεγαλύτερος στους ιστούς που έλαβανΑΜΡΑ (22.7 ± 1.1 κύτταρα ανά 100μm ιστού, n=5, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ το HU-210 (n=3) και η AEA (n=3) προστάτευσαν τον αμφιβληστροειδή μειώνοντας τον αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων που παρατηρήθηκε στους AMPA ιστούς κατά 45% και 71%, αντίστοιχα (12.4 \pm 1.2 και 8.9 \pm 1.1 κύτταρα ανά 100μm ιστού, αντίστοιχα, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL^{· ###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). Το αποτέλεσμα αυτό μαρτυρά τον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί η ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητα και τη νευροπροστατευτική δράση των ΑΕΑ και HU-210, αποτελέσματα επαληθεύοντας τα των ανοσοϊστοχημικών μελετών που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα.

4.2.2 Επίδραση του ΑΜΡΑ παρουσία ή απουσία HU-210 στο πάχος του αμφιβληστροειδούς

Χρησιμοποιήθηκε ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Η/Ε) με στόχο τη μελέτη της μεταβολής του πάχους του ιστού παρουσία AMPA ή AMPA+HU-210. Μετρήθηκε το πάχος του ιστού και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.7Α,Β δείχνουν περίπου 38% μείωση του πάχους του αμφιβληστροειδούς στους ιστούς που έλαβαν AMPA (n=6), ενώ το HU-210 (n=4) επανάφερε το πάχος του ιστού στα επίπεδα του CTRL (n=5). Μελέτη του πάχους των επιμέρους κοκκωδών στιβάδων του αμφιβληστροειδούς έδειξε ότι το ΑΜΡΑ προκάλεσε στατιστικά σημαντική συρρίκνωση της στιβάδας INL, το πάχος της οποίας επανήλθε στα επίπεδα του CTRL παρουσία HU-210 (Εικόνα 4.7Γ). Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν υπέρ της βραχύινα νευροπροστατευτικής δράσης του HU-210 στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται κατά κύριο λόγω στη στιβάδα INL.



Εικόνα 4.6 Επίδραση του AMPA παρουσία ή απουσία HU-210 ή MethAEA στον κυτταρικό θάνατο – Χρώση TUNEL σε αμφιβληστροειδή επίμυων. Α. Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες της χρώσης TUNEL. Η χορήγηση AMPA προκάλεσε ραγδαία αύξηση των TUNEL-θετικών κυττάρων που διακρίνονται στις στιβάδες INL και GCL. Παρουσία HU-210 ή AEA ο αριθμός των TUNEL-θετικών κυττάρων μειώθηκε σημαντικά. Κλίμακα 20μm. INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. **B.** Μελέτες ποσοτικοποίησης της χρώσης TUNEL. Το AMPA προκάλεσε 18.5 φορές αύξηση του αριθμού των TUNEL-θετικών κυττάρων, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL). Τα κανναβινοειδή HU-210 και AEA μείωσαν στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των σημασμένων κυττάρων (^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA).

A







Εικόνα 4.7 Επίδραση του ΑΜΡΑ παρουσία ή απουσία HU-210 στο πάχος του αμφιβληστροειδούς – Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Η/Ε). Α. Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες της χρώσης Η/Ε. Κλίμακα: 20 μm.INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Β. Μελέτες ποσοτικοποίησης των ιστολογικών δεδομένων. Στους ιστούς που έλαβαν AMPA παρατηρήθηκε μείωση του πάχους του ιστού συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (*** p<0.001, συγκριτικά με το CTRL). Το HU-210 αναίρεσε τις διεγερσιτοξικές επιδράσεις του AMPA, επαναφέροντας το πάχος του ιστού στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου ([#]p<0,05, συγκριτικά με το AMPA). Γ. Ποσοτικοποίηση του πάχους των επιμέρους κοκκωδών στιβάδων του αμφιβληστροειδούς. Παρουσία AMPA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συρρίκνωση της στιβάδας INL (^{**}p<0.01 συγκριτικά με το CTRL). Το HU-210 συν-χορηγούμενο με AMPAεπανέφερε το πάχος της INL στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου (^{##}p<0.01 συγκριτικά με το AMPA). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις στιβάδες ONL και GCL. ONL: εξωτερική κοκκώδης στιβάδα, INL: έσω κοκκώδης στιβάδα, GCL: στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων.

4.2.3 Επίδραση του AMPA παρουσία ή απουσία 2-AG στον κυτταρικό θάνατο σε αμφιβληστροειδείς μυών

Όπως θα παρουσιαστεί στις επόμενες ενότητες, η χρήση μυών κρίθηκε απαραίτητη στην παρούσα μελέτη για τη διερεύνηση του ρόλου των CB1 και CB2 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών αλλά και για τη διερεύνηση της εμπλοκής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στις εν λόγω δράσεις. Προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι το 2-AG παρέχει αποτελεσματικότερη προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς μυών όταν συν-χορηγείται με AMPA (όπως θα παρουσιαστεί στην Ενότητα 3), συγκριτικά με τα υπόλοιπα κανναβινοειδή που χρησιμοποιήθηκαν. Για το λόγο αυτό το 2-AG χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μύες.

Η χρώση TUNEL χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου σε ιστούς αγρίου τύπου μυών που έλαβαν AMPA (21nmol ανά οφθαλμό) και της νευροπροστασίας σε ιστούς που έλαβαν ΑΜΡΑ παρουσία 2-AG, 24 ώρες μετά την ενδοφθάλμια χορήγηση. Αντιπροσωπευτικές εικόνες και μελέτες ποσοτικοποίησης της χρώσης TUNEL παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.8A και 4.8B, αντίστοιχα. Το AMPA προκάλεσε αύξηση των TUNEL-θετικών κυττάρων, ενώ παρουσία 2-AG ο αριθμός τους παρουσιάστηκε μειωμένος (Εικόνα 4.8B). Μελέτες ποσοτικοποίησης αποκάλυψαν περίπου 12.5 φορές περισσότερα TUNEL-θετικά κύτταρα στους ιστούς που έλαβαν AMPA (46.5 \pm 1.9 κύτταρα ανά 100 μ m ιστού, n=3) συγκριτικά με τους ιστούς ελέγχου (2.1 ± 1.8 κύτταρα ανά 100 μ m ιστού, n=3). Το 2-AG συν-χορηγούμενο με AMPA προκάλεσε μείωση των TUNEL-θετικών κυττάρων κατά περίπου 30.5% συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA (28.7 ± 5.0 κύτταρα ανά 100 μ m ιστού, n=4) (Εικόνα 4.8B). Ο αριθμός των TUNEL-θετικών κυττάρων μετρήθηκε και στις επιμέρους κοκκώδεις αμφιβληστροειδούς στιβάδες του (Εικόνα **4.8**Γ). Παρουσιάστηκε αύξηση των TUNEL-θετικών κυττάρων σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο στην ONL (0.8 ± 0.4 και 16.3 ± 4.3 κύτταρα ανά 100 μm ιστού, για τα CTRL και AMPA, αντίστοιχα, **p<0.01 συγκριτικά με το CTRL) και INL $(0.6 \pm 0.4$ και 20.3 \pm 2.6 κύτταρα ανά 100 μm ιστού, για τα CTRL και AMPA, αντίστοιχα, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL) αλλά όχι στην GCL (0.5 ± 0.3 και 9.3 ± 1.9 κύτταρα ανά 100 μm ιστού) των ιστών που έλαβαν AMPA, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Το 2-AG παρείχε προστασία μειώνοντας των αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων στην στιβάδα INL (12.0 ± 2.0 κύτταρα ανά 100 μm ιστού, *p<0.05 συγκριτικά με το CTRL,

[#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA) αλλά όχι στις στιβάδες GCLκαι ONL (5.5 ± 1.1 και 10.5 ± 3.9 κύτταρα ανά 100 μm ιστού, αντίστοιχα). Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA αλλά και τις νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG στα βραχύινα κύτταρα αμφιβληστροειδή μυών.



Εικόνα 4.8 Επίδραση του ΑΜΡΑ παρουσία ή απουσία 2-ΑG στον κυτταρικό θάνατο - Χρώση ΤUNEL σε αμφιβληστροειδή αγρίου τύπου μυών. Α. Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες της χρώσης TUNEL. Στους ιστούς που έλαβαν AMPA παρατηρήθηκε αυξημένη χρώση TUNEL, η οποία μειώθηκε παρουσία του 2-AG. Κλίμακα: 20 μm.INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Β. Μελέτες ποσοτικοποίησης της χρώσης TUNEL. Στατιστικά σημαντική αύξηση των TUNEL-θετικών κυττάρων παρατηρήθηκε στους αμφιβληστροειδείς μυών που έλαβαν AMPA (*** p<0.001 συγκριτικά με το CTRL). Η παρουσία του 2-AG μείωσε τον αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (**p<0.01 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA). Γ. Ποσοτικοποίηση των TUNEL-θετικών κυττάρων στις επιμέρους κοκκώδεις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των TUNEL-θετικών κυττάρων στις στιβάδες ONL και INL των ιστών που έλαβαν AMPA συγκριτικά με τους ιστούς ελέγχου (*p<0.01, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL). Το 2-AG παρείχε προστασία στη στιβάδα INL, μειώνοντας τον αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA (*p<0.05 συγκριτικά με το CTRL, #p<0.01 συγκριτικά με το AMPA). ONL: εξωτερική κοκκώδης στιβάδα, INL: έσω κοκκώδης στιβάδα, GCL: στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων.

4.2.4 Επίδραση του μη-NMDA ανταγωνιστή DNQX στις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA

Προκειμένου να εξακριβωθεί ότι οι δράσεις που παρατηρούνται στους ιστούς που έλαβαν AMPA οφείλονται στην ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων, χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνιστής των μη-NMDA υποδοχέων DNQX ο οποίος συνχορηγήθηκε με AMPA (42nmol ανά οφθαλμό) στη δόση των 10^{-6} M, σε αμφιβληστροειδείς επίμυων. Μελέτες ποσοτικοποίησης της bNOS-IR (**Εικόνα 4.9A**) έδειξαν ότι το DNQX (76.6 ± 9.3 κύτταρα ανά τομή, n=3) ανέστειλε πλήρως τις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA (21.9 ± 3.9 κύτταρα ανά τομή, n=5). Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύτηκε και από μελέτες TUNEL (**Εικόνα 4.9B**). Το DNQX προκάλεσε περίπου 78% μείωση των TUNEL-θετικών κυττάρων (4.9 ± 0.4 κύτταρα ανά 100μm ιστού, n=3) συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA (22.7 ± 1.1 κύτταρα ανά 100μm ιστού, **Εικόνα 4.9Γ**). Επομένως, οι τοξικές δράσεις του AMPA που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων.



Εικόνα 4.9 Επίδραση του μη-NMDA ανταγωνιστή DNQX στις διεγερσιτοξικές επιδράσεις του AMPA. A. Ποσοτικοποίηση των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων. Το DNQX ανέστειλε τις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL) στα bNOSανοσοδρασικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA) φτάνοντας περίπου στο 85.8% της ομάδας ελέγχου (^{*}p<0.05 συγκριτικά με το CTRL). **B.** Αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες της χρώσης TUNEL. Κλίμακα: 20 μm. INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Γ. Ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL. Το DNQX ανέστειλε πλήρως τον κυτταρικό θάνατο που προκλήθηκε από το AMPA, μειώνοντας τον αριθμό των TUNELθετικών κυττάρων στο 21.8% των επιπέδων του AMPA (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA).

A

B

Γ

<u>4.2.5</u> Εμπλοκή αποπτωτικών μηχανισμών στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται παρουσία AMPA

Ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρήθηκε παρουσία του διεγερτικού αμινοξέος ΑΜΡΑ μπορεί να οφείλεται είτε σε απόπτωση είτε σε νέκρωση είτε σε συνδυασμό των δύο αυτών μηχανισμών. Μόρια κλειδιά στην επαγωγή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου αποτελούν οι πρωτεΐνες κασπάσες και ειδικότερα η κασπάση-3. Με στόχο τη διερεύνηση του κατά πόσον εμπλέκονται αποπτωτικές διαδικασίες στη μείωση των bNOS-ανοσοδραστικών νευρώνων που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, έγινε συν-γορήγηση ενός αναστολέα της κασπάσης-3 (Z-DEVD-FMK, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) μαζί με AMPA. Η παρουσία του Z-DEVD-FMK στον ιστό δε μετέβαλε τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων, συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν μόνο AMPA, σε καμία από τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις (Εικόνα 4.10A, 10^{-6} M, $14.9 \pm$ 2.5 κύτταρα ανά τομή 10^{-5} M, n=3, 6.8 ± 3.4 κύτταρα ανά τομή 10^{-4} M, n=3, 11.8 ± 1.5 κύτταρα ανά τομή, n=3). Μελέτες TUNEL επιβεβαίωσαν τα δεδομένα των ανοσοϊστοχημικών μελετών (Εικόνα 4.10Β, Γ). Δεν παρουσιάστηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων στους ιστούς που έλαβαν AMPA παρουσία (23.2 \pm 1.1 κύτταρα ανά 100 μ m ιστού, n=3) ή απουσία Z-DEVD-FMK (22.7 \pm 1.1 κύτταρα ανά 100 μ m ιστού) (Εικόνα 4.10Γ).

Επιπρόσθετα, έγιναν μελέτες ανοσοαποτύπωσης με χρήση αντισωμάτων έναντι της φωσφορυλιωμένης και της συνολικής μορφής των κινασών SAPK/JNK. Η σηματοδότηση μέσω SAPK/JNK διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ανοδικά της ενεργοποίησης των κασπασών (Dhanasekaran και Reddy, 2008). Οι πρωτεΐνες SAPK/JNK βρέθηκαν σε δύο διακριτές ζώνες των 46 και 54 kDa (Εικόνα 4.10Δ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο λόγο φωσφορυλιωμένης προς συνολικής SAPK/JNK μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ζώων που έλαβαν AMPA (Εικόνα 4.10Ε).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη δε φαίνεται να εμπλέκονται μονοπάτια που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για τη διερεύνηση πιθανών μηχανισμών νέκρωσης ή νεκρόπτωσης.



Εικόνα 4.10 Εμπλοκή αποπτωτικών μηχανισμών στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται παρουσία AMPA. A. Επίδραση του αναστολέα της κασπάσης-3 Z-DEVD-FMK στην AMPA διεγερσιτοξικότητα – Ποσοτικοποίηση της bNOS-IR. Το Z-DEVD-FMK δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη μείωση των bNOS-θετικών κυττάρων που προκάλεσε το AMPA (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL). B. Επίδραση του αναστολέα της κασπάσης-3 Z-DEVD-FMK στην AMPA διεγερσιτοξικότητα – Αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες της χρώσης TUNEL. Κλίμακα: 20 μm. INL: έσω κοκκώδη στιβάδα, GCL: στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Γ. Ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων στους ιστούς που έλαβαν AMPA παρουσία ή απουσία Z-DEVD-FMK. Το Z-DEVD-FMK δεν είχε καμία επίδραση στον κυτταρικό θάνατο που προκλήθηκε από το AMPA. Δ. Σύγκριση της μεταβολής της ενεργοποίησης των κινασών SAPK/JNK μεταξύ CTRL και AMPA ιστών. Αντιπροσωπευτική εικόνα των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Ε. Ποσοτική ανάλυση των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στη φωσφορυλίωση των SAPK/JNK μεταξύ CTRL και AMPA ιστών.

ENOTHTA 3

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΕΜΠΛΟΚΗΣ ΤΩΝ CB1, CB2 KAI TRPV1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

Τα κανναβινοειδή ασκούν τις δράσεις τους ενεργοποιώντας τους κανναβινοειδικούς υποδοχείς CB1 και CB2. Ωστόσο, δεδομένα υποστηρίζουν την ενεργοποίηση και άλλων μη κανναβινοειδικών υποδοχέων από τα κανναβινοειδή, όπως είναι ο ορφανός υποδοχέας GPR55 και ο TRPV1 υποδοχέας των βανιλλοειδών. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η εμπλοκή των CB1, CB2 και TRPV1 υποδοχέων στη δράση των κανναβινοειδών.

<u>4.3.1</u> Επίδραση των CB1 και CB2 ανταγωνιστών (AM251 και AM630, αντίστοιχα) στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών

Η εμπλοκή των κανναβινοειδικών CB1 και CB2 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών, μελετήθηκε αρχικά με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μελετών και μελετών ποσοτικοποίησης. Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ποσοτικοποιήσεων της bNOS-IR σε ιστούς που έλαβαν AMPA + AEA (Εικόνα 4.11A) ή 2-AG (Εικόνα 4.11B) ή MethAEA (Εικόνα 4.11Γ) ή ΗU-210 (Εικόνα 4.11Δ), παρουσία ή απουσία του ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα (AM251, 10⁻⁶ M) ή του ανταγωνιστή του CB2 υποδοχέα $(AM630, 10^{-6} M)$, αντίστοιχα. Παρουσία AM251 ή AM630 η νευροπροστατευτική δράση των ενδογενών κανναβινοειδών ΑΕΑ και 2-ΑG μειώθηκε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, φτάνοντας ή προσεγγίζοντας τα επίπεδα των ιστών που έλαβαν AMPA [Εικόνα 4.11A, AEA+AMPA+AM251, 22.2 ± 2.1 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺p<0.01 συγκριτικά με το AMPA+AEA(10⁷ M)^{*} AEA+AMPA +AM630, 30.2 ± 4.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺p<0.01 συγκριτικά με το AMPA+AEA (10⁻⁷ M)⁻ Εικόνα 4.11B, 2-AG +AMPA+AM251, 39.5 \pm 13.5 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+2-AG $(10^{-7} \text{ M})^{-2}$ 2-AG+AMPA +AM630, 37.4 ± 3.1 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ${}^{\#}p<0.05$ συγκριτικά με το AMPA, ${}^{++}p<0.01$ συγκριτικά με το AMPA+2-AG (10-7 M)]. Η νευροπροστατευτική δράση των συνθετικών κανναβινοειδών MethAEA και HU-210 μειώθηκε επίσης σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, παρουσία των ΑΜ251 ή ΑΜ630, φτάνοντας τα επίπεδα των ιστών που έλαβαν AMPA (Εικόνα 4.11Γ, MethAEA +AMPA+AM251, 31.7 \pm 16.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το

AMPA+MethAEA (10^{-7} M)[•] MethAEA +AMPA +AM630, 30.0 ± 10.6 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+MethAEA (10^{-7} M)[•] **Εικόνα 4.11Δ**, HU-210+AMPA +AM251, 27.2 ± 2.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+HU-210 (10^{-7} M)[•] HU-210+AMPA +AM630, 25.9 ± 5.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+HU-210 (10^{-7} M)[•] HU-210+AMPA +AM630, 25.9 ± 5.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+HU-210 (10^{-7} M)]. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ της εμπλοκής και των δύο κανναβινοειδικών υποδοχέων (CB1 και CB2) στις δράσεις των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών.



4.3.2 Επίδραση του CB2 αγωνιστή JWH015 συν-χορηγούμενου με AMPA στον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων

Προκειμένου να διαλευκανθεί περαιτέρω η εμπλοκή του CB2 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των CB1/CB2 αγωνιστών πραγματοποιήθηκαν λειτουργικές μελέτες με στόχο τη διαλεύκανση της νευροπροστατευτικής δράσης του CB2 αγωνιστή JWH015 έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των ανοσοϊστοχημικών μελετών έναντι της bNOS παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.12A**. Ο CB2 αγωνιστής JWH015 δεν παρείχε προστασία σε καμία από τις χορηγούμενες δόσεις (10⁻⁸ M, 26.7 ± 5.8 κύτταρα ανά τομή n=3⁻ 10⁻⁷ M, 29.2 ± 6.6 κύτταρα ανά τομή n=3⁻ 10⁻⁶ M, 27.0 ± 8.0 κύτταρα ανά τομή, n=3). Επομένως, η άμεση ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα από τον εκλεκτικό αγωνιστή JWH015 δεν παρέχει προστασία έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας.

<u>4.3.3</u> Μελέτη της ύπαρξης των CB1 και CB2 υποδοχέων σε υγιή αμφιβληστροειδή επίμυος

Για την περαιτέρω διερεύνηση των επιπέδων των CB1 και CB2 υποδοχέων στον υγιή αμφιβληστροειδή, πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης και μελέτες RT-PCR. Οι μελέτες δέσμευσης έδειξαν ότι ο εκλεκτικός CB1 ανταγωνιστής AM251 (10⁻⁶ M, n=2, *p<0.05 συγκριτικά με το Total) εκτόπισε πλήρως την ειδική δέσμευση του [³H]CP55940, κάτι που δεν παρατηρήθηκε παρουσία του CB2 εκλεκτικού ανταγωνιστή AM630 (10⁻⁶ M, n=2) (Εικόνα 4.12B). Επίσης, μελέτες RT-PCR έδειξαν ότι τα επίπεδα του CB2 mRNA (n=5) [***p<0.001 συγκριτικά με το CB1 (n=4)] αποτελούν μόλις το 20% των συνολικών επιπέδων κανναβινοειδικών υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυος (Εικόνα 4.12Γ,Δ). Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη του CB1 υποδοχέα στον ιστό του αμφιβληστροειδούς και ότι μέσω αυτού τα κανναβινοειδή (ενδο-και συνθετικά) νευροπροστατευτικές τους δράσεις παρέγουν τις έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Ωστόσο η ύπαρξη ή μη του CB2 υποδογέα δεν είναι ξεκάθαρη. Οι μελέτες RT-PCR έδειξαν την ύπαρξη μικρών συγκεντρώσεων του CB2 υποδοχέα, σε επίπεδο mRNA, ενώ οι μελέτες δέσμευσης υποστηρίζουν την απουσία της πρωτεΐνης από τον ιστό του αμφιβληστροειδούς, γεγονός που ίσως να οφείλεται στις πολύ μικρές συγκεντρώσεις του CB2 υποδοχέα στον ιστό με αποτέλεσμα την αδυναμία εντοπισμού του με τη συγκεκριμένη τεχνική προσέγγιση.



Εικόνα 4.12 Μελέτες της ύπαρξης των CB1 και CB2 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Α. Επίδραση του συνθετικού CB2 αγωνιστή JWH015 στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Συν-χορήγηση AMPA μαζί με τον CB2 αγωνιστή JWH015 δεν είχε καμία επίπτωση στην AMPA διεγερσιτοξικότητα, όσον αφορά τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων, σε καμιά από τις χορηγούμενες δόσεις (*** p<0.001, συγκριτικά με το CTRL). **B.** Μελέτες δέσμευσης με χρήση ραδιοσημασμένου [³H]CP55940. Ο CB1 ανταγωνιστής AM251 εκτόπισε την ειδική δέσμευση του [³H]CP55940 στις μεμβράνες του αμφιβληστροειδούς, ενώ ο CB2 ανταγωνιστής AM630 δεν είχε καμία δράση [*** p<0.001 συγκριτικά με τη συνολική δέσμευση (Total)]. **Γ.** Αντιπροσωπευτική εικόνα των μελετών PCR για τη μελέτη των επιπέδων των CB1 και CB2 υποδοχέων στον υγιή αμφιβληστροειδή. **Δ.** Ποσοτικοποίηση των μελετών PCR. Μελέτες ποσοτικοποίησης έδειξαν ότι το mRNA του CB2 υποδοχέα αποτελεί μόλις το 23% του συνόλου του mRNA των κανναβινοειδικών υποδοχέων στον ιστό του αμφιβληστροειδούς (*** p<0,001 συγκριτικά με το CB1).

<u>4.3.4</u> Νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG σε αγρίου τύπου, CB1^{-/-} και CB2^{-/-} μύες

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των CB1 και CB2 υποδοχέων μελετήθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG (CB1 αγωνιστής) χρησιμοποιώντας μύες αγρίου τύπου (WT) και διαγονιδιακούς μύες που στερούνται του CB1 (CB1-/-) ή του CB2 (CB2-/-) υποδοχέα (Εικόνα 4.13A). Η bNOS-IR παρουσίασε το ίδιο μοτίβο με αυτό που παρατηρήθηκε στον αμφιβληστροειδή επίμυων 4.1A). Συγκεκριμένα, (Εικόνα παρουσιάστηκε μειωμένη ανοσοδραστικότητα παρουσία του διεγερτικού αμινοξέος AMPA συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ενδοϋαλοειδική χορήγηση AMPA (21nmol ανά οφθαλμό) παρουσία 2-AG προκάλεσε αύξηση του αριθμού των bNOS ανοσοδραστικών κυττάρων στους WT (7.8 ± 2.8 κύτταρα ανά τομή, n=5) και CB2^{-/-} (6.2 ± 3.2 κύτταρα ανά τομή, n=4) μύες συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν ΑΜΡΑ (Εικόνα 4.13Γ), αλλά δεν είχε καμία δράση στους CB1^{-/-} μύες (2.5 \pm 0.9 κύτταρα ανά τομή, n=4) (**Εικόνα 4.13B**). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των CTRL WT $(13.1 \pm 4.6$ κύτταρα ανά τομή, n=5) και CTRL CB1^{-/-} (15.9 ± 1.9 κύτταρα ανά τομή, n=3) ή CTRL CB2^{-/-} (12.6 \pm 0.7 κύτταρα ανά τομή, n=3) μυών αλλά ούτε μεταξύ των AMPA WT $(3.3 \pm 1.9 \text{ kúttada avá touń, n=5})$ kai AMPA CB1^{-/-} $(3.9 \pm 0.4 \text{ kúttada})$ ανά τομή, n=4) ή AMPA CB2^{-/-} (3.4 \pm 0.2 κύτταρα ανά τομή, n=3) μυών. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι ο CB1 αλλά όχι ο CB2 υποδοχέας εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG.







B

Г

<u>Εικόνα 4.13</u> Επίδραση του 2-AG συν-χορηγούμενου με AMPA στον αριθμό των bNOSανοσοδραστικών κυττάρων σε αμφιβληστροειδείς WT, CB1^{-/-} και CB2^{-/-} μυών. A. Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες της bNOS-IR σε WT, CB1^{-/-} και CB2^{-/-} αμφιβληστροειδείς που έλαβαν PBS (CTRL) ή AMPA (21 nmol/eye) ή AMPA με 2-AG (10^{-7} M). Κλίμακα: 20 μm. INL: έσω κοκκώδης στιβάδα, IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα, GCL: στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων. **B**, **Γ**. Μελέτες ποσοτικοποίησης. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των bNOSανοσοδραστικών κυττάρων μεταξύ των CTRL WT και CB1^{-/-} ή CB2^{-/-} μυών ή μεταξύ των WT ή CB1^{-/-} ή CB2^{-/-} μυών που έλαβαν AMPA. Το 2-AG, συν-χορηγούμενο με AMPA, παρείχε προστασία στους WT και CB2^{-/-} αμφιβληστροειδείς, ενώ δεν είχε καμία δράση στους CB1^{-/-} (****p<0.001 συγκριτικά με το CTRLCB1^{-/-}).

<u>4.3.5</u> Εμπλοκή του TRPV1 υποδοχέα των βανιλλοειδών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την ενεργοποίηση των TRPV1 υποδοχέων των βανιλλοειδών από ενδογενή κανναβινοειδή και συγκεκριμένα από την AEA. Συν-χορήγηση του αναστολέα του TRPV1 υποδοχέα, καψαζεπίνη [capz, capsazepine (10⁻⁶ M)], μαζί με AMPA και AEA (10⁻⁷ M, n=5) ή 2-AG (10⁻⁷ M, n=4) ή HU-210 (10⁻⁷ M, n=3), προκάλεσε μείωση των νευροπροστατευτικών δράσεων των AEA, 2-AG και HU-210, όπως φάνηκε από τις μελέτες ποσοτικοποίησης των bNOSανοσοδραστικών κυττάρων [**Εικόνα 4.14A**, AEA+AMPA+Capz, 27.3 ± 4.3 κύτταρα ανά τομή, n=6, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+AEA (10⁻⁷ M)⁻ **Εικόνα 4.14B**, 2-AG+AMPA+Capz, 52.6 ± 5 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+2-AG (10⁻⁷ M)⁻ **Εικόνα 4.14Γ**, HU-210+AMPA+Capz, 38.9 ± 2.5 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+HU-210 (10⁻⁷ M)], αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την εμπλοκή του TRPV1 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών.

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της καψαζεπίνης (10⁻⁶ M) στη βιωσιμότητα των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων, η καψαζεπίνη χορηγήθηκε στον αμφιβληστροειδή επίμυος απουσία AMPA. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (**Εικόνα 4.15A**, n=3, 88.6 ± 3.9 κύτταρα ανά τομή).



<u>Εικόνα 4.14</u> Επίδραση του ανταγωνιστή του TRPV1 υποδοχέα καψαζεπίνη στις νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA 2-AG και HU-210. Α. Συν-χορήγηση της καψαζεπίνης (capz.) με AMPA + AEA προκάλεσε μείωση των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων (^{***} p<0.001, συγκριτικά με το CTRL, ^{###} p<0.001, συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺ p<0.01 συγκριτικά με το + AEA). **B**, Γ. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν η καψαζεπίνη συν-χορηγήθηκε με AMPA + 2-AG ή HU-210 (^{***} p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{##} p<0.01, ^{###} p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺ p<0.05, ⁺⁺ p<0.01 συγκριτικά με το AMPA + 2-AG ή HU-210, ^{###} p<0.01 συγκριτικά με το AMPA + 2-AG ή HU-210, αντίστοιχα).

Επίσης, μελετήθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις του TRPV1 εκλεκτικού αγωνιστή καψαϊκίνη (capsaicin). Η καψαϊκίνη συν-χορηγήθηκε με AMPA σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, n=3 για κάθε συγκέντρωση) αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην μείωση των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων που προκλήθηκε από το AMPA (**Εικόνα 4.15B**, AMPA+capsaicin, 10^{-6} M, 12.7 ± 1.3 κύτταρα ανά τομή⁻ 10^{-5} M, 23.2 ± 4 κύτταρα ανά τομή⁻ 10^{-4} M, 18.5 ± 6 κύτταρα ανά τομή). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η δράση της καπσαζεπίνης στο συγκεκριμένο μοντέλο δε φαίνεται να είναι εκλεκτική για τον TRPV1 υποδοχέα και ότι ο TRPV1 υποδοχέας των βανιλλοειδών δεν εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών.



Εικόνα 4.15 Επίδραση της καψαζεπίνης στον υγιή ιστό – Νευροπροστατευτικές δράσεις του TRPV1 αγωνιστή καψαϊκίνη. Α. Επίδραση της καψαζεπίνης στον αριθμό των bNOSανοσοδραστικών κυττάρων. Χορήγηση καψαζεπίνης απουσία AMPA δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. **B.** Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων της καψαϊκίνης. Η καψαϊκίνη δεν είχε καμία νευροπροστατευτική δράση όταν συν-χορηγήθηκε με AMPA (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL).

ENOTHTA 4

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

Το περισσότερο μελετημένο σηματοδοτικό μονοπάτι που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στις δράσεις των κανναβινοειδών είναι αυτό των αδενυλική κυκλάση/κυκλικό AMP/ πρωτεϊνική κινάση A (Adenylatecyclase/cAMP/PKA, Howlett και Fleming, 1984). Παρ' όλα αυτά, έχουν ενοχοποιηθεί και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια στις δράσεις των κανναβινοειδών σε διαφορετικά συστήματα, όπως τα προεπιβιωτικά μονοπάτια των PI3K/Akt (Gómez del Pulgar και συν., 2000) και MEK/ERK1/2 (Wartmann και συν., 1995⁻ Karanian και συν., 2005). Ο ρόλος των δύο αυτών σηματοδοτικών μονοπατιών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στις λοματοδοτικά.

<u>4.4.1</u> Επίδραση του αναστολέα του PI3K/Akt μονοπατιού wortmannin στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών

Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt φαίνεται να εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις που επάγονται από την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα. Για να μελετήσουμε την εμπλοκή του στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στην παρούσα μελέτη, αρχικά πραγματοποιήσαμε φαρμακολογική μελέτη χρησιμοποιώντας τον αναστολέα του PI3K/Akt μονοπατιού wortmannin (10^6 M). Συν-χορήγηση της wortmannin με AMPA και AEA ή 2-AG ή HU-210 (n=4 για κάθε αγωνιστή) μείωσε τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών (Εικόνα. **4.16A**, AMPA+AEA+Wort 34.5 ± 17.5 κύτταρα ανά τομή, n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, $^{++}p<0.01$ συγκριτικά με το AMPA+AEA (10^{-7} M)⁻ Εικόνα. 4.16B, AMPA+2-AG+Wort 20 \pm 0.9 κύτταρα ανά τομή, n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+2-AG (10⁻⁷ M)⁻ Εικόνα. 4.16Γ, AMPA+HU-210+Wort 38.5 ± 12.4 κύτταρα ανά τομή, n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+HU-210 (10⁻⁷ M)]. Συν-χορήγηση AMPA με HU-210 (10-7 M) +Wort (10-6 M) +AM251 (10-6 M) μείωσε ακόμη περαιτέρω τις νευροπροστατευτικές δράσεις του HU-210 (Εικόνα. **4.16**Γ, AMPA+HU-210+Wort+AM251, 17.8 ± 4.3 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺⁺⁺p<0.01 συγκριτικά με το AMPA+HU-210 (10⁻⁷ M), ^xp<0.05 συγκριτικά με το HU-210+Wort). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στις νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA, 2-AG και HU-210 έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυος.



Εικόνα 4.16 Επίδραση του αναστολέα του **PI3K/Akt** μονοπατιού wortmannin στις νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA, 2-AG και HU-210. A,B. Συν-χορήγηση του PI3K/Akt αναστολέα wortmannin (Wort) με AMPA + AEA ή 2-AG προκάλεσε μείωση των bNOSανοσοδραστικών κυττάρων, συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA + AEA ή 2-AG (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το + AEA ή 2-AG, αντίστοιχα). Γ. Η wortmannin είχε παρόμοια δράση όταν συνχορηγήθηκε με AMPA + HU-210 (*p<0.05, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.01, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το + HU-210). Παρουσία του CB1 ανταγωνιστή AM251 η Wort μείωσε περαιτέρω τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων (^Xp<0.05, συγκριτικά με το + HU-210 + Wort).

4.4.2 Επίδραση των κανναβινοειδών στην φωσφορυλίωση της Akt κινάσης

Για την περαιτέρω μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt χρησιμοποιήθηκαν μελέτες ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης και συνολικής μορφής της πρωτεΐνης Akt, για τη διερεύνηση της επίπτωσης των κανναβινοειδών στην φωσφορυλίωση της εν λόγω κινάσης. Στην **Εικόνα 4.17A** παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Η Akt εντοπίστηκε σε μια διακριτή ζώνη με μοριακό βάρος ~60 kDa. Μελέτες ποσοτικοποίησης (**Εικόνα 4.17B**) αποκάλυψαν μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt παρουσία του διεγερτικού αμινοξέος AMPA (n=8, *p<0.05 συγκριτικά με το CTRL) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (n=8). Τα κανναβινοειδή HU-210, AEA και 2-AG (n=4 για κάθε αγωνιστή), συν-χορηγούμενα με AMPA, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA ([#]p<0.05, ^{##}p<0.01 συγκριτικά με το AMPA). Τα δεδομένα αυτά επαληθεύουν τα αποτελέσματα των μελετών της ενότητας 4.4.1 που υποστηρίζουν την εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στις νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA, 2-AG και HU-210 που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

<u>4.4.3</u> Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων του 2-AG σε αμφιβληστροειδείς αγρίου τύπου (WT) και Akt2^{-/-}μυών

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις AMPA (21nmol ανά οφθαλμό) ή AMPA+2-AG σε οφθαλμούς αγρίου τύπου και Akt2^{-/-} μυών. Μελέτες ποσοτικοποίησης των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων έδειξαν ότι το 2-AG παρείχε προστασία στα αγρίου τύπου αλλά όχι στα Akt2^{-/-} ζώα (Εικόνα 4.17Γ, WT AMPA+2-AG, 7.8 ± 2.8 κύτταρα ανά τομή, n=5, Akt2^{-/-} AMPA+2-AG, 4.6 ± 1.8 κύτταρα ανά τομή, n=4). Επομένως, όλα τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η κινάση Akt2 εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG.



Εικόνα 4.17 Μελέτη της εμπλοκής του PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Α. Αντιπροσωπευτική εικόνα των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Β. Ποσοτικοποίηση των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του λόγου φωσφορυλιωμένη προς συνολική μορφή της Akt στους ιστούς που έλαβαν AMPA συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (^{*}p<0.05 συγκριτικά με το CTRL). Τα κανναβινοειδή HU-210, AEA και 2-AG προκάλεσαν αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt ([#]p<0.05, ^{##}p<0.01 συγκριτικά με το AMPA). Γ. Μελέτες ποσοτικοποίησης των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση AMPA παρουσία ή απουσία 2-AG σε αμφιβληστροειδείς αγρίου τύπου και Akt2^{-/-} μυών. Το 2-AG παρείχε προστασία στα αγρίου τύπου ζώα αλλά όχι στα Akt2^{-/-} (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL Akt2^{-/-}).

4.4.4 Επίδραση των κανναβινοειδών στην φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η ενεργοποίηση των κανναβινοειδικών υποδοχέων επάγει τη φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών σε διαφορετικά παραδείγματα (Bouaboula και συν., 1995[•] Wartmann και συν., 1995), ενώ οι προ-επιβιωτικές δράσεις της ενεργοποίησης του CB1 υποδογέα φαίνεται να εμπλέκουν την ενεργοποίηση των ERK1/2 (Galve-Roperh και συν., 2002). Για τη διερεύνηση του κατά πόσον οι ERK1/2 κινάσες εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των HU-210 και AEA έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανοσοαποτύπωσης με χρήση αντισωμάτων έναντι της φωσφορυλιωμένης και συνολικής μορφής των πρωτεϊνών ERK1/2. Οι ERK1/2 εντοπίστηκαν σε δύο διακριτές μπάντες των 42 και 44 kDa (Εικόνα 4.18Α). Μελέτες ποσοτικοποίησης έδειξαν ότι ο λόγος φωσφορυλιωμένης προς συνολικής ERK1/2 αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στους ιστούς που έλαβαν AMPA + AEA (n=4, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA) συγκριτικά με τους ιστούς ελέγχου (n=5) ή τους ιστούς που έλαβαν AMPA (n=5). Αντιθέτως, το HU-210 δεν είχε καμία επίδραση στην φωσφορυλίωση των ERK1/2 (AMPA+HU-210, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με την ΑΕΑ, Εικόνα 4.18B). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των MEK/ERK1/2 εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις της ΑΕΑ, αλλά όχι του HU-210.


Εικόνα 4.18 Μελέτη της εμπλοκής του σηματοδοτικού μονοπατιού MEK/ERK1/2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Α. Αντιπροσωπευτική εικόνα των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Β. Ποσοτικοποίηση των μελετών ανοσοαποτύπωσης. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 μεταξύ CTRL και AMPA. Η ΑΕΑ προκάλεσε αύξηση της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 συν-χορηγούμενη με AMPA (*** p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###} p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺ p<0.001 συγκριτικά με το +HU-210). Το HU-210 δεν είχε καμία επίπτωση στη φωσφορυλίωση των ERK1/2.

ΕΝΟΤΗΤΑ 5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΩΣ ΝΕΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ

Πέραν της εξωγενούς χορήγησης κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή, ένας έμμεσος τρόπος για την αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκανναβινοειδών στη σύναψη είναι η αναστολή του καταβολισμού τους. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δύο αναστολείς των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι.

4.5.1 Μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων των AM6642 (αναστολέας της FAAH) και AM9928 (διπλός αναστολέας των FAAH/MGL)

Ο αναστολέας της υδρολάσης των αμιδίων των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH) μειώνει το μεταβολισμό της ΑΕΑ και επομένως αυξάνει τα επίπεδά της στη σύναψη. Αντίστοιχα, ο αναστολέας της λιπάσης της μονοακυλογλυκερόλης (MonoacylGlycerol Lipase, MGL) αυξάνει τα επίπεδά του 2AG στη σύναψη μειώνοντας τον μεταβολισμό του.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι ο αναστολέας της FAAH, AM6642, παρείχε μερική προστασία έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας αυξάνοντας τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο φτάνοντας το 46% και 40% των επιπέδων της ομάδας ελέγγου στις δόσεις των 10^{-5} και 10^{-4} M, αντίστοιχα (Εικόνα 4.19A, AMPA+AM6642 10^{-6} M, 17.1 ± 4.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL $^{-10^{-5}}$ M, 40.9 ± 5.5 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ##p<0.01 συγκριτικά με το AMPA⁻ 10⁻⁴ M, 36.6 ± 3.5 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ##p<0.01 συγκριτικά με το AMPA). Ο διπλός αναστολέας των FAAH/MGL παρείχε αποτελεσματικότερη νευροπροστασία, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, φτάνοντας το 62% και 77% των επιπέδων της ομάδας ελέγχου στις δόσεις των 10^{-5} και 10^{-4} M, αντίστοιχα (Εικόνα 4.19B, AMPA+AM9928, 10⁻⁶ M, 33.0 ± 18.0 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL⁻ 10⁻⁵ M, 51.3 ± 12.4 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, 10⁻⁴ M⁻ 94.0 \pm 13.9 κύτταρα ανά τομή, n=3, **p<0.01 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο αναστολέας της FAAH, αυξάνοντας τα επίπεδα της ΑΕΑ στη σύναψη, μιμείται τις δράσεις της ΑΕΑ και δρα ως μερικός αγωνιστής. Η αποτελεσματικότερη νευροπροστατευτική δράση του διπλού αναστολέα ΑΜ9928 πιθανότατα οφείλεται στο ότι ο ΑΜ9928 αυξάνει τόσο την ΑΕΑ όσο και το 2-AG και επομένως η παρουσία του 2-AG ενισχύει τη νευροπροστασία.

Η εμπλοκή του CB1 υποδογέα στις δράσεις των ΑΜ6642 και ΑΜ9928 μελετήθηκε με συν-χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή AM251 με AMPA και AM6642 ή ΑΜ9928. Ο ΑΜ251 αναίρεσε τις νευροπροστατευτικές δράσεις των δύο αναστολέων (Εικόνα 4.19Γ, AMPA+AM6642+AM251, 17.1 ± 2.7 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ⁺p<0.05 συγκριτικά με το AMPA+AM664⁺ Εικόνα 4.19Δ, AMPA+AM9928+AM251, 11.9 ± 2.9 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, +++p<0.001 συγκριτικά με το AMPA+AM9928). Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει την εμπλοκή του CB1 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των δύο αναστολέων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών, γεγονός που ήταν αναμενόμενο εφόσον ο CB1 υποδοχέας εμπλέκεται στη νευροπροστασία που παρέχουν τα ίδια τα ενδοκανναβινοειδή ΑΕΑ και 2-AG.

Μελετήθηκε επίσης η εμπλοκή του CB2 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις του AM9928, με χρήση αγρίου τύπου και CB2^{-/-} μυών. Όπως και στις μελέτες των νευροπροστατευτικών δράσεων του 2-AG σε WT και CB2^{-/-} (**Εικόνα 4.13**) έτσι και στην παρούσα μελέτη το AM9928 παρείχε προστασία τόσο στα αγρίου τύπου όσο και στα CB2^{-/-} ζώα (**Εικόνα 4.19E**, WT + 2-AG, 24.6 ± 2.8 κύτταρα ανά τομή, n=3⁻ CB2⁺ + 2-AG, 24.0 ± 7.0 κύτταρα ανά τομή, n=3). Εφόσον ο AM9928 αναστέλλει τον καταβολισμό τόσο της AEA (CB1/CB2 αγωνιστής) όσο και του 2-AG (CB1 αγωνιστής), το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει τη μη εμπλοκή του CB2 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις της AEA.



Εικόνα 4.19 Επίδραση του αναστολέα της FAAH AM6642 και του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL AM9928 στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας. A. Νευροπροστατευτική δράση του AM6642. Το AM6642 συν-χορηγούμενο με AMPA παρείχε προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα στη συγκέντρωση 10⁻⁵ M (*** p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05 συγκριτικά με το AMPA). **B.** Νευροπροστατευτική δράση του AM9928. Νευροπροστατευτική δράση άσκησε και ο διπλός αναστολέας των FAAH/MGL AM9928 (*p<0.05, *** p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###} p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). **Γ,Λ.** Εμπλοκή του CB1 υποδοχέα στις δράσεις των AM6642 και AM9928. Παρουσία του CB1 ανταγωνιστή AM251 αναιρέθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις των AM6642 και AM9928 (*** p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05, ^{####} p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺p<0.05, ⁺⁺⁺ p<0.05 συγκριτικά με το CTRL, [#] p<0.05, ^{####} p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺p<0.05, ⁺⁺⁺⁺ p<0.05 συγκριτικά με το CTRL, [#] p<0.05, ^{####} p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺ p<0.05, ⁺⁺⁺⁺ p<0.05 συγκριτικά με το +AM6642 ή AM9928, αντίστοιχα). **Ε.** Εμπλοκή του CB2 υποδοχέα στις δράσεις του AM9928. Το AM9928 παρείχε προστασία στους αμφιβληστροειδείς τόσο των αγρίου τύπου όσο και των CB2^{-/-} ζώων.

<u>4.5.2</u> Επίδραση του αναστολέα της FAAH AM6642 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών

Προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσον η συν-χορήγηση των συνθετικών ή ενδογενών κανναβινοειδών με τους αναστολείς των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερη νευροπροστασία πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μελέτες.

Για την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων των κανναβινοειδών στη σύναψη, έγινε συν-γορήγηση AMPA με AM6642 (10^{-5} M) και AEA (10^{-7} M) ή HU-210 (10^{-7} M) ή MethAEA (10-7 M). Ακολούθησαν ανοσοϊστογημικές μελέτες έναντι της bNOS και ποσοτικοποίηση των ανοσοϊστοχημικών δεδομένων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.20. Συν-χορήγηση ΑΜΡΑ μαζί με ΑΕΑ και ΑΜ6642 δεν παρείχε περαιτέρω προστασία στον ιστό από την ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητα, αντιθέτως επανέφερε τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων στα επίπεδα των ιστών που έλαβαν AMPA (Εικόνα 4.20A, AMPA+ AM6642+AEA, 21.7 ± 1.4 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν όταν το HU-210 συν-χορηγήθηκε με AMPA και AM6642 (Εικόνα 4.20B, AMPA+ AM6642+HU-210, 13.9 ± 2.6 kúttapa avá tomá, n=3, ***p<0.001 suykpitiká me to CTRL). Σε αντίθεση με τα ΑΕΑ και HU-210, η MethAEA συν-γορηγούμενη με AMPA και AM6642 παρείχε προστασία στον ιστό (Εικόνα 4.20Γ, ΑΜΡΑ+ AM6642+MethAEA, 54.1 ± 5 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ###p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, η συν-χορήγηση AMPA με AM6642 και AEA ή HU-210 αναιρεί τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών και του ΑΜ6642, κάτι που δε συμβαίνει στην περίπτωση της MethAEA.



Εικόνα 4.20 Επίδραση του αναστολέα της FAAH AM6642 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών A,B. Επίδραση των AEA και HU-210 στις νευροπροστατευτικές δράσεις του AM6642. Παρουσία AEA ή HU-210 ο αναστολέας της FAAH AM6642, δεν κατάφερε να προστατεύσει τον ιστό από την AMPA διεγερσιτοξικότητα, όπως προέκυψε από μελέτες ποσοτικοποίησης των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων (A, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{*}p<0.05, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το +AEA+AM6642, B, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το +HU-210+AM6642, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το +AMPA, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το +HU-210+AM6642, ^{****}p<0.001 συγκριτικά με το +AM6642). Γ. Η MethAEA συν-χορηγούμενη με AMPA+AM6642 εξακολούθησε να παρέχει προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά κύτταρα (^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το +HU-210+AM6642.

<u>4.5.3</u> Επίδραση του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL AM9928 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών

Τα ενδογενή κανναβινοειδή AEA, 2-AG συν-χορηγήθηκαν με AMPA+AM9928. Τα αποτελέσματα των μελετών ποσοτικοποίησης των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.21**. Η συν-χορήγηση AEA ή 2-AG με AMPA+AM9928 ανέστειλε τις νευροπροστατευτικές δράσεις της AEA και μείωσε τις νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG (**Εικόνα 4.21** AMPA+AM9928+AEA, 8.1 ± 2.2 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.001 συγκριτικά με το AMPA' AMPA+AM9928+2-AG, 33.8 ± 9.5 κύτταρα ανά τομή, n=6, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.001 συγκριτικά με το AMPA). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τη συν-χορήγηση των συνθετικών κανναβινοειδών HU-210 και MethAEA (**Εικόνα 4.22**, AMPA+AM9928+HU-210, 31.8 ± 3.9 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL' AMPA+AM9928+MethAEA, 9.5 ± 1.9 κύτταρα ανά τομή, n=3, ***p<0.001 συγκριτικά με το CTRL). Όπως και κατά την συν-χορήγηση AM6642 με τα ενδοκανναβινοειδή AEA ή 2-AG έτσι και στην περίπτωση της συν-χορήγησης των κανναβινοειδών με το διπλό αναστολέα AM9928 μειώθηκαν ή αναιρέθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις.

Η μείωση της νευροπροστατευτικής δράσης των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδογενών κανναβινοειδών παρουσία των κανναβινοειδών θα μπορούσε να οφείλεται σε απευαισθητοποίηση και μειορύθμιση (down regulation) των CB1 υποδοχέων, κάτι που πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.



Εικόνα 4.21 Επίδραση του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL AM9928 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των ενδογενών κανναβινοειδών Α. Επίδραση της ΑΕΑ στις νευροπροστατευτικές δράσεις του AM9928. Παρουσία ΑΕΑ ο αναστολέας AM9928, δεν παρείχε προστασία στον ιστό από την AMPA διεγερσιτοζικότητα, όπως προέκυψε από μελέτες ποσοτικοποίησης των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων (^{**}p<0.01, ^{****}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το +AEA+AM9928) **B.** Επίδραση της 2-AG στις νευροπροστατευτικές δράσεις του AM9928. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τη συν-χορήγηση 2-AG με AMPA+AM9928 (^{****}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, [#]p<0.05, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ⁺⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺⁺p<0.001 συγκριτικά με το +2-AG +AM9928).



Εικόνα 4.22 Επίδραση του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL AM9928 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των συνθετικών κανναβινοειδών Α. Επίδραση του HU-210 στις νευροπροστατευτικές δράσεις του AM9928. Παρουσία HU-210 ο αναστολέας AM9928, δεν παρείχε προστασία στον ιστό από την AMPA διεγερσιτοξικότητα, όπως προέκυψε από μελέτες ποσοτικοποίησης των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων (^{*}p<0.05, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{*}p<0.05, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το +HU-210+AM9928) **B.** Επίδραση της MethAEA στις νευροπροστατευτικές δράσεις του AM9928. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τη συν-χορήγηση MethAEA με AMPA+AM9928 (^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{###}p<0.01, ^{####}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{+**}p<0.01, ^{####}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{***}p<0.01 συγκριτικά με το AMPA, ^{***}p<0.01, ^{****}p<0.001 συγκριτικά με το CTRL, ^{****}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{***}p<0.001 συγκριτικά με το AMPA, ^{****}p<0.001 συγκριτικά με το +MethAEA +AM9928).

<u>κεφαλαίο 5:</u> ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών, καθώς και αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών, σε ένα *in vivo* μοντέλο AMPA διεγερσιτοξικότητας, καθώς και στη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτές τις δράσεις. Τα κυριότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ότι τόσο τα ενδογενή και συνθετικά κανναβινοειδή όσο και οι αναστολείς των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών παρέχουν προστασία των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς από την AMPA διεγερσιτοξικότητα. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές αυτές δράσεις φαίνεται να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του κανναβινοειδικού CB1 υποδοχέα αλλά και των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt ή/και MEK/ERK1/2.

Πρώτο βήμα στην επίτευξη του παραπάνω στόχου ήταν η πρόκληση διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή και η μελέτη των επιπτώσεων της στον ιστό. Το μοντέλο της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας έχει χρησιμοποιηθεί και παλαιότερα στο εργαστήριό μας για τη μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων άλλων μορίων, όπως η σωματοστατίνη (Kiagiadaki και Thermos, 2008' Kokona και συν., 2012b) και τα νευροστεροειδή (Kokona και συν., 2012a). Σύμφωνα με τη μελέτη των Kiagiadaki και Thermos (2008), η ενδοϋαλοειδική χορήγηση AMPA (42nmol/οφθαλμό) σε οφθαλμό επίμυ, προκάλεσε απώλεια χολινεργικών και bNOSανοσοδραστικών κυττάρων, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε αυξημένος κυτταρικός θάνατος σε όλο το μήκος του αμφιβληστροειδούς 24 ώρες μετά την ενδοβολβική χορήγηση (Kiagiadaki και Thermos, 2008). Πέραν των βραχύινων GABAεργικών κυττάρων, τα calbindin-ανοσοδραστικά κύτταρα (οριζόντια και δίπολα κύτταρα που συνδέονται με κωνία) φαίνεται επίσης να μειώνονται παρουσία του AMPA (Kokona και συν., 2012a), ενώ οι δείκτες φωτοϋποδεκτικών, ντοπαμινεργικών και γαγγλιακών κυττάρων δεν επηρεάζονται (Kiagiadaki και Thermos, 2008).

Χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημικούς δείκτες έναντι στη α) bNOS για τη σήμανση των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν την NOS, β) έναντι στην ChAT για τη σήμανση των χολινεργικών βραχύινων κυττάρων και γ) έναντι στην πρωτεΐνη calbindin για τη σήμανση των οριζόντιων και μιας ομάδας βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη calbindin σύμφωνα με τις μελέτες των Kiagiadaki και Thermos (2008) και Kokona και συν. (2012a). Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν αρχικά με στόχο τη μελέτη των διεγερσιτοξικών επιδράσεων του AMPA. Το ΑΜΡΑ προκάλεσε μείωση της έκφρασης των τριών αυτών δεικτών στον αμφιβληστροειδή (Εικόνες 4.1, 4.2, 4.3), ενώ η χρώση TUNEL έδειξε αυξημένο κυτταρικό θάνατο στους ιστούς που έλαβαν AMPA και συγκεκριμένα στις στιβάδες ONL, όπου εντοπίζονται τα οριζόντια κύτταρα και στις στιβάδες INL και GCL, όπου εντοπίζονται τα βραχύινα και έκτοπα βραχύινα κύτταρα, αντίστοιχα (Εικόνες 4.6, 4.8). Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Kiagiadaki και Thermos, 2008⁻ Kokona και συν., 2012a).

Τα χολινεργικά κύτταρα φαίνεται να επηρεάζονται αρνητικά και από το καϊνικό και κισκαλικό οξύ (μη-NMDA αγωνιστές), όπως προκύπτει από παλαιότερες μελέτες (Osborne και συν., 1995a' Fischer και συν., 1998), ενώ μελέτες συν-εντοπισμού της ChAT με αντισώματα για τις διαφορετικές υπομονάδες του AMPA υποδοχέα, δείχνουν ότι όλες οι υπομονάδες του ΑΜΡΑ υποδοχέα είναι παρούσες σε αυτή την ομάδα βραχύινων κυττάρων (Firth και συν., 2003 Grunder, 2000). Παρομοίως, τα οριζόντια κύτταρα φαίνεται να είναι πλούσια σε υποδοχείς AMPA (Yang, 2004), όπως έχει ήδη αναφερθεί στην «Εισαγωγή». Όσον αφορά τα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα που φαίνεται να επηρεάζονται από το διεγερτικό αμινοξύ ΑΜΡΑ δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να υποστηρίζουν συγκεκριμένη κατανομή των υπομονάδων του AMPA υποδοχέα στα εν λόγω κύτταρα. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην «Εισαγωγή», όλοι οι τύποι βραχύινων κυττάρων φαίνεται να εκφράζουν υποδοχείς AMPA και καϊνικού οξέος (Hughes και συν., 1992 Müller και συν., 1992. Hammassaki-Britto και συν., 1993. Brandstätter και συν., 1994, 1998. Duvoisin και συν., 1995' Peng και συν., 1995' Koulen και συν., 1996, 1997' Qin και Pourcho, 1996 Ghosh και συν., 2001 Grunert και συν., 2002). Επομένως η τοξική επίδραση του ΑΜΡΑ στα εν λόγω κύτταρα θα μπορούσε να είναι είτε άμεση ή έμμεση.

Οι AMPA υποδοχείς συντίθενται από το συνδυασμό των υπομονάδων GluR1 έως και GluR4. Η υπομονάδα GluR2 κατέχει διακριτό ρόλο καθώς καθιστά τον υποδοχέα αδιαπέραστο σε ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺) δίνοντας στα κύτταρα που τη φέρουν την ικανότητα να ανθίστανται στις τοξικές επιπτώσεις του AMPA (Liu και συν., 2007). Επομένως, η ευπάθεια του καθενός εκ των πέντε κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς στη διεγερσιτοξικότητα εξαρτάται από το συνδυασμό των υποδοχέων GluR1-GluR4 που φέρουν. Ο αριθμός των υποδοχέων γλουταμινικού που φέρει κάθε κύτταρο επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευπάθεια του κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας. Επομένως, μελέτες συνεντοπισμού του δείκτη bNOS με

Συζήτηση 103

δείκτες για τη σήμανση των διαφορετικών υπομονάδων που συγκροτούν τους AMPA υποδοχείς θα μπορούσαν να δώσουν πληροφορίες για τη δράση του AMPA στα bNOS-ανοσοδραστικά βραχύινα κύτταρα.

Παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι το ΑΜΡΑ προκάλεσε μείωση του αριθμού των bNOS-ανοσοδραστικών βραχύινων κυττάρων, χολινεργικών βραχύινων κυττάρων (Kiagiadaki και Thermos, 2008) και οριζόντιων κυττάρων (Kokona και συν., 2012a) αλλά δεν είχε καμία επίπτωση στη βιωσιμότητα των φωτοϋποδεκτικών, των δίπολων συνδεδεμένων με κωνία και των γαγγλιακών κυττάρων (Kiagiadaki και Thermos, 2008). Παλαιότερες μελέτες σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα και αναπτυξιακά στάδια, υποστηρίζουν την ύπαρξη ΑΜΡΑ υποδοχέων διαπερατών σε ασβέστιο (CP-GluARs) σε οριζόντια, βραχύινα και γαγγλιακά κύτταρα, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο στοιχεία που υποστηρίζουν την ευαισθησία των εν λόγω κυττάρων στην διεγερσιτοξικότητα από AMPA (για μια πρόσφατη ανασκόπηση βλέπε Diamond, 2011). Παρ' όλο που και τα γαγγλιακά κύτταρα φαίνεται να φέρουν CP-GluARs, στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη τα γαγγλιακά κύτταρα δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση AMPA (Kiagiadaki και Thermos, 2008). Σε παλαιότερες μελέτες, οι Ullian και συν. (2004) έδειξαν ότι τα διεγερτικά αμινοξέα NMDA, AMPA και καϊνικό οξύ δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο σε καλλιέργειες γαγγλιακών κυττάρων. Επίσης, σε έκτοπες καλλιέργειες αμφιβληστροειδούς το NMDA προκάλεσε κυτταρικό θάνατο σε βραχύινα κύτταρα στην INL και έκτοπα βραχύινα κύττταρα στη GCL αλλά όχι στα γαγγλιακά κύτταρα (Ullian και συν., 2004). Οι μελέτες των Ullian και συν. συμφωνούν με τις μελέτες του εργαστηρίου μας και υποστηρίζουν τη μειωμένη ευαισθησία των γαγγλιακών κυττάρων στη διεγερσιτοξικότητα. Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι το μεγάλο κυτοσόλιο που φέρουν τα γαγγλιακά κύτταρα μπορεί να δρα ρυθμιστικά, μειώνοντας τη συσσώρευση ασβεστίου ενδοκυτταρικά και έτσι καθιστά τα γαγγλιακά κύτταρα λιγότερο ευάλωτα στη διεγερσιτοξικότητα (Fischer και συν., 1998). Επομένως, η αδυναμία του AMPA να επηρεάσει αρνητικά τα γαγγλιακά κύτταρα πιθανότατα οφείλεται στο μεγάλο κυτοσόλιο των εν λόγω κυττάρων.

Η χορήγηση διεγερτικών αμινοξέων αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή για τη μελέτη των νευροπροστατευτικών δράσεων διαφόρων μορίων, συμπεριλαμβανομένων και των κανναβινοειδών. Αν και οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν το

Συζήτηση 104

μοντέλο της NMDA διεγερσιτοξικότητας (Schuettauf και συν. 2011 Lafuente και συν., 2002. Wang και συν., 2002. Chidlow και Osborne, 2003. Zhang και συν., 2003), όπου επηρεάζονται τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, είναι εξίσου σημαντική η μελέτη των πιο άμεσων επιπτώσεων της διεγερσιτοξικότητας σε άλλους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς που αφορούν στα πρώιμα στάδια των αμφιβληστροειδοπαθειών. Τα βραχύινα (Osborne και Herrera, 1994' Siliprandi και συν., 1992. Kapin και συν., 1999. Osborne και συν., 1995a,b. Gastinger και συν., 2006 Barber και συν., 1998) και τα οριζόντια κύτταρα (Kuroiwa και συν., 1998 Rábl και συν., 2002) φαίνεται να είναι ιδιαιτέρως ευπαθή σε ισχαιμικές καταστάσεις και θεωρούνται σημαντικοί τύποι κυττάρων για τη φυσιολογία του αμφιβληστροειδούς. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί στο παρελθόν κυτταρικός θάνατος σε ομάδες βραχύινων κυττάρων (χολινεργικά και ντοπαμινεργικά βραχύινα κύτταρα) σε μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Gastinger και συν., 2006). Επίσης, πρόσφατα αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου μας υποστηρίζουν τη μείωση των bNOS-και ChAT-ανοσοδραστικών κυττάρων σε in vivo μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (μοντέλο στρεπτοζοτοκίνης).

Όλα όσα προαναφέρθηκαν, καθιστούν σαφές ότι το μοντέλο της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των πρώιμων επιπτώσεων της ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή και κατ' επέκταση του πρώιμου σταδίου των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών. Χρησιμοποιώντας λοιπόν το εν λόγω μοντέλο θελήσαμε να μελετήσουμε τις πιθανές νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών. Δεδομένου ότι μέχρι σήμερα η έρευνα γύρω από τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή έχει εστιάσει στη βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης των νευροπροστατευτικών δράσεων των κανναβινοειδών σε βραχύινα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς καθώς και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτές τις δράσεις.

Αρχικά μελετήθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις του ενδοκανναβινοειδούς ΑΕΑ έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας με χρήση ανοσοϊστοχημικών μελετών. Η ΑΕΑ, συν-χορηγούμενη με ΑΜΡΑ, παρείχε μερική προστασία έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας, αυξάνοντας τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών (Εικόνα 4.1) και χολινεργικών βραχύινων κυττάρων (Εικόνα 4.2) αλλά και την ανοσοδραστικότητα της calbindin (Εικόνα 4.3). Η ΑΕΑ είναι ένα από τα περισσότερο μελετημένα ενδοκανναβινοειδή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Θεωρείται μερικός αγωνιστής των CB1 (Mackie και συν., 1993[•] Burkey και συν., 1997[•] Glass και Northup, 1999), και CB2 υποδοχέων (Gonsiorek και συν., 2000[•] Sugiura και συν., 2000), ενώ φαίνεται να προσδένεται και σε άλλους υποδοχείς όπως ο TRPV1 υποδοχέας των βανιλλοειδών (Caterina και συν., 1997[•] Zygmunt και συν.,1999). Η ΑΕΑ έχει βρεθεί να μειώνεται σε μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στον αμφιβληστροειδή και η μείωση αυτή φαίνεται να συνδέεται με την απώλεια γαγγλιακών κυττάρων που παρατηρείται στο εν λόγω μοντέλο (Nucci και συν., 2007). Ωστόσο, το ενδογενές αυτό κανναβινοειδές φαίνεται να διαδραματίζει είτε νευροπροστατευτικό είτε νευροτοξικό ρόλο σε διαφορετικούς ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος και σε διαφορετικά πειραματικά παραδείγματα (Mechoulam και συν., 2003[•] Vander Stelt και Di Marzo, 2005).

Οι νευροπροστατευτικές δράσεις του ενδογενούς 2-AG και των συνθετικών κανναβινοειδών MethAEA και HU-210 μελετήθηκαν επίσης ως προς την ικανότητα τους να προστατεύσουν τα bNOS-ανοσοδραστικά και χολινεργικά βραχύινα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Τόσο το ενδογενές 2-AG όσο και τα συνθετικά MethAEA και HU-210 παρείχαν προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα (**Εικόνα 4.4**), δρώντας ως πλήρεις αγωνιστές, προσεγγίζοντας τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Η AEA έδρασε ως μερικός αγωνιστής φτάνοντας περίπου το 56% των επιπέδων της ομάδας ελέγχου, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Mackie και συν., 1993⁻ Burkey και συν., 1997⁻ Glass και Northup, 1999) όπου αναφέρεται η δράση της ως μερικός αγωνιστής στην προστασία που παρείχε στα ChAT-ανοσοδραστικά κύτταρα (**Εικόνα 4.5.B**).

Οι διεγερσιτοξικές επιπτώσεις του διεγερτικού αμινοξέος AMPA καθώς και οι νευροπροστατευτικές δράσεις των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών επαληθεύτηκαν με χρήση της τεχνικής TUNEL, μιας ευρέως χρησιμοποιούμενης τεχνικής για τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου. Τόσο σε ιστούς επίμυων όσο και σε ιστούς μυών η χρώση TUNEL εντοπίστηκε κυρίως στις στιβάδες ONL, INL και GCL όπου βρίσκονται τα οριζόντια, και bNOS-ανοσοδραστικά και χολινεργικά βραχύινα κύτταρα, αντίστοιχα (Εικόνες 4.6 και 4.8). Συγκεκριμένα, σε αμφιβληστροειδείς επίμυ που έλαβαν AMPA ο αριθμός TUNEL-θετικών κυττάρων βρέθηκε περίπου 18,5 φορές υψηλότερος συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Εν αντιθέσει, συνχορήγηση AMPA με HU-210 ή AEA προκάλεσε μείωση των TUNEL-θετικών

κυττάρων κατά 45% και 71%, αντίστοιχα (Εικόνα 4.6). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στους αμφιβληστροειδείς αγρίου τύπου μυών. Δωδεκάμισι (12,5) φορές περισσότερα TUNEL-θετικά κύτταρα παρατηρήθηκαν στους ιστούς που έλαβαν AMPA συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ παρουσία 2-AG ο αριθμός αυτός μειώθηκε κατά περίπου 30,5% (Εικόνα 4.8). Επιπρόσθετα, μελέτες αιματοξυλίνης-ηωσίνης αποκάλυψαν μείωση του πάχους του αμφιβληστροειδούς παρουσία AMPA, και συγκεκριμένα της στιβάδας INL. Το πάχος του ιστού επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα όταν συν-χορηγήθηκε AMPA+HU-210 (Εικόνα 4.7). Οι τοξικές αυτές δράσεις του AMPA οφείλονται σε ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων καθώς η παρουσία του μη-NMDA ανταγωνιστή DNQX μείωσε την απώλεια bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων αλλά και τον αριθμό των TUNELθετικών κυττάρων που παρατηρήθηκαν παρουσία του AMPA (Εικόνα 4.9).

Τα αποτελέσματα των μελετών TUNEL αποκαλύπτουν τις τοξικές επιδράσεις του διεγερτικού αμινοξέος AMPA και την ικανότητα του να προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε νευρώνες του αμφιβληστροειδούς. Ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρήθηκε παρουσία ΑΜΡΑ μπορεί να οφείλεται είτε σε απόπτωση είτε σε νέκρωση είτε σε συνδυασμό των δύο αυτών μηχανισμών. Μόρια κλειδιά στην επαγωγή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου αποτελούν οι πρωτεΐνες κασπάσες και ειδικότερα η κασπάση-3. Με στόχο τη διερεύνηση του κατά πόσον εμπλέκονται αποπτωτικές διαδικασίες στη μείωση των αμφιβληστροειδικών νευρώνων που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε φαρμακολογική μελέτη όπου έγινε συν-χορήγηση ενός αναστολέα της κασπάσης-3 (Z-DEVD-FMK) μαζί με AMPA. Η παρουσία του Z-DEVD-FMK στον ιστό δε μετέβαλε τον αριθμό των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων, συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν μόνο ΑΜΡΑ, σε καμία από τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις (Εικόνα 4.10Α). Η τεχνική TUNEL επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών μελετών, καθώς ο Z-DEVD-FMK συν-χορηγούμενος με AMPA δεν είχε καμία επίπτωση στον αριθμό των TUNEL-θετικών κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν μόνον AMPA (Εικόνα 4.10Β,Γ). Τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 δεν εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται σε νευρώνες του αμφιβληστροειδούς μετά από χορήγηση ΑΜΡΑ. Επιπρόσθετα, έγιναν μελέτες ανοσοαποτύπωσης με χρήση αντισωμάτων έναντι της φωσφορυλιωμένης και της συνολικής μορφής των κινασών SAPK/JNK. Η σηματοδότηση μέσω SAPK/JNK διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Sluss και συν.,

1994[•] Tang και συν., 2002[•] Lin, 2003). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο λόγο φωσφορυλιωμένων προς συνολικών SAPK/JNK μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ζώων που έλαβαν AMPA. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ του ότι ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρείται παρουσία AMPA δεν είναι αποπτωτικός.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των κινασών SAPK/JNK φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο και στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε νευρώνες του αμφιβληστροειδούς. Πρόσφατα οι Donovan και συν. (2011) πρότειναν ότι η ενεργοποίηση του εν λόγω μονοπατιού προκαλεί απόπτωση των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς ex vivo, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Επιπλέον, σε ένα in vivo μοντέλο αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης JNK και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 παρατηρήθηκαν αυξημένα σε αμφιβληστροειδή επίμυος (Liu και συν., 2011). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δε βρίσκονται σε συμφωνία με τις παλαιότερες έρευνες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παρ' όλα αυτά, προγενέστερη των προηγούμενων μελέτη υποστηρίζει ότι διαφορετικά διεγερτικά αμινοξέα έχουν διαφορετική δράση στον ιστό του αμφιβληστροειδούς όσον αφορά την επαγωγή αποπτωτικού ή νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου (Ientile και συν., 2001). Συγκεκριμένα, στην εν λόγω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα διεγερτικά αμινοξέα NMDA, AMPA και καϊνικό οξύ με στόχο τη μελέτη των επιπτώσεων τους σε αμφιβληστροειδείς εμβρύων κοτόπουλων in vitro. Ακολούθησαν μελέτες TUNEL, μελέτες απελευθέρωσης γαλακτικής αφυδρογονάσης, μελέτες ανοσοαποτύπωσης καθώς και μελέτες δραστηριότητας πρωτεασών. Το NMDA οδήγησε σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης πρωτεασών συγγενών της κασπάσης-3, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε παρουσία AMPA ή καϊνικού (Ientile και συν., 2001). Επιπλέον, η μορφή κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται μετά από εξωγενή χορήγηση διεγερτικών αμινοξέων φαίνεται να εξαρτάται και από το χρονικό πλαίσιο της κάθε πειραματικής προσέγγισης. Για παράδειγμα οι Joo και συν. (1999) έκαναν λόγω για νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στις στιβάδες INL και GCL τέσσερις ώρες μετά την πρόκληση αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο τρεις ημέρες μετά. Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε μόνον η εμπλοκή της κασπάσης-3 στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρήθηκε παρουσία ΑΜΡΑ, μπορούμε να καταλήξουμε ότι ο κυτταρικός θάνατος ήταν ανεξάρτητος της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και θα μπορούσε να περιλαμβάνει μηγανισμούς νεκρωτικού ή νεκροπτωτικού κυτταρικού

Συζήτηση 108

θανάτου. Ωστόσο, δε μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα ως προς τον τύπο του κυτταρικού θανάτου που παρατηρήθηκε. Επομένως, περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες ώστε να μας δώσουν στοιχεία για τους μηχανισμούς που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται στην παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα που έχουν συζητηθεί μέχρι τώρα μαρτυρούν την τοξική δράση του ΑΜΡΑ στον ιστό του αμφιβληστροειδούς και τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Αν και η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη ένδειξη των νευροπροστατευτικών δράσεων των κανναβινοειδών κυρίως σε βραχύινα αλλά και σε οριζόντια κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την προστατευτική δράση του κανναβινοειδικού συστήματος σε διαφορετικά μοντέλα διεγερσιτοξικότητας/νευροεκφύλισης όπου επηρεάζουν διαφορετικές ομάδες αμφιβληστροειδικών νευρώνων. Συγκεκριμένα, οι El-Remessy και συν. (2003), χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο NMDA διεγερσιτοξικότητας σε αμφιβληστροειδή επίμυος, έδειξαν ότι n συστημική χορήγηση του φυτοκανναβινοειδούς ΤΗC (τετραϋδροκανναβινόλη) παρείχε προστασία στον αμφιβληστροειδή, μειώνοντας τα TUNEL-θετικά κύτταρα στις στιβάδες INL και GCL και αναστρέφοντας τη συρρίκνωση του αμφιβληστροειδούς που παρατηρήθηκε παρουσία του NMDA, μέσω ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα. Η μείωση των TUNEL-θετικών κυττάρων στις στιβάδες INL και GCL θα μπορούσε να θεωρηθεί ως κυτταρικός θάνατος ομάδων βραχύινων κυττάρων, καθώς τα εν λόγω κύτταρα εντοπίζονται στις προαναφερόμενες στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Επιπλέον, η ομάδα του Nucci και συν. (2007) έδειξε ότι η ενδοϋαλοειδική χορήγηση του συνθετικού κανναβινοειδούς MethAEA παρείχε προστασία στα γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς σε ένα μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, του μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων CB1 και TRPV1. Πέραν των γαγγλιακών κυττάρων, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι το συνθετικό κανναβινοειδές HU-210 παρέγει προστασία στα κωνιοφόρα και ραβδιοφόρα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς σε ένα μοντέλο μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε επίμυες (Lax και συν., 2014). Όλες οι προαναφερόμενες μελέτες υποστηρίζουν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς.

Επόμενο βήμα της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της εμπλοκής των κανναβινοειδικών CB1 και CB2 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Σαν πρώτο βήμα χρησιμοποιήθηκαν ανταγωνιστές των παραπάνω

υποδοχέων, οι οποίοι συν-χορηγήθηκαν ενδοϋαλοειδικά μαζί με ΑΜΡΑ και συνθετικά ή ενδογενή κανναβινοειδή. Παρουσία των CB1 ή CB2 ανταγωνιστών αναστάλθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις τόσο των ενδογενών όσο και των συνθετικών κανναβινοειδών (Εικόνα 4.11). Το αποτέλεσμα αυτό πρότεινε την ύπαρξη τόσο του CB1 όσο και του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή και την εμπλοκή τους στη νευροπροστατευτική δράση των κανναβινοειδών.

Τα κανναβινοειδή είναι γνωστό ότι προσδένονται στους CB1 και CB2 υποδοχείς τους οποίους και ενεργοποιούν. Η κατανομή των κανναβινοειδικών υποδοχέων στον ιστό του αμφιβληστροειδούς έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια και διαφορετικές ερευνητικές ομάδες κάνουν λόγω για εντοπισμό τόσο του CB1 όσο και του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών. Ο CB1 υποδοχέας φαίνεται να εκφράζεται σε μεγάλη έκταση στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών, συμπεριλαμβανομένων των οριζοντίων κυττάρων, των GABAεργικών βραχύινων κυττάρων (Yazulla και συν., 1999) αλλά και της στιβάδας OPL (Straiker και συν., 1999). Όσον αφορά τον CB2 υποδοχέα η πρώτη μελέτη που έκανε λόγο για ύπαρξη του υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή ήταν η μελέτη των Lu και συν. (2000), όπου μελέτες RT-PCR και in situ υβριδοποίησης υποστήριξαν την παρουσία του CB2 mRNA σε αμφιβληστροειδή επίμυ. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, οι López και συν. (2011) χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μελέτες έναντι του CB2 υποδοχέα πρότειναν τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό του CB2 υποδοχέα στο μελάχρουν επιθήλιο, τα εσωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων, σε οριζόντια και βραχύινα κύτταρα, στη στιβάδα IPL αλλά και σε κύτταρα που εντοπίζονται στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Τρία χρόνια αργότερα, τα αποτελέσματα της μελέτης των López και συν. (2011) αμφισβητήθηκαν από τους Cécyre και συν. (2014), σύμφωνα με τους οποίους η πλειονότητα των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται έναντι του CB2 υποδοχέα, δεν είναι εκλεκτικά για τον υποδογέα. Σύμφωνα με τους Cécyre και συν. (2014) μόνον ένα (101550, Cayman Chemicals) από τα χρησιμοποιούμενα αντισώματα επιδεικνύει αποτελεσματική εκλεκτικότητα για τον CB2 υποδοχέα. Μάλιστα, η ίδια ομάδα σε προηγούμενη μελέτη, χρησιμοποιώντας το παραπάνω αντίσωμα, έδειξε ότι οι CB2 υποδοχείς εντοπίζονται και στους πέντε τύπους νευρώνων του αμφιβληστροειδούς C57BL/6 μυών (Cécyre και συν., 2013).

Στην παρούσα μελέτη τα ευρήματα της συν-χορήγησης CB1 ή CB2 ανταγωνιστών με συνθετικά ή ενδογενή κανναβινοειδή υποστήριξαν την εμπλοκή και των δύο υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των εν λόγω μορίων στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Οι CB1 και CB2 ανταγωνιστές (AM251 και AM630, αντίστοιχα) αναίρεσαν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA, MethAEA και HU-210 και μείωσαν τις νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG (Εικόνα 4.11). Ωστόσο, ο CB2 ανταγωνιστής AM630 έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προσδένεται με μικρή συγγένεια και στον CB1 υποδοχέα σε κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ (Ki 5.15 μM, Ross και συν., 1999). Στην παρούσα μελέτη ο AM630 χορηγήθηκε στη συγκέντρωση των 10⁻⁶ M το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι η αρνητική επίπτωση του στη νευροπροστατευτική δράση των κανναβινοειδών μπορεί να οφείλεται σε πρόσδεση του στον ή /και στον CB1 υποδοχέα. Επιπλέον, μελέτες από δύο ανεξάρτητες ομάδες έχουν δείξει ότι ο AM630, σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να παράγει αποτελέσματα τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα (Hosohata και συν., 1997⁻ Landsman και συν., 1998).

Δεδομένων των παραπάνω, θελήσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω την εμπλοκή των δύο υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις για την αποσαφήνιση του ρόλου των CB1 και CB2 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις που παρατηρήθηκαν.

Αρχικά, μελετήθηκαν οι δράσεις του CB2 εκλεκτικού αγωνιστή JWH015, έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Το JWH015 δεν παρείχε προστασία στον ιστό σε καμία από τις χορηγούμενες δόσεις, υποστηρίζοντας ότι η άμεση ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα δεν έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας (**Εικόνα 4.12A**). Πρόσφατα, οι Murataeva και συν. (2012) υποστήριξαν ότι το JWH015 μπορεί να δράσει ως CB1 αγωνιστής σε καλλιέργειες ιπποκάμπου από τις οποίες απουσιάζει ο CB2 υποδοχέας. Παρ' όλα 'αυτά, στην παρούσα μελέτη δε φαίνεται αυτό να ισχύει καθώς το JWH015 δεν παρείχε καμία νευροπροστατευτική δράση σε αντίθεση με τους CB1 ή CB1/CB2 αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν [AEA (CB1/CB2 αγωνιστής), 2-AG (CB1 αγωνιστής), HU-210 (CB1/CB2 αγωνιστής), MethAEA (CB1 αγωνιστής)].

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης με χρήση ραδιοσημασμένου [³H]CP55940, ενός συνθετικού κανναβινοειδούς που προσδένεται με παρόμοια συγγένεια στους CB1 και CB2 υποδοχείς. Ο CB1 ανταγωνιστής AM251 (10⁻⁶ M) εκτόπισε πλήρως την ειδική δέσμευση του [³H]CP55940 στις αμφιβληστροειδικές μεμβράνες, ενώ ο ανταγωνιστής του CB2 υποδοχέα AM630 στην ίδια συγκέντρωση δεν είχε καμία δράση (**Εικόνα 4.12B**). Οι μελέτες αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Nucci και συν. (2007), οι οποίοι χρησιμοποιώντας μελέτες δέσμευσης

με χρήση ραδιοσημασμένου [³H]CP55940 υποστήριξαν την απουσία ή την ύπαρξη μικρών συγκεντρώσεων του CB2 υποδοχέα στον ιστό του αμφιβληστροειδούς Sprague-Dawley επίμυων.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μελέτες RT-PCR για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA των CB1 και CB2 υποδοχέων οι οποίες έδειξαν ότι το CB2 mRNA αποτελεί μόλις το 20% του συνολικού mRNA των κανναβινοειδικών υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυων (Εικόνα 4.12Γ,Δ). Επιπλέον, η παροχή νευροπροστασίας από το 2-AG στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα αμφιβληστροειδούς αγρίου τύπου και CB2^{-/-} μυών αλλά όχι στους αμφιβληστροειδείς CB1^{-/-} μυών (Εικόνα 4.13) αποκαλύπτουν την μη εμπλοκή του CB2 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή μυών. Όλα τα παραπάνω δεδομένα μας επιτρέπουν να υποθέσουμε ότι ο CB2 υποδοχέας δεν εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα τόσο στους επίμυες όσο και στους μύες.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν στην ύπαρξη ή μη του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών αν και είναι ελάχιστες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο μελαχρωστικοί όσο και αλφικοί μύες και επίμυες για τη μελέτη της ύπαρξης του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο στην παρούσα μελέτη όσο και στην μελέτη των Nucci και συν. (2007) χρησιμοποιήθηκαν αλφικοί και τα αποτελέσματα υποστήριξαν την απουσία ανιγνεύσιμων επίμυες συγκεντρώσεων του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή. Επίσης, στις μελέτες των Cécyre και συν. (2013, 2014) χρησιμοποιήθηκαν μελαγχρωστικοί μύες και υποστηρίχθηκε η παρουσία του CB2 υποδοχέα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς. Επομένως, η αδυναμία εντοπισμού του CB2 υποδοχέα θα μπορούσε να οφείλεται στον αλφισμό που γαρακτηρίζει τους επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον μελέτες σε μελαγχρωστικούς επίμυες και αλφικούς μύες, με χρήση του εκλεκτικού αντισώματος (101550, Cayman Chemical) που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες των Cécyre και συν. (2013, 2014) θα μπορούσαν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την ύπαρξη και τη λειτουργία του εν λόγω υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή τόσο αλφικών όσο και μελαχρωστικών τρωκτικών.

Πέραν των κανναβινοειδικών υποδοχέων, υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία που υποστηρίζει την πρόσδεση των ενδοκανναβινοειδών στους υποδοχείς TRPV1 και

την ενεργοποίηση των τελευταίων (Howlett και συν. 2002' Pertwee 2005' Pertwee και Ross 2002' Ross, 2003' Melck και συν., 1999' Zygmunt και συν., 1999' Smart και συν., 2000[°] Di Marzo και συν., 2002[°] Iversen και Chapman, 2002[°] Rice και συν., 2002). Στον αμφιβληστροειδή, έχει επίσης αναφερθεί η εμπλοκή του TRPV1 νευροπροστατευτικές δράσεις υποδοχέα στις εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών. Συγκεκριμένα οι Nucci και συν. (2007) πρότειναν ότι η ενδοϋαλοειδική χορήγηση MethAEA παρείχε νευροπροστασία στα γαγγλιακά κύτταρα σε ένα in vivo μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, μέσω ενεργοποίησης τόσο του CB1 όσο και του TRPV1 υποδοχέα. Στην ίδια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης με χρήση ραδιοσημασμένου [³H]CP55940 και ραδιοσημασμένης ρεσινιφερατοξίνης ($[^{3}H]$ resinferatoxin) οι οποίες υποστήριξαν την ύπαρξη τόσο του CB1 και του TRPV1 υποδοχέα, αντίστοιχα, στον ιστό του αμφιβληστροειδούς. Ανοσοϊστογημικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη του TRPV1 υποδογέα στις στιβάδες IPL, INL και GCL αμφιβληστροειδή επίμυ (Leonelli και συν., 2009) καθώς επίσης και σε βραχύινα κύτταρα όπου συν-εντοπίζεται με το ένζυμο αποικοδόμησης της AEA, FAAH (Zimov και Yazulla, 2007).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε επίσης η εμπλοκή του TRPV1 υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Αρχικά, συν-χορηγήθηκε ο TRPV1 ανταγωνιστής καψαζεπίνη, μαζί με AMPA και AEA ή 2-AG ή HU-210 και μελετήθηκαν οι επιπτώσεις του στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Οι μελέτες αυτές πρότειναν την εμπλοκή του εν λόγω υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις και των τριών κανναβινοειδών που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 4.14). Περαιτέρω μελέτες όμως με χρήση του TRPV1 αγωνιστή καψαϊκίνη έδειξαν ότι η άμεση ενεργοποίηση του TRPV1 υποδοχέα δεν προκαλεί καμία μεταβολή στη μείωση των bNOS-ανοσοδραστικών κυττάρων που προκαλείται από τη γορήγηση ΑΜΡΑ (Εικόνα 4.15B), ενώ η καψαζεπίνη δε φαίνεται να έχει τοξικές επιδράσεις στον ιστό όταν χορηγείται μόνη της απουσία AMPA (Εικόνα 4.15A). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του TRPV1 υποδοχέα δεν εμπλέκεται στη νευροπροστασία που παρατηρείται στην παρούσα μελέτη, καθώς επίσης και ότι οι δράσεις της καψαζεπίνης στον ιστό είναι ανεξάρτητες από την ενεργοποίηση του TRPV1 υποδοχέα. Η καψαζεπίνη έχει προταθεί και στο παρελθόν ότι αναστέλλει τους νικοτινικούς ακετυλοχολινεργικούς υποδοχείς σε άλλους ιστούς, όπως επίσης τασεοελεγγόμενους διαύλους ιόντων μηχανισμό και με ανεξάρτητο της ενεργοποίησης του TRPV1 υποδογέα (Kuenzi και Dale, 1996 Docherty και συν.,

Συζήτηση 113

1997 Liu και Simon, 1997). Επομένως, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν ότι ο TRPV1 υποδοχέας δεν εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη νευροπροστατευτική δράση των κανναβινοειδών έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών, μέσω ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων. Ο επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται και εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Τα προ-επιβιωτικά μονοπάτια PI3K/Akt (Gómez del Pulgar και συν., 2000[°] Ozaita και συν., 2007) και MEK/ERK1/2 (Karanian και συν., 2005a,b[°] συν., 1995) έχουν παρελθόν Wartmann και στο ενοχοποιηθεί στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών σε διαφορετικά συστήματα. Συγκεκριμένα, οι Gómez del Pulgar και συν. (2000) έδειξαν ότι το φυτοκανναβινοειδές THC, το ενδοκανναβινοειδές ΑΕΑ και το συνθετικό κανναβινοειδές HU-210 οδήγησαν στην ενεργοποίηση της Akt κινάσης σε κύτταρα ωοθηκών χάμστερ τα οποία ήταν επιμολυσμένα με CB1 cDNA. Η ενεργοποίηση της Akt αναστάλθηκε παρουσία του CB1 αντίστροφου αγωνιστή SR141716 (Gómez del Pulgar και συν., 2000). Σε πιο πρόσφατη μελέτη οι Ozaita και συν. (2007) χρησιμοποιώντας μελέτες ανοσοαποτύπωσης πρότειναν τη φωσφορυλίωση της Akt μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση THC και την αναστολή της φωσφορυλίωσης της παρουσία του CB1 αντίστροφου αγωνιστή SR141716 στον εγκεφαλικό ιστό και συγκεκριμένα στον ιππόκαμπο, το ραβδωτό σώμα και την παρεγκεφαλίδα (Ozaita και Επιπλέον, μελέτες των Karanian και συν. (2005b) έδειξαν ότι η συν., 2007). MethAEA προκάλεσε αύξηση στη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2 σε οργανοτυπικές καλλιέργειες «φετών» ιπποκάμπου, δράση που αναστάλθηκε παρουσία του CB1 ανταγωνιστή AM281 (Karanian και συν., 2005b).

Στην παρούσα διατριβή, για τη μελέτη της εμπλοκής του PI3K/Akt μονοπατιού στις νευροπροστατευτικές δράσεις των ενδογενών AEA και 2-AG καθώς και του συνθετικού κανναβινοειδούς HU-210 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε ιστούς που έλαβαν AMPA με κανναβινοειδή και τον αναστολέα του PI3K/Akt μονοπατιού wortmannin. Η wortmannin ανέστειλε πλήρως τις νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA και 2-AG (**Εικ. 4.16A,B**) ενώ μείωσε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο τις νευροπροστατευτικές δράσεις του HU-210 (**Εικ. 4.16Γ**). Ακολούθησαν μελέτες ανοσοαποτύπωσης κατά western με αντισώματα έναντι της συνολικής και φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Akt. Και τα τρία κανναβινοειδή που χρησιμοποιήθηκαν προκάλεσαν αύξηση της φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt, 24 ώρες μετά τη συν-χορήγηση τους με AMPA (Εικόνα 4.17A,B). Η φωσφορυλίωση των Akt κινασών επάγεται από την ενεργοποίηση της PI3K και παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση αναστέλλοντας αποπτωτικούς μηγανισμούς (Mora και συν., 2001 Sanvicens και συν., 2004). Ο ρόλος των Akt κινασών στην επιβίωση των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς έχει προταθεί και στο παρελθόν σε διαφορετικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών (Li και συν., 2007) Dreixler και συν., 2009). Για παράδειγμα, οι Dreixler και συν. (2009) έδειξαν ότι οι ισομορφές Akt2 και Akt3 αλλά όχι η ισομορφή Akt1 εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των σύντομων εφαρμογών ισχαιμίας ακολουθούμενων από επαναιμάτωση (ischemic preconditioning) στα γαγγλιακά κύτταρα σε ένα μοντέλο ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Επιπλέον, οι Li και συν. (2007) πρότειναν ότι σε Akt2^{-/-} μύες τα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα που είναι συνδεδεμένα με κωνία παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από στρεσσογόνους παράγοντες, συγκριτικά με ετερόζυγους ή αγρίου τύπου μύες (Li και συν., 2007).

Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές της κινάσης Akt (Akt1-Akt3) οι οποίες εντοπίζονται στον αμφιβληστροειδή σε επίπεδο mRNA (Reiter και συν., 2003) αλλά και πρωτεΐνης (Li και συν., 2007). Παρά την παρουσία και των τριών ισομορφών στον αμφιβληστροειδή φαίνεται ότι η ισομορφή Akt2 είναι αυτή που εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το στρες (Li και συν., 2007). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε Akt2-/- μύες για τη διερεύνηση της εμπλοκής συγκεκριμένης ισομορφής στις νευροπροστατευτικές δράσεις της του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε αγρίου τύπου μύες και Akt2^{-/-} μύες αποκάλυψαν την εμπλοκή της Akt2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG, καθώς απουσία της Akt2 το 2-AG δεν παρείχε προστασία στα bNOSανοσοδραστικά κύτταρα έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας (Εικόνα 4.17Γ). Το γεγονός ότι η γενετική απαλοιφή της ισομορφής Akt2 δεν επηρεάζει την έκφραση των άλλων δύο ισομορφών (Li και συν., 2007), σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους Akt2^{-/-} μύες, μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση της Akt2 κινάσης προάγει τις νευροπροστατευτικές δράσεις του 2-AG έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας.

Το επόμενο σηματοδοτικό μονοπάτι που μελετήθηκε ήταν το μονοπάτι των κινασών ERK1/2. Οι δράσεις των ΑΕΑ και HU-210 στην φωσφορυλίωση των ERK1/2 κινασών μελετήθηκαν με μελέτες ανοσοαποτύπωσης. Η ΑΕΑ προκάλεσε φωσφορυλίωση των ERK1/2 σε αντίθεση με το HU-210 το οποίο δεν είχε καμία επίπτωση στη φωσφορυλίωση των εν λόγω κινασών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ή με τους ιστούς που έλαβαν μόνον AMPA (**Εικ. 4.18**).

Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι τα AEA και HU-210 παρέχουν προστασία AMPA διεγερσιτοξικότητας μέσω έναντι της ενεργοποίησης διαφορετικών μονοπατιών επιβίωσης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τις μελέτες των Molina-Holgado και συν. (2005), οι οποίοι έδειξαν ότι το HU-210 προκάλεσε αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt και προκάλεσε νευροπροστασία έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων, ενώ δεν είχε καμία επίπτωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 (Molina-Holgado και συν., 2005). Επιπλέον, το σταθερό ανάλογο της ΑΕΑ, MethAEA, έχει επίσης αναφερθεί ότι επάγει τη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2 στον ιππόκαμπο μέσω μηχανισμού στον οποίο εμπλέκεται και η ενεργοποίηση τους CB1 υποδοχέα (Karanian και συν., 2005a). Τα δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί μέχρι τώρα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν το νευροπροστατευτικό ρόλο των κανναβινοειδών έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας in vivo μέσω ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων και των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt ή και MEK/ERK1/2.

Ωστόσο, πέραν της άμεσης ενεργοποίησης των κανναβινοειδικών υποδοχέων μέσω εξωγενούς χορήγησης συνθετικών ή ενδογενών κανναβινοειδών, ένας έμμεσος τρόπος αύξησης των επιπέδων κανναβινοειδών στη σύναψη είναι η εξωγενής χορήγηση αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς των FAAH και MGL, ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι. Αρχικά μελετήθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις δύο νέων αναστολέων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών⁻ του αναστολέα της FAAH, AM6642, και του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL, AM9928. Οι δύο αυτοί αναστολείς συν-χορηγούμενοι με AMPA μιμήθηκαν τις δράσεις της εξωγενούς χορήγησης των ενδο- και συνθετικών κανναβινοειδών και παρείχαν προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (**Εικ. 4.19A,B**). Ο διπλός FAAH/MGL αναστολέας AM9928 έδρασε πιο αποτελεσματικά από τον αναστολέα της FAAH AM6642, πιθανότατα λόγω της αύξησης των επιπέδων τόσο της ΑΕΑ όσο και της 2-AG στη σύναψη. Οι νευροπροστατευτικές δράσεις αναστολέων καταβολισμού των των ενδοκανναβινοειδών έχουν προταθεί παλαιότερα στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, παλαιότερες μελέτες ανέδειξαν τις νευροπροστατευτικές δράσεις του αναστολέα της FAAH AM374 καθώς και του αναστολέα του μεταφορέα της AEA AM404 σε ένα μοντέλο AMPA διεγερσιτοξικότητας στον ιππόκαμπο τόσο in vitro όσο και in vivo (Karanian και συν., 2005). Επιπλέον, σε πιο πρόσφατες μελέτες ο διπλός FAAH/MGL αναστολέας AM6701 παρείχε προστασία έναντι της διεγερσιτοξικότητας από καϊνικό οξύ σε φέτες ιπποκάμπου και επίσης μείωσε τη σοβαρότητα των επιληπτικών κρίσεων σε επίμυες, γεγονός που παρατηρήθηκε και μετά από χορήγηση του FAAH αναστολέα AM5206 (Naidoo και συν., 2011 2012). Η παρούσα μελέτη προσπάθεια αποτελεί την πρώτη ανάδειξης των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή επίμυ.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη με στόχο τη διερεύνηση της εμπλοκής των CB1 και CB2 υποδοχέων στις δράσεις των AM6642 και AM9928. Ο CB1 ανταγωνιστής AM251 ανέστειλε τις νευροπροστατευτικές δράσεις τόσο του AM6642 όσο και του AM9928 (Εικόνα 4.19Γ,Δ), υποδεικνύοντας την εμπλοκή του CB1 υποδοχέα στη δράση των εν λόγω μορίων, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι ο CB1 υποδοχέας φαίνεται να εμπλέκεται στις δράσεις των ενδογενών κανναβινοειδών AEA και 2-AG (Εικόνα 4.11A,B). Επιπλέον, ενδοϋαλοειδική συν-χορήγηση AMPA με AM9928 δεν παρείχε προστασία σε αμφιβληστροειδείς CB2^{-/-} μυών έναντι της AMPA διεγερσιτοζικότητας, προτείνοντας ότι ο CB2 υποδοχέας δεν εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις του διπλού αναστολέα AM9928 (Εικόνα 4.19E), γεγονός επίσης αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στις Εικόνες 4.12 και 4.13, τα οποία υποστήριζαν ότι ο CB2 υποδοχέας δεν εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών στην παρούσα μελέτη.

Θέλοντας να αυξήσουμε ακόμη περισσότερο τη συγκέντρωση των ενδοκανναβινοειδών στη σύναψη, με στόχο την ενίσχυση της νευροπροστασίας, συνχορηγήσαμε AMPA με AEA ή HU-210 ή MethAEA και AM6642, ή AMPA με AEA ή 2-AG και AM9948. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.20A, Β παρουσία του AM6642 αναστάλθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις των AEA και HU-210, κάτι που δεν παρατηρήθηκε όμως κατά τη συν-χορήγηση AMPA+MethAEA+AM6642 (Εικ. 4.20Γ).

Η δράση των αναστολέων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών στοχεύει στην αύξηση των συγκεντρώσεων τους στη σύναψη λόγω αδυναμίας καταβολισμού τους. Συν-χορήγηση αναστολέων καταβολισμού σε συνδυασμό με εξωγενώς χορηγούμενα κανναβινοειδή προκαλεί αύξηση των συγκεντρώσεων κανναβινοειδών στη σύναψη και κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι οι δύο αυτοί παράγοντες θα μπορούσαν να δράσουν συνεργατικά, αυξάνοντας τις νευροπροστατευτικές δράσεις των αναστολέων μεταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών. Παρ' όλα αυτά στην παρούσα μελέτη η νευροπροστατευτική δράση του αναστολέα του ενζύμου καταβολισμού της ΑΕΑ (FAAH) ΑΜ6642 αναιρέθηκε παρουσία εξωγενούς χορηγούμενων ΑΕΑ ή HU-210 (Εικόνα 4.20Α,Β). Παρομοίως, συν-χορήγηση του διπλού αναστολέα των FAAH/MGL AM9928 με ΑΕΑ, HU-210 ή MethAEA και AMPA είχε ως αποτέλεσμα την αναίρεση της προστατευτικής δράσης του AM9928 και μείωση της στην περίπτωση συν-χορήγησης με AMPA+2-AG (Εικόνες 4.21 και 4.22).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι υποδοχείς GPCRs οδηγούνται σε απευαισθητοποίηση μετά από παρατεταμένη ενεργοποίηση τους. Συγκεκριμένα, η παρατεταμένη ενεργοποίηση οδηγεί σε φωσφορυλίωση των GPCR κινασών (GRKs) που ακολουθείται από πρόσδεση της πρωτεΐνης β-αρρεστίνης στον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα, ο οποίος αδυνατεί πλέον να προσδέσει G πρωτεΐνες και να ενεργοποιήσει καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια (για λεπτομερή ανασκόπηση βλέπε Gainetdinov και συν., 2004). Σε ποιο πρόσφατη μελέτη οι Schlosburg και συν. (2010), χρησιμοποιώντας διαγονιδιακούς MGL^{-/-} μύες αλλά και χορηγώντας ενδοπεριτοναϊκά τον MGL αναστολέα JZL184 σε αγρίου τύπου μύες, έδειξαν ότι η χρόνια παρεμπόδιση της αποικοδόμησης του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG προκάλεσε απευαισθητοποίηση και μειορύθμιση (downregulation) του CB1 υποδοχέα (Schlosburg και συν., 2010).

Επομένως, η μείωση της νευροπροστασίας που παρατηρήθηκε κατά τη συνχορήγηση AMPA με κανναβινοειδή και αναστολείς των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών, πιθανόν να οφείλεται σε μειορύθμιση του CB1 υποδοχέα μετά από την παρατεταμένη ενεργοποίηση του, λόγω αύξησης των κανναβινοειδών στη σύναψη, παρότι ο χρόνος των εικοσιτεσσάρων ωρών που ο αμφιβληστροειδής έχει δεχθεί τις υπό μελέτη ουσίες είναι αμφίβολο εάν θεωρείται χρόνια χορήγηση σε *in* vivo μοντέλα πειραματόζωων. Ωστόσο, η συν-χορήγηση MethAEA με AMPA και τον αναστολέα της FAAH AM6642 δεν προκάλεσε μείωση της νευροπροστασίας. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι η MethAEA είναι ένα σταθερό ανάλογο της AEA το οποίο μεταβολίζεται με μηχανισμό ανεξάρτητο της ενεργοποίησης της FAAH (Abadji και συν., 1994).

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή υποστηρίζουν το νευροπροστατευτικό ρόλο των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών έναντι της ΑΜΡΑ διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών και την εμπλοκή των CB1 υποδοχέων και των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt ή/και MEK/ERK1/2 αλλά όχι των CB2 και TRPV1 υποδοχέων. Τα ενδοκανναβινοειδή AEA και 2-AG αλλά και τα συνθετικά κανναβινοειδή HU-210 και MethAEA παρείχαν προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά και χολινεργικά βραχύινα κύτταρα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι διεγερσιτοξικές επιπτώσεις του ΑΜΡΑ και οι νευροπροστατευτικές δράσεις των ΑΕΑ, 2-ΑG και ΗU-210 επαληθεύτηκαν με την τεχνική TUNEL. Το ΑΜΡΑ προκάλεσε κυτταρικό θάνατο σε ομάδες νευρώνων του αμφιβληστροειδούς ανεξάρτητο από την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, όπως προέκυψε από λειτουργικές μελέτες και μελέτες ανοσοαποτύπωσης. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για την αποσαφήνιση του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το AMPA στη συγκεκριμένη μελέτη. Πέραν της εξωγενούς χορήγησης κανναβινοειδών, μελετήθηκαν επίσης οι αναστολείς των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών ΑΜ6642 και ΑΜ9928 ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι. Οι δύο αναστολείς παρείχαν προστασία στα bNOS-ανοσοδραστικά βραχύινα κύτταρα από την AMPA διεγερσιτοξικότητα. Ωστόσο, συν-χορήγηση των AM6642 ή ΑΜ9928 με κανναβινοειδή και ΑΜΡΑ αναίρεσε τις προστατευτικές δράσεις των δύο αναστολέων, με μοναδική εξαίρεση τη συν-χορήγηση AM6642 με MethAEA και ΑΜΡΑ. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διαλεύκανση του μηγανισμού μέσω του οποίου η συν-χορήγηση ενδοκανναβινοειδών ή του συνθετικού κανναβινοειδούς HU-210 με AMPA και τους αναστολείς των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών αναιρούν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των τελευταίων.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν υπέρ του ότι το κανναβινοειδικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του αμφιβληστροειδούς και μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό νευροπροστατευτικό στόχο για τη δημιουργία θεραπευτικών σχημάτων που θα στοχεύουν στην καταπολέμηση του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται κατά τις ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες. Σε συνδυασμό με τις ήδη εφαρμοζόμενες θεραπείες κατά της νεοαγγείωσης, τα κανναβινοειδή θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε δημιουργία αποτελεσματικότερων φαρμακευτικών προσεγγίσεων για τη θεραπεία των πρώιμων και τελικών σταδίων των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών.

Επιστημονικές Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Νίκη Μαστροδήμου (PhD) για την πραγματοποίηση των μελετών δέσμευσης, τη Σοφία Παπαδογκωνάκη (BSc) για την πραγματοποίηση των μελετών της δράσης του ΑΜ9928 σε αγρίου τύπου και CB2-/μύες, καθώς και τους Ειρήνη Φιλίδου (MSc), Κωνσταντίνο Αρβανιτίδη (PhD) και Γιώργο Κολιό (Καθηγητή Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου) για την πραγματοποίηση των μελετών RT-PCR. Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο -ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιγειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:</u>

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε μια προσπάθεια μελέτης των νευροπροστατευτικών δράσεων των ενδογενών και συνθετικών κανναβινοειδών σε ένα *in vivo* μοντέλο AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών. Τα δεδομένα που προέκυψαν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και δίνουν έναυσμα για περαιτέρω μελέτες που θα μας βοηθήσουν να αποκτήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το μηχανισμό δράσης των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή.

Μελλοντικές έρευνες κρίνονται απαραίτητες για τη διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο συνδυασμός των αναστολέων των ενζύμων μεταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών παρουσία των εξωγενώς χορηγούμενων ενδο-και συνθετικών κανναβινοειδών μειώνει τη νευροπροστασία στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς.

Επιπλέον, η παρούσα μελέτη υποστήριξε τη μη εμπλοκή αποπτωτικών μηχανισμών εξαρτώμενων της κασπάσης-3 στις διεγερσιτοξικές δράσεις του AMPA. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την αποσαφήνιση του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το AMPA (νέκρωση/νεκρόπτωση) στο *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας.

Οι μελέτες αυτές θα μας δώσουν περισσότερες πληροφορίες για τον τρόπο δράσης των κανναβινοειδών στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του αμφιβληστροειδούς και θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην ανεύρεση νέων αποτελεσματικών σχημάτων που θα στοχεύουν στη θεραπεία των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:</u>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διεγερσιτοξικότητα είναι μια άμεση συνέπεια της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Lipton και Rosenberg, 1994' Campochiaro, 2000' Osborne και συν., 2004' Grant και συν., 2005). Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται σήμερα για τις ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες περιλαμβάνουν θεραπείες με laser αλλά και φαρμακολογικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στην καταπολέμηση της νεοαγγείωσης αλλά όχι και του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται κατά τις ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες. Για τη διατήρηση της όρασης είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών στόχων, που σε συνδυασμό με τις ήδη εφαρμοζόμενες θεραπείες θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη δημιουργία πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των νευροπροστατευτικών δράσεων των ενδογενών [2-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνη (2-arachidonoylethanolamine, AEA, anandamide, ανανδαμίδιο) και 2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη (2-arachidonoylglycerol, 2-AG)], συνθετικών κανναβινοειδών (MethAEA και HU-210), καθώς και των αναστολέων των ενζύμων μεταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών, έναντι του κυτταρικού θανάτου, σε ένα *in vivo* μοντέλο AMPA διεγερσιτοξικότητας σε αμφιβληστροειδή τρωκτικών, καθώς και των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτές τις δράσεις.

Χρησιμοποιήθηκε το *in vivo* μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας (Kiagiadaki και Thermos, 2008) στον αμφιβληστροειδή επίμυος και μελετήθηκαν οι νευροπροστατευτικές δράσεις των συνθετικών HU-210 και MethAEA καθώς και των ενδογενών κανναβινοειδών AEA και 2-AG. Τα κανναβινοειδή συν-χορηγήθηκαν ενδοϋαλοειδικά μαζί με AMPA, εικοσιτέσσερις (24) ώρες μετά τη χορήγηση του AMPA τα ζώα θανατώθηκαν και οι αμφιβληστροειδείς τους προετοιμάστηκαν για ανοσοϊστοχημικές μελέτες ή μελέτες ανοσοαποτύπωσης.

Το AMPA προκάλεσε ραγδαία μείωση των χολινεργικών και bNOS ανοσοδραστικών κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς ελέγχου, ενώ τα κανναβινοειδή παρείχαν νευροπροστασία έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας, αυξάνοντας στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό των παραπάνω κυττάρων συγκριτικά με τους ιστούς που έλαβαν AMPA. Οι νευροτοξικές δράσεις του AMPA και οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση της χρώσης TUNEL. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρήθηκε ήταν ανεξάρτητος της ενεργοποίησης της κασπάσης-3.

Για τη μελέτη της εμπλοκής των CB1 και CB2 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από διαφορετικές προσεγγίσεις (χρήση ανταγωνιστών των CB1 και CB2 υποδοχέων, μελέτες δέσμευσης, μελέτες της νευροπροστατευτικής δράσης του CB2 αγωνιστή JWH015, μελέτες RT-PCR αλλά και μελέτες σε CB1^{-/-} και CB2^{-/-} μύες), τα αποτελέσματα των οποίων μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο CB1 αλλά όχι ο CB2 υποδοχέας εμπλέκεται στη νευροπροστασία που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Μελετήθηκε επίσης η εμπλοκή του TRPV1 υποδοχέα των βανιλλοειδών στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών με χρήση του ανταγωνιστή (capsazepine) και του αγωνιστή (capsaicin) του TRPV1 υποδοχέα και φάνηκε ότι ο εν λόγω υποδοχέας δεν εμπλέκεται στις δράσεις των κανναβινοειδών που παρατηρούνται στην παρούσα μελέτη.

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της εμπλοκής των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt και MEK/ERK1/2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Μελέτες ανοσοαποτύπωσης καθώς και η χρήση του PI3K/Akt αναστολέα wortmannin αλλά και διαγονιδιακών Akt2^{-/-}μυών υποστήριξαν την εμπλοκή του PI3K/Akt ή/και MEK/ERK1/2 στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών. Συγκεκριμένα το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt φαίνεται να εμπλέκεται στις δράσεις των ΑΕΑ, 2-AG και HU-210, ενώ το μονοπάτι ΜΕΚ/ERK1/2 φαίνεται να εμπλέκεται στις δράσεις των ΑΕΑ, 2-AG, αλλά όχι του HU-210.

Πέραν της εξωγενούς χορήγησης των ενδοκανναβινοειδών ΑΕΑ και 2-AG, έμμεσος τρόπος αύξησης των επιπέδων τους στη σύναψη είναι και η αναστολή της αποικοδόμησης τους μέσω αναστολέων των ενζύμων που ευθύνονται για τον καταβολισμό τους [υδρολάση των αμιδίων των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH) και λιπάσης της μονοακύλογλυκερόλης (MonoacylGlycerol Lipase, MGL)], αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την πιθανή νευροπροστατευτική δράση του αναστολέα της FAAH (AM6642) και ενός διπλού αναστολέα των FAAH και MGL (AM9928), ως νέους θεραπευτικούς στόχους. Οι δύο αναστολείς συν-χορηγούμενοι με AMPA παρείχαν προστασία στον ιστό με τον AM9928 να δρα πιο αποτελεσματικά. Η νευροπροστατευτική δράση των δύο αναστολέων αναστάλθηκε παρουσία του CB1 ανταγωνιστή AM251.

Για την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων των κανναβινοειδών στη σύναψη συνχορηγήθηκε AMPA με AM6642 ή AM9928 και HU-210, AEA, MethAEA ή 2-AG και μελετήθηκε η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική τους δράση. Η παρουσία εξωγενώς χορηγούμενων κανναβινοειδών αναίρεσε τη νευροπροστατευτική δράση των AM6642 και AM9928, με μοναδική εξαίρεση τη συν-χορήγηση AMPA + MethAEA + AM6642. Η μείωση που παρατηρήθηκε πιθανόν να οφείλεται σε μειο-ρύθμιση (down regulation) του CB1 υποδοχέα καθώς υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την απευαισθητοποίησή του CB1 και μειορύθμιση του μετά από παρατεταμένη αναστολή του ενζύμου MGL (Schlosburg και συν., 2010). Το γεγονός ότι η MethAEA δε μείωσε τη νευροπροστατευτική δράση του AM6642 πιθανώς οφείλεται στο ότι η MethAEA είναι ένα μεταβολικά σταθερό μόριο που δεν καταβολίζεται από την FAAH (Abadji και συν., 1994). Το δεύτερο συνθετικό κανναβινοειδές που χρησιμοποιήθηκε (HU-210) συμπεριφέρθηκε μιμούμενο τα ενδογενή κανναβινοειδή και αναίρεσε τις νευροπροστατευτικές δράσεις των ΑΜ6642 και ΑΜ9928. Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν δεδομένα για τον μηχανισμό καταβολισμού του HU-210 δε μπορούμε να σχολιάσουμε τον τρόπο δράσης του HU-210 στη μείωση των νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων μεταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνηγορούν υπέρ του νευροπροστατευτικού ρόλου του κανναβινοειδικού συστήματος έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών. Τα κανναβινοειδή παρείχαν προστασία έναντι της AMPA διεγερσιτοξικότητας μέσω ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα και των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt ή/και ERK1/2. Η μελέτη της εμπλοκής αποπτωτικών μηχανισμών ανέδειξε ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 δεν εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται μετά τη χορήγηση AMPA, γεγονός το οποίο απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Η αναστολή των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών φάνηκε εξίσου αποτελεσματική με την εξωγενή χορήγηση κανναβινοειδών στην παροχή νευροπροστασίας στον ιστό. Ωστόσο, παρουσία εξωγενώς χορηγούμενων καναβινοειδών, οι αναστολείς των ενζύμων καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών δεν παρείχαν νευροπροστατευτική δράση, γεγονός το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν υπέρ του ότι το κανναβινοειδικό σύστημα μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του αμφιβληστροειδούς και αποτελεί έναν σημαντικό νευροπροστατευτικό στόχο για τη δημιουργία αποτελεσματικότερων σχημάτων που θα στοχεύουν στη θεραπεία σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8:</u>

ABSTRACT
Retinal ischemia leads to neovascularization and excitotoxicity (cell death) both of which can lead to the development of very severe retinopathies, such as diabetic retinopathy and age related macular degeneration (Lipton and Rosenberg, 1994; Campochiaro, 2000; Osborne et al., 2004; Grant et al., 2005), that often result in poor visual acuity and blindness. Surgical and new pharmacological approaches are available to target the neovascular component of ischemia induced retinopathies but not the neurodegenerative component. In order to preserve vision both components must be treated. Therefore, it is mandatory to establish new pharmacological targets for the treatment of the neurodegenerative component.

The main aim of the present study was to investigate whether the endocannabinoid system may serve as an efficacious therapeutic target for the treatment of neurodegenerative retinal disease. Specifically, the neuroprotective actions of the endocannabinoids AEA (N-arachidonoylethanolamine, anandamide) and 2-AG (2-arachidonoylglycerol) and synthetic cannabinoids MethAEA (Methanandamide) and HU-210 were studied, as well as the neuroprotective actions of the inhibitors of the enzymes responsible for the metabolism of the endocannabinoids. In addition, the involvement of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors and the TRPV1 vallinoid receptor in the neuroprotective actions of endo- and synthetic cannabinoids, as well as the downstream signaling pathways leading to their putative neuroprotective effects were also investigated.

We employed the *in vivo* AMPA model of retinal excitotoxicity, previously developed in our laboratory (Kiagiadaki and Thermos, 2008) and we investigated the neuroprotective actions of the synthetic HU-210 and MethAEA and the endogenous cannabinoids AEA and 2-AG. Cannabinoids were intravitreally injected with AMPA (42nmoles/eye) and 24 hours post injection, the animals were euthanized and their retinas were prepared for immunohistochemical studies or western blot analysis.

AMPA caused a reduction of bNOS (brain nitric oxide synthase) and ChAT (choline acetyltransferase) immunoreactive neurons compared to the control tissues and the cannabinoids afforded neuroprotection against AMPA excitotoxicity, increasing the number of bNOS and ChAT immunoreactive cells compared to the AMPA treated tissues. The toxic effects of AMPA and the neuroprotective actions of cannabinoids were also substantiated by the TUNEL assay. Additional studies revealed that the cell death observed in the presence of AMPA does not involve activation of the apoptosis mediator caspase-3.

To investigate the involvement of CB1 and CB2 receptors in the neuroprotection, we performed a series of studies, namely the intravitreal co-injection of cannabinoid receptor antagonists with AMPA and cannabinoids, radioligand binding studies, study of the neuroprotective actions of the CB2 selective agonist JWH015, RT-PCR and studies in CB1^{-/-} andCB2^{-/-} mice, which revealed that the CB1 but not the CB2 receptor is involved in the neuroprotective actions of cannabinoids. We also performed pharmacological studies to assess the involvement of the TRPV1 vallinoid receptor in the cannabinoids' neuroprotective actions. The data obtained from these studies revealed that the TRPV1 receptor, is not involved in the neuroprotective actions of cannabinoids in *the vivo* retinal model of AMPA excitotoxicity.

Having assessed the neuroprotective properties of the cannabinoids in the AMPA model of excitotoxicity in the retina and the involvement of the CB1 cannabinoid receptor in their actions, we subsequently investigated the signaling pathways that lead to the neuroprotection. We performed western blot analysis against phosphorylated and total forms of the PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 kinases, functional studies using the PI3K/Akt inhibitor wortmannin and neuroprotection studies in Akt2^{-/-} mice. The data obtained suggested the involvement of PI3K/Akt and/or MEK/ERK1/2 signaling pathways in the neuroprotection afforded by the cannabinoids. Specifically, the PI3K/Akt signaling pathway seems to be involved in the

neuroprotective actions of AEA, 2-AG and HU-210, while the MEK/ERK1/2 pathway is involved in the neuroprotective actions of AEA and 2-AG, but not those of HU-210.

Besides the direct activation of cannabinoid receptors with specific agonists, cannabinergic signaling can also be modulated through inhibition of endocannabinoid metabolism. Therefore, we examined the putative neuroprotective actions of the inhibitors of the two metabolic enzymes of AEA and 2-AG (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH and Monoacylglycerol lipase, MGL for AEA and 2-AG, respectively), to substantiate whether these inhibitors could provide a new therapeutic target for the treatment of retinal disease. We performed experiments employing a FAAH inhibitor (AM6642), which inhibits the degradation of AEA and 2-AG. These compounds afforded neuroprotection when co-injected with AMPA, with AM9928 affording greater neuroprotection than AM6642.The neuroprotective actions of the two inhibitors were reversed in the presence of the CB1 receptor antagonist AM251.

Subsequently, we co-injected the above mentioned enzyme inhibitors with AMPA plus endogenous and synthetic cannabinoids to examine if the neuroprotective effects could be increased due to the elevation of endocannabinoid levels in the synapse and the exogenously added agents. Both the FAAH and the FAAH/MGL inhibitors failed to afford neuroprotection in the presence of exogenously applied cannabinoids. These results suggest that blockade of endocannabinoids' degradation protects the retina from the AMPA insults. However, the co-administration of the enzyme inhibitors and exogenously administered endocannabinoids did not have an additive effect, probably due to desensitization and downregulation of CB1 receptor (Schlosburget al., 2010). This tenet must be investigated further. MethAEA, a metabolically stable analogue of AEA that is metabolized by pathways independent of FAAH, did not alter the neuroprotective action of AM6642 (Abadji et al., 1994). The second synthetic cannabinoid employed (HU-210) reversed the neuroprotective actions of both AM6642 and AM9928. Since there are no reports in the literature regarding the metabolic pathways of HU-210, one cannot make any hypotheses regarding HU-210's actions.

The data obtained from the present study suggest that endogenous and synthetic cannabinoids protect the retina from AMPA excitotoxicity, via activation of the CB1, but not CB2 or TRPV1 receptors, with the involvement of the PI3K/Akt and/or MEK/ERK1/2 signaling pathways. Inhibition of the enzymes that metabolize the endocannabinoids also afforded neuroprotection, yet the co-administration of exogenous endocannabinoids leads to its attenuation.

In conclusion, the present study revealed an important role for the endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the retina. This system could provide an important therapeutic target for the development of more efficacious therapeutics for the treatment of retinopathies whose pathophysiology involves excitotoxic insults.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9</u>

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Abadji V., Lin S., Taha G., Griffin G., Stevenson L.A., Pertwee R.G., Makriyannis A., 1994. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem.* 37,1889-1893.

Adams R, Loewe S, Jelinek C, Wolff H., 1941. Tetrahydrocannabinol homologs with marihuana activity. *J Am Chem Soc.* 63,1971-1973.

Akazawa C., Ohishi H., Nakajima Y., Okamoto N., Shigemoto R., Nakanishi S., Mizuno N., 1994. Expression of mRNAs of L-AP4-sensitive metabotropic glutamate receptors (mGluR4, mGluR6, mGluR7) in the rat retina. *Neurosci Lett.* 171,52-54.

Alexander S.P., Kendall D.A., 2009. The life cycle of the endocannabinoids: formation and inactivation. *Curr Top Behav Neurosci.* 1,3-35.

Antoniou K., Galanopoulos A., Vlachou S., Kourouli T., Nahmias V., Thermos K., Panagis G., Daifoti Z., Marselos M., Papahatjis D., Spyraki C., 2005. Behavioral pharmacological properties of a novel cannabinoid 10,10-dithiolane delta8-THC analog, AMG-3. *Behav Pharmacol.* 16,499-510.

Arriza J.L., Eliasof S., Kavanaugh M.P., Amara S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Nat Acad Sci USA*. 94,4155-4160.

Barber A.J., 2003. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27,283-290.

Barber A.J., Lieth E., Khin S.A., Antonetti D.A., Buchanan A.G., Gardner T.W., 1998. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*. 102,783-791.

Baty D.E., Zhang M., Li H., Erb C.J., Adler M.W., Ganea D., Loftus C.M., Jallo J.I., Tuma R.F., 2008. Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates motor and autonomic function deficits in a mouse model of spinal cord injury. *Clin Neurosurg*. 55,172-177.

Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S.Y., Makriyannis A., Piomelli D., 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 277,1094-1097.

Bisogno T., Delton-Vandenbroucke I., Milone A., Lagarde M., Di Marzo V., 1999. Biosynthesis and inactivation of N-arachidonoylethanolamine (anandamide) and Ndocosahexaenoylethanolamine in bovine retina. *Arch Biochem Biophys.* 370,300-307.

Bisogno T., Howell F., Williams G., Minassi A., Cascio M.G., Ligresti A., Matias I., Schiano-Moriello A., Paul P., Williams E.J., Gangadharan U., Hobbs C., Di Marzo V., Doherty P., 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 163,463-468.

Blankman J.L., Simon G.M., Cravatt B.F., 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol.* 14,1347-1356.

Bleakman D., Lodge D., 1998. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*. 37,1187-1204.

Bonhaus D.W., Chang L.K., Kwan J., Martin G.R., 1998. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther.* 287,884-888.

Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Bourrié B., Canat X., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Casellas P., 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J.* 312 (Pt 2),637-641.

Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Marchand J., Canat X., Bourrié B., Rinaldi-Carmona M., Calandra B., Le Fur G., Casellas P., 1996. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogenactivated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem*. 237,704-711.

Bouskila J., Javadi P., Casanova C., Ptito M., Bouchard J.F., 2013. Müller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *J Comp Neurol*. 521,2399-2415.

Brandstätter J.H., Hartveit E., Sassoè-Pognetto M., Wässle H., 1994. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci.* 6,1100-1112.

Brandstätter J.H., Koulen P., Kuhn R., van der Putten H., Wässle H., 1996. Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): two different active sites at a retinal synapse. *J Neurosci.* 16,4749-4756.

Brandstätter J.H., Koulen P., Wässle H., 1997. Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci.* 17,9298-9307.

Brandstätter J.H., Koulen P., Wässle H., 1998. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38,1385-1397.

Buckley N.E., Hansson S., Harta G., Mezey E., 1998. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*. 82,1131-1149.

Buckley N.E., McCoy K.L., Mezey E., Bonner T., Zimmer A., Felder C.C., Glass M., Zimmer A., 2000. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2). *Eur J Pharmacol.* 396,141-149.

Burkey T.H., Quock R.M., Consroe P., Ehlert F.J., Hosohata Y., Roeske W.R., Yamamura H.I., 1997. Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 336,295-298.

Campochiaro P.A., 2000. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 184,301-310.

Carroll C.B., Bain P.G., Teare L., Liu X., Joint C., Wroath C., Parkin S.G., Fox P., Wright D., Hobart J., Zajicek J.P., 2004. Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study. *Neurology*. 63,1245-1250.

Carroll C.B., Zeissler M.L., Hanemann C.O., Zajicek J.P., 2012. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) exerts a direct neuroprotective effect in a human cell culture model of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 38,535-547.

Caterina N.C., Windsor L.J., Yermovsky A.E., Bodden M.K., Taylor K.B., Birkedal-Hansen H., Engler J.A., 1997. Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Biol Chem.* 272,32141-32149.

Caulfield M.P., Brown D.A., 1992. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol.* 106,231-232.

Cécyre B., Thomas S., Ptito M., Casanova C., Bouchard J.F., 2014. Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 387,175-184.

Cécyre B., Zabouri N., Huppé-Gourgues F., Bouchard J.F., Casanova C., 2013. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54,8079-8090.

Chen J., Matias I., Dinh T., Lu T., Venezia S., Nieves A., Woodward D.F., Di Marzo V., 2005. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 330,1062-1067.

Chidlow G., Osborne N.N., 2003. Rat retinal ganglion cell loss caused by kainate, NMDA and ischemia correlates with a reduction in mRNA and protein of Thy-1 and neurofilament light. *Brain Res.* 963,298-306.

Cho H., Mu J., Kim J.K., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Crenshaw E.B. 3rd, Kaestner K.H., Bartolomei M.S., Shulman G.I., Birnbaum M.J., 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKBb). *Science* 292,1728-1731.

Chung Y.H., Shin C.M., Kim M.J., Cha C.I., 2001. Enhanced expression of L-type Ca2+ channels in reactive astrocytes after ischemic injury in rats. *Neurosci Lett.* 302,93-96.

Collin C., Davies P., Mutiboko I.K., Ratcliffe S., 2007. Randomized controlled trial of cannabis-based medicine in spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 14,290-296.

Conn P.J., Pin J.P., 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37,205-237.

Crowder J.M., Bradford H.F., 1987. Inhibitory effects of noradrenaline and dopamine on calcium influx and neurotransmitter glutamate release in mammalian brain slices. *Eur J Pharmacol.* 143,343-352.

Dani J.A., Mayer M.L., 1995. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 5,310-317.

Davis M.I., Ronesi J., Lovinger D.M., 2003. A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 278,48973-48980.

Derkinderen P., Toutant M., Burgaya F., Le Bert M., Siciliano J.C., de Franciscis V., Gelman M., Girault J.A., 1996. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science*. 273,1719-1722.

Derkinderen P., Toutant M., Kadaré G., Ledent C., Parmentier M., Girault J.A., 2001. Dual role of Fyn in the regulation of FAK+6,7 by cannabinoids in hippocampus. *J Biol Chem.* 276,38289-38296.

Devane W.A., Dysarz F.A. 3rd, Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34,605-613.

Devane W.A., Dysarz F.A. 3rd, Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34,605-613.

Dhanasekaran D.N., ReddyE.P., 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27,6245–6251.

Dhingra A., Lyubarsky A., Jiang M., Pugh E.N. Jr, Birnbaumer L., Sterling P., Vardi N., 2000. The light response of ON bipolar neurons requires G[alpha]o. *J Neurosci.* 20,9053-9058.

Di Marzo V., Griffin G., De Petrocellis L., Brandi I., Bisogno T., Williams W., Grier M.C., Kulasegram S., Mahadevan A., Razdan R.K., Martin B.R., 2002. A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J Pharmacol Exp Ther*. 300,984-991.

Diamond J.S., 2011. Calcium-permeable AMPA receptors in the retina. *Front Mol Neurosci.* 4,27.

Dingledine R., Borges K., Bowie D., Travnelis S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51,7-61.

Dinh T.P., Freund T.F., Piomelli D., 2002. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*. 121,149-158.

Dixon D.B., Copenhagen D.R., 1992. Two types of glutamate receptors differentially excite amacrine cells in the tiger salamander retina. *J Physiol.* 449,589-606.

Docherty R.J., Yeats J.C., Piper A.S., 1997. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol*. 121;1461-1467.

Donovan M., Doonan F., Cotter T.G., 2011. Differential roles of ERK1/2 and JNK in Dreixler J.C., Hemmert J.W., Shenoy S.K., Shen Y., Lee H.T., Shaikh A.R., Rosenbaum D.M., Roth S., 2009. The role of Akt/protein kinase B subtypes in retinal ischemic preconditioning. *Exp Eye Res.* 88,512–521.

Duvoisin R.M., Zhang C., Ramonell K., 1995. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci.* 15,3075-3083.

Egertová M., Simon G.M., Cravatt B.F., Elphick M.R., 2008. Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules. *J Comp Neurol.* 506,604-615.

Elphick M.R., Egertová M., 2001. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356,381-408.

El-Remessy A.B., Khalil I.E., Matragoon S., Abou-Mohamed G., Tsai N.J., Roon P., Caldwell R.B., Caldwell R.W., Green K., Liou G.I., 2003. Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol.* 163,1997-2008.

Eshhar N., Striem S., Biegon A., 1993. HU-211, a non-psychotropic cannabinoid, rescues cortical neurones from excitatory amino acid toxicity in culture. *Neuroreport*. 5,237-240.

Fairman W.A., Vandenberg R.J., Arriza J.L., Kavanaugh M.P., Amara S.G., 1995. Anexcitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. 375,599-603.

Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M., Mansouri J., Mackie K., Blond O., Lai Y., Ma A.L., Mitchell R.L., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48,443-450.

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

Ferreira I.L., Duarte C.B., Carvalho A.P., 1997. "Chemical ischemia" in cultured retina cells: the role of excitatory amino acid receptors and of energy levels on cell death. *Brain Res.* 768,157-166.

Fine S.L., Berger J.W., Maguire M.G., Ho A.C., 2000. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 342,483-492.

Firth S.I., Li W., Massey S.C., Marshak D.W., 2003. AMPA receptors mediate acetylcholine release from starburst amacrine cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 466,80-90.

Fischer A.J., Seltner R.L., Poon J., Stell W.K., 1998. Immunocytochemical characterization of quisqualic acid- and N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the retina of chicks. *J Comp Neurol.* 393,1-15.

Fletcher E.L., Hack I., Brandstätter J.H., Wässle H., 2000. Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol*. 420,98-112.

Furuyama T., Inagaki S., Takagi H., 1993. Distribution of type II adenylyl cyclase mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 19,165-170.

Gainetdinov R.R., Premont R.T., Bohn L.M., Lefkowitz R.J., Caron M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci.* 27,107-144.

Galve-Roperh I., Rueda D., Gómez del Pulgar T., Velasco G., Guzmán M., 2002. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 62,1385-1392.

Gaoni Y., Mechoulam R., 1971. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 93,217-224.

Gastinger M.J., Singh R.S., Barber A.J., 2006. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47,3143-3150.

Gérard C.M., Mollereau C., Vassart G., Parmentier M., 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 279,129-134.

Ghosh K.K., Haverkamp S., Wassle H., 2001. Glutamate receptors in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci.* 21,8636-8647.

Gilbertson T.A., Scobey R., Wilson M., 1991. Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science*. 251,1613-1615.

Glaser S.T., Deutsch D.G., Studholme K.M., Zimov S., Yazulla S., 2005. Endocannabinoids in the intact retina: 3H-anandamide uptake, fatty acid amide hydrolase immunoreactivity and hydrolysis of anandamide. *Vis Neurosci.* 22,693–705.

Glass M., Felder C.C., 1997. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci.* 17,5327-5333.

Glass M., Northup J.K., 1999. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol.* 56,1362-1369.

Gomes I., Jordan B.A., Gupta A., Rios C., Trapaidze N., Devi L.A., 2001. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med (Berl)*. 79,226-242.

Gómez del Pulgar T., Velasco G., Guzmán M., 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J.* 347(Pt 2),369-373.

Gonsiorek W., Lunn C., Fan X., Narula S., Lundell D., Hipkin R.W., 2000. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol.* 57,1045-1050.

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

Grünert U., Haverkamp S., Fletcher E.L., Wässle H., 2002. Synaptic distribution of ionotropic glutamate receptors in the inner plexiform layer of the primate retina. *J Comp Neurol.* 447,138-151.

Gulyas A.I., Cravatt B.F., Bracey M.H., Dinh T.P., Piomelli D., Boscia F., Freund T.F., 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci.* 20,441-458.

Hampson A.J., Bornheim L.M., Scanziani M., Yost C.S., Gray A.T., Hansen B.M., Leonoudakis D.J., Bickler P.E., 1998. Dual effects of anandamide on NMDA receptormediated responses and neurotransmission. *J Neurochem.* 70,671-676.

Hartveit E., Brandstätter J.H., Enz R., Wässle H., 1995. 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.* 7,1472-1483.

Hartveit E., Brandstätter J.H., Sassoè-Pognetto M., Laurie D.J., Seeburg P.H., Wässle H., 1994. Localization and developmental expression of the NMDA receptor subunit NR2A in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 348,570-582.

Hartveit E., Veruki M.L., 1997. AII amacrine cells express functional NMDA receptors. *Neuroreport.* 8:1219-1223.

Harvey D.M., Calkins D.J., 2002. Localization of kainate receptors to the presynaptic active zone of the rod photoreceptor in primate retina. *Vis Neurosci.* 19,681-692.

Hashimotodani Y., Ohno-Shosaku T., Kano M., 2007. Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci.* 27,1211-1219.

Hashimotodani Y., Ohno-Shosaku T., Maejima T., Fukami K., Kano M., 2008. Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocanabinoid release. *Neuropharmacology*. 54,58-67.

Herkenham M., Lynn A.B., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 11,563-583.

Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87,1932-1936.

Hosohata Y., Quock R.M., Hosohata K., Makriyannis A., Consroe P., Roeske W.R., Yamamura H.I., 1997. AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 321,R1-3.

Howlett A.C., 1984. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci.* 35,1803-1810.

Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54,161-202.

Howlett A.C., Breivogel C.S., Childers S.R., Deadwyler S.A., Hampson R.E., Porrino L.J., 2004. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 47 Suppl 1,345-358.

Howlett A.C., Fleming R.M., 1984. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* 26,532-538.

Howlett A.C., Qualy J.M., Khachatrian L.L., 1986. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol.* 29,307-313.

Hu S.S., Arnold A., Hutchens J.M., Radicke J., Cravatt B.F., Wager-Miller J., Mackie K., Straiker A., 2010. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol.* 518,3848-3866.

Hughes T.E., Hermans-Borgmeyer I., Heinemann S., 1992. Differential expression of glutamate receptor genes (GluR1-5) in the rat retina. *Vis Neurosci.* 8,49-55.

Ientile R., Macaione V., Teletta M., Pedale S., Torre V., Macaione S., 2001. Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. *J. Neurochem.* 79,71-78.

Iversen L., Chapman V., 2002. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr Opin Pharmacol.* 2,50-55.

Johnson J.W., Ascher P., 1990. Voltage-dependent block by intracellular Mg2+ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophys J*. 57,1085-1090.

Joo C.K., Choi J.S., Ko H.W., Park K.Y., Sohn S., Chun M.H., Oh Y.J., Gwag B.J., 1999. Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA mediated excitotoxicity and p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40,713e720.

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

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

Kapin M.A., Doshi R., Scatton B., DeSantis L.M., Chandler M.L., 1999. Neuroprotective effects of eliprodil in retinal excitotoxicity and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40,1177-1182.

Karanian D.A., Brown Q.B., Makriyannis A., Bahr B.A., 2005a. Blocking cannabinoid activation of FAK and ERK1/2 compromises synaptic integrity in hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 508,47-56.

Karanian D.A., Brown Q.B., Makriyannis A., Kosten T.A., Bahr B.A., 2005b. Dualbmodulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J. Neurosci.* 25,7813e7820.

Katona I., Urbán G.M., Wallace M., Ledent C., Jung K.M., Piomelli D., Mackie K., Freund T.F., 2006. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 26,5628-5637.

Khanolkar A.D., Abadji V., Lin S., Hill W.A., Taha G., Abouzid K., Meng Z., Fan P., Makriyannis A., 1996. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J Med Chem.* 39,4515-4519.

Kiagiadaki F., Thermos K., 2008. Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49,3080-3089.

Knöpfel T., Kuhn R., Allgeier H., 1995. Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. *J Med Chem.* 38,1417-1426.

Kokona D., Charalampopoulos I., Pediaditakis I., Gravanis A., Thermos K., 2012a. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. *Neuropharmacol.* 62,2106-2117.

Kokona D., Mastrodimou N., Pediaditakis I., Charalampopoulos I., Schmid H.A., Thermos K., 2012b. Pasireotide (SOM230) protects the retina in animal models of ischemia induced retinopathies. *Exp Eye Res.* 103,90-98.

Kondo S., Kondo H., Nakane S., Kodaka T., Tokumura A., Waku K., Sugiura T., 1998. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* 429,152-156.

Koulen P., Kuhn R., Wässle H., Brandstätter J.H., 1997. Group I metabotropic glutamate receptors mGluR1alpha and mGluR5a: localization in both synaptic layers of the rat retina. *J Neurosci.* 17,2200-2211.

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

Koulen P., Malitschek B., Kuhn R., Wässle H., Brandstätter J.H., 1996. Group II and group III metabotropic glutamate receptors in the rat retina: distributions and developmental expression patterns. *Eur J Neurosci.* 8,2177-2187.

Kozak K.R., Rowlinson S.W., Marnett L.J., 2000. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 275,33744-33749.

Krishnan G., Chatterjee N., 2012. Endocannabinoids alleviate proinflammatory conditions by modulating innate immune response in muller glia during inflammation. *Glia.* 60,1629-1645.

Krishnan S., Cairns R., Howard R., 2009. Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* (2):CD007204.

Krizaj D., Akopian A., Witkovsky P., 1994. The effects of L-glutamate, AMPA, quisqualate, and kainate on retinal horizontal cells depend on adaptational state: implications for rod-cone interactions. *J Neurosci.* 14:5661-5671.

Kuenzi F.M., Dale N., 1996. Effect of capsaicin and analogues on potassium and calcium currents and vanilloid receptors in Xenopus embryo spinal neurones. *Br J Pharmacol.* 119,81-90.

Kuroiwa S., Katai N., Shibuki H., Kurokawa T., Umihira J., Nikaido T., Kametani K., Yoshimura N., 1998. Expression of cell cycle-related genes in dying cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39,610-617.

Kuroiwa S., Katai N., Yoshimura N., 1999. A possible role for p16INK4 in neuronal cell death after retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40,528-533.

Lafuente M.P., Villegas-Pérez M.P., Sellés-Navarro I., Mayor-Torroglosa S., Miralles de Imperial J., Vidal-Sanz M., 2002. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neurosci.* 109, 157-168.

Landsman R.S., Makriyannis A., Deng H., Consroe P., Roeske W.R., Yamamura H.I., 1998. AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci.* 62,PL109-113.

Lax P., Esquiva G., Altavilla C., Cuenca N., 2014. Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 120,175-185.

Leonelli M., Martins D.O., Kihara A.H., Britto L.R., 2009. Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina. *Int J Dev Neurosci.* 27,709-18.

L'Esperance F.A. Jr., 1968. An opthalmic argon laser photocoagulation system: design, construction, and laboratory investigations. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 66,827-904.

Li G., Anderson R.E., Tomita H., Adler R., Liu X., Zack D.J., Rajala R.V., 2007. Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death. *J Neurosci.* 27,203-211.

Li H.L., Lin H., 1974. An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany* 28,437-447.

Lin A., 2003. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the break on apoptosis. *Bioessays*. 25,1-8.

Lipinski D.M., Thake M., MacLaren R.E., 2013. Clinical applications of retinal gene therapy. *Prog Retin Eye Res.* 32,22-47.

Lipton A.J., Johnson M.A., Macdonald T., Lieberman M.W., Gozal D., Gaston B., 2001. Snitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature*. 413,171-174.

Lipton S.A., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev. 79,1431-1568.

Lipton S.A., Rosenberg P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 330,613-622.

Liu H., Sun H., Liu C., 2011. Interference of the apoptotic signaling pathway in RGC stress response by SP600125 in moderate ocularhypertensive rats. *Chin J Physiol*. 54, 124-132.

Liu J., Gao B., Mirshahi F., Sanyal A.J., Khanolkar A.D., Makriyannis A., Kunos G., 2000. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J.* 346 Pt 3,835-840.

Liu J., Wang L., Harvey-White J., Osei-Hyiaman D., Razdan R., Gong Q., Chan A.C., Zhou Z., Huang B.X., Kim H.Y., Kunos G., 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103,13345-13350.

Liu L., Simon S.A., 1997. Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neurosci Lett.* 228,29-32.

Liu S.J., Zukin R.S., 2007. Ca2+-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30,126-134.

López E.M., Tagliaferro P., Onaivi E.S., López-Costa J.J., 2011. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse*. 65,388-392.

Lu Q., Straiker A., Lu Q., Maguire G., 2000. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci.* 17,91-95.

Lucas D.R., Newhouse J.P., 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol.* 58,193-201.

Mackie K., Devane W.A., Hille B., 1993. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol.* 44,498-503.

Mackie K., Hille B., 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89,3825-3829.

Mackie K., Lai Y., Westenbroek R., Mitchell R., 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 15,6552-6561.

Madden D.R., 2002. The inner workings of the AMPA receptors. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 5,741-748.

Maione S., Cristino L., Migliozzi A.L., Georgiou A.L., Starowicz K., Salt T.E., Di Marzo V., 2009. TRPV1 channels control synaptic plasticity in the developing superior colliculus. *J Physiol*. 587,2521-2535.

Makara J.K., Mor M., Fegley D., Szabó S.I., Kathuria S., Astarita G., Duranti A., Tontini A., Tarzia G., Rivara S., Freund T.F., Piomelli D., 2005. Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci.* 8,1139-1141.

Maneuf Y.P., Brotchie J.M., 1997. Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *Br J Pharmacol.* 120,1397-1398.

Masland R.H., 1988. Amacrine cells. Trends Neurosci. 11,405-410.

Masland R.H., 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*. 11,431-436.

Mastrodimou N., Lambrou G.N., Thermos K., 2005. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 371,44-53.

Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346,561-564.

Matsuda S., Kanemitsu N., Nakamura A., Mimura Y., Ueda N., Kurahashi Y., Yamamoto S., 1997. Metabolism of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, in porcine ocular tissues. *Exp Eye Res.* 64,707-711.

Mechoulam R., Lichtman A.H., 2003. Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science*. 302,65-67.

Melck D., Bisogno T., De Petrocellis L., Chuang H., Julius D., Bifulco M., Di Marzo V., 1999. Unsaturated long-chain N-acyl-vanillyl-amides (N-AVAMs): vanilloid receptor ligands that inhibit anandamide-facilitated transport and bind to CB1 cannabinoid receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 262,275-284.

Melis M., Perra S., Muntoni A.L., Pillolla G., Lutz B., Marsicano G., Di Marzo V., Gessa G.L., Pistis M., 2004. Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci.* 24,10707-10715.

Molina-Holgado F., Pinteaux E., Heenan L., Moore J.D., Rothwell N.J., Gibson R.M., 2005. Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol Cell Neurosci.* 28,189-194.

Mora A., Sabio G., González-Polo RA., Cuenda A., Alessi D.R., Alonso J.C., Fuentes J.M., Soler G., Centeno F., 2001. Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K+ deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 78,199-206.

Müller F., Greferath U., Wässle H., Wisden W., Seeburg P., 1992. Glutamate receptor expression in the rat retina. *Neurosci Lett.* 138,179-182.

Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365,61-65.

Murataeva N., Mackie K., Straiker A., 2012. The CB2-preferring agonist JWH015 also potently and efficaciously activates CB1 in autaptic hippocampal neurons. *Pharmacol Res.* 66,437-442.

Nadler V., Mechoulam R., Sokolovsky M., 1993. The non-psychotropic cannabinoid (+)-(3S,4S)-7-hydroxy-delta 6- tetrahydrocannabinol 1,1-dimethylheptyl (HU-211) attenuates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in primary cultures of rat forebrain. *Neurosci Lett.* 162,43-45.

Naidoo V., Karanian D.A., Vadivel S.K., Locklear J.R., Wood J.T., Nasr M., Quizon P.M., Graves E.E., Shukla V., Makriyannis A., Bahr B.A., 2012. Equipotent inhibition of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase - dual targets of the endocannabinoid system to protect against seizure pathology. *Neurotherapeutics*. 9,801-813.

Naidoo V., Nikas S.P., Karanian D.A., Hwang J., Zhao J., Wood J.T., Alapafuja S.O., Vadivel S.K., Butler D., Makriyannis A., Bahr B.A., 2011. A new generation fatty acid amide hydrolase inhibitor protects against kainate-induced excitotoxicity. *J Mol Neurosci.* 43,493-502.

Nakanishi S., Nakajima Y., Masu M., Ueda Y., Nakahara K., Watanabe D., Yamaguchi S., Kawabata S., Okada M., 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev.* 26,230-235.

Nucci C., Gasperi V., Tartaglione R., Cerulli A., Terrinoni A., Bari M., De Simone C., Agrò A.F., Morrone L.A., Corasaniti M.T., Bagetta G., Maccarrone M., 2007. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48,2997-3004.

Nyilas R., Dudok B., Urbán G.M., Mackie K., Watanabe M., Cravatt B.F., Freund T.F., Katona I., 2008. Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci.* 28,1058-1063.

O'Dell T.J., Christensen B.N., 1989a. A voltage-clamp study of isolated stingray horizontal cell non-NMDA excitatory amino acid receptors. *J Neurophysiol*. 61,162-172.

O'Dell T.J., Christensen B.N., 1989b. Horizontal cells isolated from catfish retina contain two types of excitatory amino acid receptors. *J Neurophysiol*. 61,1097-1109.

Okamoto Y., Wang J., Morishita J., Ueda N., 2007. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers.* 4,1842-1857.

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

Orlando L.R., Dunah A.W., Standaert D.G., Young AB., 2002. Tyrosine phosphorylation of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in striatal neurons. *Neuropharmacology*. 43,161-173.

Osborne N.N., Casso R.J., Wood J.P., Chidlow G., Graham M., Melena J., 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 23, 91-147.

Osborne N.N., Herrera A.J., 1994. The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neuroscience*. 59,1071-1081.

Osborne N.N., Larsen A., Barnett N.L., 1995a. Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36,1692-1700.

Osborne N.N., Ugarte M., Chao M., Chidlow G., Bae J.H., Wood J.P., Nash M.S., 1999. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol 43 Suppl.* 1,102-128.

Osborne N.N., Wood J., Muller A., 1995b. The influence of experimental ischaemia on protein kinase C and the GABAergic system in the rabbit retina. *Neuropharmacology*. 34,1279-1288.

O'Shaughnessy W.B., 1839. Case of Tetanus, Cured by a Preparation of Hemp (the Cannabis indica.), *Transactions of the Medical and Physical Society of Bengal* 8,1838-40, 462-469

Ozaita A., Puighermanal E., Maldonado R., 2007. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem*. 102,1105-1114.

Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54,581-618.

Pate D.W., Järvinen K., Urtti A., Mahadevan V., Järvinen T., 1998. Effect of the CB1 receptor antagonist, SR141716A, on cannabinoid-induced ocular hypotension in normotensive rabbits. *Life Sci.* 63,2181-2188.

Peng Y.W., Blackstone C.D., Huganir R.L., Yau K.W., 1995. Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience*. 66,483-497.

Pertwee R.G., 2005. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* 76,1307-24.

Pertwee R.G., Ross R.A., 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 66,101-121.

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

Pines G., Danbolt N.C., Bjørås M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L., Koepsell H., Storm-Mathisen J., Seeberg E., Kanner B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L glutamatetransporter. *Nature*. 360,464-467.

Porcella A., Casellas P., Gessa G.L., Pani L., 1998. Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marihuana. *Brain Res Mol Brain Res.* 58,240-245.

Porcella A., Maxia C., Gessa G.L., Pani L., 2000. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur J Neurosci.* 12,1123-1127.

Price D.A., Martinez A.A., Seillier A., Koek W., Acosta Y., Fernandez E., Strong R., Lutz B., Marsicano G., Roberts J.L., Giuffrida A., 2009. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 29,2177-2186.

Puente N., Cui Y., Lassalle O., Lafourcade M., Georges F., Venance L., Grandes P., Manzoni O.J., 2011. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci.* 14,1542-1547.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A.S., McNamara J.O., Williams S.M., 2001. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Chapter 7. Fig. 7-12.

Qin P., Pourcho R.G., 1996. Distribution of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the cat retina. *Brain Res.* 710,303-307.

Rábl K., Reglodi D., Bánvölgyi T., Somogyvári-Vigh A., Lengvári I., Gábriel R., Arimura A., 2002. PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. *Regul Pept.* 109,71-74.

Ramon y Cajal S., 1911. Histologie du syste`me nerveux de l'homme et des verte´bre´s, Paris: Maloine. 2,891–942.

Rea K., Roche M., Finn D.P., 2007. Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. *Br J Pharmacol.* 152,633-48.

Reiter C.E., Sandirasegarane L., Wolpert E.B., Klinger M., Simpson I.A., Barber A.J., Antonetti D.A., Kester M., Gardner T.W., 2003. Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285,E763-74.

Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G.P., Mariotti S.P., 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 82,844-851.

retinal development and degeneration. J. Neurochem. 116,33e42.

Rey J.M., Martin A., Krabman P., 2004. Is the party over? Cannabis and juvenile psychiatric disorder: the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 43,1194-1205.

Rice A.S., Farquhar-Smith W.P., Nagy I., 2002. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 66,243-256.

Ross R.A., 2003. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol. 140,790-801.

Ross R.A., Brockie H.C., Stevenson L.A., Murphy V.L., Templeton F., Makriyannis A., Pertwee R.G., 1999. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol.* 126,665-672.

Rothen M., Jablon E., Monares G., Fontal M.R., Alfaro D.V. 3rd., 2005. Anti-macular degeneration agents. *Ophthalmol Clin North Am.* 18,561-567.

Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 152,1092-1101.

Sanacora G., Zarate C.A., Krystal J.H., Manji H.K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 7,426-437.

Sánchez M.G., Ruiz-Llorente L., Sánchez A.M., Díaz-Laviada I., 2003. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal.* 15,851-859.

Sanvicens N., Gomez-Vicente V., Masip I., Messeguer A., Cotter T.G., 2004. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *J Biol Chem* 279,39268 – 39278.

Schiller P.H., 1992. The ON and OFF channels of the visual system. *Trends Neurosci*. 15,86-92.

Schlosburg J.E., Blankman J.L., Long J.Z., Nomura D.K., Pan B., Kinsey S.G., Nguyen P.T., Ramesh D., Booker L., Burston J.J., Thomas E.A., Selley D.E., Sim-Selley L.J., Liu Q.S., Lichtman A.H., Cravatt B.F., 2010. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci*. 13,1113-1119.

Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 671-675.

Schuettauf F., Stein T., Choragiewicz T.J., Rejdak R., Bolz S., Zurakowski D., Varde MA, Laties A.M., Thaler S., 2011. Caspase inhibitors protect against NMDA-mediated retinal ganglion cell death. *Clin Experiment Ophthalmol.* 39,545-554.

Schultz K., Goldman D.J., Ohtsuka T., Hirano J., Barton L., Stell W.K., 1997. Identification and localization of an immunoreactive AMPA-type glutamate receptor subunit (GluR4) with respect to identified photoreceptor synapses in the outer plexiform layer of goldfish retina. *J Neurocytol.* 26,651-666.

Shatz C.J., Sretavan D.W., 1986. Interactions between retinal ganglion cells during the development of the mammalian visual system. *Annu Rev Neurosci.* 9,171-207.

Shen M., Thayer S.A., 1998. The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 783,77-84.

Siliprandi R., Lipartiti M., Fadda E., Sautter J., Manev H., 1992. Activation of the glutamate metabotropic receptor protects retina against N-methyl-D-aspartate toxicity. *Eur J Pharmacol.* 219,173-174.

Simon G.M., Cravatt B.F., 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem.* 281,26465-26472.

Sinor A.D., Irvin S.M., Greenberg D.A., 2000. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 278,157-160.

Sluss H.K., Barrett T., Dérijard B., Davis R.J., 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol.* 14,8376-8384.

Smart D., Gunthorpe M.J., Jerman J.C., Nasir S., Gray J., Muir A.I., Chambers J.K., Randall A.D., Davis J.B., 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol.* 129,227-230.

Smith K.S., Berridge K.C., 2007. Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci.* 27,1594-1605.

Song Z.H., Slowey C.A., 2000. Involvement of cannabinoid receptors in the intraocular pressure-lowering effects of WIN55212-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 292,136-139.

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

Straiker A., Stella N., Piomelli D., Mackie K., Karten H.J., Maguire G., 1999a. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96,14565-14570.

Straiker A.J., Maguire G., Mackie K., Lindsey J., 1999b. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40,2442-2448.

Sugiura T., Kodaka T., Nakane S., Miyashita T., Kondo S., Suhara Y., Takayama H., Waku K., Seki C., Baba N., Ishima Y., 1999a. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem.* 274,2794-2801.

Sugiura T., Kondo S., Kishimoto S., Miyashita T., Nakane S., Kodaka T., Suhara Y., Takayama H., Waku K., 2000. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem.* 275,605-612.

Sugiura T., Kondo S., Nakane S., Waku K., 1999b. [2-Arachidonoylglycerol: an endogenous cannabinoid receptor agonist]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 44,1104-1110.

Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 215,89-97.

Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y., Waku K., 1996. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonoylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur J Biochem.* 240,53-62.

Tachibana M., 1985. Permeability changes induced by L-glutamate in solitary retinal horizontal cells isolated from Carassius auratus. *J Physiol*. 358,153-167.

Tang F., Tang G., Xiang J., Dai Q., Rosner M.R., Lin A., 2002. Absence of NF-kBmediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor a induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22,8571-8579.

Tehrani A., Wheeler-Schilling T.H., Guenther E., 2000. Coexpression patterns of mGLuR mRNAs in rat retinal ganglion cells: a single-cell RT-PCR study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41,314-319.

Todd A.R., 1940. Chemistry of the hemp drugs. Nature. 146,829-830.

Ullian E.M., Barkis W.B., Chen S., Diamond J.S., Barres B.A., 2004. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci*. 26,544-557.

Van der Stelt M., Di Marzo V., 2005. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromol Med.* 7,37-50.

Van der Stelt M., Fox S.H., Hill M., Crossman A.R., Petrosino S., Di Marzo V., Brotchie J.M., 2005. A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J.* 19,1140-1142.

Van der Stelt M., Veldhuis W.B., van Haaften G.W., Fezza F., Bisogno T., Bar P.R., Veldink G.A., Vliegenthart J.F., Di Marzo V., Nicolay K., 2001. Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J Neurosci.* 21,8765-8771.

Van Sickle M.D., Duncan M., Kingsley P.J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J.S., Marnett L.J., Di Marzo V., Pittman Q.J., Patel K.D., Sharkey K.A., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310,329-332.

Vandenbranden C.A., Kamphuis W., Nunes Cardozo B., Kamermans M., 2000. Expression and localization of ionotropic glutamate receptor subunits in the goldfish retina--an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Neurocytol.* 29,729-742.

Vardi N., 1998. Alpha subunit of Go localizes in the dendritic tips of ON bipolar cells. *J Comp Neurol*. 395,43-52.

Vardi N., Duvoisin R., Wu G., Sterling P., 2000. Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol*. 423,402-412.

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

Wade M.R., Tzavara E.T., Nomikos G.G., 2004. Cannabinoids reduce cAMP levels in the striatum of freely moving rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 1005,117-123.

Wager-Miller J., Westenbroek R., Mackie K., 2002. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*. 121,83-9.

Wang H., Xie H., Sun X., Kingsley P.J., Marnett L.J., Cravatt B.F., Dey S.K., 2007. Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 83,62-74.

Wang X., Niwa M., Hara A., Matsuno H., Kawase K., Kozawa O., Mow H., Uematsu T., 2002. Neuronal degradation in mouse retina after a transient ischemia and protective effect of hypothermia. *Neurol Res.* 24,730-735.

Wartmann M., Campbell D., Subramanian A., Burstein S.H., Davis R.J., 1995. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* 359,133-136.

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

Wenzel A., Fritschy J.M., Mohler H., Benke D., 1997. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem.* 68,469-478.

Witmer A.N., Vrensen G.F., Van Noorden C.J., Schlingemann R.O., 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 22,1-29.

Yang R., Yang X., 2001. Differential modulation by AMPA of signals from red- and green-sensitive cones in carp retinal luminosity-type horizontal cells. *Sci China C Life Sci.* 44:373-382.

Yang X.L., 2004. Characterization of receptors fro glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol*. 73,127-150.

Yang X.L., Wu S.M., 1991. Coexistence and function of glutamate receptor subtypes in the horizontal cells of the tiger salamander retina. *Vis Neurosci.* 7,377-382.

Yazulla S., 2008. Endocannabinoids in the Retina: From Marijuana to Neuroprotection. *Prog Retin Eye Res.* 27,501–526.

Yazulla S., Studholme K.M., McIntosh H.H., Deutsch D.G., 1999. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol.* 415,80-90.

Yazulla S., Studholme K.M., McIntosh H.H., Fan S.F., 2000. Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Vis Neurosci.* 17,391-401.

Yoshida T., Fukaya M., Uchigashima M., Miura E., Kamiya H., Kano M., Watanabe M., 2006. Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-

arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. J Neurosci. 26,4740-4751.

Zhang C., Hammassaki-Britto D.E., Britto L.R., Duvoisin R.M., 1996. Expression of glutamate receptor subunit genes during development of the mouse retina. *Neuroreport*. 8,335-340.

Zhang X., Chaudhry A., Chintala S.K., 2003. Inhibition of plasminogen activation protects against ganglion cell loss in a mouse model of retinal damage. *Mol Vis.* 9,238-248.

Zimmer A., Zimmer A.M., Hohmann A.G., Herkenham M., Bonner T.I., 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci.* 96,5780-5785.

Zimov S., Yazulla S., 2007. Vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1) co-localizes with fatty acid amide hydrolase (FAAH) in retinal amacrine cells. *Visual Neurosci.* 24,581–591.

Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H., Sørgård M., Di Marzo V., Julius D., Högestätt E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400,452-457.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α:

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Name: Despina Kokona Date of birth: February 18th 1986 Place of birth: Chios, Greece Address: Murtenstrasse 141, Bern, Switzerland Tel: +41316328535, +41798991063 E-mail: despina.kokona@insel.ch



Current position

March 2015-present **Research Assistant**, Department of Ophthalmology, Inselspital, Bern University Hospital and University of Bern, Bern, Switzerland

<u>Research project:</u> "Microglia/macrophages dynamics in the retina in experimental models of retinopathies".

Mentors: Dr M.S. Zinkernagel, Consultant ophthalmic surgeon. Dr A. Ebneter, Senior Physician.

Education

Feb 2011- Sep 2015 **PhD student**, Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete

<u>**Title of thesis:**</u> "Study of the neuroprotective action of cannabinoids in retinal ischemia".

Mentor: Dr K. Thermos, Professor of Pharmacology.

Oct 2008-Oct 2010 MSc in "Neuroscience", University of Crete, School of Medicine. Grade: 9,08 (The highest awarded grade in my class awarded the Christina Spyraki Scholarship).

<u>**Title of thesis:**</u> "Study of the neuroprotective action of neurosteroids in an *in vivo* model of AMPA excitotoxicity in rat retina".

Mentor: Dr K. Thermos, Professor of Pharmacology, Laboratory of Pharmacology, School of Medicine.

Oct 2003-Apr 2008 **BS** in **Biology**, University of Crete, Department of Biology. Grade: **6,96.** <u>**Title of thesis:**</u> "The effect of somatostatin in rat locomotor activity, after administration in the striatum".

Mentor: Dr K. Thermos, Professor of Pharmacology, Laboratory of Pharmacology, School of Medicine.

Publications

- 1. Kokona D, Georgiou PC, Kounenidakis M, Kiagiadaki F, Thermos K. Endogenous and Synthetic Cannabinoids as Therapeutics in Retinal Disease (Review). Special Issue on "Cannabinoids in the Brain: New Vistas on an Old Dilemma", *Neural Plasticity* (submitted)
- Kokona D, Thermos K. Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity *in vivo*, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Experimental Eye Research*, 2015, 136:45-58. [PMID: 25989217]
- **3. Kokona D**, Mastrodimou N, Pediaditakis I, Charalampopoulos I, Schmid HA, Thermos K .Pasireotide (SOM230) protects the retina in animal models of ischemia induced retinopathies. *Experimental Eye Research*, 2012, 103:90-8. [PMID:22960304]
- **4. Kokona D**, Charalampopoulos I, Pediaditakis I, Gravanis A, Thermos K. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. *Neuropharmacology*, 2012, 62:2106-17. [PMID:22269901]
- Santis S, Kastellakis A, Kotzamani D, Pitarokoili K, Kokona D, Thermos K. Somatostatin increases rat locomotor activity by activating sst2 and sst4 receptors in the striatum and via glutamatergic involvement. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2009, 379:181-9. [PMID:18766327]

Abstracts/Posters/Oral presentations

- **1. D. Kokona,** N.U. Häner, A. Ebneter and M.S. Zinkernagel. Macrophages infiltrate into the retina during an *in vivo* murine model of Anterior Ischemic Optic Neuropathy. Similarities with OCT observations in humans. Day of Clinical Research, Bern, Switzerland, 4 November, 2015.
- **2. D. Kokona,** N.U. Häner, A. Ebneter and M.S. Zinkernagel. Role of macrophages in the course of an *in vivo* murine model of Anterior Ischemic Optic Neuropathy. Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), Nice, France, 7-10 October, 2015.

- **3.** S. Lisa , R. Ibán-Arias, N. Mastrodimou, **D. Kokona**, P. Iordanidou, M. Boumpouli, A. Gravanis, I. Charalampopoulos, K. Thermos. Novel microneurotrophinsprotect retinal neurons by activating the NGF TrkA receptorin the *in vivo* Streptozotocin (STZ)-model of Diabetic Retinopathy and afford anti-inflammatory effects. Fens Featured Regional Meeting (FFRM), Thessaloniki, Greece, 7-10 October, 2015.
- 4. R. Ibán Arias, S. Lisa, S. Poulaki, N. Mastrodimou, D. Kokona, M. Boumpouli, A. Gravanis, I. Charalampopoulos, K. Thermos. The microneurotrophin BNN27 provides neuroprotection to retinal neurons through NGF TrkA receptor, when it is administered either intraperitoneally or as eye-drops. 16th Congress of the Spanish Society of Neuroscience (SENC), Granada, Spain, 23-25 September, 2015.
- **5.** Lisa S, Iban-Arias R, Mastrodimou N, **Kokona D**, Charampopoulos I, A Gravanis, Thermos K. EFFECTS OF NOVEL SYNTHETIC MICRONEUROTROPHINS IN DIABETIC RETINOPATHY. European Society for Neurochemistry's Conference Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System, Tartu, Estonia, June 14-17, 2015.
- **6.** N. Mastrodimou, S. Lisa Ferrer, R. Ibán Arias, **D. Kokona,** I. Charalampopoulos, A. Gravanis, K. Thermos. The novel microneurotrophin BNN27 protects retinal neurons in the in vivo STZ-model of Diabetic Retinopathy by activating NGF TrkA receptor. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, Colorado, USA, 3-7 May, 2015.
- **7. D. Kokona**, A. Zimmer and K. Thermos. 2-Arachidonoylglycerol protects the retina from AMPA excitotoxicity *in vivo* via the activation of CB1 receptor. Involvement of the PI3K/Akt signaling pathway. Society for Neuroscience (SfN), Washington, DC, USA, 15-19 November, 2014.
- **8.** K. Thermos, N. Mastrodimou, S. Lisa, R. Ibán Arias, S. Poulaki, P. Iordanidou, P. Giannogonas, **D. Kokona**, M. Kamaratou, E. Volitaki, I. Charalampopoulos, A. Gravanis. Effect of the synthetic neurosteroidal derivatives BNN 20 and 27 in an *ex vivo* model of chemical ischemia and the *in vivo* STZ-model of Diabetic Retinopathy: Neuroprotection via TrkA signaling. Society for Neuroscience (SfN), Washington, DC, USA, 15-19 November, 2014.
- **9. D.** Kokona, A. Zimmer and K. Thermos. Synthetic and endogenous cannabinoids protect the retina from AMPA-induced excitotoxicity *in vivo*. 9th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Milan, Italy, 5-9 July, 2014.
- 10. D. Kokona, A. Makriyannis, A. Zimmer and K. Thermos. Endogenous cannabinoids and the inhibitors of their metabolic enzymes protect the retina from AMPA-induced excitotoxicity *in vivo*. 8th Congress of the Hellenic Society for Basic and Clinical Pharmacology, Athens, 23-25 May, 2014 (oral presentation). 1st EPHAR award.
- **11. D. Kokona** and K. Thermos. Study of the neuroprotective properties of cannabinoids in retinal ischemia. Hrakleitos II meeting, Heraklion, Crete, Greece, 4-5 December, 2012 (oral presentation).

- **12. D. Kokona** and K. Thermos. Synthetic cannabinoids protect the retina from AMPAinduced excitotoxicity *in* vivo. 8th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Barcelona, Spain, 14-18 July, 2012.
- 13. D. Kokona, N. Mastrodimou, S. Pediaditakis, H.A. Schmid, F. Kiagiadaki, K. Thermos. Pasireotide (SOM230) protects the retina from ischemia induced retinopathies. Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), Hersonissos, Crete, 5-8 October, 2011. First prize of the poster scientific section Physiology/Biochemistry/Pharmacology.
- 14. D. Kokona, I. Charalampopoulos, A. Gravanis, K. Thermos. Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA excitotoxicity *in vivo*: TrkA receptor involvement. 23rd Biennal Meeting of International and European Societies of Neurochemistry (ISN-ESN). Athens, 28 August-1 September, 2011. Travel Award
- **15.** K. Thermos, N. Mastrodimou, **D. Kokona**, H.A. Schmid, F. Kiagiadaki. Somatostatin analogues as therapeutics in ischemia induced retinopathies. European Neuropeptide Conference and the European Neuropeptide Club Meeting, Boston, Massachusets (USA.), May 22-25, 2011.
- 16. K Thermos, P Giannogonas, E Koulakis, D Kokona, N Mastrodimou, F Kiagiadaki, I Charalampopoulos, A Gravanis, Immunohistochemistry and Western blot methodologies to evaluate neuroprotective agents in models of retinopathies. Special Issue: Annual Meeting of the European Association for Vision and Eye Research. Acta Ophthalmologica 88, Issue Supplement s246, 2010.
- 17. K. Thermos, D. Kokona, I. Charalampopoulos, A. Gravanis. DHEA mimics NGF neuroprotective effects against retinal AMPA excitotoxicity *in vivo*. Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), Hersonisos, Greece, 6-9 October, 2010. First prize of the poster scientific section Physiology/Biochemistry/Pharmacology.
- **18. D. Kokona**, I. Charalampopoulos, A. Gravanis, K. Thermos. DHEA mimics NGF neuroprotective effects against retinal AMPA excitotoxicity *in vivo*. Research Gala of Hellenic Society of Neuroscience, Athens, Greece, 1-2 October, 2010 (**Awarded** oral presentation).
- **19. D. Kokona**, I. Charalampopoulos, A. Gravanis, K.Thermos. DHEA and NGF protect the retina from AMPA excitotoxicity *in vivo*. 6th Panellenic Conference of Hellenic Society of Pharmacology, Heraklion, Crete, 4-6 June, 2010.

Scholarships-Awards

- June 2014 **"Travel Scholarship in Memory of Marietta Isidoridou Radovits",** Hellenic Society for Neuroscience to attend the FENS 2014 meeting, Milan, 5-9 July, 2014.
- May 2014 **1st EPHAR award** for the oral presentation at the Young Investigators Forum, at the 8th Congress of the Hellenic Society for Basic and Clinical Pharmacology, Athens, 23-24 May, 2014.
- October 2011 First prize of the poster scientific section Physiology/Biochemistry/Pharmacology at the Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), Hersonissos, Crete, 5-8 October, 2011.
- September 2011 **Travel Award** from the International Society of Neurochemistry-European Society of Neurochemistry (ISN-ESN) for the attendance of the ISN-ESN 23rd Biennal Meeting. Athens, 28 August-1 September, 2011.
- October 2010 First prize of the poster scientific section Physiology/Biochemistry/Pharmacology at the Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), Hersonissos, Crete, 6-9 October, 2010.
- October 2010 Awarded oral presentation by the Hellenic Society of Neuroscience at the Research Gala of Hellenic Society of Neuroscience, Athens, Greece, 1-2 October, 2010.
- October 2010 **Christina Spyraki Scholarship** for the highest grade upon graduation in the Graduate Program of Neuroscience.

Research experience

March 2015present Research Assistant at the Department of Ophthalmology, Inselspital, Bern University Hospital and University of Bern, studying "the role of innate immunity in the course of experimental models of retinopathies".

Group leader: M.S. Zinkernagel (Consultant ophthalmic surgeon).

March 2014 Member of the scientific group of the Laboratory of Pharmacology, – Jan 2015 University of Crete, School of Medicine, studying "chronic retinal damage after streptozotocin administration in rats".

Supervisor: K. Thermos (Prof. of Pharmacology).

Febr 2011–PhD student in the University of Crete, School of Medicine, LaboratorySept 2015of Pharmacology.

<u>Title of thesis:</u> "Study of the neuroprotective action of cannabinoids in retinal ischemia".

Mentor: K. Thermos (Prof. of Pharmacology).

My PhD thesis focuses on the study of the neuroprotective properties of synthetic and endogenous cannabinoids, as well as the inhibitors of endocannabinoid metabolism, in an *in vivo* model of AMPA excitotoxicity in rodent retina, and the mechanism involved in these actions. Parts of this study have already been published (Kokona & Thermos, 2015) or presented as poster or oral presentations in different congresses. Recently the oral presentation with the title "Endogenous cannabinoids and the inhibitors of their metabolic enzymes protect the retina from AMPA-induced excitotoxicity *in vivo*" was awarded the 1st EPHAR poster award at the 8th Congress of the Hellenic Society for Basic and Clinical Pharmacology, May 2014.

27/1/2011 Member of the scientific group of the Laboratory of Pharmacology
27/5/2011 studying "the neuroprotective properties of SOM230 in retinal ischemia models".

Supervisor: K. Thermos (Prof. of Pharmacology).

The results of this study were presented as a poster presentation at the Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), October 2011, and the poster received the first prize in the scientific section Physiology/Biochemistry/Pharmacology. These results were subsequently published in the journal of Experimental Eye Research (PMID: 22960304).

20/1/2010 – **Master thesis** in the University of Crete, School of Medicine, Laboratory 17/12/2010 of Pharmacology.

<u>Title of thesis:</u> "Study of the neuroprotective action of neurosteroids in an *in vivo* model of AMPA excitotoxicity in rat retina".

Mentor: K. Thermos (Prof. of Pharmacology).

This study focused on the investigation of the neuroprotective actions of the neurosteroid DHEA and of two synthetic neurosteroids in an *in vivo* model of AMPA excitotoxicity in the rat retina, as well as the involvement of the NGF TrkA receptor in these actions. Part of this work was presented as poster presentation at the Annual Meeting of the European Association of Vision and Eye Research (EVER), Crete, October 2010, where it received the first prize of the poster scientific section Physiology/ Biochemistry/ Pharmacology. Part of this study was published in the Neuropharmacology journal (PMID: 22269901). 01/9/2009 – Lab rotation, as part of the requirements of the Graduate Program of
30/11/2009 – Neurosciences, in the Laboratory of Pharmacology studying "the *in vivo* neuroprotective actions of neurosteroids in a model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, in mice".

<u>Supervisor:</u> Dr I. Charalampopoulos (Assistant Professor of Pharmacology).

1/5/2009 – Lab rotation, as part of the requirements of the Graduate Program of
30/7/2009 Neurosciences, in the Neurology Department studying "the localization of
GLUT2 in testical and hippocampal tissues".

Supervisor: Dr. C. Spanaki (Assistant Professor of Neurology).

1/11/2006 – Undergraduate thesis in the University of Crete, School of Medicine, 18/5/2007Laboratory of Pharmacology.

<u>Title of thesis:</u> "The effect of somatostatin in rat locomotor activity, after *in vivo* administration in the striatum".

Mentor: K.Thermos (Prof. of Pharmacology).

Part of this work was published in the journal of Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (PMID: 18766327).

Laboratory experience

- <u>Immunohistochemical/histochemical studies</u>: immunohistochemistry of frozen and paraffin coated sections, TUNEL staining, cryoprotection, etc
- <u>Cryostat-Microtome sectioning</u>
- Optical, fluorescence and confocal microscopy
- <u>Nucleic Acids manipulations</u>: DNA and RNA extraction, RT-PCR, quantitative Real Time PCR.
- <u>Western blot analysis</u>
- <u>Protein electrophoresis</u>
- <u>Flow cytometry analysis</u>
- Radioligand binding assay
- <u>Rodent handling</u>: stereotaxic surgery, perfusion, IP, SC, IV and IM injections, intravitreal and intracranial administrations, etc. [completed the category B course of Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)]
- <u>Optical Coherence Tomography (OCT)</u>

Languages

Greek (Excellent) – English (Advanced) – German (Basic)

Computer skills

Microsoft Office, Graphpad Prism, Adobe Photoshop, ImageJ, HTML, FlowJo, CorelDRAW, Blender

Other interests

Participation in literature contests.

Participation in scientific artistic expression contests.

- FENS 2012 video contest (8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 14-18 July 2012)
- FENS 2014 video contest. (9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, 5-9 July 2014) 3rd Prize (<u>http://www.youtube.com/watch?v=OKW0FpUdZoM</u>)

ПАРАРТНМА В:

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Experimental Eye Research 136 (2015) 45-58

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer

Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity *in vivo*, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways

Despina Kokona¹, Kyriaki Thermos^{*}

Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete 71003 GR, Greece

ARTICLE INFO

Article history: Received 20 February 2015 Received in revised form 14 May 2015 Accepted in revised form 15 May 2015 Available online 16 May 2015

Keywords: Cannabinoids CB1 receptors Retina Excitotoxicity Neuroprotection Amacrine cells PI3K/Akt signaling pathway MEK/ERK1/2 signaling pathway

ABSTRACT

Cannabinoids have been suggested to protect retinal ganglion cells in different models of toxicity, but their effects on other retinal neurons are poorly known. We investigated the neuroprotective actions of the endocannabinoid N-arachidonoyl ethanolamine (Anandamide/AEA) and the synthetic cannabinoids R1-Methanandamide (MethAEA) and HU-210, in an in vivo retinal model of AMPA excitotoxicity, and the mechanisms involved in the neuroprotection. Sprague–Dawley rats were intravitreally injected with PBS or AMPA in the absence or presence of the cannabinoid agonists. Brain nitric oxide synthase (bNOS) and choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity (IR), as well as TUNEL staining, assessed the AMPAinduced retinal amacrine cell loss and the dose-dependent neuroprotection afforded by cannabinoids. The CB1 receptor selective antagonist AM251 and the PI3K/Akt inhibitor wortmannin reversed the cannabinoid-induced neuroprotection, suggesting the involvement of CB1 receptors and the PI3K/Akt pathway in cannabinoids' actions. Experiments with the CB2 agonist JWH015 and [³H]CP55940 radioligand binding suggested that the CB2 receptor is not involved in the neuroprotection. AEA and HU-210 induced phosphorylation of Akt but only AEA induced phosphorylation of ERK1/2 kinases, as revealed by western blot analysis. To investigate the role of caspase-3 in the AMPA-induced cell death, the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK was co-injected with AMPA. Z-DEVD-FMK had no effect on AMPA excitotoxicity. Moreover, no difference was observed in the phosphorylation of SAPK/JNK kinases between PBS- and AMPA-treated retinas. These results suggest that endogenous and synthetic cannabinoids protect retinal amacrine neurons from AMPA excitotoxicity in vivo via a mechanism involving the CB1 receptors, and the PI3K/Akt and/or MEK/ERK1/2 signaling pathways.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Retinal ischemia plays a prominent role in the development of several retinal diseases, such as glaucoma and diabetic retinopathy,

Corresponding author.

and can lead to neurodegeneration and neovascularization followed by loss of visual acuity and blindness (Osborne et al., 2004). Ischemia-induced retinopathies are linked to the loss of retinal ganglion cells (RGCs) and thus the majority of studies in the field focused in the investigation of the degeneration of RGCs (Lafuente et al., 2002; Wang et al., 2002; Chidlow and Osborne, 2003; Zhang et al., 2003; Schuettauf et al., 2011). However, amacrine (Siliprandi et al., 1992; Osborne and Herrera, 1994; Osborne et al., 1995a,b; Barber et al., 1998; Kapin et al., 1999; Mastrodimou et al., 2005; Gastinger et al., 2006) and horizontal (Kuroiwa et al., 1999; Rábl et al., 2002) retinal neurons have also been reported to be affected during the early stages of ischemia-induced retinopathies and are considered important in the pathophysiology of retinal disease.

Many strategies have been employed in order to develop therapeutic agents for the successful treatment of ischemia induced





Abbreviations: AMPA, (RS)-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide; AEA, anandamide, N-arachidonoyl ethanolamine; 2-AG, 2arachidonoyl glycerol; bNOS, brain nitric oxide synthetase; ChAT, choline acetyltransferase; DNQX, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione; MethAEA, methanandamide; PBS, phosphate-buffered saline; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; RGCs, retinal ganglion cells; TRPV1, transient receptor potential vanilloid type-1; Z-DEVD-FMK, N-benzyloxycarbonyl-Phe-Ala-fluoromethyl ketone.

E-mail addresses: despina.kokona@insel.ch (D. Kokona), thermos@med.uoc.gr (K. Thermos).

¹ Present address: Department of Ophthalmology, Bern University Hospital, Inselspital, Bern 3010 CH, Switzerland.

retinopathies. However, no efficacious treatment is available up to now. The neuroprotective properties of the cannabinoids have been studied in several CNS regions, using *in vivo* ischemia/excitotoxicity models (Mauler et al., 2002; Leker et al., 2003; Nagayama et al., 1999).

Retina is equipped with a functional endocannabinoid system, consisting of endogenous cannabinoids, enzymes involved in their metabolism, and cannabinoid CB1 receptors (for a review see Yazulla, 2008). The endogenous cannabinoids N-arachidonoyl ethanolamine (Anandamide or AEA, Devane et al., 1992) and 2arachidonoyl glycerol (2-AG, Sugiura et al., 1995), as well as their major biosynthetic enzymes, have been found in mammalian retina (Bisogno et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Chen et al., 2005; Hu et al., 2010). The cannabinoid receptor type 1 (CB1) has been found in the inner plexiform layer (IPL), outer plexiform layer (OPL) and bipolar cells in the rodent retina (Straiker et al., 1999; Yazulla et al., 1999; Hu et al., 2010). However, the presence of CB2 receptors in the rodent retina till recently was a subject of debate. Immunohistochemical studies supported the expression of CB2 receptor in rat retinal tissue (López et al., 2011), but the specificity of the antibody used in these studies has recently been questioned (Cécyre et al., 2014). In the Cécyre et al. study, immunohistochemistry and western blot analysis were used to test the selectivity of various CB2 antibodies in the mouse retina. Only one of the tested antibodies (101550, Cayman Chemical) showed valuable specificity for the CB2 receptors. The authors concluded that most of the available antibodies targeting the CB2 receptor cannot be considered reliable due to their low specificity (Cécyre et al., 2014). The same group, using immunohistochemical studies to locate CB2 receptors in wild type and $CB2^{-/-}$ mice, showed that CB2 receptors are expressed in all five neuronal types of the mouse retina (Cécyre et al., 2013).

Cannabinoids have been reported to afford neuroprotection to RGCs in animal models of oxidative stress and NMDA-excitotoxicity (El-Remessy et al., 2003) through activation of CB1 receptors. Most recently, Lax et al. (2014) reported that the synthetic analog HU-210 afforded neuroprotection against photoreceptor degeneration in a model of retinitis pigmentosa. However, the putative neuroprotective properties of cannabinoids on other types of retinal neurons, such as amacrine cells are still unknown.

In the past years we employed an *in vivo* AMPA excitotoxicity model of retinal neurodegeneration and assessed the neuroprotective actions of different therapeutic targets for early stages of retinal disease (Kiagiadaki and Thermos, 2008; Kokona et al., 2012). The excitatory amino acid AMPA has been shown to affect cholinergic and bNOS-positive amacrine cells (Kiagiadaki and Thermos, 2008), as well calbindin-immunoreactive (IR) horizontal and GABA amacrine cells (Kokona et al., 2012), while it had no effect on ganglion, bipolar and photoreceptor cells (Kiagiadaki and Thermos, 2008).

The aim of the present study was to investigate the possible neuroprotective effects of the cannabinoids AEA, HU-210 and MethAEA (metabolic stable analog of AEA) (Abadji et al., 1994; Khanolkar et al., 1996) on the viability of two types of amacrine cells (bNOS-positive and cholinergic amacrine cells), employing an *in vivo* model of AMPA excitotoxicity. The involvement of CB1 receptors and PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in these actions was also studied.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult Sprague–Dawley rats (220–350 g) were used in the present study. Animals were housed one to two animals per cage in a room maintained at 22 °C, with an alternating 12-h light–dark cycle. Food and water were available ad libitum. Euthanization was

performed with ether inhalation. All procedures were conducted in accordance with the EU Directive 2010/63/EU, the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and in compliance with Greek national laws (EC Directive 1986/609 and Law 2015/2001). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. AMPA-induced excitotoxicity and neuroprotection studies

The *in vivo* model of AMPA excitotoxicity was employed according to Kiagiadaki and Thermos (2008). Rat eyes received intravitreally PBS (50 mM K₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.9% NaCl, pH 7.4; control or CTRL) or AMPA (Tocris, Bristol UK; 42 nmol per eye; diluted in 50 mM PBS), in the presence or absence of HU-210 [Tocris, Bristol, UK; CB1/CB2 agonist; $10^{-9}-10^{-6}$ M], AEA (kindly offered by A. Makriyannis CB1/CB2 partial agonist; $10^{-8}-10^{-6}$ M), R1-Methanandamide (MethAEA; Cayman, Michigan, USA; CB1 agonist; 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-5} M) or JWH015 (Cayman, Michigan, USA; CB2 agonist; 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M). The CB1 receptor selective antagonist AM251 (Cayman, Michigan, USA; 10^{-6} M) was co-injected with AMPA + HU-210 (10^{-7} M), AMPA + AEA (10^{-7} M) or AMPA + MethAEA (10^{-7} M). In addition, the PI3K/Akt inhibitor wortmannin (Sigma, St. Louis, MO; 10^{-6} M) was co-injected with AMPA + HU-210 (10^{-7} M) or AMPA + AEA (10^{-7} M).

In order to ascertain that the effects observed in the AMPA-treated retinas are due to AMPA receptor activation, the non-NMDA antagonist DNQX (10^{-6} M, RBI Natick, MA, U.S.A.) was co-injected with AMPA. To investigate the involvement of caspase-3 in the AMPA induced retinal cell death, the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK (Tocris, Bristol, UK; 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) was co-injected with AMPA.

All cannabinoid agents were dissolved in absolute ethanol at the concentration of 10^{-2} M and aliquots (10μ l) were stored at $-20 \,^{\circ}$ C. DNQX and Z-DEVD-FMK were dissolved in DMSO at the concentration of 10^{-2} M. All agents were further diluted in PBS ($50 \,$ mM) to minimize ethanol or DMSO concentration in the final solutions. The presence of ethanol or DMSO had no effect in the control tissue (data not shown). Each animal received 5 μ l of a different treatment in each eye with a flow rate of 1 μ l/min.

2.3. Immunohistochemical studies

2.3.1. Tissue preparation

Twenty four hours after treatment, animals were euthanatized and their eyes were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde; 0.1 M phosphate buffer (PFA buffer) for 45 min at 4 °C. The eyecups were then isolated and fixed further in PFA buffer for 1.5 h 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 min and sectioned vertically near the optic nerve head using a cryostat (Superfrost; Erie Scientific, Portsmouth, NH). Serial transverse sections of 10 µm each were spread into 10 slides, so that each slide contained a representative part of the central retinal tissue, including the optic nerve head.

2.3.2. Immunohistochemical staining

Previous studies in our laboratory showed that intravitreal administration of AMPA led to the reduction of ChAT and bNOS amacrine cells (Kiagiadaki and Thermos, 2008) and calbindinimmunoreactive (IR) horizontal and GABA amacrine cells (Kokona et al., 2012), but it did not affect other type of neurons such as photoreceptors, bipolar cells and RGCs. Therefore, immunohistochemical studies were performed as previously reported (Kiagiadaki and Thermos, 2008) using primary antibodies against bNOS (rabbit polyclonal; 1:2000; Sigma, St. Louis, MO), ChAT (goat polyclonal; 1:400; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and calbindin (mouse



Fig. 1. Effect of AEA on AMPA excitotoxicity – bNOS IR. **A**. Photomicrographs of bNOS IR bNOS IR in CTRL rat retinas was localized in bNOS-expressing retinal amacrine cell somata in the INL and in the GCL, and in amacrine cell processes in the IPL. AMPA caused a reduction of bNOS-IR whereas AEA co-injected with AMPA afforded partial recovery in a dose-dependent manner. Arrows depict the bNOS-expressing cell somata. Scale bar: 20 µm. INL: Inner Nuclear Layer; IPL: Inner Plexiform Layer; GCL: Ganglion Cell Layer. **B**. Quantification studies. AEA (10^{-8} M, n = 3; 10^{-7} M, n = 5; 10^{-6} M, n = 3) afforded partial neuroprotection on bNOS-expressing retinal cells against AMPA excitotoxicity acting as a partial agonist at the two higher doses used (***p < 0.001 compared to CTRL, *p < 0.001, compared to AMPA treatment), while it had no effect at the dose of 10^{-8} M. AEA afforded neuroprotection reaching the 56.6% of the control tissue at the dose of 10^{-7} M.

monoclonal; 1:5000, Swant, Bellinzona, Switzerland). Alexa-Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:400; Molecular Probes, Eugene, Oregon) and Alexa Fluor 546 donkey anti-goat IgG (H + L) (1:1000; Molecular probes, Eugene, Oregon) secondary antibodies were used for bNOS-IR and ChAT-IR assessment, respectively and Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (1:400; Molecular Probes, Eugene, OR) was used for calbindin-IR localization.

2.4. Determination of retinal cell death – TUNEL staining

To determine cell death, enzymatic *in situ* labeling of apoptosisinduced DNA strand breaks was performed on rat retinas treated with PBS, AMPA, AMPA + HU-210 (10^{-7} M), AMPA + AEA (10^{-7} M), AMPA + DNQX (10^{-7} M) or AMPA + Z-DEVD-FMK (10^{-6} M). The terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated TMR-dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) was used.

2.5. Hematoxylin/eosin staining (H/E)

In order to study the effect of AMPA or AMPA + HU-210 (10^{-7} M) on retinal thickness we performed H/E histological staining. The

slides were immersed in 100% ethanol for 2 min, washed with distilled water and immersed in Mayer's Hematoxylin solution (Sigma, St. Louis, MO). They were washed again in distilled water and immersed in 0.25% eosin solution (Sigma, St. Louis, MO), followed by washing in distilled water and immersion in sequential aqueous solutions of ethanol (70%, 80%, 95%, 100%). The slides were immersed in xylene for 5 min and were coversliped with Endellan mounting medium.

2.6. Microscopy

Light and optical microscopy images were taken with a camera (Axioskop with Plan-Neofluar \times 40/0.75; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany or AxioVert.A1 with Zeiss LD A-Plan 32 \times /0.45; Carl Zeiss, Gottingen, Germany). Light and contrast adjustments of images were processed with the use of the commercial software Photoshop ver. 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

2.7. Quantification studies

Quantification of bNOS and ChAT immunoreactive retinal neurons was performed according to Kiagiadaki and Thermos (2008).



Fig. 2. Effect of AEA on AMPA excitotoxicity – ChAT IR. **A.** Photomicrographs of ChAT IR. ChAT IR in CTRL rat retinas was localized in somata of a) cholinergic retinal amacrine cells in the INL, b) displaced cholinergic amacrine cells in the GCL and in cholinergic amacrine cell processes in the IPL. In retinas treated with AMPA the number of cholinergic amacrine cells was greatly reduced, whereas AEA partially protected the retina from AMPA toxicity at the dose of 10^{-7} M. Scale bar: $20 \ \mu$ m. INL: Inner Nuclear Layer; IPL: Inner Plexiform Layer; GCL: Ganglion Cell Layer. **B**. Quantitative analysis of the ChAT-IR data. AEA (n = 4) afforded neuroprotection on cholinergic amacrine cells against AMPA excitotoxicity acting as a partial agonist [***p < 0.001 compared to CTRL (n = 6), *p < 0.05 compared to AMPA (n = 5)].

Briefly, each section of control or treated retinas was studied by means of a 40×/0.75 or 32×/0.45 lens (Axioskop with Plan-Neofluar ×40/0.75; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany or Axio-Vert.A1 with Zeiss LD A-Plan 32×/0.45; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) and the total number of immunoreactive neurons in each retinal section was counted in a masked fashion. Three or more slices were counted per retinal slide and \geq 3 retinas per treatment.

Calbindin quantification was performed according to Kokona et al. (2012). Briefly, the retinal sections were studied under a $32 \times /0.45$ lens (AxioVert.A1 with Zeiss LD A-Plan $32 \times /0.45$; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) and 3 successive photomicrographs were taken from 3 slices of each retina near the optic nerve head. The region starting from the horizontal cells processes in the OPL to the amacrine cell terminals in the IPL, was delineated using the ImageJ 1.44 software (Schneider et al., 2012). The mean gray value of this region was calculated in each image. Three retinas were counted per treatment.

Quantification of H/E histological studies was performed according to Kokona et al. (2012). Three or more slices were counted per retinal slide and \geq 3 retinas per treatment.

For the TUNEL staining quantification of each retinal section was studied using a $32 \times /0.45$ lens (AxioVert.A1 with Zeiss LD A-Plan $32 \times /0.45$; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) and 2 successive photomicrographs were taken from 3 slices of each retina near the optic nerve head. The number of TUNEL positive cells was calculated in each image using the public domain ImageJ 1.44 software (Schneider et al., 2012) and is expressed as number of positive cells per 100 µm of tissue.

2.8. [³H]CP55940 radioligand binding to retinal membranes

To assess the presence of CB1 or CB2 receptors in rat retina $[^{3}H]$ CP55940 radioligand binding assays were performed. The ability of the CB1 and CB2 selective antagonists, AM251 (10^{-6} M) and AM630 (10^{-6} M), to compete for $[^{3}H]$ CP55940 specific binding was

examined according to Khanolkar et al. (1996) and Antoniou et al. (2005). Briefly, the retinas were removed and mechanically homogenized in 10 ml of incubation buffer (50 mM Tris–HCl; pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 5 mM MgCl₂), followed by centrifugation at 27,000 rpm for 20 min at 4 °C. The pellet was re-suspended in incubation buffer and centrifuged again as previously. The final pellet was re-suspended in 1 ml of incubation buffer and the protein concentration determined according to Bradford. [³H]CP55940 [124 Ci/mmol (0.5 or 1 nM), Perkin Elmer] was incubated with rat retinal membranes (70 µg) for 90 min at 30 °C. Specific binding was determined in the presence of WIN 55,212-2 (10^{-5} M).

2.9. Western blot analysis

Retinas were mechanically homogenized in lysis buffer containing 50 mM Tris—HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% DOC, 0.1 mM PMSF and a protease and a phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Sci., Waltham, MA, respectively). Retinas were prepared for SDS-PAGE (50 µg of protein/lane) according to Lisa et al. (2012) and blotted onto nitrocellulose membranes (Macherey—Nagel, Düren, Germany). Blots were incubated with primary antibodies against phospho-Akt (1:2000), phospho-ERK1/2 (1:1000) or phospho-SAPK/JNK (1:1000) overnight at 4 °C. The membranes were stripped and incubated with antibody against total-Akt (1:1000), total-ERK1/2 (1:1000) or total-SAPK/JNK (1:1000), overnight at 4 °C. To normalize for protein content the blots were stripped again and stained with a rabbit polyclonal antibody raised against GAPDH (1:1000). All above mentioned antibodies were purchased from Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA.

Blots were incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody HRP-goat anti-rabbit IgG (1:4000; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Proteins were visualized using the ECL Western blotting kit (Supersignal west pico chemilluminescent substrate, Thermo Scientific, Rockford, USA), and the optical density of the bands in each blot was quantified using the Image Lab 5


Fig. 3. Effect of HU-210 and MethAEA on AMPA excitotoxicity – Quantification studies. **A.** Effect of HU-210 on the AMPA excitotoxicity – bNOS quantification studies. HU-210 $(10^{-9} \text{ M}, n = 3; 10^{-8} \text{ M}, n = 3; 10^{-7} \text{ M}, n = 3; 10^{-6} \text{ M}, n = 3)$ protected the bNOS-expressing retinal cells from AMPA excitotoxicity in a dose-dependent manner (*p < 0.05, ****p < 0.001 compared to CTRL, #*#p < 0.01, #*##p < 0.001 compared to AMPA treatment) acting as a full agonist at the two higher doses of 10⁻⁷ and 10⁻⁶ M (79.8% and 88.4% of the CTRL levels, respectively). **B.** Effect of MethAEA on the AMPA excitotoxicity – bNOS quantification studies. MethAEA also afforded neuroprotection on bNOS-expressing macrine cells against AMPA excitotoxicity in a dose-dependent manner. MethAEA acted as a full agonist at the dose of 10⁻⁵ M (n = 3; 81.9% of the CTRL levels; ### p < 0.001 compared to AMPA treatment). Less neuroprotection was observed at the dose of 10⁻⁷ M (n = 5; 73.5% of the CTRL levels; ***p < 0.001 compared to CTRL, ### p < 0.001 compared to AMPA treatment), while it had no effect at the dose of 10⁻⁸ M (n = 3; 16.8% of the CTRL levels; ***p < 0.001 compared to CTRL, ### p < 0.001, compared to AMPA treatment) reaching approximately 56.5% of the control levels. **D.** Effect of MethAEA on the AMPA excitotoxicity – ChAT quantification studies. MethAEA protected cholinergic amacrine cells from AMPA excitotoxicity at the dose of 10⁻⁸ M (n = 3) (***p < 0.001 compared to CTRL, ### p < 0.001, compared to AMPA treatment), while it had no effect at the dose of 10 evels. **D.** Effect of MethAEA on the AMPA excitotoxicity – ChAT quantification studies. MethAEA protected cholinergic amacrine cells from AMPA excitotoxicity at the dose of 10⁻⁸ M (***p < 0.001 compared to CTRL, ### p < 0.001, compared to AMPA treatment) reaching approximately 65.5% of the control levels. **D.** Effect of MethAEA on the AMPA excitotoxicity – ChAT quantification studies. MethAEA protected cholinergic amacrine cells from the AM

software. The background was subtracted from all values for the densitometric analysis. Only blots below saturation were included in the quantification.

2.10. Reverse transcription PCR

Total RNA isolation from retinal homogenates was performed using TRIzol Reagent (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). cDNA synthesis was performed from total RNA using PrimeScript[™] 1st strand cDNA Synthesis Kit (Cat. No. 6110A, Takara Bio Inc, Seta, Otsu, Shiga, Japan), according to the manufacturer's instructions. Possible DNA contamination was eliminated by Deoxyribonuclease I (DNAse I, Amplification Grade, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions.

Detection of CB1 and CB2 cannabinoid receptors were performed by RT-PCR, using KAPATaq™ PCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions. The amplification profile program for all tested mRNAs included: 60 s of denaturation at 95 °C, 60 s of annealing at 60 °C and 60 s of extension at 75 °C. The sequences of the primers used were as follows: GAPDH forward, 5-GGTCGGTGTGAACGGATTTG-3, GAPDH Reverse, 5-GTGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3 (Aravindan et al., 2006); CB1 Forward, 5-CATCATCATCCACACGTCAG-3, CB1 Reverse, 5-ATGCTGTTGTCTAGAGGCTG-3 (Porcella et al., 1998); CB2 Forward, 5-TTTCCCACTGATCCCTAACG-3 and CB2 Reverse. 5-AGTTAACAAGGCACAGCATG-3 (Porcella et al., 1998).

The PCR products were visualized using agarose gel

electrophoresis. The predicted sizes of the amplified products of CB1, CB2 and GAPDH were 329 and 328 and 350 bp, respectively. The integrated density of the bands was quantified using the ImageJ 1.44 software (Schneider et al., 2012). CB1 and CB2 mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels.

2.11. Statistical analysis

Immunohistochemical quantification data was expressed as percentage of control (100%). For statistical analysis, GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) was used and a one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc analysis test applied. Student's t-test was used to assess differences between two groups. Differences are considered statistically significant when p < 0.05. The data were plotted as the mean \pm S.E.M (Standard Error of the Mean) of all values in the different groups.

3. Results

3.1. Neuroprotective effect of AEA, HU-210 and MethAEA against AMPA-induced retinal excitotoxicity in vivo

The effects of the CB1/CB2 partial agonist AEA against AMPA excitotoxicity were investigated. We employed the retinal cell marker bNOS, which was localized in amacrine cell somata in the inner nuclear layer (INL), displaced amacrine cell somata in the ganglion cell layer (GCL) and amacrine cell processes in the inner



Fig. 4. Effect of the CB1 receptor selective antagonist AM251 in the neuroprotective properties of cannabinoids A. Effect of AM251 on HU-210 neuroprotective actions bNOS quantification studies. Co-injection of the CB1 selective antagonist AM251 with AMPA + HU-210 (n = 3) caused a statistically significant attenuation of bNOSexpressing retinal cells as revealed by quantification studies (***p < 0.001 compared to CTRL; # p^* < 0.001 compared to AMPA; $^{++}$ p < 0.01, compared to +HU-210). **B**. Effect of AM251 on AEA neuroprotective actions - bNOS quantification studies. Similar results are obtained from the co-injection of AM251 with AMPA + AEA (n = 3). AM251 attenuated the neuroprotective properties of AEA (***p < 0.001 compared to CTRL; $^{\#\#\#}p < 0.001$ compared to AMPA; $^{+++}p < 0.001$ compared to +AEA). **C**. Effect of AM251 on MethAEA neuroprotective actions - bNOS quantification studies. Similar to AEA and HU-210, MethAEA failed to afforded neuroprotection against AMPA excitotoxicity in the presence of the CB1 selective antagonist AM251 (n = 3; *p < 0.05, ***p < 0.001compared to CTRL; ###p < 0.001 compared to AMPA; +p < 0.05 compared to +MethAEA).

plexiform layer (IPL; Fig. 1A). No IR was observed in the absence of primary antibody (data not shown). AMPA caused a reduction of bNOS IR, while AEA, co-injected with AMPA, afforded a dose-dependent partial recovery (Fig. 1A). Quantitative data analysis showed that AMPA caused an approximately 75% reduction in the number of bNOS-immunoreactive cell somata [Fig. 1B; 19.8 \pm 10.6 cells per section; ***p < 0.001 compared to CTRL (90.3 \pm 11.5 cells per section)], while AEA produced neuroprotection only at the two

higher doses $[10^{-7}$ M: 50.8 \pm 6.6 cells per section; 10^{-6} M: 44.3 \pm 12.7 cells per section] and did not exceed 60% of control levels (56.6% and 54.4% of control levels for the doses of 10^{-7} M and 10^{-6} M, respectively; ***p < 0.001 compared to CTRL, #p < 0.05, ###p < 0.001, compared to AMPA). AEA did not afford neuroprotection at the dose of 10^{-8} M [Fig. 1B; 29.2 \pm 3.2 cells per section].

We also employed the retinal marker ChAT, which labels cholinergic amacrine cell somata in the INL, displaced amacrine cell somata in the GCL and their processes in the IPL of CTRL retinas (Fig. 2A). No IR was observed in sections where the primary antibody was omitted (data not shown). Intravitreal administration of the excitatory amino acid AMPA caused a great loss of ChATpositive amacrine cell somata, while their processes in the IPL were still visible but less intense compared to the CTRL tissues. AEA afforded partial recovery of the cholinergic cell somata at the dose of 10^{-7} M (Fig. 2A). Quantitative analysis of the ChAT-IR data (Fig. 2B) supports an approximate 90% reduction of ChAT-positive cell somata in AMPA-treated retinas [10.7 \pm 3.9 cells per section, ***p < 0.001 compared to CTRL (131.8 ± 24.7 cells per section)] and a significant neuroprotection in AMPA + AEA-treated tissues [30% of control levels; 38.3 ± 5.6 cells per section; ***p < 0.001 compared to CTRL, $^{\#}p < 0.05$ compared to AMPA].

The retinal markers of bNOS and ChAT were also employed in order to test the neuroprotective actions of HU-210 and MethAEA. Both HU-210 and MethAEA acted as full agonists and afforded a statistically significant neuroprotection on bNOS-positive cells. compared to AMPA [Fig. 3A: HU-210, 10^{-9} M: 48.8 + 8 cells per section, 59.9% of control levels; 10^{-8} M: 62.8 \pm 4.5 cells per section, 70.9% of control levels; 10^{-7} M: 72.5 ± 3.2 cells per section, 79.8% of control levels; 10^{-6} M: 78.1 \pm 5.8 cells per section, 88.4% of control levels; Fig. 3B; MethAEA, 10^{-8} M, 14.3 \pm 2.9 cells per section, 16.9% of control levels; 10^{-7} M, 61 ± 19.5 cells per section, 73.5% of control levels; 10^{-5} M, 72.8 ± 8.7 cells per section, 82% of control levels; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.01 compared to CTRL, ##p < 0.01, $^{\#\#\#}p < 0.001$ compared to AMPA]. Similar to the bNOS-IR data, guantification of ChAT-IR data supports a neuroprotective action of both HU-210 and MethAEA. HU-210 co-injected with AMPA afforded an increase in the number of cholinergic amacrine cell somata even at the low concentration of 10^{-8} M [Fig. 3C; 76.5 ± 4.8 cells per section, 58% of control levels; **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to CTRL, ###p < 0.001 compared to AMPA]. MethAEA protected cholinergic cells at the doses of 10^{-7} M [Fig. 3D; 80.7 ± 13.7 cells per section, 62% of control levels; ***p < 0.001 compared to CTRL, ^{###}p < 0.001 compared to AMPA] and 10⁻⁵ M [Fig. 3D; 71.0 ± 9.2 cells per section, 54.1% of control levels; ***p < 0.001 compared to CTRL, ###p < 0.001 compared to AMPA]. MethAEA had no neuroprotective effect at the concentration of 10^{-8} M [Fig. 3D; 8.6 \pm 0.2 cells per section; ***p < 0.001 compared to CTRL).

We have also examined if similar protection is afforded by AEA to other retinal cells known to be affected by AMPA excitotoxicity. Calbindin immunoreactivity (a marker for horizontal and GABA amacrine cells) was performed and preliminary data support that AEA (10^{-7} M) protects both horizontal cells and GABA amacrine cells against AMPA excitotoxicity [CTRL: 34.8 ± 4.5 mean gray value per 100 µm, AMPA: 12.8 ± 2.0 mean gray value per 100 µm (36.6% of CTRL), AEA: 23.2 ± 2.6 mean gray value per 100 µm (66% of CTRL), n = 3 for each group]. Studies are in progress to examine the dose dependent effect of the endogenous AEA and the other two synthetic cannabinoids (MethAEA and HU210) on calbindin IR.

In order to avoid repetition of the immunohistochemical data of the two amacrine markers, only the quantification data of the bNOS-IR studies of all subsequent experiments will be presented. The effective dose of 10^{-7} M was used for all three cannabinoid ligands in the following experiments.



Fig. 5. Presence and functional relevance of CB2 receptor in the rat retina. **A**. $[^{3}H]$ CP55940 (1 nM, n = 2) radioligand binding studies. Only the CB1 antagonist AM251 attenuated the specific $[^{3}H]$ CP55940 binding (*p < 0.05 compared to Total), whereas the CB2 preferred antagonist AM630 had no effect. **B**. mRNA levels of CB1 and CB2 receptors in rat retina. Representative micrographs of RT-PCR studies in control rat retina. **C**. Quantification of the RT-PCR data. Quantification studies revealed that the CB2 receptor mRNA represents only 20% of the total cannabinoid receptor mRNA in the rat retina (***p < 0.001 compared to CB1, n = 4 and n = 5 for CB1 and CB2, respectively). **D**. Effect of the CB2 agonist JWH015 in the AMPA model of retinal excitotoxicity-bNOS-IR studies. Quantification studies of bNOS-IR data revealed that JWH015 had no effect on AMPA excitotoxicity at any of the doses used (10^{-8} M, n = 3; 10^{-7} M, n = 3, 10^{-6} M, n = 3; ***p < 0.001, compared to CTRL).

3.2. Effect of CB1 receptor selective antagonist (AM251) in the neuroprotective properties of AEA, HU-210 and MethAEA

In order to investigate the involvement of CB1 receptor in the neuroprotective properties of AEA, HU-210 and MethAEA, the selective antagonist for the CB1 receptor AM251 was used. AEA, HU-210 and MethAEA were co-injected with AM251 (10^{-6} M) and AMPA. Immunohistochemical studies showed a statistically significant attenuation of the number of bNOS-immunoreactive cell somata in retinas treated with AMPA + AEA + AM251 (Fig. 4A; approximately 56.4% reduction; 22.2 ± 2.1 cells per section; ***p < 0.001 compared to CTRL, ###p < 0.001 compared to AMPA, ++p < 0.01 compared to +AEA). The number of bNOS-

immunoreactive cell somata was also reduced in AMPA + HU-210- (Fig. 4B; approximately 74.3% reduction; ***p < 0.001 compared to CTRL, ###p < 0.001 compared to AMPA, +++p < 0.001 compared to +HU-210) or AMPA + MethAEA - (Fig. 4C; approximately 41.3% reduction, *p < 0.05, ***p < 0.001 compared to CTRL, ###p < 0.001 compared to AMPA, +p < 0.05 compared to +MethAEA) treated retinas in the presence of AM251 (27.2 \pm 2 cells per section and 31.7 \pm 16 cells per section, respectively).

3.3. Presence and functional relevance of CB2 receptor in the rat retina

In order to investigate the presence of CB1 or CB2 receptors in



Α

Fig. 6. Effect of HU-210 and AEA on AMPA-induced retinal cell death – Effect of HU-210 on retinal thickness. **A.** Photomicrographs of TUNEL-staining. Scale bar: 20 μ m. INL: Inner Nuclear Layer; GCL: Ganglion Cell Layer. **B.** TUNEL quantification studies. AMPA (n = 5) induced excitotoxic effects compared to CTRL (n = 5) (****p < 0.001, compared to CTRL), whereas HU-210 (n = 3) and AEA (n = 3) protected the retina from AMPA-induced retinal cell death (**p < 0.01, ***p < 0.001, compared to CTRL ### p < 0.001, compared to AMPA) reducing the TUNEL-positive cells to 54.7% and 39% of the AMPA levels, respectively. **C.** Photomicrographs of H/E staining. **D.** Quantification studies of H/E staining. An almost 35% shrinkage of retinal tissue was observed in the AMPA group [n = 5; ***p < 0.001, compared to CTRL (n = 5)]. HU-210 (n = 3) reversed the excitotoxic effects of AMPA (*p < 0.05, compared to AMPA). Scale bar: 20 μ m. **E.** Quantification of INL thickness. AMPA (n = 3) caused a statistically significant shrinkage in the INL (**p < 0.01 compared to CTRL), while HU-210 (n = 3) afforded neuroprotection reversing this shrinkage to the control levels (**p < 0.05 compared to AMPA).

the rat retina, $[{}^{3}H]$ CP55940 radioligand binding studies were performed in rat retinal membranes first using 0.5 nM (n = 1) and subsequently using 1 nM concentration (n = 2) of the radioligand, due to the low number of counts afforded by the 0.5 nM concentration. However, the percent displacement of the $[{}^{3}H]$ CP55940 specific binding by the CB1 and CB2 preferred antagonists was almost identical in both concentrations of $[{}^{3}H]$ CP55940 used (data not shown). The radioligand binding data of $[{}^{3}H]$ CP55940 (1 nM) are shown in Fig. 5A. the RT-PCR data revealed that the CB2 receptor mRNA represents only 20% of the total cannabinoid receptor mRNA in the rat retina (Fig. 5C; ***p < 0.001 compared to CB1; 0.53 ± 0.07 and 0.13 ± 0.01 mRNA levels/GAPDH for CB1 and CB2, respectively).

To examine further the presence and functional relevance of the CB2 receptor in the rat retina, a CB2 preferred agonist JWH015 was employed. JWH015 had no neuroprotective effect at any of the doses used (Fig. 5B).

RT-PCR studies were also performed (Fig. 5B). Quantification of



Fig. 7. Effect of the non-NMDA antagonist DNQX in the AMPA excitotoxicity. **A.** Quantification of bNOS-expressing retinal cells. DNQX (n = 3) reversed the excitotoxic effect of AMPA (n = 5) on bNOS-expressing retinal cells (*p < 0.05 compared to CTRL, ****p < 0.001 compared to AMPA) reaching approximately 85.8% of the CTRL levels (n = 5). **B.** Photomicrographs of TUNEL staining. Scale bar: 20 µm. INL: Inner Nuclear Layer; GCL: Ganglion Cell Layer. **C.** TUNEL quantification studies. DNQX (n = 3) totally reversed the AMPA [n = 5; ***p < 0.001 compared to CTRL (n = 3)] -induced cell death reducing the TUNEL-positive cells to 21.8% of the AMPA levels (***p < 0.001 compared to AMPA).

3.4. Effect of HU-210 and AEA on AMPA-induced retinal cell death – effect of HU-210 on AMPA-induced retinal shrinkage

The neuroprotective role of HU-210 and AEA in the AMPA excitotoxicity model was substantiated by TUNEL assay. TUNEL staining was used to assess retinal cell death by AMPA and neuroprotection by HU-210 and AEA, one day after treatment. Fig. 6 includes representative photomicrographs of the HU-210 and AEA neuroprotection studies. The results shown in Fig. 6A and B confirm the excitotoxic effects of AMPA, compared to CTRL and the protection afforded by HU-210 and AEA. Quantification studies revealed that in the AMPA-treated tissues TUNEL staining was almost 18.5-fold higher than in CTRL tissues (Fig. 6B, 22.7 ± 1.1 cells per 100 μ m compared to 1.2 ± 0.3 cells per 100 μ m of the CTRL). HU-210 and AEA afforded neuroprotective actions reducing the number of TUNEL-positive cells observed in AMPA-treated retinas to approximately 45% (12.4 ± 1.2 cells per 100 μ m) and 71% (8.9 ± 1.1 cells per 100 μ m), respectively.

A histological H/E analysis was also performed on sections obtained from a) CTRL, b) AMPA- and c) AMPA + HU-210-treated retinas (Fig. 6C). The retinal thickness was quantified and the results shown in Fig. 6D depict an approximate 35% shrinkage of the retina in the AMPA group compared to the control group. This shrinkage was reversed in the presence of HU-210. Thickness was also measured in each of the retinal nuclear layers (ONL, INL and GCL). The results of INL thickness measurements are presented in Fig. 6E. A statistically significant shrinkage was observed in the INL of AMPA-treated retinas compared to CTRL retinas (approximately 23.8% shrinkage; **p < 0.01 compared to CTRL). HU-210 reversed the AMPA induced INL shrinkage ($^{\#}p$ < 0.05 compared to AMPA). No significant difference was observed in ONL or GCL thickness between the three groups (data not shown).

3.5. Effect of DNQX on AMPA excitotoxicity

In order to ascertain that the effects observed in the AMPAtreated retinas were due to AMPA receptor activation, the non-NMDA antagonist DNQX (10^{-6} M) was co-injected with AMPA. DNQX (76.6 ± 9.3 cells) blocked the excitotoxic effects of AMPA (21.9 ± 3.9 cells per section) as revealed by bNOS immunoreactivity [Fig. 7A; DNQX group, approximately 81% of the CTRL (90.2 ± 11.5 cells per section); DNQX group, *p < 0.05 compared to CTRL and ###p < 0.001 compared to AMPA, respectively, AMPA group, ***p < 0.001 compared to CTRL]. In the TUNEL quantification studies (Fig. 7B and C), DNQX treatment led to an almost 78% reduction of TUNEL-positive cells (4.9 ± 0.4 cells per 100 μ m, ###p < 0.001 compared to the AMPA-treated tissues (22.7 ± 1.1 cells per 100 μ m), while it had no statistically significant difference from the control tissues (1.2 ± 0.3 cells per 100 μ m).

3.6. Involvement of apoptotic pathways in AMPA-induced cell death

In order to examine if the cell death (TUNEL assay) that was observed in the presence of AMPA is characterized by caspase-3 driven apoptosis, we co-injected AMPA with the irreversible caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK. Z-DEVD-FMK did not have any effect on AMPA-induced toxicity regarding bNOS-IR at any of the concentrations used (Fig. 8A; 10^{-6} , 14.9 ± 2.5 cells per section; 10^{-5} , 6.8 ± 3.4 cells per section; 10^{-4} , 11.8 ± 1.5 cells per section; 10^{-5} , 6.8 ± 3.4 cells per section; 10^{-4} , 11.8 ± 1.5 cells per section; 10^{-4} , with Z-DEVD-FMK (10^{-6}) did not have any effect on the number of TUNEL-positive cells observed in the AMPA-treated tissues (Fig. 8B, C, 23.2 ± 1.1 cells per 100μ m).

In addition, we performed western blot analysis using antibodies against the phosphorylated and total stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase (SAPK/JNK kinase). Phosphoand total-SAPK/JNK was observed in two distinct bands of ~46 and ~54 kDa. We did not observe any alteration in the phosphorylation of SAPK/JNK between CTRL or AMPA-treated tissues (Fig. 8D and E).

3.7. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in the neuroprotective actions of HU-210 and AEA

The pro-survival PI3K/Akt signaling pathway has been proposed to be activated following CB1 and CB2 activation (Gómez del Pulgar et al., 2000; Ozaita et al., 2007). In order to test the involvement of the PI3K/Akt pathway in the neuroprotective properties of HU-210 and AEA, we initially employed the PI3K/Akt inhibitor wortmannin and examined its ability to inhibit the HU-210- and AEA-induced neuroprotection. Co-injection of wortmannin (10^{-6} M) with AMPA + HU-210 or AMPA + AEA resulted in a reduction of bNOS-IR compared to HU-210- and AEA-treated retinas, respectively



Fig. 8. Involvement of caspase-3 in the AMPA-induced retinal cell death. **A.** Effect of the capsase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK in the AMPA insult – bNOS IR. The presence of Z-DEVD-FMK had no effect on AMPA-induced reduction in the number of bNOS-expressing amacrine cells at any of the doses used (n = 3; ***p < 0.001 compared to CTRL). **B.** Effect of the capsase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK in the AMPA insult – Photomicrographs of TUNEL staining. Scale bar: 20 µm. INL: Inner Nuclear Layer; GCL: Ganglion Cell Layer. **C.** Quantification of TUNEL-positive retinal cells. No significant difference was observed in the TUNEL-positive cells between AMPA (n = 3) - and AMPA + Z-DEVD-FMK (n = 3)-treated retinas. Z-DEVD-FMK kinases activation between CTRL and AMPA-treated tissues. Representative western blot. **E.** Quantification of SAPK/JNK between CTRL (n = 8) and AMPA (n = 8) treated tissues.

[Fig. 9A; approximately 47.4% reduction; 38.5 ± 12.3 cells per section; ***p < 0.001 compared to CTRL, ^{##}p < 0.01, ^{###}p < 0.001 compared to AMPA, ⁺⁺p < 0.01 compared to +HU-210; Fig. 9B; approximately 41% reduction; 34.5 ± 17.5 cells per section; ***p < 0.001 compared to CTRL, ^{###}p < 0.001 compared to AMPA, ⁺p < 0.05 compared to +AEA].

Western blot analysis using antibodies raised against the phosphorylated and total Akt was subsequently performed. Akt kinase was observed at ~60 kDa. There was a statistically significant difference in the phosphorylated/total Akt ratio between AMPA and AMPA + HU-210- or AMPA and AMPA + AEA-treated tissues, 24 h after the injection (Fig. 9C and D). HU-210 and AEA afforded a statistically significant increase of Akt kinase activation ([#]p < 0.05, ^{###}p < 0.001 compared to AMPA), while AMPA had no effect compared to the CTRL tissue.

3.8. Involvement of ERK1/2 signaling pathway in the neuroprotective actions of AEA and HU-210

Cannabinoid receptor activation has been suggested to induce

the phosphorylation of ERK1/2 kinases in different paradigms (Bouaboula et al., 1995; Wartmann et al., 1995) and the pro-survival actions of CB1 receptor activation have been suggested to involve the activation of ERK1/2 (Galve-Roperh et al., 2002). To investigate whether ERK1/2 is involved in the neuroprotective properties of HU-210 and AEA against AMPA excitotoxicity, western blot analysis using antibodies raised against the phosphorylated and total ERK1/2 was performed (Fig. 9E). ERK1/2 kinases were observed in two distinct bands of ~42 and ~44 kDa.

The phosphorylated/total ERK1/2 ratio was significantly increased in AMPA + AEA-treated retinas compared to CTRL or AMPA-treated retinas, 24 h after the injection (Fig. 9E and F; ***p < 0.001 compared to CTRL, ##p < 0.01 compared to AMPA, ++p < 0.01 compared to HU-210). HU-210 had no effect on the phosphorylation of ERK1/2 kinases.

4. Discussion

The main finding of this study is that the endogenous cannabinoid AEA and the synthetic cannabinoids HU-210 and MethAEA,



Fig. 9. Investigation of the downstream signaling pathways involved in the neuroprotective actions of HU-210 and AEA. **A.** Effect of the PI3K/Akt inhibitor wortmannin in the neuroprotection afforded by HU-210 – bNOS quantification studies. Co-injection of wortmannin with AMPA + HU-210 (n = 4) reduced the neuroprotective properties of HU-210 on bNOS-expressing retinal cells (***p < 0.001 compared to CTRL; $^{\#}p < 0.05$ (***p < 0.001 compared to AMPA; $^{++}p < 0.01$ compared to +HU-210). **B.** Effect of the PI3K/Akt inhibitor wortmannin in the neuroprotective afforded by AEA – bNOS quantification studies. Co-injection of wortmannin with AMPA + AEA (n = 4) reduced the neuroprotective properties of the endocannabinoid on bNOS-expressing retinal cells (***p < 0.001 compared to CTRL; ##*p < 0.001 compared to AMPA; $^{+}p < 0.05$ compared to +HU-210). **B.** Effect of the PI3K/Akt inhibitor wortmannin with AMPA + AEA (n = 4) reduced the neuroprotective properties of the endocannabinoid on bNOS-expressing retinal cells (***p < 0.001 compared to CTRL; ##*p < 0.001 compared to AMPA; $^{+}p < 0.05$ compared to +AEA). **C.** Investigation of Akt kinase phosphorylation on CTRL (n = 8), AMPA (n = 8), AMPA + HU-210 (n = 4) and AMPA + AEA (n = 4) -treated tissues. Representative western blot. **D.** Quantification of western blot analysis. Western blot analysis revealed no alteration of Akt phosphorylation in the AMPA-treated tissues compared to CTRL, whereas HU-210 and AEA, co-injected with AMPA, induced the phosphorylation of Akt (**p < 0.001 compared to AMPA). **E.** Investigation of EKK1/2 phosphorylation on CTRL (n = 5), AMPA (n = 5), AMPA + HU-210 (n = 4) and AMPA + AEA (n = 4) -treated tissues. Representative western blot analysis. No significant difference was observed in ERK1/2 phosphorylation between CTRL and AMPA + treated tissues. REPresentative western blot analysis. No significant difference was observed in ERK1/2 phosphorylation between CTRL and AMPA + treated tissues. AEA induced the phosphorylation of EKK1/2 when

injected intravitreally, protect retinal cells from AMPA-induced cell death, via a mechanism involving CB1 receptors and the PI3K/Akt and/or MEK/ERK1/2 signaling pathways.

We have previously shown that AMPA affects horizontal and three types of amacrine cells (bNOS, ChAT and calbindinexpressing) and thus it is a useful model for the study of the early events of retinal ischemia and the assessment of the neuroprotective properties of new pharmacological agents (Kiagiadaki and Thermos, 2008; Kokona et al., 2012).

Activation of the cannabinoid system has been shown to afford neuroprotection in various structures of the CNS, including the retina (Shen and Thayer, 1998; El-Remessy et al., 2003). In the present study, the endogenous cannabinoid AEA and the synthetic cannabinoids HU-210 and MethAEA were intravitreally co-injected with AMPA and provided neuroprotection on bNOS-expressing and cholinergic amacrine cells (Figs. 1–3). We have also examined if similar protection is afforded by AEA to other retinal cells known to be affected by AMPA excitotoxicity. Calbindin immunoreactivity (a marker for horizontal cells and GABA amacrine cells) was performed and preliminary data support that AEA (10^{-7} M) protects both kinds of retinal cells against AMPA excitotoxicity. Studies are in progress to examine the dose dependent neuroprotective effects of AEA, MethAEA and HU210.

TUNEL analysis and H/E staining substantiated the excitotoxic effects of AMPA and the neuroprotective actions of HU-210 and AEA, especially in the INL where the majority of bNOS and ChAT positive cells are located (Fig. 6).

Co-injection of the CB1 selective antagonist AM251 with AMPA and AEA, HU-210 or MethAEA reversed the neuroprotection (Fig. 4). These results suggest the presence of CB1 receptors in the retina. The CB1 receptor has been detected throughout the mammalian retina, including horizontal and GABAergic amacrine cell somata in the rat retina (Yazulla et al., 1999), OPL in the mouse and IPL in the primate retina (Straiker et al., 1999). CB2 receptor mRNA was

shown to be present in adult rat retina using RT-PCR and in situ hybridization (Lu et al., 2000). However, the presence of the CB2 receptor protein in rat retina is not yet clear. López et al. (2011) presented immunohistochemical data suggesting that the CB2 receptor is present in retinal pigment epithelium, inner segments of photoreceptors, horizontal and amacrine cells, fibers of the inner plexiform layers and cells localized in the ganglion layer of the Sprague–Dawley rat retina. However, the specificity of the CB2 antibody used in the above mentioned study has recently been questioned by Cécyre et al., who showed that only one of the available antibodies (101550, Cayman Chemicals) was specific for CB2 receptors in mouse retina (Cécyre et al., 2014). The same group, in a previous publication, showed that CB2 receptors were localized in rod and cone photoreceptors, horizontal, amacrine and bipolar cells, as well as RGCs of the mouse retina (Cécyre et al., 2013). In this very elegant study, the function of the CB1 and CB2 receptors in the mouse retina was also studied in electroretinographic experiments performed in CB1 and CB2 lacking mice. The results of this study provide novel findings suggesting the differential role of the two cannabinoid receptors in the mouse retina and the involvement of the CB2 receptor in rod and cone sensitivity and light adaptation.

In the present study, we performed [³H]CP55940 radioligand binding to rat retinal membranes in the presence of CB1 and CB2 preferred antagonists and functional studies using a CB2 agonist to address the presence or not of the CB2 receptor in rat retina. Only the CB1 preferred antagonist AM251 displaced the specific [³H] CP55940 binding, whereas the CB2 preferred antagonist AM630 had no effect (Fig. 5A). RT-PCR studies were also performed and quantification of the data revealed that the CB2 receptor mRNA represents only 20% of the total cannabinoid receptor mRNA in the rat retina (Fig. 5B and C).

In addition, functional studies using the CB2 agonist JWH015 revealed that JWH015 did not afford neuroprotection at any of the doses employed (Fig. 5B). These results are in agreement to those reported by Nucci et al. (2007), namely that the CB2 receptor is either not present in the Sprague–Dawley rat retina or is present in very small concentrations.

The experimental designs that have been employed so far for the localization of CB2 receptors in the rodent retina have examined both pigmented (CB57BL/6 mice; Cécyre et al., 2013, 2014) and albino retinas (Sprague–Dawley rats; Nucci et al., 2007; López et al., 2011; present study). Thus, the difficulty of certain laboratories to detect the presence and function of the CB2 receptor in the Sprague–Dawley rat retina may be associated with the use of a non selective antibody for the CB2 receptor or to the albinism that characterizes Sprague–Dawley rats. Further studies employing the antibody (101550, Cayman Chemical) used in the Cécyre et al. (2013, 2014) studies and/or albino Sprague–Dawley rats or BALB/ c mice could provide a better understanding of CB2 signaling in the retina and could potentially designate differences in CB2 receptor function and localization between pigmented and albino animals.

The neuroprotective actions of cannabinoids on RGCs have been studied in retinal toxicity models. El-Remessy et al. (2003) reported that THC administered systemically (0.4 and 2 mg/kg) to rats prior to, or after the intravitreal injection of NMDA afforded neuroprotection via a mechanism involving CB1 receptors. THC attenuated the NMDA induced increase in apoptotic cells in the INL and GCL, reversed the inner retinal shrinkage and protected the Thy-1 and NFL loss. The localization of TUNEL-positive cells in the INL and GCL could suggest that some of these cells correspond to amacrine cells, which would be in agreement with the present study. Nucci et al. (2007) employing an *in vivo* model of ischemia-reperfusion, reported that the intravitreal administration of MethAEA rescued RGCs via activation of both the CB1 receptors and the TRPV1 vanilloid receptor (Transient receptor potential cation

channel subfamily V member 1). The results of the present study demonstrate for the first time that cannabinoids provide neuroprotection to retinal amacrine cells via a mechanism involving CB1 receptors.

In the present study, we also examined the involvement of caspase-3 driven apoptosis in the AMPA-induced cell death. According to our results Z-DEVD-FMK, an inhibitor of the crucial mediator of apoptosis caspase-3 did not reverse the excitotoxic effects of AMPA at any of the doses used (Fig. 8A-C). This result suggests that the AMPA-induced cell death observed in the present study does not involve the activation of caspase-3. To study further the involvement of caspase-3 driven apoptosis in our model, we performed western blot analysis against the phosphorylated and total form of SAPK/JNK kinases. SAPK/JNK signaling pathway plays a critical role in mediating apoptotic signaling pathways (Sluss et al., 1994; Tang et al., 2002; Lin, 2003). No statistically significant difference was observed in the phosphorylation of SAPK/JNK between control and AMPA-treated tissues (Fig. 8D and E). The above mentioned results suggest that the cell death observed in the model of AMPA excitotoxicity is not mediated by apoptosis.

The JNK pathway has been suggested to play a role in retinal apoptosis. Recently, Donovan et al. proposed that activation of JNK in retinal explants resulted in caspase-3-dependent photoreceptor apoptosis (Donovan et al., 2011). Moreover, Liu et al. (2011) reported that phosphorylated JNK kinase and cleaved caspase-3 were increased upon in vivo intraocular pressure elevation in rats. Our findings are not in agreement with the above mentioned studies. However, there is evidence that excitotoxicity in the retina may result in either apoptosis or necrosis, depending on the type of glutamate receptors activated and the time course of study. In an older study, NMDA, AMPA and kainate excitotoxins were used to induce cell death in retinas of chickens' embryos (Ientile et al., 2001). Despite the fact that all three ligands afforded cell death as revealed by TUNEL assay and elevation of LDH release, protease activity and western blot analysis showed that incubation of chicken embryos' retinas with 100 µM of NMDA for three hours resulted in the activation of caspase-3-like proteases, while AMPA $(50 \ \mu\text{M})$ and kainate $(50 \ \mu\text{M})$ did not afford any alteration to these enzymes. Moreover, Joo et al. (1999) reported that necrosis occurred in the INL and GCL four hours after the induction of ischemia, based on cell morphology using electron microscopy in an in vivo model of high intraocular pressure-induced retinal ischemia, while apoptotic patterns were apparent 3 days after the ischemic insult. Our findings are in agreement with lentile et al. (2001) who found that AMPA-induced cell death is not characterized by activation of caspase-3-dependent apoptotic signaling pathways in an in vitro model of excitotoxicity in the chicken retina. Thus, in our model the AMPA-induced cell death seems to be caspase-3-independent and may involve necrotic or necroptotic mechanisms. Investigations are in progress to characterize the necrotic/necroptotic pathways that may be involved in the AMPAinduced retinal cell death.

The downstream signaling pathways involved in the neuroprotective actions of cannabinoids were also investigated in the present study. The prosurvival PI3K/Akt (Gómez del Pulgar et al., 2000; Ozaita et al., 2007) and MEK/ERK1/2 (Karanian et al., 2005a,b; Wartmann et al., 1995) signaling pathways have been shown to be involved in the cannabinoids' actions in different systems. To test if this also holds in the neuroprotection observed in our retinal model, we co-injected the PI3K/Akt inhibitor wortmannin with AMPA + HU-210 or AMPA + AEA and observed a reduction of bNOS-expressing retinal cell somata (Fig. 9A and B). Akt kinase activation by HU-210 and AEA was confirmed using western blot analysis (Fig. 9C and D). These results suggest that the PI3K/Akt signaling pathway is involved in HU-210's and AEA's neuroprotective actions in the retina. The MEK/ERK1/2 signaling pathway also seems to be involved in AEA's actions, since ERK1/2 phosphorylation was induced in the presence of AEA (Fig. 9E and F). However, HU-210 failed to induce the phosphorylation of ERK1/2 kinases (Fig. 9E and F). These results are in agreement with the study of Molina-Holgado et al. (2005), where it was reported that the synthetic cannabinoid HU-210 induced the phosphorylation of Akt kinase and afforded neuroprotection against AMPA excitotox-icity in primary cortical neuronal cultures, while it did not alter the levels of ERK1/2 phosphorylation. Moreover, the stable ananda-mide analog R1-Methanandamide has also been reported to induce ERK1/2 phosphorylation in the hippocampus via a mechanism involving the CB1 receptors (Karanian et al., 2005a).

The present data provide solid evidence supporting the neuroprotective role of the endogenous cannabinoid AEA and the synthetic cannabinoids HU-210 and MethAEA in the *in vivo* retinal model of AMPA excitotoxicity via a mechanism involving CB1 receptors and PI3K/Akt and/or ERK1/2 signaling pathways. This is the first time that cannabinoids have been shown to protect cholinergic and bNOS-expressing amacrine cells against AMPA excitotoxicity *in vivo*. Studies are in progress in order to characterize further the mechanisms involved in these actions and the therapeutic significance of the cannabinoids in retinal disease.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

This research has been co-financed by a grant to K.T. from the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek National Funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund (KA 3396). The funding source had no involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report or in the decision to submit the article for publication. The authors would like to thank Dr. N. Mastrodimou for performing the radio-ligand binding studies, Dr. G. Kolios and E. Filidou for the RT-PCR studies and Dr. A. Vasilaki for her helpful advice throughout the project.

References

- Abadji, V., Lin, S., Taha, G., Griffin, G., Stevenson, L.A., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., 1994. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. J. Med. Chem. 37, 1889–1893.
- Antoniou, K., Galanopoulos, A., Vlachou, S., Kourouli, T., Nahmias, V., Thermos, K., Panagis, G., Daifoti, Z., Marselos, M., Papahatjis, D., Spyraki, C., 2005. Behavioral pharmacological properties of a novel cannabinoid 1',1'-dithiolane delta8-THC analog, AMG-3. Behav. Pharmacol. 16, 499–510.
- Aravindan, N., Cata, J.P., Hoffman, L., Dougherty, P.M., Riedel, B.J., Price, K.J., Shaw, A.D., 2006. Effects of isoflurane, pentobarbital, and urethane on apoptosis and apoptotic signal transduction in rat kidney. Acta Anaesthesiol. Scand. 50, 1229–1237.
- Barber, A.J., Lieth, E., Khin, S.A., Antonetti, D.A., Buchanan, A.G., Gardner, T.W., 1998. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. J. Clin. Invest. 102, 783–791.
- Bisogno, T., Delton-Vandenbroucke, I., Milone, A., Lagarde, M., Di Marzo, V., 1999. Biosynthesis and inactivation of N arachidonoylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenoyl-ethanolamine in bovine retina. Arch. Biochem. Biophys. 370, 300–307.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. Biochem. J. 312, 637–641.
- Cécyre, B., Zabouri, N., Huppé-Gourgues, F., Bouchard, J.F., Casanova, C., 2013. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54, 8079–8090.

- Cécyre, B., Thomas, S., Ptito, M., Casanova, C., Bouchard, J.F., 2014. Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 387, 175–184.
- Chen, J., Matias, I., Dinh, T., Lu, T., Venezia, S., Nieves, A., Woodward, D.F., Di Marzo, V., 2005. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 330, 1062–1067.
- Chidlow, G., Osborne, N.N., 2003. Rat retinal ganglion cell loss caused by kainate, NMDA and ischemia correlates with a reduction in mRNA and protein of Thy-1 and neurofilament light. Brain Res. 963, 298–306.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 258, 1946–1949.
- Donovan, M., Doonan, F., Cotter, T.G., 2011. Differential roles of ERK1/2 and JNK in retinal development and degeneration. J. Neurochem. 116, 33–42.
- El-Remessy, A.B., Khalil, I.E., Matragoon, S., Abou-Mohamed, G., Tsai, N.J., Roon, P., Caldwell, R.B., Caldwell, R.W., Green, K., Liou, G.I., 2003. Neuroprotective effect of (-)Δ⁹-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-Methyl-D-Aspartateinduced retinal neurotoxicity. Am. J. Pathol. 163, 1977–2008.
- Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzmán, M., 2002. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. Mol. Pharmacol. 62, 1385–1392.
- Gastinger, M.J., Singh, R.S., Barber, A.J., 2006. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47, 3143–3150.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzmán, M., 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. Biochem. J. 347, 369–373.
- Hu, S.S., Arnold, A., Hutchens, J.M., Radicke, J., Cravatt, B.F., Wager-Miller, J., Mackie, K., Straiker, A., 2010. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. J. Comp. Neurol. 518, 3848–3866.
- Ientile, R., Macaione, V., Teletta, M., Pedale, S., Torre, V., Macaione, S., 2001. Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. J. Neurochem. 79, 71–78.
- Joo, C.K., Choi, J.S., Ko, H.W., Park, K.Y., Sohn, S., Chun, M.H., Oh, Y.J., Gwag, B.J., 1999. Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDAmediated excitotoxicity and p53. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 713–720.
- Kapin, M.A., Doshi, R., Scatton, B., DeSantis, L.M., Chandler, M.L., 1999. Neuroprotective effects of eliprodil in retinal excitotoxicity and ischemia. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 1177–1182.
- Karanian, D.A., Brown, Q.B., Makriyannis, A., Bahr, B.A., 2005a. Blocking cannabinoid activation of FAK and ERK1/2 compromises synaptic integrity in hippocampus. Eur. J. Pharmacol. 508, 47–56.
- Karanian, D.A., Brown, Q.B., Makriyannis, A., Kosten, T.A., Bahr, B.A., 2005b. Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. J. Neurosci. 25, 7813–7820.
- Khanolkar, A.D., Abadji, V., Lin, S., Hill, W.A., Taha, G., Abouzid, K., Meng, Z., Fan, P., Makriyannis, A., 1996. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. J. Med. Chem. 39, 4515–4519.
- Kiagiadaki, F., Thermos, K., 2008. Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49, 3080–3089.
- Kokona, D., Charalampopoulos, I., Pediaditakis, I., Gravanis, A., Thermos, K., 2012. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. Neuropharmacol 62, 2106–2117.
- Kuroiwa, S., Katai, N., Yoshimura, N., 1999. A possible role for p16INK4 in neuronal cell death after retinal ischemia-reperfusion injury. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 528–533.
- Lafuente, M.P., Villegas-Pérez, M.P., Sellés-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Vidal-Sanz, M., 2002. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. Neurosci 109, 157–168.
- Lax, P., Esquiva, G., Altavilla, C., Cuenca, N., 2014. Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration. Exp. Eye Res. 120, 175–185.
- Leker, R.R., Gai, N., Mechoulam, R., Ovadia, H., 2003. Drug-induced hypothermia reduces ischemic damage: effects of the cannabinoid HU-210. Stroke 34, 2000–2006.
- Lin, A., 2003. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the break on apoptosis. Bioessays 25, 1–8.
- Lisa, S., Domingo, B., Martínez, J., Gilch, S., Llopis, J.F., Schätzl, H.M., Gasset, M., 2012. Failure of prion protein oxidative folding guides the formation of toxic transmembrane forms. J. Biol. Chem. 287, 36693–36701.
- Liu, H., Sun, H., Liu, C., 2011. Interference of the apoptotic signaling pathway in RGC stress response by SP600125 in moderate ocularhypertensive rats. Chin. J. Physiol. 54, 124–132.
- López, E.M., Tagliaferro, P., Onaivi, E.S., López-Costa, J.J., 2011. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. Synapse 65, 388–392.
- Lu, Q., Straiker, A., Lu, Q., Maguire, G., 2000. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. Vis. Neurosci. 17, 91–95.
- Mastrodimou, N., Lambrou, G.N., Thermos, K., 2005. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. Naunyn Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 371, 44–53.
- Mauler, F., Mittendorf, J., Horváth, E., De Vry, J., 2002. Characterization of the diarylether sulfonylester (-)-(R)-3-(2-hydroxymethylindanyl-4-oxy)phenyl-4,4,4-

trifluoro-1-sulfonate (BAY 38-7271) as a potent cannabinoid receptor agonist with neuroprotective properties. J. Pharmacol. Exp. Ther. 302, 359–368.

- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Heenan, L., Moore, J.D., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., 2005. Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. Mol. Cell. Neurosci. 28, 189–194.
- Nagayama, T., Sinor, A.D., Simon, R.P., Chen, J., Graham, S.H., Jin, K., Greenberg, D.A., 1999. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J. Neurosci. 19, 2987–2995.
- Nucci, C., Gasperi, V., Tartaglione, R., Cerulli, A., Terrinoni, A., Bari, M., De Simone, C., Agrò, A.F., Morrone, L.A., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Maccarrone, M., 2007. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48, 2997–3004.
- Osborne, N.N., Herrera, A.J., 1994. The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. Neurosci 59, 1071–1081.
- Osborne, N.N., McCord, R.J., Wood, J.P.M., 1995a. The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina in vivo. Neurochem. Res. 20, 635–641.
- Osborne, N.N., Wood, J.P.M., Muller, A., 1995b. The influence of experimental ischaemia on protein kinase c and the Gabaergic system in the rabbit retina. Neuropharmacol 34, 1279–1288.
- Osborne, N.N., Casso, R.J., Wood, J.P., Chidlow, G., Graham, M., Melena, J., 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. Prog. Retin. Eye Res. 23, 91–147.
- Ozaita, A., Puighermanal, E., Maldonado, R., 2007. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. J. Neurochem. 102, 1105–1114.
- Porcella, A., Casellas, P., Gessa, G.L., Pani, L., 1998. Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marihuana. Brain Res. Mol. Brain Res. 58, 240–245.
- Rábl, K., Reglodi, D., Bánvölgyi, T., Somogyvári-Vigh, A., Lengvári, I., Gábriel, R., Arimura, A., 2002. PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. Regul. Pept. 109, 71–74.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 671–675.

- Schuettauf, F., Stein, T., Choragiewicz, T.J., Rejdak, R., Bolz, S., Zurakowski, D., Varde, M.A., Laties, A.M., Thaler, S., 2011. Caspase inhibitors protect against NMDA-mediated retinal ganglion cell death. Clin. Exp. Ophthalmol. 39, 545–554.
- Shen, M., Thayer, S.A., 1998. The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. Brain Res. 783, 77–84.
- Siliprandi, R., Canella, R., Carmignoto, G., Schiavo, N., Zanellato, A., Zanoni, R., Vantini, G., 1992. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. Vis. Neurosci. 8, 567–573.
- Sluss, H.K., Barrett, T., Dérijard, B., Davis, R.J., 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. Mol. Cell. Biol. 14, 8376–8384.
- Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H.J., Maguire, G., 1999. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. Neurobiol 96, 14565–14570.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 89–97.
- Tang, F., Tang, G., Xiang, J., Dai, Q., Rosner, M.R., Lin, A., 2002. Absence of NF-κBmediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor a induced apoptosis. Mol. Cell. Biol. 22, 8571–8579.
- Wang, X., Niwa, M., Hara, A., Matsuno, H., Kawase, K., Kozawa, O., Mow, H., Uematsu, T., 2002. Neuronal degradation in mouse retina after a transient ischemia and protective effect of hypothermia. Neurol. Res. 24, 730–735.
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S.H., Davis, R.J., 1995. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. FEBS Lett. 359, 133–136.
- Yazulla, S., Studholme, K.M., McIntosh, H.H., Deutsch, D.G., 1999. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. J. Comp. Neurol. 415, 80–90.
- Yazulla, S., 2008. Endocannabinoids in the retina: from Marijuana to neuroprotection. Prog. Retin Eye Res. 27, 501–526.
- Zhang, X., Chaudhry, A., Chintala, S.K., 2003. Inhibition of plasminogen activation protects against ganglion cell loss in a mouse model of retinal damage. Mol. Vis. 9, 238–248.