



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της φαρμακοκινητικής και της ενδεχόμενης
αμφιβληστροειδικής τοξικότητας πρωτότυπων συνθετικών
νευροστεροειδών μορίων με νευροπροστατευτική δράση.**

Χρυσάνθη Τσίκα, MD, MSc, FEBO

Επιβλέπων: Καθ Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 2023

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης (επιβλέπων), Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αχιλλέας Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Τζατζαράκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης (επιβλέπων), Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αχιλλέας Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Τζατζαράκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Χαραλαμπόπουλος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σοφία Αντιμησιάρη, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ευστάθιος Δετοράκης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Ζαγανάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Η παρούσα διατριβή διανέμεται με την άδεια Creative Commons: Αναφορά- Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC).

Pharmacokinetic study and evaluation of potential retina toxicity of novel synthetic neurosteroid analogs with neuroprotective activity © 2024 by Chrysanthi Tsika is

licensed under [Attribution-NonCommercial 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) 

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Τσιλιμπάρη, όχι μόνο για την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διατριβής, αλλά για όλα τα χρόνια της γνωριμίας μας. Από τα χρόνια του μεταπτυχιακού και της ειδικότητας, αποτέλεσε πρότυπο για μένα ως ακαδημαϊκός αλλά και ως κλινικός γιατρός. Οι γνώσεις και η εμπειρία που μοιράστηκε μαζί μου κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών, της ειδικότητας, της εξειδίκευσης και μέχρι την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής, διαμόρφωσαν μεγάλο κομμάτι της ιατρικής και ερευνητικής μου ματιάς και του είμαι ευγνώμων γι' αυτό. Ως καθηγητής, στο μεταπτυχιακό μας πρόγραμμα αποτέλεσε την έμπνευση για την ενασχόληση μου με την έρευνα, με την αέναη περιέργεια του και ενδιαφέρον του για τη γνώση και για το καινούριο, που αποτελούν πηγή έμπνευσης, όχι μόνο για μένα, αλλά για όλους τους συνεργάτες του, φοιτητές και συναδέλφους. Η διερευνητική του ματιά στην κλινική πράξη και ο τρόπος γεφύρωσης της εργαστηριακής με την κλινική σκέψη αποτέλεσαν και θα αποτελούν για μένα πρότυπο για την περαιτέρω κλινική μου πορεία. Τα χρόνια της συνεργασίας μας και οι συζητήσεις μας, όχι μόνο για την οφθαλμολογία, αλλά και για ζητήματα ανθρωπίνης ουσίας, θα κατέχουν πάντα ιδιαίτερο κομμάτι στη μνήμη μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθ Γραβάνη που μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέρος αυτής της καταπληκτικής ομάδας μελέτης των BNN. Η υποδοχή και φιλοξενία στο εργαστήριό του, από τον ίδιο και την ομάδα του, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν ανεκτίμητη, καθώς και η γενναιοδωρία του ως προς την τεχνική/υλική υποστήριξη, την

παροχή των BNN και ειδικά του BNN27. Τέλος, του είμαι ευγνώμων για την υπομονή που έδειξε μαζί μου όλα αυτά τα χρόνια, μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής.

Δεν έχω λόγια να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Αν. Καθ. Μανόλη Τζατζαράκη, ο οποίος ήταν παρών σε κάθε βήμα της προσπάθειας αυτής. Πρωταγωνιστής από τα πρώτα βήματα, δείχνοντας πάντα άμεση ανταπόκριση σε κάθε μου απορία και διαθέτοντας απλόχερα το χρόνο του και την πείρα του για την εκπαίδευση και πρόοδο μου, μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής, με την ουσιαστική συμβολή του στη δημοσίευση των αποτελεσμάτων και την ολοκλήρωση της συγγραφής.

Θερμές ευχαριστίες στην επταμελή μου εξεταστική επιτροπή για την καθοδήγηση και το χρόνο τους. Ιδιαίτερα στην Καθ Αντιμησιάρη για την καθοδήγηση και τη καθοριστική συμβολή της στην ολοκλήρωση της δημοσίευσης και τον Καθ Χαραλαμπόπουλο, ο οποίος ήταν ένας από τους πυλώνες της προσπάθειας αυτής. Η καθοδήγηση του στην θεωρητική και πειραματική ανάπτυξη της διατριβής καθώς και τη διαμόρφωση της δημοσίευσης ήταν θεμελιώδης και θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από καρδιάς.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες ερευνητές και φίλους, για τη στήριξη και τη συνεργασία τους τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε στα εργαστήρια, την Παυλίνα, τον Πασχάλη, τη Ρουλίνα, τη Στέλλα, το Νίκο καθώς και το Μιχάλη, που η βοήθειά του ήταν απλά ανεκτίμητη.

Στην αδερφή μου, Κωνσταντίνα, που δυστυχώς δεν κατάφερε να συνηθίσει.....

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ/ΣΧΗΜΑΤΩΝ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	16
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	20
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ	11
1.1. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ	11
1.1.1. Δομή – Λειτουργία.....	11
1.1.2. Αιματο-Αμφιβληστροειδικός Φραγμός (ΑΑΦ)	17
1.1.3. Αμφιβληστροειδικές παθήσεις.....	22
Ταξινόμηση και παθοφυσιολογία αμφιβληστροειδικών παθήσεων	23
Απόπτωση και νευρο-αμφιβληστροειδικές παθήσεις.....	29
1.2. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ	31
1.2.1. Νευροτροφίνες	31

1.2.2. Νευροστεροειδή	32
1.2.2.1. DHEA	32
1.3. ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΕΣ- BNNs.....	35
1.3.1. BNN και ΑΕΦ	37
1.4. BNN27.....	38
2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΊΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS).....	46
2.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	46
2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΩΝ	47
2.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΑΖΩΝ	48
2.3.1. Τεχνική πλήρους σάρωσης.....	49
2.3.2. Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων	49
2.3.3. Τεχνική φασματομετρίας μαζών σε σειρά	49
2.4. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΜΑΖΩΝ	50
2.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΊΑΣ ΜΑΖΩΝ	51
3. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ.....	54
3.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	54
3.1.1. Χορήγηση φαρμάκων στον οφθαλμό.....	55
3.2.1. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ / ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ - ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	58
3.2.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ / ΚΑΤΑΝΟΜΗ-ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ	61
3.3. ΜΟΝΤΕΛΑ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	63

3.3.1. Μη – Διαμερισματική ανάλυση	63
3.3.2. Διαμερισματική ανάλυση	64
Μονοδιαμερισματικό μοντέλο	64
Πολυδιαμερισματικό μοντέλο	66
3.4. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΪΑΛΟΕΙΔΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ.....	69
3.4.1. Υαλοειδές	69
3.4.2. Κινητική φαρμάκων στην υαλοειδική κοιλότητα	73
3.4.3. Πειραματικά μοντέλα ενδοϋαλοειδικής φαρμακοκινητικής	75
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	77
4.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟΥ	78
4.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	81
4.2.1. Αξιολόγηση της ανατομική ακεραιότητας.	81
4.2.1.1 Βυθοσκόπηση	81
4.2.1.2 Ιστολογική μελέτη.....	82
4.2.1.3 Ανοσοϊστοχημική και ιστοχημική μελέτη	82
4.2.2 Αξιολόγηση της λειτουργικής ακεραιότητας	83
Ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα, ΗΑΓ (ElectroRetinoGram, ERG).	83
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	90
5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΈΡΕΥΝΑΣ	91
6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	93

6.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ- ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	
(LC/MS)	94
6.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	98
6.2.1. Φαρμακοκινητική μετά από Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση	98
6.2.1.1. Σχηματισμός μίγματος BNN27 για ενδοπεριτοναϊκή χρήση	98
6.2.1.2. Φαρμακοκινητική του BNN27 στη συστηματική κυκλοφορία	99
6.2.1.3. Φαρμακοκινητική του BNN27 στον αμφιβληστροειδή	101
6.2.1.4. Φαρμακοκινητική ανάλυση/φαρμακοκινητικές παράμετροι	105
6.2.2. Φαρμακοκινητική μετά από Ενδοϋαλοειδική χορήγηση	106
6.2.2.1. Σχηματισμός μίγματος BNN27 για ενδοϋαλοειδική χρήση	106
6.2.2.2. Ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις	107
6.2.2.3. Σχεδιασμός πειράματος – Πιλοτική μελέτη	108
6.2.2.4. Τυχαιοποίηση.....	110
6.2.2.5. Απομόνωση υαλοειδούς	110
6.2.2.6. Προετοιμασία δείγματος για ποσοτικοποίηση	111
6.2.2.7. Φαρμακοκινητική ανάλυση/φαρμακοκινητικές παράμετροι	112
6.3. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	113
6.3.1. Προεγχειρητικός έλεγχος	114
6.3.1.1. Κλινική εξέταση	114
6.3.1.2. Ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ΗΑΓ).....	116
6.3.2. Κριτήρια αποκλεισμού.....	121

6.3.3. Μετεγχειρητικός έλεγχος - Παρακολούθηση	121
6.3.4. Καταγραφή επιπλοκών και ανεπιθύμητων συμβάντων.	122
6.3.5. Ευθανασία.....	123
6.3.6. Ιστολογία	124
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	126
7.1. ΗPLC ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ-ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ (VALIDATION) ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	126
7.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ	131
7.2.1. Φαρμακοκινητική BNN27 στη συστηματική κυκλοφορία και τον αμφιβληστροειδή, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση.....	131
7.2.1.1. Συστηματική Κυκλοφορία.....	131
7.2.1.2. Αμφιβληστροειδής χιτώννας	134
7.2.3. Φαρμακοκινητική BNN27 στο υαλοειδές, μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση	138
7.3. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	140
7.3.1. Καταγραφή επιπλοκών και ανεπιθύμητων συμβάντων.	140
7.3.2. Κλινική Εξέταση	142
a. Σχισμοειδής λυχνία	142
b. Τονομετρία	143
c. Βυθοσκόπηση	144
7.3.3. Ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος (ΗΑΓ).....	148
A. Φωτοπικές συνθήκες	148

Β. Σκοτοπικές συνθήκες.....	152
Γ. Photopic Flash Flicker 20Hz	156
7.3.4. Ιστολογία.....	161
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	168
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χρωματογραφικές παράμετροι των τριών μορίων BNN.

Πίνακας 2. Συγκέντρωση BNN27 στον ορό μυών C57BL/6 σε σχέση με το χρόνο.

Πίνακας 3. Συγκέντρωση BNN27 στον αμφιβληστροειδή S-D επίμυων σε σχέση με το χρόνο.

Πίνακας 4. Φαρμακοκινητικές παράμετροι BNN27, βασισμένες στις συγκεντρώσεις ορού μυων και τις αμφιβληστροειδικές συγκεντρώσεις επίμυων, έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 100 mg/kg β.σ. και 30 mg/kg β.σ. BNN27 αντίστοιχα.

Πίνακας 5. Διάμεση ΕΟΠ (IQR) mmHg των οφθαλμών μελέτης (ΔΟ) και των οφθαλμών ελέγχου (ΑΟ) των δύο υπό μελέτη ομάδων και οι τιμές του p-value της μεταβολής της ΕΟΠ με το χρόνο.

Πίνακας 6: Περιγραφική στατιστική των καταγραφών του β-κύματος μετά από μονήρες flash υπό φωτοπικές συνθήκες.

Πίνακας 7: Χρόνος εμφάνισης του β-κύματος μετά από την εμφάνιση του φωτεινού ερεθίσματος σε φωτοπικές συνθήκες στις δύο ομάδες,

Πίνακας 8: Περιγραφική στατιστική των καταγραφών του β-κύματος μετά από μονήρες standard flash υπό σκοτοπικές συνθήκες.

Πίνακας 9: Χρόνος εμφάνισης του β-κύματος μετά από την εμφάνιση του φωτεινού ερεθίσματος σε σκοτοπικές συνθήκες στις δύο ομάδες

Πίνακας 10: Στατιστική περιγραφή των μετρήσεων του πλάτους (μVolt) της ΗΑΓ καταγραφής μετά από φωτεινό ερέθισμα flicker 20Hz.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ/ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Έκλυση BNN27, BNN23, BNN20, σε καθορισμένες συνθήκες.

Σχήμα 2: Φάσμα μαζών BNN27, BNN23, BNN20.

Σχήμα 3: Τυπικές φυσιολογικές καταγραφές των τριών καταγραφόμενων πρωτόκολλων ΗΑΓ. (α): φωτοπικό φλας, (β) σκοτοπικό φλας μέγιστης απόκρισης, (γ) (i) φωτοπικό flash flicker 20Hz και (ii) ο FFT μετασχηματισμός του.

Σχήμα 4: Φάσμα μαζών (m/z ions) των τριών μορίων BNN.

Σχήμα 5: Χρωματογραφήματα BNN27, BNN23 (μαύρη και κόκκινη συμπίπτουσες κορυφές) και του BNN20.

Σχήμα 6: Γραμμικότητα της μεθόδου σε φορτισμένα δείγματα του ορού.

Σχήμα 7: Γραμμικότητα της μεθόδου σε φορτισμένα δείγματα αμφιβληστροειδούς.

Σχήμα 8: Γραμμικότητα της μεθόδου σε φορτισμένα δείγματα υαλοειδούς.

Σχήμα 9: Συγκέντρωση (C_{serum} , ng/ml) του BNN27 σε σχέση με το χρόνο (t, h), μετά από ip έγχυση 100 mg/kg β.σ. BNN27 σε C57BL/6 μυς.

Σχήμα 10: Συγκέντρωση (C_{retina} , ng/g) του BNN27 σε σχέση με το χρόνο(t, h), μετά από ip έγχυση 30 mg/kg β.σ. BNN27 σε S-D επίμυς.

Σχήμα 11. Συγκέντρωση (C_{vitreous} , μg/ml) του BNN27 σε σχέση με το χρόνο (t σε ημέρες, days, d), μετά από IVT έγχυση 0.1ml μίγματος BNN27 συγκέντρωσης 6 mg/ml σε οφθαλμούς κονίκλων.

Σχήμα 12: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος καταγραφών β-κύματος, μετά από μονήρες flash υπό φωτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας A (υψηλή δόση), προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Σχήμα 13: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος καταγραφών β-κύματος, μετά από μονήρες flash υπό φωτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας B (χαμηλή δόση), προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση .

Σχήμα 14: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος των καταγραφών β-κύματος μετά από προβολή μονήρους standard flash υπό σκοτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας A (υψηλή δόση) προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Σχήμα 15: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος καταγραφών β-κύματος μετά από προβολή μονήρους standard flash υπό σκοτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας B (χαμηλή δόση), προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Σχήμα 16: Μετασχηματισμός Fourier των καταγραφόμενων μετρήσεων μετά από προβολή ερεθίσματος συχνότητας 20 Hz για 500msec.

Σχήμα 17: Θηκογράμματα και διάμεσοι των καταγραφών του ΗΑΓ μετά από την προβολή φωτεινού ερεθίσματος τύπου flash flicker συχνότητας 20Hz, σε φωτοπικές συνθήκες, προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Σχήμα 18: Θηκογράμματα και διάμεσοι των καταγραφών του ΗΑΓ μετά από την προβολή φωτεινού ερεθίσματος τύπου flash flicker συχνότητας 20Hz, σε φωτοπικές συνθήκες, προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Οβελιαία διατομή φυσιολογικού βολβού.

Εικόνα 2: Ανατομία αμφιβληστροειδή πρωτεύοντος

Εικόνα 3. Ανατομική διάταξη αμφιβληστροειδή σε στιβάδες/φωτοϋποδοχείς.

Εικόνα 4. Φωτομετατροπή στο ραβδίο.

Εικόνα 5. Σχηματισμός της εικόνας.

Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του αιματο- οφθαλμικού φραγμού.

Εικόνα 7: Αιματο- αμφιβληστροειδικός φραγμός (ΑΑΦ).

Εικόνα 8: Διαφορά μεταξύ χοριοειδικών και αμφιβληστροειδικών τριχοειδών.

Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση ενδοϋαλοειδικής έγχυσης.

Εικόνα 10,11: Εικόνα φυσιολογικού αμφιβληστροειδούς (10) και αμφιβληστροειδή ασθενούς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (11).

Εικόνα 12: Εκφυλιστικές παθήσεις του νευροεπιθηλίου.

Εικόνα 13: Λοίμωξη του αμφιβληστροειδή (αμφιβληστροειδίτιδα) από Κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus, CMV), σε ασθενή HIV+.

Εικόνα 14: Αποκόλληση αμφιβληστροειδή με μεγάλη ρωγμή.

Εικόνα 15: Κεντρική ορώδης αμφιβληστροειδοπάθεια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πάθησης του μελάγχρου επιθηλίου

Εικόνα 16: Ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας.

Εικόνα 17: DHEA και διαμεμβρανική σύνδεση και δράση.

Εικόνα 18: Σειρά συνθετικών C-17spiroxy- ανάλογων της DHEA.

Εικόνα 19: Κατανομή των υποδοχέων των νευροτροφινών στον αμφιβληστροειδή του ενήλικα χοίρου με ανοσοϊστοχημική μελέτη.

Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης των υποδοχέων TrkA και p75 στον αμφιβληστροειδή ενθλίκων τρωκτικών (ποντικού και του αρουραίου).

Εικόνα 21: Δοσοεξαρτώμενη καταστολή της υπερέκφρασης GFAP από τα κύτταρα της γλοίας στο μοντέλο ΔΑ.

Εικόνα 22: Αύξηση της GFAP μετά από ip χορήγηση 200mg/kg β.σ. BNN27 σε μυες, στο μοντέλο αμφιβληστροειδικής αποκόλλησης.

Εικόνα 23: Διάγραμμα τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου.

Εικόνα 24: Παθητικός (διάχυση, διήθηση) και ενεργητικός μηχανισμός διέλευσης κυτταρικής μεμβράνης.

Εικόνα 25: Μέθοδοι περιοχικής χορήγησης φαρμάκων στον οφθαλμό.

Εικόνα 26: Ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης (C) σε σχέση με το χρόνο (t)- υπολογισμός επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (Area under the curve, AUC)

Εικόνα 27: Οδοί απέκκρισης μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση.

Εικόνα 28: Οβελιαία τομή ανθρώπινου οφθαλμού(a, b) και οφθαλμού κονίκλου (c, d, e), μετά από μονιμοποίηση σε γλουταραλδεϋδη και κόκκινο του ρουθηνίου.

Εικόνα 29: Υαλώδες σώμα κονίκλου.

Εικόνα 30: Βυθός (αριστερά) και διατομή αμφιβληστροειδή (δεξιά) από ένα πίθηκο, έναν αλφικό κόνικλο και έναν αλφικό επίμυ.

Εικόνα 31: Σχηματική παράσταση της προέλευσης των ηλεκτρικών αποκρίσεων των ΗΑΓ καταγραφών.

Εικόνα 32: Τυπικές καταγραφές ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφήματος (ΗΑΓ).

Εικόνα 33: Παράδειγμα εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την παραγωγή, εκπομπή και την καταγραφή του φωτεινού ερεθίσματος που θα προκαλέσει την ηλεκτρική διέγερση των κυττάρων του αμφιβληστροειδή.

Εικόνα 34: Είδη ηλεκτροδίων τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταγραφή της ηλεκτροαμφιβληστροειδικής δραστηριότητας.

Εικόνα 35: Τύποι ηλεκτροδίων χρησιμοποιούμενοι σε ζώα για την καταγραφή του ΗΑΓ.

Εικόνα 36: Εμφάνιση του BNN27 κολλοειδούς, μετά από ενδοϋαλοειδική έγχυση οφθαλμού αλφικού κόνικλου, όπως φαίνεται πίσω από τον κρυσταλλοειδή φακό, μέσα στο υδρόφιλο περιβάλλον του υαλοειδούς.

Εικόνα 37: Μετεγχειρητικός έλεγχος- πρόσθιο ημιμόριο

Εικόνα 38: Διατομή φυσιολογικού αμφιβληστροειδή κόνικλου με τις επιμέρους στιβάδες, Διακρίνονται η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (1), η έσω κοκκώδης στιβάδα (2), η έξω κοκκώδης στιβάδα (3), η στιβάδα των έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων (4), το μελάγχρουν επιθήλιο(5), ο χοριοειδής(6) και ο σκληρός χιτώνας (7).

Εικόνα 39: Πολλαπλά κενοτόπια στις έξω αμφιβληστροειδικές στιβάδες

Εικόνα 40: Ελαττωμένη έξω κοκκώδης στιβάδα (a,b) με συνοδό εντοπισμένη αποκόλληση αμφιβληστροειδή

Εικόνα 41: Χοριοειδική αποκόλληση.

Εικόνα 42: Το νευροεπιθήλιο μαζί με το μελάγχρουν επιθήλιο έχουν αποσπαστεί από τον υποκείμενο χοριοειδή. Κάποια debris παρατηρούνται στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο.

Εικόνα 43: Ουλοποίηση. Η ανατομία του ιστού είναι καθολικά αποδιοργανωμένη. Δεν υπάρχουν διακριτές στιβάδες. Η στιβάδα των φωτοϋποδοχέων έχει εξαφανιστεί.

Εικόνα 44: Εντοπισμένη υπαμφιβληστροειδική περιοχή με ενδοϊστική διάταση, που η δημιουργία της έχει προκαλέσει την συμπίεση/στρέβλωση των υπερκείμενων έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων.

Εικόνα 45: Διάταση του υπερχοριοειδικού χώρου με συμπίεση των υπερκείμενων στιβάδων (α). Εικόνα (β), παρόμοια εικόνα σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.

Εικόνα 46: Οφθαλμός μελέτης: κενοτόπια, ενδοϊστική διάταση και υπερκείμενη στρέβλωση

Εικόνα 47: Τομή από οφθαλμό ελέγχου, φυσιολογικά ευρήματα.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΑΦ: Αιματο- Αμφιβληστροειδικός Φραγμός

ΑΕΦ: Αιματο-Εγκεφαλικός Φραγμός

ΑΟ: Αριστερός Οφθαλμός

ΑΥΦ: Αιματο-υδατοειδικός φραγμός

ΒΣ: Βάρος Σώματος

ΔΑ: Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

ΔΟ: Δεξιός Οφθαλμός

ΕΟΠ: Ενδοφθάλμια Πίεση

ΗΑΓ: Αμφιβληστροειδογράφημα

ΗΕΩ: Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς κηλίδας

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΜΒ: Μοριακό Βάρος

ΜΕ: Μελάγχρουν Επιθήλιο

ΜΝΤ: Μικρονευροτροφίνες

ΜΟ: Μέσος Όρος

ΟΝ: Οπτικό Νεύρο

ΣΚΟ: Σκληροκερατοειδικό Όριο

ΤΑ: Τυπικό Σφάλμα

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis

APCI: Atmospheric pressure chemical ionization

ARVO: Association for Research in Vision and Ophthalmology

AUC: Area Under the Curve

AUMC: Area Under the first Moment Curve

BAB: Blood- Aqueous Barrier

BBB: Blood-Brain Barrier

Bcl-2: B-cell lymphoma-2

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

Blood-Retina Barrier, BRB:

. iBRB: inner BRB

. oBRB: outer BRB

bNOS: brain Nitric Oxide Synthase

CMV: Cytomegalovirus

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DD: Disc diameter

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DIC: Differential Interference Contrast

DTL: Dawson, Trick, and Litzkow

ERG: Electroretinography/Electroretinogram

FFT: Fast Fourier Transformation

GABA: γ -Aminobutyric acid	NfL: Neurofilament light protein
GCL: Ganglion Cell Layer	NGF: Nerve Growth Factor
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein	NMDA: N-methyl-D-aspartate
cGMP: cyclic Guanosine Monophosphate	NT-3: Neurotrophin-3
HIV: Human Immunodeficiency Virus	NT- 4: Neurotrophin-4
IL: Interleukin (IL-1 β , IL-4, IL-10)	OCT: Optical Coherence Tomography
INL: Inner Nuclear Layer	ONL: Outer Nuclear Layer
IOP: Intraocular Pressure	OPL: Outer Plexiform layer
IPL: Inner Plexiform Layer	OP: Oscillatory potentials
IQR: Interquartile range	OS: Outer Segment
IS: Inner Segment	p75 ^{NTR} : p75 neurotrophin receptor
IS: Internal Standard	PBS: Phosphate-buffered saline
ISCEV: International Society for Clinical Electrophysiology of Vision	PREG: Pregnenolone
IVT: Intravitreal	PROG: Progesterone
LC-MS: Liquid Chromatography- Mass Spectrometry	RNFL: Retinal Nerve Fiber Layer
LNGFR: Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor	RL: Ringer's Lactate
LOD: Limit of Determination	SEM: Standard Error of the Mean
LOQ: Limit Of Quantification	SIM: Single Ion Monitoring
MRM: Multiple Reaction Monitoring	SLO: Scanning Laser Ophthalmoscopy
MRT: Mean Residence Time	SRM: Selected Reaction Monitoring
MS: Mass Spectrometry	TH: Tyrosine hydroxylase
NFL: Nerve Fiber Layer	TNF- α : Tumor Necrosis Factor- alpha
	trkA: Tropomyosin receptor kinase A

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το BNN27 είναι ένα πρωτόλειο συνθετικό 17-spiroepoxy παράγωγο του νευροστεροειδούς Δεϋδροεπιανδροστερόνης (Dehydroepiandrosterone, DHEA). Αποτελεί το ένα από μια ολόκληρη σειρά νεοσυντεθιμένων συνθετικών παραγώγων της DHEA, τα οποία ονομάστηκαν BNN και είναι μικρά λιπόφιλα μόρια, με αντιαποπρωτικές ιδιότητες, χωρίς την ανεπιθύμητη οιστρογονική δράση της DHEA. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα από τα τρία BNN (BNN20, 23 και 27), τα οποία βρέθηκαν να έχουν την πιο ισχυρή νευροπροστατευτική και αντιαποπρωτική δράση. Στην παρούσα διατριβή, επιλέχθηκε το BNN27, γιατί είναι το BNN που έχει μελετηθεί σε πειραματικά ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδικών παθήσεων, ενώ είναι και το πιο πολυχρησιμοποιημένο BNN, στις μέχρι τώρα προκλινικές μελέτες, συνολικά.

Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη των φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών του BNN27, τόσο μετά από συστηματική όσο και μετά από τοπική χορήγηση, τόσο στο αίμα όσο και στο όργανο στόχο, το οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού (υαλοειδές και αμφιβληστροειδής), καθώς και η διερεύνηση πιθανής τοξικότητας του μορίου στον αμφιβληστροειδή, μετά από τοπική χορήγηση.

Αρχικά, περιεγράφηκαν φασματοσκοπικά τα τρία βασικά BNN, BNN20, 23 και 27. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η φαρμακοκινητική του BNN27 τόσο μετά από συστηματική-ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, στον ορό του αίματος και στο όργανο στόχο, τον αμφιβληστροειδή, όσο και μετά από τοπική- ενδοϋαλοειδική χορήγηση, στο υαλοειδές σώμα. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η ύπαρξη ενδεχόμενης αμφιβληστροειδικής τοξικότητας έπειτα από ενδοϋαλοειδική χορήγηση του BNN27.

Για την κινητική στο αίμα, χρησιμοποιήθηκαν 42 C57BL/6 μύς. Χορηγήθηκε μία ενδοπεριτοναϊκή ένεση 100mg/kg β.σ. BNN27. Το αίμα συλλέχθηκε οπισθοβολβικά στις χρονικές στιγμές 0, 30 λεπτά, 1ώρα, 2, 4, 6 και 24ώρες μετά την έγχυση και οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν με υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Το μόριο βρέθηκε να έχει σταθερά απομάκρυνσης (elimination constant) $k_{el}=0.465(h^{-1})$ και χρόνο μέσης παραμονής (Mean Residence Time) $MRT=2.154$ ώρες στον ορό του αίματος του μύος.

Για την κινητική στον αμφιβληστροειδή, έγινε μία ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 30mg/kg β.σ. σε 48 Sprague-Dawley επίμυες. Ο αμφιβληστροειδής απομονώθηκε με κατάλληλη τεχνική, μετά από εξόρυξη των οφθαλμών στις χρονικές στιγμές 0, 15, 30λεπτά, 1ώρα, 2, 4, 6 και 24ώρες μετά την έγχυση και οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν με υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Η πρώτη χρονική στιγμή ανίχνευσης του BNN27 στον αμφιβληστροειδή ήταν τα 30 λεπτά. Η χρονική στιγμή της μέγιστης μετρούμενης συγκέντρωσης (t_{cmax}) ήταν οι δύο ώρες και η μέγιστη συγκέντρωση βρέθηκε ίσης με $C_{max}=1100ng/g$. Το BNN27 ανιχνεύτηκε στον αμφιβληστροειδή ακόμα και μετά από απομάκρυνση του αίματος από τη συστηματική κυκλοφορία, με τροποποιημένη διακαρδιακή έγχυση με ισοτονικό διάλυμα Ringer's Lactate (RL) με μετρούμενη συγκέντρωση στις 2 ώρες τα 320 (70) ng/g.

Για τη μελέτη της κινητικής στο υαλοειδές, έγινε μία ενδοϋαλοειδική ένεση 6mg/ml BNN27 σε αμφοτέρους τους οφθαλμούς 21 αλφικών κονίκλων. Το υαλοειδές απομονώθηκε με κατάλληλη τεχνική, μετά από εξόρυξη των οφθαλμών στις χρονικές στιγμές 0 (ευθανασία αμέσως μετά την έγχυση), 12 ώρες, 1, 2, 7, 14 και 30 ημέρες μετά την έγχυση και οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν με υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία

μάζας (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Η απομάκρυνση του BNN27 από το υαλοειδές βρέθηκε να ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης, με σταθερά απομάκρυνσης $k_{el} = 0.15(h^{-1})$ και χρόνο ημίσειας ζωής τις 4.49 ημέρες.

Για τη διερεύνηση της αμφιβληστροειδικής τοξικότητας, ελέγχθηκαν δύο ενδοϋαλοειδικές συγκεντρώσεις BNN27: 6mg/ml (ομάδα A) και 0.6mg/ml (ομάδα B). Σε αμφότερες τις ομάδες, εγχύθηκε ενδοϋαλοειδικά 0.1ml μίγματος BNN27 της αντίστοιχης συγκέντρωσης, στον δεξιό οφθαλμό (οφθαλμός μελέτης) 12 κονίκλων με φυσιολογική χρωστική και 0.1 ml διαλύματος 6% αιθυλικής αλκοόλης στον αριστερό οφθαλμό και των δύο ομάδων(οφθαλμός ελέγχου-θετικός μάρτυρας). Ελέγχθηκαν οι χρονικές στιγμές 0 (πριν την έγχυση), 1 μέρα, 1 εβδομάδα, 2 εβδομάδες και 1 μήνας μετά την έγχυση. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν μακροσκοπικές τεχνικές παρακολούθησης (σχισμοειδής λυχνία, βυθοσκόπηση, τονομέτρηση). Μετά το τέλος του πειράματος, οι οφθαλμοί μελετήθηκαν ιστολογικά, με φωτονικό μικροσκόπιο, μετά από εξόρυξη και κατάλληλη προετοιμασία. Η λειτουργική ακεραιότητα του αμφιβληστροειδή μελετήθηκε με αμφιβληστροειδογράφημα (ΗΑΓ), πριν την έγχυση και ένα μήνα μετά την έγχυση, πριν την ευθανασία.

Στην ομάδα A παρατηρήθηκαν ανατομικά και λειτουργικά ευρήματα ενδοϋαλοειδικής φλεγμονής σε 2 οφθαλμούς μελέτης, τα οποία πιθανά να σχετίζονται με το υπό μελέτη κολλοειδές του BNN27. Στην ομάδα B, δεν παρατηρήθηκαν ευρήματα τοξικότητας του BNN27. Σε αμφότερες τις ομάδες, παρατηρήθηκαν μικροσκοπικές αλλοιώσεις, μη σχετιζόμενες με το υπό μελέτη μόριο, που δεν επιβεβαιώθηκαν ηλεκτροφυσιολογικά. Οι οφθαλμοί μάρτυρες αμφότερων των ομάδων δεν εμφάνισαν σημεία τοξικότητας.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι το BNN27 μετακινείται ταχέως από τον ενδοπεριτοναϊκό χώρο στο αίμα και από κει στον αμφιβληστροειδή. Δεδομένου του μεγέθους και της λιποφιλικότητας του μορίου, κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο. Το BNN27 αποδείχθηκε ότι διέρχεται τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό με την ανίχνευσή του στον ιστό, μετά τη διακαρδιακή έγχυση RL. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η συγκεκριμένη φαρμακοκινητική μορφή του BNN27 μπορεί να λειτουργήσει ως δεξαμενή για την βραδεία απόδοση του μορίου στον αμφιβληστροειδή, σε πιθανή κλινική του χρήση. Τέλος, η χαμηλή δόση φαίνεται να είναι σχετικά ασφαλής για ενδοϋαλοειδική χρήση και η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για την αραίωση του BNN27 στη συγκέντρωση 6%.

ABSTRACT

BNN27 is a novel synthetic 17-spiroepoxy derivative of the neurosteroid Dehydroepiandrosterone (DHEA). It is one of a series of newly synthesized synthetic derivatives of DHEA, named BNN, which are small lipophilic molecules with antiapoptotic properties, without the undesirable estrogenic effect of DHEA. More specifically, it is one of the three BNNs (BNN20, 23 and 27), which were found to have the most potent neuroprotective and antiapoptotic activity. In the present thesis, BNN27 was chosen to be studied as it is the most widely used in preclinical studies, among the three lead molecules so far, but also the molecule that has been used in the.

The purpose of this research was to study the pharmacokinetic characteristics of BNN27, both after systemic and local administration, in the blood, but also in the target-tissue, the posterior segment of the eye (vitreous and retina), as well as to assess for any retinal toxicity after local administration.

After the initial spectroscopic characterization of the three lead BNNs, BNN20, 23 and 27, the BNN27 pharmacokinetics were studied, both after systemic- intraperitoneal administration, in the serum and in the target-tissue, the retina, as well as after local-intravitreal (IVT) administration in the vitreous. Moreover, the presence of retinal toxicity after intravitreal administration was investigated.

For the serum pharmacokinetics, 42 C57BL/6 mice were used. The blood was collected post-orbitarily at time points 0, 30 min, 1h, 2, 4, 6 and 24h after one intraperitoneal injection of 100mg/kg BNN27 and the concentrations were measured by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The molecule was found to have an

elimination constant $k_{el}=0.465(h^{-1})$ and mean residence time (MRT) = 2.154 h in the mice serum.

For the retinal pharmacokinetics, 48 Sprague-Dawley rats were used. The retina was isolated, after enucleation, at 0, 15, 30min, 1h, 1h, 2, 4, 6 and 24h after one intraperitoneal injection of 30mg/kg BNN27 and the concentrations were measured by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The first time point of BNN27 detection in the retinal tissue were the 30 minutes after injection. The time of the maximum measured concentration (t_{cmax}) was 2 hours and the maximum concentration was found to be $C_{max}=1100ng/g$. BNN27 was detected in the retina even after transcardiac perfusion with Ringer's Lactate (RL), with a 2h post-injection concentration equal to 320 (70) ng/g.

For the vitreous pharmacokinetics, both eyes of 21 albino rabbits received one intravitreal injection of 0.6mg/0.1ml BNN27. The vitreous was isolated after enucleation, at time points 0 (euthanasia and enucleation immediately after injection), 12 h, 1 day, 2, 7, 14 and 30 days after one intravitreal injection of 6mg/ml BNN27 and concentrations were measured by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). BNN27 was shown to follow 1st order kinetics, with an elimination constant $k_{el} = 0.15(h^{-1})$ and a half-life of 4.49 days. At 30 days, traces of BNN27 were detected.

To assess for any retinal toxicity, two intravitreal concentrations of BNN27 were examined: 6mg/ml (group A) and 0.6mg/ml (group B). Each group comprised of 12 pigmented rabbits. The right eye of each animal was injected with 0.1ml of the respective BNN27 concentration (study eye) and the left eye was injected with 0.1ml of a 6% ethanol solution (control eye-positive control), in both groups. The animals were examined at time

points: 0 (before injection), 1 day, 1 week, 2 weeks and 1 month after injection. During the experiment, the eyes were monitored macroscopically, with slit-lamp anterior segment examination, fundoscopy and tonometry. At the end of the experiment (30 days after injection), the eyes were studied histologically, with photon microscopy, after enucleation and appropriate preparation. The retinal function was studied with electroretinography (ERG) before injection and one month after the intravitreal injection.

In group A, two study eyes presented macroscopic, histological and functional findings of posterior segment inflammation and this was potentially associated with the BNN27 solution. In both groups, non-specific histological findings were observed, which were not confirmed by ERG; they are not most likely associated with the BNN27. Furthermore, in both groups, the control eyes did not show any signs of toxicity, anatomical or functional.

In conclusion, BNN27 was proved to move rapidly from the intraperitoneal space into the systemic circulation and thence into the retina. This is consistent with the size and lipophilicity of the molecule. The detection of intraretinal BNN27, after transcardiac RL perfusion, proved that BNN27 can cross the blood-retinal barrier. In addition, given the long -term detection of the BNN27 in the vitreous after IVT administration, the present formulation could be potentially considered for the BNN27's slow release to the retina, in case of future clinical use. Eventually, the low dose appears to be relatively safe for intravitreal use and ethanol can be safely used for the BNN27 dilution at 6% concentration.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό ότι ο αμφιβληστροειδής αποτελεί προέκταση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Κατ' αναλογία με το σύνολο του νευρικού ιστού, χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία σε αλλαγές στην παροχή οξυγόνου και γλυκόζης, ενώ χάρη σε τοπικούς φραγμούς αντίστοιχους προς τον αιματοεγκεφαλικό, προστατεύεται από την επίδραση εξωγενών βλαπτικών παραγόντων. Ένας από τους τρόπους προστασίας και αυτορρύθμισής του, περιλαμβάνει την παρακρινική δράση των ενδογενών ορμονών, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι στεροειδείς ορμόνες, όπως για παράδειγμα η Δεϋδροεπιανδροστερόνη (Dehydroepiandrosterone, DHEA), καθώς οι παράγωγες ορμόνες της που σχετίζονται με το φύλλο, τα οιστρογόνα και ανδρογόνα (νευροστεροειδή).

Η νευροπροστατευτική δράση της DHEA στο ΚΝΣ και τον αμφιβληστροειδή αποτέλεσε το έναυσμα για την κατασκευή συνθετικών ανάλογών της στο εργαστήριο, με ενδιαφέρουσες ιδιότητες *in vitro*. Τα ανάλογα αυτά ονομάστηκαν BNN. Ορισμένα εξ' αυτών, συγκεκριμένα τα BNN20, 23 και 27, βρέθηκε ότι εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση, χωρίς να συνδέονται σε υποδοχείς των οιστρογόνων και τεστοστερόνης. Άρα, στερούνται των ανεπιθύμητων ενεργειών που προέρχονται από την ορμονική δράση των τελευταίων, καθιστώντας τα μόρια ελκυστικούς υποψήφιους για την περαιτέρω κλινική χρήση τους.

Από τα μόρια αυτά, το BNN20 και το BNN27 έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία έτη, σε σχέση με την αντιαποπρωτική και την αντιφλεγμονώδη δράση τους σε πειραματικά ζωικά μοντέλα νευρολογικών και ψυχιατρικών παθήσεων, καθώς και σε

αμφιβληστροειδικές παθήσεις, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) και η αποκόλληση του αμφιβληστροειδή.

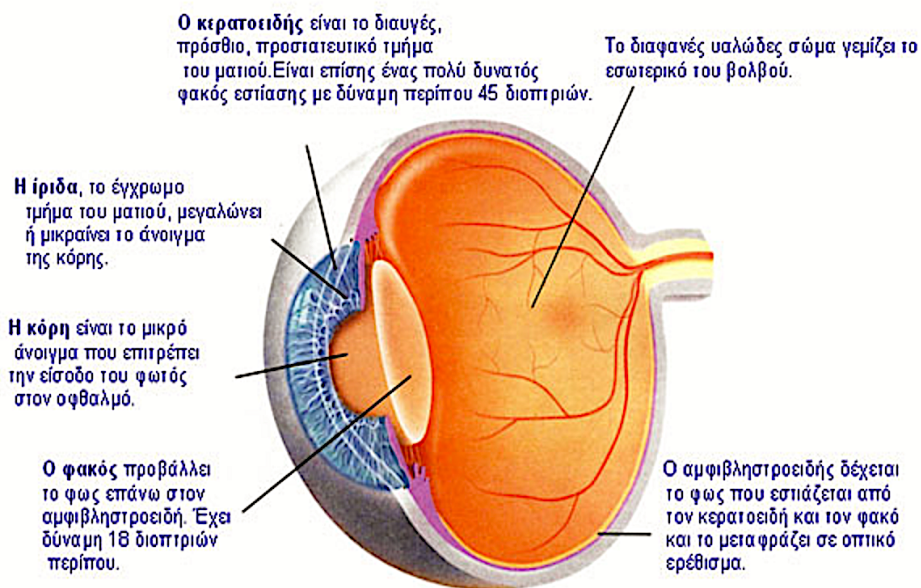
Η παρούσα διατριβή εστιάζει στο BNN27 και τη διερεύνηση του ποσοτικού προσδιορισμού του στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού, μετά από συστηματική και ενδοϋαλοειδική χορήγηση, σε συνδυασμό με την εκτίμηση της ενδεχόμενης ύπαρξης τοξικότητάς του στον αμφιβληστροειδή, μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση.

1. Αμφιβληστροειδής και Νευροπροστασία

1.1. Αμφιβληστροειδής

1.1.1. Δομή – Λειτουργία

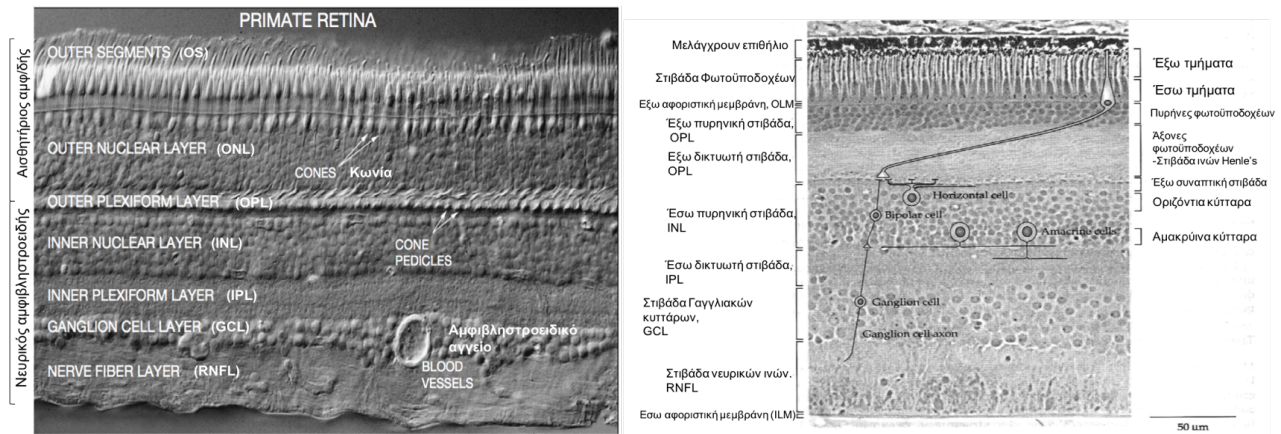
Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί τον φωτοευαίσθητο χιτώνα του οφθαλμού, όπου αρχίζει η οπτική αντίληψη. Το φως που διέρχεται από τα διαφανή διαθλαστικά μέσα του προσθίου ημιμορίου (κερατοειδής χιτώνας, κρυσταλλοειδής φακός), προβάλλεται στον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 1,4), όπου επιτελείται το πρώτο στάδιο της οπτικής λειτουργίας, το οποίο είναι η μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική (φωτομεταγωγή ή φωτομετατροπή).



Εικόνα 1. Οβελιαία διατομή φυσιολογικού βολβού. Το φως διέρχεται από την κόρη και διαμέσου των διαφανών οπτικών, φθάνει και διεγείρει τον αμφιβληστροειδή.

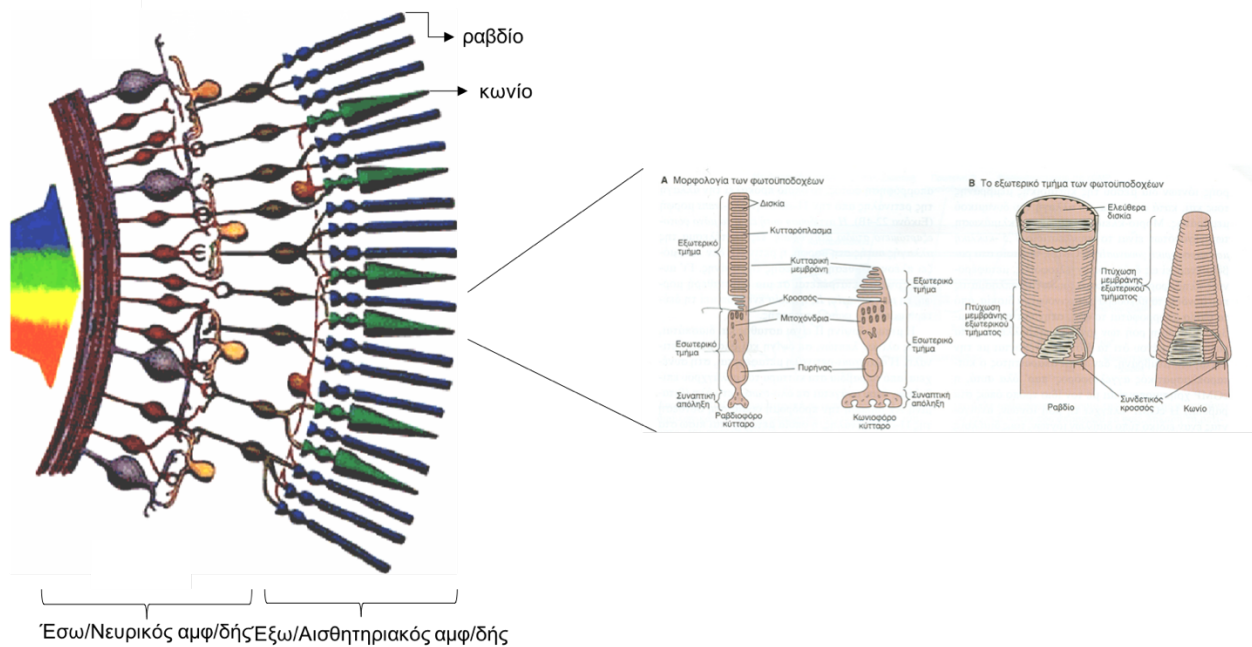
Η λειτουργία του αμφιβληστροειδή δεν περιορίζεται στην πιστή μετατροπή του φωτός σε εικόνα, όπως το φωτογραφικό φιλμ, με το οποίο παρομοιάζεται συχνά. Στον αμφιβληστροειδή πραγματοποιείται και ένα πρώτο στάδιο επεξεργασίας της εικόνας, φιλτράροντας μεγάλα ποσά πληροφορίας. Το παραπάνω αφορά κυρίως την ανίχνευση και τη σύγκριση των αλλαγών στην παρατηρούμενη εικόνα (όπως χρωματικό προφίλ, φωτεινότητα), όπου καταχωρούνται και διαβιβάζονται, ενώ σταθερές εντάσεις είτε στο χώρο είτε στο χρόνο «αγνοούνται». Ουσιαστικά, ο αμφιβληστροειδής επιτελεί μία υψηλή εξειδικευμένη λειτουργία, η οποία επιτυγχάνεται χάρη στην υψηλή εξειδίκευση στη δομή του (*Εικόνα 2*).

Η ανατομική διάταξη του αμφιβληστροειδή σε στιβάδες προσομοιάζει με την αντίστοιχη του εγκεφάλου, με τον οποίο αναπτυξιακά προέρχονται από την ίδια εμβρυική δομή, το νευρικό σωλήνα. Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί μέρος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), ουσιαστικά αποτελεί τμήμα του εγκεφάλου, με μία επιπλέον εξειδικευμένη αισθητηριακή στιβάδα, τους φωτοϋποδοχείς (*ραβδία και κωνία, εικόνα 3*). Πρακτικά, ο αμφιβληστροειδής είναι μια λεπτή «φέτα» του εγκεφάλου, διαθέσιμη για μελέτη, εφόσον είναι εύκολα προσβάσιμη για παρατήρηση και διεγείρεται από ένα εύκολα ελεγχόμενο ερέθισμα, το φως. Για το λόγο αυτό, έχει χαρακτηριστεί από τους ερευνητές ως το προσβάσιμο μέρος του εγκεφάλου¹.



Εικόνα 2: Ανατομία αμφιβληστροειδή πρωτεύοντος, αριστερά εικόνα από DIC μικροσκοπία και δεξιά σχηματικά. Διακρίνονται: το μελάγχρουν επιθήλιο (ME, δεξιά εικόνα) που είναι η εξώτατη στιβάδα που στηρίζει και τρέφει τον έξω αμφιβληστροειδή (αισθητήριος αμφιβληστροειδής). Πάνω στο ME ακουμπούν τα έξω τμήματα(OS) των φωτοϋποδοχέων (ραβδίων και κωνίων), στα οποία γίνεται η απορρόφηση του φωτός. Νευροαισθητήριος αμφ/δής: ONL: έξω πυρηνική στιβάδα, όπου περιλαμβάνονται οι πυρήνες των φωτοϋποδοχέων, OPL: έξω δικτυωτή στιβάδα: συναπτική στιβάδα μεταξύ φωτοϋποδοχέων και νευρικού αμφ/δής, INL: έσω πυρηνική στιβάδα: πυρήνες των δίπολων, οριζοντίων αμακρίνινων κυττάρων και κυττάρων Muller. IPL: έσω δικτυωτή στιβάδα: συναπτική στιβάδα μεταξύ δίπολων -αμακρίνινων και γαγγλιακών κυττάρων. GCL: στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων, RNFL: στιβάδα νευρικών ινών των γαγγλιακών κυττάρων. (Από Ryan SJ. Retina. 4th edition. Philadelphia US. Elsevier Inc ;2017)

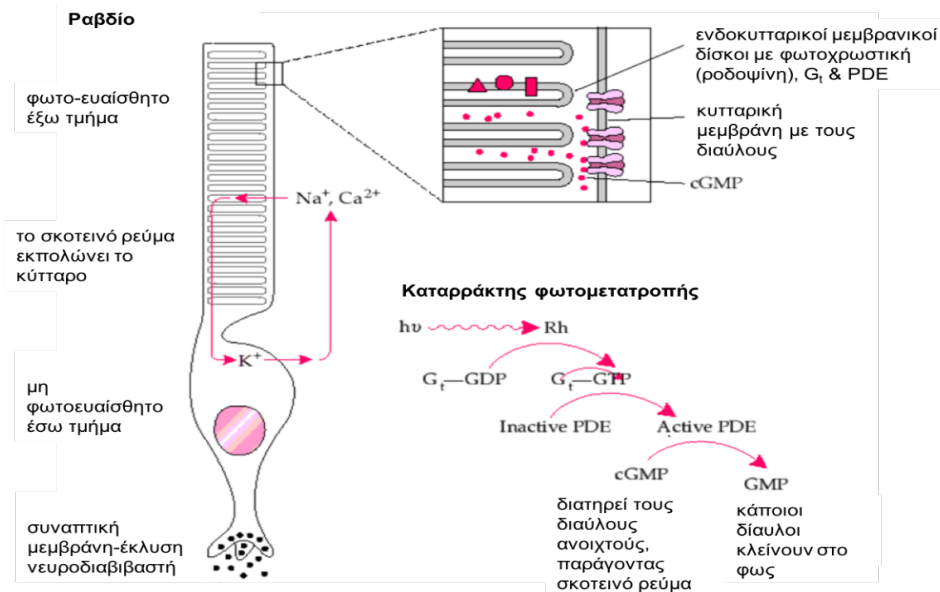
Ανατομικά, αποτελείται από το μελάγχρουν επιθήλιο (ME) και τον ιδίως αμφιβληστροειδή (Εικόνα 2). Ο τελευταίος μπορεί λειτουργικά να διακριθεί σε δύο μέρη²: τον αισθητηριακό αμφιβληστροειδή, ο οποίος σχετίζεται με τη φωτομετατροπή από τους φωτοϋποδοχείς (ραβδία και κωνία) και το νευρικό αμφιβληστροειδή, ο οποίος αποτελείται από πιο τυπικούς νευρώνες που πραγματοποιούν τα πρώτα βήματα για την επεξεργασία της οπτικής πληροφορίας (δίπολα, αμακρίνα, οριζόντια και γαγγλιακά κύτταρα).



Εικόνα 3. Ανατομική διάταξη αμφιβληστροειδή σε στιβάδες/φωτοϋποδοχείς. Η μορφολογία του έξω τμήματος των δύο ειδών των φωτοϋποδοχέων τους έδωσε το όνομά τους: Ραβδιοφόρα ή ραβδία και κωνιοφόρα ή κωνία. Διαφορετική μορφολογία αντιστοιχεί σε διαφορετική λειτουργία (ραβδία για την όραση σε χαμηλό φωτισμό, κωνία για τα χρώματα και τις λεπτομέρειες). Και στις δύο περιπτώσεις, η έναρξη της διαδικασίας παραγωγής ηλεκτρικού ρεύματος γίνεται με την απορρόφηση του φωτός από τις φωτοχρωστικές (ροδοψίνη και τα ραβδία, 3 οψίνες για τα κωνία για τα τρία βασικά χρώματα), οι οποίες βρίσκονται στους μεμβρανικούς δίσκους των έξω τμημάτων

Ο συγκεκριμένος διαχωρισμός είναι ουσιαστικός γιατί η φωτομεταγωγή (φωτομετατροπή) αποτελεί την εξαίρεση στον κανόνα της παραγωγής μιας νευρικής ώσης, καθώς το ρεύμα που παράγεται είναι αναλογικό της παραγόμενης μεταβολής του διαμεμβρανικού δυναμικού, ενώ δεν παράγεται κατά ώσεις (ώση: εκπόλωση της μεμβράνης όταν το δυναμικό ηρεμίας ξεπεράσει συγκεκριμένη ουδό). Η ενδοκυτταρική διαδικασία που επιτελείται στα έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων, η οποία θα μετατρέψει το φωτεινό ερέθισμα σε ηλεκτρικό (Εικόνα 4) έχει σαν αποτέλεσμα τη σταδιακή διέγερση

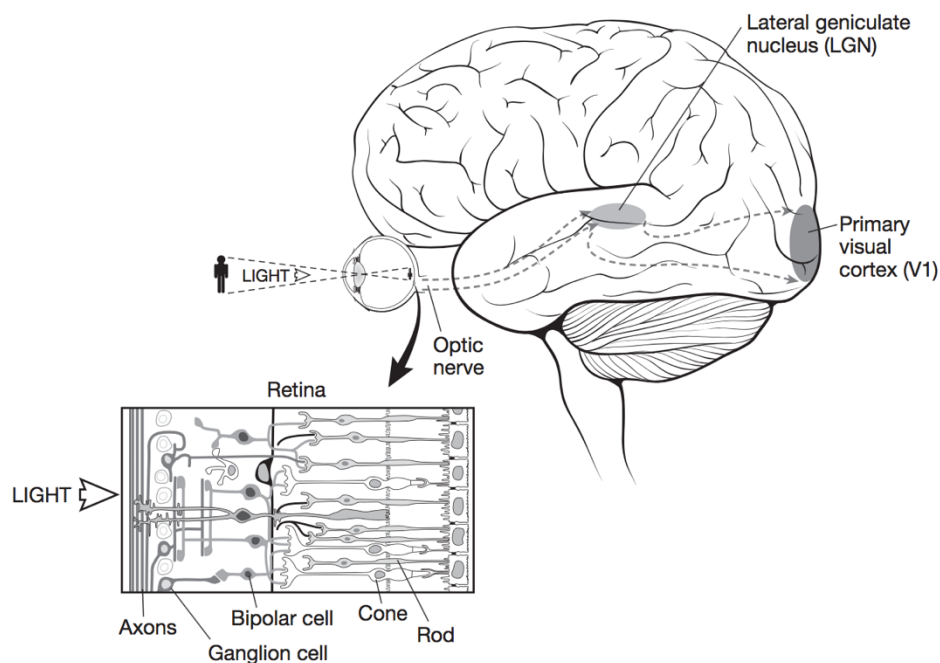
της μεμβράνης του νευροαισθητήριου υποδοχέα και την παραγωγή διαβαθμισμένων δυναμικών, τα οποία μεταφέρονται στον εσώτερο νευρώνα (δίπολο κύτταρο).



Εικόνα 4. Φωτομετατροπή στο ραβδίο. Σε σκοτεινές συνθήκες, τα επίπεδα του κυκλικού GMP (cGMP) είναι υψηλά και διατηρούν τους ιοντικούς διαύλους ελεγχόμενους από cGMP ανοιχτούς, επιτρέποντας μια συνεχή ροή φορτίου, που ονομάζουμε «σκοτεινό ρεύμα». Σε φωτιστικές συνθήκες, η απορρόφηση του φωτός από τη ροδοψίνη πυροδοτεί μια αλυσίδα αντιδράσεων που έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την εκπόλωση του κυττάρου και τη μεταφορά του ηλεκτρικού σήματος στον επόμενο νευρώνα (δίπολο κύτταρο).

Ακολούθως, η μετάδοση του ηλεκτρικού σήματος ενδοϊστικά, από τα δίπολα ως τα γαγγλιακά κύτταρα (νευρικός αμφιβληστροειδής) και οπισθιότερα γίνεται με τον κλασικό τρόπο, μέσω συναπτικών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων των διαφόρων στιβάδων. Η ενδοαμφιβληστροειδική επεξεργασία της πρωτο-παραγόμενης από φωτοϋποδοχείς οπτικής πληροφορίας πραγματοποιείται χάρη στις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ των

διαφόρων στιβάδων του αμφιβληστροειδή και το σήμα μεταδίδεται τελικώς προς τον εγκέφαλο, μέσω του οπτικού νεύρου, το οποίο σχηματίζεται από τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, που είναι τα κύτταρα της εσωτερής αμφιβληστροειδικής στιβάδας (εικόνα 5). Ουσιαστικά, πρόκειται για έναν ιστό με έντονη ηλεκτρική δραστηριότητα, όπως ακριβώς ο εγκέφαλος, την οποία μπορούμε να καταγράψουμε και να χρησιμοποιήσουμε διαγνωστικά (με τη χρήση μεθοδολογίας όπως το ΗΑΓ).



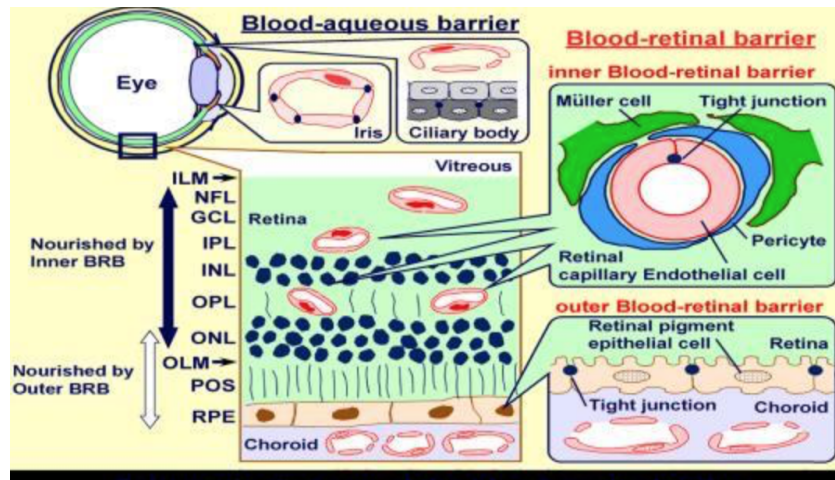
Εικόνα 5. Σχηματισμός της εικόνας. Το φως, αφού διανύσει τον οφθαλμό περνώντας από τα διαφανή διαθλαστικά μέσα (κερατοειδής, υδατοειδές υγρό, κρυσταλλοειδής φακός, υαλώδες σώμα) καταλήγει και διεγείρει τον αμφιβληστροειδή, από τον οποίο ξεκινά η δημιουργία της εικόνας. Μια πρώτη επεξεργασία θα γίνει στις στιβάδες του και στη συνέχεια μέσω του οπτικού νεύρου (νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων), η πληροφορία θα μεταφερθεί κατά μήκος της οπτικής οδού μέχρι το κέντρο της όρασης (V1), που βρίσκεται στον ινιακό λοβό.

Η πολυπλοκότητα του ιστού τόσο ανατομική, όσο και λειτουργική έχει σαν αποτέλεσμα να αποτελεί ο αμφιβληστροειδής τον ιστό του σώματος με τις μεγαλύτερες απαιτήσεις σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά σε σχέση με το μέγεθός του (μαζί με τον εγκέφαλο). Αυτό τον καθιστά ευάλωτο σε στερήσεις σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά καθώς και στην έκθεση σε επιβλαβή στοιχεία.

Με απώτερο σκοπό την προστασία του και τη διατήρηση της ομοιόστασής του, διαχωρίζεται από τη συστηματική κυκλοφορία με ένα φραγμό, που προσομοιάζει με τον Αιματο- Εγκεφαλικό Φραγμό, ΑΕΦ (Blood-Brain Barrier, BBB), που προστατεύει τον εγκέφαλο, ο οποίος ονομάζεται Αιματο-Αμφιβληστροειδικός Φραγμός, ΑΑΦ (Blood-Retina Barrier, BRB).

1.1.2. Αιματο-Αμφιβληστροειδικός Φραγμός (ΑΑΦ)

Ο αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός(ΑΑΦ) αποτελεί ένα τμήμα του συνολικού αιματο-οφθαλμικού φραγμού (εικόνα 6), ο οποίος ρυθμίζει την ομοιόσταση του ενδοφθάλμιου περιβάλλοντος και των οφθαλμικών ιστών (είσοδος-έξοδος ουσιών, θρέψη ιστών, ενδοφθάλμια πίεση).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του αιματο-οφθαλμικού φραγμού. Ο αιματο-οφθαλμικός φραγμός συναπαρτίζεται από τον αιματο-υδατοειδικό φραγμό και τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό.

Η κοινή συνιστώσα που καθιστά αποτελεσματικό τον φραγμό είναι οι στενές συνδέσεις (tight junctions) μεταξύ κυττάρων στα σημεία που πραγματοποιείται ο φραγμός. Συγκεκριμένα:

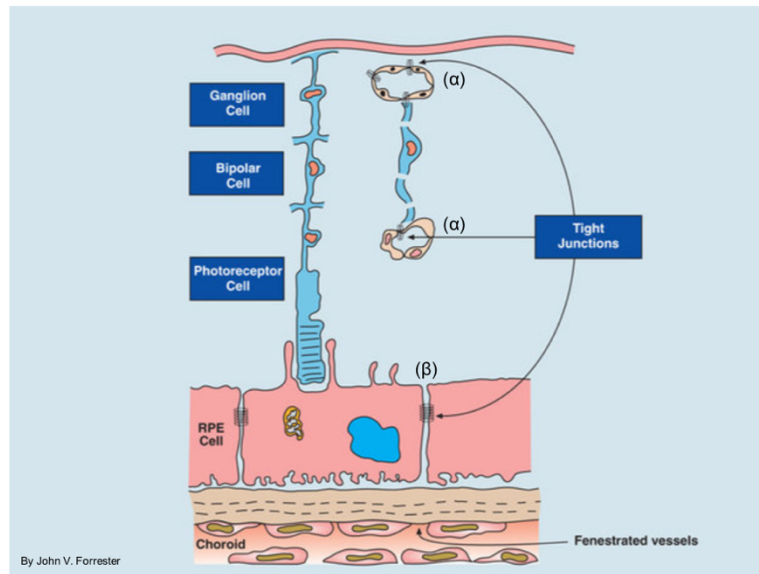
-Αιματο-υδατοειδικός φραγμός, ΑΥΦ (Blood-aqueous barrier-BAB): Διαθέτει αγγειακή συνιστώσα: στενές συνδέσεις στο επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών του ακτινωτού σώματος και της ίριδας και επιθηλιακή συνιστώσα: στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων στο επίπεδο του οπίσθιου επιθηλίου της ίριδας και του μη χρωστικοφόρου επιθηλίου του ακτινωτού σώματος .

-Αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός, ΑΑΦ (Blood-retina barrier, BRB): Συναποτελείται επίσης από αγγειακή και επιθηλιακή συνιστώσα, σαφώς διαχωρισμένες. Πρόκειται για τον έσω ΑΑΦ (inner BRB, iBRB): Στενές συνδέσεις στο επίπεδο του

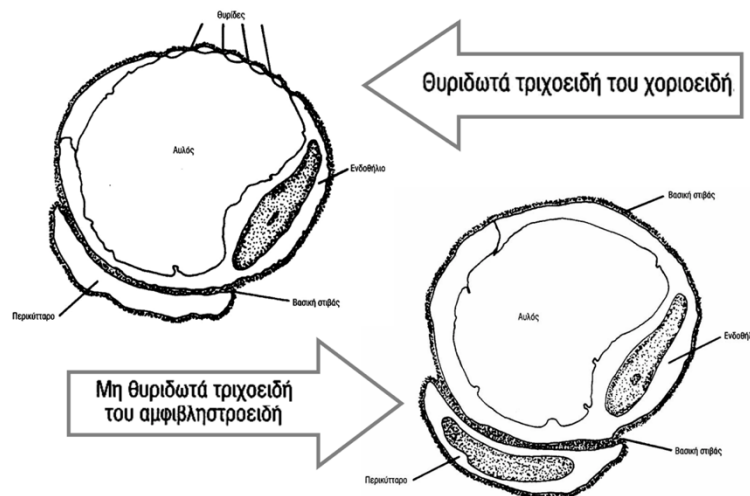
ενδοθηλίου των τριχοειδών που αιματώνουν τα έσω 2/3 του ιστού και για τον έξω ΑΑΦ(outer BRB, oBRB): Στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων του ΜΕ.

Ο ΑΑΦ συνίσταται σε δύο μέρη. Τον έσω ΑΑΦ (inner BRB, iBRB), ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ των έσω στιβάδων του αμφιβληστροειδή (νευρικός αμφ/δής) και του ενδαγγειακού χώρου των αγγείων που τις αρδεύουν και τον έξω ΑΑΦ (outer BRB, oBRB), που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις έξω στιβάδες του αμφιβληστροειδή (αισθητηριακός αμφ/δής-φωτοϋποδοχείς) και τον χοριοειδή (εικόνα 7).

Τα έσω 2/3 του αμφιβληστροειδή αιματώνονται από τις διακλαδώσεις της κεντρικής αμφ/κής αρτηρίας, η οποία εισέρχεται στον οφθαλμό διαμέσου του οπτικού νεύρου. Ο έσω ΑΑΦ είναι ίδιος στην κατασκευή με τον ΑΕΦ και η μεταφορά ουσιών διαμέσου τόσο του ενός όσο και του άλλου είναι περιορισμένη και επιλεκτική. Το έξω 1/3 του αμφ/δή δεν έχει απευθείας αιμάτωση, αλλά τρέφεται και υποστηρίζεται από το ΜΕ, το οποίο μεσολαβεί μεταξύ του αμφιβληστροειδή και των χοριοτριχοειδών (τριχοειδή του αγγειώδη χιτώνα, χοριοειδή). Τα χοριοτριχοειδή έχουν θυριδωτό ενδοθήλιο, επιτρέπουν την ελεύθερη διάχυση και μετακίνηση ουσιών στο συγκεκριμένο επίπεδο (εικόνα 8). Αντίθετα, η μετακίνηση των ουσιών από τα χοριοτριχοειδή προς τον έξω αμφιβληστροειδή μέσω του ΜΕ είναι αυστηρά ελεγχόμενη με μια σειρά διακυτταρικών στενών συνδέσεων και ειδικής μορφολογίας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών των κυττάρων του ΜΕ². Ο έξω ΑΑΦ συνίσταται στις στενές συνδέσεις (tight junctions) μεταξύ των κυττάρων του ΜΕ, όπου δεν επιτρέπουν καμία ελεύθερη μετακίνηση προς τον αισθητηριακό ιστό. Η ομοιότητα του έξω ΑΑΦ με τον ΑΕΦ έχει μελετηθεί λιγότερο από ότι του έσω ΑΑΦ, όμως υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους³.



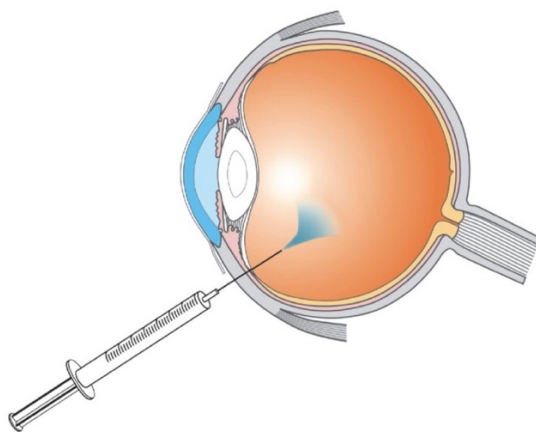
Εικόνα 7: Αματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός (ΑΑΦ): (α) Εσω ΑΑΦ: στενές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών του αμφιβληστροειδικού δικτύου. (β) Εξω ΑΑΦ: στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων του ΜΕ. (Από Forrester JV, Xu H. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol.* 2012;3:338.)



Εικόνα 8: Διαφορά μεταξύ χοριοειδικών και αμφιβληστροειδικών τριχοειδών. Τα τριχοειδή του χοριοειδή έχουν μεγάλα ανοίγματα (60-80nm) που επιτρέπουν τη διέλευση μεγάλων μορίων(π.χ. αλβουμίνη)⁴. Αντίθετα, τα τριχοειδή του αμφιβληστροειδή είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με στενές συνδέσεις που δεν επιτρέπουν τη διέλευση μορίων μεγαλύτερων από 2nm.

Χάρη στην ύπαρξη του ΑΑΦ, ο αμφιβληστροειδής καταφέρνει να διατηρεί την ομοιόσταση του, αλλά και να ανθίσταται σε πιθανές εξωτερικές βλαπτικές επιδράσεις. Ταυτόχρονα όμως, καθίσταται δύσκολη ή και αδύνατη η προσπέλασή του από φάρμακα και άλλες θεραπευτικές ουσίες, όταν η χορήγησή τους γίνεται συστηματικά, όπως στην περίπτωση μεγαλοπεπτιδίων και άλλων μεγαλομοριακών μορίων, που μπλοκάρονται στο επίπεδο του ΑΑΦ, όπως ακριβώς συμβαίνει και στον ΑΕΦ.

Στο παραπάνω πρόβλημα δόθηκε λύση με την εισαγωγή στη θεραπευτική των ενδοϋαλοειδικών εγχύσεων. Η ενδοϋαλοειδική οδός χορήγησης έφερε επανάσταση στη θεραπευτική των αμφιβληστροειδικών παθήσεων καθώς ο αμφιβληστροειδής έγινε πλέον άμεσα προσβάσιμος στα φάρμακα. Κατά την υαλοειδική έγχυση, εναποτίθεται η ουσία με λεπτή βελόνη στον κέντρο της υαλοειδική κοιλότητας, απ' όπου διαχέεται προς τον αμφιβληστροειδή, όπου θα ασκήσει τη δράση της (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση ενδοϋαλοειδικής έγχυσης.

Η ενδοϋαλοειδική οδός χορήγησης έχει γίνει πλέον μέθοδος εκλογής για παθήσεις του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμού, όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, ενώ η εμφάνιση νέων θεραπευτικών παραγόντων για τις αμφιβληστροειδικές παθήσεις περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο φαρμακοτεχνικές μορφές, κατάλληλες για ενδοϋαλοειδική χορήγηση.

1.1.3. Αμφιβληστροειδικές παθήσεις

Παρά την ύπαρξη υψηλά εξειδικευμένων δομών και μηχανισμών με σκοπό την προστασία του, ο αμφιβληστροειδής είναι ένας ευάλωτος ιστός λόγω των μεταβολικών του αναγκών, του μικρού του μεγέθους και της νευρωνικής φύσης του. Οι δομικές βλάβες που υφίσταται είναι (σχεδόν) ανεπανόρθωτες, όπως και στην περίπτωση του εγκεφάλου.

Λόγω του μικρού του μεγέθους, η λειτουργική ικανότητα είναι πολύ συμπυκνωμένη ώστε να είναι σε θέση να επιτελεί την τόσο πολύπλοκη λειτουργία του σε τόσο λίγο διαθέσιμο χώρο. Αρκεί να σημειωθεί ότι ο αμφιβληστροειδής ποσοστιαία είναι υπεύθυνος για το 30% των αισθητηριακών καταχωρήσεων του εγκεφάλου. Συνεπώς, οι αμφιβληστροειδικές παθήσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την εκφύλιση, την ουλοποίηση, την ατροφία ακόμη και περιορισμένης έκτασης περιοχών του ιστού οδηγούν σε σοβαρή λειτουργική έκπτωση με σημαντικές συνέπειες στη ζωή του πάσχοντος ατόμου. Γίνεται λοιπόν αντιληπτή η σπουδαιότητα της πρόληψης και της θεραπείας των αμφιβληστροειδικών παθήσεων.

Ταξινόμηση και παθοφυσιολογία αμφιβληστροειδικών παθήσεων

Οι παθήσεις του αμφιβληστροειδή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν αναλόγως με την αιτιολογία τους ως εξής:

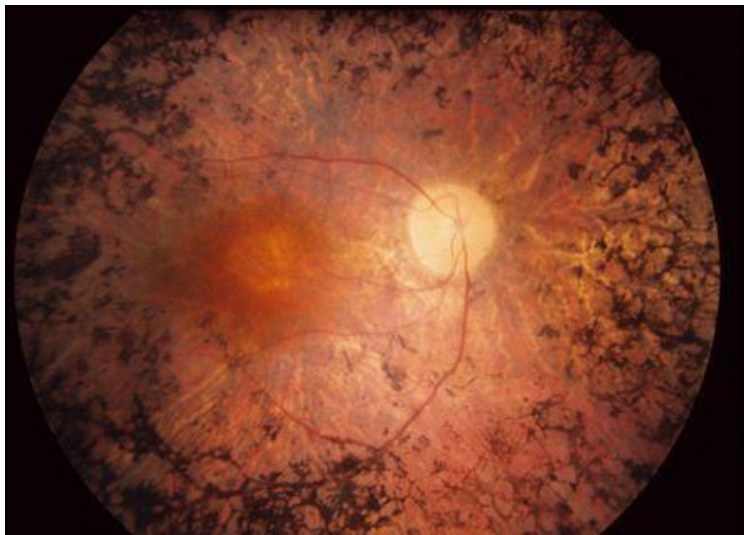
1) *Αγγειακές παθήσεις*. Απόφραξη των μεγάλων αγγείων και των κλάδων τους έχουν ως αποτέλεσμα την αποστέρηση του ιστού από το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά (απόφραξη αρτηρίας, ισχαιμία, υπέρταση) ή / και τη συσσώρευση φλεβικού αίματος μέσα στον ιστό (θρόμβωση φλέβας), εφόσον τα αγγεία του αμφι/δή, όπως τα αντίστοιχα του εγκεφάλου είναι τελικά αγγεία.

Επιπλέον, η διαταραχή της ακεραιότητας ή/και της διαπερατότητας των αγγείων οδηγεί σε αιμορραγίες ή / και σε διήθηση του ιστού από προϊόντα του αίματος (διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, αιματολογικές παθήσεις). Η παρουσία του αίματος και ενδοϊστικού υγρού προκαλεί τελικά εκφύλιση των νευρώνων του αμφιβληστροειδή, καθώς και των φωτοϋποδοχέων.



Εικόνα 10,11: Εικόνα φυσιολογικού αμφιβληστροειδούς (10) και αμφιβληστροειδή ασθενούς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (11).

2) *Εκφυλιστικές παθήσεις του νευροεπιθηλίου*, επίκτητες ή συγγενείς (προϊούσες ή κληρονομούμενες στάσιμες). Η παραγωγή μη φυσιολογικών δομικών και άλλων πρωτεϊνών των φωτοϋποδοχέων αλλά και των κυττάρων των υπόλοιπων στιβάδων του αμφ/δής (έσω στιβάδες, πχ δίπολα κύτταρα, γαγγλιακά κύτταρα, κύτταρα Muller) επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο ή τη δυσλειτουργία του κυττάρου, με αποτέλεσμα την ελαττωματική λειτουργία του ιστού και τη μείωση της όρασης. Παράδειγμα αποτελεί η Μελαγχρωστική Αμφιβληστροειδοπάθεια (εκφύλιση των ραβδίων αρχικά και των κωνίων στη συνέχεια), η δυστροφία των κωνίων, η τηλαγγειεκτασία τύπου 2 (εκφύλιση των κυττάρων Muller).



Εικόνα 12: Εκφυλιστικές παθήσεις του νευροεπιθηλίου.

3) Φλεγμονές. Λοιμώδεις ή μη παράγοντες μπορεί να πυροδοτήσουν την εμφάνιση μιας οφθαλμικής φλεγμονής, ενώ η συμμετοχή του αμφιβληστροειδή μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Η πρώτη περίπτωση, όπου η φλεγμονή αφορά τον αμφιβληστροειδή αποκλειστικά (αμφιβληστροειδίτιδα/αγγειίτιδα), είναι λιγότερο συχνή και οι επιπτώσεις της μπορεί είναι καταστροφικές για την όραση εφόσον εμπλέκεται η ωχρά κηλίδα.

Στη δεύτερη περίπτωση, που είναι και η πιο συχνή, η συμμετοχή του αμφιβληστροειδή συμβαίνει δυτεροπαθώς λόγω φλεγμονής των γειτονικών ιστών και έκκλησης φλεγμονωδών παραγόντων που έχουν σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή του ΑΑΦ και την εμφάνιση αμφιβληστροειδικού οιδήματος (φλεγμονώδες κυστικό οίδημα της ωχράς σε χρόνια πρόσθια ραγοειδίτιδα, χοριοειδίτιδες, νευροαμφιβλοστροειδίτιδες κλπ).



Εικόνα 13: Λοίμωξη του αμφιβληστροειδή (αμφιβληστροειδίτιδα) από Κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus, CMV) σε ασθενή HIV+.

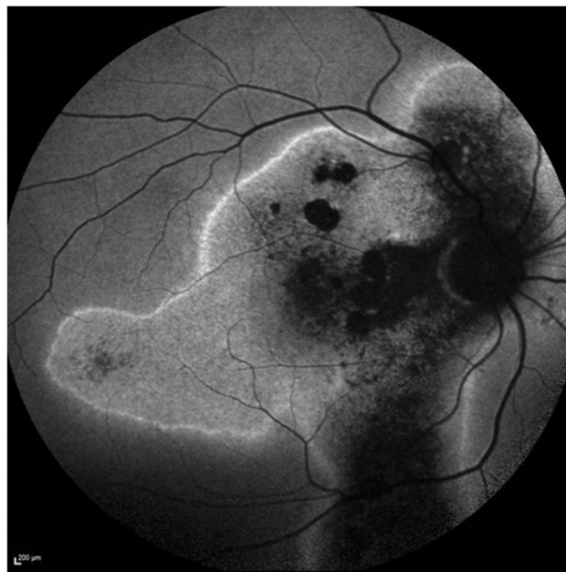
4) Τραύμα. Στην περίπτωση διαμπερούς τραυματισμού του οφθαλμού, μπορεί να συμμετέχει και ο αμφιβληστροειδής, ενώ κλειστά τραύματα μπορούν να προκαλέσουν «διάσειση» του αμφιβληστροειδικού ιστού (commotio retinae) και κατά συνέπεια εμφάνιση οιδήματος, λόγω της μεταφοράς της δύναμης κατά την κρούση. Τραυματισμός του αμφιβληστροειδή μπορεί να προκληθεί και από το φως, εφόσον υπάρξει εστίαση της ακτινοβολίας επάνω στον ιστό (ηλιακό έγκαυμα, έγκαυμα από laser). Ενδοφθάλμια αίτια μπορούν επίσης να είναι πηγές τραυματισμού, όπως η πρόκληση των ρωγμών κατά την αποκόλληση του υαλοειδούς σώματος. Η αποκόλληση του αμφιβληστροειδή αποτελεί πιθανή εξέλιξη μιας ρωγμής του αμφιβληστροειδή. Σε αυτή την περίπτωση, ο αμφιβληστροειδής αποκολλάται από το ΜΕ και η απώλεια της λειτουργίας του μπορεί να είναι από μερική ως καθολική, ακόμα και μετά από την ανατομική αποκατάσταση του ιστού.



Εικόνα 14: Αποκόλληση αμφιβληστροειδή με μεγάλη ρωγμή.

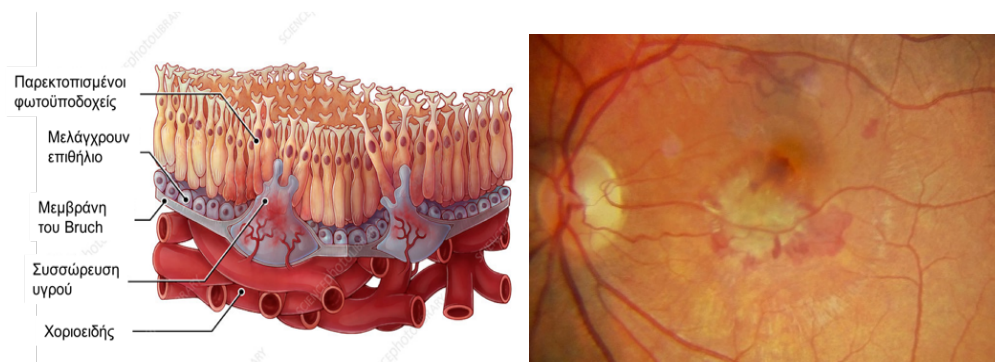
5) *Παθήσεις του μελάγχρου επιθηλίου.* Βλάβη του μελαγχρόου επιθηλίου είναι ζημιογόνος για τη λειτουργία του αμφιβληστροειδή, γιατί το ΜΕ είναι ο χιτώνας που τρέφει και στηρίζει το νευροαισθητήριο αμφιβληστροειδή, ενώ απομακρύνει τα μεταβολικά αποπροϊόντα της λειτουργίας του και προστατεύει τους φωτοϋποδοχείς από τις βλαπτικές επιδράσεις ουσιών που φτάνουν στον «σπογγώδη» χοριοειδή με την κυκλοφορία (έξω ΑΑΦ).

Βλάβη του ΜΕ συνεπάγεται τη διαταραχή του φραγμού και την απώλεια του ομοιοστατικού μηχανισμού του ιδίως αμφιβληστροειδή, με αποτέλεσμα αντίστοιχης έκτασης βλάβης και του ιδίου. Όταν η απώλεια ΜΕ είναι μόνιμη, θα επέλθει τελικά απώλεια των φωτοϋποδοχέων και κατά συνέπεια της όρασης.



Εικόνα 15: Κεντρική ορρώδης αμφιβληστροειδοπάθεια. Χαρακτηριστικό παραδειγμα πάθησης του μελαγχρόου επιθηλίου

6) *Μικτές*. Σπάνια η αιτιολογία μιας πάθησης είναι μονήρης. Συνήθως, πολλαπλοί παράγοντες συμμετέχουν, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της πάθησης. Για παράδειγμα, η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (ΗΕΩ), όπου οι γενετικοί παράγοντες (όπως το φύλλο, η έκφραση γονιδίων), μαζί με περιβαλλοντικούς (όπως κάπνισμα, διατροφή) και τοπικούς στον ιστό (ισχαιμία) έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη νεοαγγειακών σχηματισμών, οι οποίοι διαταράσσουν τον έξω ΑΑΦ (ΜΕ) και προκαλούν την εκφύλιση και καταστροφή του αμφιβληστροειδή (της ωχράς κηλίδας κατά κύριο λόγο).



Εικόνα 16: Ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδας.

Ανεξαρτήτως της αιτιολογίας, οι μηχανισμοί που οδηγούν τελικά στην καταστροφή του ιστού είναι συγκεκριμένοι και αφορούν είτε στη *νέκρωση* (φλεγμονή, τραύμα), είτε στην *απόπτωση* και *αυτοφαγία* (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), είτε σε *μικτού τύπου* διαδικασίες.

Στην πρώτη περίπτωση, ο ιστός υπόκειται σε αυτόλυση εξαιτίας των εξωτερικών παραγόντων όπως τοξίνες, φλεγμονή, τραυματισμός, οπότε η θεραπευτική παρέμβαση είναι εφικτή και στοχεύει στην πρόληψη ή στην αντιμετώπιση του βλαπτικού παράγοντα.

Απόπτωση και νευρο-αμφιβληστροειδικές παθήσεις

Στη δεύτερη περίπτωση, όταν η καταστροφή του ιστού προέρχεται από έναν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όπως για παράδειγμα στις περισσότερες κληρονομούμενες εκφυλιστικές παθήσεις του βυθού αλλά και στις μικτού τύπου περιπτώσεις, όπως η αποκόλληση του αμφιβληστροειδή και το τραύμα, οι θεραπευτικές δυνατότητες παραμένουν ακόμα περιορισμένες.

Ενώ η γνώση γύρω από τους μηχανισμούς της απόπτωσης συνεχώς αυξάνεται, οι παράγοντες που ενεργοποιούν τη διαδικασία αυτή δεν είναι ακόμα πλήρως διασαφηνισμένοι. Για το λόγο αυτό, οι παθήσεις οι οποίες έχουν ως κεντρική παθοφυσιολογική διαδικασία τη διαδικασία της απόπτωσης, παραμένουν χωρίς αιτιολογική θεραπεία, όπως ισχύει και για αντίστοιχες παθήσεις του ΚΝΣ (ALS, Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's, ισχαιμικό τραύμα). Η αντιμετώπισή τους συνίσταται σε συμπτωματικές παρεμβάσεις, όπου ο ασθενής ανακουφίζεται από το σύμπτωμα της νόσου του, όμως δε διακόπτεται η εξέλιξή της ή σε θεραπείες αναστολής της διαδικασίας της απόπτωσης. Οι τελευταίες είναι στοχευμένες θεραπείες, όπου παρόλο που δε σταματούν την εξέλιξη της νόσου, αποσκοπούν στο να παρέμβουν στο βασικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό της πάθησης, διασώζοντας το κύτταρο από τον επερχόμενο θάνατο και κατά συνέπεια διαφυλάσσοντας τη λειτουργική ικανότητά του.

Εξαιτίας του ολοένα αυξανόμενου προσδόκιμου επιβίωσης στο δυτικό κόσμο, έχει αυξηθεί δραματικά η εμφάνιση των προαναφερθέντων νευροεκφυλιστικών παθήσεων, αλλά και κακοηθειών. Όσο αποσαφηνίζονται οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί εμφάνισης των παραπάνω, γίνεται εμφανής ο ρόλος της απόπτωσης στην ανάπτυξή τους. Η ανάπτυξη μοριακών φαρμάκων που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια αναστολής ή διέγερσης του κυτταρικού θανάτου αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εκλεκτική αντιμετώπιση των παραπάνω παθήσεων.

Φάρμακα που αναστέλλουν την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 πρωτεΐνη) έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις αιματολογικές κακοήθειες⁵ και κάποια όπως το venetoclax, ένας εξειδικευμένος αναστολέας της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 έχουν εγκριθεί για τη χρήση τους σε αιματολογικούς καρκίνους όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία⁶.

Για την περίπτωση των αμφιβληστροειδικών εκφυλιστικών παθήσεων, η ελλιπής γνώση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών σε συνδυασμό με την ασυμφωνία συχνά μεταξύ εργαστηριακών και κλινικών μελετών, δεν έχει οδηγήσει ακόμα σε εγκεκριμένα αντι-αποπτωτικά φάρμακα. Γνωστά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η κουρκουμίνη, το συνένζυμο Q10, η N-ακετυλοκυστεΐνη, η citicoline, έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των μελετητών, χωρίς όμως να αποτελούν εγκεκριμένη θεραπεία για κάποια νευροεκφυλιστική πάθηση του αμφιβληστροειδή. Ωστόσο, κάθε φορά που μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ανακαλύπτεται να εμπλέκεται στα μονοπάτια του νευρωνικού θανάτου, εμφανίζεται μια καινούρια ευκαιρία ανάπτυξης νέων μορίων με πιθανή νευροπροστατευτική δράση⁷⁻⁸.

1.2. Ενδογενής νευροπροστασία

1.2.1. Νευροτροφίνες

Φυσιολογικά, στους ιστούς ΚΝΣ (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή), το ρόλο της ενδογενούς ρύθμισης της απόπτωσης τον κατέχουν οι νευροτροφίνες (NGF, BDNF, CNTF, NT-3 και NT-4), οι οποίες ρυθμίζουν την ομοιόσταση του ιστού με την αντι-αποπτωτική και τη νευροπροστατευτική τους δράση. Στο ώριμο νευρικό σύστημα, ελέγχουν τη συναπτική λειτουργία και τη συναπτική πλαστικότητα, ενώ συνεχίζουν να ρυθμίζουν την επιβίωση των νευρώνων, μέσω αποφάσεων για τη μοίρα των κυττάρων, την ανάπτυξη των νευραξόνων και των δενδριτικών διακλαδώσεων και την έκφραση πρωτεϊνών καθοριστικών για τη φυσιολογική νευρωνική λειτουργία, όπως οι νευροδιαβιβαστές και τα κανάλια ιόντων⁹.

Στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών παθήσεων, οι νευροτροφίνες μειώνονται σημαντικά στον ιστό, ενώ η εξωγενής χορήγησή τους, συναντά σημαντικές δυσκολίες εφόσον φιλτράρονται από τους φραγμούς, λόγω του μεγάλου Μοριακού Βάρους τους (μεγαλομοριακές ενώσεις με MB χιλιάδων kD).

Εκτός από τις νευροτροφίνες, σημαντικό ρόλο στην νευροπροστασία έχει βρεθεί πως παίζουν τα νευροστεροειδή¹⁰⁻¹³. Ο όρος νευροστεροειδή σχετίζεται με το γεγονός ότι έχει διαπιστωθεί η ενδογενής παραγωγή τους στο ΚΝΣ, εκτός από το συνηθισμένο τόπο παραγωγής τους, που είναι τα επινεφρίδια και οι γονάδες¹⁴.

1.2.2. Νευροστεροειδή

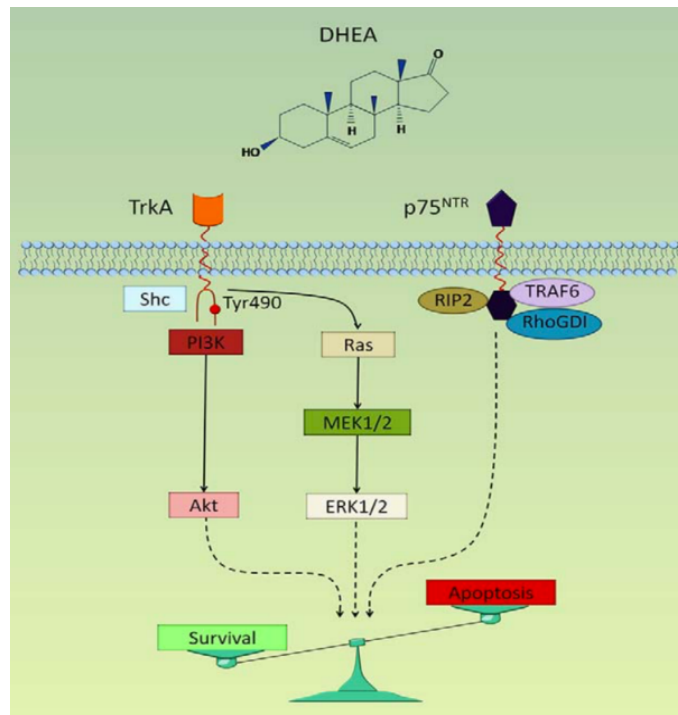
Τα κυριότερα νευροστεροειδή είναι η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), η πρεγνενολόνη (PREG), τα θειικά ανάλογα τους (DHEAS, PREGS), η προγεστερόνη (PROG), η δεοξυκορτικοστερόνη και κάποιοι μεταβολίτες τους. Όλα τα παραπάνω έχουν ανιχνευτεί και στον αμφιβληστροειδικό ιστό, ως ενδογενώς παραγόμενα¹⁵. Από την ανακάλυψή τους, έχει μελετηθεί εκτενώς η βιολογική τους δράση και έχει διαπιστωθεί η σημασία τους στην νευρογένεση, τη νευροπροστασία και στον έλεγχο της φλεγμονής στο ΚΝΣ¹⁶.

1.2.2.1. DHEA

Το πιο άφθονο και καλύτερα μελετημένο από τα νευροστεροειδή με ποικίλες δράσεις αλλά και κλινικές εφαρμογές είναι η DHEA. Αποτελεί ένα πολυδύναμο στεροειδές, καθώς εμφανίζει πολλαπλές δράσεις: αποτελεί το πρόδρομο μόριο των ορμονών του φύλλου και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του καρδιαγγειακού συστήματος, του μυοσκελετικού συστήματος, του ανοσοποιητικού συστήματος και του ΚΝΣ.

Η DHEA ως νευροστεροειδές, δρα νευρογενετικά και νευροπροστατευτικά. Η αντι-αποπτωτική δράση της επιτελείται είτε μέσω της έμμεσης ρύθμισης αντι-αποπτωτικών μηχανισμών (NMDA, excitotoxicity, με απευθείας σύνδεση στον NMDA-R ή με GABAα modulation) και πρωτεϊνών [μείωση αποπτωτικών πρωτεϊνών (caspase-3, bax) και της θετικής της επίδρασης επί των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (bcl family)], είτε με απευθείας σύνδεση στους υποδοχείς μιας εκ των τριών νευροτροφινών, του NGF (Nerve Growth Factor)¹⁷.

Οι υποδοχείς στους οποίους έχει βρεθεί ότι συνδέεται η DHEA είναι ο trkA (tropomyosin receptor kinase A) και ο p75^{NTR} (p75 neurotrophin receptor, αρχικά γνωστός ως low affinity nerve growth factor receptor, LNGFR), ενώ η ισορροπία στην αναλογία της έκφρασης των δύο υποδοχέων ρυθμίζει το αποτέλεσμα της δράσης του συνδεόμενου μορίου. Παρουσία του trkA, η σύνδεση της DHEA στους δύο υποδοχείς προωθεί την νευροπροστασία και την επιβίωση του νευρικού κυττάρου, ενώ απουσία του trkA, ο p75^{NTR} ενεργοποιεί τα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 17: DHEA και διαμεμβρανική σύνδεση και δράση. Από Lazaridis I, Charalampopoulos I, Alexaki VI, et al. Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS Biol.* 2011;9(4):e1001051.)

Η απευθείας σύνδεση της DHEA στους trkA, p75^{NTR} υποδοχείς, έδειξε το βασικό μηχανισμό δράσης της ένωσης ως νευροπροστατευτικό μόριο και επιβεβαίωσε τη

σημασία της ως ρυθμιστικό παράγοντα της ανάπτυξης και της αναγέννησης στο ΚΝΣ. Η DHEA έχει νευροπροστατευτική δράση και στον αμφιβληστροειδή, όπως ήταν αναμενόμενο^{12,18,19}.

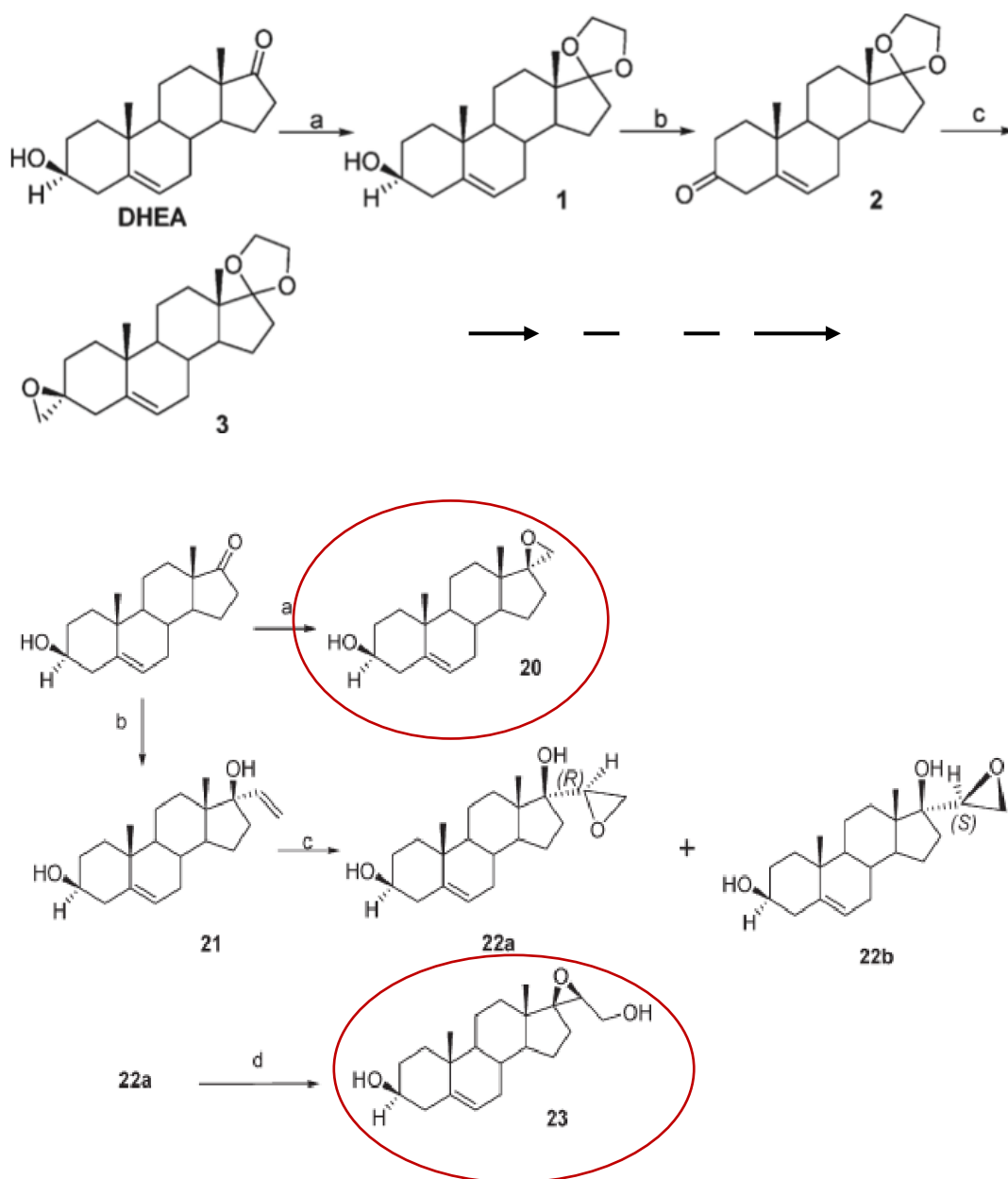
Η νευροπροστατευτική δράση της σχετίζεται με τη σύνδεσή της στο trkA υποδοχέα όπως απέδειξαν οι Kokona et al¹², ο οποίος εκφράζεται από κύτταρα του έσω αμφιβληστροειδή (έσω πυρηνική στιβάδα, στιβάδα γαγγλιακών κυτταρων), αναδεικνύοντας το μόριο ως πιθανό θεραπευτικό παράγοντα σε οφθαλμικές παθήσεις σχετιζόμενες με την ισχαιμία, όπως για παράδειγμα η Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια, η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας και το γλαύκωμα.

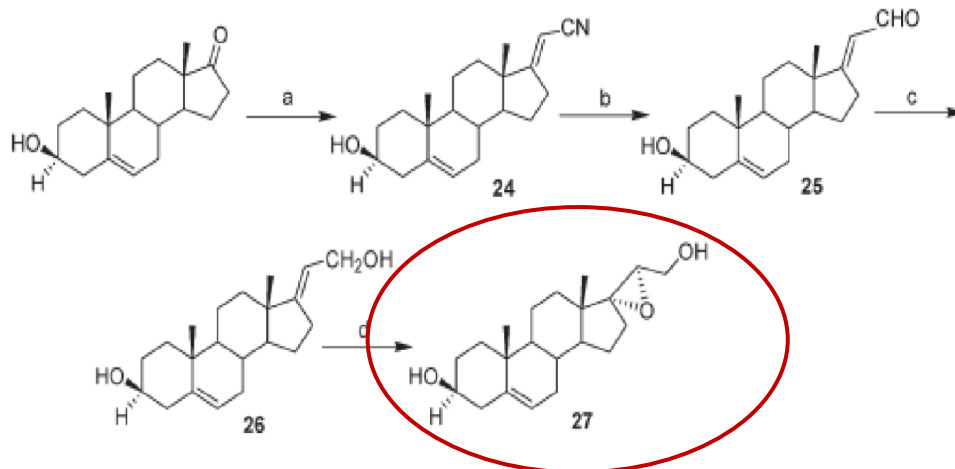
Παρά τις πολλαπλές ευεργετικές της ιδιότητες, η DHEA εμφανίζει ένα σημαντικό μειονέκτημα στη θεραπευτική χρήση της. Συγκεκριμένα ο μεταβολισμός που υφίσταται αναπόφευκτα σε οιστρογόνα και ανδρογόνα, εφόσον είναι το φυσιολογικό τους πρόδρομο μόριο, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών που σχετίζονται με αυτά, όταν λαμβάνεται συστηματικά.

Μάλιστα, έχει συσχετιστεί η λήψη της με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ορμονο-εξαρτώμενων νεοπλασιών (μαστός, προστάτης), με παρουσία καρδιαγγειακών νοσημάτων, νευροψυχιατρικών διαταραχών και την αυξημένη αντίσταση σε ινσουλίνη²⁰⁻²⁶. Από την άλλη πλευρά, τα ανάλογα της DHEA, χωρίς την προαναφερθείσα ενδοκρινική δράση, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδιαφέροντες υποψήφιους μικρομοριακούς νευροπροστατευτικούς παράγοντες.

1.3. Συνθετικές μικρονευροτροφίνες- BNNs

Με την αξιοποίηση των ιδιοτήτων της DHEA, οι ερευνητές του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και του Ιατροβιολογικού Ινστιτούτου της Ακαδημίας Αθηνών, ανέπτυξαν στο εργαστήριο μια σειρά συνθετικών C-17σπироxy-αναλόγων της DHEA, που διατηρούν τη νευροπροστατευτική δράση της ενώ στερούνται της ικανότητας σύνδεσης στους υποδοχείς των οιστρογόνων και των ανδρογόνων, κατ' επέκταση δεν εμφανίζουν τις αντίστοιχες ανεπιθύμητες ενέργειες²⁷.





Εικόνα 18: Σειρά συνθετικών C-17spiroxy- αναλόγων της DHEA.(Από Calogeropoulou T, Avlonitis N, Minas V, et al. Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *J Med Chem.* 2009;52(21):6569-6587.)

Τα νεοσυντεθειμένα μόρια ονομάστηκαν **BNN** και τρία εξ' αυτών, τα **BNN20** (17β-spiro[5-androstene-17, 2⁰-oxiran]-3β-ol), **BNN23** ((20S)-3β,21-dihydroxy-17β,20-epoxy-5-pregnene) και **BNN27** ((20R)-3β,21-dihydroxy- 17R,20-epoxy-5-pregnene) βρέθηκαν να έχουν *in vitro* σημαντική αντι-αποπτωτική δράση στην πρώτη σειρά των πειραμάτων. Έκτοτε, ακολούθησε μια σειρά από μελέτες με τα εν λόγω μόρια, οι οποίες απέδειξαν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες τους. Το μικρό μέγεθος τους και η ικανότητά τους να ρυθμίζουν την επιβίωση νευρικών κυττάρων, όπως οι μεγαλομοριακές νευροτροφίνες, οδήγησε στην ονομασία τους ως **μικρονευροτροφίνες (MNT)**.

1.3.1. BNN και ΑΕΦ

Σε πρώτο στάδιο, τα 3 BNN μόρια ελέγχθηκαν σε μοντέλο που προσομοιάζει τον ΑΕΦ και αποδείχτηκε πως είναι ικανά να διαπερνούν τέτοιου είδους μεμβράνες *in vitro* χωρίς παλινδρόμηση²⁸. Στην ίδια μελέτη, μελετήθηκε εκτενέστερα το BNN27, το οποίο μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση στον επίμου, ανιχνεύτηκε στον εγκέφαλο ύστερα από 30 λεπτά.

Οι *in vivo* μετρήσεις του BNN27 στον εγκέφαλο συμπληρώνουν τα *in vitro* δεδομένα της ίδιας μελέτης, ως προς την κινητικότητα του μορίου διαμέσου των μεμβρανών οι οποίες προσομοιάζουν τον ΑΕΦ, ενισχύοντας σημαντικά τη θεωρητική υπόθεση πως τα μόρια BNN διαπερνούν τους αιματο-ιστικούς φραγμούς (ΑΕΦ, ΑΑΦ), χάρη στο μικρό μέγεθος και τη λιποφιλικότητά τους, χαρακτηριστικά που περιγράφουν μόρια που διαπερνούν με τη διάχυση τις κυτταρικές μεμβράνες.

Έκτοτε το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στο BNN27, το οποίο αποτέλεσε και το αντικείμενο της παρούσας διατριβής. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα γύρω από τη νευροπροστατευτική δράση του BNN20, έχει επίσης δώσει ορισμένα θετικά αποτελέσματα^{29,30}.

1.4. BNN27

Το BNN27 ((20R)-3β,21-dihydroxy- 17R,20-epoxy-5-pregnene) αποδείχτηκε ότι ασκεί τη βιολογική δράση του συνδεδεμένο στους υποδοχείς *trkA* και *p75^{NTR}*^{31,32} του NGF, όπως και το πρόδρομό του μόριο, η DHEA. Ο τρόπος δράσης του BNN27, σε συνδυασμό με τη μη σύνδεσή του στους υποδοχείς των ορμονών του φύλλου, το καθιστούν πολύτιμο υποψήφιο ως θεραπευτικό παράγοντα για τις εκφυλιστικές παθήσεις του ΚΝΣ (συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδή).

Το BNN27 έχει δοκιμαστεί σε μια σειρά *in vitro* & *in vivo* πειραματικών μοντέλων νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως η Alzheimer's³³, η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)³⁴, τα απομυελινωτικά νοσήματα³⁵, αλλά και σε μοντέλα νευροψυχιατρικών παθήσεων³⁶⁻³⁸, φλεγμονωδών παθήσεων^{39,40} και σε μοντέλα πόνου⁴⁰, παθήσεις όπου η DHEA έχει γνωστά ευεργετικά αποτελέσματα.

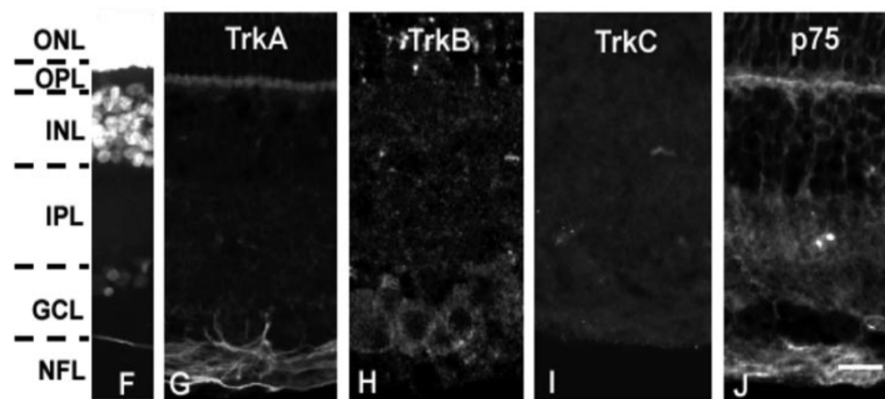
Τα αποτελέσματα ποικίλουν, ωστόσο είναι σαφές πως το BNN27 εμφανίζει μία σημαντική νευροπροστατευτική δράση, με δόσοεξαρτώμενο χαρακτήρα και χωρίς την ενδοκρινική δράση. Εκτός από τις εκφυλιστικές παθήσεις του ΚΝΣ, το BNN27 μελετήθηκε και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα αμφιβληστροειδικών παθήσεων, καθώς είναι γνωστό ότι στον αμφιβληστροειδή εκφράζονται οι δύο υποδοχείς του NGF, στους οποίους συνδέεται το BNN27⁴¹.

Σε *in vivo* μελέτη του αμφιβληστροειδή χοίρου, ο *trkA* έχει βρεθεί να εκφράζεται στη στιβάδα των νευρικών ινών και των γαγγλιακών κυττάρων, στα αστρογλοιακά κύτταρα, ενώ ο *p75^{NTR}* φαίνεται να εκφράζεται σε όλη την έκταση του αμφιβληστροειδή, στα κύτταρα Muller. Στον αμφιβληστροειδή των τρωκτικών (ποντικός, αρουραίος), τα

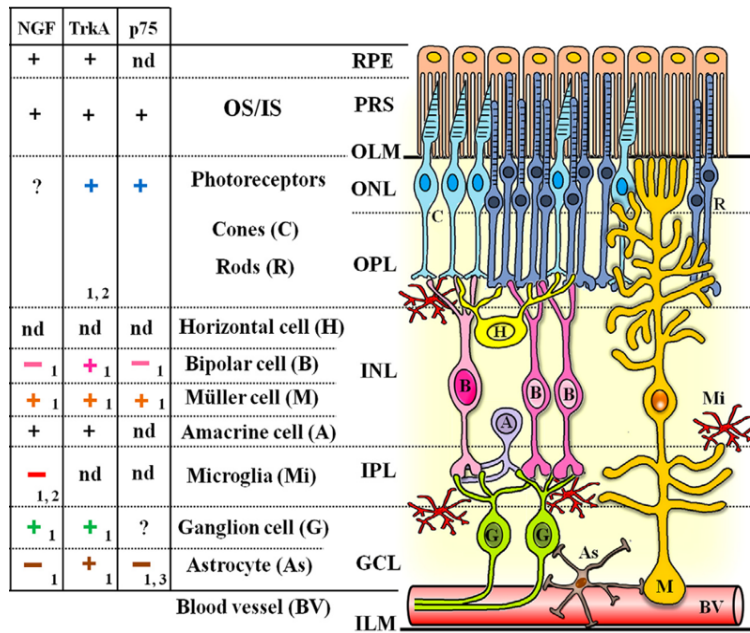
οποία αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στα *in vivo* πειραματικά μοντέλα των αμφιβληστροειδοπαθειών, η κατανομή των υποδοχέων του NGF δε διαφέρει σημαντικά⁴².

Ο υποδοχέας *trkA* φαίνεται να εκφράζεται στα γαγγλιακά κύτταρα, στις προσεκβολές των κυττάρων Müller, καθώς και στην εσώτατη μοίρα της INL, ενώ ο *p75^{NTR}* φαίνεται να εκφράζεται στα κύτταρα Muller αλλά και στις προσεκβολές τους, κατά μήκος όλου του αμφιβληστροειδή.

Στο επίπεδο των φωτοϋποδοχέων, η έκφραση του υποδοχέα *trkA* είναι αμφιλεγόμενη μεταξύ των ερευνητών, ενώ η έκφραση του *p75^{NTR}* περιγράφεται τόσο για τον αρουραίο, όσο για τον ποντικό⁴³.



Εικόνα 19: Κατανομή των υποδοχέων των νευροτροφινών στον αμφιβληστροειδή του ενήλικα χοίρου με ανοσοϊστοχημική μελέτη. (F) Χρώση για διάκριση των πυρηνικών σιβάδων (DAPI). (G) *TrkA*: έσω αμφιβληστροειδικές σιβάδες (σιβάδα των νευρικών ινών (NFL) και των γαγγλιακών κυττάρων (GCL), (J) *p75*: κατά μήκος όλου του αμφιβληστροειδή. (Από García M, Forster V, Hicks D, Vecino E. *In vivo* expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(10):4532-4541.)



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης των υποδοχέων TrkA και p75 στον αμφιβληστροειδή ενήλικων τρωκτικών (ποντικού και του αρουραίου). (Από Garcia TB, Hollborn M, Bringmann A. Expression and signaling of NGF in the healthy and injured retina. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;34:43-57)

Παράλληλα, το BNN27 έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε δύο μοντέλα της αμφιβληστροειδοπάθειας, όπου εμπλέκονται αποπτωτικοί μηχανισμοί με ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Ένα μοντέλο εκφύλισης του έσω αμφιβληστροειδή, είναι της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (ΔΑ) σε επίμυες^{44,45} και ένα μοντέλο της εκφύλισης του έξω αμφιβληστροειδή, αποτελεί της αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή σε μυς⁴⁶.

Το μόριο δόθηκε ενδοπεριτοναϊκά και στις δύο περιπτώσεις^{44,46}. Επιπλέον, στην περίπτωση της ΔΑ, πραγματοποιήθηκε μία δεύτερη μελέτη, η οποία διερεύνησε την αποτελεσματικότητα της μικρονευροτροφίνης, μετά από τοπική χρήση, με οφθαλμικές σταγόνες⁴⁵.

Χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεκριμένες μελέτες, πολλαπλές δόσεις του BNN27 σε πολλαπλές συχνότητες χορήγησης και μελετήθηκαν με μεγάλη λεπτομέρεια οι επιδράσεις της μικρονευροτροφίνης στην έκφραση των NGFR και στη βιολογική δράση της, σε διάφορες στιβάδες του αμφιβληστροειδή. Τα αποτελέσματα ήταν συμπληρωματικά για κάποιες πτυχές της δράσης του BNN27 και αντικρουόμενα για ορισμένες άλλες.

Πιο συγκεκριμένα, στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, στους αλφικούς αρουραίους, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, το BNN27 φάνηκε να δρα προστατευτικά σε δόση των 10 και των 50mg/kg β.σ., αλλά όχι σε δόση 2mg/kg β.σ. Χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες αμφιβληστροειδικής έκφρασης του έσω αμφιβληστροειδή (τα αμακρινικά και τα γαγγλιακά κύτταρα), των κυττάρων της γλοίας (κύτταρα Muller και μικρογλοιακά κύτταρα), καθώς και τα επίπεδα κυτοκινών, προ- και αντι-φλεγμονωδών.

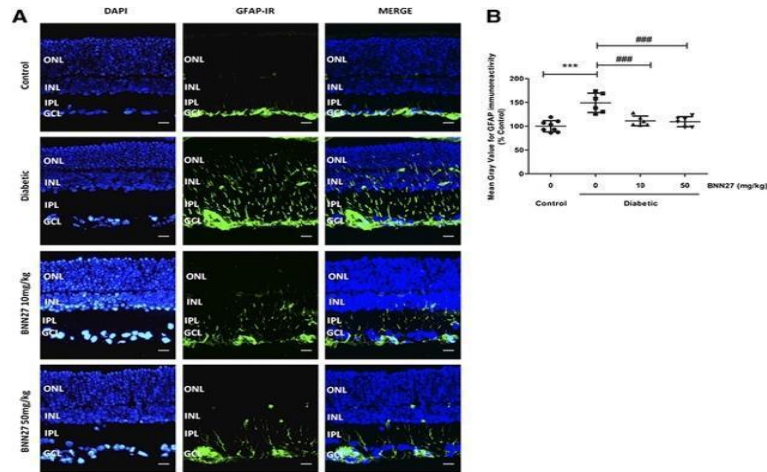
Το BNN27 φάνηκε να αναστέλλει τη μείωση των δεικτών την οποία προκαλεί ο διαβήτης, τόσο κατά την εμφάνισή του, όσο και στην εγκατεστημένη μορφή του. Η προστατευτική του δράση φάνηκε να την ασκεί αυξάνοντας τα επίπεδα του υποδοχέα TrkA και μειώνοντας τα επίπεδα του υποδοχέα p75, τα οποία αυξάνονται στον διαβητικό αμφιβληστροειδή. Ουσιαστικά, επιβεβαιώθηκε ο τρόπος δράσης του BNN27, μέσω ρύθμισης της έκφρασης των υποδοχέων του NGF και στον έσω αμφιβληστροειδή, όπως και σε άλλες περιπτώσεις στο ΚΝΣ.

Από τις τρεις δοσολογίες που μελετήθηκαν, φάνηκε μια δόσοεξαρτώμενη σχέση στη νευροπροστατευτική δράση του, με τις δύο μεγαλύτερες δόσεις να εμφανίζουν παρόμοια αποτελεσματικότητα. Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισε η τοπική χρήση του BNN27, στην ίδια δοσολογία σε μορφή των οφθαλμικών σταγόνων.

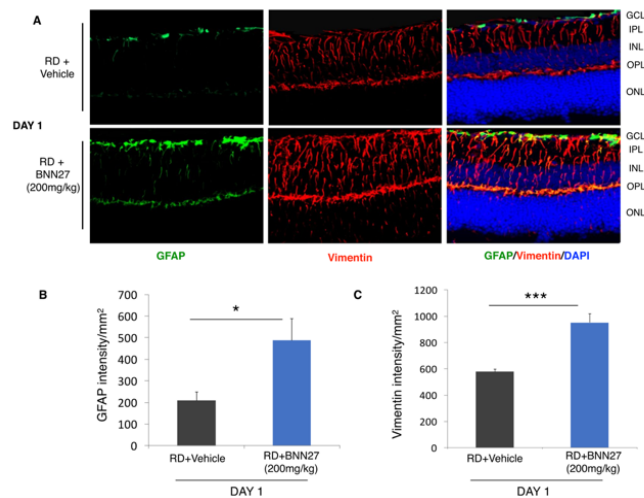
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η νευροπροστατευτική δράση του μορίου ήταν αναλογική της χορηγούμενης δόσης. Ταυτόχρονα, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του BNN27 φάνηκε να εμφανίζει μία δοσοεξαρτώμενη αντιφλεγμονώδη δράση στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια του αρουραίου. Αφενός με την καταστολή της υπεραύξησης της γλοίας και αφετέρου με την υπερρύθμιση αντιφλεγμονωδών (IL-10 και IL-4) και καταστολή φλεγμονωδών (TNF-α και IL-1β) κυτοκινών. Η ανώτερη δόση (50mg/kg β.σ.) φάνηκε να εμφανίζει συνολικά την πιο σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση στο συγκεκριμένο μοντέλο.

Παράλληλα, στο μοντέλο της αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή στον ποντικό C57BL/6, που είναι ένα καλά μελετημένο μοντέλο εκφύλισης του έξω αμφιβληστροειδή (φωτοϋπόδοχείς), τα αποτελέσματα αποδείχθηκαν μικτά. Στο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε τετραπλάσια δόση από την ανώτερη, η οποία χρησιμοποιήθηκε στο μοντέλο της ΔΑ σ' ένα μικρότερο ζώο, της ίδιας οικογένειας, επομένως με μικρότερο όγκο κατανομής.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η προστασία του έξω αμφιβληστροειδή δεν επιβεβαιώθηκε, τόσο στη μέγιστη δόση των 200mg/kg β.σ. όσο σε μικρότερες δόσεις ελέγχου των 100, 50 και 10 mg/kg. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μία αύξηση των παραγόντων φλεγμονής, οι οποίοι ελέγχθηκαν (προσέλκυση μακροφάγων και αύξηση των δεικτών ενεργοποίησης των αστροκυττάρων και των κυττάρων Muller). Το παραπάνω γεγονός έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της μελέτης του μοντέλου της ΔΑ με μια πρώτη ματιά.



Εικόνα 21: Δοσοεξαρτώμενη καταστολή της υπερέκφρασης GFAP από τα κύτταρα της γλοίας στο μοντέλο ΔΑ. (Από Ibán-Arias R, Lisa S, Mastrodimou N, et al. The Synthetic Microneurotrophin BNN27 Affects Retinal Function in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes*. 2018;67(2):321-333.)



Εικόνα 22: Αύξηση της GFAP μετά από ip χορήγηση 200mg/kg BNN27 σε μύες, στο μοντέλο αμφιβληστροειδικής αποκόλλησης. (Από Tsoka P, Matsumoto H, Maidana DE, et al. Effects of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, on experimental retinal detachment-induced photoreceptor cell death. *Sci Rep*. 2018;8(1):10661.)

Το BNN27 ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των στεροειδών, τα οποία είναι παραδεκτό ότι έχουν εξαιρετικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ωστόσο με σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες σε περίπτωση υπερδοσολογίας ή παρατεταμένης χρήσης (Σύνδρομο Cushing, διαβήτη επαγόμενος από στεροειδή κ.ά.). Εξάλλου, οι περισσότερες ορμόνες, μπορούν να μετατραπούν από ευεργετικές σε επιβλαβείς, με μικρές μόνο αλλαγές στις συγκεντρώσεις τους.

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια και τους ιστούς, κατά συνέπεια οι επιτελούμενες δράσεις εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από τις συγκεντρώσεις τους στο αίμα, στο όργανο και στον ιστό-στόχο, ενώ μικρές μεταβολές τους προκαλούν σημαντικές μεταβολές στη λειτουργία του οργάνου στόχου, στις περισσότερες περιπτώσεις. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη πως το BNN27 είναι ένα στεροειδές ανάλογο, τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν αντιτίθενται απαραίτητα στα ευρήματα της μελέτης για την ΔΑ, αλλά ενδεχομένως τα συμπληρώνουν, προσθέτοντας πληροφορία σε σχέση με την αντίδραση του νευρικού ιστού, στην έκθεσή του σε υψηλές συγκεντρώσεις του στεροειδούς μορίου.

Αδιαμφισβήτητα, χρειάζεται να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση του ακριβή ρόλου του BNN27 σε οποιοδήποτε στάδιο της αντιφλεγμονώδους διαδικασίας και της διάσωσης των νευρώνων του αμφιβληστροειδή. Ωστόσο, συνολικά τα συμπεράσματα που βγήκαν από τις δύο μελέτες συνάδουν με το γεγονός ότι πρόκειται για μόριο το οποίο έχει θέση στη θεραπευτική των αμφιβληστροειδικών παθήσεων, ενώ εμφανίζει δόσο-εξαρτώμενη επίδραση στον ιστό, έπειτα από συστηματική χορήγηση.

Με αφετηρία τα παραπάνω, το θέμα της παρούσας διατριβής κρίνεται ως κρίσιμο, εφόσον η περιγραφή των ποσοτικών και φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών του μορίου,

μετά από συστηματική και τοπική χορήγηση και ο καθορισμός πιθανών ορίων στη χορηγούμενη δόση, πριν την εμφάνιση της τοξικότητας, μπορούν να συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση των χορηγούμενων δοσολογικών σχημάτων του BNN27, σε μελλοντικές μελέτες.

2. Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)

2.1. Γενικά

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια αναλυτική τεχνική ευρύτατα διαδεδομένη σε πολλούς τομείς της έρευνας και της τεχνολογίας λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας που τη διακρίνει στο να ανιχνεύει άγνωστα μόρια και να τα διαχωρίζει μεταξύ τους, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Με την τεχνική MS, τα μόρια του υπό μελέτη δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η ευαισθησία της μπορεί να φτάσει ως τα 10^{-18} mol και λόγω της ακρίβειας που τη διακρίνει, μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για τη χημική δομή μεγάλου αριθμού ενώσεων και την παρουσία και το ποσοστό των ισότοπων τους.

Η τεχνική της φασματομετρίας μαζών θεωρείται εξαιρετικά αξιόπιστη μέθοδος, χάρη στην υψηλή ευαισθησία της, αλλά κυρίως γιατί επιτυγχάνει την απόλυτη μοριακή αναγνώριση, αφού πρακτικά δεν υπάρχει πιθανότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού της αναλυόμενης ένωσης με άλλες ενώσεις, όπου μπορεί να εκλούονται την ίδια χρονική στιγμή. Το παραπάνω επιτυγχάνεται, κυρίως, στη Φασματομετρία μαζών σε σειρά (tandem mass spectrometry), όπου χάρη στην εκλεκτικότητα της μεθόδου, το σήμα θορύβου είναι πολύ μικρό, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο λόγος S/N (Signal/Noise).

Η δυνατότητα της μεθόδου να αναλύει ποιοτικά και ποσοτικά οποιοδήποτε άγνωστο μίγμα ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις αποτέλεσε την βασική ιδιότητα για

την οποία επιλέχθηκε για τη μεθοδολογία του πρώτου μέρους της μελέτης, όπου επιχειρήθηκε η ποιοτική διάκριση των 3 νεοσυντεθειμένων BNN μορίων και η ποσοτική ανάλυση του BNN27.

2.2. Φασματογράφος μαζών

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1) **Σύστημα εισαγωγής του δείγματος.** Το δείγμα μπορεί να βρίσκεται σε αέρια ή υγρή μορφή.

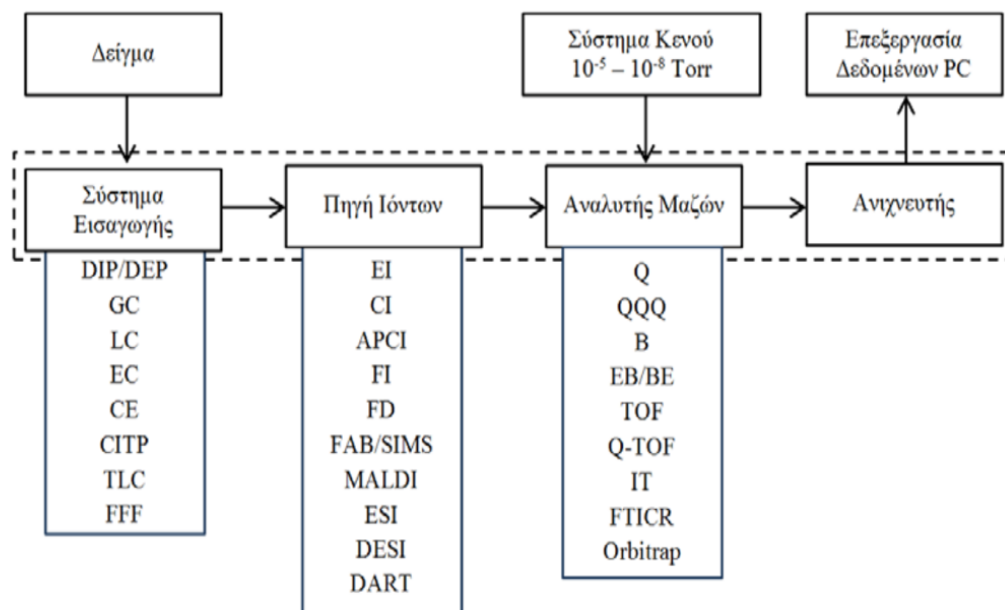
2) **Πηγή ιόντων:** Τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα. Συνήθως η πηγή ιόντων είναι συνενωμένη με το σύστημα εισαγωγής του δείγματος.

3) **Αναλυτής μαζών:** Λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το m/z τους.

4) **Ανιχνευτής:** Συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.

5) **Εξειδικευμένο λογισμικό:** Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος φέρει ειδικό λογισμικό για την καταγραφή και την ανάλυση του λαμβανόμενου ηλεκτρικού σήματος.

6) **Σύστημα κενού:** Ο φασματογράφος λειτουργεί υπό κενό αέρος το οποίο δημιουργείται από εξωτερικές και εσωτερικές αντλίες κενού.



Εικόνα 23: Διάγραμμα τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου.

2.3. Τεχνικές ανάλυσης στη φασματογραφία μαζών

Στη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιούνται ορισμένες κύριες τεχνικές ανάλυσης:

α) η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan), β) η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring-SIM), και γ) η φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), η οποία περιλαμβάνει υποκατηγορίες τεχνικών σάρωσης, όπως η τεχνική της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring-SRM ή Multiple Reaction Monitoring-MRM).

2.3.1. Τεχνική πλήρους σάρωσης

Με την τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan) καταγράφεται το ολικό φάσμα μεταξύ δυο τιμών m/z για καθορισμένο χρόνο. Η ευαισθησία της μπορεί να αυξηθεί αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης, διότι έτσι αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων, τα οποία φτάνουν στον ανιχνευτή. Με τη τεχνική επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της δομής μιας άγνωστης ένωσης, με τον προσδιορισμό του μοριακού της βάρους ή με σύγκριση με πρότυπα φάσματα. Επίσης, η αύξηση της ευαισθησίας μπορεί να επιτευχθεί με μείωση του εύρους σάρωσης, όμως στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι δυνατό να χαθούν πληροφορίες.

2.3.2. Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων

Στην περίπτωση που το φάσμα των υπό μελέτη ενώσεων είναι γνωστό, τότε χρησιμοποιείται η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων. Κατά την εφαρμογή της, επιλέγονται ορισμένα από τα χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματος του εισαγόμενου συστατικού και ο αναλυτής μεταβαίνει με μεγάλη ταχύτητα από τη μια μάζα στην άλλη, μετρώντας αποκλειστικά τις επιλεγμένες μάζες. Η τεχνική προσφέρει μεγάλη ευαισθησία, ωστόσο υπάρχει ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα, εφόσον μπορεί να συμπροσδιοριστεί οποιαδήποτε ένωση, η οποία αποδίδει το συγκεκριμένο ιόν.

2.3.3. Τεχνική φασματομετρίας μαζών σε σειρά

Η τεχνική της φασματομετρίας μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρίας ανάλυσης. Τα επιμέρους

τμήματα του κάθε επιπέδου μπορούν να επιλέξουν εάν θα μεταφερθεί μεταξύ τους ένα ιόν μόνο του ή όλα τα ιόντα μαζί κάθε φορά. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες και η επιλογή ανάμεσά τους καθώς και ανάμεσα στους διάφορους αναλυτές MS σάρωσης ή μη σάρωσης, παρέχει πολύτιμη πληροφορία για τη δομή της αναλυόμενης ένωσης και αυξάνει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μέτρησης.

2.4. Ποσοτική ανάλυση φάσματος μαζών

Η καταγραφή της (σχετικής) έντασης του σήματος σε σχέση με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) παρέχει το *φάσμα μαζών*. Η κορυφή του φάσματος με τη μεγαλύτερη ένταση καλείται *κύρια κορυφή (base peak)*. Η *μοριακή κορυφή (molecular peak)* είναι η κορυφή που αντιστοιχεί στη σχετική μοριακή μάζα της αναλυόμενης ένωσης. Τα καταγραφόμενα φάσματα εστιάζονται και ρυθμίζονται με βάση την κύρια κορυφή, ώστε οι εντάσεις και τα ύψη των υπόλοιπων κορυφών να προβάλλονται σε σχέση με το ύψος (ένταση) της κύριας κορυφής. Το φάσμα μαζών εξαρτάται από τις *συνθήκες* και την *τεχνική ιονισμού*. Αλλαγές μπορούν να επιφέρουν μεγάλες μεταβολές στο φάσμα μια ένωσης και πρέπει πάντα να καταγράφονται και να αναφέρονται.

Άλλοι συχνοί τύποι κορυφών που διακρίνονται στο καταγραφόμενο φάσμα μαζών είναι: οι θυγατρικές κορυφές, οι κορυφές ισοτόπων και οι κορυφές του υποστρώματος/θορύβου. Οι θυγατρικές κορυφές είναι οι κορυφές καταγραφής των ιόντων, τα οποία προέρχονται από τη θραύση των μοριακών ιόντων. Οι κορυφές ισοτόπων λαμβάνονται από τα ισότοπα στοιχείων, όπως παράδειγμα τα δύο φυσιολογικά ισότοπα του χλωρίου:

^{35}Cl , ^{37}Cl και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία των παραγόμενων φασμάτων , στην ταυτοποίηση αγνώστων ενώσεων και στον προσδιορισμό μοριακών μαζών.

Οι κορυφές του υποστρώματος, καθώς και του θορύβου οφείλονται σε πιθανές παρεμβολές στο αναλυτικό σύστημα από γνωστά και πολύ διαδεδομένα μόρια, όπως το νερό και το άζωτο ή από μόρια που εισέρχονται από διάφορες πηγές, όπως ατμοί λαδιών από τις αντλίες κενού, πολυμερή και μονομερή από τα πλαστικά μέρη του συστήματος κλπ.

Επιπρόσθετα, ως είδος κορυφής αποτελούν οι κορυφές προσθήκης, δηλαδή είναι οι κορυφές που λαμβάνονται από την προσθήκη διαφόρων μορίων, όπως του νερού (+18), του αμμωνίου (+17), του νατρίου (+23), του ακετονιτριλίου, στα αναλυόμενα ιόντα.

2.5. Εφαρμογές φασματομετρίας μαζών

Οι κυριότερες εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας αφορούν στον προσδιορισμό μοριακών τύπων και δομών (ποιοτική ανάλυση) αγνώστων ουσιών και στην ποιοτική ανάλυση δειγμάτων. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για τον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών ενώσεων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο φασματογράφος μάζας λειτουργεί ως εξειδικευμένος ανιχνευτής.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό μοριακών μαζών, η πρώτη και σημαντικότερη πληροφορία που είναι δυνατό να ληφθεί από τα φάσματα είναι η *σχετική μοριακή μάζα* (το μοριακό βάρος, *MB*) της ένωσης. Συχνά, επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη κορυφών προσθήκης ή αφαίρεσης. Για την ανάλυση, ιδιαίτερα αγνώστων δειγμάτων, σημαντικό ρόλο παίζουν η κατανόηση του δείγματος και οι πιθανές ταυτότητες των αναλυόμενων

ενώσεων. Ενίοτε απαιτείται ανάλυση με περισσότερες από μία τεχνικές ιονισμού για τη συλλογή επιπλέον πληροφοριών από το λογισμικό του οργάνου, ώστε να βελτιστοποιηθεί η πιθανότητα ταυτοποίησης.

Παράλληλα, σχετικά με τον προσδιορισμό της μοριακής δομής και του μοριακού τύπου, η Φασματομετρία Μαζών αποτελεί ένα από τα πιο αξιόπιστα εργαλεία για τον προσδιορισμό της δομής και του τύπου μια άγνωστης ένωσης. Μετά τον προσδιορισμό του MB, ακολουθούν διαδοχικά πειράματα θραύσης του μορίου, ώστε να συλλεχθούν οι δομικές πληροφορίες (MS-MS product scan).

Τα φάσματα που λαμβάνονται εισάγονται σε ειδικά λογισμικά που μπορούν να αναλύουν κατάλληλα το σήμα (αποσυνέλιξη), οπότε και να επιτευχθεί ο επιθυμητός προσδιορισμός, ο οποίος συμπεριλαμβάνει τη σύγκριση με τα πρότυπα φάσματα, που υπάρχουν καταγεγραμμένα σε γνωστές βιβλιοθήκες των φασμάτων (Data libraries).

Οι βιβλιοθήκες λειτουργούν με τους αλγορίθμους που συγκρίνουν τα φάσματα ως προς την ακριβή μάζα του μοριακού ιόντος, τη μάζα των κορυφών και τη σχετική ένταση τους, ενώ στη συνέχεια προτείνονται οι πιθανότερες ενώσεις και μοριακοί τύποι βασισμένοι στην αναζήτηση σε σύγχρονες ανοιχτές βάσεις δεδομένων (ChemSpider, HMDB, MassBank, LipidMaps, METLIN). Ακολουθεί περαιτέρω φιλτράρισμα με ειδικά κριτήρια (όπως φύση του μορίου, χρόνος συγκράτησης), καθώς και περαιτέρω αναλύσεις.

Οι βιβλιοθήκες φασμάτων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες οι οποίες αποτελούν οι τοπικές που δημιουργούνται από τον χρήστη σε κάθε όργανο, οι εμπορικές, αλλά και οι κοινόχρηστες που είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο.

Οι τοπικές βιβλιοθήκες φασμάτων δημιουργούνται κατά τη χρήση του οργάνου, με την ανάλυση προτύπων ουσιών. Ο αναλυτής έχει τη δυνατότητα δημιουργίας νέας βάσης δεδομένων ή της προσθήκης δεδομένων στη βάση, χάρη σε κατάλληλο λογισμικό. Στην περίπτωση του LC-MS, για να είναι συγκρίσιμα τα φάσματα, πρέπει να λαμβάνονται υπό τις ίδιες συνθήκες (pH, διαλύτες κλπ.).

Οι εμπορικές βιβλιοθήκες φασμάτων είναι δημιούργημα εταιριών και οργανισμών και περιλαμβάνουν βάσεις δεδομένων αναλύσεων χιλιάδων ενώσεων. Είναι βιβλιοθήκες γενικού (NIST, Willey) ή ειδικού (Maurer Toxicology, Fiehn Metabolomics) ενδιαφέροντος, με δεδομένα που έχουν ληφθεί από πιστοποιημένα εργαστήρια.

Οι κοινόχρηστες βάσεις δεδομένων, οι οποίες φιλοξενούνται στο διαδίκτυο, είναι ανοιχτές και κάθε εγγεγραμμένος ερευνητής μπορεί να συνεισφέρει και να εισάγει τα δεδομένα. Ωστόσο, χρειάζεται μεγάλη προσοχή κατά τη χρήση τους, γιατί οι μικρές διαφορές στις συνθήκες ανάλυσης, αλλάζουν σημαντικά τα λαμβανόμενα φάσματα για μία ένωση, ακόμα και όταν αναλύεται με την ίδια μέθοδο. Κατά συνέπεια, η χρήση τους δεν προσφέρει μεγάλη βεβαιότητα για την ταυτοποίηση των ενώσεων.

3. Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική αναφέρεται σε αυτό που το σώμα προκαλεί σε ένα φάρμακο, ασχολείται δηλαδή με τις μεταβολές που υφίσταται μια ουσία από τη στιγμή που θα εισέλθει στον οργανισμό (fate of the drug). Ουσιαστικά, ασχολείται με την *Απορρόφηση*, την *Κατανομή*, το *Μεταβολισμό* και την *Απέκκριση (ΑΚΜΑ)* μιας ουσίας.

Ας δούμε όμως αρχικά πώς μπορεί να αποδοθεί μια φαρμακευτική ουσία στο σώμα, αλλά και ειδικότερα στον οφθαλμό.

3.1. Βασικές αρχές χορήγησης φαρμάκων

Οι οδοί χορήγησης ενός φαρμάκου διακρίνονται αδρά σε συστηματικές και τοπικές. Όσον αφορά τη συστηματική χορήγηση, η ουσία διατίθεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να φτάσει στο όργανο-στόχο, μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας. Ο γρηγορότερος τρόπος είναι η ενδοφλέβια χορήγηση, δηλαδή η απευθείας χορήγηση του φαρμάκου στην κυκλοφορία.

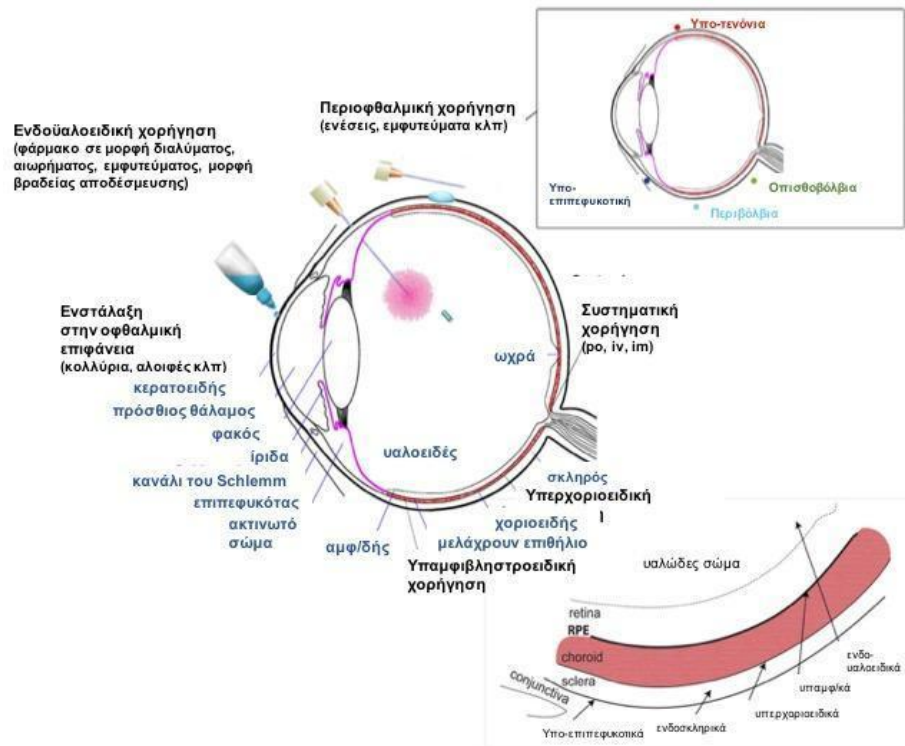
Άλλες οδοί αποτελούν η ενδομυϊκή, η υποδόρια, οι εισπνοές (παραντερικές οδοί χορήγησης), η χορήγηση από το πεπτικό σύστημα και η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, η οποία έχει ελάχιστες εφαρμογές στον άνθρωπο (πολύ εξειδικευμένες θεραπείες όπως κάποιες χημειοθεραπείες, διάλυση). Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση διατίθεται ευρέως για κτηνιατρική χρήση, για τη χορήγηση των φαρμάκων και των υγρών και για τη πειραματική χορήγηση φαρμάκων σε πειραματόζωα όπως τα τρωκτικά (ποντικός, αρουραίος κλπ).

Στην περίπτωση που η χορήγηση δεν είναι ενδοφλέβια, απαιτείται πάντοτε η απορρόφηση της ουσίας από το σημείο εφαρμογής προς την κυκλοφορία, μέσω της οποίας θα κατανεμηθεί στους ιστούς και θα φτάσει στη θέση δράσης του, διεισδύοντας διαμέσου διαφόρων φραγμών, οι οποίοι διαχωρίζουν τα διάφορα «διαμερίσματα» του σώματος. Στην περίπτωση όπου η θέση δράσης αποτελεί το Κεντρικό Νευρικό σύστημα (ΚΝΣ, εγκέφαλος, νωτιαίος μυελός), ο φραγμός είναι ο αιματο-εγκεφαλικός, ο οποίος απαρτίζεται από τα τοιχώματα των τριχοειδών των αγγείων, τα οποία αιματώνουν τον εγκέφαλο. Κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία, η ουσία υφίσταται μεταβολές (μεταβολίζεται), με φυσιολογική ή μη μετατροπή σε άλλες δραστικές ή μη ενώσεις (αδρανοποίηση) και τελικά το φάρμακο απομακρύνεται μέσω μηχανισμών απέκκρισης από τα αντίστοιχα όργανα (ήπαρ, νεφρός, πνεύμονες).

Ο δεύτερος τρόπος χορήγησης μια ουσίας είναι η τοπική χορήγηση και αφορά προφανώς όργανα-στόχους προσιτά με εξωτερική χρήση. Τέτοια αποτελούν ορισμένα επιθήλια (δέρμα, αυτί), οι αρθρώσεις (ενδοαρθρικές εγχύσεις) και ο οφθαλμός, ο οποίος αποτελεί άριστο παράδειγμα για την τοπική χορήγηση των ουσιών.

3.1.1. Χορήγηση φαρμάκων στον οφθαλμό

Συμπεριλαμβάνει (i) ενστάλαξη στην οφθαλμική επιφάνεια οφθαλμικών σταγόνων, αλοιφών, γέλης, (ii) περιοφθαλμική χορήγηση (iv) ενδοϋαλοειδική χορήγηση.



Εικόνα 25: Μέθοδοι περιοχικής χορήγησης φαρμάκων στον οφθαλμό. (Τροποποιημένη από Del Amo EM, Rimpelä AK, Heikkinen E, et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Prog Retin Eye Res.* 2017;57:134-185.)

Η τελευταία είναι παρεμβατική μέθοδος, ωστόσο αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για τη χορήγηση φαρμάκων για παθήσεις του οπίσθιου ημιμορίου. Με την εναπόθεση ουσίας απευθείας στον ενδοϋαλοειδικό χώρο, «παρακάμπτεται» ο αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός, που παρεμβάλλεται μεταξύ συστηματικής κυκλοφορίας και του αμφιβληστροειδή.

Η ενδοϋαλοειδική έγχυση εξασφαλίζει όχι μόνο την άμεση πρόσβαση στον ιστό, αλλά και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων συστηματικών ενεργειών. Η τοπική χορήγηση εξασφαλίζει την άμεση εφαρμογή της ουσίας στον ιστό-στόχο, όμως ένας

βαθμός απορρόφησης είναι αδύνατον να αποφευχθεί, με αποτέλεσμα ένα ποσοστό του απορροφημένου φαρμάκου να φτάνει τελικά στη συστηματική κυκλοφορία, ασκώντας πιθανές παράλληλες/ανεπιθύμητες δράσεις. Όσο μικρότερη είναι η χρησιμοποιούμενη ποσότητα, τόσο μικρότερη είναι η αντίστοιχη ποσότητα που θα φτάσει στην κυκλοφορία, κατά επέκταση οι παράλληλες/ανεπιθύμητες δράσεις.

Καθώς ο αμφιβληστροειδής είναι ένας μικρός ποσοτικά ιστός, οι χορηγούμενες ποσότητες, με τοπική χορήγηση, μέσω ενδοϋαλοειδικής έγχυσης, είναι αντίστοιχα μικρές, σε σχέση με τις αντίστοιχες συστηματικές. Άρα, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση επιτυγχάνει τη βελτιστοποίηση της δοσολογίας και την ελαχιστοποίηση των συστηματικών ενεργειών.

Το παραπάνω γεγονός την έχει καταστήσει εξαιρετικά χρήσιμη στη θεραπευτική των αμφιβληστροειδικών παθήσεων και αποτελεί πλέον τη μέθοδο εκλογής, όποτε είναι εφικτό. Κάθε φορά που μια ουσία εισάγεται στη θεραπευτική του αμφιβληστροειδή, είναι επιθυμητή η μελέτη τόσο της ενδοϋαλοειδικής και της ενδοφθάλμιας συμπεριφοράς της (φαρμακοκινητική), όσο της επίδρασής της στον αμφιβληστροειδικό ιστό (αποκλεισμός εμφάνισης αμφιβληστροειδικής τοξικότητας).

Πριν γίνει λεπτομερέστερη αναφορά στην ενδοφθάλμια φαρμακοκινητική, θα περιγραφούν κάποια γενικότερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά και παράμετροι.

3.2.1. Φαρμακοκινητικές Παράμετροι / Απορρόφηση - Κατανομή

Οι μηχανισμοί διέλευσης των μεμβρανών μεταξύ των διαμερισμάτων διακρίνονται σε *ενεργητικούς και παθητικούς*, αναλόγως με το αν απαιτείται κατανάλωση ενέργειας για τη μεταφορά ή όχι, αντιστοίχως.

Οι **ενεργητικοί μηχανισμοί** συμπεριλαμβάνουν την ενεργητική μεταφορά, την ενδοκυττάρωση και τη διευκολυνόμενη διάχυση. Η ενέργεια που απαιτείται προέρχεται από διαμεμβρανικούς μηχανισμούς, όπως ο σχηματισμός το ένζυμο Na-K-ATP-άση, που μεσολαβεί ώστε να μεταφερθούν μόρια είτε αντίθετα στο πρηνές της συγκέντρωσης (ενεργητική μεταφορά), είτε μεγάλα μόρια (ενδοκυττάρωση). Η διευκολυνόμενη διάχυση ακολουθεί πάντα το πρηνές της συγκέντρωσης, με τη βοήθεια κάποιου μεμβρανικού φορέα.

Οι **παθητικοί μηχανισμοί** είναι η *διάχυση και η διήθηση*.

i) Η **διάχυση** αποτελεί τον *πιο κοινό τρόπο διαμεμβρανικής διακίνησης μορίων*.

Δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και ακολουθεί **τον νόμο του Fick**:

$$D=K [A (C1 - C2)/ d] , \text{ όπου}$$

D: ο ρυθμός διάχυσης/διαπέρασης

A: η επιφάνεια της μεμβράνης που συμμετέχει στη διάχυση

C1 – C2: η διαφορά της συγκέντρωσης της ουσίας μεταξύ των δύο διαμερισμάτων που διαχωρίζονται από τη μεμβράνη.

d: το πάχος της μεμβράνης

Φαίνεται ότι για μια δεδομένη μεμβράνη, η διάχυση είναι ανάλογη της διαφοράς της συγκέντρωσης (πρανές) της ουσίας και της **σταθεράς K**.

Η **σταθερά K** εξαρτάται από τη θερμοκρασία, από το μοριακό βάρος (MB) και δομή, τη λιποδιαλυτότητα και το βαθμό ιονισμού.

- **Το μοριακό βάρος και η μοριακή δομή:** Έχει υπολογισθεί πως ουσίες με M.B. >1.000 πολύ δύσκολα μπορούν να διαχυθούν
- **Η λιποδιαλυτότητα** εξαρτάται από τη δομή του μορίου και συγκεκριμένα από το ποσό των υδρόφιλων και των λιπόφιλων ομάδων, τις οποίες περιλαμβάνει. Ποσοτικά η λιποφιλικότητα εκφράζεται από το *συντελεστή μερισμού (P)*, σε ένα σύστημα δύο μη αναμιγνυομένων διαλυτών. Ως συντελεστής μερισμού (P) ορίζεται ο λόγος συγκέντρωσης της ουσίας στην οργανική φάση προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή της στο νερό, ενώ αποτιμάται με τη μορφή του λογαρίθμου του (logP):

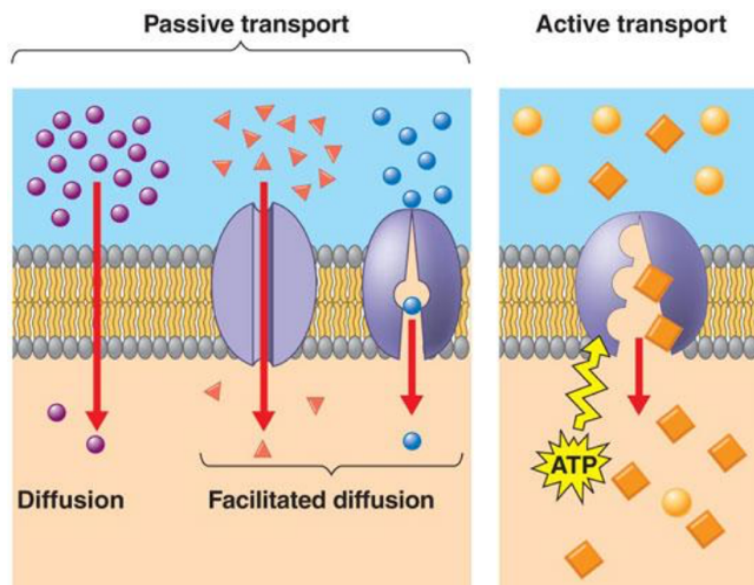
$$\log P = \log(C_{\text{organic}}/C_{\text{aqueous}})$$
, για δεδομένο σύστημα διαλυτών, θερμοκρασίας και pH υδατικής φάσης.

Στο σχεδιασμό των φαρμάκων, το πιο καθιερωμένο μέτρο λιποφιλικότητας μιας ένωσης είναι ο λογάριθμος του συντελεστή μερισμού της, στο σύστημα οκτανόλης/νερού (n-octanol/water, 25°C) ($\log P = \log P_{\text{oct}}$) και αφορά στην ουδέτερη μονομερή (μη ιονισμένη) μορφή της ένωσης.

- **Ο ιονισμός της ουσίας.** Λόγω της πολικότητας του λιποειδικού τμήματος των μεμβρανών, μόνο μη ιονισμένες ουσίες μπορούν να τις διαπερνούν παθητικά. Οι ιονισμένες μορφές μιας ουσίας δημιουργούν εύκολα δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού και γίνονται υδατοδιαλυτές. Τελικά, η διάχυση δεν επηρεάζεται από το πρανές της ολικής συγκέντρωσης της ουσίας, αλλά μόνο της μη ιονισμένης μορφής

της, επειδή μόνο η συγκεκριμένη μπορεί να διαχυθεί, δια μέσου της λιπιδιακής μεμβράνης.

(ii) Ο δεύτερος τρόπος παθητικής μετακίνησης είναι η **διήθηση**. Η κλασική μορφή μιας βιολογικής μεμβράνης συμπεριλαμβάνει μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα, μέσα στην οποία συνυπάρχουν πόροι, με υδρόφιλο τοίχωμα. Κατά τη διήθηση, οι υδατοδιαλυτές ουσίες διαπερνούν μέσα από τους πόρους, λόγω πρσανούς ωσμωτικής ή υδροστατικής πίεσης. Αυτός ο τρόπος μετακίνησης είναι για πολύ μικρά μόρια και ουσιαστικά δεν έχει μεγάλη συμμετοχή για φάρμακα (οργανικά) με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 200 daltons.



Εικόνα 24: Παθητικός (διάχυση, διήθηση) και ενεργητικός μηχανισμός διέλευσης κυτταρικής μεμβράνης.

3.2.2. Φαρμακοκινητικές παράμετροι / Κατανομή-Απέκκριση

Μετά την απορρόφηση ενός φαρμάκου, κατανέμεται στους ιστούς, όπου φτάνει με την αιματική κυκλοφορία. Το ποσό κάθε φαρμάκου που φτάνει στους ιστούς όπου δρα είναι ένα μικρό μόνο κλάσμα του ολικού ποσού του φαρμάκου που χορηγείται, εφόσον το μεγαλύτερο μέρος παραμένει στα διάφορα διαμερίσματα των υγρών του οργανισμού (ενδοκυττάριος, μεσοκυττάριος και ενδαγγειακός χώρος) ή διαλύεται μέσα στο λίπος των λιπαποθηκών. Ο βαθμός της επέκτασης στα διάφορα διαμερίσματα υγρών καθορίζει την τελική κατανομή του φαρμάκου, μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση και αναφέρεται ως **φαινομενικός όγκος κατανομής (Vd)**.

Ο φαινομενικός όγκος κατανομής ορίζεται ως:

$$Vd = D_0 / C \text{ (L/kg), όπου}$$

D_0 : χορηγούμενη δόση και C : συγκέντρωση στο πλάσμα

Επομένως, είναι κατανοητό ότι ο φαινομενικός όγκος κατανομής σπάνια συμπίπτει με τον όγκο του αίματος του υποκειμένου, ενώ αποτελεί μία σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρο. Επιπλέον σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρος είναι η *Βιοδιαθεσιμότητα*.

Βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμάκου είναι το μέτρο του ρυθμού (rate), καθώς της έκτασης (extent), σύμφωνα με την οποία η δραστική ουσία του φαρμάκου απορροφάται και είναι διαθέσιμη στο σημείο δράσης του φαρμάκου και εκφράζεται ποσοτικά ως:

$$F\% = AUC / AUC_{iv} * 100$$

AUC: Area Under the Curve, επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης της ουσίας σε σχέση με το χρόνο, της οδού χορήγησης ενδιαφέροντος.

AUC_{iv}, επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης της ουσίας σε σχέση με το χρόνο, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.

Προφανώς, στην περίπτωση της ενδοφλέβιας χορήγησης ο λόγος είναι 1 και η διαθεσιμότητα 100%. Επίσης, η από του στόματος χορήγηση εμφανίζει τη χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα μεταξύ των συστηματικών οδών χορήγησης. Περαιτέρω σημαντικές φαρμακευτικές παράμετροι αποτελούν:

Χρόνος ημίσειας ζωής, $t_{1/2}$.

Είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα στο μισό, σε σχέση με την αρχική.

Σταθερά απομάκρυνσης, k_{el}

Η σταθερά απομάκρυνσης έχει μονάδες αντίστροφου χρόνου και χαρακτηρίζει την απομάκρυνση του φαρμάκου από όλους τους ιστούς. ($k_{el}=k_1+k_2+k_3+k_{\text{κλπ}}$)

Κάθαρση (Clearance, Cl)

Η απομάκρυνση ενός φαρμάκου από το σώμα μπορεί να περιγραφεί από την *κάθαρση* και ορίζεται ως:

$$Cl = D_0 / AUC \text{ (L/h/kg)}$$

Επομένως για δεδομένη δόση, τα φάρμακα με υψηλή AUC, εμφανίζουν χαμηλή κάθαρση και αντίστροφα. Επίσης, η κάθαρση μπορεί να εκφραστεί συναρτήσει της κατανομής και της απομάκρυνσης, σύμφωνα με τον τύπο:

$$Cl=Vd \cdot k_{el} \quad ,$$

όπου Vd , ο όγκος κατανομής και k_{el} η σταθερά απομάκρυνσης.

Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος κατανομής, τόσο χαμηλότερη θα είναι η αρχική συγκέντρωση. Η σταθερά απομάκρυνσης είναι αντιστρόφως ανάλογη του χρόνου ημίσειας ζωής. Όταν ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι μικρός, η k_{el} είναι μεγάλη και τα επίπεδα του πλάσματος μειώνονται γρήγορα. Επομένως, ο υψηλός Vd και k_{el} έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα και υψηλή κάθαρση.

3.3. Μοντέλα φαρμακοκινητικής ανάλυσης

Με απώτερο στόχο την περιγραφή και την ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων των φαρμακοκινητικών μελετών έχουν αναπτυχθεί ορισμένα μοντέλα που περιγράφουν τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά μιας ουσίας, στο σύνολο του σώματος ή σε τμήμα ή τμήματα του σώματος (διαμερίσματα).

Διακρίνονται δύο βασικές μεθόδους μοντελοποίησης στη φαρμακοκινητική: τη μη-διαμερισματική και τη διαμερισματική. Ως «διαμέρισμα» περιγράφεται ο επί μέρους χώρος του σώματος, στον οποίο η συγκέντρωση ενός φαρμάκου αυξομειώνεται ομοιόμορφα.

3.3.1. Μη – Διαμερισματική ανάλυση

Η μη-διαμερισματική μέθοδος, εφαρμόζεται όταν δεν είναι γνωστή η συμπεριφορά μιας ουσίας σε σχέση με την κατανομή της, μέσα στο σώμα, γιατί είναι περισσότερο ευέλικτη, εφόσον δεν προϋποθέτει την ύπαρξη των διαμερισματικών χώρων, ενώ και τα αποτελέσματα που δίνει είναι αποδεκτά για τις βιολογικές μελέτες.

Επιπλέον, εξετάζει την ολική έκθεση στην ουσία, χρησιμοποιώντας ως παράμετρο την AUC(επιφάνεια κάτω από την καμπύλη), η οποία υπολογίζεται με τη μέθοδο του τραπεζίου. Επομένως, όσο περισσότερα χρονικά σημεία είναι διαθέσιμα (άξονας χ), τόσο πιο ακριβής θα είναι ο υπολογισμός. Εκτός από την AUC, άλλες παράμετροι οι οποίες περιγράφονται από τη μη-διαμερισματική ανάλυση είναι η μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}), ο χρόνος κατά τον οποίο παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση (t_{cmax}), ο όγκος κατανομής (Vd) και η κάθαρση (Cl).

3.3.2. Διαμερισματική ανάλυση

Η διαμερισματική ανάλυση προϋποθέτει ως βάση ότι το φάρμακο κυκλοφορεί σε ένα (μονοδιαμερισματική), δύο (διδιαμερισματική) ή / και περισσότερα διαμερίσματα (πολυδιαμερισματική), όπως ορίστηκαν παραπάνω, ενώ προσπαθεί να προβλέψει τη σχέση της συγκέντρωσης με το χρόνο, με τη χρήση των φαρμακοκινητικών μοντέλων.

Μονοδιαμερισματικό μοντέλο

Το **μονοδιαμερισματικό** μοντέλο κατανομής προϋποθέτει όλο το σώμα ως ένα ενιαίο διαμέρισμα και είναι το συχνότερα χρησιμοποιούμενο για την ενδοφλέβια εφ' άπαξ χορήγηση. Για το μονοδιαμερισματικό μοντέλο ισχύουν οι παρακάτω παραδοχές: αρχικά, η εξισορρόπηση της συγκέντρωσης της ουσίας στο αίμα και στους ιστούς επέρχεται ταχύτατα και στη συνέχεια η συγκέντρωση της χορηγούμενης ουσίας αυξομειώνεται με τον ίδιο τρόπο και ταχύτητα σε όλους τους ιστούς.

Στην περίπτωση του μονοδιαμερισματικού μοντέλου, η απομάκρυνση της ουσίας ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, δηλαδή ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης κάθε

χρονική στιγμή είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της ουσίας στο σώμα και η ποσότητα που απομακρύνεται κάθε χρονική στιγμή, είναι ανάλογη με την αντίστοιχη που παραμένει στο σώμα, ώστε ν' απομακρυνθεί με τη σειρά της. Μαθηματικά, το μονοδιαμερισματικό μοντέλο και η κινητική πρώτης τάξης περιγράφονται ως εξής:

$$dC/dt = -k_{el} \cdot C \text{ όπου:}$$

dC / dt : ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης C του φαρμάκου

C : η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα

k_{el} : πρωτοταξική σταθερά ρυθμού απομάκρυνσης του φαρμάκου.

Από ολοκλήρωση της σχέσης προκύπτει η εκθετική σχέση:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}, \text{ όπου:}$$

C : η συγκέντρωση στο αίμα σε χρόνο t

C_0 : η αρχική συγκέντρωση στο αίμα σε χρόνο $t = 0$

Από την παραπάνω εξίσωση, προκύπτουν οι τύποι της σταθεράς απομάκρυνσης k_{el} και του χρόνου της ημίσειας ζωής, $t_{1/2}$, εφόσον αντικατασταθεί το C με $C_0/2$. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα πως ο τύπος που συνδέει το χρόνο της ημίσειας ζωής με τη σταθερά απομάκρυνσης, είναι $t_{1/2} = 0.693/k_{el}$. Στην περίπτωση πρωτοταξικής κινητικής ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι σταθερός και ανεξάρτητος της συγκέντρωσης.

Επίσης, το μονοδιαμερισματικό μοντέλο δεν είναι το πιο ακριβές σε ότι αφορά την κατανομή και απομάκρυνση ενός φαρμάκου από το σώμα, εφόσον η αυξομείωση στη

συγκέντρωσή του δεν είναι σταθερή σε όλο το σώμα, αλλά μπορεί να εξαρτάται από παράγοντες, όπως αιμάτωση ή/και την ύπαρξη φραγμών(πχ εγκέφαλος).

Πολυδιαμερισματικό μοντέλο

Στην περίπτωση όπου είναι γνωστή η ύπαρξη πολλαπλών διαμερισμάτων της κατανομής μιας ουσίας, αξιοποιείται ένα πολυδιαμερισματικό μοντέλο για να περιγράψει, με τη χρήση πιο πολύπλοκων εξισώσεων, την κατανομή μεταξύ των διαμερισμάτων και την απέκκριση της ουσίας. Η καμπύλη της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με το χρόνο δημιουργείται με βάση τις εξισώσεις, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη παράγοντες, όπως ο ρυθμός μετακίνησης μεταξύ των διαμερισμάτων, ο μεταβολισμός, ο χρόνος απέκκρισης κάθε διαμερίσματος (εικόνα 26).

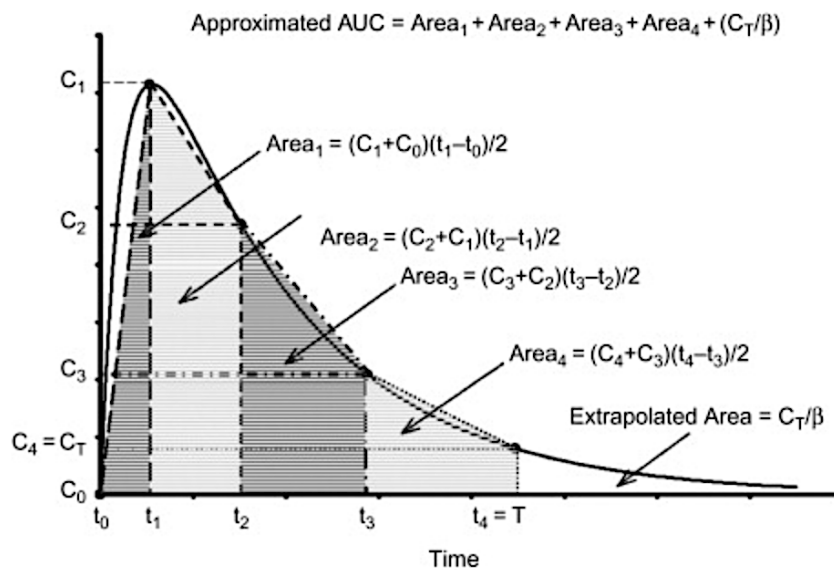
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο συνολικός όγκος της κατανομής V_{dtot} για τη χορηγούμενη ουσία, ισούται με το άθροισμα των επιμέρους όγκων κατανομής των διαμερισμάτων (1, 2,..n κλπ), δηλαδή ισχύει:

$$V_{dtot}=V_{d1}+V_{d2}+...+V_{dn}.$$

Όπως είναι αντιληπτό, η περισσότερο ασφαλής μέθοδος ανάλυσης, με την οποία λαμβάνονται τα πιο ακριβή αποτελέσματα για τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά τους, μετά από συστηματική χορήγηση νεοσυντεθειμένων φαρμάκων, αποτελεί η εφαρμογή μιας μη-διαμερισματικής ανάλυσης.

Ο υπολογισμός της AUC με βάση την καμπύλη της συγκέντρωσης του φαρμάκου, σε συνάρτηση με το χρόνο δίνει σημαντική πληροφορία σε σχέση με τη συνολική έκθεση των ιστών στο φάρμακο⁴⁷.

Η χρήση άλλων παραμέτρων βασισμένων στα δεδομένα καμπύλης (συγκέντρωση και χρόνος), όπως η AUMC (Area Under the first Moment Curve), θα επιτρέψει τον υπολογισμό του μέσου χρόνου της παραμονής στον ιστό (*mean residence time*) $MRT=AUMC/AUC$ (h). Αντιπροσωπεύει τη μέση παραμονή του φαρμάκου στο σύστημα και ποσοτικά το χρόνο που χρειάζεται, ώστε ποσοστό 63.2% του φαρμάκου, να απεκκριθεί από το σύστημα. Ο ρυθμός της απέκκρισης υπολογίζεται στη συγκεκριμένη περίπτωση ως αντίστροφο του MRT, ονομάζεται «φαινομενική σταθερά απομάκρυνσης», *apparent elimination rate constant*, $k_{el}'=1/MRT$ (h^{-1}).



Εικόνα 26: Ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης (C) σε σχέση με το χρόνο (t)- υπολογισμός επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (Area under the curve, AUC).

Στην παραπάνω εικόνα, το AUC είναι το ολοκλήρωμα του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο και δίνεται από τον τύπο $AUC=\int_0^{\infty} C dt$. Η καμπύλη της πρώτης στιγμής της συγκέντρωσης σε πλάσμα, σε συνάρτηση με το χρόνο αντιστοιχεί

στην καμπύλη σε σχέση με το χρόνο της συγκέντρωσης πολλαπλασιασμένης με το χρόνο και η area under the first moment curve (AUMC), δίνεται από τον τύπο $AUC = \int_0^{\infty} tC dt$.

Ο υπολογισμός της AUC και της AUMC γίνεται με τον κανόνα του τραπεζίου: Η συνολική επιφάνεια κάτω από την καμπύλη προσδιορίζεται από ένα πλήθος τραπεζίων, όπου ορίζονται από τις διαδοχικές συγκεντρώσεις της ουσίας και τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, ενώ με κατάλληλους υπολογισμούς συνυπολογίζεται το υπολειπόμενο τμήμα της καμπύλης, μετά το τελευταίο τραπέζιο.

3.4. Φαρμακοκινητικό μοντέλο στην ενδοϋαλοειδική χορήγηση

3.4.1. Υαλοειδές

Για να γίνουν κατανοητές οι αρχές της ενδοϋαλοειδικής κινητικής μορίων, είναι απαραίτητο να περιγραφούν κάποια βασικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του υαλοειδούς.

Το υαλοειδές σώμα είναι μία διαυγής γέλη, εξαιρετικά υψηλής περιεκτικότητας σε νερό που γεμίζει το χώρο μεταξύ του κρυσταλλοειδούς φακού και του αμφιβληστροειδή⁵⁰. Ποσοστιαία καταλαμβάνει το 80% του όγκου του οφθαλμικού βολβού κατά προσέγγιση, ενώ αποτελείται κατά 99% από νερό, αλλά έχει ζελατινώδη σύσταση, την οποία οφείλει στο υπόλοιπο 1% πρωτεϊνικό «σκελετό» του.

Συγκεκριμένα, ένα δίκτυο κολλαγόνων ινών και υαλουρονικού οξέος συγκρατεί τα μόρια του νερού, σχηματίζοντας τελικά μία γέλη, η οποία στηρίζει τον οφθαλμικό ιστό και επιτρέπει, χάρη στη διαφάνειά της, τη διέλευση του φωτός προς τον αμφιβληστροειδή, για το σχηματισμό της εικόνας.

Η βασική ανατομία του υαλοειδούς είναι κοινή ανάμεσα στα θηλαστικά, ωστόσο υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς την πρωτεϊνική του σύνθεση, μεταξύ των ειδών. Το παραπάνω εξαρτάται όχι μόνο από την αρχική του σύσταση, κατά την ανάπτυξή του σε κάθε είδος, αλλά και από τις μεταβολικές διεργασίες των ιστών, με τους οποίους έρχεται σε επαφή, δηλαδή του αμφιβληστροειδή και του πρόσθιου ραγοειδή χιτώνα (pars plana, κυκλικό σώμα).

Το ανθρώπινο υαλοειδές περιέχει πάνω από 1000 διαφορετικές πρωτεΐνες⁵¹, με κυριότερες το υαλουρονικό οξύ, τα κολλαγόνα, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες. Η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης μπορεί να ανέρχεται σε 1200μg/ml, από την οποία τα 180μg/ml είναι κολλαγόνα. Η περιεκτικότητα ανθρώπινου υαλοειδούς σε υαλουρονικό οξύ είναι 100-400μg/ml, αποδίδοντας στο υαλοειδές αρνητικό φορτίο, παρά τη μεγάλη περιεκτικότητά του σε νερό.

Εκτός από τις δομικές πρωτεΐνες, μέσα στο υαλώδες σώμα συναντώνται μη δομικές πρωτεΐνες, όπως προτεάσες, πρωτεΐνες του συμπληρώματος, τους αυξητικούς παράγοντες, τις κυτοκίνες, τις πρωτεΐνες με σηματοδοτική δραστηριότητα κ.ά. Τα μικρότερα μικρό-μοριακά ανόργανα και οργανικά μόρια, όπως ανόργανα άλατα, ασκορβικό οξύ, σάκχαρα, βρίσκονται διαλυμένα στο υαλοειδές επίσης⁵².

Το υαλοειδές σώμα δεν παρουσιάζει την ίδια πυκνότητα και σύσταση σε όλο του τον όγκο. Εμφανίζει μια εξωτερική μοίρα με μεγαλύτερο ιξώδες, το φλοιό και μια κεντρική ρευστότερη, τον πυρήνα⁵³. Κατά την ανάπτυξη, η δομή του υαλοειδικού στρώματος υπόκειται σε συνεχή αναδιαμόρφωση, ώστε στον ενήλικα, να συναντώνται χώροι πλήρεις με οφθαλμικό υγρό περιβαλλόμενοι από την υαλοειδική γέλη σε στρωματική διάταξη. Η ρευστότητα του υαλοειδούς αυξάνεται με την ηλικία. Η αλλαγή ιξώδους του υαλοειδούς αλλάζει τα χαρακτηριστικά της διάχυσης των ουσιών στο εσωτερικό του και αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα μελέτης στο σχεδιασμό των θεραπευτικών σχημάτων.

Η περιεκτικότητα του υαλοειδούς σε πρωτεΐνη είναι μικρή αναλογικά με το πλάσμα, ωστόσο είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς κρίνονται απαραίτητες για τη διατήρηση της ομοιόστασης και λειτουργίας των περιβαλλόντων ιστών. Ταυτόχρονα, η περιεκτικότητα του υαλοειδούς σε πρωτεΐνες και άλλα μόρια μπορεί να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή

του με τις χορηγούμενες ουσίες, κατά επέκταση το μεταβολισμό τους, καθώς και την απομάκρυνσή των τελευταίων από την υαλοειδική κοιλότητα.

Εκτός από τη λειτουργική επίδραση που μπορεί να διαθέτει το περιεχόμενο του υαλοειδούς στη χορήγηση μιας ουσίας, έχει και ανατομικές/μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζουν τη διάχυση και μετακίνηση ουσιών διαμέσου του.

Εξαιτίας της θέσης και του όγκου που καταλαμβάνει, δρα ως φυσικός φραγμός για τη μετακίνηση των μορίων από το πρόσθιο προς το οπίσθιο πόλο του οφθαλμού⁵⁴. Ταυτοχρόνως, χρησιμεύει ως «ρεζερβουάρ» για τα μόρια μεταβολισμού των οφθαλμικών ιστών του, τα οποία δεν μπορούν να διασχίσουν τους αιματο-οφθαλμικούς φραγμούς, καθώς επίσης για τα φάρμακα τα οποία χορηγούνται ενδοβόλβια, για τη θεραπεία των παθήσεων του οπίσθιου ημιμορίου.

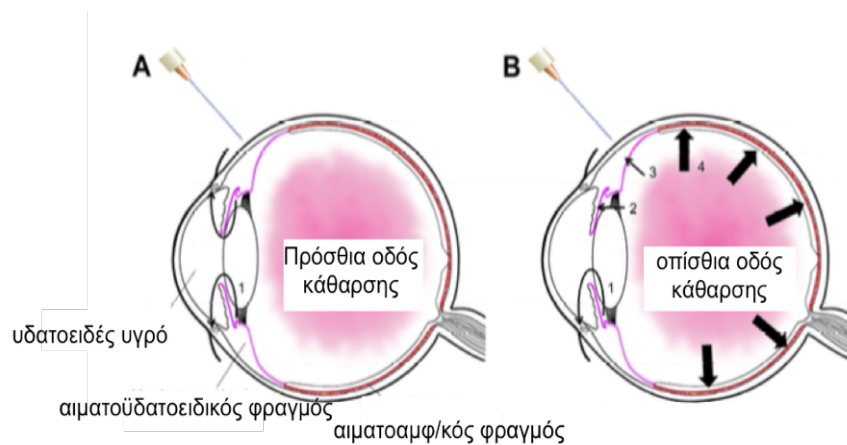
Πιο συγκεκριμένα, μετά την έγχυση μια ουσίας στην ενδοϋαλοειδική κοιλότητα, διαχέεται στον όγκο του υαλοειδούς. Ο βαθμός της διάχυσης εξαρτάται από τη φύση των μορίων: μέγεθος, ιονισμός-pH, λιποφιλικότητα, ικανότητα δημιουργίας των δεσμών με τα συστατικά του πρωτεϊνικού πλέγματος του υαλοειδούς.

Έπειτα, η ουσία απομακρύνεται προς τη συστηματική κυκλοφορία, ακολουθώντας είτε την πρόσθια, είτε την οπίσθια οδό απέκκρισης⁵⁵ (εικόνα 27).

Τα μικρά ουδέτερα μόρια απομακρύνονται γρήγορα από την υαλοειδική κοιλότητα, μέσα σε ώρες (1-10 ώρες)^{49,56}, εφόσον δεν «παγιδεύονται» στο πρωτεϊνικό πλέγμα, ενώ ταυτόχρονα διαπερνούν τον αιματο-οφθαλμικό φραγμό (ΑΑΦ και ΑΥΦ, οπίσθια οδός απέκκρισης). Τα μεγάλα μόρια, τα ιονισμένα μόρια, που σχηματίζουν εύκολα ενώσεις με το νερό και λιπόφιλα μόρια, τα οποία παραμένουν αδιάλυτα μέσα σε υδατικό περιβάλλον,

όπως του υαλοειδούς, απομακρύνονται αργότερα από την υαλοειδική κοιλότητα, με το σχηματισμό «αποθηκών» για ποικίλα διαστήματα, αναλόγως με τα χαρακτηριστικά τους.

Τα μόρια θα απομακρυνθούν τελικά είτε από την πρόσθια οδό αποβολής που είναι μέσω της γωνίας του προσθίου θαλάμου, είτε αφού μεταβολιστούν σε μικρότερα μόρια, τα οποία είναι ικανά να διαπερνούν τους φραγμούς. Ουσιαστικά, αφού διαχυθούν στο υδατοειδές υγρό του οπίσθιου θαλάμου, μεταφέρονται στον πρόσθιο θάλαμο, όπου αποβάλλονται από το σύστημα εκροής της γωνίας του προσθίου θαλάμου.



Εικόνα 27: Οδοί απέκκρισης μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση. A: πρόσθια οδός, η διαλυμένη στο υδατοειδές ουσία μεταφέρεται στον πρόσθιο θάλαμο και αποβάλλεται από το σύστημα εκροής της γωνίας. B: οπίσθια οδός, διαμέσου του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού. (Τροποποιημένο από del Amo EM, Vellonen KS, Kidron H, Urtti A. Intravitreal clearance and volume of distribution of compounds in rabbits: In silico prediction and pharmacokinetic simulations for drug development. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95(Pt B):215-226)

Το BNN27 είναι μικρό και λιπόφιλο μόριο. Δεδομένου του μεγέθους του, αναμένεται να απομακρυνθεί κατά κύριο λόγο από την οπίσθια οδό κάθαρσης. Η

λιποφιλία του ευνοεί τη διαπερατότητα του από μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένης αυτής των αιματοφθalmικών φραγμών. Ωστόσο, η λιποφιλική του σύσταση μπορεί επίσης να καθυστερεί την άμεση διάλυση και διάχυσή του μες στον υδάτινο σκελετό του υαλώδους σώματος.

3.4.2. Κινητική φαρμάκων στην υαλοειδική κοιλότητα

Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση φαρμάκων χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς σε σχέση με τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της⁴⁸. Εφόσον μια ουσία εισέρχεται στην υαλοειδική κοιλότητα, η κατανομή της στους ιστούς εξαρτάται από τη διαπερατότητα των μεμβρανών τους, καθώς και από τη συγγένεια σύνδεσής της με λιπίδια, πρωτεΐνες, μελανίνη και άλλα κυτταρικά συστατικά. Ιδιαίτερα η πρόσδεση με τη μελανίνη, μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του φαρμάκου (μελανίνη υπάρχει στο ΜΕ, αλλά και το χοριοειδή, την ίριδα και το ακτινωτό σώμα).

Μία σημαντική παράμετρος που θα καθορίσει το μοντέλο της φαρμακοκινητικής, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί είναι ο φαινομενικός όγκος κατανομής, V_d , που περιγράφει την έκταση κατανομής μιας ουσίας μετά τη χορήγησή της. Μετά από μια ενδοϋαλοειδική έγχυση, ο οφθαλμός συμπεριφέρεται ως ένας απομονωμένος ιστός, γιατί η αραίωση που υφίσταται η ουσία, όταν περνά στη συστηματική κυκλοφορία είναι πάρα πολύ σημαντική.

Αποτέλεσμα είναι η συγκέντρωσή της στο πλάσμα να είναι τόσο χαμηλή, σε σχέση με ενδοϋαλοειδική, όπου η επίδρασή της στο προφίλ των οφθαλμικών συγκεντρώσεων να είναι μηδαμινή. Άρα, ένας ξεχωριστός όγκος κατανομής μπορεί να προσδιοριστεί για τον οφθαλμό.

Από δεδομένα που υπάρχουν για τον οφθαλμό του κονίκλου, ο V_d είναι ίσος με τον ανατομικό όγκο του υαλοειδούς, υποδεικνύοντας ότι οι περιβάλλοντες ιστοί (αμφιδής, φακός ακτινωτό σώμα, ίριδα) έχουν μόνο μικρό αντίκτυπο στον όγκο της κατανομής. Το παραπάνω οφείλεται στο γεγονός ότι το ανατομικό μέγεθος των ιστών είναι πολύ μικρότερο από τον όγκο του υαλώδους σώματος. Η εξίσωση του όγκου κατανομής είναι:

$$V_d = V_v + k_{p1}V_1 + k_{p2}V_2 + \dots,$$

όπου V_v είναι ο όγκος του υαλοειδούς, k_{p1} , k_{p2} κλπ είναι οι συντελεστές κατανομής μεταξύ ιστού και υαλοειδούς και V_1 , V_2 , ..., οι ανατομικοί όγκοι των περιβαλλόντων ιστών. Για τον οφθαλμό ισχύει ότι $V_v \gg V_1, V_2, \dots$. Επομένως, ισχύει $V_d = V_v$. Αναφορικά με τον οφθαλμό του κονίκλου, οι συγκεκριμένες τιμές στη βιβλιογραφία είναι 1.1-2.2ml⁴⁹.

Αξίζει να σημειωθεί ότι διαπιστώθηκε για το φαινομενικό όγκο της κατανομής του υαλοειδούς πως είναι ανεξάρτητος των φυσικών χαρακτηριστικών της χορηγούμενης ουσίας (λιποφιλικότητα, μέγεθος κλπ).

Συνεπώς, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση μπορεί να θεωρηθεί ότι ακολουθεί πρωτοταξική κινητική, εφόσον ο οφθαλμός συμπεριφέρεται ως ένα διαμέρισμα, με το φαινομενικό όγκο της κατανομής, ίσο με τον ανατομικό όγκο του υαλοειδούς, μέσα στον οποίο η συγκέντρωση υπόκειται σε ομοιόμορφες μεταβολές, ανεξάρτητες από τη συστηματική κυκλοφορία και το υπόλοιπο σώμα.

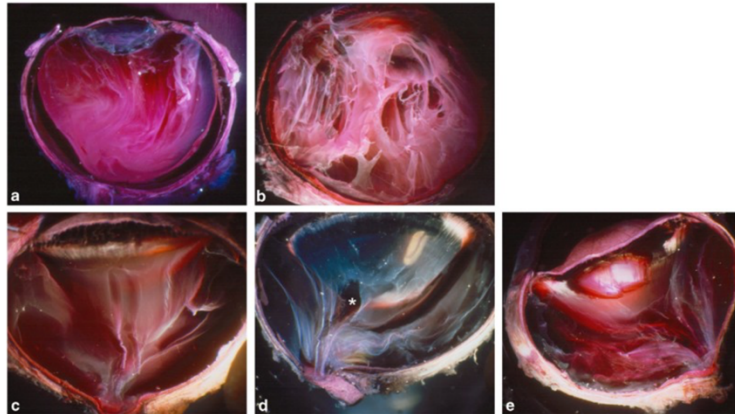
Κατά συνέπεια, η ενδοϋαλοειδική κινητική μπορεί να μελετηθεί με την εφαρμογή μονοδιαμερισματικού φαρμακοκινητικού μοντέλου που ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Ουσιαστικά, σε πρακτικό επίπεδο, ο όγκος κατανομής της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης ισούται με τον ανατομικό όγκο του υαλοειδούς.

3.4.3. Πειραματικά μοντέλα ενδοϋαλοειδικής φαρμακοκινητικής

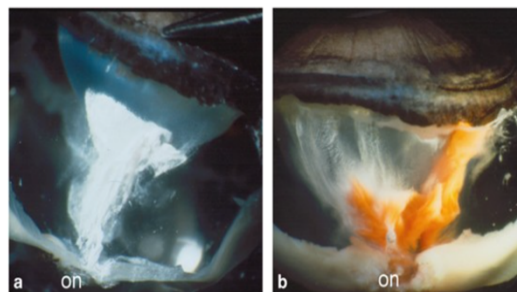
Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα στις προκλινικές μελέτες ενδοϋαλοειδικής φαρμακοκινητικής είναι ο κόνικλος, ο χοίρος, ο σκύλος και τα μη ανθρωποειδή πρωτεύοντα. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα ζώα είναι οι κόνικλοι, γιατί παρέχουν ικανοποιητικό όγκο υαλοειδούς προς ανάλυση (1.5ml κατά μέσο όρο)⁵⁷, η ποιοτική σύσταση του υαλοειδούς του κόνικλου προσομοιάζει με την αντίστοιχη του ανθρώπου, ενώ ταυτόχρονα είναι εύκολα στο χειρισμό, σχετικά οικονομικά και η εκτροφή τους αποσκοπεί για εργαστηριακή χρήση.

Τα φυσικά χαρακτηριστικά του υαλοειδούς του κόνικλου προσομοιάζουν με του ανθρώπου⁴⁹. Παρατηρείται ένας περιφερικός πυκνότερος φλοιός και ένας ρευστότερος πυρήνας, με δοκιδώδη διάταξη του πρωτεϊνικού σκελετού. Η γενικότερη μορφολογία του είναι χωνοειδής και στα δύο είδη. Το υαλοειδές του ενήλικα κόνικλου εμφανίζει σαφές το κανάλι του Cloquet σε όλες τις ηλικίες. Η εντόπισή του είναι συγκεκριμένη, από την οπίσθια επιφάνεια του φακού μέχρι το οπτικό νεύρο και περιβάλλεται από φυσιολογικό στρώμα υαλοειδικού υλικού.

Στη φωτονική μικροσκοπία, η δοκιδώδης διάταξη του υαλοειδούς του ενήλικα κόνικλου υπήρξε παρόμοια με την αντίστοιχη του ενήλικου ανθρώπου. Οι συγκεντρώσεις κολλαγόνου μεταξύ κόνικλου και ανθρώπινου υαλοειδούς δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές. Τέλος, η συγκέντρωση υαλουρονικού οξέος στους κόνικλους είναι 20-40μg/ml ενώ και στον άνθρωπο 100-400 μg / ml^{58,59}. Όλα τα παραπάνω καθιστούν το κουνέλι ένα αξιόπιστο μοντέλο για τη χρήση του, στις προκλινικές μελέτες της φαρμακοκινητικής ενδοϋαλοειδικής χορήγησης⁵⁷.



Εικόνα 28: Οβελιαία τομή ανθρώπινου οφθαλμού(a, b) και οφθαλμού κονίκλου (c, d, e) , μετά από μονιμοποίηση σε γλουταραλδεΐδη και κόκκινο του ρουθηνίου. (a, c,d) οι υαλοειδικές δοκίδες εμφανίζουν οργάνωση δίκην χοάνης. (b) εναλλακτική μορφή οργάνωσης με τις δοκίδες να στρέφονται οπισθίως προς τον ισημερινό του οφθαλμού. (d) *κανάλι του Cloquet. (c-e) αύξηση των δοκίδων με την ηλικία(c: 5-8 μηνών, d: 28 μηνών, e: 43 μηνών). (Από Los LI. The rabbit as an animal model for post-natal vitreous matrix differentiation and degeneration. *Eye (Lond)*. 2008;22(10):1223-1232)



Εικόνα 29: Υαλώδες σώμα κονίκλου. Γίνονται ορατές δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του καναλιού του Cloquet, με στενότερη(a) ή πλατύτερη (b) χοάνη. οπ: οπτικό νεύρο. (Από Los LI. The rabbit as an animal model for post-natal vitreous matrix differentiation and degeneration. *Eye (Lond)*. 2008;22(10):1223-1232)

4. Πειραματικά Μοντέλα Αμφιβληστροειδικής Τοξικότητας

Με απώτερο σκοπό την ενδοϋαλοειδική χρήση φαρμάκων στην κλινική πράξη, ελέγχεται ιδανικά αρχικά η ύπαρξη αμφιβληστροειδική τοξικότητας σε πειραματικά ζωικά μοντέλα. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα ελέγχου τοξικότητας σε ποικίλα είδη πειραματόζωων. Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται αναφορά στην επιλογή του πειραματόζωου, στις τεχνικές και στις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της τοξικότητας.

Για την ανάπτυξη μοντέλων αμφιβληστροειδικής τοξικότητας, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ζώα, όπως οι σκύλοι, οι γάτες, οι χοίροι, οι κόνικλοι, οι μυς (ποντικοί) και οι επίμυες (αρουραίοι), με 'gold standard' τα μη ανθρωποειδή πρωτεύοντα. Ωστόσο, το κόστος και δεοντολογικά ζητήματα που εμπλέκουν τη χρήση των τελευταίων, την καθιστούν σπάνια.

Τα είδη που χρησιμοποιούνται συχνά σε τέτοιου είδους πειράματα είναι οι κόνικλοι, οι μυς και οι επίμυες. Τα δύο μικρά τρωκτικά παρέχουν καλά ελεγχόμενα γενετικά μοντέλα, αλλά οι κόνικλοι είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είδος για την αξιολόγηση της τοξικότητας στον αμφιβληστροειδή.

Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση τοξικότητας είναι η φωτεινή μικροσκοπία (light microscopy), η ηλεκτρονική μικροσκοπία, η ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφία (ERG), καθώς και νεότερες τεχνικές όπως η τομογραφία οπτικής συνοχής (Optical Coherence Tomography, OCT) και η απεικόνιση με την τεχνική

της οφθαλμοσκόπησης με λέιζερ σάρωσης (Scanning Laser Ophthalmoscopy, SLO imaging).

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στη μελέτη της τοξικότητας στα φάρμακα σε ζωικά μοντέλα, τα οποία αποτελούν:

(1) Δυνατότητα ελέγχου πολλαπλών δόσεων, προκειμένου να προσδιοριστούν με ακρίβεια τα όρια ασφαλείας.

(2) Διερεύνηση ξεχωριστά των συστατικών της φαρμακοτεχνικής μορφής, εφόσον χρειάζεται για την ανίχνευση του τοξικού συστατικού (ώστε να μπορεί στη συνέχεια να τροποποιηθεί/αντικατασταθεί).

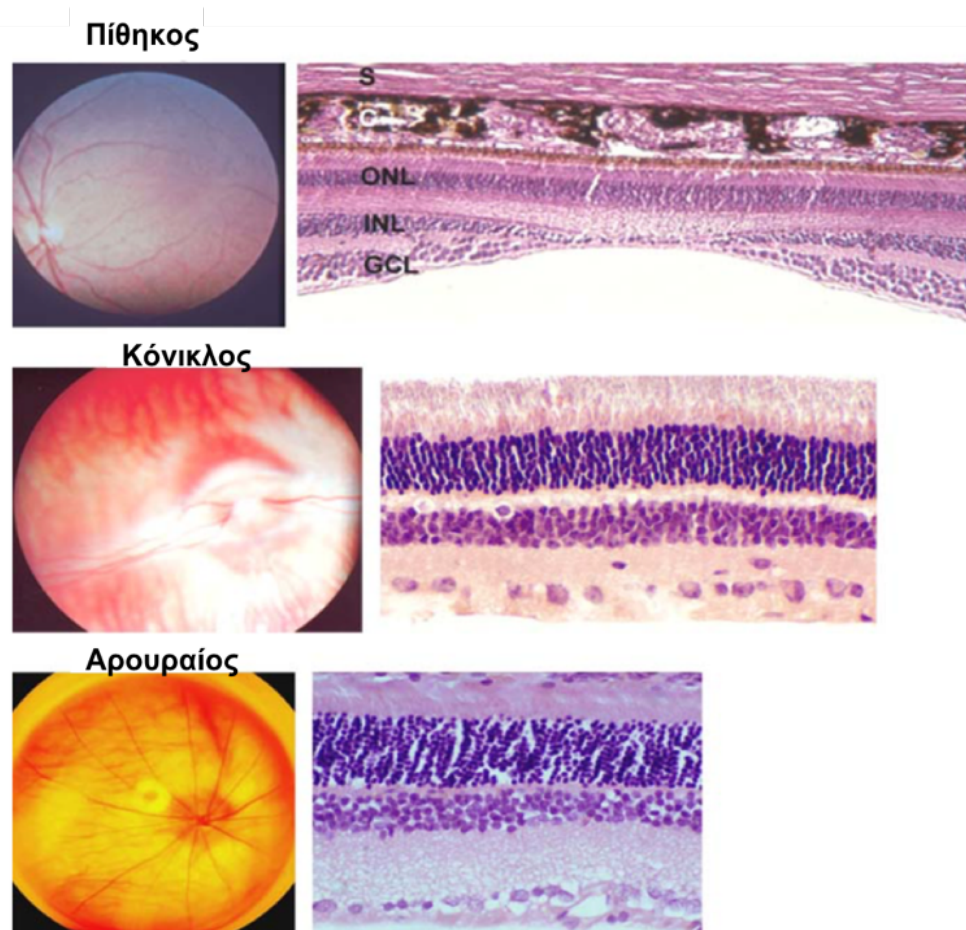
(3) Τα ζωικά μοντέλα προσφέρονται για μακροχρόνια πειράματα, που μπορούν να αναδείξουν μακροπρόθεσμα, με κατάλληλες επεμβατικές ή μη τεχνικές, τους ακριβείς κυτταρικούς μηχανισμούς που επηρεάζονται από το τοξικό φάρμακο. Η κατανόηση που προσφέρουν τα ζωικά μοντέλα, σε σχέση με μηχανισμούς, με τους οποίους δρουν τα φάρμακα τόσο σε κυτταρικό, όσο σε μοριακό επίπεδο στον αμφιβληστροειδή, αυξάνει τη κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας του ιστού, εν γένει και τη γνώση για μελλοντικές εξελίξεις των φαρμάκων για οφθαλμική χρήση.

4.1. Επιλογή πειραματόζωου

Η επιλογή του χρησιμοποιούμενου πειραματόζωου βασίζεται στους διάφορους παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν:

- Το μέγεθος του οφθαλμού.

- Η ομοιότητα των οφθαλμικών δομών και του αμφιβληστροειδή του πειραματόζωου σε σχέση με τις αντίστοιχες ανθρώπινες δομές.
- Η προηγούμενη γνώση και αξιοπιστία των υπαρχόντων δεδομένων σε σχέση με τη δομή και τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς, καθώς τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές.
- Η ευκολία απόκτησης και χειρισμού τους.



Εικόνα 30: Βυθός (αριστερά) και διατομή αμφιβληστροειδή (δεξιά) από ένα πίθηκο, έναν αλφικό κόνικλο και έναν αλφικό επίμου. Ο βυθός του πιθήκου είναι ο πλησιέστερος στον ανθρώπινο, με διαμόρφωση κεντρικού βοθρίου-περιφέρειας αμφ/δής. Ο κόνικλος και ο επίμους έχουν επίσης αμφιβληστροειδή με διαμόρφωση σε στιβάδες.

Όσον αφορά τη δομή του αμφιβληστροειδούς, ο πίθηκος (πρώτη σειρά) είναι ο πλησιέστερος στον άνθρωπο. Έχει έναν κεντρικό βοθρίο χωρίς αιμοφόρα αγγεία, με το νευρικό αμφιβληστροειδή να μετατοπίζεται, αφήνοντας το φως που εκπέμπεται να φωτίζει άμεσα τους φωτοϋποδοχείς. Ωστόσο, οι πίθηκοι είναι ακριβά ζώα για την αγορά και τη συντήρηση, ενώ οι μελέτες των πρωτευόντων υπόκεινται στις αυστηρές δεοντολογικές νομοθεσίες που καθιστούν τη χρήση τους ασύμφορη.

Οι αρουραίοι, στη συνέχεια, έχουν καλώς αναπτυγμένο αμφιβληστροειδικό αγγειακό δίκτυο, όπως στον άνθρωπο, με τις αρτηρίες και τις φλέβες να αναδύονται ακτινοειδώς από τον οπτικό δίσκο. Η δομή του αμφιβληστροειδούς είναι παρόμοια με εκείνη του ανθρώπου, αποτελούμενη από τρεις πυρηνικές στιβάδες (έξω και έσω πυρηνική στιβάδα και στιβάδα γαγγλιακών κυττάρων, ONL, INL, GCL), παρεμβαλλόμενες από τις δύο συναπτικές στιβάδες, τις έξω και έσω δικτυωτές στιβάδες (OPL και IPL).

Τα ζώα είναι σχετικά φθηνά και εκτρέφονται για εργαστηριακή χρήση. Ωστόσο, ο οφθαλμός του αρουραίου είναι μικρός και δύσκολος στο χειρισμό για τέτοιου είδους πειραματισμό και απαιτεί ένα εξειδικευμένο εξοπλισμό για τη διεκπεραίωση των απλών πρακτικών όπως η ενδοϋαλοειδική έγχυση και το ΗΑΓ. Αντίθετα, οι οφθαλμοί των κουνελιών είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος και κοντά στο μέγεθος του ανθρώπινου ματιού και κατά συνέπεια μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για την οφθαλμική έρευνα.

Η δομή του αμφιβληστροειδούς του κονίκλου είναι παρόμοια με την αντίστοιχη των άλλων θηλαστικών και πρωτευόντων. Παρ' όλο που διαθέτει ανεπαρκώς ανεπτυγμένο αγγειακό σύστημα (δεύτερη σειρά) σε σχέση με τον ανθρώπινο, χρησιμοποιείται ευρέως στα πειράματα τοξικότητας και διατίθεται πλέον μεγάλος όγκος δεδομένων, σε σχέση με τη δομή και λειτουργία του αμφ/δή. Αντίστοιχος όγκος διατίθεται για τις μεταβολές που

σχετίζονται με την τοξικότητα, τόσο σε ανατομικό, όσο και σε λειτουργικό επίπεδο (ΗΑΓ), καθιστώντας τον κόνικλο το δημοφιλέστερο πειραματόζωο προς πειραματική χρήση. Επίσης, τα κουνέλια και οι αρουραίοι έχουν αμφιβληστροειδή πλούσιο σε ραβδία (rod-dominant) και επομένως η χρήση τους είναι περιορισμένη, στις μελέτες τοξικότητας του συστήματος των κωνίων.

4.2. Τεχνικές αξιολόγησης αμφιβληστροειδικής τοξικότητας

Η επιλογή των πειραματικών τεχνικών εξαρτώνται από τα ερωτήματα που έχουν τεθεί στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας σε σχέση με τη χρονική εμφάνιση της τοξικότητας, την εντόπιση, τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς κλπ. Συμπεριλαμβάνουν *μορφολογικές και λειτουργικές τεχνικές που ελέγχουν την ανατομική και τη λειτουργική ακεραιότητα του αμφιβληστροειδή αντίστοιχα.*

4.2.1. Αξιολόγηση της ανατομική ακεραιότητας.

Ελέγχεται μακροσκοπικά, μέσω της βυθοσκόπησης και μικροσκοπικά, με την ιστολογική εξέταση των οφθαλμών, μετά από τη θυσία του πειραματόζωου και κατάλληλη επεξεργασία.

4.2.1.1 Βυθοσκόπηση

Ελέγχονται μακροσκοπικά τα σημεία της τοξικότητας στο οπίσθιο ημιμόριο, συμπεριλαμβανομένου του υαλοειδούς, του αγγειακού δικτύου, του οπτικού νεύρου, του ιδίως αμφι/δή, του μελαγχρόου επιθηλίου, αλλά και του χοριοειδή. Οι παράμετροι που

χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των αντίστοιχων δομικών βλαβών είναι το Bioscore, για τη διαφάνεια του υαλοειδούς (0-4), η εμφάνιση χρωστικών βλαβών ή η αλλαγή των χρωστικών χαρακτηριστικών των ιστών (υπερχρωματισμός, υποχρωματισμός) και η έκταση τους, η οποία κατά συνθήκη μετράται σε σχέση με το μέγεθος του οπτικού δίσκου (θηλαία διάμετρος, disc diameter, DD).

4.2.1.2 Ιστολογική μελέτη

Η ιστολογική ανάλυση στο φωτεινό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται για αξιολόγηση των ποιοτικών και ποσοτικών αλλαγών στη δομική ακεραιότητα του αμφιβληστροειδούς. Παράμετροι όπως το πλάτος ολόκληρου του αμφιβληστροειδούς ή / και συγκεκριμένων στιβάδων του αμφιβληστροειδούς, ο αριθμός σειρών των πυρήνων στην έξω πυρηνική στιβάδα, χρησιμοποιούνται συνήθως με στόχο την περιγραφή της δομικής βλάβης του αμφιβληστροειδούς. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία παρέχει μεγαλύτερη ανάλυση και προσφέρει πληροφορία σε ενδοκυττάριο επίπεδο, όταν αυτό είναι απαραίτητο.

4.2.1.3 Ανοσοϊστοχημική και ιστοχημική μελέτη

Ο προσδιορισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνών-δεικτών της κυτταρικής βλάβης με ανοσοϊστοχημεία και η μέτρηση της δραστηριότητάς τους με την ιστοχημεία, μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό και στην παρακολούθηση τους, ώστε να μελετηθεί το εύρος πιθανών αμφιβληστροειδικών προσβολών (GFAP, bNOS, NfL, TH).

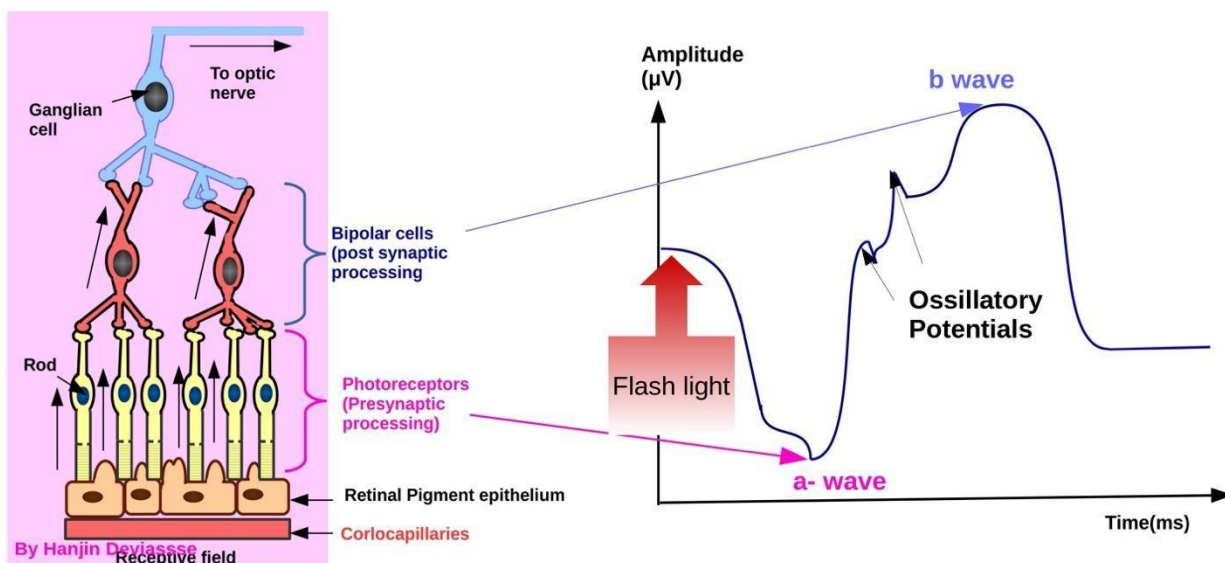
4.2.2 Αξιολόγηση της λειτουργικής ακεραιότητας

Ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα, ΗΑΓ (ElectroRetinoGram, ERG).

Το ΗΑΓ είναι ο κατεξοχήν τρόπος μελέτης της επίδρασης των φαρμάκων στην αμφιβληστροειδική λειτουργία. Αποτελεί τεχνική εκλογής για τα ζωικά μοντέλα, γιατί πρόκειται για έναν αντικειμενικό τρόπο εκτίμησης της αμφιβληστροειδικής λειτουργίας, εφόσον δε στηρίζεται στη συνεργασία του υποκειμένου.

Πρόκειται για την καταγραφή της ηλεκτρικής δραστηριότητας των κυττάρων του αμφιβληστροειδή, μετά από την έκθεσή του σε φωτεινό ερέθισμα μικρής διάρκειας (flash). Το είδος του ERG που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στα μοντέλα της τοξικότητας είναι το πλήρους πεδίου ΗλεκτροΑμφιβληστροειδοΓραφημα (ΗΑΓ), μετά από τη διέγερση με φωτεινό ερέθισμα μικρής διάρκειας (full-field flash ERG).

Το full-field flash ERG προκύπτει από τις αθροιστικές αποκρίσεις των κυττάρων όλου του αμφιβληστροειδή, συνεπώς η πληροφορία που παρέχει αφορά στην καθολική λειτουργία του αμφιβληστροειδή. Το καταγραφόμενο σήμα ενός full-field flash ERG συμπεριλαμβάνει ηλεκτραρνητικές και ηλεκτροθετικές καταγραφές με γνωστή προέλευση (εικόνα 31). Οι κυριότερες καταγραφές είναι το α-κύμα και το β-κύμα, που προέρχονται αντίστοιχα από τους φωτοϋποδοχείς και τις έσω στιβάδες του αμφιβληστροειδή (κατά κύριο λόγο τα δίπολα κύτταρα).

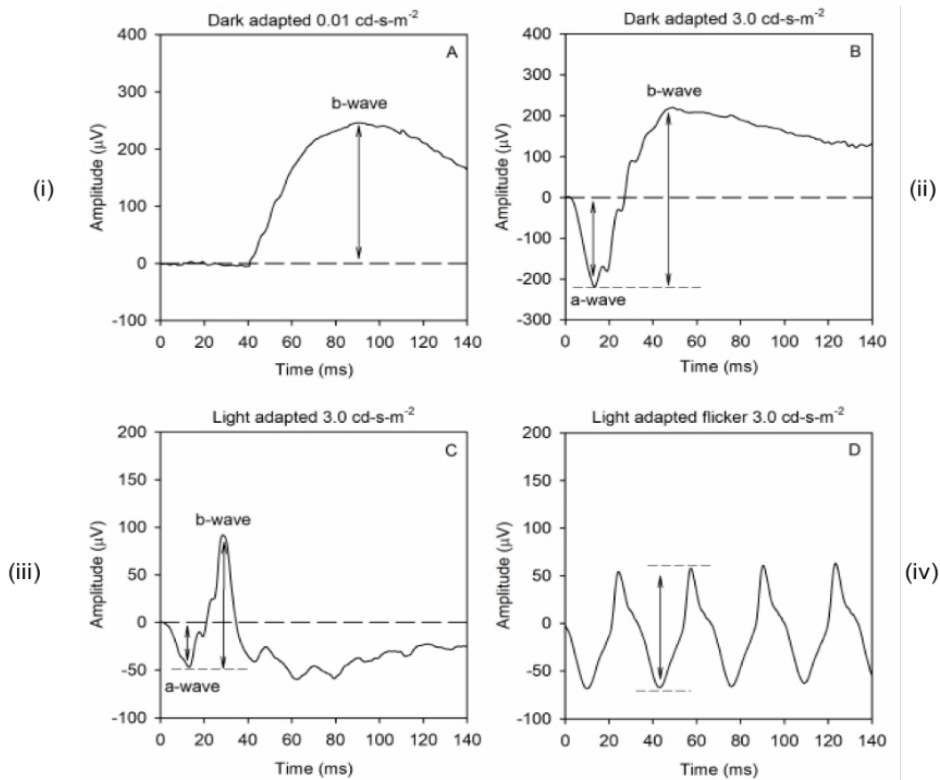


Εικόνα 31: Σχηματική παράσταση της προέλευσης των ηλεκτρικών αποκρίσεων των ΗΑΓ καταγραφών. Το ηλεκτρικό α-κύμα προέρχεται από τη στιβάδα των φωτοϋποδοχέων, ραβδία και κωνία και εμφανίζεται πρώτο στην καταγραφή. Ακολουθεί η αθροιστική απόκριση των εσώτερων στιβάδων (δίπολα, οριζόντια, αμακρίνα κύτταρα) που καταγράφεται ως β-κύμα. Τα δυναμικά ταλάντωσης (Oscillatory Potentials, OP) που καταγράφονται στο ανιόν σκέλος του β-κύματος πιστεύεται ότι προέρχονται από τα αμακρίνα κύτταρα.

Μεταβολές στη μορφολογία του λαμβανόμενου σήματος σηματοδοτούν βλάβες στις αντίστοιχες αμφιβληστροειδικές στιβάδες. Αδρά, μείωση ή απουσία του α-κύματος υποδηλώνει τη βλάβη στη στιβάδα των φωτοϋποδοχέων, ενώ μείωση ή απουσία του β-κύματος, υποδηλώνει διαταραχή του έσω αμφιβληστροειδή. Προφανώς, όταν η απουσία των φωτοϋποδοχέων είναι καθολική, το β-κύμα θα είναι επηρεασμένο.

Με την κατάλληλη επιλογή του φωτεινού ερεθίσματος και υποβάθρου, μπορούν κάθε φορά να απομονωθούν οι αποκρίσεις συγκεκριμένου τύπου κυττάρων. Έτσι, έχουν διαμορφωθεί διεθνή πρωτόκολλα για τον άνθρωπο, με συγκεκριμένες συνθήκες έκθεσης,

με τα οποία ελέγχονται ομάδες κυττάρων κατά περίπτωση, όπως τα ραβδία, τα κωνία, ο έσω αμφιβληστροειδής (εικόνα 32).



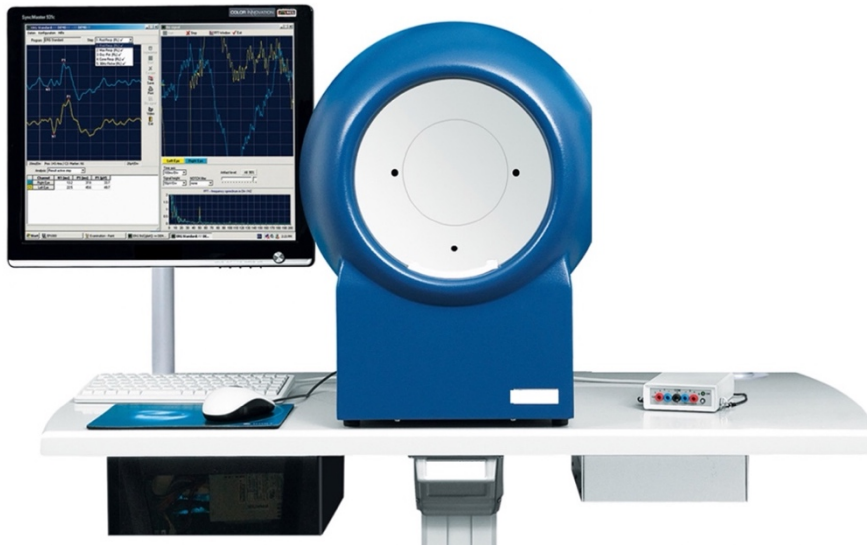
Εικόνα 32: Τυπικές καταγραφές ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφήματος (ΗΑΓ).

Πάνω: Καταγραφές υπό σκοτοπικές συνθήκες μετά από περίοδο προσαρμογής στο σκοτάδι (dark-adapted). (i) μετά από προβολή μονήρους ερεθίσματος (flash) έντασης 0.01db (καταγραφή της δραστηριότητας των ραβδίων κυρίως). (ii) μετά από προβολή μονήρους ερεθίσματος (flash) έντασης 3.0db (μικτή καταγραφή, του έξω και έσω αμφιβληστροειδή).

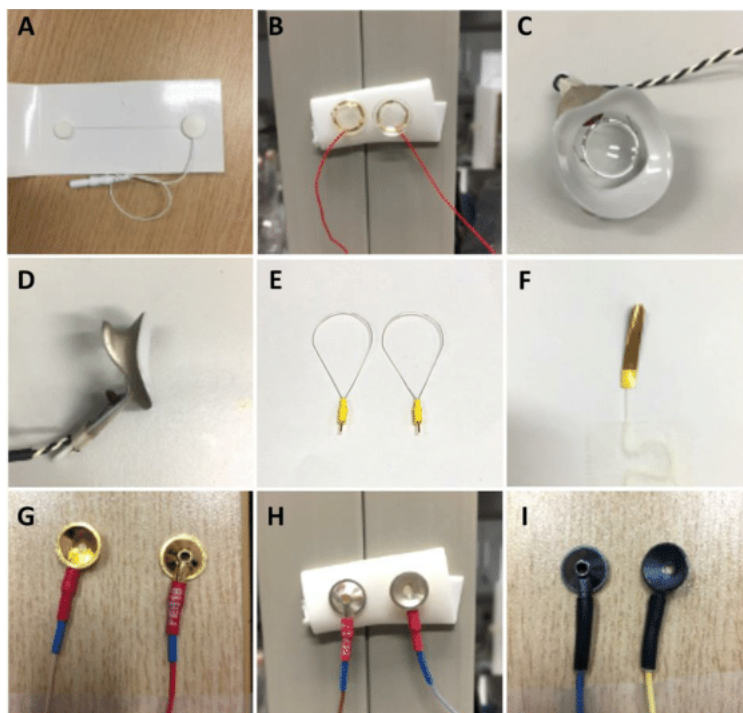
Κάτω: Καταγραφές υπό φωτοπικές συνθήκες (light-adapted). (iii) μετά από προβολή μονήρους flash 3.0db υπό φωτοπικές συνθήκες (μικτή καταγραφή), (iv) πολλαπλών εναλλασσόμενων φωτεινών ερεθισμάτων (flicker flash) 3.0db υπό φωτοπικές συνθήκες (καταγραφή της δραστηριότητας των κωνίων).

Το λαμβανόμενο σήμα/καταγραφή εξαρτάται άμεσα από τη διάρκεια και την ένταση του φωτεινού ερεθίσματος, καθώς επίσης και από τις συνθήκες φωτισμού του περιβάλλοντος χώρου. Τα διεθνή στάνταρ για την καταγραφή του ΗΑΓ στον άνθρωπο, τα οποία έχουν θεσπιστεί από τη διεθνή εταιρεία ηλεκτροφυσιολογίας (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, ISCEV)⁶⁰, διασφαλίζουν αντικειμενικές συνθήκες ως προς τους παραπάνω παράγοντες, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα μεταξύ εργαστηρίων.

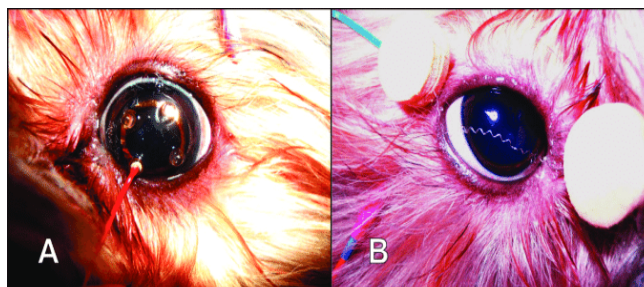
Επιγραμματικά, η εξέταση γίνεται υπό μυδρίαση, ώστε να εξουδετερώνεται ο παράγοντας του μεγέθους της κόρης και ταυτόχρονα να εξασφαλίζεται η μέγιστη φωτεινή ένταση, η οποία φτάνει και διεγείρει τον αμφιβληστροειδή. Επιπρόσθετα, περιλαμβάνονται μετρήσεις υπό συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού: φωτοπικές συνθήκες, που διεγείρουν κατά κύριο λόγο το σύστημα των κωνίων και σκοτοπικές συνθήκες, που διεγείρουν κατά βάση το σύστημα των ραβδίων. Ακόμη, τα χαρακτηριστικά του προβαλλόμενου ερεθίσματος είναι καθορισμένα, ως προς την ένταση και τη συχνότητα, ενώ, τέλος, συστήνεται τεχνικός εξοπλισμός (σύστημα εκπομπής του φωτεινού ερεθίσματος, σύστημα καταγραφής του σήματος, ηλεκτρόδια, ενισχυτές σήματος και μονάδες χρονισμού) με συγκεκριμένες προδιαγραφές, ώστε να εξασφαλίζεται η ποιότητα του σήματος. Ας μην ξεχνάμε ότι αναφερόμαστε σε ηλεκτρικά σήματα του επιπέδου των μVolt , οπότε γίνεται αντιληπτή η σημασία της καθαρότητας του σήματος στην ερμηνεία των καταγραφών. (εικόνες 33,34,35).



Εικόνα 33: Παράδειγμα εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την παραγωγή, εκπομπή και την καταγραφή του φωτεινού ερεθίσματος που θα προκαλέσει την ηλεκτρική διέγερση των κυττάρων του αμφιβληστροειδή. (τροποποιημένη από www.tomey.de)



Εικόνα 34: Είδη ηλεκτροδίων τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταγραφή της ηλεκτροαμφιβληστροειδικής δραστηριότητας. A: DTL αγωγίμες ίνες, B, C, D: κερατοειδικά ηλεκτρόδια επαφής, E: μεταλλικός βρόγχος (αργύρου, χρυσού, πλατίνα), D: φύλλο χρυσού, G, H, I: κυάθια (χρυσό και αργυρό). (Από Man TTC, Yip YWY, Cheung FKF, Lee WS, Pang CP, Brelén ME. Evaluation of Electrical Performance and Properties of Electroretinography Electrodes. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(7):45. S1)



Εικόνα 35: Τύποι ηλεκτροδίων χρησιμοποιούμενοι σε ζώα για την καταγραφή του ΗΑΓ. A: κερατοειδικό ηλεκτρόδιο τύπου φακού επαφής. B: DTL ηλεκτρόδιο (λεπτό μεταλλικό νήμα). (Από Pereira AL, Montiani-Ferreira F, Santos VR, Salomão SR, Souza C, Berezovsky A. Electroretinography in dogs using a fiber electrode prototype. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(3):257-262.)

Η προσαρμογή των προαναφερθέντων παραμέτρων στις φυσιολογικές ιδιαιτερότητες του αμφιβληστροειδή εκάστοτε πειραματόζωου, αλλά και στις τεχνικές δυσκολίες που μπορεί να παρουσιάζει η καταγραφή του ΗΑΓ στα πειραματόζωα, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ερευνητικών πρωτόκολλων ανά εργαστήριο. Θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη στο αντίστοιχο κεφάλαιο του ειδικού μέρους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Σκοπός της Έρευνας

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι διπτός. Καταρχάς, να περιγράψει ποσοτικά την κυκλοφορία του BNN27, τόσο στη συστηματική κυκλοφορία, όσο και στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού, στον αμφιβληστροειδή και στο υαλώδες σώμα, έπειτα από συστηματική (ενδοπεριτοναϊκή) και τοπική (ενδοϋαλοειδική) χορήγηση. Επιπλέον, να διερευνήσει την ενδεχόμενη ύπαρξη αμφιβληστορειδικής τοξικότητας του μορίου έπειτα από ενδοϋαλοειδική χορήγηση BNN27 εύρους δοσολογιών του.

Η ποσοτική ανίχνευση του μορίου στον αμφιβληστροειδή έπειτα από συστηματική χορήγηση θα αποδείξει ότι το μόριο διαπερνά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό. Η σημασία του γεγονότος αυτού είναι διπλή. Αφενός θα επιβεβαιώσει την ύπαρξη του μορίου στον ιστό, η οποία υποδηλώνεται στα υπάρχοντα μοντέλα αμφιβληστροειδικών παθήσεων μέσω της βιολογικής δράσης του μορίου. Αφετέρου, λόγω της ομοιότητας των δύο φραγμών, του αιματοαμφιβληστροειδικού και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, θα ενισχυθεί περαιτέρω η πεποίθηση ότι το μόριο διαπερνά και τον ΑΕΦ, όπως έχει αναδειχθεί με τη βιολογική του δράση, στις μέχρι τώρα μελέτες του ρόλου του σε μοντέλα εκφυλιστικών, και άλλων παθήσεων του ΚΝΣ. Η συγκεκριμένη πληροφορία αποτελεί κλειδί στην παγίωση/επικύρωση της ορθότητας των δεδομένων της βιολογικής δράσης του μορίου και τοποθετεί την περαιτέρω έρευνα σε πιο στέρεη βάση.

Επιπρόσθετος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη του BNN27, μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση, της μεθόδου εκλογής χορήγησης φαρμάκων, τα οποία στοχεύουν σε αμφιβληστροειδικές παθήσεις. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός φαρμάκου στο υαλώδες σώμα, καθώς και η εξέταση ύπαρξης αμφιβληστροειδικής

τοξικότητας μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση, είναι απαραίτητες διαδικασίες για κάθε νέο φάρμακο που εισάγεται στη θεραπευτική του οπίσθιου ημιμορίου. Αφενός, η γνώση της φαρμακοκινητικής ενός μορίου στην υαλοειδική κοιλότητα είναι αναγκαία για τη διαμόρφωση της συχνότητας χορήγησης ενός μορίου ενδοϋαλοειδικά. Αφετέρου, η διερεύνηση ύπαρξης ή μη αμφιβληστροειδικής τοξικότητας μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση ενός μορίου, μπορεί να θέσει τα όρια ασφαλείας για τις μελλοντικές χορηγούμενες συγκεντρώσεις.

6. Μεθοδολογία

Όπως προαναφέρθηκε, σκοπός της διατριβής ήταν, περιληπτικά, η μελέτη της παρουσίας και αλληλεπίδρασης του BNN27 με το οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού σε ζωικά μοντέλα. Καθώς όμως πρόκειται για πρωτότυπο μόριο, κρίθηκε απαραίτητο να συμπεριληφθεί και η συστηματική φαρμακοκινητική του, η οποία δεν είχε ως τώρα μελετηθεί και συνιστά σημαντική πληροφορία για τη φαρμακοκινητική περιγραφή ενός νεοσυντεθιμένου μορίου.

Η τελική πειραματική διαμόρφωση ήταν η εξής: φαρμακοκινητική μελέτη του BNN27 στη συστηματική κυκλοφορία μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, φαρμακοκινητική μελέτη του BNN27 στον αμφιβληστροειδή μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, φαρμακοκινητική μελέτη του BNN27 στο υαλοειδές μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση και τέλος μελέτη της ενδεχόμενης ύπαρξης τοξικότητας του BNN27 στον αμφιβληστροειδή, μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση.

Όλα τα πειράματα ακολούθησαν τις οδηγίες της ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), για τη χρήση πειραματόζων στην οφθαλμολογία και τις επιστήμες της όρασης, τον Κώδικα Δεοντολογίας Έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης (2012), καθώς και την ευρωπαϊκή νομοθεσία αναφορικά με τα πειράματα στα ζώα (Directive/2010/63/EU).

6.1. Ποσοτικός προσδιορισμός- Υγρή Χρωματογραφία/ Φασματομετρία Μάζας (LC/MS)

Αρχικά, στη μελέτη, χαρακτηρίστηκαν χρωματογραφικά και τα τρία BNN, με τις νευροπροσταυτετικές ιδιότητες (όπως περιγράφηκε στο γενικό μέρος), το BNN20, 23 και 27. Εξ' αυτών, επιλέχθηκε τελικά ως αντικείμενο μελέτης το BNN27, ενώ το BNN20 χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard-IS) στην τεχνική της ποσοτικοποίησης με LC-MS.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του BNN27 στα τρία είδη ιστού, ορό αίματος, αμφιβληστροειδή και υαλοειδές, επιχειρήθηκε η χρήση μίας ενιαίας μεθόδου. Το παραπάνω υλοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS)⁶¹, με τις αντίστοιχες τροποποιήσεις για κάθε ιστό.

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μια δυαδική LC αντλία (Shimadzu Prominence LC), ένα σύστημα απαέρωσης κενού, ένα αυτόματο δειγματολήπτη και ένα θερμαινόμενο / ψυχόμενο διαμέρισμα στήλης. Ένα μίγμα διαλυτών από: νερό - μεθανόλη - μυρμηκικό οξύ (89.7-10-0.3%) (διαλύτης A) και από μεθανόλη - μυρμηκικό οξύ (99.7- 0.3%) (διαλύτης B), επιλέχθηκαν για τη κινητή φάση με ρυθμό ροής 0.6ml/min.

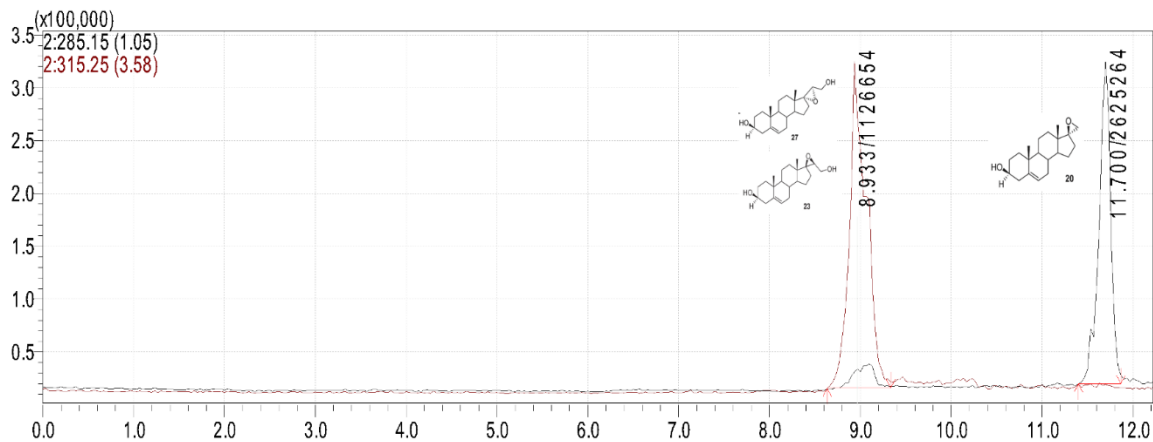
Παράλληλα, ένας φασματογράφος μάζας (LCMS-2010 EV Shimadzu) συνδεδεμένος με ένα θερμαινόμενο σωλήνα χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI) και ένα μονό τετράπολο (Q), χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των BNNs, με την τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (selected ion monitoring, SIM). Οι θερμοκρασίες του θερμαινόμενου σωλήνα, του CDL, του θερμικού μπλοκ ήταν

400° C, 250° C και 200° C αντίστοιχα. Η τάση του ανιχνευτή ήταν 1,5 kV, η ροή του αερίου εκνέφωσης 2,5 L / min και το αέριο ξήρανση ρυθμίστηκε στα 0.02 MPa.

Τα διαλύματα παρασκευάζονται σε συνθήκες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής (GMP) σε μεγάλη κλίμακα, υπό τη μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης. Όλη η ποσότητα στην πρωτογενούς σκόνης των BNN μορίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν μια ευγενική προσφορά της Bionature E.A. Ltd (Patent number: WO2008/155534 A2).

Η μεθανόλη (LC-MS grade) αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich (3050 Spruce street, St Louis, USA). Αντίστοιχα, το μυρμηγκικό οξύ από τη Riedel-de Haen (Sigma Aldrich, Laborchemikallen, GmbH, D-30926, Seelze); το υπερ-καθαρό (ultra-pure) νερό παράχθηκε από ένα σύστημα καθαρισμού νερού (Direct-Q 3UV, Merck, Germany). Οι Bond elut C-18 SPE (Solid Phase Extraction) κολώνες έκλουσης για την HPLC, αγοράστηκαν από την Agilent Technologies (USA).

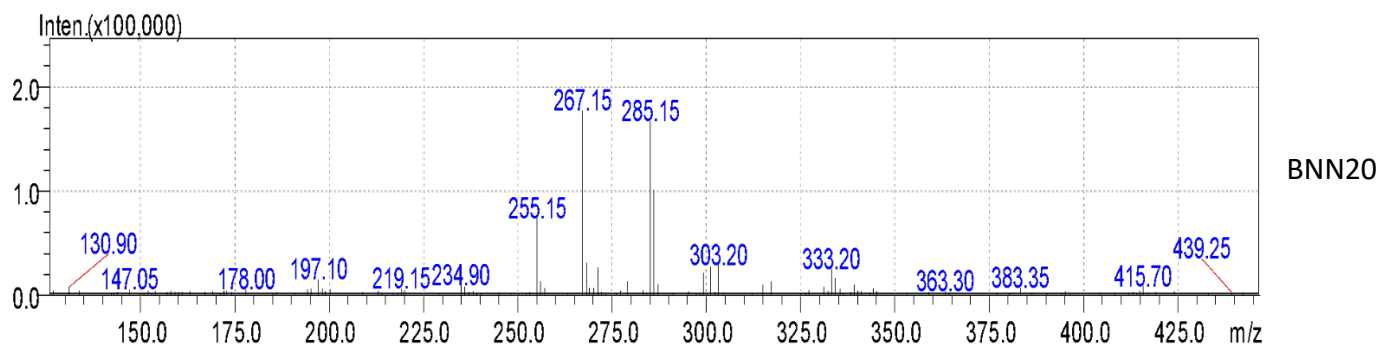
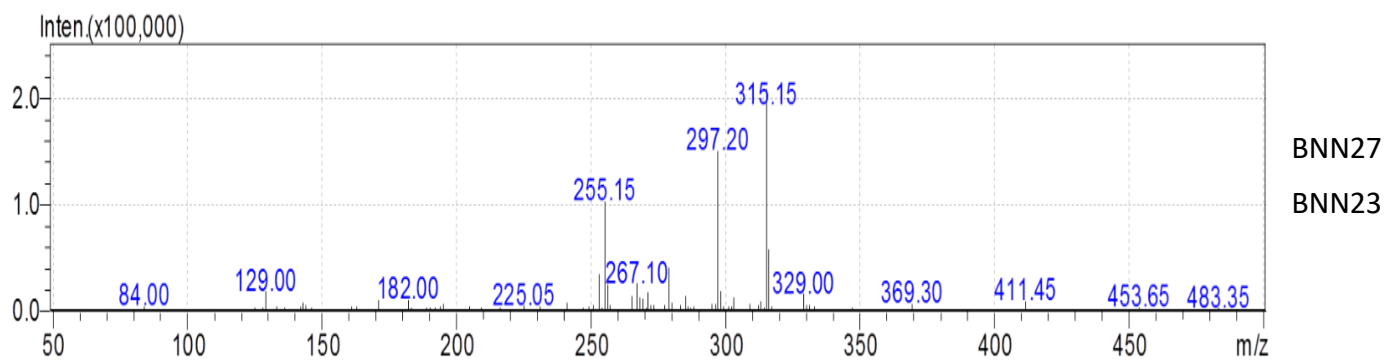
Η έκλουση έγινε μέσα από στήλη Discovery C18 HPLC στήλη (250 x 4.6mm, 5 μm, Supelco, (Bellefonte, USA) στους 30° C. Υπό τις περιγραφόμενες συνθήκες, το BNN27 και το BNN23 εκλούστηκαν σε 8.93min και το BNN20 σε 11.7min. Ο όγκος κάθε δείγματος που εισερχόταν στην κολώνα ήταν 30μL.



Σχήμα 1: Έκλουση BNN27, BNN23, BNN20, σε καθορισμένες συνθήκες.

Για κάθε BNN, διαχωρίστηκαν τα παρακάτω κλάσματα m/z : BNN20: **285,15**, 267.15 και 255.15 , BNN27: **315.15**, 297.20 και 255.15 (σε bold το m/z που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση) και BNN23: **315,25** 297,2 285,25 255,2.

Όπως παρατηρείται τόσο από τους χρόνους έκλουσης όσο και από το φάσμα μαζών, τα BNN23 και BNN 27 ήταν μεταξύ τους πρακτικά αδιαχώριστα. Επιλέχθηκε εν τέλει το BNN27 ως το μόριο μελέτης, γιατί είναι το περισσότερο μελετημένο στα βιολογικά πειράματα και ως εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard) επιλέχθηκε το BNN20.



Σχήμα 2: Φάσμα μαζών BNN27, BNN23, BNN20.

6.2. Φαρμακοκινητική μελέτη

Για την φαρμακοκινητική μελέτη στη συστηματική κυκλοφορία και τον αμφιβληστροειδή, χρησιμοποιήθηκε μη-διαμερισματική ανάλυση, εφόσον η κατανομή του μορίου μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση είναι άγνωστη. Επίσης, για τη μελέτη του BNN27 μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση ενός διαμερίσματος, για τους λόγους που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 3.3.

Στατιστική ανάλυση

Για τον υπολογισμό των φαρμακοκινητικών παραμέτρων και τη δημιουργία των διαγραμμάτων (και curve-fitting) χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα GraphpadPrism 9.0 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, USA) και PKfs of Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA, USA).

6.2.1. Φαρμακοκινητική μετά από Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση

6.2.1.1. Σχηματισμός μίγματος BNN27 για ενδοπεριτοναϊκή χρήση

Το μίγμα του BNN27 προετοιμάζεται σε δύο χρόνους. Σε πρώτο χρόνο, η σκόνη του λιπόφιλου αυτού μορίου διαλύεται σε καθαρή αιθανόλη στους 60° C και φυλάσσεται σε αποστειρωμένα στεγανά γυάλινα μικροφουαλίδια, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση. Το δεύτερο στάδιο προετοιμασίας γίνεται αμέσως πριν την έγχυση και περιλαμβάνει διάλυση του αλκοολικού διαλύματος σε ενέσιμο ύδωρ (Water for Injection, WFI) και καλή ανακίνηση της σύριγγας πριν από την έγχυση, ώστε να δημιουργηθεί μια ομοιογενής αδιάφανη κολλοειδής διασπορά.

Με το συγκεκριμένο τρόπο, βελτιστοποιείται η διάλυση της υδρόφοβης μικρονευροτροφίνης στον υδατικό διαλύτη και αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματωμάτων του υδρόφοβου στοιχείου μέσα στο νερό.

Η ποσότητα αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν πάντα σταθερή και η ελάχιστη δυνατή, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διάλυση της σκόνης του BNN27, στη μέγιστη χρησιμοποιούμενη δόση. Το τελικό ενέσιμο μίγμα ήταν περιεκτικότητας 6% v/v σε αιθανόλη.

6.2.1.2. Φαρμακοκινητική του BNN27 στη συστηματική κυκλοφορία

6.2.1.2.1. Σχεδιασμός πειράματος- τυχαιοποίηση

Για την ανάλυση της φαρμακοκινητικής του BNN27 στη συστηματική κυκλοφορία (ορός) χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες, 2-3 μηνών, C57BL/6 μύες, αρσενικοί και θηλυκοί, βάρους 23-26g. Η συγκέντρωση του εγχέομένου μίγματος σε BNN27, ήταν 100mg/kg β.σ. Για την έγχυση χρησιμοποιήθηκε σύριγγα ινσουλίνης με βελόνα διαμέτρου 21G, για την απρόσκοπτη διέλευσης της κολλοειδούς διασποράς. Η έγχυση έγινε στο οπίσθιο αριστερό τεταρτημόριο της κοιλιάς, με εισαγωγή της βελόνης κατά το ήμισυ, για να αποφευχθεί ο τραυματισμός των σπλάχνων του πειραματόζωου.

Τα ζώα διέμεναν σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία, 20-24° C, φωτοπερίοδο 12 ώρες και είχαν πρόσβαση σε νερό και τροφή. Στεγάστηκαν 2-3 ζώα του ίδιου φύλου ανά κλωβό. Δεν υπήρχαν γνωστές προσμίξεις στα τρόφιμα ή το νερό που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη διεξαγωγή της μελέτης.

Σαράντα δύο C57BL/6 μυσ τυχαιοποιήθηκαν σε επτά (7) χρονικά σημεία. Σε κάθε

χρονικό σημείο, πέντε ζώα (n = 5) έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά 100mg/kg β.σ. του μίγματος BNN27 και ένα ζώο χρησίμευσε ως τυφλός μάρτυρας.

Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε στα επιλεγμένα χρονικά σημεία που ήταν: 0, 30 λεπτά, 1 ώρα, 2, 4, 6, 24 ώρες μετά την ένεση. Το αίμα συλλέχθηκε οπισθοβολβικά με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur υπό ελαφρά αναισθησία και στη συνέχεια τα ζώα υποβλήθηκαν σε ευθανασία (εισπνοή διαιθυλαιθέρα). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 8000 rpm για 20 λεπτά στους 4° C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4-8° C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

6.2.1.2.2. Προετοιμασία δείγματος για ποσοτικοποίηση

Παράλληλα, δημιουργήθηκαν τα φορτισμένα διαλύματα ορού σε συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 250, 500 ng/ml. Η εξαγωγή του BNN27 από τον ορό πραγματοποιήθηκε με SPE εκχύλιση (στερεάς φάσης). Εν ολίγοις, τα φορτισμένα και τα πρότυπα δείγματα ορού (0.1-0.2ml) διαλύθηκαν σε 0.5ml απιονισμένου νερού, όπου προστέθηκαν 100ng BNN20 ως IS.

Το αραιωμένο διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά και στη συνέχεια φορτώθηκε στην κολώνα έκλουσης στερεάς φάσης (C18, 1ml/100mg). Οι κολώνες ενεργοποιήθηκαν επιπλέον με 1ml μεθανόλης και πλύθηκαν με 1ml νερού. Τα αναλυόμενα διαλύματα εκλούστηκαν με 1ml διαιθυλαιθέρα. Το τελικό έκλουσμα αφέθηκε να εξατμιστεί μέχρι ξηρού υπό ελαφρό ρεύμα αζώτου στους 35° C, αναδομήθηκε σε 100μl μεθανόλης και από αυτά, 30μl εγχύθηκαν στο σύστημα LC-MS.

6.2.1.3. Φαρμακοκινητική του BNN27 στον αμφιβληστροειδή

6.2.1.3.1. Σχεδιασμός πειράματος- τυχαιοποίηση

Όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση BNN27 στον αμφιβληστροειδή, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες αρουραίοι Sprague-Dawley (S-D), 2-3 μηνών, αρσενικοί και θηλυκοί, βάρους 250-350g. Η συγκέντρωση του εγχεόμενου μίγματος σε BNN27 ήταν 30mg/kg β.σ. Για την έγχυση χρησιμοποιήθηκε σύριγγα ινσουλίνης με βελόνα διαμέτρου 21G, με στόχο την απρόσκοπτη διέλευση της κολλοειδούς διασποράς. Η έγχυση έγινε στο οπίσθιο αριστερό τεταρτημόριο της κοιλιάς, με εισαγωγή βελόνης κατά το ήμισυ για ν' αποφευχθεί ο τραυματισμός σπλάχνων του πειραματόζωου.

Τα ζώα διέμεναν σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία, 20-24° C, φωτοπερίοδο 12 ώρες και είχαν πρόσβαση σε νερό και τροφή. Στεγάστηκαν 2-3 ζώα του ίδιου φύλου ανά κλωβό. Δεν υπήρχαν γνωστές προσμίξεις στα τρόφιμα ή το νερό που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη διεξαγωγή της μελέτης.

Σαράντα οκτώ S-D επίμυες τυχαιοποιήθηκαν σε οχτώ (8) χρονικά σημεία. Σε κάθε χρονικό σημείο, πέντε ζώα (n = 5) έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά 30mg / kg β.σ. του μίγματος BNN27 και ένα ζώο χρησίμευσε ως τυφλός μάρτυρας. Οι αμφιβληστροειδείς αμφοτέρων των οφθαλμών απομονώθηκαν μετά από εξόρυξη στα επιλεγμένα χρονικά σημεία που ήταν: 0, 15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 2, 4, 6 και 24 ώρες μετά από την ένεση.

Η εξόρυξη πραγματοποιήθηκε μετά από την ευθανασία (εισπνοή διαιθυλαιθέρα) στην εκάστοτε χρονική στιγμή. Η απομόνωση του αμφιβληστροειδή έγινε με κατάλληλους λεπτούς χειρισμούς. Αμφότεροι οι αμφιβληστροειδείς από κάθε επίμυ χρησίμευσαν ως ένα δείγμα (1 ζώο = 1 δείγμα, n=5 ανά χρονικό σημείο), ώστε να μεγιστοποιηθεί η

ποσότητα ιστού ανά δείγμα και να εξουδετερωθούν οι τυχόν διαφορές κατανομής του φαρμάκου ανά οφθαλμό.

Τη χρονική στιγμή της μέγιστης μετρούμενης συγκέντρωσης (t_{cmax}), έξι (6) ακόμη ζώα προστέθηκαν στη μελέτη. Στη δεδομένη χρονική στιγμή, τα ζώα υποβλήθηκαν σε μια διαδικασία διακαρδιακής έκχυσης (transcardial perfusion) της κυκλοφορίας. Εξ' αυτών, τα πέντε (n=5) πήραν επίσης ενδοπεριτοναϊκά 30mg/kg β.σ BNN27 και ένας επίμυς πήρε ενδοπεριτοναϊκά τον αντίστοιχο όγκο του διαλύματος φορέα (αιθανόλη 6% v/v).

6.2.1.3.2. Διακαρδιακή έκχυση (transcardial perfusion)

Με τη συγκεκριμένη τεχνική, απομακρύνεται το ενδοαγγειακό αίμα από το σώμα του πειραματόζωου, με σκοπό να αντικατασταθεί από κάποιο άλλο διάλυμα (πχ, ισοτονικά διαλύματα, μονιμοποιητικά διαλύματα), αναλόγως με το σκοπό του εκάστοτε πειράματος. Στην παρούσα μελέτη, ο σκοπός της τεχνικής ήταν να απομακρύνει το ενδοαγγειακό BNN27 από τον αμφιβληστροειδή, χωρίς να αλλοιώσει τον ιστό, οπότε χρησιμοποιήθηκε ισότονο διάλυμα Ringer's lactate (RL).

Γίνεται αντιληπτό ότι απομακρύνοντας το ενδοαγγειακό BNN27, η ποσότητα BNN27 που μετρείται στη συνέχεια, αντιστοιχεί ευθέως στο ενδοϊστικό BNN27, αυτό δηλαδή που ουσιαστικά πέρασε τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό και βρίσκεται μέσα στον αμφιβληστροειδικό ιστό. Τουτέστιν, η μέτρηση επιπέδων BNN27 στους αμφιβληστροειδείς των ζώων που επιβλήθηκαν σε διακαρδιακή έκχυση επισφραγίζει τη διέλευση του ΑΑΦ από το BNN27.

Επιλέχθηκε η χρονική στιγμή της μέγιστης συγκέντρωσης, προκειμένου να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες ανίχνευσης της μικρονευροτροφίνης στο μικρό από τη

φύση ιστό του αμφιβληστροειδή του επίμυος, εφόσον εξαρχής οι μετρούμενες ποσότητες που ανιχνεύονταν ήταν μικρές.

Η διαδικασία της διακαρδιακής έκχυσης πραγματοποιήθηκε ως εξής: 100mg/kg β.σ. νατριούχου πεντοβαρβιτάλης (200mg/ml) ενίονται ενδοπεριτοναϊκά, ώστε το πειραματόζωο να εισαχθεί σε βαθιά αναισθησία. Πριν τη διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας, ελέγχεται το αντανακλαστικό του πόνου μετά από τσίμπημα της πατούσας (πρέπει να είναι αρνητικό). Στη συνέχεια, διανοίγεται η θωρακική και η κοιλιακή κοιλότητα και αποκαλύπτεται το καρδιοπνευμονικό σύμπλεγμα, το διάφραγμα, το ήπαρ και τα λοιπά σπλάχνα της κοιλιάς. Εισάγεται στην Αριστερή Κοιλία και σταθεροποιείται στην αορτή βελόνη 19G και στη συνέχεια τέμνεται ο Δεξιός Κόλπος, ώστε να επιτρέπεται η ροή του αίματος.

Η διάχυση αρχίζει με την παροχή στην καθετηριασμένη αορτή ηπαρινισμένου διαλύματος Ringer's Lactate Solution (RL) με ρυθμό 20ml/min για 10min (ή μέχρι να αποχρωματιστεί το ήπαρ) (NADIA Scientific Core IHC Perfusion Protocol). Στο σημείο αυτό, γίνεται η ευθανασία και ακολουθεί η εξόρυξη, η απομόνωση και η επεξεργασία των δύο αμφιβληστροειδών με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω.

6.2.1.3.3. Απομόνωση αμφιβληστροειδή

Η διαδικασία εφαρμόστηκε κάθε φορά που απαιτήθηκε η απομόνωση του ιστού (δημιουργία πρότυπων και φορτισμένων διαλυμάτων, δημιουργία διαλυμάτων μελέτης). Μετά την εξόρυξη, οι οφθαλμοί τοποθετούνται σε PBS, το οποίο αποτελεί το μέσο της συντήρησης του ιστού σε όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας του, μέχρι το επόμενο στάδιο, το οποίο είναι η προετοιμασία του για την LC-MS ανάλυση.

Αρχικά, αποχωρίζεται το πρόσθιο από το οπίσθιο ημιμόριο, με ψαλίδι Wescott και λαβίδα επιπεφυκότα και το πρόσθιο ημιμόριο, μαζί με το φακό, απομακρύνονται. Το οπίσθιο ημιμόριο είναι πλέον διαθέσιμο για την απομόνωση του αμφιβληστροειδή. Με λαβίδα Moorfields καθλώνεται ο σκληρός σε στερεή επιφάνεια και με τη βοήθεια του οφθαλμικού σπόγγου τύπου stick (τριγωνάκι), αποκολλάται ο αμφιβληστροειδής από το υποκείμενο μελάγχρουν επιθήλιο και λοιπό οφθαλμικό ιστό, με μία απότομη κίνηση.

Με το συγκεκριμένο χειρισμό, επιτυγχάνεται η αποκόλληση στο ακέραιο του ιστού και η απόσπαση από την οπτική θηλή, με ασήμαντες απώλειες. Στη συνέχεια, ο αμφιβληστροειδής μεταφέρεται γρήγορα σε PBS με έκπλυση από τον σπόγγο, μέχρι το επόμενο βήμα της επεξεργασίας που ξεκινάει άμεσα.

6.2.1.3.3. Προετοιμασία δείγματος για ποσοτικοποίηση

Με απώτερο στόχο την ανάλυση των αμφιβληστροειδικών δειγμάτων, αμφότεροι αμφιβληστροειδείς από κάθε επίμυ προστίθενται σε 2ml μεθανόλης. Αρχικά το δείγμα ομογενοποιείται μηχανικά και στη συνέχεια υπερηχητικά για 60sec στα 30KHz (UP100H, Hielscher US Tech, Germany). Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση, στις 14000rpm για 60', στους 4° C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και αφήνεται να εξατμιστεί μέχρι ξηρού, υπό ρεύμα αζώτου. Στο υπόλειμμα προστίθενται 100μL μεθανόλης και από το τελικό διάλυμα, τα 30μL εγχέονται στο LC-MS σύστημα. Τα φορτισμένα διαλύματα δημιουργήθηκαν από αμφιβληστροειδείς ζώων που δεν έλαβαν ουσία, σε συγκεντρώσεις από 0 ως 5260 ng/g ιστού.

6.2.1.4. Φαρμακοκινητική ανάλυση/φαρμακοκινητικές παράμετροι

Όσον αφορά το σχηματισμό της καμπύλης μεταβολής της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο, υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές, καθώς και το τυπικό σφάλμα από n=5 τιμές συγκέντρωσης ουσίας για κάθε χρονική στιγμή, τόσο για τα δεδομένα του ορού όσο και για τα δεδομένα του αμφιβληστροειδή. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της MNT μετά από την διακαρδιακή έκχυση δε συμπεριλήφθηκε στην καμπύλη.

Με στόχο τη φαρμακοκινητική ανάλυση στον ορό και στον αμφιβληστροειδή, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν με τη μη - διαμερισματική ανάλυση. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν στην επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (area under the time curve, AUC) (χρονική στιγμή μηδέν) και την επιφάνεια κάτω από την καμπύλη την πρώτη στιγμή (area under the first moment curve, AUMC). Όλες οι συγκεντρώσεις που ήταν μικρότερες από το όριο της ποσοτικοποίησης θεωρήθηκαν ως μηδέν.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η AUC και η AUMC υπολογίστηκαν με τον κανόνα του τραπεζίου. Για τα δεδομένα του ορού του αίματος των μυών, το τελικό τμήμα της AUC υπολογίζεται ως $C_{p(\text{last})}/k'$, όπου k' είναι ο τελευταίος εκθετικός όρος που υπολογίζεται από το γράφημα C_p έναντι χρόνου (C_p , η μετρούμενη συγκέντρωση στη δεδομένη χρονική στιγμή). Για τα δεδομένα του αμφιβληστροειδούς (στους επίμυες), ο τελευταίος υπολογισμός δεν ήταν απαραίτητος, καθώς η συγκέντρωση που μετρήθηκε στα τελευταία χρονικά σημεία ήταν ήδη κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Ο χρόνος της μέσης παραμονής στον ιστό (Mean Residence Time, MRT) υπολογίστηκε ως ο λόγος AUMC / AUC και η φαινόμενη σταθερά ρυθμού απομάκρυνσης (apparent elimination rate constant) K_{el} ως $1 / MRT$, και για τους δύο ιστούς (αίμα και αμφιβληστροειδής). Από τα δεδομένα συγκέντρωσης στον ορό, η ολική κάθαρση (Cl_{tot})

υπολογίστηκε ως D_0 / AUC (D_0 = ποσότητα χορηγούμενου φαρμάκου) παραδεχόμενοι την υπόθεση ότι η βιοδιαθεσιμότητα του BNN27 είναι 100% ($F = 1$) μετά από ip χορήγηση.

6.2.2. Φαρμακοκινητική μετά από Ενδοϋαλοειδική χορήγηση

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες κόνικλοι, 2.5-3.5kg, αρσενικοί και θηλυκοί. Επιπλέον, επιλέχθηκαν κόνικλοι με φυσιολογική χρωστική, κατ' αναλογία με τον ανθρώπινο οφθαλμό. Οι κόνικλοι διέμεναν σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 20-24°C και φωτοπερίοδο 12 ώρες. Ένας κόνικλος καταλάμβανε κάθε κλωβό και είχε ad libitum πρόσβαση σε τροφή και νερό. Δεν υπήρχαν γνωστές προσμίξεις στα τρόφιμα ή το νερό που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη διεξαγωγή της μελέτης.

Πριν από οποιαδήποτε διαδικασία (το πειραματόζωο αναισθητοποιούνταν με μίγμα υδροχλωρικής κεταμίνης (35mg/kg) και ξυλαζίνης (5mg/kg), παραμένοντας υπό διαρκή παρακολούθηση. Εφαρμοζόταν επιπρόσθετη τοπική αναισθησία στους οφθαλμούς (1 σταγόνα προξυμετακαΐνης, ALCON Lab, Hellas AEBE). Η ευθανασία γινόταν με ενδοφλέβια νατριούχο πεντοβαρβιτάλη 150 mg/kg β.σ.

6.2.2.1. Σχηματισμός μίγματος BNN27 για ενδοϋαλοειδική χρήση

Αρχικά, υπολογίστηκε η συγκέντρωση BNN27, το οποίο θα χορηγούνταν ενδοϋαλοειδικά (intravitreally, IVT). Για τον υπολογισμό, χρησιμοποιήθηκε ως δόση αναφοράς, εκείνη η οποία χορηγήθηκε συστηματικά (ενδοπεριτοναϊκά) για τον υπολογισμό των επιπέδων BNN27 στον αμφιβληστροειδή και έγινε αναγωγή της στον όγκο του υαλοειδούς. Ο μέσος όρος του όγκου του υαλοειδούς των κόνικλων έχει

υπολογιστεί σε 1.1ml(+/-0.2) από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας⁶², οπότε η δόση ενδοϋαλοειδικής χορήγησης υπολογίστηκε στα 6mg/ml.

Χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός διαλύτης η καθαρή αιθανόλη, σε συγκέντρωση 6% v/v (σε ενέσιμο ύδωρ).

Κάθε φορά, κατασκευαζόταν σε μία σύριγγα ινσουλίνης 1ml μίγματος, από το οποίο απομακρυνόταν τα 0.9ml και εγχέονταν το τελευταίο 0.1ml. Προηγούνταν μηχανική ανακίνηση για 30sec, για να επιτευχθεί η βέλτιστη ομογενοποίηση πριν από την έγχυση.

6.2.2.2. Ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις

Η διαδικασία εφαρμόζεται για την πραγματοποίηση ενδοϋαλοειδικών εγχύσεων στα κουνέλια σε οποιαδήποτε στιγμή του πειράματος, εφόσον απαιτείται (κινητική μελέτη, μελέτη τοξικότητας).

Πριν από την έγχυση, προηγείται μυδρίαση με σταγόνες τροπικαμίδης 0,5% και φαινυλεφρίνης 5% και η περιοχή αποστειρώνεται με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης 5%. Τοποθετείται βλεφαροδιαστολέας και χρησιμοποιείται διαβήτης για να υπολογίζεται με ακρίβεια η απόσταση από το χειρουργικό Σκληροκερατοειδικό Όριο (ΣΚΟ). Η βελόνη εισάγεται κατά το ½ στον οφθαλμό, άνω κροταφικά, 1.5-2mm οπισθιότερα από το ΣΚΟ και κάθετα προς την επιφάνεια του οφθαλμού.

Με τη συγκεκριμένη τεχνική, αποφεύγεται η επαφή με τον κρυσταλλοειδή φακό και η πρόκληση του τραυματικού καταρράκτη, καθώς και η πρόκληση της αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή χιτώνα (εφόσον η κατεύθυνση ορίζεται οπισθιότερα) ή αιμορραγίας του ακτινωτού σώματος (κατεύθυνση προσθιότερα), επειδή στη συγκεκριμένη απόσταση, η

υποκείμενη περιοχή της εισαγωγής της βελόνης, αντιστοιχεί σε ανάγγεια περιοχή του ραγοειδή χιτώνα (pars plana).

Η ενδοϋαλοειδική έγχυση γίνεται με βελόνη 27G, αντί για τη συνήθη βελόνη 30G των ενδοϋαλοειδικών εγχύσεων, για τη διευκόλυνση της ομαλής προώθησης της κολλοειδούς διασποράς του BNN27. Έπειτα από την ένεση του μίγματος, η βελόνη διατηρείται για 10 δευτερόλεπτα εντός του οφθαλμού, με στόχο την ελαχιστοποίηση της απώλεια της ουσίας, λόγω παλινδρόμησης (reflux) και στη συνέχεια απομακρύνεται αργά. Ελέγχεται επισκοπικά η θέση εναπόθεσης του κολλοειδούς (η αδιαφανής του σύσταση το κάνει ορατό) και η ακεραιότητα του φακού.

Στο τέλος της διαδικασίας, για την προφύλαξη από μετεγχειρητική ενδοφθάλμια λοίμωξη (ενδοφθαλμίτιδας), εφαρμόζεται η τοπική αγωγή με την οφθαλμική αλοιφή τομπραμυκίνη 0.3mg/g (αντιβιοτικό ευρέως φάσματος και ταχείας δράσης), 3 φορές την ημέρα για 5 ημέρες, όταν πρόκειται για κόνικλο τυχαιοποιημένο σε χρονικό σημείο > 24 ωρών, για το πείραμα της φαρμακοκινητικής, αλλά και σε όλους τους οφθαλμούς του πειράματος της τοξικότητας.

6.2.2.3. Σχεδιασμός πειράματος – Πιλοτική μελέτη

Όπως προαναφέρθηκε, το υπό μελέτη μόριο, είναι ιδιαίτερα υδρόφοβο, με αποτέλεσμα να διαλύεται δύσκολα στο νερό και να σχηματίζει ουσιαστικά κολλοειδείς διασπορές. Το υαλώδες σώμα αποτελείται κατά 98-99% από νερό, με αποτέλεσμα, η κολλοειδής διασπορά του BNN27, κατά την εισαγωγή της στην υαλοειδική κοιλότητα, να παραμένει αδιάλυτη και αδιαφανής πίσω από τον κρυσταλλοειδή φακό και να απορροφάται αργά από το υδρόφιλο περιβάλλον του υαλοειδούς (εικόνα 36).



Εικόνα 36: Εμφάνιση του BNN27 κολλοειδούς, μετά από ενδοϋαλοειδική έγχυση οφθαλμού αλφικού κονίκλου, όπως φαίνεται πίσω από τον κρυσταλλοειδή φακό, μέσα στο υδρόφιλο περιβάλλον του υαλοειδούς.

Επομένως, για την επιλογή των χρονικών σημείων της φαρμακοκινητικής μελέτης χρειάστηκε να προηγηθούν μια σειρά από πιλοτικά πειράματα παρατήρησης όσον αφορά την απορρόφηση του κολλοειδούς μέσα στο χρόνο. Τα συμπεράσματα που βγήκαν ήταν τα εξής. Την 1^η μέρα μετά την έγχυση, το κολλοειδές παρατηρείται αμετάβλητο σε σχέση με τον όγκο που καταλαμβάνει οπισθοφακικά και την πυκνότητά του. Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε πειραματικά, κατά τη διάρκεια των πιλοτικών δοκιμών, όπου τα επίπεδα του BNN27, δε φαινόταν ν' αλλάζουν σημαντικά πριν τις 24 ώρες post-op (μετά την έγχυση).

Έτσι, η πρώτη χρονική στιγμή που επιλέχθηκε/μελετήθηκε μετά την έγχυση ήταν οι 12 ώρες. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά (βυθοσκόπηση), σε κάποιους από τους οφθαλμούς, υπολείμματα του εγχεόμενου μίγματος μέχρι και 4 εβδομάδες μετά την έγχυση. Επιλέχθηκε, κατά συνέπεια, ως τελικό σημείο του πειράματος οι 30 μέρες μετά την έγχυση.

6.2.2.4. Τυχαιοποίηση

Συνολικά, για τον υπολογισμό της καμπύλης συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο, επιλέχθηκαν τα παρακάτω χρονικά σημεία: 0 (IVT ένεση και ευθανασία αμέσως μετά την έγχυση), 12 ώρες, 1, 2, 7, 14 και 30 ημέρες μετά την IVT έγχυση (0.1ml μίγματος BNN27 συγκέντρωσης 6mg/ml).

Σε κάθε χρονικό σημείο, χρησιμοποιήθηκαν τρία πειραματόζωα και έγινε ένεση σε αμφοτέρους τους οφθαλμούς. Κάθε οφθαλμός θεωρήθηκε ως ένα ανεξάρτητο δείγμα, δηλαδή για κάθε χρονικό σημείο, ο αριθμός δειγμάτων υαλοειδούς προς εξέταση ήταν 6 (n=6). Σε κάθε χρονικό σημείο, αντιστοίχησε ένα τυφλό δείγμα υαλοειδούς (οφθαλμός που δε δέχτηκε ένεση).

6.2.2.5. Απομόνωση υαλοειδούς

Στην εκάστοτε χρονική στιγμή, πραγματοποιούνταν εξόρυξη των οφθαλμών, μετά από ευθανασία. Οι απομονωμένοι οφθαλμοί τοποθετούνταν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Ακολούθως, απομονώνονταν το υαλοειδές με την παρακάτω τεχνική.

Διατέμνεται και διαχωρίζεται το πρόσθιο από το οπίσθιο ημιμόριο του παγωμένου οφθαλμού με ψαλίδι και με κατάλληλες λαβίδες, απομακρύνεται το πρόσθιο ημιμόριο, καθώς οι ιστικοί χιτώνες του οπίσθιου ημιμορίου (σκληρός, χοριοειδής, αμφιβληστροειδή μαζί με το μελάγχρουν επιθήλιο). Η διαδικασία γίνεται ταχέως, ώστε να μην προλάβει να αποψυχθεί το υαλοειδές, το οποίο ξεπαγώνει αργότερα από το υδατοειδές υγρό.

Η διαφορά φάσης των δύο μέσων και η γρηγορότερη υγροποίηση του υδατοειδούς βοηθά στην επιβεβαίωση ότι το υλικό που απομονώνεται είναι αποκλειστικά υαλώδες σώμα, χωρίς συνοδό υδατοειδές του οπίσθιου θαλάμου, το οποίο βρίσκεται επίσης πίσω από την ίριδα, αλλά και προσθιότερα της βάσης του υαλοειδούς. Το παγωμένο υαλώδες σώμα τοποθετούνταν σε κωνικό σωληνάριο τύπου Falcon™ των 15ml και όταν το δείγμα έφτανε τους 0°C (μίγμα πάγου και νερού), υλοποιούνταν με κατεργασία με υπερήχους 30kHz για 1 λεπτό (30kHz, UP100H, Hielscher US Tech, Germany) (τροποποιημένη τεχνική⁶³).

6.2.2.6. Προετοιμασία δείγματος για ποσοτικοποίηση

Η μεθοδολογία επεξεργασίας του υαλοειδούς σώματος, για τη μέτρηση του BNN27 με LC-MS, τροποποιήθηκε και προσαρμόστηκε στην ποιότητα του ιστού (98-99% ύδωρ), μετά από κάποιες παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια πειράματος. Ακολουθώντας αρχικά τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο σκέλος της μελέτης, όπου ο ιστός ομογενοποιούνταν, στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν, ελήφθησαν επαναλήψιμα, ανεξήγητα χαμηλά αποτελέσματα, ως μία τάξη μεγέθους, σε κάθε προσπάθεια.

Εξετάζοντας την επίδραση στο αποτέλεσμα του κάθε βήματος της διαδικασίας χωριστά, αποδείχθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του μορίου απομακρυνόταν με φυγοκέντρηση.

Κατά συνέπεια, τροποποιήθηκε αναλόγως η μεθοδολογία, διατηρώντας την υπερηχητική ομογενοποίηση ως κύρια επεξεργασία του υαλώδους σώματος και τα δείγματα φυλάσσονταν στους -20°C , μέχρι τη στιγμή της προετοιμασίας για τον φασματογράφο. Από το αρχικό διάλυμα συλλέγονταν 10 μl , προσθέτονταν 3ml μεθανόλης. Οι ρυθμίσεις του φασματογράφου ήταν ίδιες με τις αντίστοιχες του σκέλους της εργασίας για συστηματική χορήγηση. Τα φορτισμένα διαλύματα δημιουργήθηκαν από υαλοειδές ζώων που δεν έλαβαν ουσία, σε συγκεντρώσεις από 0 ως 50 $\mu\text{g/ml}$.

6.2.2.7. Φαρμακοκινητική ανάλυση/φαρμακοκινητικές παράμετροι

Για το σχηματισμό της καμπύλης μεταβολής της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο, υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και το τυπικό σφάλμα από $n=6$ τιμές για κάθε χρονικό σημείο.

Για τη φαρμακοκινητική ανάλυση στο υαλοειδές, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν με μονοδιαμερισματική ανάλυση.

Υπολογίστηκε η σταθερά απομάκρυνσης, k_{el} και ο χρόνος ημίσειας ζωής $t_{1/2}$. Η κάθαρση (clearance) υπολογίστηκε ως $Cl=k_{el} \cdot V$, όπου V , ο όγκος του υαλοειδούς ($V_d=V$, βλ κεφ 3.4.2). Για τον υπολογισμό των παραμέτρων αλλά και τη δημιουργία της καμπύλης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphpadPrism 9.0 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, USA) και PKfs of Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA, USA).

6.3. Αμφιβληστροειδική τοξικότητα

Η παρασκευή και η χορήγηση του κολλοειδούς υλοποιήθηκε με τον τρόπο που αναφέρεται στη μελέτη της φαρμακοκινητικής, με αντίστοιχη προσαρμογή της δόσης, στην περίπτωση που απαιτήθηκε.

Μελετήθηκαν δύο χορηγούμενες συγκεντρώσεις: Η επαγωγικά υπολογισμένη συγκέντρωση από την αντίστοιχη συστηματική δόση για τον αμφιβληστροειδή του πρώτου μέρους, τα 6mg/ml (στο εξής «υψηλή δόση/συγκέντρωση») και δόση χαμηλότερη της πρώτης κατά μία τάξη μεγέθους, τα 0.6mg/ml (στο εξής «χαμηλή δόση/συγκέντρωση»). Σχηματίστηκαν **δύο ομάδες μελέτης, Α και Β**, ανάλογα με την υπό μελέτη συγκέντρωση, καθεμία από τις οποίες συμπεριλάμβανε 12 (n=12) πειραματόζωα.

Στην **Ομάδα Α**, ελέγχθηκε η υψηλή δόση των 6mg/ml BNN27. Ο δεξιός οφθαλμός(ΔΟ) ήταν ο οφθαλμός μελέτης, ο οποίος δέχτηκε IVT 0.1ml του υπό μελέτη κολλοειδούς. Ο αριστερός οφθαλμός(ΑΟ) ήταν ο οφθαλμός ελέγχου, ο οποίος αποτέλεσε ταυτόχρονα θετικό μάρτυρα ως προς την ασφάλεια του διαλύματος φορέα, καθώς δέχτηκε 0.1ml του διαλύματος φορέα, δηλαδή διάλυμα αιθανόλης 6% v/v.

Στην **Ομάδα Β**, ελέγχθηκε η χαμηλή δόση των 0.6mg/ml BNN27. Ο ΔΟ ήταν ο οφθαλμός μελέτης, ο οποίος δέχτηκε IVT 0.1ml του υπό μελέτη κολλοειδούς και ΑΟ ήταν ο οφθαλμός ελέγχου, ο οποίος δέχτηκε 0.1ml του διαλύματος φορέα. Η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης παρέμεινε ίδια με αυτή της ομάδας Α, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο στους οφθαλμούς μελέτης (επίδραση του BNN27) όσο και στους οφθαλμούς ελέγχου (επίδραση της αιθυλικής αλκοόλης 6%-θετικός μάρτυρας).

Για τον έλεγχο τοξικότητας, χρησιμοποιήθηκαν υποκειμενικές και αντικειμενικές μέθοδοι, οι οποίες εφαρμόστηκαν προεγχειρητικά, δηλαδή πριν την IVT έγχυση (pre-op) και σε διάφορες χρονικές στιγμές παρακολούθησης μετεγχειρητικά, δηλαδή μετά την IVT έγχυση (post-op) και περιγράφηκαν οι μεταβολές. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η πιθανή συσχέτιση των μεταβολών αυτών με το υπό μελέτη μόριο, ώστε να του αποδοθεί ή όχι σχετική τοξικότητα.

Οι υποκειμενικές μέθοδοι συμπεριέλαβαν την οφθαλμοσκόπηση του προσθίου ημιμορίου του οφθαλμού, δηλαδή την επισκόπησή του με σχισμοειδή λυχνία και την επισκόπηση του οπίσθιου ημιμορίου (βυθοσκόπηση) με τη χρήση έμμεσου δίοφθαλμου οφθαλμοσκόπιου και την λεπτομερή καταγραφή των οφθαλμολογικών ευρημάτων. Οι αντικειμενικές μέθοδοι συμπεριέλαβαν την Τονομετρία (μέτρηση της ενδοφθάλμιας πίεσης), τον ηλεκτροφυσιολογικό έλεγχο με Ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ΗΑΓ) και την ιστολογική εξέταση με φωτονική μικροσκόπηση του αμφιβληστροειδή, μετά τη θυσία των πειραματόζων.

6.3.1. Προεγχειρητικός έλεγχος

Ο προεγχειρητικός έλεγχος συμπεριλάμβανε την κλινική εξέταση καθώς και το ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ΗΑΓ).

6.3.1.1. Κλινική εξέταση

a. Σχισμοειδής λυχνία (Σ/Λ): Πραγματοποιήθηκε η οφθαλμοσκόπηση με φορητή σχισμοειδή λυχνία. Παρατηρούνται τα βλέφαρα και η βλεφαρική σχισμή, ο επιπεφυκότας και το «τρίτο βλέφαρο» (Plica semilunaris), ο κερατοειδής, ο Πρόσθιος

Θάλαμος (ΠΘ), η ίριδα με την κόρη, ο κρυσταλλοειδής φακός και το πρόσθιο υαλοειδές. Το πρόσθιο ημιμόριο έπρεπε να είναι ήρεμο, χωρίς ανατομικές ανωμαλίες, παρουσία λοιμώξεων ή άλλων παθήσεων, με καλή κινητικότητα της κόρης, καλή μυδρίαση (μετά την ενστάλλαξη των μυδριατικών σταγόνων) και διαυγή διαθλαστικά μέσα. Καταγράφηκε οποιαδήποτε μακροσκοπική μεταβολή κατά τη διάρκεια της μελέτης.

b. Τονομετρία: Η μέτρηση της Ενδοφθάλμιας Πίεσης (ΕΟΠ, Intraocular Pressure, IOP) έγινε με βαθμονομημένο Tono-Pen XL (Medtronic Solan)⁶⁴. Κάθε καταγραφή αντιπροσώπευε τον μέσο όρο 5 διαδοχικών μετρήσεων. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, USA). Δεδομένου του μικρού μεγέθους του δείγματος, χρησιμοποιήθηκαν μη-παραμετρικά τεστ. Υπολογίστηκε η διάμεσος της ΕΟΠ κάθε ομάδας και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Για τη σύγκριση της ΕΟΠ μεταξύ των οφθαλμών της ίδιας ομάδας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για σχετιζόμενα δείγματα (Wilcoxon signed rank test) και για τη σύγκριση του ίδιου οφθαλμού μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για ανεξάρτητα δείγματα (Mann-Whitney U test). Για την αναζήτηση πιθανής αύξησης της ΕΟΠ με το χρόνο, μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση, εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση.

c. Φωτοκινητικό αντανακλαστικό

d. Διόφθαλμη βυθοσκόπηση υπό μυδρίαση: Μετά από την ενστάλλαξη των μυδριατικών σταγόνων (τροπικαμίδη 0.5% και φαινυλεφρίνη 5%), γινόταν βυθοσκόπηση με το διόφθαλμο έμμεσο οφθαλμοσκόπιο και εξεταστικό φακό 2.2D. Επισκοποούνταν και περιγραφόταν το οπτικό νεύρο με τα μεγάλα αγγεία, ο κεντρικός και ο περιφερικός

αμφιβληστροειδής, το μελάγχρουν επιθήλιο και ο χοριοειδής. Οποιαδήποτε μεταβολή κατά τη διάρκεια της μελέτης, καταγραφόταν με λεπτομέρεια.

Καταγραφόταν επίσης η πορεία της απορρόφησης του μίγματος. Αυτό γινόταν πάντα μετά από μυδρίαση, ώστε να είναι ορατές οι περισσότερες δυνατές λεπτομέρειες σε σχέση με τη θέση και την απορρόφησή του.

6.3.1.2. Ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ΗΑΓ)

Το ΗΑΓ καταγράφηκε στην αρχή του πειράματος, προεγχειρητικά και στο τέλος του πειράματος, δηλαδή την 30ή μετεγχειρητική ημέρα. Το ΗΑΓ προηγούνταν πάντα της βυθοσκόπησης, ώστε να αποφευχθεί η υπερδιέγερση των φωτοϋποδοχέων από το φως της εξέτασης, που θα απαιτούσε στη συνέχεια μακρύτερο χρόνο προσαρμογής στο σκοτάδι.

Πριν την έναρξη των καταγραφών, προηγούνταν η μυδρίαση με τις σταγόνες τροπικαμίδης 0,5% και φαινυλεφρίνης 5%. Αυτό προσφέρει σταθερό και μεγάλο μέγεθος κόρης, ένας παράγοντας κρίσιμος για την απόκτηση των επαναλήψιμα συγκρίσιμων καταγραφών στο ίδιο υποκείμενο, αλλά και μεταξύ των διαφόρων υποκειμένων.

Η εξέταση έγινε υπό αναισθησία, με το ζώο τοποθετημένο μέσα σε πλαστικό ημικυλινδρικό πλαίσιο καλυμμένο με ανανεώσιμο υπόστρωμα, ώστε να υποστηρίζεται σε όλη τη διάρκεια του πειράματος με το κεφάλι ακινητοποιημένο (κατά επέκταση τους οφθαλμούς). Το πειραματόζωο τοποθετούνταν σε στερνική κατάκλιση, με το κεφάλι στερεωμένο επιπλέον ανάμεσα στα δύο πρόσθια πόδια, ώστε να επιτυγχάνεται βέλτιστη θέση των οφθαλμών κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ενστάλαξη τοπικού αναισθητικού κολλυρίου προηγούνταν της τοποθέτησης των ηλεκτροδίων, καθώς επίσης και τεχνητών δακρύων σε τακτικά χρονικά διαστήματα, ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση του κερατοειδή, εφόσον η αναισθησία αίρει το αντανακλαστικό του βλεφαρισμού.

Η εξέταση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα τα κριτήρια της ISCEV (διεθνής εταιρεία ηλεκτροφυσιολογίας) για την αμφιβληστροειδογραφία της όρασης Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV)⁶⁵⁻⁶⁷ ελαφρώς τροποποιημένα για τον κόνικλο. Το πλήρους πεδίου φωτο-επαγόμενο ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (full-field flash ERG) καταγράφηκε και από τους δύο οφθαλμούς κάθε πειραματόζωου, με το σύστημα καταγραφής Primus 2.5 (Tomey, Germany), χρησιμοποιώντας θόλο Ganzfeld.

Χρησιμοποιήθηκε ως ενεργό ηλεκτρόδιο βρόχος επιπεφυκότα (HK loop electrode, Medelec, Oxford Instruments, UK), ο οποίος τοποθετείται σ' επαφή με το σκληρό και στερεώνεται μέσα στον κατώτερο βλεφαρικό σάκο, κάτω από το άνω και το τρίτο βλέφαρο. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς (κυάθιο από άργυρο, silver-silver chloride electrode, Oxford Instruments, UK) στερεωνόταν δίπλα στην κογχική παρυφή. Για τη γείωση, χρησιμοποιήθηκε ένας ενώπιος συνδετήρας. Για βέλτιστη αγωγιμότητα, αποτριχωνόταν η περιοχή όπου τοποθετούνταν το ηλεκτρόδιο. Η ηλεκτρική αντίσταση, για όλα τα ηλεκτρόδια, ήταν μικρότερη από 5 kΩ.

Η δειγματοληψία των καταγραφών πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα 1000Hz, περιοριζόμενη από φίλτρο ζώνης, συχνοτήτων εύρους (band-pass filtering) μεταξύ 0,3-300 Hz. Το λαμβανόμενο σήμα ενισχύεται ($\times 5$ K), ενώ τα ψευδή ευρήματα, όπως οι βλεφαρισμοί, απομακρύνονταν αυτόματα.

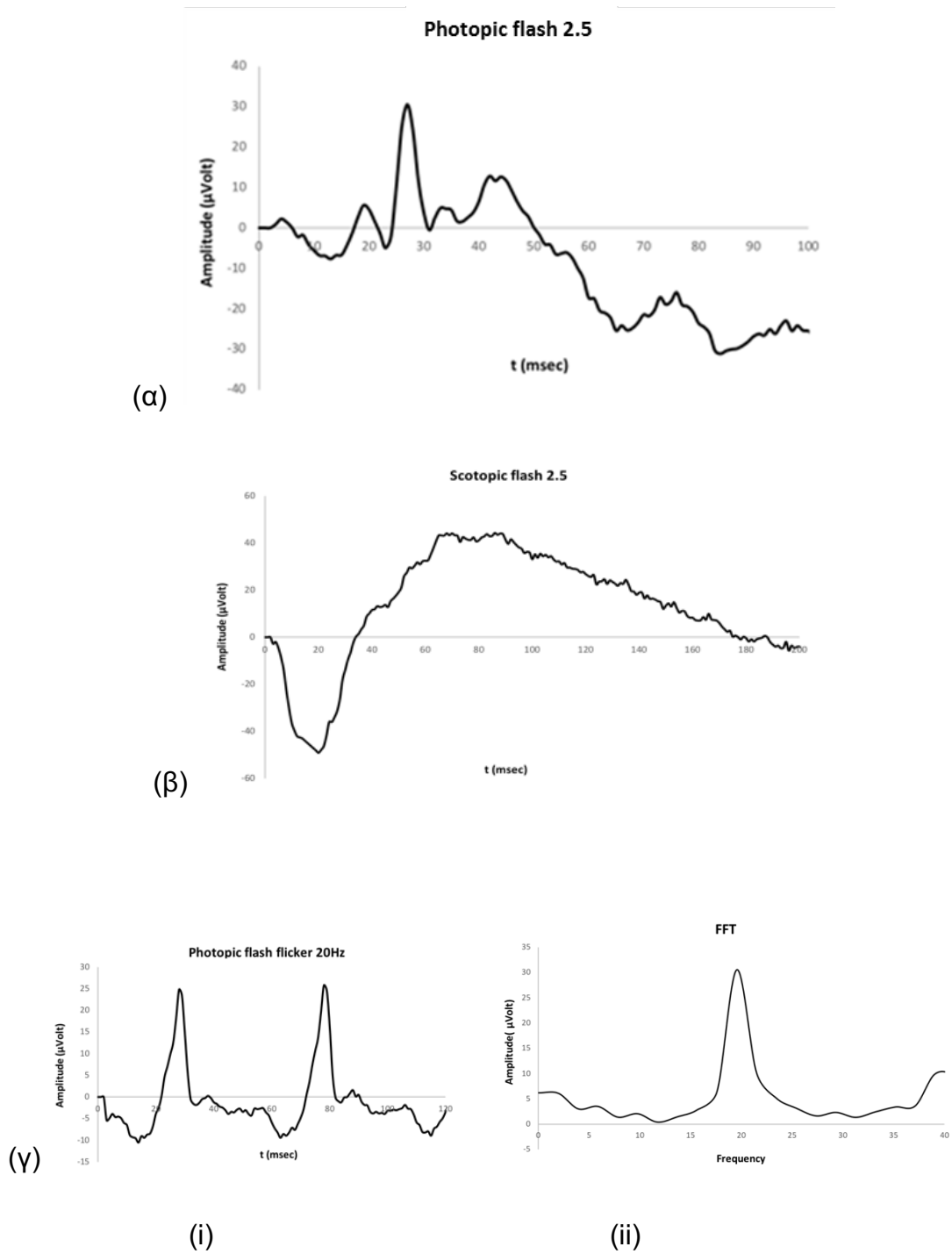
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλάμβανε την καταγραφή αποκρίσεων σε φωτοπικές συνθήκες και σκοτοπικές συνθήκες.

(A) Αρχικά, καταγράφονταν οι αποκρίσεις σε *φωτοπικές συνθήκες*, οι οποίες περιλάμβαναν 2 μετρήσεις, μετά από διέγερση με φλας έντασης 2.5 cd*s/m^2 μέσα στον θόλο Ganzfeld, με σταθερό φωτεινό υπόβαθρο έντασης 25 cd/m^2 , έπειτα από 10 λεπτά προσαρμογής στο φως υπό τις παρακάτω μορφές:

a. από μονήρες (single) φλας (photopic flash ERG). Υπολογιζόταν η μέση απόκριση από πέντε τέτοια συνεχόμενα φλας (ελάχιστο μεσοδιάστημα μεταξύ φλας: 0.5s) (Σχήμα 3α: Τυπική καταγραφή).

b. φλας συχνότητας 20Hz (ρυθμός εμφάνισης του ερεθίσματος: 20 ερεθίσματα ανά δευτερόλεπτο) (20 Hz flash flicker) (Σχήμα 3γ (i και ii)). Είναι γνωστό ότι το πλάτος των καταγραφών μετά από flicker ερέθισμα εξαρτάται από τη συχνότητα και τη φωτεινότητα του ερεθίσματος. Επιλέχθηκαν τα 20Hz, γιατί είναι γνωστό ότι στις χαμηλές συχνότητες το εύρος είναι ανεξάρτητο της φωτεινότητας (Weber law behavior) ώστε να εξαλειφθεί ο παράγοντας αυτός⁶⁷. Χρησιμοποιώντας μετασχηματισμό Fourier, υπολογίζεται το θεμελιώδες πλάτος από τη συνάρτηση απόκρισης-συχνότητας

(B) Στη συνέχεια καταγράφονται αποκρίσεις σε *σκοτοπικές συνθήκες*, έπειτα από 40 min προσαρμογής στο σκοτάδι. Καταγράφηκε η απόκριση μετά από φλας έντασης $2,5 \text{ cd*s/m}^2$, το οποίο διεγείρει το σύνολο των κυττάρων του αμφιβληστροειδή (scotopic flash ERG) (Σχήμα 3β). Υπολογίστηκε η μέση απόκριση από πέντε (5) συνεχόμενες καταγραφές ((ελάχιστο μεσοδιάστημα μεταξύ φλας: 10s).



Σχήμα 3: Τυπικές φυσιολογικές καταγραφές των τριών καταγραφόμενων πρωτόκολλων ΗΑΓ. (α) φωτοπικό φλας, (β) σκοτοπικό φλας, (γ) (i)φωτοπικό flash flicker 20Hz και (ii) ο FFT μετασχηματισμός του.

Στην περίπτωση (α) και (β) λαμβάνεται μια κυματομορφή με δύο βασικά στοιχεία, το α-κύμα και το β-κύμα. Το πλάτος του α-κύματος υπολογίζεται από το μηδέν του ρεύματος αναφοράς ως το μέγιστο αρνητικό (κοιλιάδα) της κυματομορφής. Το πλάτος του β-κύματος υπολογίζεται από την κοιλιάδα της αρνητικής καταγραφής του α-κύματος ως το μέγιστο της θετικής καταγραφής της κυματομορφής (όρος) του β-κύματος.

Στην περίπτωση (γ) λαμβάνεται επαναλαμβανόμενη κυματομορφή σε επιλεγμένη συχνότητα. Το πλάτος της υπολογίζεται με μετασχηματισμό Fourier (FFT, Fast Fourier Transformation) και είναι ενδεικτικό της λειτουργίας των κωνίων.

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης τοξικότητας, χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες: ο χρόνος εμφάνισης της καταγραφής (*implicit time*), που αντικατοπτρίζει το χρόνο απόκρισης των φωτοϋποδοχέων, το πλάτος του β-κύματος, που αντικατοπτρίζει την αμφιβληστροειδική λειτουργία, καθώς και το πλάτος του φωτοπικού flicker, ως ένδειξη λειτουργίας των κωνίων.

Για την επίδραση του BNN27 στην αμφιβληστροειδική λειτουργία, συγκρίθηκαν οι καταγραφές του ΔΟ πριν την έγχυση (*pre-op*) και 30 μέρες μετά την έγχυση (*post-op*), στην Ομάδα Α και στην Ομάδα Β, καθώς επίσης και μεταξύ των δύο ομάδων.

Για τον έλεγχο επίδρασης του διαλύτη (6% αιθανόλη) συγκρίθηκαν οι καταγραφές του β-κύματος του ΑΟ πριν την έγχυση (*pre-op*) και 30 μέρες μετά την έγχυση (*post-op*), τόσο στην Ομάδα Α όσο και στην Ομάδα Β.

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, USA). Για τη στατιστική περιγραφή των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν μη-παραμετρικά τεστ. Υπολογίστηκε η διάμεσος και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Για τη σύγκριση των καταγραφών μεταξύ των

οφθαλμών της ίδιας ομάδας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για σχετιζόμενα δείγματα (Wilcoxon signed rank test) και για τη σύγκριση των καταγραφών του ίδιου οφθαλμού μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για ανεξάρτητα δείγματα (Mann-Whitney U test).

6.3.2. Κριτήρια αποκλεισμού

Τα κριτήρια αποκλεισμού εισόδου στη μελέτη αποτέλεσαν η παρουσία προεγχειρητικά ανατομικών ελαττωμάτων και φλεγμονών ή λοιμώξεων του προσθίου ή του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμού, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αντικειμενικότητα των μετρήσεων, όπως η παρουσία θολερών διαθλαστικών μέσων, π.χ. καταρράκτης, η ελλιπής μυδρίαση, η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, η αποκόλληση αμφιβληστροειδή ή άλλες εμφανείς μακροσκοπικά παθήσεις του ΜΕ και του ΟΝ.

Ακόμα, η παρουσία μη φυσιολογικού ΗΑΓ και παθολογικού φωτοκινητικού αντανακλαστικού, τα οποία υποδηλώνουν την ύπαρξη εξαιρετικά εκτεταμένης παθολογίας του αμφιβληστροειδή ή παθολογίας του Οπτικού νεύρου.

6.3.3. Μετεγχειρητικός έλεγχος - Παρακολούθηση

Γίνεται έλεγχος την 1^η μέρα μετά την έγχυση, την 1^η εβδομάδα, 2^η εβδομάδα και ένα μήνα μετά την έγχυση, που είναι και το τελικό σημείο της μελέτης. Το ΗΑΓ πραγματοποιείται την 1^η μέρα πριν την έγχυση και την τελευταία μέρα πριν τη θανάτωση των πειραματόζων. Στις ενδιάμεσες χρονικές στιγμές της παρακολούθησης, δεν πραγματοποιήθηκε ΗΑΓ, γιατί, παρά τη μυδρίαση του οφθαλμού, η παρουσία της

αδιαφανούς κολλοειδούς διασποράς οπισθοφακικά στους πειραματικούς οφθαλμούς που πήραν την υψηλή δόση, παρεμπόδιζε την αντικειμενικότητα των καταγραφών.

Η αδιαφανής του φύση διακόπτει την απρόσκοπτη πορεία του φωτός προς τον αμφιβληστροειδή καθιστώντας τις ΗΑΓ καταγραφές μη αξιόπιστες και μη συγκρίσιμες. Επομένως, η καταγραφή του ΗΑΓ στις 2 εβδομάδες δε θα μπορούσε να αξιολογηθεί στο σύνολο των ζώων, άρα προτιμήθηκε να μην επαναληφθεί παρά μόνο στο τέλος του πειράματος, όπου η υαλοειδική κοιλότητα είναι ουσιαστικά ελεύθερη φαρμάκου. Πιο αναλυτικά, το πρωτόκολλο παρακολούθησης ήταν το παρακάτω:

1^η μέρα: Σ/Λ, Τονομετρία, Βυθοσκόπηση.

1^η εβδομάδα: Σ/Λ, Τονομετρία, Βυθοσκόπηση.

2^η εβδομάδα: Σ/Λ, Τονομετρία, Βυθοσκόπηση.

1 μήνας: Σ/Λ, Τονομετρία, ΗΑΓ, Βυθοσκόπηση, Ευθανασία, προετοιμασία για ιστολογική εξέταση.

6.3.4. Καταγραφή επιπλοκών και ανεπιθύμητων συμβάντων.

Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, καταγράφονταν η εμφάνιση επιπλοκών ανεπιθύμητων συμβάντων, τα οποία εκτιμιούνταν, ανάλογα με τη βαρύτητά τους, για το αν το ζώο μπορούσε να συνεχίσει στην παρακολούθηση, αλλά και για το αν συσχετιζόταν η εμφάνισή τους με την επίδραση υπό μελέτη στεροειδικού αναλόγου.

Για παράδειγμα, στην περίπτωση της εμφάνισης καταρράκτη, ο οποίος μπορεί να είναι αποτέλεσμα της τεχνικής της ένεσης (τραυματικός καταρράκτης) ή της βλαπτικής επίδρασης του φαρμάκου, θα έπρεπε να εκτιμηθούν τα εξής: αρχικά αν η έκταση του

καταρράκτη επιτρέπει την επαρκή εξέταση για την παρακολούθηση του ζώου και την καταγραφή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.

Στην περίπτωση εκτεταμένου καταρράκτη, το ζώο θα έπρεπε να αποσυρθεί από την παρακολούθηση. Στην περίπτωση αρχόμενου καταρράκτη, το ζώο θα μπορούσε να συνεχίσει στην παρακολούθηση μετά την καταγραφή του συμβάντος. Επιπλέον, γινόταν συσχέτιση της εμφάνισης της επιπλοκής με τη δράση του μορίου BNN27 και γινόταν σχετική καταγραφή .

Παρόμοια καταγραφή πραγματοποιούνται για κάθε μη αναμενόμενη ανατομική ή/ και λειτουργική μεταβολή των ενιόμενων οφθαλμών, σε κάθε χρονική στιγμή της παρακολούθησης. Εάν ένας οφθαλμός εμφάνιζε ενδοφθαλμίτιδα, εκτεταμένο καταρράκτη ή συμπτωματική υψηλή αύξηση της πίεσης (ερυθρός οφθαλμός και πειραματόζωο εμφανώς σε δυσφορία και πόνο), τερμάτιζε τη μελέτη. Καταγραφόταν η χρονική στιγμή και το πειραματόζωο οδηγούταν σε ευθανασία, εξόρυξη αμφοτέρων των οφθαλμών και προετοιμασία τους για ιστολογική ανάλυση.

6.3.5. Ευθανασία

Η ευθανασία πραγματοποιούνταν τη χρονική στιγμή που το πειραματόζωο αποχωρούσε από τη μελέτη, λόγω σημαντικού ανεπιθύμητου συμβάντος ή την ημέρα ολοκλήρωσης του πειράματος, δηλαδή 30 ημέρες μετά από την έγχυση. Προηγούνταν η κλινική εξέταση και το ΗΑΓ. Τα ζώα θανατώνονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology), με ενδοφλέβια νατριούχο πεντοβαρβιτάλη (150 mg/kg). Μετά τη διαπίστωση του θανάτου (απουσία καρδιακού

σφυγμού>60sec), ακολουθούσε εξόρυξη των οφθαλμών και ξεκινούσε η επεξεργασία της μονιμοποίησης και της προετοιμασίας για ιστολογική εξέταση με φωτονικό μικροσκόπιο.

6.3.6. Ιστολογία

Μετά την εξόρυξη, οι οφθαλμοί προετοιμάζονταν για την ιστολογική εξέταση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου Οπτικής και Όρασης του Πανεπιστημίου της Κρήτης^{62,66}. Σε πρώτο χρόνο (prefixation), εμβυθιζόταν όλος ο οφθαλμός σε ψυχρή γλουταροαλδεϋδη 2,5% v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού άλατος 0,1 M (pH 7,4), αφού είχε τρυπηθεί σε 2-3 σημεία, ώστε να διευκολυνθεί η διέλευση του μονιμοποιητικού και η μονιμοποίηση του οπίσθιου ημιμορίου.

Μετά από 48 ώρες, απομακρύνονταν προσεκτικά το πρόσθιο ημιμόριο με ψαλίδι και λαβίδα, ενώ το οπίσθιο ημιμόριο τοποθετούνταν στο ίδιο φρέσκο μονιμοποιητικό υλικό. Από το συγκεκριμένο, δημιουργούνταν τα ιστοτεμάχια τα οποία δίνονταν για την ιστολογική εξέταση. Επιλέγονταν οι ύποπτες περιοχές, εφόσον είχαν ανιχνευτεί τέτοιες κατά τη βυθοσκόπηση, η περιθηλαία περιοχή, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής θηλής, τα παραθηλαία τμήματα, καθώς τα περισσότερο κεντρικά και περιφερειακά τμήματα του αμφιβληστροειδή, με τυχαίο τρόπο.

Σε δεύτερο χρόνο (post fixation), τα δείγματα τοποθετούνταν σε τετροξείδιο του οσμίου 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού άλατος 0,1 M (pH 7,4), για 2 ώρες στους 4° C, στο σκοτάδι. Έπειτα, τα δείγματα αφυδατώνονταν σταδιακά σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις της αιθανόλης, 30%, 50%, 70%, 96% (δισ) και 100% (τρεις). Το μέσο της αφυδάτωσης ανταλλάχθηκε με προπυλενοξείδιο κατά το στάδιο της διαύγασης, το οποίο είναι συμβατό με το μέσο της έγκλισης σε πλαστικό.

Τα δείγματα εισάγονταν σε προπυλενοξείδιο (δισ) για 20 min υπό ανάδευση. Μετά την ανάμιξη των συστατικών της εποξικής ρητίνης, ο ιστός επωάστηκε ολονύκτια με το μίγμα, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκε ο παράγοντας του πολυμερισμού και τα δείγματα επωάστηκαν σε φούρνο στους 40° C, για μία ημέρα και στους 60° C, για άλλες 3-4 ημέρες.

Πραγματοποιήθηκαν οι πλαστικές τομές πάχους 1 μm με υπερμικροτόμο (Leica Reichert Ultracut R-1) και συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Για την εξέταση των δειγμάτων με οπτική μικροσκοπία, οι τομές επεξεργάστηκαν με μία τροποποιημένη τρίχρωμη βαφή⁶⁸.

Η παρατήρηση έγινε με διοπτρικό οπτικό μικροσκόπιο προσπίπτοντος φωτισμού (Diarlan Microscope), ενώ οι περιοχές ενδιαφέροντος φωτογραφήθηκαν σε τρεις διαφορετικές μεγεθύνσεις.

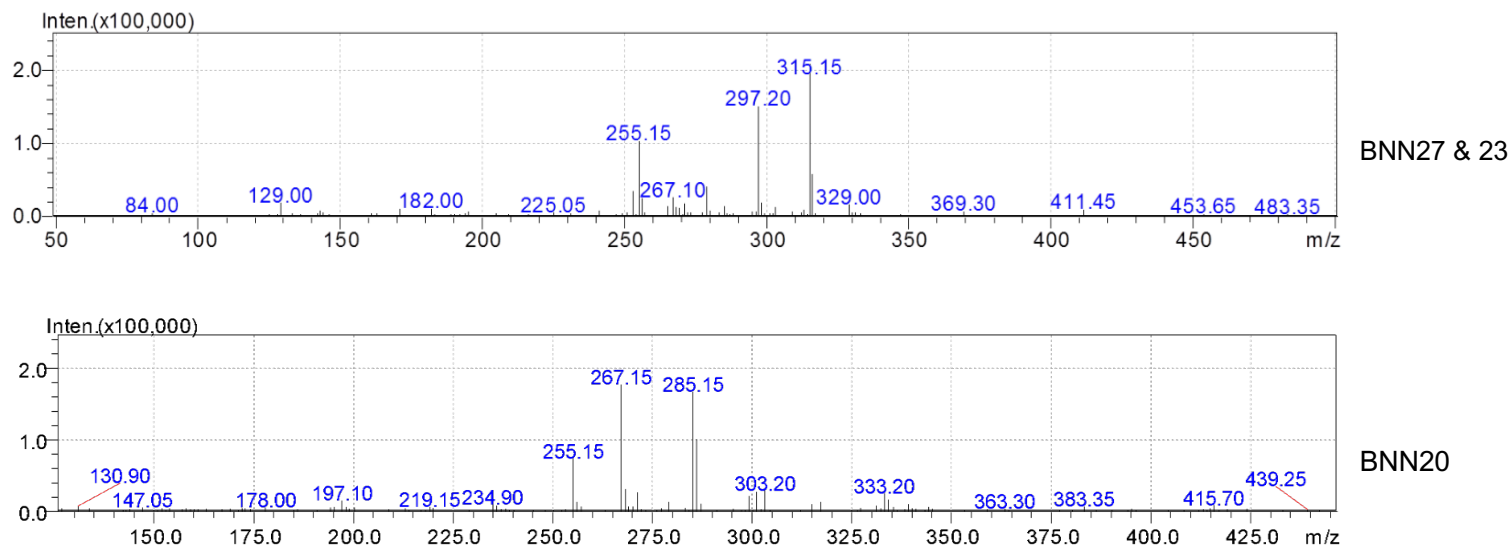
7. Αποτελέσματα

7.1. HPLC Χαρακτηρισμός-Επαλήθευση (validation) της μεθόδου

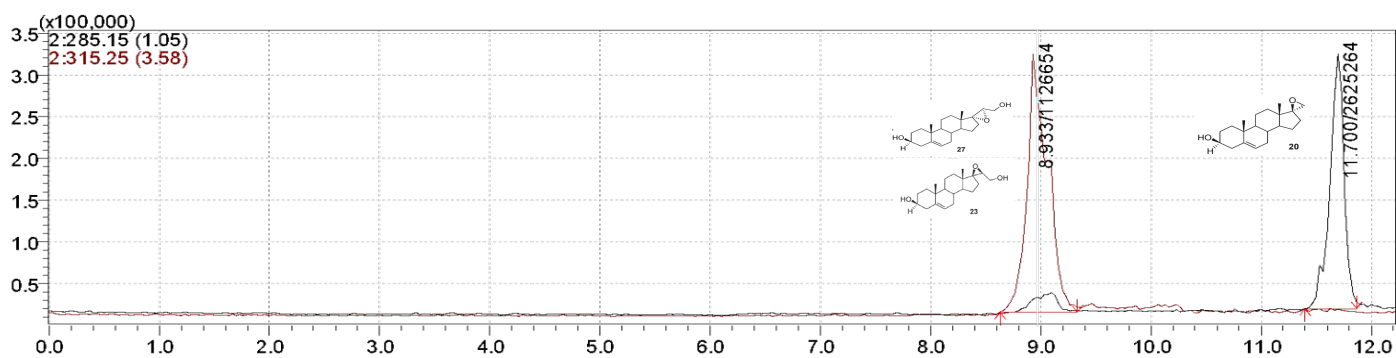
Περιγράφηκαν χρωματογραφικά τα τρία μόρια BNN με νευροπροστατευτική δράση, τα BNN20, 23, 27. Τα δύο τελευταία εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες ως προς το χρόνο της κατακράτησης (retention time) και το μοριακό βάρος τους. Στον πίνακα 1, συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά τριών μορίων BNN. Στο σχήμα 4, παρουσιάζεται το πλήρες φάσμα απορρόφησης. Το Σχήμα 5 περιλαμβάνει τα χρωματογραφήματα των BNN27, BNN23 (μαύρη και κόκκινη συμπίπτουσες κορυφές) και του BNN20.

	Rt(min)	m/z target	m/z	Mw
BNN20	11.7	285.15	255,2 267,15 285,15	302.451
BNN27	8.9	315.15	315,15 297,20 255,2	332.48
BNN23	8.9	315.25	315,25 297,2 285,25 255,2	332.477

Πίνακας 1: Χρωματογραφικές παράμετροι των τριών μορίων BNN.



Σχήμα 4: Φάσμα μαζών (m/z ions) των τριών μορίων BNN.



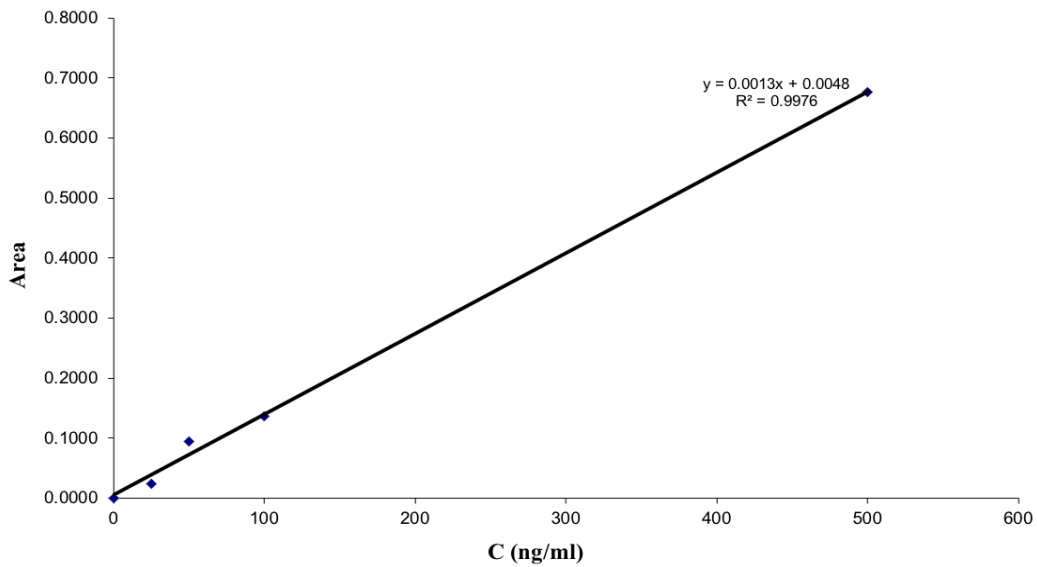
Σχήμα 5: Χρωματογραφήματα BNN27, BNN23 (μαύρη και κόκκινη συμπίπτουσες κορυφές) και του BNN20.

Η ανάκτηση της μεθόδου (recovery) υπολογίστηκε σε φορτισμένα διαλύματα πέντε συγκεντρώσεων (10, 25, 50, 100 και 500 ng/ml) για την ανάλυση των δεδομένων του ορού και υπολογίστηκε να είναι $87,3 \pm 12,6\%$. Για τον αμφιβληστροειδή, υπολογίστηκε σε φορτισμένα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 530, 1320, 2630, 5260 ng / g. Υπολογίστηκε σε $76,7 \pm 11,1\%$. Για το υαλοειδές υπολογίστηκε σε φορτισμένα διαλύματα στις συγκεντρώσεις 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 και 50 μg/ml και μετρήθηκε σε $50.9\% \pm 8.3\%$.

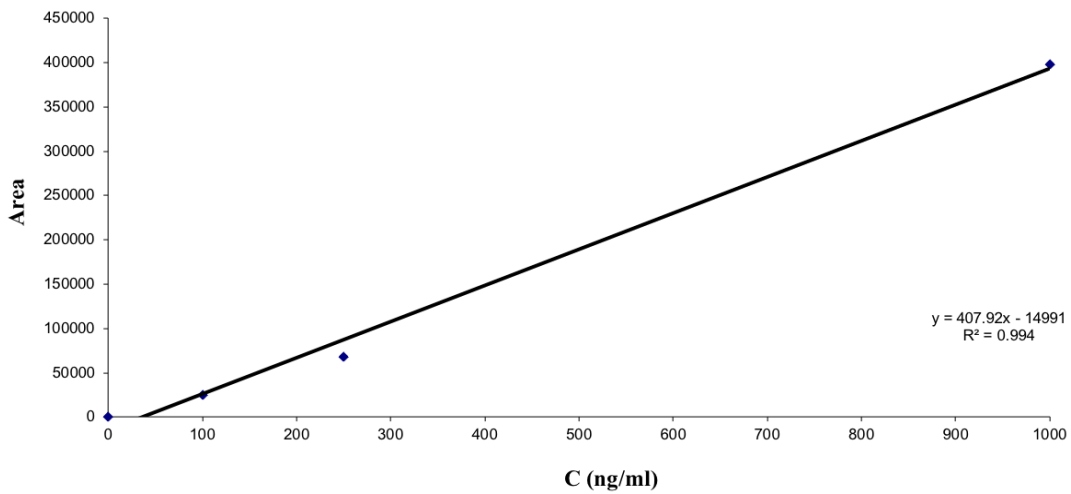
Η γραμμικότητα της μεθόδου σε πρότυπα ($r^2 = 0,999$) και φορτισμένα διαλύματα ($r^2 = 0,9975$ για τον ορό, $r^2 = 0,9930$ για τον αμφιβληστροειδή και $r^2 = 0,9983$ για το υαλοειδές) βρέθηκε αποδεκτή ($r^2 > 0,99$). Η % ακρίβεια (accuracy) και η επαναληψιμότητα (precision) μεταξύ ημερών (εκφραζόμενη ως %RSD) προσδιορίστηκαν με ανάλυση των δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων, 10, 25, 50, 100, 500 ng / ml για τον ορό, 0, 530, 1320, 2630, 5260 ng/g για τον αμφιβληστροειδή και 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 και 50 μg/ml για το υαλοειδές. Η μέση % ακρίβεια της μεθόδου ήταν $101 \pm 17,7$ για την ανάλυση του ορού και $100,6 \pm 14,6$ για τον αμφιβληστροειδή, ενώ η επαναληψιμότητα μεταξύ ημερών ήταν $13,1 \pm 3,2$ για τον ορό και $10,6 \pm 2,1$ για τον αμφιβληστροειδή.

Επιπλέον, επιτεύχθηκαν χαμηλά όρια προσδιορισμού (Limit of Determination, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) τα οποία μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τα επίπεδα BNN στους υπό μελέτη ιστούς.

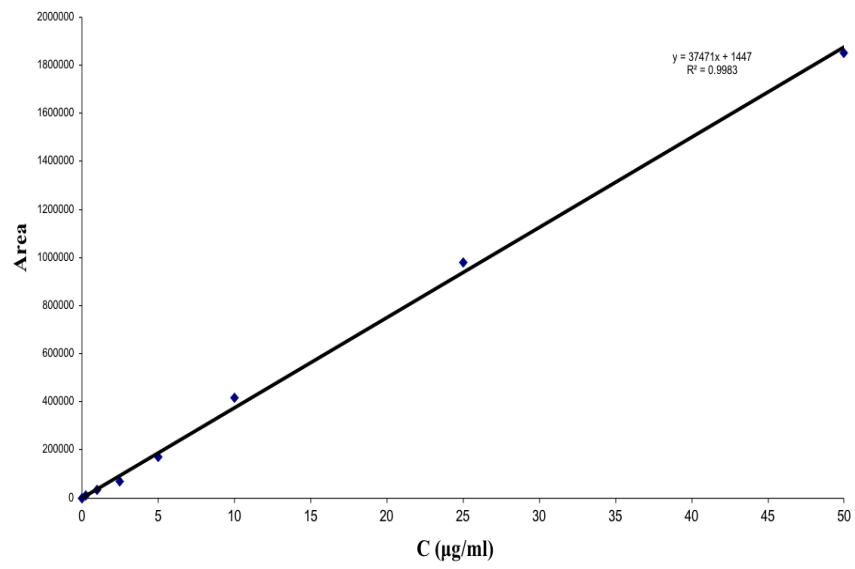
Συγκεκριμένα, οι τιμές LOD και LOQ για την ανίχνευση του BNN27 σε δείγματα αμφιβληστροειδούς ήταν 17 ng/g και 55 ng/g αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές για τον προσδιορισμό στα δείγματα ορού αίματος ήταν 2,9 και 9,7ng/ml αντίστοιχα και για το υαλοειδές 0.05 μg/ml και 0.17 μg/ml.



Σχήμα 6: Γραμμικότητα της μεθόδου σε φορτισμένα δείγματα του ορού.



Σχήμα 7: Γραμμικότητα της μεθόδου σε φορτισμένα δείγματα αμφιβληστροειδούς.



Σχήμα 8: Γραμμικότητα της μεθόδου σε φορτισμένα δείγματα υαλοειδούς.

7.2. Φαρμακοκινητική

7.2.1. Φαρμακοκινητική BNN27 στη συστηματική κυκλοφορία και τον αμφιβληστροειδή, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση.

7.2.1.1. Συστηματική Κυκλοφορία

Υπολογίστηκε η μέση συγκέντρωση BNN27 ορού (C_{Serum} , ng/ml), μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 100 mg/kg β.σ. BNN27 σε μύες C57BL/6, για τις χρονικές στιγμές 0 (αμέσως μετά την έγχυση), 15, 30 λεπτά, 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες μετά την έγχυση (n=5, για κάθε χρονική στιγμή). Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν με μη-παραμετρική ανάλυση.

Ο μέσος όγκος αίματος που συλλέχθηκε ανά χρονική στιγμή ήταν $0,5 \pm 0,15$ ml. Ο μέσος όγκος του ορού που συλλέχθηκε ήταν $0,15 \pm 0,05$ ml.

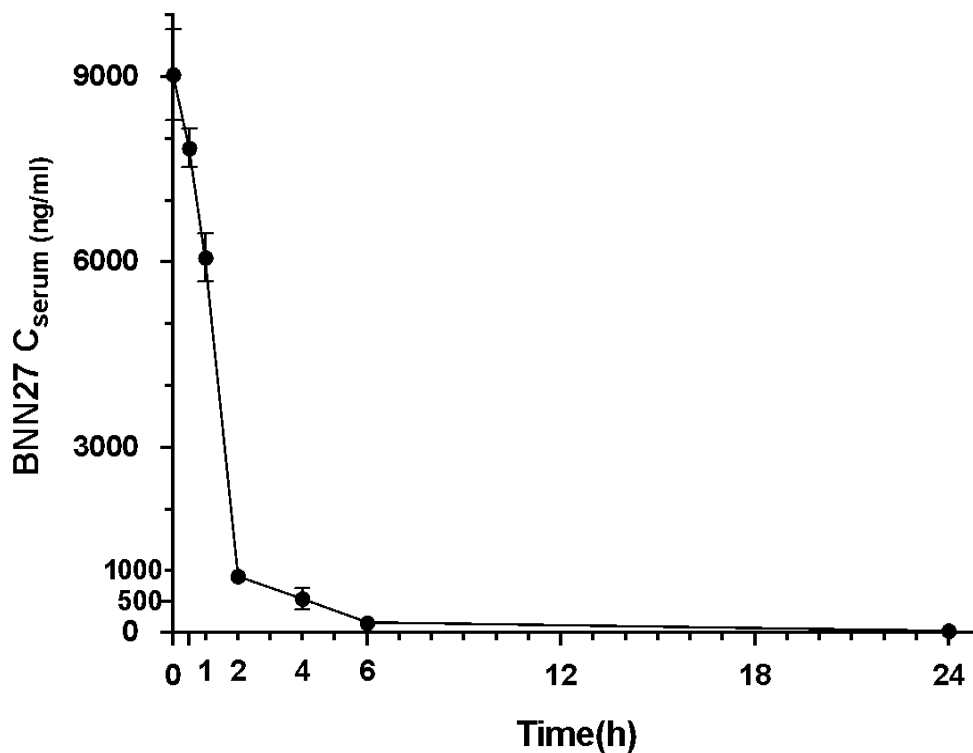
Όλα τα τυφλά δείγματα μετρήθηκαν σε μηδενική συγκέντρωση.

Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων (ΤΣ), καθώς και οι τιμές της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC) και της περιοχής κάτω από την καμπύλη την πρώτη στιγμή (Area Under the first Moment Curve, AUMC) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Η μεταβολή της μέσης συγκέντρωσης του BNN27 (ng/ml) και το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (Standard Error of the Mean, SEM) , για n=5, σε σχέση με το χρόνο (ώρες, h) απεικονίζονται στο σχήμα 9.

Χρόνος (h)	C_{Serum} (ng/ml) (δόση=100mg/kg)	AUC (ng*hr/mL)	AUMC (ng*hr ² /mL)
0	9026.7 (744.08)	0	0
0.25	-	-	-
0.5	7838.2 (312.87)	4216.22214	979.776099
1	6064.4 (393.4)	7691.86108	3475.63894
2	907.1 (83.31)	11177.6028	7414.94891
4	542.9 (180.48)	12627.6369	1400.8122
6	152.9 (16.88)	13323.4345	14489.8026
24	26.9 (0.44)	14941.6345	28556.8026
∞		15107.9661	32548.7626

Πίνακας 2. Συγκέντρωση BNN27 στον ορό μυων C57BL/6 (C_{Serum} , ng/ml) σε σχέση με το χρόνο (h). Η συγκέντρωση αντιπροσωπεύει το μέσο όρο(ΤΣ) για n=5. Συμπεριλαμβάνονται, επίσης, οι τιμές της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC) και της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη την πρώτη στιγμή (Area Under the first Moment Curve, AUMC).



Σχήμα 9: Συγκέντρωση (C_{serum}, ng/ml) του BNN27 σε σχέση με το χρόνο (t, h), μετά από ip έγχυση 100 mg/kg β.σ. BNN27 σε C57BL/6 μυς. Σε κάθε χρονική στιγμή αντιστοιχεί η μέση συγκέντρωση (ΤΣ) 5 δειγμάτων (το ΤΣ (τυπικό σφάλμα) δεν απεικονίζεται όταν η μπάρα είναι μικρότερη από το σύμβολο απεικόνισης).

Υπολογίστηκαν η φαινόμενη σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης, $K_{el}(h^{-1})$ (apparent elimination rate constant), ίση με 0,465 και ο χρόνος μέσης παραμονής στο αίμα (Mean Residence Time, MRT) ίσος με 2,154 ώρες. Η χορηγούμενη δόση του BNN27 (D_0) για τον υπολογισμό της κάθαρσης (Clearance, Cl) ήταν 2,45 mg BNN27 (100mg/kg για μέσο βάρος ζώων 24,5 g). Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι τόσο για τη συστηματική, όσο και για την αμφιβληστροειδική κινητική συνοψίζονται παρακάτω, στον Πίνακα 4.

7.2.1.2. Αμφιβληστροειδής χιτώνας

Υπολογίστηκε η μέση συγκέντρωση BNN27 στους αμφιβληστροειδείς (C_{Retina} , ng/g) μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 30 mg/kg β.σ. BNN27 σε επίμυες Sprague-Dawley, για τις χρονικές στιγμές 0 (αμέσως μετά την έγχυση), 15, 30 λεπτά, 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες μετά την έγχυση (n=5 επίμυες, για κάθε χρονική στιγμή (βλ κεφ 4.2.3.3). Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν με μη-παραμετρική ανάλυση.

Το μέσο βάρος του αμφιβληστροειδούς S-D επίμου ήταν $19 \pm 0,5$ mg.

Όλα τα τυφλά δείγματα μετρήθηκαν σε μηδενική συγκέντρωση.

Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων (ΤΣ), καθώς και οι τιμές της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC) και της περιοχής κάτω από την καμπύλη την πρώτη στιγμή (Area Under the first Moment Curve, AUMC) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Η μεταβολή της μέσης συγκέντρωσης BNN27(ng/g) (ΤΣ) σε σχέση με το χρόνο (h) απεικονίζονται στο Σχήμα 10.

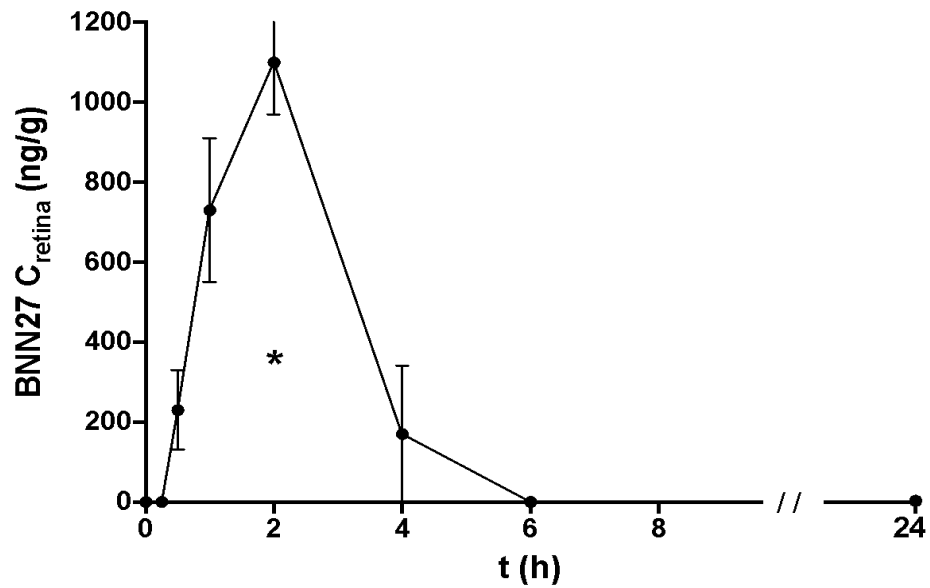
Η μέγιστη συγκέντρωση που μετρήθηκε (C_{max}) ήταν 1100ng/g, τη χρονική στιγμή $t_{\text{cmax}} = 2\text{h}$ μετά από την έγχυση.

Στο ίδιο χρονικό σημείο (2 ώρες μετά την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση), η μέση συγκέντρωση του αμφιβληστροειδικού BNN27 στα ζώα που υποβλήθηκαν σε perfusion μετά από ip έγχυση 30mg/kg β.σ. BNN27 (n=5) ήταν 320 (70) ng/g. Στο δείγμα ελέγχου μετρήθηκαν μηδενικά επίπεδα BNN27.

Χρόνος (h)	C _{Retina} (ng/g) (δόση = 30 mg/kg)	AUC (ng*hr/g)	AUMC (ng*hr ² /g)
0	<LOD		
0.25	<LOD	0	0
0.5	230 (100)	28.75	14.375
1	730(180)	268.75	225.625
2	1.100(130)*	1183.75	1690.625
4	170(160)	2453.75	4570.625
6	<LOD	2623.75	5250.625
24	<LOD	2623.75	5250.625
∞		2623.75	5250.625

*Η αντίστοιχη μετρούμενη τιμή μετά από perfusion (βλ μέθοδος για περισσότερες πληροφορίες) είναι **320 (70) ng/g**.

Πίνακας 3. Συγκέντρωση BNN27 στον αμφιβληστροειδή S-D επιμυων (C_{Retina} , ng/g) σε σχέση με το χρόνο (h). Η συγκέντρωση αντιπροσωπεύει το μέσο όρο(ΤΣ) για n=5. Συμπεριλαμβάνονται, επίσης, οι τιμές της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC) και της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη την πρώτη στιγμή (Area Under the first Moment Curve, AUMC).



Σχήμα 10: Συγκέντρωση (C_{retina} , ng/g) του BNN27 σε σχέση με το χρόνο(t, h), μετά από ip έγχυση 30 mg/kg β.σ. BNN27 σε S-D επίμυς. Σε κάθε χρονική στιγμή αντιστοιχεί η μέση συγκέντρωση(ΤΣ) 5 δειγμάτων. Κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε 1 πειραματόζωο και περιλαμβάνει τους αμφιβληστροειδείς και των δυο οφθαλμών (ΔΑΟ).

Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι συνοψίζονται στον Πίνακα 4, όπου παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, μαζί με τις αντίστοιχες παραμέτρους του ορού.

Φαρμακοκινητικές παράμετροι	Ορός (μύες) [για AUC _∞]	Αμφιβληστροειδής (επίμυες)
C_{max}	9026.68 ng/ml	1100 ng/g
AUC	15107.9661ng*h/mL	2623.75 ng*h/g
AUMC	32548.7626 ng*h ² /mL	5250.63 ng*h ² /g
MRT (h)	2.154	2.001
K_{el} (h⁻¹)	0.465	0.450
Cl (L/h) [assuming F=1]	0.162	-
V_{ss} (L)	0.394	-

Πίνακας 4. Φαρμακοκινητικές παράμετροι BNN27, βασισμένες στις συγκεντρώσεις ορού μυων και τις αμφιβληστροειδικές συγκεντρώσεις επίμυων, έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 100 mg/kg β.σ. και 30 mg/kg β.σ. BNN27 αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε μη -παραμετρική φαρμακοκινητική ανάλυση.

7.2.3. Φαρμακοκινητική BNN27 στο υαλοειδές, μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση

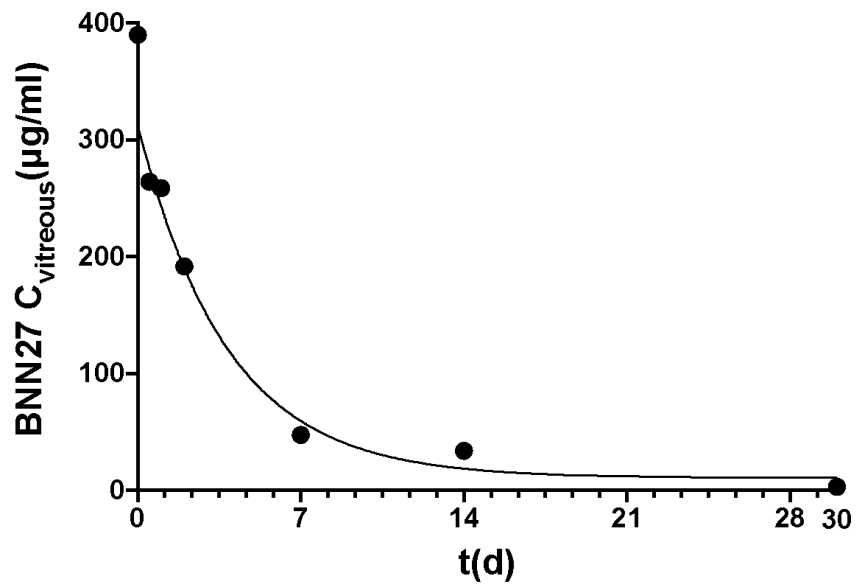
Υπολογίστηκε η μέση συγκέντρωση BNN27 στο υαλοειδές σώμα (C_{vitreous} , $\mu\text{g/ml}$), μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση 0.1ml μίγματος BNN27 συγκέντρωσης 6mg/ml, για τις χρονικές στιγμές 0 (αμέσως μετά την έγχυση), 12 ώρες, 1, 2, 7, 14 και 30 ημέρες μετά την IVT έγχυση ($n=6$ οφθαλμοί, για κάθε χρονική στιγμή).

Η μεταβολή της συγκέντρωσης του BNN27 στην ενδοϋαλοειδική κοιλότητα βρέθηκε να ακολουθεί κατανομή της 1^{ης} τάξης στο μονοδιαμερισματικό μοντέλο της ενδοϋαλοειδικής κοιλότητας .

Ο χρόνος ημίσειας ζωής υπολογίστηκε ίσος με $t_{1/2} = 4.49$ ημέρες. Η $k_{el} = 0.15(\text{h}^{-1})$. Η κάθαρση, για $V = 1.1\text{ml}^{60}$ υπολογίστηκε ίση με $Cl = 0.17\text{ml/h}$.

Η μεταβολή της μέσης συγκέντρωσης BNN27(TΣ) (mg/ml) σε σχέση με το χρόνο (μέρες, days, d) απεικονίζονται στο σχήμα 11.

Σε όλα τα τυφλά δείγματα μετρήθηκε μηδενική συγκέντρωση BNN27.



Σχήμα 11. Συγκέντρωση (C_{vitreous} , $\mu\text{g/ml}$) του BNN27 σε σχέση με το χρόνο (t σε ημέρες, days, d), μετά από IVT έγχυση 0.1ml μίγματος BNN27 συγκέντρωσης 6 mg/ml σε οφθαλμούς κονίκλων. Σε κάθε χρονική στιγμή αντιστοιχεί ο ΜΟ(ΤΣ) 6 δειγμάτων. $T_{1/2}=4.49$, $K_{el}=0.15$, $Cl=0.17$

7.3. Αμφιβληστροειδική Τοξικότητα

7.3.1. Καταγραφή επιπλοκών και ανεπιθύμητων συμβάντων.

Τελικά, 9 στα 12 πειραματόζωα από κάθε ομάδα (9 πειραματικοί οφθαλμοί και 9 οφθαλμοί ελέγχου σε κάθε ομάδα) έφτασαν μέχρι το τελικό χρονικό σημείο της μελέτης, τις 30 μέρες μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Από την ομάδα A, μεταξύ των 3 ζώων που δε συμπεριλήφθηκαν, ένας κόνικλος πέθανε αιφνίδια την 10^η μέρα μετά την έγχυση και δυο εμφάνισαν ενδοϋαλοειδική φλεγμονή. Από την ομάδα B, δύο κόνικλοι πέθαναν αιφνίδια την 30η ημέρα κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και ένας έπαθε ενδοφθαλμίτιδα.

Ομάδα A:

Εξαιτίας μεταθανάτιων αλλοιώσεων, δεν υπήρξε κατάλληλο υλικό για ιστολογική ανάλυση του κόνικλου που πέθανε αιφνίδια. Ο θάνατος του θεωρήθηκε τυχαίο γεγονός. Οι δύο άλλοι κόνικλοι που αποκλείστηκαν, εμφάνισαν εικόνα θολού υαλοειδούς στον οφθαλμό μελέτης, στο χρονικό σημείο των δύο εβδομάδων, χωρίς άλλα σημεία φλεγμονής, όπως ερυθρότητα, κύτταρα στον πρόσθιο θάλαμο, ιριδοφακικές συνέχειες, χorioαμφιβληστορειδικές αλλοιώσεις ή ανησυχία ή άλλου τύπου συμπεριφορά του ζώου που να υποδηλώνει πόνο ή δυσφορία.

Στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο, η θολή βυθοσκόπηση θεωρήθηκε αποτέλεσμα της διάχυσης του αδιαφανούς μίγματος στο υαλοειδές και τα πειραματόζωα συνέχισαν την παρακολούθηση. Ωστόσο, την 30η μέρα του πειράματος, στους οφθαλμούς μελέτης των ίδιων δύο ζώων υπήρχαν ενδείξεις ενδοϋαλοειδικής φλεγμονής, με λευκές

εναποθέσεις στο υαλοειδές και εξιδρωματική αποκόλληση εμφανή βυθοσκοπικά στο ένα από τα δύο ζώα. Δεν παρατηρήθηκαν στοιχεία φλεγμονής στο πρόσθιο ημιμόριο ή συμπεριφορά ενδεικτική πόνου ή δυσφορίας στο ζώο. Επιπλέον, οι καλλιέργειες του υαλοειδούς ήταν αρνητικές. Τα περιστατικά θεωρήθηκαν ως άσηπτες ενδοφθαλμίτιδες χωρίς υπόπυο. Στην περίπτωση αυτή, δεν ήταν δυνατό να αποκλειστεί συσχέτιση με το υπό μελέτη μόριο.

Ομάδα Β:

Οι αιφνίδιοι θάνατοι της δεύτερης ομάδας θεωρήθηκαν επιπλοκή της αναισθησίας, μια και οι δυο κόνικλοι πραγματοποίησαν κανονικά το πρώτο κομμάτι του πειράματος, της κλινικής εξέτασης και της βυθοσκόπησης και απεβίωσαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, όσο βρίσκονταν υπό την επίδραση της αναισθησίας. Ο οφθαλμός με ενδοφθαλμίτιδα ήταν οφθαλμός μελέτης και εμφάνισε τυπικά σημεία βακτηριακής ενδοφθαλμίτιδας, με έντονη αντίδραση στον πρόσθιο θάλαμο, υπόπυο και αιμορραγικά στοιχεία.

Στο οπίσθιο ημιμόριο, η ενδοϋαλοειδική κοιλότητα ήταν σχεδόν κατειλημμένη πλήρως με υποκίτρινο εξιδρωματικό υλικό, ενώ διαπιστώθηκε εξιδρωματική αποκόλληση και αιμορραγικά στοιχεία στην περιοχή του οπτικού νεύρου. Η ιστολογία έδειξε διήθηση του ιστού από λευκοκύτταρα και αποκόλληση. Η καλλιέργεια επιβεβαίωσε πρασινίζοντα στρεπτόκοκκο (*Streptococcus viridans* spp). Θεωρήθηκε δευτερογενής λοίμωξη της διαδικασίας της ενδοϋαλοειδικής έγχυσης και δε συνδέθηκε με το υπό μελέτη μόριο.

7.3.2. Κλινική Εξέταση

a. Σχισμοειδής λυχνία

Χωρίς ανωμαλίες ή φλεγμονή στο πρόσθιο ημιμόριο παρατηρήθηκαν τόσο οι 9 οφθαλμοί μελέτης, όσο και οι 9 οφθαλμοί ελέγχου κάθε ομάδας, στον προεγχειρητικό έλεγχο, αλλά και σε όλες τις φάσεις της παρακολούθησης, έως την 30^η ημέρα.



Εικόνα 37: Μετεγχειρητικός έλεγχος- πρόσθιο ημιμόριο. Ήρεμο πρόσθιο ημιμόριο και διαφανής κερατοειδής και κρυσταλλοειδής φακός. Παράδειγμα οφθαλμού μελέτης ομάδας A, την 1^η μετεγχειρητική εβδομάδα, μετά από μυδρίαση. Διακρίνεται η λευκωπή εναπόθεση του κολλοειδούς οπισθοφακικά.

b. Τονομετρία

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην ΕΟΠ (mmHg) των οφθαλμών μελέτης ή ελέγχου των δύο ομάδων σε καμία χρονική στιγμή της παρακολούθησης. Η διάμεσος με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR=Q3-Q1=75%εκατοστημόριο-25% εκατοστημόριο) για την ΕΟΠ κάθε ομάδας στις διάφορες χρονικές, συνοψίζονται στον πίνακα 5. Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται επίσης η στατιστική σημαντικότητα (p- value) της μεταβολής της ΕΟΠ σε σχέση με το χρόνο, για κάθε οφθαλμό της κάθε ομάδας. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην ενδοφθάλμια πίεση με το χρόνο σε καμία ομάδα.

Η ΕΟΠ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οφθαλμών μελέτης(ΔΟ) και των οφθαλμών ελέγχου (ΑΟ) της Ομάδας Α ($p=0.25$) αλλά ούτε και της Ομάδας Β ($p=0.25$).

Ομοίως, δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της ΕΟΠ μεταξύ των οφθαλμών μελέτης της ομάδας Α και της ομάδας Β ($p=0.68$). Επίσης, η ΕΟΠ των οφθαλμών ελέγχου, που έλαβαν το διάλυμα 6%, της καθαρής αιθανόλης δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές ανάμεσα στις δύο ομάδες (Α και Β) ($p=0.72$).

Χρόνος μετά την IVT έγχυση	Διάμεσος ΕΟΠ(IQR) mmHg			
	Ομάδα Α- ΔΟ	Ομάδα Α- ΑΟ	Ομάδα Β- ΔΟ	Ομάδα Β- ΑΟ
N	9	9	9	9
0 μέρα (προ IVT)	11 (12-10.5)	12 (12-11)	10 (11.5-10)	10 (11.5-10)
1 μέρα	12 (13-11)	11 (11.5-10.5)	11 (12-10)	11 (11-10)
1 εβδομάδα	12 (12-10.5)	10 (11-10)	11 (11.5-10)	10 (11-9.5)
2 εβδομάδες	12 (12-11)	10 (11-10)	12 (12-10.5)	10 (11-10)
1 μήνας	11 (11.5-10.5)	10 (11-10)	12 (12-10)	10 (11-10)
p-value	0.574	0.201	0.709	0.473

Πίνακας 5. Διάμεση ΕΟΠ (IQR) mmHg των οφθαλμών μελέτης (ΔΟ) και των οφθαλμών ελέγχου (ΑΟ) των δύο υπό μελέτη ομάδων (Ομάδα Α=0.6mg/0.1ml και Ομάδα Β=0.06mg/0.1ml) και οι τιμές του p-value της μεταβολής της ΕΟΠ με το χρόνο, κάθε ομάδας οφθαλμών κατά τη διάρκεια της μελέτης (πριν την έγχυση και μέχρι την 30^η ημέρα της μελέτης)

c. Βυθοσκόπηση

Προεγχειρητικός έλεγχος

Η βυθοσκόπηση ήταν φυσιολογική σε όλους τους οφθαλμούς, μελέτης και ελέγχου και των δύο ομάδων.

Παρατηρήθηκαν παραλλαγές στη μελάγχρωση του αμφιβληστροειδή αμφοτέρων των οφθαλμών σε 3/9 ζώα της ομάδας Α και 4/9 ζώα της ομάδας Β προεγχειρητικά. Η λειτουργία του αμφιβληστροειδή διαπιστώθηκε φυσιολογική στο προεγχειρητικό ΗΑΓ,

οπότε θεωρήθηκαν φυσιολογικές ανατομικές παραλλαγές και οι κόνικλοι παρέμειναν στο πείραμα. Τα ευρήματα αυτά δε μεταβλήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Μετεγχειρητικός έλεγχος

1^η ημέρα:

Ομάδα A:

Οι οφθαλμοί μελέτης της ομάδας A (υψηλή συγκέντρωση BNN27), εμφάνισαν το αδιαφανές κολλοειδές συγκεντρωμένο οπισθοφακικά και σε δύο εξ' αυτών, η γαλακτώδης εμφάνιση εξαπλωνόταν σε όλο το κανάλι του Cloquet. Η βυθοσκόπηση ήταν δυσχερής, αλλά το τμήμα της περιφέρειας του αμφιβληστροειδή που ήταν ορατό ήταν φυσιολογικό.

Ομάδα B:

Οι οφθαλμοί μελέτης της ομάδας B (χαμηλή συγκέντρωση BNN27) είχαν όλοι φυσιολογική εικόνα διάχυσης του κολλοειδούς μες στο υαλοειδές και φυσιολογική εικόνα αμφιβληστροειδή την πρώτη μέρα.

Οι οφθαλμοί ελέγχου και των δύο ομάδων είχαν φυσιολογική βυθοσκόπηση.

1^η εβδομάδα:

Ομάδα A:

Δυσχερής εξακολουθούσε να είναι η βυθοσκόπηση των 7 από τους 9 πειραματικούς οφθαλμούς.

Ομάδα Β:

Παρατηρήθηκε ελαφρά θολερό υαλοειδές (εικόνα περαιτέρω διάχυσης του μίγματος μες στο υαλοειδές) και φυσιολογική εικόνα αμφιβληστροειδή σε όλους τους οφθαλμούς μελέτης.

Οι οφθαλμοί ελέγχου και των δύο ομάδων είχαν φυσιολογική βυθοσκόπηση.

2^η εβδομάδα:

Ομάδα Α

Παρατηρήθηκε περαιτέρω απορρόφηση του μίγματος σε 4 από τους 9 οφθαλμούς μελέτης. Στους 5 από τους 9 οφθαλμούς μελέτης, το μίγμα ήταν ακόμα ορατό, είτε συγκεντρωμένο στην περιοχή της ένεσης, είτε διάχυτα στην υαλοειδική κοιλότητα. Δύο οφθαλμοί μελέτης εμφάνισαν διάχυτα θολό υαλοειδές και ένας εκ των δύο επιπλέον ενδοϋαλοειδικά συσσωματώματα. Δεν παρατηρήθηκαν χοριοαμφιβληστροειδικές αλλοιώσεις στους εν λόγω οφθαλμούς

Οι οφθαλμοί ελέγχου εμφάνισαν φυσιολογική βυθοσκόπηση.

Ομάδα Β:

Οι οφθαλμοί ελέγχου και μελέτης είχαν φυσιολογική βυθοσκόπηση.

30^η ημέρα:

Ομάδα Α:

Στους δύο οφθαλμούς μελέτης με τα ενδοϋαλοειδικά ευρήματα της 2^{ης} εβδομάδας, το υαλοειδές παρέμενε θολό, με εμμένουσες τις διηθήσεις στον ένα από τους δύο. Δεν παρατηρήθηκαν χοριοαμφιβληστροειδικές αλλοιώσεις στους εν λόγω οφθαλμούς, αν και η βυθοσκόπηση ήταν δυσχερής στον οφθαλμό με την μεγαλύτερη ενδοϋαλοειδική αντίδραση. Η βυθοσκόπηση των υπόλοιπων οφθαλμών δεν εμφάνισε παθολογικά ευρήματα

Ομάδα Β:

Στα δύο ζώα της ομάδας Β, τα οποία πέθαναν αιφνιδίως, παρατηρήθηκαν περιοχές εντοπισμένης αποκόλλησης κατά την προετοιμασία δειγμάτων. Πιθανολογείται ότι πρόκειται για post mortem αλλοιώσεις, μια και δεν ήταν ορατές βυθοσκοπικά, κατά την εξέτασή τους, η οποία έγινε πριν τη διαπίστωση του θανάτου. Οι οφθαλμοί δεν δόθηκαν για ιστολογική εκτίμηση, γιατί αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Οι υπόλοιποι οφθαλμοί, μελέτης και ελέγχου, είχαν όλοι φυσιολογική βυθοσκόπηση.

7.3.3. Ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος (ΗΑΓ)

Οι οφθαλμοί της ομάδας Α με την ενδοφθάλμια φλεγμονή δε συμπεριλήφθηκαν, όπως προαναφέρθηκε αποκλείστηκαν από την ομάδα της μελέτης. Παρ' όλα αυτά, πραγματοποιήθηκε ΗΑΓ στους οφθαλμούς αυτούς την 30ή ημέρα (που ήταν και η μέρα διαπίστωσης της ενδοφθάλμιας φλεγμονής). Όλες οι καταγραφές ήταν καταργημένες.

Ο οφθαλμός της ομάδας Β με τη βακτηριακή ενδοφθαλμίτιδα δεν ελέγχθηκε ηλεκτροφυσιολογικά λόγω των εκτεταμένων αλλοιώσεων του οφθαλμού. Επίσης, τηρήθηκε η δεοντολογία, σε σχέση με ένα ζώο σε δυσφορία/πόννο και χορηγήθηκαν στο ζώο αναισθητικά και στη συνέχεια ευθανασία, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (βλ. θεωρητικό μέρος).

Ελέγχονται ως δείκτες αμφιβληστροειδικής τοξικότητας το πλάτος του β-κύματος στις φωτοπικές και σκοτοπικές συνθήκες, το πλάτος του φωτοπικού flicker και οι χρόνοι εμφάνισης των προαναφερθέντων αποκρίσεων (implicit times).

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων κάθε ομάδας, ελέγχθηκε η πιθανή ύπαρξη διαφοράς στις καταγραφόμενες μετρήσεις μεταξύ των δύο οφθαλμών του ίδιου ζώου προεγχειρητικά. Δεν αναμένεται ουσιώδης διαφορά στις καταγραφές της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας μεταξύ των δύο οφθαλμών σε υγιή ζώα.

A. Φωτοπικές συνθήκες

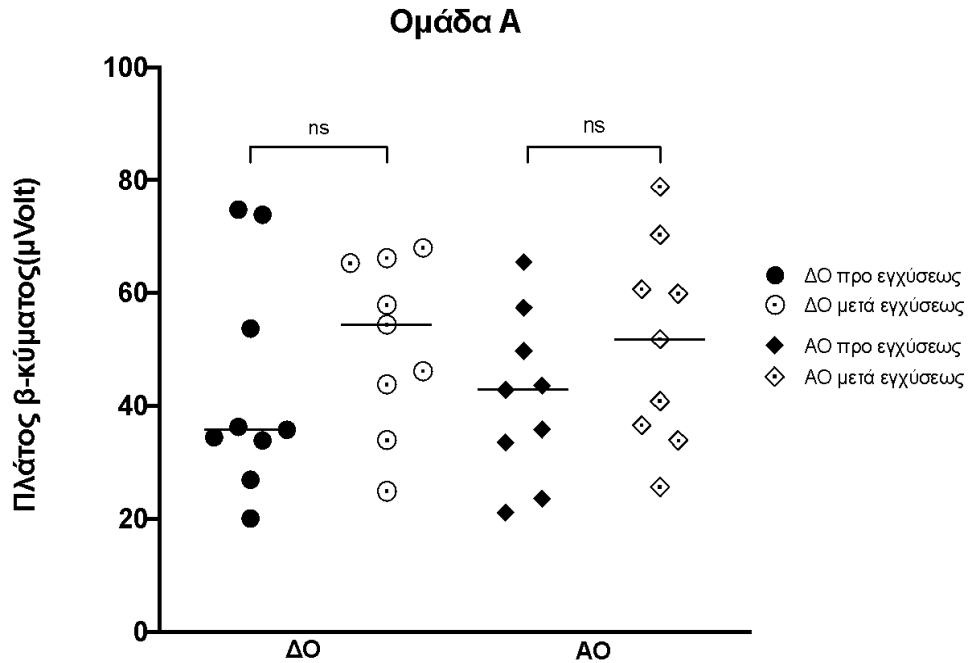
Προεγχειρητικά, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις καταγραφόμενες μετρήσεις μεταξύ του δεξιού και του αριστερού οφθαλμού, τόσο για την ομάδα Α ($p > 0.99$) όσο και για την ομάδα Β ($p = 0.234$), όπως ήταν αναμενόμενο.

Συγκρίθηκαν τα πλάτη β-κύματος της καταγραφής μετά από προβολή μονήρους φλας, πριν από την έγχυση και ένα μήνα μετά την έγχυση. Παρατίθενται τα στατιστικά χαρακτηριστικά της ομάδας στον πίνακα 6.

	ΟΜΑΔΑ Α				ΟΜΑΔΑ Β			
	ΔΟ		ΑΟ		ΔΟ		ΑΟ	
	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση
N	9	9	9	9	9	9	9	9
Πλάτος (μVolt)								
Ελάχιστο	20.2	24.9	21.2	25.6	29.7	15.3	32.7	28.3
25% τεταρτημόριο	30.5	38.9	28.7	35.3	34.1	25.3	36.8	31.3
Διάμεσος	35.9	54.4	42.9	51.8	36.6	40.8	46.1	41.0
75% τεταρτημόριο	63.8	65.7	53.6	65.5	40.6	47.2	56.6	63.7
Μέγιστο	74.8	68.0	65.6	78.8	57.5	65.3	68.7	73.1

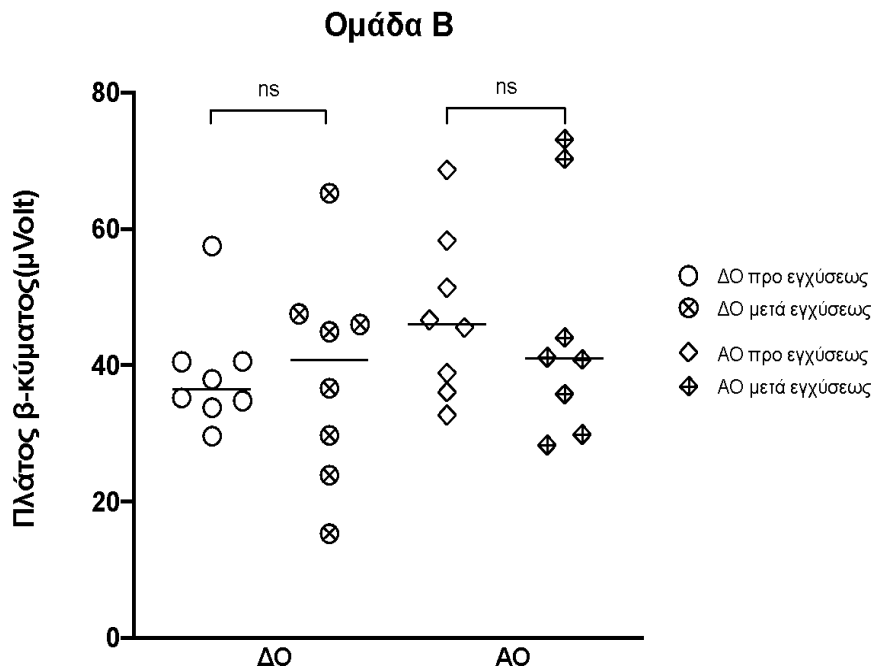
Πίνακας 6. Περιγραφική στατιστική των καταγραφών του β-κύματος μετά από μονήρες flash υπό φωτοπικές συνθήκες. Παρουσιάζεται η διάμεσος(μVolt) και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος για τον ΔΟ και τον ΑΟ των δύο ομάδων.

Επιπρόσθετα, παρουσιάζονται τα διαγράμματα διασποράς με τη διάμεσο των καταγραφών σε φωτοπικές συνθήκες του ΔΟ και του ΑΟ, πριν την ενδοϋαλοειδική έγχυση BNN27 και ένα μήνα μετά την έγχυση, στις δύο ομάδες (ομάδα Α- υψηλή δόση- σχήμα 12 και ομάδα Β- χαμηλή δόση- σχήμα 13). Η σύγκριση έγινε με μη - παραμετρική ανάλυση, για σχετιζόμενα δείγματα (Wilcoxon's matched-pairs signed rank test).



Σχήμα 12: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος πλάτους β-κύματος, μετά από μονήρες flash υπό φωτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας Α (υψηλή δόση), προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του καταγραφόμενου β-κύματος στον ΔΟ προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την έγχυση του BNN27 ($p=0.25$), αλλά ούτε στον ΑΟ($p=0.07$) προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την έγχυση του διαλύτη(6% αιθανόλη).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πλάτους του β-κύματος μετά την έγχυση του BNN27 στον οφθαλμό μελέτης ($p=0.25$), αλλά ούτε και μετά την έγχυση του διαλύτη (6% αιθανόλης) στον ΑΟ ($p=0.07$)



Σχήμα 13: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος πλάτους β-κύματος, μετά από μονήρες flash υπό φωτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας Β (χαμηλή δόση), προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση . Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του καταγραφόμενου β-κύματος στον ΔΟ προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την έγχυση του BNN27 ($p=0.95$), αλλά ούτε στον ΑΟ ($p=0.84$) προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την έγχυση του διαλύτη (6% αιθανόλη)

Δεν παρατηρήθηκε μείωση του πλάτους του β-κύματος μετά την έγχυση του BNN27 στον οφθαλμό μελέτης (ΔΟ, $p=0.95$), αλλά ούτε και μετά την έγχυση του διαλύτη (6% αιθανόλης) στον ΑΟ ($p=0.84$).

Ο μέσος χρόνος εμφάνισης της κορυφής του β-κύματος (implicit time) στους 18 φυσιολογικούς οφθαλμούς που εξετάστηκαν προεγχειρητικά ήταν 27msec (εύρος: 25-31msec) για τις φωτοπικές συνθήκες. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης της κορυφής του β-κύματος (implicit time) δε φάνηκε να μεταβάλλεται στον οφθαλμό μελέτης αλλά ούτε και στον οφθαλμό ελέγχου, τόσο στην ομάδα Α (ΔΟ:30msec $p=0.07$, ΑΟ:28msec $p=0.09$) όσο και στην ομάδα Β (ΔΟ: 31msec, $p=0.08$, ΑΟ: 31msec, $p=0.06$) (Πίνακας 7).

	ΟΜΑΔΑ Α			ΟΜΑΔΑ Β		
	Implicit time(msec) β-κύμα		p value	Implicit time(msec) β-κύμα		p value
	0 ημέρες	30 ημέρες		0 ημέρες	30 ημέρες	
ΔΟ	27 (25-30)	30 (28-34)	0.07	27 (25-31)	31 (27-44)	0.08
ΑΟ	27 (25-29)	28 (27-32)	0.09	27 (25-31)	31 (27-35)	0.06

Πίνακας 7: Μέσος χρόνος (εύρος) εμφάνισης του β-κύματος μετά από την εμφάνιση του φωτεινού ερεθίσματος σε φωτοπικές συνθήκες στις δύο ομάδες,

Β. Σκοτοπικές συνθήκες

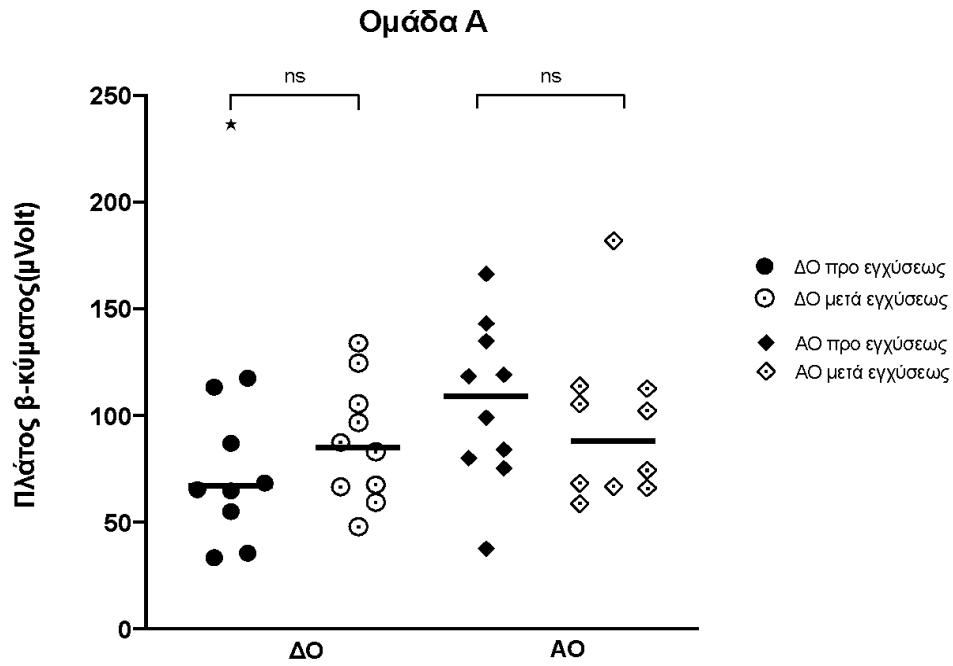
Προεγχειρητικά, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις καταγραφόμενες μετρήσεις μεταξύ του δεξιού και του αριστερού οφθαλμού, τόσο για την ομάδα Α ($p=0.23$) όσο και για την ομάδα Β ($p=0.2$).

Το πλάτος του β-κύματος της μέγιστης απόκρισης μετά από μονήρες standard flash, υπό σκοτοπικές συνθήκες, καταγράφηκε στους δύο οφθαλμούς πριν την ενδοϋαλοειδική έγχυση και ένα μήνα μετά την έγχυση. Η σύγκριση έγινε με το μη παραμετρικό τεστ για σχετιζόμενα δείγματα Wilcoxon's matched-pairs signed rank test. Τα στατιστικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων (Α, Β), περιγράφονται στον πίνακα 8.

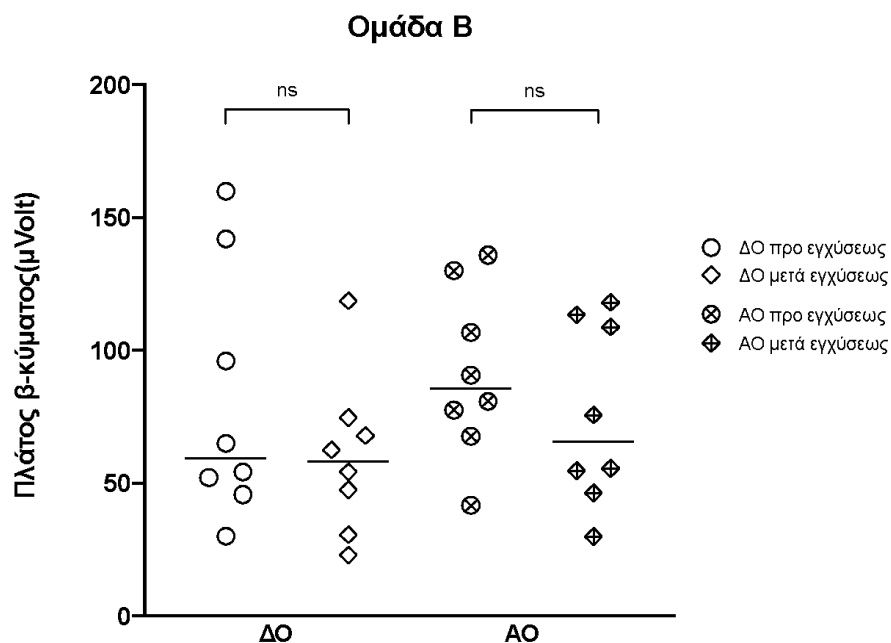
	ΟΜΑΔΑ Α				ΟΜΑΔΑ Β			
	ΔΟ		ΑΟ		ΔΟ		ΑΟ	
	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση
N	9	9	9	9	9	9	9	9
Πλάτος (μVolt)								
Ελάχιστο	33.8	48.2	38.0	58.9	30.0	23.0	41.6	30.0
25% τεταρτημόριο	50.5	64.8	79.2	66.7	47.4	34.9	70.2	48.5
Διάμεσος	67.2	85.4	109	88.3	59.6	58.5	85.8	65.6
75% τεταρτημόριο	115	110	137	113	130	73.0	124	112
Μέγιστο	237	134	167	182	160	119	136	118

Πίνακας 8: Περιγραφική στατιστική των καταγραφών του β-κύματος μετά από μονήρες standard flash υπό σκοτοπικές συνθήκες. Παρουσιάζεται η διάμεσος (μVolt) και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος για τον ΔΟ και τον ΑΟ των δύο ομάδων.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο πλάτος του β-κύματος, στους οφθαλμούς μελέτης (ΔΟ, $p > 0.99$) ή στους οφθαλμούς ελέγχου (ΑΟ, $p = 0.49$) της ομάδας Α) (σχήμα 14), αλλά ούτε και της ομάδας Β (ΔΟ, $p = 0.25$, ΑΟ, $p = 0.46$) (σχήμα 15).



Σχήμα 14: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος των καταγραφών β-κύματος μετά από προβολή μονήρους standard flash υπό σκοτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας Α (υψηλή δόση) προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Δεν παρατηρήθηκε μείωση του πλάτους του β-κύματος μετά την έγχυση του BNN27 στον ΔΟ ($p > 0.99$), αλλά ούτε και στον ΑΟ με την έγχυση του διαλύτη (6% αιθανόλη) ($p = 0.49$).



Σχήμα 15: Διάγραμμα διασποράς και διάμεσος καταγραφών β-κύματος μετά από προβολή μονήρους standard flash υπό σκοτοπικές συνθήκες των οφθαλμών της ομάδας Β (χαμηλή δόση) προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Δεν παρατηρήθηκε μείωση του πλάτους του β-κύματος μετά την έγχυση του BNN27 στον ΔΟ ($p=0.25$), αλλά ούτε και στον ΑΟ με την έγχυση διαλύτη (6% αιθανόλη) ($p=0.46$).

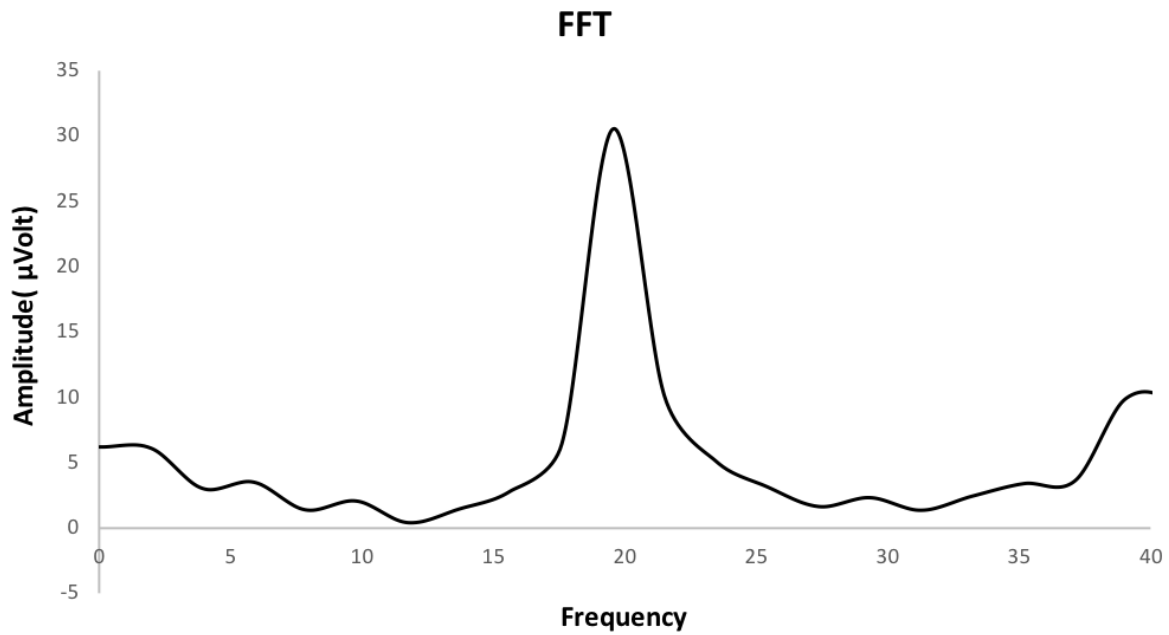
Ο μέσος χρόνος εμφάνισης της κορυφής του β-κύματος (implicit time) στους 18 προεγχειρητικούς φυσιολογικούς οφθαλμούς ήταν 66msec (εύρος: 45-78msec) για τις σκοτοπικές συνθήκες. Ο χρόνος αυτός δε φάνηκε να παρατείνεται στον οφθαλμό μελέτης (ΔΟ) ούτε στον οφθαλμό ελέγχου (ΑΟ) μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση της υπό μελέτη ουσίας και του διαλύτη αντίστοιχα, τόσο στην Ομάδα Α όσο και στην Ομάδα Β (πίνακας 9).

	ΟΜΑΔΑ Α			ΟΜΑΔΑ Β		
	Implicit time(msec) β-κύμα		p value	Implicit time(msec) β-κύμα		p value
	0 ημέρες	30 ημέρες		0 ημέρες	30 ημέρες	
ΔΟ	66 (49-73)	58(51-69)	0.19	66 (45-78)	49(45-67)	0.37
ΑΟ	69 (54-77)	64(51-69)	0.11	66 (49-78)	50(45-67)	0.23

Πίνακας 9: Μέσος χρόνος (εύρος) του β-κύματος μετά από την εμφάνιση του φωτεινού ερεθίσματος σε σκοτοπικές συνθήκες στις δύο ομάδες

Γ. Photopic Flash Flicker 20Hz

Πριν τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του εκάστοτε οφθαλμού της κάθε ομάδας, ελέγχθηκε η πιθανή ύπαρξη της διαφοράς σε καταγραφόμενες μετρήσεις μεταξύ των δύο οφθαλμών προεγχειρητικά. Δεν αναμένεται η διαφορά στις καταγραφές της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας μεταξύ των δύο οφθαλμών, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε. (Ομάδα Α: ΔΟ vs ΑΟ: $p= 0.73$, Ομάδα Β: ΔΟ vs ΑΟ: $p= 0.15$). Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός Fourier για τη σειρά των καταγραφών σε φωτοπικές συνθήκες ερεθίσματος συχνότητας 20Hz.

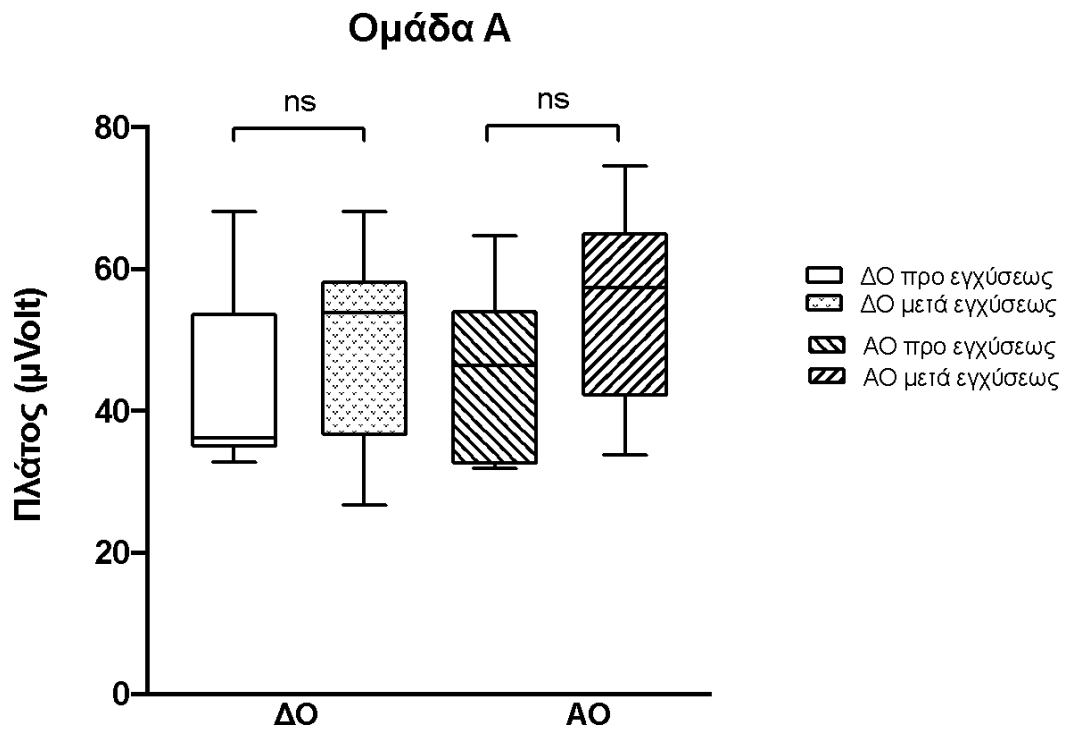


Σχήμα 16: Μετασχηματισμός Fourier των καταγραφόμενων μετρήσεων μετά από προβολή ερεθίσματος συχνότητας 20 Hz για 500msec.

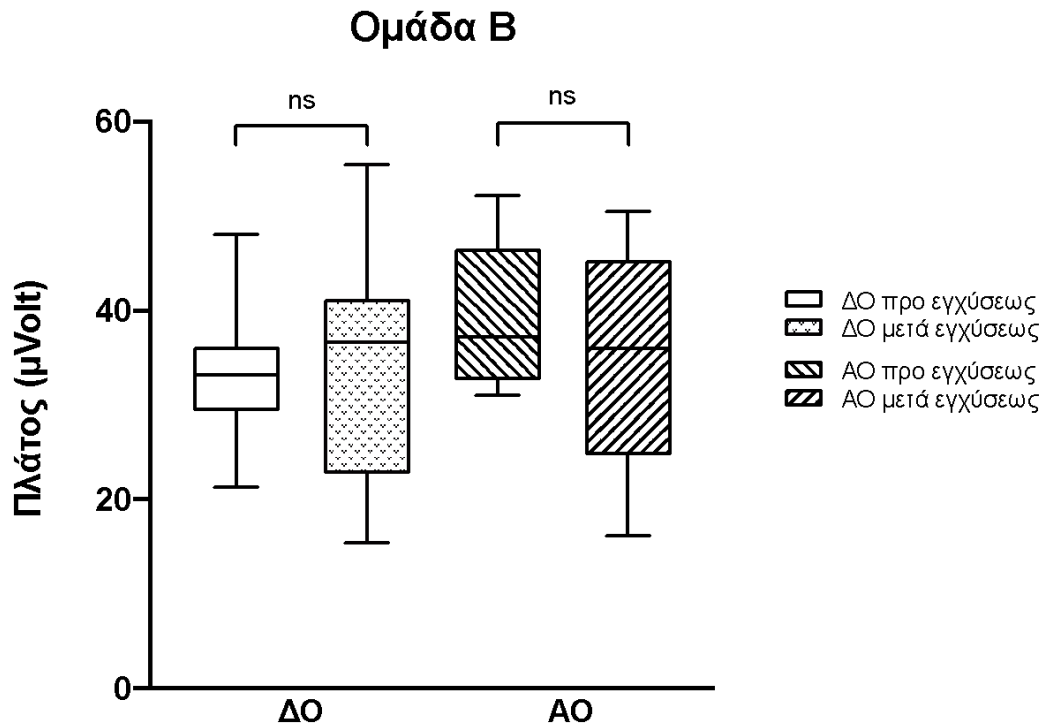
Το πλάτος των καταγραφών των photopic flickers 20Hz δεν παρουσίασε μία στατιστικά σημαντική μείωση στον οφθαλμό μελέτης ή στον οφθαλμό ελέγχου πριν και μετά την έγχυση, σε καμία από τις δύο ελεγχόμενες δόσεις (Σχήματα 17 και 18).

	ΟΜΑΔΑ Α				ΟΜΑΔΑ Β			
	ΔΟ		ΑΟ		ΔΟ		ΑΟ	
	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση	Προ εγχύσεως	1 μήνας μετά την έγχυση
N	9	9	9	9	9	9	9	9
Πλάτος (μVolt)								
Ελάχιστο	32.7	26.7	31.9	33.7	21.2	15.4	31.0	16.1
25% τεταρτημόριο	34.8	36.4	32.3	42.0	29.3	22.6	32.6	24.6
Διάμεσος	36.1	53.8	46.3	57.3	33.1	36.6	37.1	35.9
75% τεταρτημόριο	53.7	58.3	54.1	65.2	36.2	41.2	46.5	45.3
Μέγιστο	68.0	68.1	64.6	74.5	48.0	55.4	52.1	50.4

Πίνακας 10: Στατιστική περιγραφή των μετρήσεων του πλάτους (μ Volt) της ΗΑΓ καταγραφής μετά από φωτεινό ερέθισμα flicker 20Hz, για 500msec.



Σχήμα 17: Θηκογράμματα και διάμεσοι των καταγραφών του ΗΑΓ μετά από την προβολή φωτεινού ερεθίσματος τύπου flash flicker συχνότητας 20Hz, σε φωτοπικές συνθήκες, προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Τόσο για τον ΔΟ ($p= 0.30$) όσο και για τον ΑΟ ($p= 0.16$), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα καταγραφόμενα πλάτη, πριν και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση BNN27 και διαλύτη (6% αιθανόλη) αντίστοιχα.



Σχήμα 18: Θηκογράμματα και διάμεσοι του πλάτους των καταγραφών του ΗΑΓ μετά από την προβολή φωτεινού ερεθίσματος τύπου flash flicker συχνότητας 20Hz, σε φωτοπικές συνθήκες, προεγχειρητικά και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Τόσο για τον ΔΟ ($p= 0.95$) όσο και για τον ΑΟ ($p= 0.46$), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα καταγραφόμενα πλάτη πριν και ένα μήνα μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση BNN27 και διαλύτη (6% αιθανόλη) αντίστοιχα.

7.3.4. Ιστολογία

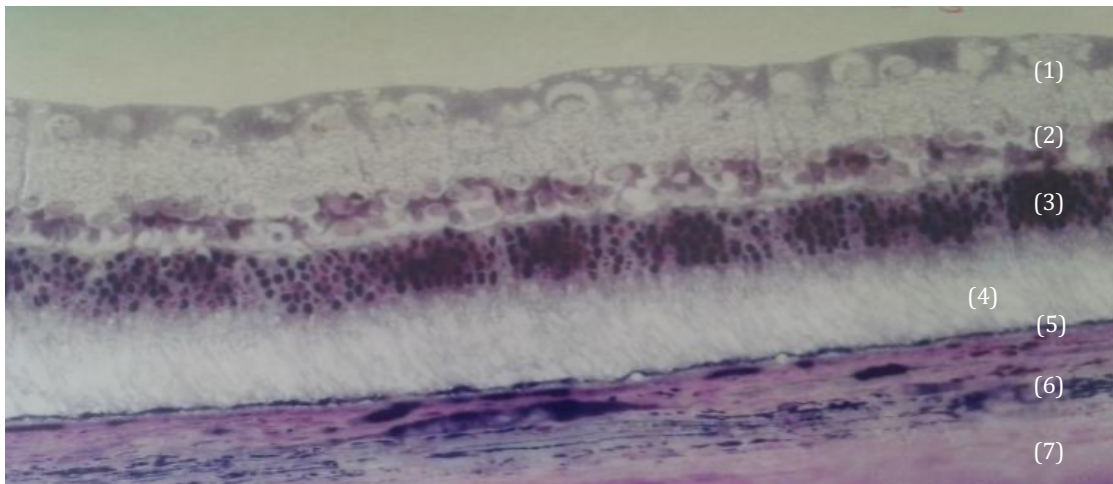
Κατά την προετοιμασία των ιστοτεμαχίων, επιλέγονταν δειγματοληπτικά τμήματα από την περιθηλαία περιοχή, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής θηλής, παραθηλαία δείγματα, καθώς και περισσότερο κεντρικά και περιφερειακά δείγματα του αμφιβληστροειδή, με τυχαίο τρόπο.

Εφόσον είχαν ανιχνευθεί μακροσκοπικές αλλοιώσεις κατά τη βυθοσκόπηση ή τη μακροσκοπική παρατήρηση, κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των μονιμοποιημένων δειγμάτων, δημιουργούνταν επιπλέον ιστοτεμάχια που να περιλαμβάνουν τις περιοχές ενδιαφέροντος.

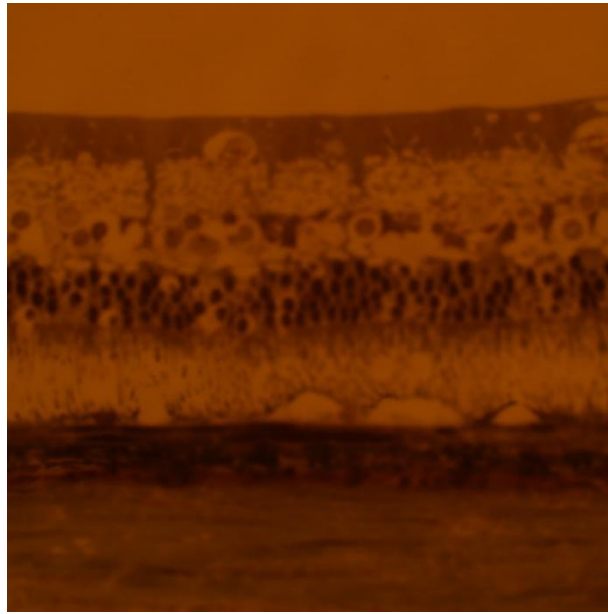
ΟΜΑΔΑ Α

Στους οφθαλμούς μελέτης, που έλαβαν την υψηλή δόση BNN27, παρατηρήθηκαν ιστολογικά αλλοιώσεις σε πολλαπλά επίπεδα του οπίσθιου ημιμορίου. Οι οφθαλμοί με την ενδοϋαλοειδική φλεγμονή εμφάνισαν εκτεταμένες αλλοιώσεις, όπως συρρίκνωση της έσω κοκκώδους στοιβάδας (εικόνα 40) και ουλοποίηση (εικόνα 43). Οι υπόλοιποι οφθαλμοί εμφάνισαν και άλλες μη ειδικές αλλοιώσεις, όπως αλλοιώσεις στη στιβάδα των φωτοϋποδοχέων με την εμφάνιση πολλαπλών κενοδοτιών (εικόνα 39), εντοπισμένες αμφιβληστροειδικές αποκολλήσεις (εικόνα 40), χοριοειδική αποκόλληση (εικόνα 41) και αποκόλληση νευροεπιθηλίου και μελάγχρου επιθηλίου (εικόνα 42). Σε κάποια δείγματα παρατηρήθηκε στρέβλωση των έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, αδιευκρίνιστης σημασίας. Στα περισσότερα, βρισκόταν υπερκείμενα των εντοπισμένων διατεταμένων ιστών (εικόνα 46)

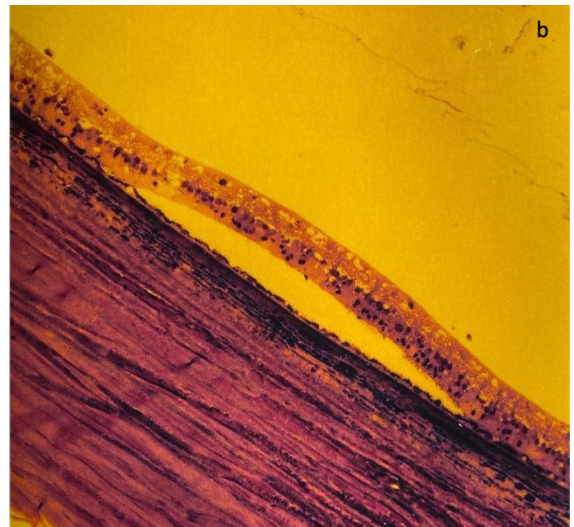
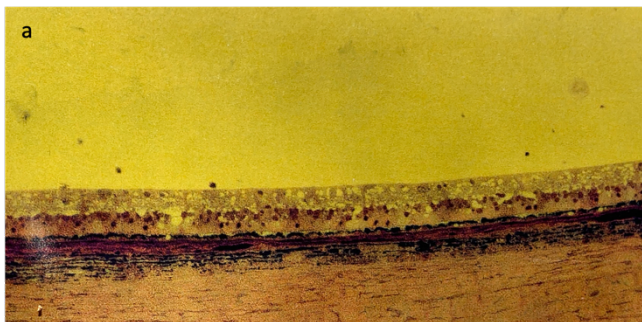
Οι οφθαλμοί ελέγχου δεν εμφάνισαν αμφιβληστροειδικές αλλοιώσεις. Παρατίθεται εικόνα δείγματος φυσιολογικού αμφιβληστροειδή οφθαλμού κονίκλου από την ομάδα ελέγχου (εικόνα 38).



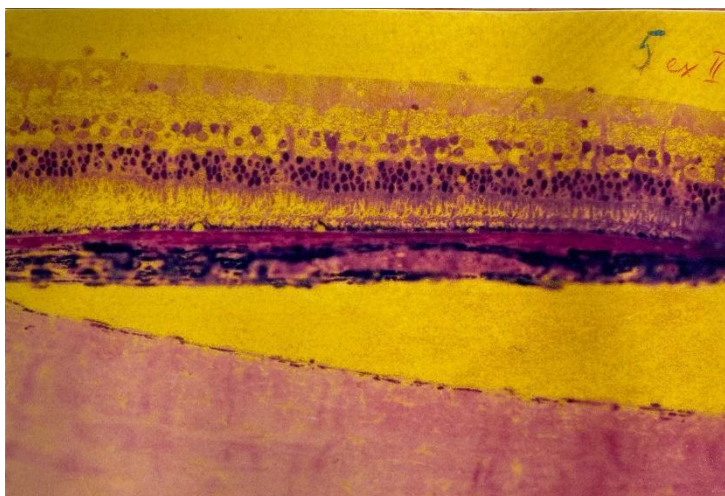
Εικόνα 38: Διατομή φυσιολογικού αμφιβληστροειδή κονίκλου με τις επιμέρους στιβάδες, Διακρίνονται η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (1), η έσω κοκκώδης στιβάδα (2), η έξω κοκκώδης στιβάδα (3), η στιβάδα των έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων (4), το μελάγχρουν επιθήλιο(5), ο χοριοειδής(6) και ο σκληρός χιτώνας (7).



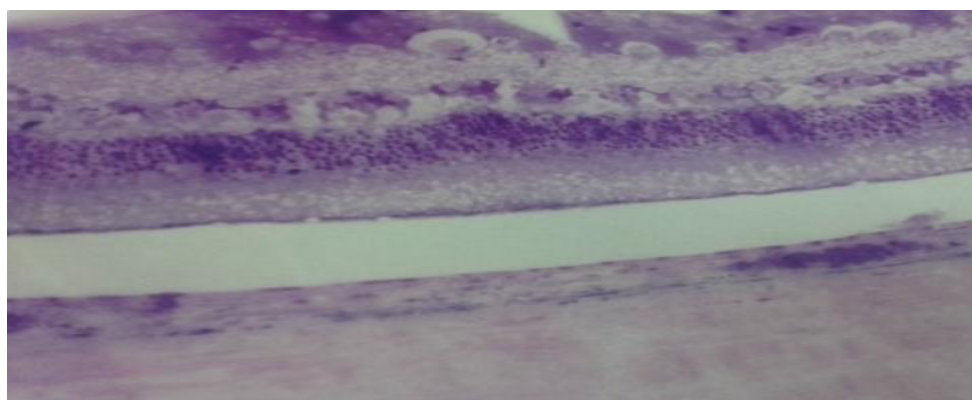
Εικόνα 39: Πολλαπλά κενοτόπια στις έξω αμφιβληστορειδικές στιβάδες



Εικόνα 40: Ελαττωμένη έξω κοκκώδης στιβάδα (a,b) με συνοδό εντοπισμένη αποκόλληση αμφιβληστορειδή



Εικόνα 41: Χοριοειδική αποκόλληση.

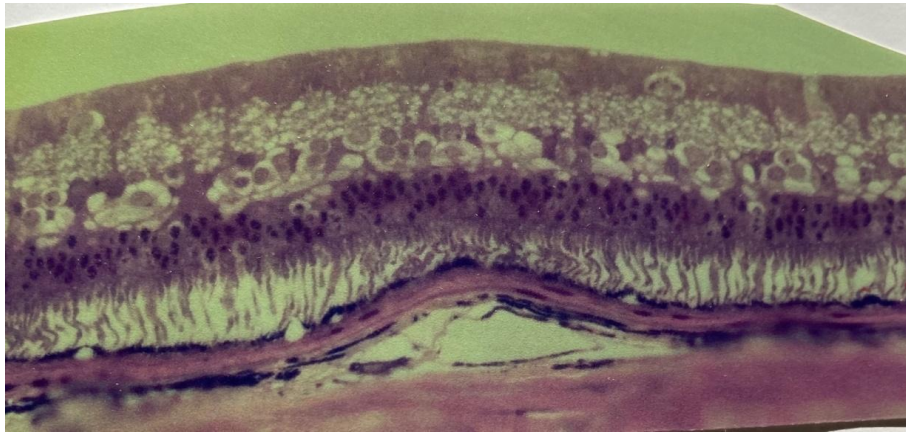


Εικόνα 42: Το νευροεπιθήλιο μαζί με το μελάχρον επιθήλιο έχουν αποσπαστεί από τον υποκείμενο χοριοειδή. Κάποια debris παρατηρούνται στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο.

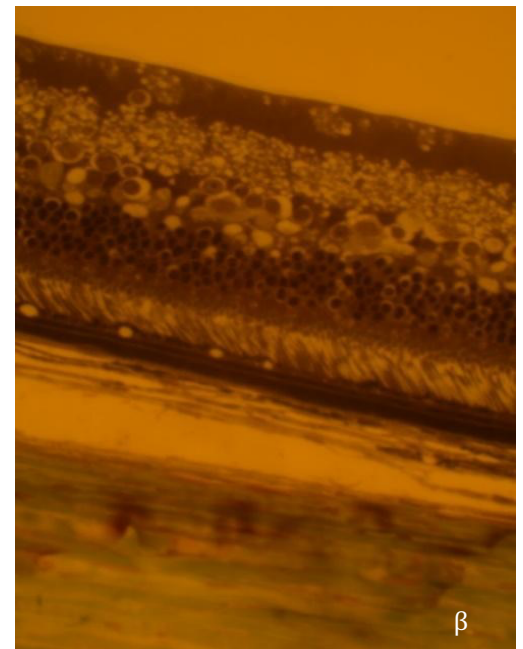
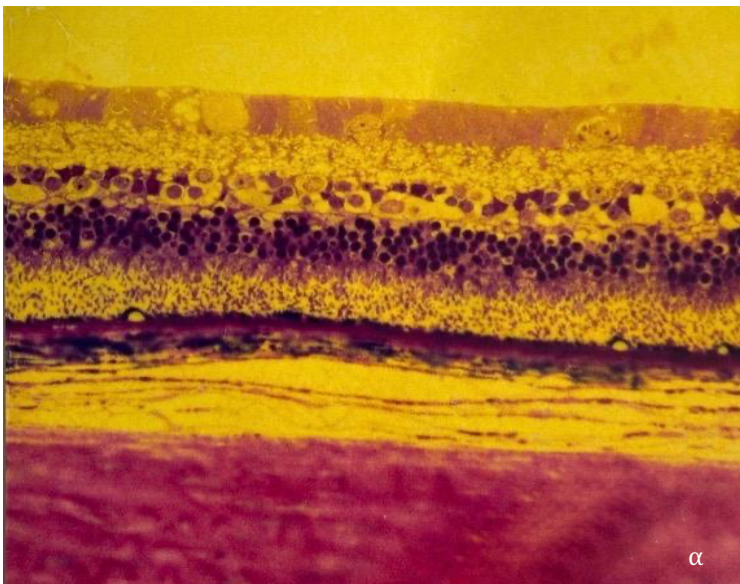


Εικόνα 43: Ουλοποίηση. Η ανατομία του ιστού είναι καθολικά αποδιοργανωμένη. Δεν υπάρχουν διακριτές στιβάδες. Η στιβάδα των φωτοϋποδοχέων έχει εξαφανιστεί.

Οι εικόνες αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή, μαζί με το μελάγχρουν επιθήλιο (εικόνα 42), αλλά και οι εντοπισμένες χοριοειδικές αποκολλήσεις (εικόνες 44, 45) θεωρήθηκαν συμπιεστικής/διατακτικής φύσεως, πιθανά λόγω συσσώρευσης υγρών ενδοϊστικά, κάτι που θα εξηγούσε και την υπερκείμενη στρέβλωση των έξω τμημάτων. Θεωρήθηκε εύρημα σχετικό με την παρασκευή των δειγμάτων, παρόλ'αυτά, δεν μπορεί να αποκλειστεί η συσχέτιση με το BNN.



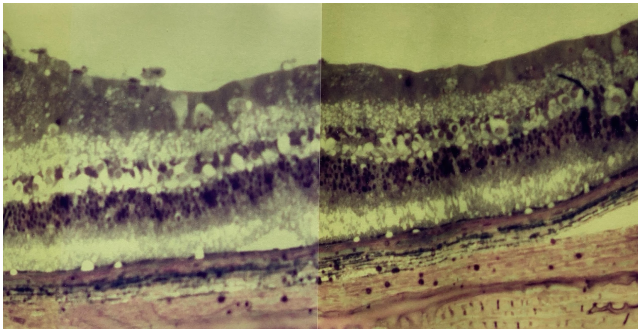
Εικόνα 44: Εντοπισμένη υπαμφιβληστροειδική περιοχή με ενδοϊστική διάταση, που η δημιουργία της έχει προκαλέσει την συμπίεση/στρέβλωση των υπερκείμενων έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων.



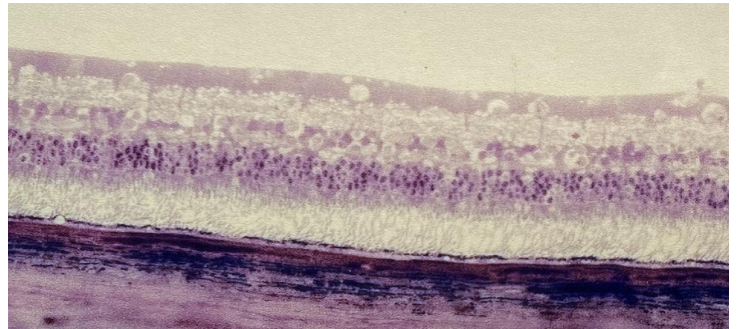
Εικόνα 45: Διάταση του υπερχοροειδικού χώρου με συμπίεση των υπερκείμενων σιβάδων (α). Εικόνα (β), παρόμοια εικόνα σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.

Ομάδα Β

Στους πειραματικούς οφθαλμούς της ομάδας Β παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις ενδοϊστικής διάταξης και εντοπισμένα κενοτόπια στις έξω αμφιβληστροειδικές στιβάδες (εικόνα 46). Στους οφθαλμούς ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα (εικόνα 47). Παρατίθενται ενδεικτικά παράδειγμα από έναν οφθαλμό μελέτης και έναν οφθαλμό ελέγχου.



Εικόνα 46: Οφθαλμός μελέτης: κενοτόπια, ενδοϊστική διάταξη και υπερκείμενη στρέβλωση



Εικόνα 47: Τομή από οφθαλμό ελέγχου με φυσιολογικά ευρήματα.

8. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η ποσοτική εκτίμηση του BNN27, στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού (αμφιβληστροειδής και υαλοειδές) έπειτα από συστηματική και τοπική χορήγηση, καθώς και η διερεύνηση ύπαρξης αμφιβληστροειδικής τοξικότητας. Κρίθηκε ωστόσο απαραίτητο να συμπεριληφθεί στη διατριβή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του μορίου στη συστηματική κυκλοφορία, έπειτα από συστηματική (ενδοπεριτοναϊκή) χορήγηση, μια και πρόκειται για πρωτόλειο μόριο, χωρίς προηγούμενη γνώση των φαρμακοκινητικών του ιδιοτήτων. Η γνώση αυτή αποτέλεσε το υπόβαθρο για τη μελέτη του μορίου στο όργανο στόχο, τον αμφιβληστροειδή. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής είναι σημαντικά, γιατί προσφέρουν πρωτότυπη πληροφορία για τη συμπεριφορά του μορίου στο αίμα και το όργανο στόχο, χρήσιμη για την επιλογή ερευνητικών και θεραπευτικών δόσεων στη μελλοντική κλινική έρευνα.

Αρχικά, επιτεύχθηκε η ποσοτικοποίηση του μορίου στη συστηματική κυκλοφορία, μετά από μία ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε τρωκτικά. Αποδείχθηκε ότι το μόριο κινείται γρήγορα από το περιτόναιο στο αίμα και από εκεί στους ιστούς (αμφιβληστροειδής), όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του μικρού μεγέθους του και της λιποφιλικότητας του. Συγκεκριμένα, ο μέσος χρόνος παραμονής στο αίμα βρέθηκε ίσως με 2.1 ώρες και πρακτικά μετά τις 6 ώρες, μόνο ίχνη φαρμάκου ανιχνεύονται στο αίμα των μυών. Τα ευρήματα αυτά δε διαφέρουν πολύ από τα χαρακτηριστικά του μητρικού μορίου του BNN27, της DHEA, η οποία έχει βρεθεί να έχει χρόνο ημίσειας ζωής 4.5 ± 0.3 ώρες, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε πρωτεύοντα⁶⁹.

Στη συνέχεια, υλοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση του BNN27 στον αμφιβληστροειδή, μετά από μία ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε επίμυες. Επιλέχθηκε δόση μικρότερη από τη συστηματική φαρμακοκινητική, βασισμένη στη δοσολογία που έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στα ζωικά πειραματικά μοντέλα αμφιβληστροειδικών παθήσεων. Η δόση των 30mg/kg β.σ. είναι δόση που προσομοιάζει με τις δοσολογίες σε «πραγματικές συνθήκες» και θα μπορούσε να προσφέρει ακριβέστερα μεταφραστικά συμπεράσματα σε σχέση με ουσιαστικά ερωτήματα όπως η διέλευση του BNN27 από τον ΑΑΦ και η ακρίβεια της μεθόδου (LC-MS) στις χαμηλές δοσολογίες της «πραγματικής ζωής» (“real life”).

Το μόριο ήταν ανιχνεύσιμο στον αμφιβληστροειδή μισή ώρα μετά την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και παρουσίασε τη μέγιστη συγκέντρωση 2 ώρες μετά την έγχυση. Στη συνέχεια φάνηκε ότι τα επίπεδα του μορίου ελαττώνονται σε μη ανιχνεύσιμα, 6 ώρες μετά την έγχυση. Η ανίχνευση του BNN27 στον αμφιβληστροειδή έπειτα από *διακαρδιακή έγχυση (transcardiac perfusion)* RL στους επίμυες επισφράγισε τα ευρήματα του κυρίως πειράματος ποσοτικοποίησης του BNN27 στον αμφιβληστροειδή και απέδειξε ότι το BNN27 διαπερνά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό (ΑΑΦ).

Η ανίχνευση του μορίου στον αμφιβληστροειδή μισή ώρα μετά την έγχυση συμφωνεί με τα δημοσιευμένα δεδομένα της ανίχνευσης του μορίου στον εγκέφαλο των επιμυών, μετά από την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση του BNN27²⁸. Τα αποτελέσματα των δύο μελετών είναι ουσιαστικά σε συμφωνία, δεδομένου ότι ο αμφιβληστροειδής αποτελεί τμήμα του ΚΝΣ, με ομοιότητες τόσο στην ανατομία, όσο και τους φραγμούς τους, όπως περιγράφηκε στο θεωρητικό μέρος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ποσοτικοποίησης του BNN27 στον εγκέφαλο, ελέγχθηκε επίσης η ικανότητα των μικρονευροτροφινών BNN να διαπερνούν *in vitro* μεμβράνες, που προσομοιάζουν στον ΑΕΦ και διατυπώθηκε το

συμπέρασμα ότι το BNN27 εμφανίζει υψηλή διαπερατότητα σε τέτοιου είδους μεμβράνες. Ο συνδυασμός των ευρημάτων της παρούσας μελέτης και της αντίστοιχης μελέτης²⁸ επιβεβαιώνει τόσο *ex vivo* όσο και *in vivo* η ικανότητα του BNN27 να διαπερνά φραγμούς με τα χαρακτηριστικά του ΑΕΦ και του ΑΑΦ.

Η διαπερατότητα των φραγμών από το BNN27 ενισχύεται περαιτέρω από τα αποτελέσματα των μελετών σε μοντέλα αμφιβληστροειδικών παθήσεων και παθήσεων του ΚΝΣ, που πληθαίνουν στη βιβλιογραφία^{28,33-38, 70}. Το μόριο έχει χορηγηθεί σε μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας μετά από τοπική και από συστηματική χορήγηση^{40,41}, αλλά και σε μοντέλο αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή⁴⁶. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών αποτελούν ενδείξεις της βιολογικής αλληλεπίδρασης του BNN27 με τον αμφιβληστροειδή, υποδεικνύοντας τη διέλευση του δια μέσου του ΑΑΦ.

Η ποσοτικοποίηση του μορίου στον αμφιβληστροειδικό ιστό, όπως υλοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, επισφραγίζει την *in vivo* ικανότητα του BNN27 να διέρχεται τον ΑΑΦ. Επιπλέον, δεδομένης της ομοιότητας του ΑΑΦ με τον ΑΕΦ τα ευρήματα της διατριβής αυτής ενισχύουν περαιτέρω τα ευρήματα της διαπερατότητας του ΑΕΦ από το BNN, προηγούμενων μελετών, τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο, όσο και σε λειτουργικό επίπεδο.

Αφού ολοκληρώθηκε η ποσοτικοποίηση του μορίου στον αμφιβληστροειδή, μετά από τη συστηματική χορήγηση, μελετήθηκε η διαθεσιμότητα του μορίου στο οπίσθιο ημιμόριο, μετά από την ενδοϋαλοειδική (τοπική) χορήγηση και η πιθανή ύπαρξη της αμφιβληστροειδικής τοξικότητας. Προτιμήθηκαν οι κόνικλοι στο δεύτερο κομμάτι της μελέτης, καθώς ο όγκος του υαλοειδούς των τρωκτικών είναι ελάχιστος και δεν επιτρέπει τη χρήση του σε μοντέλα φαρμακοκινητικής στο υαλοειδές. Η χρήση κόνικλων σε μοντέλα

της φαρμακοκινητικής στο υαλοειδές και της αμφιβληστροειδικής τοξικότητας είναι πλέον ιδιαίτερα διαδεδομένη και αξιόπιστη^{48-49,53,57,71}.

Το BNN27 χορηγήθηκε ενδοϋαλοειδικά στο δεύτερο αυτό σκέλος της μελέτης. Οι ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις αποτελούν την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη οδό χορήγησης φαρμάκων για τη θεραπεία παθήσεων του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμού. Το πλεονέκτημα της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης, το οποίο την κατέστησε τόσο δημοφιλή είναι η παράκαμψη του ΑΑΦ. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η χορήγηση ακόμα και μεγαλομοριακών ενώσεων (πχ αντισωμάτων), που δε διαπερνούν τον ΑΑΦ όταν δίνονται συστηματικά. Με την ενδοϋαλοειδική έγχυση, επιτυγχάνεται όχι μόνο η παράκαμψη του ΑΑΦ, αλλά και η ελαχιστοποίηση της χορηγούμενης δόσης.

Η στοχευμένη χορήγηση της ουσίας στο μικρό μέγεθος του αμφιβληστροειδικού ιστού απαιτεί συνήθως μόνο μικρές ποσότητες και κατά συνέπεια ελαχιστοποιούνται οι όποιες συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Παρ' όλο που το BNN27 βρέθηκε να διαπερνά τον ΑΑΦ, μετά από συστηματική χορήγηση, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση είναι πάντα ελκυστική για τη θεραπευτική του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμού, λόγω της ελαχιστοποίησης των συστηματικών επιδράσεων. Τα BNN ως συνθετικά ανάλογα της DHEA στερούνται θεωρητικά των συστηματικών της επιδράσεων, λόγω της αδυναμίας τους να μεταβολιστούν περαιτέρω σε γεννητικές ορμόνες, όμως με τη συστηματική χορήγηση, δεν αποφεύγεται η δράση τους σε άλλα συστήματα, πχ στο ΚΝΣ.

Η ελαχιστοποίηση της χορηγούμενης ποσότητας BNN στην περίπτωση της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης θα ελαχιστοποιούσε και την μεταφερόμενη ποσότητα στη συστηματική κυκλοφορία και κατ' επέκταση τη παράλληλη δράση τους σε άλλα συστήματα. Το ενδιαφέρον μας για την ενδεχόμενη μελλοντική χρήση του, σχετικά με τις

αμφιβληστροειδικές παθήσεις είναι ο λόγος που επιλέχθηκε η μελέτη του BNN27 μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση, ως αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Η φαρμακοκινητική του μορίου στην υαλοειδική κοιλότητα κατέδειξε ένα χρόνο $t_{1/2}$ ίσο με 4.49 μέρες. Παρ' όλο που το φάρμακο ήταν ορατό μακροσκοπικά την πρώτη και τη δεύτερη εβδομάδα μετά την έγχυση, οι ποσότητες που μετρήθηκαν ήταν πολύ μικρές, της τάξης των 47.4 μg/ml και 33.9μg/ml αντίστοιχα. Στον τελικό χρονικό σημείο, 30 μέρες μετά την έγχυση, ανιχνεύτηκαν ίχνη μόνο της ουσίας, κάτι που είναι σε συμφωνία με τον φαρμακοκινητικό χαρακτηρισμό της, κινητική πρώτης τάξης, που πρακτικά σημαίνει σχεδόν πλήρη απομάκρυνση του μορίου (99%) μετά από 7 χρόνους ημίσειας ζωής, δηλαδή μετά τις 27 μέρες. Οι οφθαλμοί στους οποίους ανιχνεύθηκαν οι μικροποσότητες BNN27, με τη φασματοσκοπία μάζας ήταν οι ίδιοι στους οποίους παρατηρήθηκαν μικροποσότητες κολλοειδούς μακροσκοπικά, κάτι που υποδηλώνει ότι το μόριο βρίσκεται δεσμευμένο συνέχεια μέσα στο υδρόφοβο περιβάλλον του αδιαφανούς μίγματος, μέχρι την τελική απορρόφηση του.

Η ανίχνευση BNN27 έπειτα από ένα μήνα στην υαλοειδική κοιλότητα εμφανίζει κλινικό ενδιαφέρον. Είναι γνωστή η συνεχόμενη προσπάθεια ανεύρεσης τεχνικών παραμονής των ενδοϋαλοειδικά χορηγούμενων φαρμάκων για όλο και μεγαλύτερα διαστήματα στον υαλοειδικό χώρο. Λιποσωματικές μορφές, νανοσωματίδια, πολυμερισμένα εμφυτεύματα, αλλά και γενετική μηχανική έχουν επιστρατευτεί για τον συγκεκριμένο στόχο ⁷²⁻⁷⁶.

Η ελαχιστοποίηση του αριθμών των χορηγούμενων ενέσεων είναι το ιερό δισκοπότηρο της θεραπευτικής με ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις, λόγω του ρίσκου για επιπλοκές, όπως η ενδοφθοαλμίτιδα, που συνοδεύει κάθε έγχυση. Συνεπώς, η ικανότητα

μακροχρόνιας παραμονής του BNN27 στην υαλοειδική κοιλότητα ήδη στην πρωτότυπη φαρμακοτεχνική του μορφή, του δίνει ένα εμφανές προβάδισμα προς αυτήν την κατεύθυνση, σε πιθανή μελλοντική κλινική του χρήση. Βεβαίως απαιτείται λεπτομερέστερη μελέτη της αλληλεπίδρασής του μορίου με τον ιστό, που θα προσδιορίσει τις θεραπευτικές ποσότητες BNN27 για κάθε περίπτωση αμφιβληστροειδικής πάθησης (πχ ΗΕΩ, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια με κυστικό οίδημα ή ωχρική ισχαιμία), καθώς και τη χρονική διάρκεια θεραπείας. Γίνεται όμως φανερό ότι το BNN27 μπορεί να χορηγηθεί με μεσοδιαστήματα μεγαλύτερα των 30 ημερών αν χρειαστεί σε μελλοντικές κλινικές εφαρμογές.

Για τη μελέτη της τοξικότητας, χρησιμοποιήθηκαν κόνικλοι με φυσιολογική παραγωγή μελανίνης στους οφθαλμούς τους. Η επιλογή των ζώων έγινε ώστε να προσομοιάζουν στο φυσιολογικό ανθρώπινο οφθαλμό. Τα BNN είναι συνθετικά ανάλογα της DHEA, ενός μορίου της ομάδας των στεροειδών, τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται με τη μελανίνη και μπορούν να επηρεάζουν την παραγωγή της^{77,78}. Η υπό μελέτη μικρονευροτροφίνη είναι ένα νεοσυντεθιμένο στεροειδές ανάλογο και η σχέση της με τη μελανίνη είναι ακόμα άγνωστη. Επιπρόσθετα, ο ρόλος της μελανίνης στην εμφάνιση τοξικότητας στους οφθαλμικούς ιστούς είναι αμφιλεγόμενο^{79,80}. Κατά συνέπεια, η μελέτη της τοξικότητας σε έγχρωμους οφθαλμούς θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες σχετικά με την εμφάνιση τοξικότητας σχετιζόμενης με τη μελανίνη.

Έτσι, καταγράφηκε λεπτομερώς η παρουσία των αλλοιώσεων στους χρωμοφόρους χιτώνες του οφθαλμού, σε όλα τα βήματα του πειράματος, μακροσκοπικά, κατά την εξέταση με τη σχισμοειδή λυχνία και τη βυθοσκόπηση, αλλά και μικροσκοπικά, με την ιστολογική εξέταση.

Δεν παρατηρήθηκε καμία μακροσκοπική μεταβολή στο πρόσθιο ημιμόριο (ίριδα) κανενός οφθαλμού, μελέτης ή ελέγχου. Οι ιστοί του πρόσθιου ημιμορίου δεν εξετάστηκαν μικροσκοπικά, μια και κάτι τέτοιο δεν ήταν μέσα στα πλαίσια της θεματολογίας της παρούσας διατριβής. Κατά τη βυθοσκόπηση, δύο ζώα εμφάνισαν τον εντοπισμένο αποχρωματισμό στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδή, η οποία όμως δε συσχετίστηκε με μειωμένες αποκρίσεις στο ΗΑΓ ή σημεία τοξικότητας ανατομικά στη μικροσκοπική εξέταση. Αντιστρόφως, οι οφθαλμοί με σημεία ενδοφθάλμιας φλεγμονής και διαταραχές στο ΗΑΓ ή διαταραχές των αμφιβληστροειδικών στιβάδων στην ιστολογική εξέταση δε συσχετίστηκαν με αλλαγές στην συσσώρευση της ενδοφθάλμιας μελανίνης. Θα μπορούσε λοιπόν να συμπεράνει κανείς πως, στις συγκεκριμένες δοσολογίες, τα όποια ευρήματα τοξικότητας του BNN27 στον αμφιβληστροειδή δε συνδέονται άμεσα με την αλληλεπίδραση με τη μελανίνη (σύνδεση/συσσώρευση στου χρωστικοφόρους ιστούς, πχ ΜΕ).

Αντιθέτως, η υψηλή ελεγχόμενη δόση των 0.6mg/0.1ml BNN27, εμφάνισε ενδείξεις τοξικότητας στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού των έγχρωμων κονίκλων. Δύο οφθαλμοί μελέτης εμφάνισαν μακροσκοπικά ενδοϋαλοειδική φλεγμονή χωρίς αντίδραση στον πρόσθιο θάλαμο. Στους οφθαλμούς αυτούς τα ΗΑΓ ήταν κατηρημένα και οι ιστολογικές αλλοιώσεις υπέδειξαν λέπτυνση των έσω στοιβάδων, εντοπισμένες αποκολλήσεις και ουλοποιημένο ιστό, στοιχεία που επιβεβαιώνουν αμφιβληστροειδική τοξικότητα. Επιπλέον, η εμφάνιση κενотоπίων στις έξω στιβάδες ήταν αρκετά συχνό εύρημα, χωρίς συνύπαρξη αλλοιώσεων που να υποδηλώνουν κυτταρικό θάνατο. Τέλος, παρατηρήθηκαν και μικροσκοπικές αλλοιώσεις σε ιστολογικά δείγματα οφθαλμών με μακροσκοπικά φυσιολογική βυθοσκόπηση.

Περαιτέρω αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν, όπως για παράδειγμα η ενδοϊστική εντοπισμένη αποκόλληση στο επίπεδο του χοριοειδή, με υπερκείμενη στρεβλότητα των φωτοϋποδοχέων, καθώς και οι εντοπισμένες αποκολλήσεις συνολικά αμφιβληστροειδή (νευροεπιθήλιο μαζί με μελάγχρουν επιθήλιο), έχουν αμφιλεγόμενη συσχέτιση με το BNN27 , εφόσον μπορούν να προέρχονται από ενδοϊστική συσσώρευση υγρών κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, ενώ δεν επιβεβαιώθηκαν από τα ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα.

Επιπρόσθετα, η χαμηλή ελεγχόμενη δόση των 0,06mg/0,1ml δεν εμφανίστηκε τοξική για τη λειτουργία του αμφιβληστροειδή. Μακροσκοπικά, η βυθοσκόπηση τόσο των υπό μελέτη οφθαλμών, όσο και των οφθαλμών ελέγχου, υπήρξε φυσιολογική. Ακόμα, τα ΗΑΓ ένα μήνα μετά την έγχυση δεν εμφάνισαν μεταβολές σε σχέση με τα προεγχειρητικά ΗΑΓ. Τέλος, ιστολογικά, παρατηρήθηκαν κάποια ευρήματα στρεβλότητας και ενδοϊστικής διάτασης, χωρίς ευρήματα κυτταρικού θανάτου, όπως στην ομάδα Α. Εντοπισμένα κενοτόπια στις έξω στιβάδες, χωρίς ευρήματα κυτταρικού θανάτου, εμφανίστηκαν σε μεμονωμένα ιστικά τεμάχια. Είναι σημαντικό ότι ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος δεν επιβεβαίωσε την ύπαρξη αμφιβληστροειδικής τοξικότητας.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος με full-field flash ERG, δεν είναι ευαίσθητος στην ανίχνευση μικρών εντοπισμένων αλλοιώσεων. Στην περίπτωση της ενδοφθάλμιας φλεγμονής, που είχε καταστροφική επίδραση στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, τα ΗΑΓ εμφανίστηκαν σημαντικά ελαττωμένα, όπως ήταν αναμενόμενο. Οι εντοπισμένες όμως επιμέρους αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ιστολογικά και στις δύο συγκεντρώσεις δε φάνηκε να επηρεάζουν τη συνολική αμφιβληστροειδική λειτουργία κατά μέσο όρο.

Παρ' όλο που οι περισσότερες αλλοιώσεις της ομάδας Β, της χαμηλής δόσης, όπως οι διατακτικές αλλοιώσεις, πιο πιθανά σχετίζονται με τους χειρισμούς των ιστών, η εμφάνιση των μικροσκοπικών ευρημάτων δεν είναι δυνατό να αγνοηθεί. Περαιτέρω μελέτη χρειάζεται, με έναν μεγαλύτερο αριθμό πειραματόζων και περισσότερες χορηγούμενες συγκεντρώσεις, ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα, πριν από οποιαδήποτε κλινική χρήση.

Στο συγκεκριμένο σημείο αξίζει επίσης να γίνει η συσχέτιση με τα υπάρχοντα δεδομένα για τη βιολογική δράση του BNN27. Παρ' όλο που στα υπάρχοντα πειραματικά μοντέλα της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και της αποκόλλησης του αμφιβληστροειδή χρησιμοποιήθηκαν επίμυες και μύες, είναι ενδιαφέρουσα μία αναφορά.

Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκαν στον αμφιβληστροειδή του επίμυος 1.1μg/g BNN27, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 30mg/kg βάρους σώματος. Θεωρώντας ότι όλη η ποσότητα που εγχέεται ενδοϋαλοειδικά αποδίδεται στον αμφιβληστροειδή, η χαμηλή δόση των 0.06mg/0.1ml, εφόσον αυτή αναχθεί στον όγκο του υαλοειδούς του επίμυος⁸¹, αντιστοιχεί σε 3μg/g ουσίας, που αναλογικά προκύπτει από περίπου 81mg/kg βάρους σώματος ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης. Στο μοντέλο ΔΑ, όπου το BNN27 φάνηκε να προστατεύει τον έσω αμφιβληστροειδή και η μέγιστη δόση χορήγησης ήταν τα 50mg/kg βάρους σώματος. Επίσης, στο μοντέλο της αποκόλλησης, όπου το BNN27 δε φάνηκε να προστατεύει, αλλά εμφάνισε επίσης στοιχεία αυξημένης φλεγμονώδους αντίδρασης, η μέγιστη δόση που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 200mg/kg β.σ σε μύ, δηλαδή συγκέντρωση στον αμφιβληστροειδή ποσότητας φαρμάκου της τάξης μεγέθους της ομάδας Α της μελέτης μας, με τα ευρήματα της άσηπτης φλεγμονής.

Τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να εμφανίζονται ως αντικρουόμενα, όμως αν κανείς αναλογιστεί τις ιδιότητες των στεροειδών, δεν προκαλούν έκπληξη. Από τη χρήση τόσο των τοπικών όσο και των συστηματικών στεροειδών στον άνθρωπο είναι γνωστό ότι έχουν άριστη αντιφλεγμονώδη δράση στην κατάλληλη συγκέντρωση και χρόνο χορήγησης. Αυξημένες συγκεντρώσεις και παρατεταμένη διάρκεια εμφανίζουν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η εμφάνιση τους είναι διαφορετική μεταξύ των ατόμων, ακόμα και στην ίδια χορηγούμενη δόση.

Πιο συγκεκριμένα, για την ενδοϋαλοειδική χρήση, είναι γνωστός ο κίνδυνος της εμφάνισης άσηπτης ενδοφθάλμιας φλεγμονής μετά από την ενδοϋαλοειδική έγχυση της τριαμσινολόνης στον ανθρώπινο οφθαλμό ενός μίγματος⁸²⁻⁸⁵, με χαρακτηριστικά παρόμοια με το εγχεόμενο BNN27 (μικρό λιπόφιλο μόριο σε αλκοολικό διαλύτη). Η παθογένεσή της δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά μεταξύ άλλων έχει ενοχοποιηθεί το μέγεθος και η συγκέντρωση των σωματιδίων του στεροειδούς⁸⁶. Η παραπάνω θεώρηση, σε συνδυασμό με τα εργαστηριακά ευρήματα της επαγωγής των παραγόντων γλοίας στον αμφιβληστροειδή μετά τη χορήγηση μεγάλων δόσεων BNN27⁴⁶, θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αυξημένη εμφάνιση ενδοφθάλμιας φλεγμονής στην ομάδα Α.

Η βελτιστοποίηση της χορηγούμενης δόσης, σε σχέση με το επιθυμητό αποτέλεσμα στον αμφιβληστροειδή, αποτελεί σίγουρα στόχο μελλοντικών μελετών. Είναι σημαντικό ότι η ενδοϋαλοειδική οδός χορήγησης δεν αποτελεί μονόδρομο για τη χρήση του BNN27 στις αμφιβληστροειδικές παθήσεις, δεδομένου ότι είναι ικανό να διέρχεται τον ΑΑΦ. Εφόσον αποδειχθεί η ασφάλεια του μορίου μετά από συστηματική χορήγηση στο μέλλον, οι πολλαπλές εναλλακτικές οδοί χορήγησης (συστηματική, τοπική) αποτελούν ελκυστικό χαρακτηριστικό του μορίου για τη χρήση του σε αμφιβληστροειδικές παθήσεις,

μια και θα προσφέρουν δυνατότητα ελαχιστοποίησης των συστηματικών ανεπιθύμητων ενεργειών επιλέγοντας την κατάλληλη οδό χορήγησης σε κάθε κλινική εφαρμογή.

Η χρήση των διαφορετικών πειραματόζωων στα διάφορα στάδια της παρούσας διατριβής αποτελεί ένα από τα αδύνατα σημεία της μελέτης. Ωστόσο, η αλλαγή του πειραματόζωου ήταν απαραίτητη, όπως θα φανεί παρακάτω.

Τα τρωκτικά επιλέχθηκαν στο πρώτο τμήμα της μελέτης, γιατί η πλειοψηφία των πειραματικών μοντέλων παθήσεων του ΚΝΣ αλλά και του αμφιβληστροειδή, όπου χρησιμοποιούνται οι μικρονευροτροφίνες, περιλαμβάνει τρωκτικά, μυσ και επίμους. Αφού ποσοτικοποιήθηκε το BNN27 στο αίμα, επιλέχθηκε ο επίμους για την ποσοτικοποίηση του στον αμφιβληστροειδικό ιστό, μια και ο αμφιβληστροειδικός ιστός του μύος είναι πολύ μικρός, προκειμένου να επεξεργαστεί κατάλληλα και να δώσει αξιόπιστα και ακριβή αποτελέσματα με τη χρήση της επιθυμητής τεχνικής, LC-MS.

Ένας από τους παράλληλους σκοπούς της μελέτης ήταν η χρήση μιας απλής τεχνικής ποσοτικοποίησης, όπως η LC-MS, για την ανίχνευση μικροποσοτήτων μικρών μορίων, όπως το BNN27 σε μικρό μέγεθος ιστού, όπως ο αμφιβληστροειδής του επίμους, κάτι που τελικά επετεύχθη. Η χρήση των κονίκλων στο δεύτερο μέρος της διατριβής αναλύθηκε λεπτομερώς παραπάνω.

Επιπρόσθετη πρόκληση αποδείχτηκε η λιποφιλικότητα του μορίου στα διάφορα στάδια της μελέτης. Στη συγκεκριμένη μελέτη επιχειρήθηκε να διατηρηθεί η μέθοδος στην πιο απλή πιθανή μορφή της επεξεργασίας του μορίου και του εγχεόμενου μίγματος, ώστε ν' αποφευχθούν επιδράσεις και αλληλεπιδράσεις, τόσο κατά την επεξεργασία, όσο και κατά την έγχυση με τον ιστό. Για τον παραπάνω λόγο, χρησιμοποιήθηκε η ελάχιστη πιθανή ποσότητα αιθανόλης (οργανικός διαλύτης), ώστε να διαλυθεί επαρκώς η αρχική

σκόνη και στη συνέχεια να σχηματιστεί ένα κατά το δυνατό ομοιόμορφο μίγμα, κατά τη διάλυση στο ενέσιμο ύδωρ (WFI).

Οι λιπόφιλες ουσίες απαιτούν τους οργανικούς διαλύτες για τη διάλυση, οι οποίοι είναι συχνά τοξικοί για τους βιολογικούς ιστούς (αλκοόλες, κετόνες) ή εμπλέκονται στην απορρόφηση από τους ιστούς (DMSO). Δε χρησιμοποιήθηκε DMSO, γιατί αφενός μπορεί να εμφανίσει τοξικότητα στον κρυσταλλοειδή φακό του κονίκλου, αφετέρου έχει βρεθεί να παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες⁸⁷, οπότε, θα μπορούσε να αποτελέσει bias σε σύγκριση με τη δράση του BNN27. Η ποσότητα της χρησιμοποιούμενης αλκοόλης ελαχιστοποιήθηκε ώστε να διαλύει ικανοποιητικά αφ'ενός την επιθυμητή ποσότητα του BNN27 και αφ' ετέρου να μην εμφανίζει τοξικότητα, η οποία ελέγχθηκε επίσης στους οφθαλμούς ελέγχου/μάρτυρες.

Η χρησιμοποιούμενη δόση αιθυλικής αλκοόλης αποδείχτηκε μη τοξική τόσο στο σημείο της ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης, όσο και στο οπίσθιο ημιμόριο των κονίκλων, όπως κατέδειξαν τ' αποτελέσματα των οφθαλμών ελέγχου του πειράματος της τοξικότητας. Σε όλα τα στάδια της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης, χρησιμοποιήθηκε η ίδια συγκέντρωση αιθυλικής αλκοόλης. Δεν παρατηρήθηκε αμφιβληστροειδική τοξικότητα σε κανέναν από τους οφθαλμούς ελέγχου, που αποτέλεσαν τους οφθαλμούς μάρτυρες για το σκοπό αυτό, τόσο σε ανατομικό (βυθοσκόπηση, ιστολογία), όσο και σε λειτουργικό (ΗΑΓ) επίπεδο.

Η διάλυση του λιπόφιλου BNN27 στο υδρόφιλο υαλοειδές ήταν αναμενόμενο ότι θα δημιουργήσει ιδιαιτερότητες στο δεύτερο μέρος της μελέτης. Η αδιαφανής κολλοειδής διασπορά της μικρονευροτροφίνης όχι μόνο διαλύεται αργά μέσα στο υδατικό περιβάλλον του υαλοειδούς, αλλά δημιουργεί ένα φυσικό εμπόδιο στη διέλευση του φωτός. Το

τελευταίο δημιουργεί δυσκολία στην κλινική εκτίμηση του οπίσθιου ημιμορίου, καθώς και στην καταγραφή των αντικειμενικών πειραματικών μεθόδων ελέγχου όπως το ΗΑΓ.

Τα παραπάνω διαμόρφωσαν το χρονικό σχεδιασμό του πειράματος, ενώ επιπλέον χρειάστηκε μια σειρά από πιλοτικά πειράματα, ώστε να οριστούν οι χρονικές στιγμές της μελέτης, όχι μόνο της φαρμακοκινητικής (μέχρι το τελικό σημείο της), αλλά κυρίως της διερεύνησης της αμφιβληστροειδικής τοξικότητας, ως προς τα χρονικά σημεία της παρακολούθησης, τα οποία θα προσέφεραν αξιόπιστη πληροφορία.

Πιο συγκεκριμένα, δεν πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος στο χρονικό σημείο των 15 ημερών, όπως συμβαίνει σε πολλές μελέτες τοξικότητας, γιατί το κολλοειδές της υψηλής συγκέντρωσης στην ομάδα Α δεν έχει απορροφηθεί ικανοποιητικά, με αποτέλεσμα να καλύπτει οπισθοφακικά μεγάλο τμήμα του κορικού πεδίου, ακόμα και μετά τη μυδρίαση. Ο ελλιπής φωτισμός του αμφιβληστροειδή από το φωτεινό ερέθισμα του ΗΑΓ θα είχε ως αποτέλεσμα οι καταγραφές του (που είναι ανάλογες του φωτός που φτάνει σε αμφιβληστροειδή), αφενός να μην είναι αντικειμενικές της αμφιβληστροειδικής λειτουργίας και αφετέρου να μην είναι συγκρίσιμες με το ΗΑΓ των υπό μελέτη οφθαλμών της ομάδας Β, οι οποίοι έλαβαν τη χαμηλή δόση και στους οποίους το μίγμα έχει διαλυθεί πλήρως, 15 ημέρες μετά την έγχυση.

Συμπερασματικά, η διατριβή αυτή παρουσίασε σημαντική πληροφορία σε σχέση με την κινητική του πρωτόλειου BNN27 στο αίμα και τον αμφιβληστροειδή μετά από συστηματική χορήγηση. Αποδείχθηκε ότι διαπερνά τον ΑΑΦ και ότι μπορεί να ανιχνευτεί με απλές τεχνικές ποσοτικοποίησης όπως η φασματοσκοπία μάζας σε μικρούς ιστούς όπως ο αμφιβληστροειδής. Η μέθοδος αυτή φάνηκε κατάλληλη και για την ποσοτικοποίηση του υδρόφοβου BNN27 μέσα στο υδατικής φύσεως υαλοειδές σώμα.

Τέλος, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση BNN27 εμφάνισε σημεία ενδοφθάλμιας φλεγμονής στην υψηλή μελετούμενη δόση (0.6mg/0.1ml ή 6mg/ml). Η αμφιβληστροειδική τοξικότητα στην χαμηλή μελετούμενη δόση (0.06mg/0.1ml ή 0.6mg/ml) δεν αποδείχθηκε ηλεκτροφυσιολογικά. Όλα τα παραπάνω μπορούν να συμβάλλουν στην βελτιστοποίηση της δοσολογίας του BNN27 σε μελλοντικές μελέτες δράσης του σε μοντέλα αμφιβληστροειδικών παθήσεων, τόσο από άποψη βιολογικής δράσης όσο και ασφάλειας χορήγησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dowling JE. The retina: An approachable part of the brain (rev. ed.). *Retin An approachable part brain (rev ed)*. 2012.
2. Schachat, Andrew P., MD; Sadda, Srinivas R., MD; Hinton, David R., MD; Wilkinson, C.P., MD; Wiedemann, Peter M. Ryan's Retina. In: *Ryans Retina*; 2017.
3. Steuer H, Jaworski A, Elger B, et al. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(3):1047-1053. doi:10.1167/iovs.04-0925
4. Bill A, Tornquist P, Alm A. Permeability of the intraocular blood vessels. *Trans Ophthalmol Soc U K (1962)*. 1980;100(3):332-336.
5. Han Z, Liang J, Li Y, He J. Drugs and Clinical Approaches Targeting the Antiapoptotic Protein: A Review. *Biomed Res Int*. 2019;1212369. doi: 10.1155/2019/1212369.
6. Roberts AW, Wei AH, Huang DCS. BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies. *Blood*. 2021;138(13):1120-1136. doi: 10.1182/blood.2020006785.
7. Sita Sharan Patel, Ashish Acharya, R. S. Ray, Ritesh Agrawal, Ramsaneh Raghuwanshi & Priyal Jain (2020) Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease, *Crit Rev Food Sc Nutr*.2020; 60(6):887-939. doi: 10.1080/10408398.2018.1552244.
8. Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Zarate CB, Pallas M. An overview of investigational antiapoptotic drugs with potential application for the

- treatment of neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(5):587-604. doi: 10.1517/13543781003781898
9. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*.2001;24:677-736. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.
 10. Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(8):300-307. doi:10.1016/j.tem.2008.07.004
 11. Charalampopoulos I, Alexaki V-I, Tsatsanis C, et al. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088:139-152. doi:10.1196/annals.1366.003
 12. 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(5-6):2106-2117. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.01.006
 13. Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, et al. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(21):8209-8214.
 14. Baulieu EE. Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*.1998;23(8):963-987.doi:10.1016/S0306-4530(98)00071-7
 15. Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V.

- Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem.* 1994;63(1):86-96.
doi:10.1046/j.1471-4159.1994.63010086.x
16. Yilmaz C, Karali K, Fodelianaki G, et al. Neurosteroids as regulators of neuroinflammation. *Front Neuroendocrinol.* 2019;55:100788. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100788
 17. Lazaridis I, Charalampopoulos I, Alexaki V, et al. Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors , Preventing Neuronal Apoptosis. *PLoS Biol.* 2011;9(4):1-14. doi:10.1371/journal.pbio.1001051
 18. Brignardello E, Beltramo E, Molinatti P, et al. Dehydroepiandrosterone protects bovine retinal capillary pericytes against glucose toxicity. *J Endocrinol.* 1998;158(1):21-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713322>.
 19. Bucolo C, Drago F. Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: Role of σ 1 recognition sites. *Eur J Pharmacol.* 2004;498(1-3):111-114. doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.067
 20. Morris KT, Toth-Fejel S, Schmidt J, Fletcher WS, Pommier RF. High dehydroepiandrosterone-sulfate predicts breast cancer progression during new aromatase inhibitor therapy and stimulates breast cancer cell growth in tissue culture: A renewed role for adrenalectomy. *Surgery.* 2001;130(6):947-953. doi:10.1067/msy.2001.118378
 21. Stoll BA. Dietary supplements of dehydroepiandrosterone in relation to breast cancer risk. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53(10):771-775.

22. Arnold JT, Le H, McFann KK, Blackman MR. Comparative effects of DHEA vs. testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol on proliferation and gene expression in human LNCaP prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(3):E573-84. doi:10.1152/ajpendo.00454.2004
23. Karp G, Bentov Y, Masalha R, Ifergane G. Onset of late posttraumatic seizure after dehydroepiandrosterone treatment. *Fertil Steril.* 2009;91(3):931.e1-2. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.115
24. Kline MD, Jagers ED. Mania onset while using dehydroepiandrosterone [6]. *Am J Psychiatry.* 1999;156(6):971. doi:10.1176/ajp.156.6.971
25. Sahelian R BS. Dehydroepiandrosterone and cardiac arrhythmia. *Ann Intern Med.* 1998;129(7):588. doi:10.7326/0003-4819-129-7-199810010-00020
26. Morales AJ, Haubrich RH, Hwang JY, Asakura H, Yen SSC. The effect of six months treatment with a 100mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex steroids, body composition and muscle strength in age-advanced men and women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;49(4):421-432. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2265.1998.00507.x>.
27. Calogeropoulou T, Avlonitis N, Minas V, et al. Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *J Med Chem.* 2009;52(21):6569-6587. doi:10.1021/jm900468p
28. Bennett JP, Brien LCO, Brohawn DG, O'Brien LC, Brohawn DG. Pharmacological properties of microneurotrophin drugs developed for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Pharmacol.* 2016;117:68-77.

doi:10.1016/j.bcp.2016.08.001

29. Botsakis K, Mourtzi T, Panagiotakopoulou V, et al. BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects dopaminergic neurons in the “weaver” mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor. *Neuropharmacology*. 2017; 121: 140-157. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.04.043
30. Panagiotakopoulou V, Botsakis K, Delis F, et al. Anti-neuroinflammatory, protective effects of the synthetic microneurotrophin BNN-20 in the advanced dopaminergic neurodegeneration of “weaver” mice. *Neuropharmacology*. 2020;165:107919. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107919.
31. Padiaditakis I, Efstathopoulos P, Prousis KC, et al. Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation. *Neuropharmacology*. 2016;111:266-282.
32. Padiaditakis, I, Kourgiantaki, A, Prousis, KC, Potamitis, C, Xanthopoulos, KP, Zervou, M, Calogeropoulou, T, Charalampopoulos, I, Gravanis A. BNN27, a 17-Spiroepoxy Steroid Derivative, Interacts With and Activates p75 Neurotrophin Receptor, Rescuing Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis. *Front Pharmacol*. 2016;7:512. doi:doi: 10.3389/fphar.2016.00512
33. Pitsikas N, Gravanis A. The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts delay-dependent and scopolamine-induced recognition memory deficits in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;140:145-153. doi:10.1016/j.nlm.2017.03.004.

34. Glajch KE, Ferraiuolo L, Mueller KA, et al. MicroNeurotrophins improve survival in motor neuron-astrocyte co-cultures but do not improve disease phenotypes in a mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164103. doi:10.1371/journal.pone.0164103
35. Bonetto G, Charalampopoulos I, Gravanis A, Karagogeos D. The novel synthetic microneurotrophin BNN27 protects mature oligodendrocytes against cuprizone-induced death, through the NGF receptor TrkA. *Glia*. 2017;65(8):1376-1394. doi:10.1002/glia.23170
36. Zoupa E, Gravanis A, Pitsikas N. The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts behavioural deficits induced by the NMDA receptor antagonist ketamine in rats. *Neuropharmacology*. 2019;151:74-83. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.04.001
37. Pitsikas N, Zoupa E, Gravanis A. The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts cognitive deficits induced by the D1/D2 dopaminergic receptor agonist apomorphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021;238(1):227-237. doi:10.1007/s00213-020-05672-z
38. Kokras N, Dioli C, Paravatou R, et al. Psychoactive properties of BNN27, a novel neurosteroid derivate, in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237(8):2435-2449. doi:10.1007/s00213-020-05545-5
39. Giannogonas P, Pothoulakis C, Gravanis A, Karalis K. Protection of the enteric nervous system in colitis: A therapeutic approach for IBD? *Gastroenterology*. 2013; 144(5):S-811.

40. Poulaki, S, Karagianni, E, Rassouli, O, Gravanis, A, Venihaki M. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory properties of microneurotrophins in inflammation-induced analgesia. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:S775.
41. García M, Forster V, Hicks D, Vecino E. In vivo expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina in vitro. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(10):4532-4541. doi:10.1167/iovs.03-0419.
42. Vecino E, Caminos E, Ugarte M, Martín-Zanca D, Osborne NN. Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *Gen Pharmacol.* 1998;30(3):305-314. doi:10.1016/S0306-3623(97)00361-3
43. Garcia TB, Hollborn M, Bringmann A. Expression and signaling of NGF in the healthy and injured retina. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;34:43-57. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.11.005
44. Ibán-Arias R, Lisa S, Mastrodimou N, et al. The synthetic microneurotrophin BNN27 affects retinal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes.* 2018;67(2):321-333. doi:10.2337/db17-0391
45. Ibán-Arias R, Lisa S, Poulaki S, et al. Effect of topical administration of the microneurotrophin BNN27 in the diabetic rat retina. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019;257(11):2429-2436. doi:10.1007/s00417-019-04460-6
46. Tsoka P, Matsumoto H, Maidana DE, et al. Effects of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, on experimental retinal detachment-induced photoreceptor cell death. *Sci Rep.* 2018;8(1):10661. doi:10.1038/s41598-018-

28633-1.

47. Baynes RE, Dix KJ, Riviere JE. Distribution and Pharmacokinetics Models. In: *Pesticide Biotransformation and Disposition*; 2012. doi:10.1016/b978-0-12-385481-0.00006-x
48. del Amo EM, Rimpelä AK, Heikkinen E, et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Prog Retin Eye Res*. 2017;57:134-185. doi: 0.1016/j .preteyeres. 2016.12.001
49. Del Amo EM, Vellonen KS, Kidron H, Urtti A. Intravitreal clearance and volume of distribution of compounds in rabbits: In silico prediction and pharmacokinetic simulations for drug development. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;95(Pt B):215-226. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.003
50. American Academy of Ophthalmology. In: *Section 12: Retina and Vitreous*. 2016.
51. Murthy KR, Goel R, Subbannayya Y, et al. Proteomic analysis of human vitreous humor. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):29. doi:10.1186/1559-0275-11-29
52. Aretz S, Krohne TU, Kammerer K, et al. In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome. *Proteome Sci*. 2013;11(1):22. doi:10.1186/1477-5956-11-22
53. Los LI. The rabbit as an animal model for post-natal vitreous matrix differentiation and degeneration. *Eye (Lond)*. 2008;22(10):1223-1232. doi:10.1038/eye.2008.39
54. Mains J, Tan LE, Zhang T, Young L, Shi R, Wilson C. Species variation in small molecule components of animal vitreous. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(8):4778-4786. . doi:10.1167/iovs.12-9998

55. Maurice DM, Mishima S. Ocular Pharmacokinetics. In: *Pharmacology of the eye*; 1984:19-116. doi:10.1007/978-3-642-69222-2_2
56. Kidron H, Del Amo EM, Vellonen KS, Urtti A. Prediction of the vitreal half-life of small molecular drug-like compounds. *Pharm Res*. 2012;29(12):3302-3311. doi:10.1007/s11095-012-0822-5.
57. Del Amo EM, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data. *Exp Eye Res*. 2015;137:111-124. doi: 10.1016/j.exer.2015.05.003.
58. Boruchoff SA, Woodin AM. Viscosity and composition of solutions derived from rabbit vitreous humour. *BrJ Ophthalmol*. 1956;40(2):113-118. doi:10.1136/bjo.40.2.113.
59. Balazs E. *Functional Anatomy of the Vitreous, in: Biomedical Foundations of Ophthalmology*. Harper & R. (Duane, T., Jaeger E, ed.); 1983.
60. Robson AG, Frishman LJ, Grigg J, Hamilton R, Jeffrey BG, Kondo M, Li S, McCulloch DL. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2022 update). *Doc Ophthalmol*. 2022 Jun;144(3):165-177. doi: 10.1007/s10633-022-09872-0
61. Magnisali P, Dracopoulou M, Mataragas M, Dacou-Voutetakis A, Moutsatsou P. Routine method for the simultaneous quantification of 17alpha-hydroxyprogesterone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, cortisol, and pregnenolone in human serum of neonates using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1206(2):166-177.

doi:10.1016/j.chroma.2008.07.057

62. Diakonis VF, Tsourdou A, Tzatzarakis MN, Tsika C, Charisis S, Naoumidi I, Plainis S, Tsilimbaris MK. Evaluation of vitreous clearance and potential retinal toxicity of intravitreal lornoxicam (xefo). *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013;29(7):627-632. doi: 10.1089/jop.2012.0194.
63. Ye YF, Gao YF, Xie HT, Wang HJ. Pharmacokinetics and retinal toxicity of various doses of intravitreal triamcinolone acetonide in rabbits. *Mol Vis.* 2014;20:629-636.
64. Charisis, S.K., Ginis, H.S., Kounis, G.A., Tsilimbaris, M.K. Tono-Pen XL tonometry during application of a suction ring in rabbits. *BMC Ophthalmol.* 2008;8:14–21. doi:org/10.1186/1471-2415-8-14.
65. Gjörloff K, Andréasson S, Ehinger B. Standardized full-field electroretinography in rabbits. *Doc Ophthalmol.* 2004;109(2):163-168. doi: 10.1007/s10633-004-3924-5.
66. Tsilimbaris M, Diakonis VF, Naoumidi I, Charisis S, Kritikos I, Chatzithanasis G, Papadaki T, Plainis S. Evaluation of potential retinal toxicity of adalimumab (Humira). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(8):1119-1125. doi: 10.1007/s00417-009-1065-y.
67. Qian H, Alexander KR, Ripps H. Harmonic analysis of the cone flicker ERG of rabbit. *Exp Eye Res.* 2010;91(6):811-817. doi: 10.1016/j.exer.2010.10.005.
68. Rock ME, Anderson JA, Binder PS. A modified trichrome stain for light microscopic examination of plastic-embedded corneal tissue. *Cornea.* 1993;12(3):255-260. doi:10.1097/00003226-199305000-00012
69. Leblanc M, Labrie C, Bélanger A, Candas B, Labrie F. Bioavailability and

- pharmacokinetics of dehydroepiandrosterone in the cynomolgus monkey. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4293-4302. doi: 10.1210/jc.2003-022012.
70. Georgelou K, Saridaki EA, Karali K, Papagiannaki A, Charalampopoulos I, Gravanis A, Tzeranis DS. Microneurotrophin BNN27 Reduces Astrogliosis and Increases Density of Neurons and Implanted Neural Stem Cell-Derived Cells after Spinal Cord Injury. *Biomedicines.* 2023;11(4):1170. doi: 10.3390/biomedicines11041170.
 71. Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, Dib E, Fiod Costa E, Furlani BA, Nunes Moraes Filho M, Dreyfuss JL, Bottós J, Farah ME. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part I: animal models and toxicity assays. *Ophthalmic Res.* 2010;44(2):82-104. doi: 10.1159/000312817.
 72. Rupenthal ID, Agarwal P. Progress in Ocular Drug Delivery: Challenges and Constraints. *Handb Exp Pharmacol.* 2023. doi: 10.1007/164_2023_693.
 73. Rafael D, Guerrero M, Marican A, Arango D, Sarmiento B, Ferrer R, Durán-Lara EF, Clark SJ, Schwartz S Jr. Delivery Systems in Ocular Retinopathies: The Promising Future of Intravitreal Hydrogels as Sustained-Release Scaffolds. *Pharmaceut.* 2023;15(5):1484. doi: 10.3390/pharmaceutics15051484.
 74. Tawfik M, Chen F, Goldberg JL, Sabel BA. Nanomedicine and drug delivery to the retina: current status and implications for gene therapy. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2022;395(12):1477-1507. doi: 10.1007/s00210-022-02287-3.
 75. Paliwal H, Prajapati BG, Srichana T, Singh S, Patel RJ. Novel Approaches in the Drug Development and Delivery Systems for Age-Related Macular Degeneration. *Life (Basel).* 2023;13(2):568. doi: 10.3390/life13020568.

76. Ham Y, Mehta H, Kang-Mieler J, Mieler WF, Chang A. Novel Drug Delivery Methods and Approaches for the Treatment of Retinal Diseases. *Asia Pac J Ophthalmol*. (Phila). 2023;12(4):402-413. doi: 10.1097/APO.0000000000000623.
77. Natale CA, Duperret EK, Zhang J, Sadeghi R, Dahal A, O'Brien KT, Cookson R, Winkler JD, Ridky TW. Sex steroids regulate skin pigmentation through nonclassical membrane-bound receptors. *Elife*. 2016. doi: 10.7554/eLife.15104.
78. Du W, Sun S, Xu Y, Li J, Zhao C, Lan B, Chen H, Cheng L. The effect of ocular pigmentation on transscleral delivery of triamcinolone acetonide. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013;29(7):633-638. doi: 10.1089/jop.2012.0226.
79. Leblanc B, Jezequel S, Davies T, Hanton G, Taradach C. Binding of drugs to eye melanin is not predictive of ocular toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1998;28(2):124-132. doi: 10.1006/rtph.1998.1243.
80. Dayhaw-Barker P. Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. *Int J Toxicol*. 2002;21(6):451-454. doi: 10.1080/10915810290169873.
81. Remtulla S, Hallett PE. A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat. *Vision Res*. 1985;25(1):21-31. doi: 10.1016/0042-6989(85)90076-8.
82. Jonisch J, Lai JC, Deramo VA, Flug AJ, Fastenberg DM. Increased incidence of sterile endophthalmitis following intravitreal preserved triamcinolone acetonide. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(8):1051-1054. doi: 10.1136/bjo.2007.136069.
83. Moshfeghi DM, Kaiser PK, Bakri SJ, Kaiser RS, Maturi RK, Sears JE, Scott IU, Belmont J, Beer PM, Quiroz-Mercado H, Mieler WF. Presumed sterile endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection. *Ophthalm Surg*

Las. Imag. 2005;36(1):24-29.

84. Wang LC, Yang CM. Sterile endophthalmitis following intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Ocul Immunol Inflamm.* 2005;13(4):295-300. doi:10.1080/09273940590951007
85. Mason RH, Ballios BG, Yan P. Noninfectious endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide: clinical case and literature review. *Can J Ophthalmol.* 2020;55(6):471-479. doi: 10.1016/j.jcjo.2020.06.002.
86. Dodwell DG, Krimmel DA, de Fiebre CM. Sterile endophthalmitis rates and particle size analyses of different formulations of triamcinolone acetonide. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:1033-40. doi: 10.2147/OPHTH.S82562.
87. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 1986.