ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών: «Νευροεπιστήμες»

Τίτλος: «Μελέτη της επίδρασης της υποχρόνιας ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης του κανναβινοειδούς R-WIN55,212-2 στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον φυσιολογικό αμφιβληστροειδή και στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερτοτοξικότητας»

Title:"Effect of sub chronic intraperitoneal administration of the synthetic CB1/CB2 cannabinoid, WIN 55 212-2, on the expression of the CB1 receptor in healthy retinal and in the model of AMPA excitotoxicity"

Σπυριδάκος Δημήτριος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κυριακή Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2018

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο:

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών,

Σχολή Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Κυριακή Θερμού (Επιβλέπουσα), Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Καστελλάκης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας

Χαραλαμπόπουλος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 5

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6

ABSTRACT 7

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8

1.1.Ανατομία του οφθαλμού 8

1.2. Ανατομία του αμφιβληστροειδούς 10

1.2.1. Τύποι κυττάρων στον αμφιβληστροειδή 11

1.3. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή 17

1.4. Παθοφυσιολογία αμφιβληστροειδοπαθειών 19

1.4.1. Γεροντική εκφύλιση ωχράς κηλίδας (ΓΕΩ) 19

1.4.2. Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΜΑ) 20

1.4.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) 20

1.4.4. Γλαύκωμα 21

1.5. Ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών 22

1.5.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) 22

1.5.2. Γεροντική εκφύλιση ωχράς κηλίδας (ΓΕΩ) 23

1.5.3. Γλαύκωμα 23

1.5.4. Μοντέλα διεγερσιτοξικότητας 24

1.6. Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών 26

1.6.1. Υποδοχείς κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή 31

1.6.2. Ενδογενή κανναβινοειδή στον αμφιβληστροειδή 33

1.6.3. Βιοσυνθετικά και αποδομητικά ένζυμα των ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή 34

1.6.4. Λειτουργίες του συστήματος ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή 35

1.7. Κανναβινοειδή και νευροπροστασία στον αμφιβληστροειδή 37

1.8. Επιδράσεις της υποχρόνιας και χρόνιας χορήγησης κανναβινοειδών στην έκφραση του CB1 υποδοχέα 42

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 47

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 49

3.1. Πειραματόζωα και συνθήκες διαβίωσης 49

3.2. Ουσίες 49

3.3. Πειράματα 49

3.4. Μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. 52

3.5. Αφαίρεση και προετοιμασία ιστών 53
3.6. Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών 54
3.7. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις 54
3.8. Μικροσκοπία 55
3.9. Στατιστική ανάλυση 56
3.10. Western Blot 56
3.10.1. Προετοιμασία δειγμάτων 56
3.10.2. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 57
3.10.3. Ανοσοαποτύπωση 57
3.11. Διαλύματα 58
3.12. Διαλύματα για την ανάλυση κατά Western 59
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 62
4.1. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας 62
4.2.Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του επιλεκτικού ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή AM251 του CB1 υποδοχέα, στις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 66
4.3. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγεριτοξικότητας 68
4.4. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας 70
4.5. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιειή αμφιβληστροειδή 73
4.6. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας 75
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 78
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 90
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 91

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τον επίλογο της διετούς φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Νευροεπιστήμες». Στην πορεία των δύο αυτών χρόνων, απέκτησα μία πληθώρα γνώσεων για το πολύ ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο των νευροεπιστημών και ήρθα σε επαφή με αρκετές άγνωστες για εμένα τεχνικές. Ωστόσο η συγκεκριμένη εργασία δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την βοήθεια αρκετών ανθρώπων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια, κα Κυριακή Θερμού, για την απόλυτη εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή του προγράμματος και για την ευκαιρία που μου παρείχε να εργαστώ σε ένα εργαστήριο σαν το δικό της, κάτι που μέχρι τότε δεν μου περνούσε από το μυαλό, εξαιτίας του θεωρητικού μου υπόβαθρου. Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω, στην Σοφία Παπαδογκωνάκη, διδακτορικής φοιτήτριας στο εργαστήριο, η οποία με βοήθησε να ενταχθώ στο εργαστήριο με τον καλύτερο δυνατό τρόπο, μαθαίνοντάς μου αρκετές νέες τεχνικές κατά το ξεκίνημά μου, πάντα με την καλύτερη των διαθέσεων παρά τον φόρτο εργασίας της. Επιπλέον δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τη Νίκη Μαστροδήμου, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ΄ ολη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Σύλβια Διονυσοπούλου, μεταπτυχιακής φοιτήτριας, η οποία με βοήθησε αρκετά, λύνοντας πιθανές απορίες που είχα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προαναφερθέντες για το εξαιρετικά φιλικό περιβάλλον συνεργασίας και αλληλοϋποστήριξης, που υπήρχε ανάμεσά μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την οικογένεια μου, τον πατέρα μου και την μητέρα μου, Γιάννη και Μαρία, καθώς και την αδελφή μου Μιχαέλα, για την πολύτιμη βοήθεια και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν. Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον παππού και τη γιαγιά μου, Μιχάλη και Παναγιώτα Αρρώνη, διότι μου έμαθαν να αγωνίζομαι και να προσπαθώ συνεχώς να εκπληρώσω το στόχο μου, κόντρα σε οποιεσδήποτε δυσκολίες παρουσιαστούν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές επιδράσεις σε αρκετά μοντέλα νευροτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή, δρώντας μέσω του CB1 υποδοχέα. Ωστόσο ευρήματα από μελέτες στον εγκέφαλο και στον αμφιβληστροειδή, δείχνουν ότι η χρόνια και η υποχρόνια χορήγηση κανναβινοειδών μπορεί να προκαλέσει μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων. Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι να εξετάσει τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες του συνθετικού κανναβινοειδούς WIN55,212-2, ενός αγωνιστή των CB1/CB2 υποδοχέων, στο in vivo μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Επίσης η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στον έλεγχο των επιδράσεων της υποχρόνιας (4 ημέρες) χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα, τόσο στον υγιή αμφιβληστροειδή, όσο και στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. Spargue-Dawley επίμυες, έλαβαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις PBS ή AMPA παρουσία ή απουσία του WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} & 10^{-4} M). Για τα πειράματα της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 πραγματοποιήθηκαν ενδοπεριτοναϊκές (i.p) χορηγήσεις WIN55,212-2 (25, 50 & 100 μg/kg), είτε σε υγιή ζώα είτε σε ζώα που είχαν λάβει ενδοφθάλμιες εγχύσεις AMPA. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες διεξήχθησαν, προκειμένου να αξιολογηθούν οι επιδράσεις του WIN55,212-2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς και στην έκφραση του CB1 υποδοχέα σε υγιείς αμφιβληστροειδείς και αμφιβληστροειδείς που είχαν λάβει AMPA. Η ενδοφθάλμια χορήγηση του WIN55,212-2 προστάτεψε τα bNOS βραχύινα κύτταρα, επίδραση η οποία καταργήθηκε από την συγχορήγηση του ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή των CB1 υποδοχέων, AM251μαζί με το WIN55,212-2. Επίσης το WIN55,212-2 μείωσε την ενεργοποίηση της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή. Η υποχρόνια χορήγηση του WIN55,212-2 μείωσε την επαγόμενη από το AMPA απώλεια των bNOS κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μεγαλύτερη δόση των 100 μg/kg WIN55,212-2 δεν παρείχε, ενώ η δόση των 25mg/kg παρείχε προστασία στα bNOS κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την δοσο-εξαρτώμενη έκφραση του υποδοχέα CB1 μετά από υποχρόνια χορήγηση του WIN55,212-2, όπου στη δόση των 100 μg/kg προκλήθηκε μειορύθμιση τόσο σε υγιείς όσο και στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. Τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν ότι το WIN55,212-2 διαθέτει νευροπροστατευτικές ιδιότητες ενάντια στην επαγόμενη από το AMPA διεγερσιτοξικότητα, οι οποίες βρίσκονται σε άμεση σύνδεση με τις επιδράσεις του στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή, έπειτα από υποχρόνια χορήγησή του.

Λέξεις κλειδιά: κανναβινοειδή, WIN55,212-2, CB1 υποδοχέας, AM251, διεγερσιτοξικότητα, ενδοφθάλμια έγχυση, υποχρόνια χορήγηση, βραχύινα κύτταρα, νευροπροστασία

ABSTRACT

Cannabinoids have been shown to exert neuroprotective effects in many models of neurotoxicity in the retina, including AMPA induced excitotoxicity. These effects are mediated mainly through the CB1 receptor, located in many different cell populations in the retina. However studies in the brain and retina have shown, that chronic or subchronic use of cannabinoid agonists causes downregulation of CB1 receptors, something that interferes with their neuroprotective actions. The goal of the present study is to investigate the neuroprotective action of the synthetic cannabinoid CB1/CB2 agonist, WIN55,212-2, in the AMPA model of excitotoxicity in rat retina and also to examine its effects, after subcronic administration, in the expression of CB1 receptor. Sprague-Dawley rats received intravitreal injections of PBS or AMPA, in the absence or presence of WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} & 10^{-4} M). In the subchronic model, WIN55,212-2 was administered intraperitoneally (i.p), for 4 days in healthy rats or in rats, that were administered AMPA intravitreally. Immunohistochemical studies were performed, in order to assess the viability of retinal cells and to examine CB1 expression in healthy and AMPA treated retinas. Intravitreal administration of WIN55,212-2 protected bNOS expressing amacrine cells, an effect that was blocked by co-administration of the CB1 antagonist/inverse agonist, AM251. Also WIN55,212-2 reduced the activation of microglia. Subchronic administration of WIN55,212-2 protected bNOS expressing amacrine cells at the dose of 25 μg/kg, but there was no such effect at the dose of 100 μg/kg. The latter may be due to the fact that the dose of 100 μg/kg, WIN55,212-2 induced the downregulation of the CB1 receptor in both healthy and AMPA treated retinas. No such downregulation was observed at doses of 25 and 50 μg/kg . Collectively these data suggest that WIN55,212-2 exerts neuroprotective actions in the AMPA excitotoxicity model when administered acutely. Subchronic administration of high doses of WIN55,212-2 leads to the downregulation of the CB1 receptor and reduces its neuroprotective actions.

Key words: cannabinoids, WIN55,212-2, CB1 receptor, AM251, excitotoxicity, intravitreal injection, subchronic administration

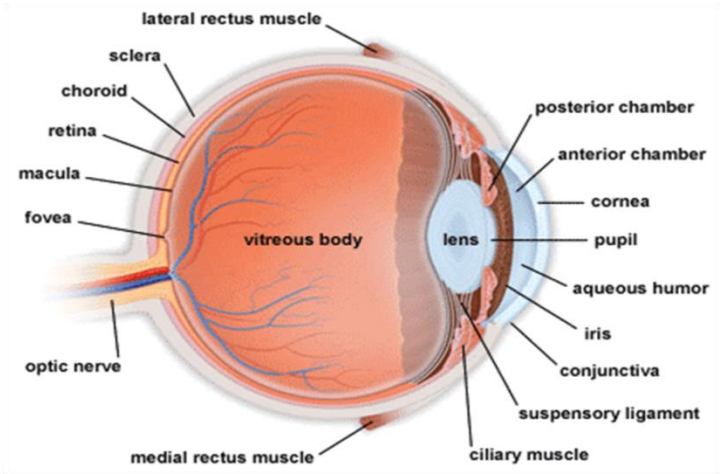
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Ανατομία του οφθαλμού

Η όραση είναι ίσως η σημαντικότερη από όλες τις αισθήσεις. Δίχως αυτήν οι πιθανότητες επιβίωσης οποιουδήποτε έμβιου όντος, μειώνονται δραματικά. Όπως και για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, έτσι και για τον άνθρωπο είναι απαραίτητο να λαμβάνει οπτικά ερεθίσματα, προκειμένου να κατανοεί πως κινείται στο χώρο, αλλά και πως κινούνται τα αντικείμενα σε σχέση με αυτόν.

Το αισθητήριο όργανο της όρασης, είναι ο οφθαλμός, ο οποίος χρησιμοποιώντας το φως, καθιστά εφικτή την αποτύπωση της εξωτερικής πραγματικότητας στον εγκέφαλο. Η ανατομία του οφθαλμού είναι κατά τέτοιο τρόπο δομημένη, ώστε να μπορεί να εκμεταλλεύεται στο έπακρο το φως που εκπέμπεται ή αντανακλάται από τα αντικείμενα.

Κοιτώντας προσεκτικά τον οφθαλμό, παρατηρούμε ότι στο κέντρο του εντοπίζεται μια μικρή οπή, μαύρου χρώματος, η οποία ονομάζεται κόρη και επιτρέπει στο φως να εισέλθει στο εσωτερικό του οφθαλμού (Purves και συν., 2001). Η ίριδα, που εντοπίζεται γύρω από την κόρη, αποτελείται από δύο υποομάδες μυών με αντιθετική δράση, οι οποίοι ελέγχουν το μέγεθος της κόρης και κατ' επέκταση το ποσοστό του φωτός που εισέρχεται στον οφθαλμό (Purves και συν., 2001). Το μεγαλύτερο μέρος της εξωτερικής επιφάνειας του οφθαλμού, καλύπτεται από ένα λευκό, σκληρό ιστό, τον σκληρό χιτώνα, ο οποίος σχηματίζει μέρος της υποστηρικτικής επιφάνειας του οφθαλμού (Purves και συν., 2001). Προχωρώντας από το οπίσθιο προς το πρόσθιο μέρος του οφθαλμού, ο σκληρός χιτώνας μετατρέπεται σε διαφανή ιστό τον κερατοειδή χιτώνα, επιτρέποντας την είσοδο του φωτός προς την κόρη (Purves και συν., 2001).



Εικόνα 1. Ανατομία του οφθαλμού σε οβελιαία τομή (λήφθηκε από: http://orsillovisioncare.com/articles/anatomy_a1.htm)

Η ανατομία του οφθαλμού, χωρίζεται ουσιαστικά σε τρείς στιβάδες, την εξωτερική (κερατοειδής και σκληρός χιτώνας), την ενδιάμεση (ίριδα, ακτινωτό σώμα και χοριοειδές) και την οπίσθια (αμφιβληστροειδής χιτώνας) (Snell & Lemp, 2013). Η ενδιάμεση στιβάδα χωρίζεται σε ένα πρόσθιο τμήμα που περιλαμβάνει την ίριδα και το μυϊκό τμήμα του ακτινωτού σώματος και σε ένα οπίσθιο τμήμα που αποτελείται από το χοριοειδές, το αγγειακό τμήμα του ακτινωτού σώματος που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του υδατοειδούς υγρού (Snell & Lemp, 2013). Στο χοριοειδές παρατηρείται επίσης και εκτεταμένη αγγείωση, η οποία βοηθά στην αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς. Ο αμφιβληστροειδής, ευρισκόμενος στην οπίσθια στιβάδα του οφθαλμού, περιλαμβάνει τους φωτοϋποδοχείς και άλλους τύπους νευρικών κυττάρων, οι οποίοι συμμετέχουν στην διαδικασία της φωτομετατροπής, της μετατροπής δηλαδή των φωτεινών ερεθισμάτων σε νευρικές ώσεις που μεταδίδονται στον εγκέφαλο, δια μέσω του οπτικού νεύρου (Purves και συν., 2001).

Ο φακός, ο οποίος βρίσκεται πίσω από την ίριδα και την κόρη, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες δομές του οφθαλμού. Είναι συνδεδεμένος με το πρόσθιο κομμάτι του ακτινωτού σώματος, οι μύες του οποίου ελέγχουν την συστολή και την διαστολή του, διαμορφώνοντας το σχήμα του (Snell & Lemp, 2013). Ένα άλλο σημαντικό κομμάτι της ανατομίας του οφθαλμού, αποτελούν οι θάλαμοι, που είναι πλήρεις με υγρό. Συνολικά εντοπίζονται τρείς θάλαμοι, ο πρόσθιος (μεταξύ του κερατοειδούς και της ίριδας), ο οπίσθιος (μεταξύ της ίριδας και του φακού) και ο θάλαμος του υαλώδους υγρού (μεταξύ του φακού και του αμφιβληστροειδούς) (Kolb, 2018). Οι δύο πρώτοι θάλαμοι είναι γεμάτοι με υδατοειδές υγρό, ένα διάφανο και υδαρές υγρό, ο ρόλος του οποίου είναι να παρέχει θρεπτικά συστατικά σε αυτές τις δομές. Υπεύθυνο για την παραγωγή του είναι το χοριοειδές, απ’ όπου το υδατοειδές υγρό παροχετεύεται μέσω της κόρης στον πρόσθιο θάλαμο, όπου προσλαμβάνεται από εξειδικευμένα κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ της ίριδας και του κερατοειδούς(Kolb, 2018). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ρυθμός παραγωγής και εναλλαγής του υδατοειδούς υγρού, μεταξύ οπίσθιου και πρόσθιου θαλάμου, βρίσκονται σε ισορροπία, διατηρώντας την ενδοφθάλμια πίεση (ΕΦΠ) σταθερή (Kolb, 2018). Η αύξηση της ΕΦΠ, εξαιτίας διαταραχών του συστήματος παροχέτευσης, οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι το γλαύκωμα (Kolb, 2018). Ο τρίτος θάλαμος αποτελείται από ένα παχύρευστο, ζελατινοειδές υγρό, το υαλώδες, που καλύπτει τον χώρο μεταξύ φακού και αμφιβληστροειδούς (Snell & Lemp, 2013). Πέρα από τον υποστηρικτικό του ρόλο, το υαλώδες περιέχει και φαγοκυτταρικούς πληθυσμούς, οι οποίοι απομακρύνουν άχρηστα υπολείμματα από την γύρω περιοχή (Snell & Lemp, 2013).

1.2. Ανατομία του αμφιβληστροειδούς

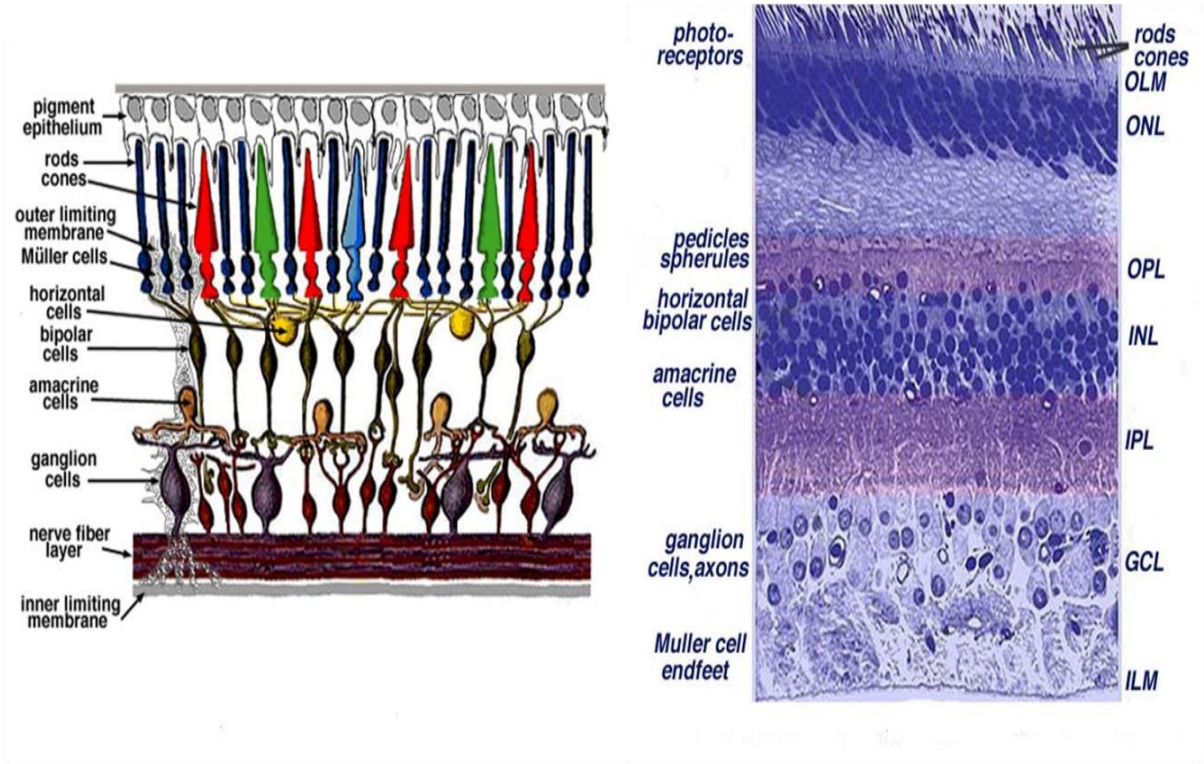
Το σημαντικότερο τμήμα του οφθαλμού είναι ο αμφιβληστροειδής, ο οποίος βρίσκεται στο οπίσθιο τμήμα του, αποτελώντας το σημείο όπου τα φωτεινά ερεθίσματα μετατρέπονται σε ηλεκτρικές ώσεις και άγονται με την βοήθεια του οπτικού νεύρου προς τον εγκέφαλο. Η σπουδαιότητα του αμφιβληστροειδούς διαφαίνεται από το γεγονός, ότι περίπου το 80% όλων των αισθητικών πληροφοριών στον άνθρωπο, θεωρείται ότι προέρχεται από τον αμφιβληστροειδή (Sharma & Ehinger, 2003).

Ο αμφιβληστροειδής είναι πάχους 0.5 mm, ενώ η διάμετρός του φτάνει τα 30-40 mm. Στο κεντρικό τμήμα του, εντοπίζεται το οπτικό νεύρο, που αποτελείται από τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, οι οποίοι εξέρχονται με κατεύθυνση τον εγκέφαλο. Παράλληλα δια μέσω του οπτικού νεύρου εισέρχονται στον αμφιβληστροειδή διάφορα αιμοφόρα αγγεία (Kolb, 1995). Μερικά χιλιοστά αριστερά του σημείου εξόδου του οπτικού νεύρου, υπάρχει ένας ελλειπτικός κίτρινος σχηματισμός, από τον οποίο απουσιάζει η αγγείωση και ονομάζεται ωχρά κηλίδα (Kolb, 1995). Στο κέντρο της ωχράς κηλίδας, εντοπίζεται το κεντρικό βοθρίο, διαμέτρου 0.35 mm, το οποίο αποτελεί το σημείο με την μεγαλύτερη οπτική οξύτητα, εξαιτίας της πληθώρας κωνίων που διαθέτει (Hildebrand & Fielder, 2011). Το κυκλικό πεδίο, διαμέτρου 6 mm, που σχηματίζεται γύρω από το κεντρικό βοθρίο, αποτελεί τον κεντρικό αμφιβληστροειδή, ενώ από εκεί και έπειτα όλη η υπόλοιπη επιφάνεια θεωρείται περιφερειακός αμφιβληστροειδής (Hildebrand & Fielder, 2011).

Ο κεντρικός και ο περιφερειακός αμφιβληστροειδής, παρουσιάζουν κάποιες μορφολογικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ τους. Για παράδειγμα ο κεντρικός είναι πιο παχύς από τον περιφερειακό, εξαιτίας της αυξημένης πυκνότητας φωτοϋποδοχέων, δίπολων και γαγγλιακών κυττάρων που διαθέτει (Hildebrand & Fielder, 2011). Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, η έσω κοκκώδης στιβάδα (inner nuclear layer, INL), η έσω δικτυωτή στιβάδα (inner plexiform layer, IPL) και η γαγγλιακή στιβάδα (ganglion cell layer, GCL) είναι παχύτερες στον κεντρικό σε σύγκριση με τον περιφερειακό (Kolb και συν., 1995). Επιπλέον στον κεντρικό, ο αριθμός των κωνίων είναι πολύ μεγαλύτερος, γεγονός που προσδίδει στο συγκεκριμένο σημείο ικανότητα για αυξημένη οπτική οξύτητα. Από την άλλη πλευρά στον περιφερειακό, ο αριθμός των ραβδίων είναι μεγαλύτερος από αυτόν των κωνίων (Hildebrand & Fielder, 2011).

Μελετώντας προσεκτικότερα την κυτταροαρχιτεκτονική του αμφιβληστροειδούς, παρατηρούμε ότι τα γαγγλιακά κύτταρα, που αποτελούν τους αγγελιοφόρους της οπτικής πληροφορίας, βρίσκονται κοντά στον φακό, ενώ οι φωτοϋποδοχείς (ραβδία και κωνία), τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη των φωτονίων, βρίσκονται στο οπίσθιο τμήμα του αμφιβληστροειδούς, κοντά στο μελάγχρουν επιθήλιο και το χοριοειδές (Kolb, 1995). Αυτό

πρακτικά σημαίνει, ότι το φώς θα πρέπει να διαπεράσει όλες της κυτταρικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, προκειμένου να φθάσει στους φωτοϋποδοχείς και να τους ενεργοποιήσει (Kolb, 1995).



Εικόνα 2. Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρικής οργάνωσης στον αμφιβληστροειδή. Δεξιά: Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου από τον κεντρικό αμφιβληστροειδή ανθρώπου (λήφθηκε από: https://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina/)

1.2.1. Τύποι κυττάρων στον αμφιβληστροειδή

Οι βασικοί τύποι κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, αποτελούνται από τα κύτταρα στης στιβάδας του μελάγχρου επιθηλίου (retinal pigment epithelium, RPE), οι φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα κύτταρα, τα γαγγλιακά κύτταρα, τα διάφορα είδη ενδονευρώνων και τα κύτταρα της γλοίας (Hildebrand & Fielder, 2011).

1.2.1.α. Μελάχρουν επιθήλιο

Τα κύτταρα του RPE δημιουργούν μία κυτταρική στιβάδα, ακριβώς έξω από το αισθητικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς, όπου είναι στενά συνδεδεμένα με το χοριοειδές και περιβάλουν τα αμφιβληστροειδικά κύτταρα (Strauss, 2005). Η στιβάδα του RPE, αποτελείται από κύτταρα εξαγωνικού σχήματος που περιέχουν μελανίνη, στην οποία οφείλεται και το

μελανό χρώμα της στιβάδας (Strauss, 2005). Τα κύτταρα δημιουργούν στενές συνδέσεις μεταξύ τους, συνθέτοντας με αυτόν τον τρόπο τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό (ΑΑΦ), ο οποίος προστατεύει τον αμφιβληστροειδή από εξωτερικές απειλές (Strauss, 2005). Με την κορυφαία μεμβράνη τους, τα κύτταρα του RPE γειτνιάζουν με τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων, με τα οποία αλληλεπιδρούν συνεχώς (Bock, 1993). Στην αντιδιαμετρική πλευρά συνορεύουν με την μεμβράνη του Bruch, η οποία χωρίζει το RPE από το ενδοθηλιακό μέρος του χοριοειδούς (Bock, 1993).

Τα κύτταρα του RPE επιτελούν μα πληθώρα λειτουργιών. Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητές τους, αποτελεί η δυνατότητα να απορροφούν την περίσσεια φωτός που συγκεντρώνεται στον αμφιβληστροειδή, κάτι που συμβάλει στην βελτίωση της ποιότητας της οπτικής πληροφορίας και στην προστασία των φωτοϋποδοχέων από την επαγόμενη από το φως οξείδωση (Boulton & Dayhaw-Backer, 2001). Επίσης είναι σε θέση να μεταφέρουν διάφορα στοιχεία, από και προς τον αμφιβληστροειδή. Από την μία πλευρά μεταφέρουν ιόντα και νερό από τον αμφιβληστροειδή προς το χοριοειδές (Hughes και συν., 1998), ενώ από την άλλη μεταφέρουν γλυκόζη και άλλα θρεπτικά στοιχεία, από την αιματική κυκλοφορία προς τους φωτοϋποδοχείς (Ban & Rizzolo, 2000). Παράλληλα, τα κύτταρα του RPE, μπορούν να ανταποκριθούν σε γρήγορες αλλαγές της ομοιόστασης, μέσω διαφόρων αντισταθμιστικών μηχανισμών, διατηρώντας την διεγερσιμότητα των φωτοϋποδοχέων (Steinberg, 1985). Μία από τις σπουδαιότερες λειτουργίες των κυττάρων του RPE, είναι η ανανέωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, εξαιτίας της συνεχής τους έκθεσης στην ακτινοβολία (Beatty και συν., 2000). Η ανανέωση αυτή υποβοηθάται σε σημαντικό βαθμό από τα κύτταρα του RPE, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα υπολείμματα της οξείδωσης (Bock και συν., 1993). Τέλος τα κύτταρα του RPE, είναι σε θέση να παρέχουν στον αμφιβληστροειδή πληθώρα τροφικών παραγόντων, κρίσιμων για την επιβίωση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Tanihara και συν., 1997).

1.2.1.β. Φωτοϋποδοχείς

Οι φωτοϋποδοχείς αποτελούν τα αισθητικά κύτταρα του οπτικού συστήματος, τα οποία συλλέγουν τα φωτόνια από την ακτινοβολία και τα μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα, μέσω της φωτομετατροπής (Levin, 2003). Υπάρχουν δύο είδη φωτοϋποδοχέων, τα ραβδία και τα κωνία, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους, ως προς το σχήμα, το είδος της φωτοευαίσθητης χρωστικής που διαθέτουν και ως προς την γεωγραφική κατανομή τους στον αμφιβληστροειδή.

Τα ραβδία περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φωτοευαίσθητης χρωστικής από τα κωνία και διεκπεραιώνουν την όραση, κατά την διάρκεια της νύχτας, μία διαδικασία που καλείται σκοτοπική όραση (Purves και συν., 2001). Επιπλέον τα σήματα από αρκετά ραβδία

συγκλίνουν προς ένα δίπολο κύτταρο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αλληλοενίσχυση του σήματος (Langado & Baylor, 1992). Από την άλλη πλευρά λιγότερα κωνία συνάπτονται με ένα δίπολο κύτταρο, γεγονός που μειώνει την ευαισθησία στο φως, αυξάνοντας όμως την χωρική διακριτική ικανότητα τους (Langado & Baylor, 1992). Γι' αυτό τον λόγο, τα κωνία είναι εξειδικευμένα για την όραση κατά τη διάρκεια της ημέρας, μία διαδικασία που καλείται φωτοπική όραση (Purves και συν., 2001). Στο κεντρικό βοθρίο, όπου το είδωλο της εικόνας υφίσταται την ελάχιστη παραμόρφωση, είναι συγκεντρωμένος μεγάλος αριθμός κωνίων και τα ραβδία απουσιάζουν, ενώ κάθε κωνίο συνάπτεται με διαφορετικό δίπολο κύτταρο, συμβάλλοντας έτσι στην μέγιστη δυνατή οπτική οξύτητα (Langado & Baylor, 1992). Στον αμφιβληστροειδή του ανθρώπου, υπάρχουν τρείς τύποι κωνίων, με διαφορετική χρωστική ο καθένας, η οποία είναι ευαίσθητη σε ένα συγκεκριμένο τμήμα του φάσματος (Purves και συν., 2001).

Τα κωνία και τα ραβδία παρουσιάζουν κάποιες ομοιότητες ως προς την αδρή μορφολογία τους. Διαθέτουν τρείς περιοχές, το εξωτερικό τμήμα, το εσωτερικό τμήμα και τις συναπτικές απολήξεις (Kandel και συν., 1999). Το εσωτερικό τμήμα περιέχει των πυρήνα και το μεγαλύτερο μέρος των βιοσυνθετικών οργανιδίων του κυττάρου (Roof & Makino, 2000). Στις συναπτικές τους απολήξεις οι φωτοϋποδοχείς συνάπτονται με διάφορα κύτταρα στόχους, όπως είναι τα δίπολα και τα οριζόντια κύτταρα (Roof & Makino, 2000). Το εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός πολύπλοκου συστήματος μεμβρανικών δισκίων, στα οποία εντοπίζονται οι φωτοαπορροφητικές οπτικές χρωστικές, που είναι υπεύθυνες για την φωτομετατροπή (Kandel και συν., 1999).

1.2.1.γ. Ενδονευρώνες

Οι ενδονευρώνες αποτελούν κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην μετάδοση του σήματος από τους φωτοϋποδοχείς προς τα γαγγλιακά κύτταρα. Αποτελούνται από διάφορους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα δίπολα, τα οριζόντια και τα βραχύινα κύτταρα και σχηματίζουν πολύπλοκα δίκτυα στον αμφιβληστροειδή (Sharma & Ehinger, 2003). Προκειμένου όμως να γίνει περισσότερο κατανοητός ο ρόλος αυτών των κυττάρων, θα πρέπει να τα δούμε ως μέρος της ευρύτερης κυτταροαρχιτεκτονικής του αμφιβληστροειδούς και όχι μεμονωμένα.

Ο αμφιβληστροειδής των σπονδυλωτών αποτελείται από τρείς στιβάδες, οι οποίες περιέχουν τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων και δύο στιβάδες, στις οποίες υπάρχουν οι αποφυάδες αυτών των κυττάρων και πραγματοποιούνται οι εκάστοτε συνδέσεις μεταξύ τους (Kandel και συν., 1999). Τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων βρίσκονται στην εξωτερική κοκκώδη στιβάδα (outer nuclear layer, ONL), ενώ τα κυτταρικά σώματα των διάμεσων νευρώνων εντοπίζονται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα (inner nuclear layer.

INL) (Kandel και συν., 1999). Η γαγγλιακή στιβάδα (ganglion cell layer, GCL), περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων (Kandel και συν. 1999). Μεταξύ της ONL και της INL, παρεμβάλλεται η εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (outer plexiform layer, OPL), το σημείο όπου οι φωτοϋποδοχείς πραγματοποιούν συνδέσεις με τα οριζόντια και τα δίπολα κύτταρα (Kandel και συν. 1999). Απ' την άλλη πλευρά, τα δίπολα, τα βραχύινα και τα γαγγλιακά πραγματοποιούν συνδέσεις μεταξύ τους στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (inner plexiform layer, IPL), η οποία βρίσκεται μεταξύ της INL και της GCL (Kandel και συν., 1999).

Από τα παραπάνω, διαφαίνεται ο πολύ σημαντικός ρόλος των δίπολων κυττάρων, αφού έχοντας τις αποφυάδες τους στις δύο δικτυωτές στιβάδες, συνδέουν άμεσα τους φωτοϋποδοχείς με τα γαγγλιακά κύτταρα και οι συνδέσεις αυτές είναι γνωστές με τον όρο άμεσο ή κατακόρυφο μονοπάτι (Sharma & Ehinger, 2003). Ανάλογα με τους φωτοϋποδοχείς με τους οποίους συνάπτονται, τα δίπολα κύτταρα χωρίζονται σε κωνιοφόρα και ραβδιοφόρα (Sharma & Ehinger, 2003). Τα δίπολα κύτταρα διαθέτουν υποδεκτικό πεδίο με ανταγωνιστική οργάνωση μεταξύ κέντρου και περιφέρειας και διακρίνονται σε κύτταρα φωτεινού και σκοτεινού κέντρου (Kandel και συν., 1999).

Εκτός από την άμεση οδό, σήματα από τους φωτοϋποδοχείς προς τα γαγγλιακά κύτταρα, μεταβιβάζονται και μέσω δίπολων κυττάρων, με την διαμεσολάβηση οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν το έμμεσο ή πλάγιο μονοπάτι (Sharma & Ehinger, 2003). Τα οριζόντια κύτταρα διαθέτουν μεγάλα δενδριτικά πεδία, εντοπίζονται στην INL στα όριά της με την OPL και μεταφέρουν πληροφορίες από απομακρυσμένους μεταξύ τους υποδοχείς στα δίπολα κύτταρα (Kandel και συν., 1999). Τέλος τα βραχύινα κύτταρα, βρίσκονται και αυτά στην INL, στα σύνορά της με την IPL και μεταφέρουν πληροφορίες από απομακρυσμένα μεταξύ τους δίπολα κύτταρα, στα γαγγλιακά κύτταρα (Kandel και συν., 1999).

1.2.1.δ. Γαγγλιακά κύτταρα

Τα γαγγλιακά κύτταρα αποτελούν τον τελευταίο αποδέκτη της οπτικής πληροφορίας στον αμφιβληστροειδή και είναι υπεύθυνα για την μεταβίβασή της στον εγκέφαλο. Τα κυτταρικά τους σώματα βρίσκονται στην GCL, ενώ οι δενδρίτες τους σχηματίζουν συνάψεις με τα δίπολα και τα βραχύινα κύτταρα στην IPL (Wurtz & Kandel, 2000). Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων ενώνονται για να σχηματίσουν το οπτικό νεύρο, το οποίο καταλήγει σε περιοχές οπτικής επεξεργασίας του εγκεφάλου, με πρώτο σταθμό, το έξω γονατώδες σώμα του θαλάμου (Wurtz & Kandel, 2000). Καθώς οι άξονές τους συγκλίνουν για να εξέλθουν από τον αμφιβληστροειδή, δημιουργούν την στιβάδα των νευρικών ινών (nerve fibre layer, NFL), η οποία είναι λεπτότερη στην περιφέρεια και παχύτερη στο κέντρο του

αμφιβληστροειδούς, εξαιτίας των πολλών γαγγλιακών κυττάρων που υπάρχουν εκεί (Fitzgibbon, 1997).

1.2.1.ε. Κύτταρα της γλοίας

Στον αμφιβληστροειδή συναντώνται τρείς βασικοί τύποι γλοιακών κυττάρων, τα κύτταρα του Muller, τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά (Newman, 2000). Το κυτταρικό σώμα των κυττάρων του Muller βρίσκεται στην INL , από το οποίο εκφύονται αποφυάδες και προς τις δύο πλευρές του αμφιβληστροειδούς, οριοθετώντας τα όρια του αμφιβληστροειδούς (Newman, 2000). Στο οπίσθιο μέρος του αμφιβληστροειδούς, οι συνδέσεις των κυττάρων του Muller με άλλα γλοιακά κύτταρα, αλλά και με τους φωτοϋποδοχείς, δημιουργούν την εξωτερική αφοριστική μεμβράνη (Newman, 2000). Στο πρόσθιο τμήμα του αμφιβληστροειδούς, οι κωνικές απολήξεις των κυττάρων του Muller, συνθέτουν την εσωτερική αφοριστική μεμβράνη, η οποία έρχεται σε επαφή με τα υαλώδες υγρό (Newman, 2000). Τα κύτταρα του Muller παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της υγείας του αμφιβληστροειδούς, καθώς συμμετέχουν σε μία πληθώρα ενεργειών όπως, ο έλεγχος της ιοντικής ομοιόστασης και του μεταβολισμού των νευρώνων, η προστασία των νευρώνων από υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμινικού, η φαγοκυττάρωση διαφόρων επικίνδυνων υπολειμμάτων και η παροχή στους νευρώνες, χρήσιμων για την ανάπτυξή τους στοιχείων (Reichenbach & Robinshon, 1995).

Τα αστροκύτταρα από την άλλη πλευρά, δεν δημιουργούνται στον αμφιβληστροειδή, αλλά αντίθετα εισέρχονται σε αυτόν από τον εγκέφαλο, δια μέσου του οπτικού νεύρου , κατά την διάρκεια της ανάπτυξης (Provis, 2001). Τα κυτταρικά τους σώματα και οι αποφυάδες τους, εντοπίζονται στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων στην NFL και στο οπτικό νεύρο, καθώς και σε αγγεία (Provis, 2001). Μάλιστα το σχήμα τους αλλάζει ανάλογα με την εντόπισή τους στον αμφιβληστροειδή, αφού από αστεροειδούς σχήματος στην περιφέρεια, μετατρέπονται σε πιο επιμήκη, όσο προχωρούμε προς το κέντρο του αμφιβληστροειδούς (Schnitzer, 1988). Ο ρόλος των αστροκυττάρων είναι παρόμοιος με αυτόν των κυττάρων του Muller, αφού διαμορφώνουν ένα προστατευτικό περιβάλλον για τα γαγγλιακά κύτταρα (Provis, 2001).

Ο τρίτος τύπος γλοιακών κυττάρων, η μικρογλοία, εισέρχεται στον αμφιβληστροειδή κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, μέσω του οπτικού νεύρου, αλλά μπορεί παράλληλα να εισέλθει και δια μέσου της αιματικής κυκλοφορίας (Ashwell και συν., 1989). Εντοπίζονται κυρίως στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων στην NFL, αλλά λόγω της αυξημένης κινητικότητας που παρουσιάζουν, μπορεί να βρεθούν σε οποιοδήποτε μέρος του αμφιβληστροειδούς (Provis, 2001). Σε φυσιολογικές καταστάσεις η μικρογλοία συναντάται στην απενεργοποιημένη μορφή της (Davalos και συν., 2005). Ωστόσο ο όρος

απενεργοποιημένη δεν αντικατοπτρίζει πλήρως την πραγματικότητα, καθώς η μικρογλοία σε αυτήν την κατάσταση βρίσκεται σε διαρκή κίνηση και ανιχνεύει διαρκώς το περιβάλλον, μέσω μιας πληθώρας υποδοχέων που διαθέτει στην επιφάνεια της πλασματικής της μεμβράνης (Davalos και συν., 2005). Αναλυτικότερα στην μεμβράνη των μικρογλοιακών κυττάρων εντοπίζονται υποδοχείς κυτοκινών, χημειοκινών καθώς και δείκτες ιστοσυμβατότητας (Davalos και συν., 2005). Η ενεργοποιημένη μικρογλοία στην συνέχεια μπορεί να προσφέρει ένα πλήθος ευεργετικών επιδράσεων στον τραυματισμένο ιστό, οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων. (Streit, 2002). Μερικές από αυτές τις λειτουργίες μπορεί να είναι η απομάκρυσνη τοξικών υπολειμμάτων των κυττάρων (Simard και συν., 2006), η επιτάχυνση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των κυττάρων σε κρίσιμες αναπτυξιακές περιόδους (Upender και συν., 1999) και η ενίσχυση της κυτταρικής επιβίωσης μέσω της απελευθέρωσης τροφικών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων (Kreutzberg, 1996). Παράλληλα μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποιημένη μικρογλοία ενισχύει την αποκατάσταση του ιστού μετά από τραυματισμό, μέσω της καθοδήγησης στο σημείο της βλάβης βλαστικών κυττάρων (Aarum και συν., 2003), ενώ φαίνεται πως εμπλέκεται και στην νευρογένεση (Walton και συν., 2006).

Εάν η απειλή είναι μικρή, τότε η μικρογλοία αφού επιτύχει την επιδιόρθωση της βλάβης και αποκαταστήσει την ομοιόσταση, επιστρέφει στην πρότερη απενεργοποιημένη μορφή της (Cho και συν., 2006). Ωστόσο σε περιπτώσεις που η απειλή είναι μεγαλύτερη σε μέγεθος και διάρκεια, η μικρογλοία υπερενεργοποιείται απελευθερώνοντας τοξικούς για τα κύτταρα παράγοντες, όπως οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τα υπεροξείδια (Colton & Gilbet, 1989). Το NO (Moss & Bates, 2001), ο TNFα (Sawada και συν., 1989) κ.α. Επιπροσθέτως η ενεργοποιημένη μικρογλοία προκαλεί δυσλειτουργία του συστήματος του συμπληρώματος (complement system, ενός συστήματος αποτελούμενο από πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση και επιτίθενται σε αντιγόνα που έχουν αναγνωριστεί από αντισώματα) (Janewoy και συν., 2001), αυξάνοντας την έκφραση παραγόντων που ενισχύουν την ενεργοποίηση του συστήματος και μειώνοντας την έκφραση παραγόντων που την αναστέλλουν (Madeira και συν., 2018). Αυτό οδηγεί με τη σειρά του στην δημιουργία ενός προφλεγμονώδους περιβάλλοντος, το οποίο προσελκύει ακόμα περισσότερα κύτταρα ενεργοποιημένης μικρογλοίας και οδηγεί στην εκδήλωση κυτταροτοξικότητας (Zeng, 2005). Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις της ενεργοποιημένης μικρογλοίας έχουν αναγνωριστεί και σε αρκετά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών (Zeng και συν., 2005· Singhal και συν., 2010· Noailles και συν., 2014). Σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως το Alzheimer, το Parkinson κ.α, η ενεργοποιημένη μικρογλοία εμφανίζεται σε μεγάλους αριθμούς, μία κατάσταση που ονομάζεται μικρογλοίωση και συμβάλλει ενεργά στην επιδείνωση της παθολογίας της νόσου (Block και συν., 2007).

1.3. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή

Το γλουταμινικό είναι ο κυριότερος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του αμφιβληστροειδή. Ανοσοϊστοχημικές και αυτοραδιογραφικές μελέτες, υποδεικνύουν ότι το γλουταμινικό χρησιμοποιείται από τους φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα, δηλαδή αποτελεί την κύρια νευροδιαβιβαστική ουσία του κατακόρυφου μονοπατιού και εκτελεί σημαντικό ρόλο και στη λειτουργία των ενδιάμεσων νευρώνων μέσω των υποδοχέων του. (Davanger και συν., 1991· Kossinger & Allschuler, 1985).

Στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών, έχουν αναγνωριστεί αρκετά είδη γλουταμινεργικών υποδοχέων. Το γλουταμινικό προσδένεται και ενεργοποιεί αυτούς τους υποδοχείς, όπου καθένας χαρακτηρίζεται και από διαφορετική ευαισθησία, όσον αφορά τα ανάλογα του γλουταμινικού (Traynelis και συν., 2010). Οι υποδοχείς του γλουταμινικού χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τους ιοντοτροπικούς, που ελέγχουν άμεσα κάποιο δίαυλο ιόντων και τους μεταβολοτροπικούς, οι οποίοι ελέγχουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες, με την βοήθεια δεύτερων αγγελιοφόρων και την ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Traynelis και συν., 2010).

Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού σχηματίζουν σύμπλοκο με ένα δίαυλο ιόντων και είναι υπεύθυνοι για τη γρήγορη συναπτική διαβίβαση ανάμεσα στους νευρώνες (Gasic & Hollmann, 1992). Ανάλογα με τις ιδιότητές τους, την εντόπισή τους και το είδος του διαύλου ιόντων που ελέγχουν, χωρίζονται σε NMDA και σε μη NMDA υποδοχείς (Nakasishi & Massu, 1994). Ο NMDA υποδοχέας ενεργοποιείται με την πρόσδεση του γλουταμινικού οξέος και με μεγαλύτερη συγγένεια, με το NMDA (N-Methyl-D-Aspartate). Η ενεργοποίησή του προκαλεί τη διέλευση ιόντων ασβεστίου μέσω του διαύλου που ελέγχει (Gasic & Hollmann, 1992). Προσδεόμενο σε μη NMDA υποδοχείς, το γλουταμινικό ενεργοποιεί διαύλους περισσότερο διαπερατούς σε ιόντα νατρίου και καλίου, αλλά όχι ασβεστίου, εκπολώνοντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μεμβράνη (Mayer & Westbrook, 1987). Οι πιο γνωστοί υπότυποι μη NMDA υποδοχέων, είναι οι AMPA και οι υποδοχείς του καϊνικού οξέος (Traynelis και συν., 2010).

Σε αντίθεση με τους ιοντοτροπικούς, οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού (mGluRs), αποκρίνονται στην πρόσδεση γλουταμινικού με την ενεργοποίηση ενός ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού (Cann & Pin, 1997). Έχουν αναγνωριστεί οχτώ mGluRs, οι οποίοι χωρίζονται σε τρεις μεγάλες ομάδες (I, II & III), ανάλογα με την δομή και τη λειτουργία τους (Cann & Pin, 1997).

Μελέτες έχουν αναδείξει την ύπαρξη ιοντοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού, σε νευρώνες που συνθέτων συνθέτουν το OFF μονοπάτι του αμφιβληστροειδούς

(Bodnarenko & Chalupa, 1993). Ειδικότερα τα OFF δίπολα κύτταρα (Harveit, 1997), καθώς και ορισμένοι πληθυσμοί οριζόντιων κυττάρων (Yong & Wu, 1997), φαίνεται πως εκφράζουν μη NMDA υποδοχείς, αλλά όχι NMDA. Επίσης μη NMDA υποδοχείς εκφράζονται τόσο σε βραχύινα, όσο και σε γαγγλιακά κύτταρα (Massey & Miller, 1988· Yu & Miller, 1995), ενώ φαίνεται πως τα γαγγλιακά κύτταρα διαθέτουν και NMDA υποδοχείς (Massey & Miller, 1988). Οι mGluRs παρουσιάζουν και αυτοί ένα ευρύ πρότυπο κατανομής στον αμφιβληστροειδή, όπου εκφράζονται κυρίως στις στιβάδες OPL, IPL, INL και στην GCL (Connaughton, 2007). Ειδικότερα ο APB υποδοχέας είναι υπεύθυνος για την διαβίβαση ανάμεσα στους φωτοϋποδοχείς και στα ON δίπολα κύτταρα (Connaughton, 2007).

Εκτός από τους υποδοχείς, στον αμφιβληστροειδή έχουν αναγνωριστεί και κάποιοι τύποι μεταφορέων του γλουταμινικού, όπως ο γλοιακός μεταφορέας γλουταμινικού (glial glutamate transporter,GLT-1), ο γλοιακός μεταφορέας γλουταμινικού και ασπαρτικού (glial glutamate and aspartate transporter, GLAST) και ο μεταφορέας των διεγερτικών αμινοξέων (excitatory amino acid transporter, EAAC1) (Connaughton, 2007). Η ανοσοδραστικότητα των μεταφορέων είναι πιο έντονη στα γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, αλλά ορισμένοι εξ' αυτών εντοπίζονται στα γαγγλιακά, στα δίπολα και σε ορισμένα βραχύινα κύτταρα (Schultz & Stell, 1996).

Εκτός από το γλουταμινικό οξύ, παρόντες στον αμφιβληστροειδή είναι και οι δύο κυριότεροι ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές, το γ αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και η γλυκίνη (Marc και συν., 1995· Connaughton, 2007). Το GABA μπορεί να αλληλεπιδράσει με τρία είδη υποδοχέων, τους $GABA_{A,}$ τους $GABA_B$ και τους $GABA_C$ (Sieghart, 1995). Οι $GABA_A$ και οι $GABA_{B,}$ είναι ιοντοτροπικοί υποδοχείς, συζευγμένοι με ένα δίαυλο χλωρίου και η ενεργοποίηση τους προκαλεί υπερπόλωση στο κύτταρο (Sieghart, 1995). Οι $GABA_B$ υποδοχείς από την άλλη, είναι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς και ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων, συζευγμένων με G πρωτείνες (GPCRs) και ρόλος τους είναι η ρύθμιση των μακροπρόθεσμων ανασταλτικών δράσεων του GABA, μέσω της δράσης τους σε διαύλους ασβεστίου και καλίου (Ong & Kerr, 2000).

Στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς εκφράζονται και άλλοι νευροδιαβιβαστές, όπως η ακετυλοχολίνη (Masland & Ames, 1974), η ντοπαμίνη (Kolb και συν., 1992), σεροτονίνη (Vaney, 1986), καθώς και διάφορα νευροδραστικά πεπτίδια, όπως η σωματοστατίνη (Yamanda και συν., 1980), η ουσία P (Karten & Brecha, 1980) και το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (vassoactive intestinal peptide, VIP) (Loren και συν., 1980). Τα κύτταρα, είναι δυνατόν να εκφράζουν περισσότερες από μία νευρομεταβιβαστικές ουσίες. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί ο A18 κυτταρικός τύπος, στον οποίο παρατηρείται

συνεντοπισμός του γλουταμινικού, της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης (Wassle & Chun, 1988).

Συμπερασματικά, γίνεται κατανοητό, πως η νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, το οποίο συντελείται με την βοήθεια μιας πληθώρας ουσιών. Οι δύο βασικότεροι νευροδιαβιβαστές του αμφιβληστροειδούς, είναι το γλουταμινικό και το GABA, τα οποία εκφράζονται από κύτταρα του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού αντίστοιχα. Παρ΄όλα, ο ρόλος των υπόλοιπων νευροδιαβιβαστών είναι εξίσου σημαντικός για την ολοκλήρωση και την μετάδοση της οπτικής πληροφορίας.

1.4. Παθοφυσιολογία αμφιβληστροειδοπαθειών

Οι αμφιβληστροειδοπάθειες είναι η πιο κοινή αιτία τύφλωσης παγκοσμίως (Resnikoff και συν., 2004). Το φάσμα των αμφιβληστροειδοπαθειών είναι ευρύ και περιλαμβάνει διάφορες νόσους, οι κυριότερες εκ των οποίων είναι η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (ΓΕΩ), η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΜΑ), η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) και το γλαύκωμα (Pascadini και συν., 2010). Το κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ αυτών των νόσων, είναι η προοδευτική εκφύλιση διαφόρων κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς, η οποία συνοδεύεται και από μία φλεγμονώδη συνιστώσα (Wert και συν., 2014). Ακολούθως, παρατίθενται συνοπτικά, ορισμένες από τις βασικότερες παθοφυσιολογικές πτυχές της εκάστοτε νόσου.

1.4.1. Γεροντική εκφύλιση ωχράς κηλίδας (ΓΕΩ)

Η ΓΕΩ θεωρείται μία από τις πιο κοινές αιτίες μη αναστρέψιμης τύφλωσης παγκοσμίως, στις ανεπτυγμένες χώρες (Gehrs και συν., 2006). Η αιτιολογία της ΓΕΩ είναι πολυπαραγοντική, με γενετικούς, περιβαλλοντικούς και δημογραφικούς παράγοντες να παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της (Jager και συν., 2008). Προσβάλει κυρίως τους φωτοϋποδοχείς, την στιβάδα του RPE, την μεμβράνη του Bruch και το χοριοειδές (Gehrs και συν., 2006). Ειδικότερα παρατηρούνται αλλαγές στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων του RPE, πάχυνση της μεμβράνης του Bruch και της εσωτερικής αφοριστικής μεμβράνης, καθώς και εκφύλιση διαφόρων κυτταρικών τύπων (Gehrs και συν., 2006). Το κλασσικότερο ιστοπαθολογικό εύρημα που συνδέεται με την ΓΕΩ, είναι η εναπόθεση υπολειμμάτων στην μεμβράνη του Bruch, τα οποία παρουσιάζουν κρυσταλοειδή μορφή και αποτελούνται από γλυκοπρωτεΐνες και λιπίδια (Anderson και συν., 2004). Η νόσος παρουσιάζει δύο διαφορετικές μορφές, μία αργώς εξελισσόμενη ή ξηρή (dry) μορφή, όπου βασικό χαρακτηριστικό της είναι η ατροφία και μία ταχέως εξελισσόμενη ή υγρή (wet) μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη νεοαγγείωση (Ambati & Fowler, 2012). Η ξηρή μορφή χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων και των κυττάρων του RPE στην περιοχή της ωχράς κηλίδας, ενώ στην υγρή μορφή παρουσιάζεται αυξημένη

αγγειογένεση και οίδημα στα αγγεία του χοριοειδούς, γεγονός που επηρρεάζει αρνητικά τις εγγύς δομές (φωτοϋποδοχείς, μεμβράνη του Bruch, RPE) (Ambati & Fowler, 2012).

1.4.2. Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΜΑ)

Η ΜΑ είναι η πιο κοινή αιτία κληρονομήσιμης τύφλωσης παγκοσμίως, προσβάλλοντας 1 στους 3.000 ανθρώπους (Pascolini και συν., 2012). Η αιτιολογία της νόσου είναι κατά κύριο λόγο γενετική. Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στη διατήρηση της δομής των φωτοϋποδοχέων και σε διαδικασίες φωτομετατροπής, ευθύνονται για τον θάνατο των φωτοϋποδοχέων (Farrar και συν., 2002). Στα αρχικά στάδια της νόσου παρατηρείται προοδευτική εκφύλιση των ραβδίων, η οποία σε δεύτερο χρόνο οδηγεί και στην απώλεια των κωνίων (Hartog και συν., 2006). Εξαιτίας της απώλειας των ραβδίων, ένα από τα πρωταρχικά συμπτώματα είναι η νυκταλωπία (απώλεια όρασης σε συνθήκες σκότους και απώλεια της περιφερειακής όρασης) (Hartog και συν., 2006). Αντιθέτως η κεντρική όραση (αναγνώριση προσώπων, χρωμάτων και λεπτομερειών) παραμένει ανεπηρέαστη, μέχρι την έναρξη της εκφύλισης και των κωνίων (Wert και συν., 2014).

1.4.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ)

Η χρόνια υπεργλυκαιμία, η υπερλιπιδαιμία και η υπέρταση συμβάλουν στην εμφάνιση της ΔΑ (Chew και συν., 1996 · Klein και συν., 1998). Η ΔΑ χωρίζεται σε δύο μορφές, στην πολλαπλασιαστική, στην οποία παρατηρούνται βλάβες της όρασης εξαιτίας της νεοαγγείωσης και της ύπαρξης οιδήματος στην ωχρά κηλίδα και στην μη πολλαπλασιαστική, στην οποία μπορεί να εμφανιστούν μικροανευρήσματα και αιμορραγίες, τα οποία όμως δεν είναι σε θέση να επηρεάσουν την όραση (Klein και συν., 1998). Ωστόσο και οι δύο μορφές χαρακτηρίζονται από την εκφύλιση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την εκτεταμένη νεοαγγείωση (Klein και συν., 1999). Ένα από τα αρχικά σημάδια της νόσου είναι η αλλαγές στην δομή και εν τέλει η καταστροφή των αγγείων. Παρατηρείται προοδευτική εκφύλιση των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία συνθέτουν τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό (ΑΑΦ) (Ciulla, 2003). Αυτό οδηγεί με την σειρά του στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, με αποτέλεσμα την είσοδο στον αμφιβληστροειδή βλαπτικών παραγόντων όπως οι κυτοκίνες και ο αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (vascular endothelial growth factor, VEGF) (Brownlee, 2001). Ο VEGF σε συνδυασμό με την ισχαιμία που παρατηρείται στα αγγεία του αμφιβληστροειδούς, διεγείρει την δημιουργία νέων παθολογικών αγγείων στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς, τα οποία εξαιτίας των λεπτότερων τοιχωμάτων που διαθέτουν, σπάνε προκαλώντας αιμορραγικά επεισόδια και οδηγώντας μέχρι και σε αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς (Ciulla και συν., 2003)

Πέρα από τις αγγειακές ανωμαλίες, η ΔΑ χαρακτηρίζεται και από την εκφύλιση νευρικών και γλοιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Villaorel και συν., 2010). Μάλιστα το ενδιαφέρον στο σημείο αυτό είναι, ότι η νευροεκφύλιση είναι παρούσα ήδη από τα αρχικά στάδια της νόσου, πριν ακόμα γίνουν εμφανείς οι αγγειακές ανωμαλίες (Antonetti και συν., 2006). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι υπάρχει νευροεκφύλιση διαφόρων κυτταρικών τύπων, όπως είναι τα γαγγλιακά (Gastringer και συν., 2008) και τα βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν ντοπαμίνη, ακετυλοχολίνη και bNOS (Gastringer και συν., 2006· Iban-Arias και συν., 2017). Τα ευρήματα αυτά επαληθεύονται και από μελέτες σε ανθρώπους, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένους αποπτωτικούς δείκτες (Barber και συν., 1998· El-Asrar και συν., 2004), καθώς και ατροφία σε διάφορες στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, όπως η NFL (Chihara και συν., 1993). Ένας άλλος τρόπος για την αναγνώριση της νευροεκφύλισης, είναι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας, η οποία επιβεβαιώνεται τόσο από μελέτες σε ζώα (Asnaghi και συν., 2003· Iban-Arias και συν., 2017), όσο και από μελέτες σε ανθρώπους (Carrasco και συν., 2008).

1.4.4. Γλαύκωμα

Το γλαύκωμα αποτελεί μία από τις βασικότερες αιτίες τύφλωσης παγκοσμίως και θεωρείται ότι μέχρι το 2020 θα έχει προσβάλλει 79.6 εκατομμύρια ανθρώπους (Quigley & Browman, 2006). Είναι μία νευροεκφυλιστική διαταραχή, που προσβάλλει τα γαγγλιακά κύτταρα και τους άξονές τους (Qu και συ., 2010). Ο κυριότερος όμως παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση γλαυκώματος, είναι η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση (ΕΦΠ) (Weinreb & Khaw, 2004). Η μείωση της ΕΦΠ μπορεί να βοηθήσει στην διατήρηση της όρασης σε ορισμένους ασθενείς, αλλά όχι για άλλους (Araujo και συν., 1995), υποδεικνύοντας ότι στην παθογένεια του γλαυκώματος, συμμετέχουν και άλλοι μηχανισμοί, όπως η εκφύλιση κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Quigley και συν., 1999).

Βασικό χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας του γλαυκώματος, είναι ο θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων (Quigley και συν., 1999) και η εκφύλιση των αξόνων τους, που πολλές φορές εντοπίζεται ακόμα και σε οπτικές περιοχές του εγκεφάλου που καταλήγουν οι άξονες (Yucel και συν., 2000). Ο παρατηρούμενος θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων, είναι αποτέλεσμα αποπτωτικών διεργασιών (Quigley και συν., 1999). Εκλυτικοί παράγοντες της απόπτωσης είναι η διεγερσιτοξικότητα του γλουταμινικού, το οξειδωτικό στρες και η υπερβολική εναπόθεση πρωτεϊνών στα κύτταρα (Gupta & Yucel, 2007). Πέρα από το στοιχείο της νευροεκφύλισης, σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του γλαυκώματος, διαδραματίζει και η φλεγμονή (Balaiya και συν., 2011). Τα γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, σαν απόκριση στον τραυματισμό, απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor α, TNFα), η

ιντερλευκίνη 6 (IL-6) κ.α (Cvenkel και συν., 2010). Οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται στην εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων, αφού αναστολείς ή ανταγωνιστές γι' αυτούς, μειώνουν τον κυτταρικό θάνατο, μέσω της μείωσης της φλεγμονής (Roh και συν., 2012).

1.5. Ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών

Τα ζωικά μοντέλα είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στα χέρια του ερευνητή, καθώς μιμούνται βασικές πτυχές της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας της εκάστοτε αμφιβληστροειδοπάθειας και χρησιμεύουν ως βάση για τον έλεγχο ουσιών με πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες. Στην πορεία του χρόνου, οι ερευνητές έχουν καταφέρει να αναπτύξουν in vivo και in vitro μοντέλα για διάφορες παθήσεις του αμφιβληστροειδούς. Στο παρόν κεφάλαιο θα επιχειρηθεί μία συνοπτική παρουσίαση των κυριότερων μοντέλων που έχουν αναπτυχθεί για την εκάστοτε αμφιβληστροειδοπάθεια, με έμφαση στα in vivo μοντέλα.

1.5.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ)

Τα περισσότερα in vivo μοντέλα χρησιμοποιούν για την επαγωγή του διαβήτη φαρμακευτικούς παράγοντες, αλλαγές στην δίαιτα ή χημικές βλάβες. Η ΔΑ εμφανίζεται ως μία δευτερεύουσα επίπτωση του διαβήτη και τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούντα για τον σκοπό αυτό, είναι συνήθως τρωκτικά, λόγω του μικρού εύρους χρόνου που χρειάζεται για την επαγωγή του διαβήτη (Malek και συν., 2008). Ένα από τα πιο γνωστά μοντέλα, είναι η χορήγηση στρεπτοζωτοκίνης (STZ), η οποία προκαλεί βλάβη στα β κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία εκκρίνουν την ινσουλίνη (Feit-Leichman και συν., 2005). Μέσα σε δύο εβδομάδες τα ζώα αναπτύσσουν υπεργλυκαιμία και σε βάθος χρόνου, μία πληθώρα συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν την ΔΑ (Feit-Leichman και συν., 2005). Τα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνουν αυξημένο αριθμό αστροκυττάρων και έντονη γλοίωση 4-5 εβδομάδες μετά την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας (Feit-Leichman και συν., 2005), η εκφύλιση και ο θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων στις 6 εβδομάδες, η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων στις 6 εβδομάδες και η σμίκρυνση των στιβάδων INL και ONL στις 10 εβδομάδες μετά την χορήγηση STZ (Martin και συν., 2004). Η χορήγηση αλλοξάνης (Weeraura και συν., 2015), καθώς και η υποβολή των πειραματόζωων σε δίαιτα υψηλή σε γαλακτόζη (Engerman και συν., 1984), αποτελούν άλλες μεθόδους για την επαγωγή του διαβήτη, και μοιράζονται κοινές παθοφυσιολογικές επιπτώσεις με το μοντέλο της STZ.

Τα γενετικά μοντέλα εφαρμόζονται κυρίως σε μύες. Βασίζονται στην πραγματοποίηση μεταλλάξεων σε γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την δομή και την λειτουργία της ινσουλίνης, με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση διαβήτη (Barber και συν., 2005).

Όσον αφορά τα in vitro μοντέλα, σε αυτά χρησιμοποιούνται καλλιέργειες βασικών κυτταρικών τύπων που πλήττονται στον διαβήτη, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα (Fan και συν., 2016), κύτταρα του RPE (Dunn και συν., 1996), γαγγλιακά κύτταρα (Fuchs και συν., 2005) κ.α. Τα κύτταρα αυτά υφίστανται αλλαγές στο περιβάλλον τους, οι οποίες προσομοιάζουν με αυτές που παρατηρούνται στην ΔΑ, όπως είναι η χορήγηση VEGF ή η αύξηση γλυκόζης (Malek και συν., 2018).

1.5.2. Γεροντική εκφύλιση ωχράς κηλίδας (ΓΕΩ)

Η ανάπτυξη in vivo μοντέλων για την ΓΕΩ, είναι μία περίπλοκη διαδικασία, καθ' ότι η ΓΕΩ χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, που εκτείνεται από πολυάριθμους πολυμορφισμούς στο γονιδίωμα μέχρι περιβαλλοντικούς παράγοντες (Malek & Land, 2014). Παρ' όλα αυτά, μοντέλα της ΓΕΩ έχουν αναπτυχθεί σε αρκετούς ζωικούς οργανισμούς και κυρίως στα τρωκτικά, εξαιτίας της σύντομης διάρκειας ζωής τους, γεγονός που τα καθιστά την πρώτη επιλογή για την μελέτη μίας νόσου που σχετίζεται με την γήρανση (Pennesi και συν., 2012).

Τα μοντέλα αυτά αναπαριστούν βασικές πτυχές της νόσου. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της νόσου, είναι η οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται στον αμφιβληστροειδή (Wenzel και συν., 2005). Knock out ποντίκια για την δισμουτάση του υπεροξειδίου, ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού στον αμφιβληστροειδή, παρουσιάζουν κρυσταλοειδείς εναποθέσεις στην στιβάδα του RPE και στην μεμβράνη του Bruch, παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην ΓΕΩ (Imamura και συν., 2006). Η εναπόθεση λιπιδίων και χοληστερόλης στην στιβάδα του RPE, μοντελοποιείται με την υποβολή των πειραματόζωων σε δίαιτα υψηλή σε λιπαρά, γεγονός που αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ΓΕΩ (Cousins και συν., 2002), καθώς και με γενετικούς χειρισμούς του ApoE γονιδίου (Dithmar και συν., 2000). Η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος που παρατηρείται σε ασθενείς με ΓΕΩ, αναπαριστάται στα μοντέλα με την πραγματοποίηση μεταλλάξεων σε δομικά στοιχεία του ανοσοποιητικού, όπως είναι οι χημειοκίνες (Tuo και συν., 2007). Τέλος για τα in vitro μοντέλα της ΓΕΩ, χρησιμοποιούνται κυρίως καλλιέργειες RPE κυττάρων, προερχόμενων από οφθαλμούς ασθενών που απεβίωσαν ή από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα ασθενών, τα οποία εκφράζουν τον παθολογικό φαινότυπο της ΓΕΩ (Malek και συν., 2018).

1.5.3. Γλαύκωμα

Τα μοντέλα του γλαυκώματος στα τρωκτικά χρησιμοποιούν διάφορους τρόπους, προκειμένου να επάγουν την εκφύλιση και τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων (Araujo και συν., 1995). Ένα από τα πιο γνωστά μοντέλα, είναι το μοντέλο της διατομής του οπτικού νεύρου, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την καταστροφή των αξόνων γαγγλιακών κυττάρων και έπειτα ακολουθεί ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων (Yoles & Schwartz,

1998). Το μοντέλο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης προκαλεί εκτεταμένο θάνατο των γαγγλιακών και άλλων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή και προκαλείται από την έμφραξη της κεντρικής αρτηρίας στον αμφιβληστροειδή και στην συνέχεια την διάνοιξή της, επάγοντας υποξικές συνθήκες στον αμφιβληστροειδή (Kroll και συν., 1968). Βασική συνέπεια της ισχαιμίας είναι η διεγερσιτοξικότητα εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων γλουταμινικού, η οποία ευθύνεται για τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς στις περισσότερες αμφιβληστροειδοπάθειες (Osborne και συν., 2004). Προκειμένου να μοντελοποιηθούν αυτές οι κυτταροτοξικές συνθήκες, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα που βασίζονται στην ενδοφθάλμια χορήγηση αγωνιστών των γλουταμινεργικών υποδοχέων, όπως το NMDA (Kapin και συν., 1999) και το AMPA (Kiagiadaki και συν., 2010). Περισσότερα για τα μοντέλα της διεγερσιτοξικότητας θα αναφέρουμε σε επόμενο κεφάλαιο.

1.5.4. Μοντέλα διεγερσιτοξικότητας

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία αποτελεί μία παθολογική κατάσταση, παρούσα στις περισσότερες αμφιβληστροειδοπάθειες (Osborne και συν., 2004). Τα βασικότερα χαρακτηριστικά της είναι η μείωση της παροχής οξυγόνου στον ιστό και η αδυναμία απομάκρυνσης των μεταβολικών προϊόντων (Lipton και συν., 1999). Σαν αποτέλεσμα αυτών διαταράσσεται η ομοιόσταση των ιόντων και η φυσιολογική λειτουργία της μεμβράνης (Lipton και συν., 1999). Μία από τις άμεσες συνέπειες της ισχαιμίας είναι η διεγερσιτοξικότητα του γλουταμινικού, η οποία ευθύνεται για τον θάνατο των κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (Joo και συν., 1999).

Σε συνθήκες διεγερσιτοξικότητας, ο κυτταρικός θάνατος πυροδοτείται από την υπερενεργοποίηση των υποδοχέων των διεγερτικών αμινοξέων (NMDA, AMPA, καϊνικό οξύ), από υψηλές συγκεντρώσεις εξωκυττάριου γλουταμινικού (Choi, 1992). Η αρχική ενεργοποίηση των ιοντοτροπικών, μη NMDA υποδοχέων του γλουταμινικού (AMPA και καϊνικού), οδηγεί σε αύξηση της εισροής ιόντων νατρίου στο κύτταρο εκπολώνοντας την μεμβράνη. Ακολούθως η μεμβρανική εκπόλωση προκαλεί την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων, από τους οποίους το μαγνήσιο, απομακρύνεται από τον πόρο του διαύλου και επιτρέπει σε ιόντα ασβεστίου να εισέλθουν στο κύτταρο (Sattler & Tymianski,2001). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ασβεστίου στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολική αποδιοργάνωση του κυττάρου, ενεργοποιώντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, το οποίο σε συνάρτηση με τις αυξημένες συγκεντρώσεις του ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, οδηγεί στον θάνατο του κυττάρου μέσω απόπτωσης (Van der Stelt και συν., 2002). Από την άλλη πλευρά, εκτός από τον ασβεστιοεξαρτώμενο αποπτωτικό θάνατο, τα κύτταρα σε καταστάσεις διεγερσιτοξικότητας μπορεί να πεθάνουν εξαιτίας της υπερβολικής

εισροής ιόντων νατρίου, γεγονός που διαταράσσει την ωσμωτική ισορροπία και οδηγεί σε σχάση του κυττάρου (Sattler & Tymianski, 2001). Το δεύτερο αυτό είδος θανάτου παρατηρείται στα πρώτα στάδια της διεγερσιτοξικότητας και έπειτα ακολουθεί ο αποπτωτικός θάνατος (Van der Stelt και συν., 2002).

Προκειμένου να εξετάσουν τους ακριβείς μηχανισμούς που ευθύνονται για την εμφάνιση διεγερσιτοξικότητας, αλλά και να ελέγξουν της επιδράσεις της στον αμφβληστροειδή, οι ερευνητές έχουν αναπτύξει διάφορα πειραματικά μοντέλα. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στις ενδοφθάλμιες εγχύσεις αναλόγων του γλουταμινικού, όπως το NMDA και το AMPA και μιμούνται τις επιδράσεις της διεγερσιτοξικότητας που παρατηρούνται στον άνθρωπο (Goldblum και συν., 2002).

Η ενδοφθάλμια χορήγηση NMDA στα περισσότερα σπονδυλωτά, έχει ως αποτέλεσμα την δοσοεξαρτώμενη εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων, καθώς και την μείωση του πάχους της στιβάδας INL, όπου εντοπίζονται τα δίπολα, τα οριζόντια και τα βραχύινα κύτταρα (Lam και συν., 1999· Siliprandi και συν., 2009). Ωστόσο , ενώ η πλειοψηφία των in vivo μελετών αναδεικνύει εκτεταμένο θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων μετά την εφαρμογή του NMDA (Lam και συν., 1999· Kwong & Lam, 2000· Chiu και συν., 2005), ορισμένες in vitro μελέτες δεν παρατηρούν θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην διαφορετική φύση των πειραμάτων (Ullian και συν., 2004). Η απώλεια των γαγγλιακών και άλλων κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς οφείλεται σε αποπτωτικούς κυρίως μηχανισμούς, όπως φαίνεται από το κατακερματισμένο DNA στο εσωτερικό των πυρήνων και από την αυξημένη ενεργοποίηση των κασπασών (Lam και συν., 1999), δύο βασικών χαρακτηριστικών του αποπτωτικού θανάτου. Τέλος, η χορήγηση ανταγωνιστών του γλουταμινικού εμποδίζει την επαγόμενη από το NMDA διεγερσιτοξικότητα και κατ' επέκταση τον κυτταρικό θάνατο (Mosinger και συν., 1991).

Εκτός από το NMDA για την πρόκληση διεγερσιτοξικότητας, στον αμφιβληστροειδή έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον ίδιο σκοπό και το AMPA. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου κατόρθωσαν να αναπτύξουν ένα in vivo μοντέλο διεγερσιτοξικότητας, προκαλούμενης από την ενδοφθάλμια χορήγησης AMPA, σε επίμυες (Kiagiadaki & Thermos, 2008). Η έγχυση AMPA έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο των χολινεργικών βραχύινων κυττάρων και των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν bNOS (Kiagiadaki & Thermos, 2008· Kokona και συν., 2015). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι επηρρεάζει και έναν άλλο πληθυσμό κυττάρων στην στιβάδα INL, τα GABAεργικά οριζόντια και βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν calbindin (Kokona και συν., 2012). Ωστόσο δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στους φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα, κάτι που πιθανότατα οφείλεται στην διαφορετική κατανομή των υπότυπων του AMPA υποδοχέα στον

αμφιβληστροειδή (Zhang & Diamond, 2006). Αναλυτικότερα η υπομονάδα GluR2, μία από τις τέσσερις υπομονάδες που συνθέτουν τον AMPA υποδοχέα, όταν απουσιάζει από αυτόν τον καθιστά περισσότερο διαπερατό σε ιόντα ασβεστίου και κατ' επέκταση τα κύτταρα που τον εκφράζουν γίνονται περισσότερο ευάλωτα στα επιδράσεις της διεγερσιτοξικότητας (Dellegrini-Giamperto και συν., 1997). Η παρουσία λοιπόν στα γαγγλιακά κύτταρα περισσότερων AMPA υποδοχέων, οι οποίοι διαθέτουν την GluR2 υπομονάδα, θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή εξήγηση για την αδυναμία του AMPA να προκαλέσει τον θάνατο αυτών των κυττάρων. Τέλος ανάλογα αποτελέσματα για τις επιδράσεις του AMPA στη βιωσιμότητα των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, λαμβάνουμε και από παλαιότερες μελέτες, σε πειραματόζωα όπως είναι τα κοτόπουλα (Morgan, 1987· Ferreira και συν., 1998).

1.6. Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών

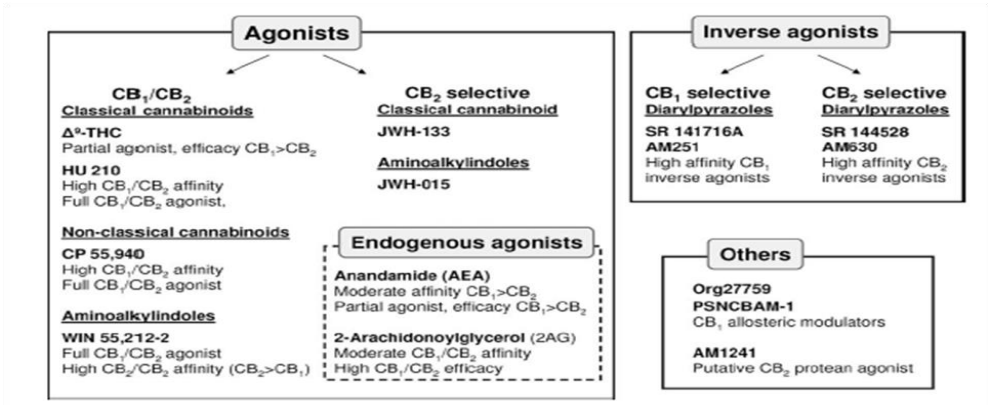
Το βασικό ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης, η Δ9-THC (ή THC) αναγνωρίστηκε τη δεκαετία του 1960 από τους Gaoni και Mechoulam (1964). Οι βιολογικές δράσεις της THC διαμεσολαβούνται μέσω κυρίως δύο υποδοχέων, τους CB1 και τους CB2 (Howlett και συν., 2002). Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs) και ενεργοποιούν ετεροτριμερή συμπλέγματα, ευαίσθητων στην τοξίνη του κοκκίτη G πρωτεινών, που ανήκουν στην οικογένεια των $G_{i/o}$ (Howlett και συν., 2002). Οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο ΚΝΣ (Howlett και συν., 2002), ενώ οι CB2 υποδοχείς εκφράζονται κατά κύριο λόγο στο ανοσοποιητικό σύστημα και σε μικρότερο βαθμό στο ΚΝΣ (Van Sickle και συν., 2005· Cabral και συν., 2008).

Την αναγνώριση των CB1 και CB2 υποδοχέων, ακολούθησε η ανακάλυψη των ενδογενών προσδετών γι' αυτούς τους υποδοχείς, της ανανδαμίδης (AEA) (Devane και συν., 1988) και της 2-αραχιδονουλγλυκερόλης (2-AG) (Mechoulam και συν., 1995), οι οποίες αποτελούν τους κυριότερους εκπροσώπους των ενδογενών κανναβινοειδών. Τα ενδοκανναβινοειδή ανήκουν στην οικογένεια των εικοσανοειδών, η οποία περιλαμβάνει ενώσεις που είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος (Howlett, 2002). Η AEA προσδένεται με υψηλότερη συγγένεια και αποτελεσματικότητα στον CB1 υποδοχέα σε σύγκριση με τον CB2 και μοιάζει αρκετά με την Δ9-THC, ως προς το γεγονός ότι συμπεριφέρεται ως μερικός αγωνιστής και στους δύο υποδοχείς (Pertwee, 2010). Η 2-AG από την άλλη, προσδένεται με παρόμοια συγγένεια κα στους δύο υποδοχείς, ενώ διαθέτει μεγαλύτερη συγγένεια γι' αυτούς σε σχέση με την AEA (Pertwee, 2010).

Εκτός από τους CB1 και τους CB2 υποδοχείς, τα ενδοκανναβινοειδή και γενοκότερα τα κανναβινοειδή μπορούν να ενεργοποιήσουν και άλλους υποδοχείς. Οι δίαυλοι ασβεστίου TRPV1 (transient receptor potential vanilloid channel 1), ο οποίος ενεργοποιείται από την καψαϊκίνη, αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα (Di Marzo και συν., 1998). Η παρατήρηση ότι η

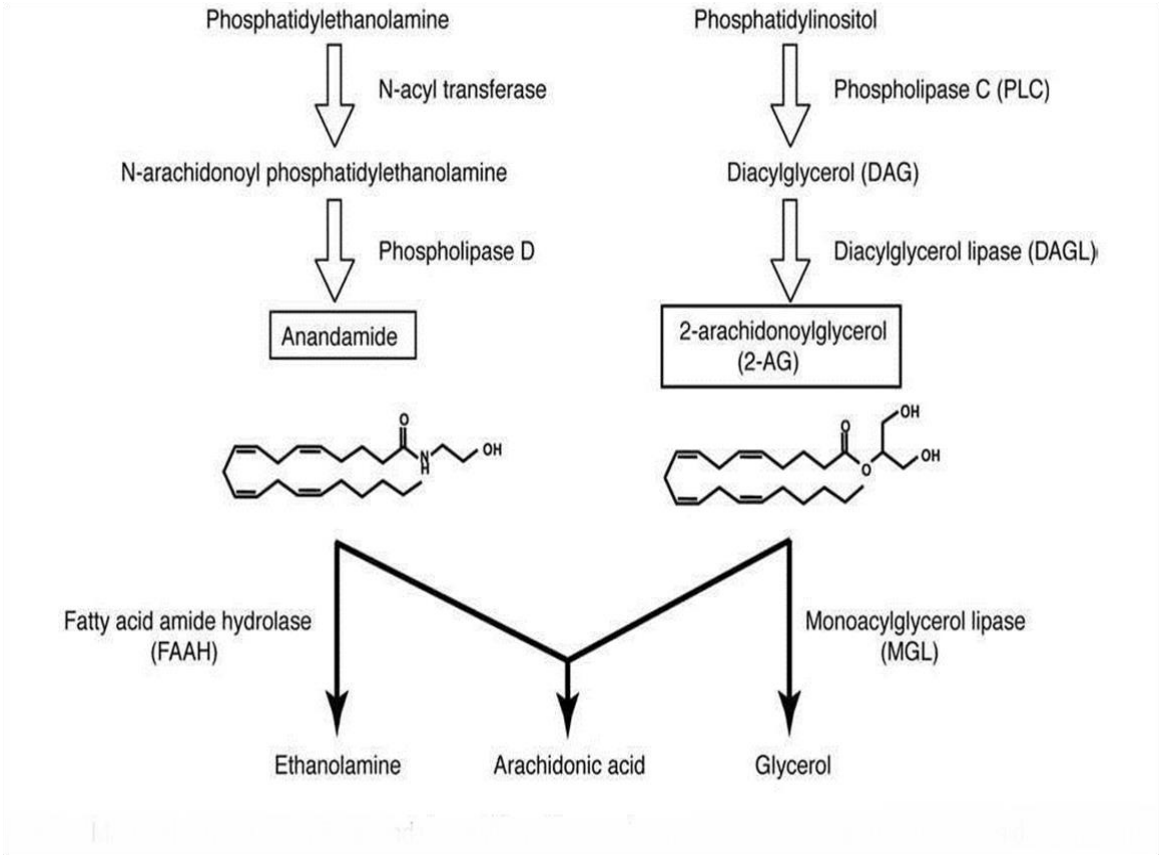
καψαϊκίνη εμφανίζει αρκετές χημικές ομοιότητες με την AEA, οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η AEA μπορεί να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς TRPV1 με ελαφρώς χαμηλότερη αποτελεσματικότητα από την καψαϊκίνη (Di Marzo και συν., 1998). Ωστόσο η 2-AG δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσει αυτόν τον υποδοχέα (Di Marzo και συν., 1998). Η AEA και η 2-AG ενεργοποιούν και τον ορφανό υποδοχέα GPR55 (Ryberg και συν., 2009). Επίσης ο GPR55, ενεργοποιείται από μία πληθώρα αγωνιστών των κανναβινοειδών, όπως η Δ9-THC, το HU-210, η μεθανανδαμίδη (methAEA), το WIN55,212-2 κ.α (Ryberg και συν., 2009).

Πέρα από τα δύο ενδογενή κανναβινοειδή, έχουν αναπτυχθεί και αρκετά συνθετικά κανναβινοειδή, Στα κλασσικά κανναβινοειδή ανήκουν η Δ9-THC, η Δ8-THC και το HU-210, το οποίο είναι ένα συνθετικό παράγωγο της Δ8-THC (Pertwee, 2010). Το HU-210 διαθέτει υψηλή συγγένεια για τους CB1 και τους CB2 υποδοχείς, υψηλότερη από την αντίστοιχη της Δ9-THC (Pertwee, 2010). Η ομάδα των μη κλασσικών κανναβινοειδών περιλαμβάνει δικυκλικά και τρικυκλικά ανάλογα της Δ9-THC, τα οποία μοιάζουν αρκετά με τα κλασσικά κανναβινοειδή (Pertwee, 2010). Το κυριότερο μέλος αυτής της ομάδας είναι το κανναβινοειδές CP55,940, το οποίο διαθέτει χαμηλότερη συγγένεια για τους CB1 και τους CB2 υποδοχείς από το HU-210, αλλά παρόμοια αποτελεσματικότητα με αυτό (Gatley και συν., 1997). Οι αμινοαλκιλυνδόλες αποτελούν την Τρίτη ομάδα συνθετικών κανναβινοειδών, η οποία παρουσιάζει εντελώς διαφορετική μορφολογία από τα κλασσικά και τα μη κλασσικά κανναβινοειδή (Pertwee, 2010). Ο πιο γνωστός εκπρόσωπος αυτής της ομάδας είναι το συνθετικό κανναβινοειδές WIN55,212-2, το οποίο παρουσιάζει παρόμοια αποτελεσματικότητα με το CP55,940 και το HU-210 για τους CB1 υποδοχείς (Pertwee, 1997). Ωστόσο σε αντίθεση με αυτά τα κανναβινοειδή, το WIN55,212-2 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τους CB2 υποδοχείς απ' ότι για τους CB1 (Pertwee, 1997). Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι προσδένεται με διαφορετικό τρόπο στον CB1 υποδοχέα σε σχέση με τα υπόλοιπα κανναβινοειδή (Howlett και συν., 2002).



Εικόνα 3. Κατηγορίες αγωνιστών των CB1 και CB2 υποδοχέων (λήφθηκε από Bosier και συν., 2010).

Τα δύο βασικότερα ενδογενή κανναβινοειδή, η AEA και η 2-AG, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους νευροδιαβιβαστές δεν αποθηκεύονται σε συναπτικά κυστίδια, αλλά παράγονται μόνο όταν είναι απαραίτητα από πρόδρομα λιπίδια της μεμβράνης (Ligresti και συν., 2005). Για την AEA έχουν αναγνωριστεί ποικίλα βιοσυνθετικά μονοπάτια (για ανσκόπηση βλ. Liu και συν., 2008). Το πιο γνωστό από αυτά περιλαμβάνει το ένζυμο NAPE-PLD (Di Marzo και συν., 1994). Αναλυτικότερα το πρόδρομο φωσφολιπίδιο N-αραχιδονουλ-φωσφατιδυλ-εθανολαμίνη (N-arachidonoyl-phosphatidyl-ethanolamine, NAPE) υδρολύεται από την φωσφολιπάση D (PLD) και παράγεται AEA και φωσφατιδικό οξύ (Di Marzo και συν., 1994). Βέβαια αν και η NAPE-PLD αποτελεί την κυριότερη βιοσυνθετική οδό της AEA, έχει προταθεί ότι για την κατ' αίτημα παραγωγή της υπεύθυνη είναι η βιοσυνθετική οδός που περιλαμβάνει το ένζυμο NAPE-PLC (Simon & Gravatt, 2010). Η NAPE υδρολύεται από την φωσφολιπάση C (PLC) και παράγεται φωσφο-AEA, η οποία αποφωσφορυλιώνεται στην συνέχεια από φωσφατάσες και προκύπτει AEA (Simon & Gravatt, 2010). Όσον αφορά την 2-AG, το κύριο βιοσυνθετικό μονοπάτι της περιλαμβάνει υδρόλυση της διακυλογλυκερόλης (DAG), από δύο λιπάσες της DAG, την DAGLα και την DAGLβ (Bisogno και συν., 2005).



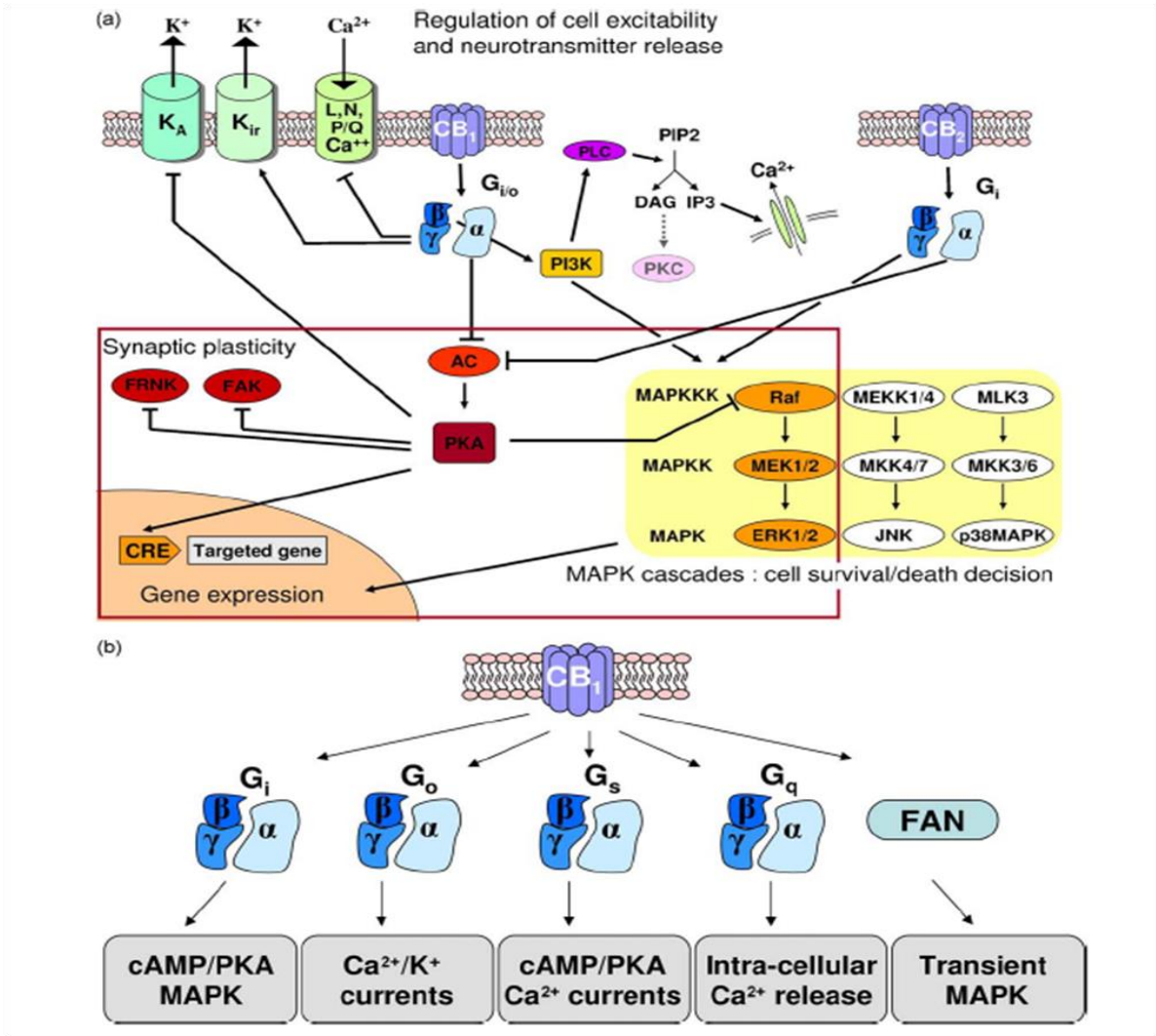
Εικόνα 4. Τα κυριότερα βιοσυνθετικά και καταβολικά μονοπάτια για την AEA και την 2-AG (λήφθηκε από http://go.galegroup.com/)

Για τον τερματισμό της δράσης της AEA και της 2-AG φροντίζουν διάφορα καταβολικά ένζυμα. Η βιολογική δραστηριότητα της AEA τερματίζεται μέσω της απομάκρυνσής της από τον εξωκυττάριο χώρο και της μεταφοράς της ενδοκυττάρια, μέσω ενός μεταφορέα ή απλώς μέσω διάχυσης (Piomelli και συν., 1999). Μετά την επαναπρόσληψή της από το κύτταρο, η AEA μεταβολίζεται από το ένζυμο αμιδο-υδρολάση των λιπαρών οξέων (fatty acid amide hydrolase, FAAH) σε αραχιδονικό οξύ και εθανολαμίνη (McKinney & Cravath, 2005). Η FAAH είναι επίσης σε θέση να διασπάσει την 2-AG, απελευθερώνοντας αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη, αλλά κατά κύριο λόγο η 2-AG αποδομείται από την λιπάση της μοναακυλογλυκερόλης (MAGL) (Dihn και συν., 2002). Εκτός από την MAGL, η 2-AG μπορεί να αποδομηθεί και από δύο υδρολάσες που ανήκουν στην οικογένεια ABHD (alpha/beta domain containing hydrolases), την ABHD6 και την ABHD12 (Blankman και συν., 2007). Τέλος, ένα άλλο ένζυμο που συμμετέχει στον μεταβολισμό τόσο της AEA, όσο και της 2-AG, είναι η κυκλοοξυγεναση 2 (COX-2) (Kozak και συν., 2004).

Όπως αναφέραμε προηγουμένως, οι CB1 και CB2 υποδοχείς ανήκουν στους GPCRs, οι οποίοι διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές α έλικες, ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο (Matsuda και συν., 1990). Μετά την ενεργοποίησή τους από κάποιον αγωνιστή, οι υποδοχείς ενεργοποιούν G_i ή G_o πρωτεΐνες, οι οποίες αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση, μειώνοντας την παραγωγή κυκλικού AMP (cAMP), που δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος (Howlett και συν., 1986). Από την άλλη πλευρά, οι CB1 αλλά όχι οι CB2 υποδοχείς, μπορούν να ενεργοποιήσουν την αδενυλική κυκλάση μέσω G_s πρωτεϊνών, όταν οι $G_{i/o}$ πρωτεΐνες μπλοκάρονται από την τοξίνη του κοκίτη (Glass & Felder, 1997). Παράλληλα η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων μπορεί να αναστείλει τασεοελεγχόμενους διαύλους ασβεστίου τύπου N και P/Q (Twitchell και συν., 1997), διαύλους νατρίου (Nicholson και συν., 2003) και να διεγείρει διαύλους ανορθωτές καλίου (GIRKs) (Vasquez και συν., 2003) μέσω $G_{i/o}$ πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που παίζουν οι CB1 υποδοχείς στην προστασία του κυττάρου από την υπερδιεγερσιμότητα, καθώς και στην επαναπόλωσή του.

Οι CB1 και CB2 υποδοχείς είναι επίσης υπεύθυνοι και για την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, αποτελούμενα από διάφορες κινάσες, οι οποίες ρυθμίζουν σημαντικές αποκρίσεις του κυττάρου. Αγωνιστές των CB1 και CB2 υποδοχέων ενεργοποιούν την κινάση MAPK μέσω της επιστράτευσης της κινάσης PI3K, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την raf-1 (Bouaboula και συν., 1995). Παράλληλα τα κανναβινοειδή μέσω της PI3K, μπορούν να ενεργοποιήσουν τις κινάσες JNK1 και JNK2, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τροποποιώντας σημαντικές κυτταρικές

λειτουργίες, όπως είναι η επιβίωση και η διαφοροποίηση του κυττάρου (Bouaboula και συν., 1996). Μία άλλη σημαντική λειτουργία των CB1 υποδοχέων είναι η ενεργοποίηση της PLC, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) και την κινητοποίηση ασβεστίου από τις ενδοκυττάριες αποθήκες, μία επίδραση, που καταργείται από την χορήγηση αναστολέων της PLC (Netzeband και συν., 1999). Τέλος ένα άλλο σημαντικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τα κανναβινοειδή, κυρίως μέσω του CB2 υποδοχέα, είναι αυτό της σύνθεσης κεραμίδιου, το οποίο φαίνεται να συμμετέχει στις νευροτοξικές δράσεις των κανναβινοειδών (Galve-Roperh και συν., 2000). Έχει δειχθεί ότι η μακροχρόνια χορήγηση κεραμίδιου, ενεργοποιεί την raf-1, η οποία με την σειρά της οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση της p42/p44 MAPK κινάσης, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο απόπτωση σε γλοιακά κύτταρα (Galve-Roperh και συν., 2000).



Εικόνα 5. Λειτουργίες των CB1 και CB2 υποδοχέων (λήφθηκε από Bosier και συν., 2010).

Ο νευρορυθμιστικός ρόλος του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών φαίνεται και από το γεγονός ότι είναι σε θέση να ρυθμίζει την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών (Schlicker και συν., 2001). Η προσυναπτική εντόπιση των CB1 υποδοχέων στους περισσότερους νευρώνες (Kawamura και συν., 2006), τους καθιστά ικανούς να μειώνουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμινικό (Gerdeman & Lovinger, 2001), το GABA (Katona και συν., 1999) και η ντοπαμίνη (Hungung και συν., 2003). Εξάλλου είναι γνωστό ότι τα ενδογενή κανναβινοειδή δρουν ως ανάδρομοι αγγελιοφόροι (Wilson & Nicoll, 2001). Μετά την απελευθέρωσή τους από το μετασυναπτικό κύτταρο, ενεργοποιούν CB1 υποδοχείς στο προσυναπτικό κύτταρο, ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών (Schlicker και συν., 2001). Παρόμοιος φαίνεται πως είναι και ο μηχανισμός ενεργοποίησης των CB2 υποδοχέων στα γλοιακά κύτταρα (Stella, 2009). Πέρα από την προσυναπτική τους εντόπιση, οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται και σε μετασυναπτικό επίπεδο και είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση της διεγερσιμότητας των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου (Hajos και συν., 2001). Οι νευρορυθμιστικές δράσεις των κανναβινοειδών δεν διαμεσολαβούνται μόνο μέσω των CB1 ή των CB2 υποδοχέων. Για παράδειγμα η AEA, δρώντας μέσω μετασυναπτικών TRPV1 υποδοχέων, μειώνει την απελευθέρωση γλουταμινικού και προκαλεί LTD, μέσω της ενδοκυττάρωσης που προκαλεί στους AMPA υποδοχείς, ενώ μέσω προσυναπτικών TRPV1 υποδοχέων αυξάνει την απελευθέρωση γλουταμινικού (Grueter και συν., 2010).

Ανακεφαλαιώνοντας, γίνεται κατανοητό ότι το ενδοκανναβινοειδές σύστημα είναι ένα νευρορυθμιστικό σύστημα, ο ρόλος του οποίου είναι κρίσιμος για αρκετές λειτουργίες του κυττάρου. Η μελέτη και η κατανόηση της λειτουργίας αυτού του συστήματος, θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για διάφορες παθολογικές καταστάσεις ή να βελτιώσει τις ήδη υπάρχουσες.

1.6.1. Υποδοχείς κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των μελετών έχει επικεντρωθεί στο ρόλο του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών στον οφθαλμό. Η αρχή πραγματοποιήθηκε μέσα από την παρατήρηση των επιδράσεων που έχει το κάπνισμα της κάνναβης στην όραση, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν αλλαγές στην διάκριση των χρωμάτων και αύξηση της ευαισθησίας στο φως (Dawson και συν., 1977). Μεταγενέστερες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ενός συστήματος ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή (Chen και συν., 2005· Porcella και συν., 2001). Εξάλλου η παρουσία ενός συστήματος ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή είναι απολύτως λογικό, ιδιαίτερα εάν σκεφτεί κανείς ότι αποτελεί ανατομική προέκταση του εγκεφάλου, παρουσιάζοντας παρόμοια φυσιολογία και κυτταρική οργάνωση με αυτόν.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει την ύπαρξη CB1 υποδοχέων στους αμφιβληστροειδείς αρκετών ειδών, όπως η σαλαμάνδρα, το χρυσόψαρο, ο μυς, ο επίμυς, ο πίθηκος και το κοτόπουλο (Straiker και συν., 1999· Yazulla και συν., 1999). Αναλυτικότερα, η ανοσοδραστικότητα για τον CB1 υποδοχέα εντοπίστηκε στις δύο συναπτικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς (OPL και IPL) και των έξι ειδών (Straiker και συν., 1999). Επίσης, σε όλα τα είδη εκτός του χρυσόψαρου, ο ανοσοφθορισμός ήταν έντονος σε ορισμένους πληθυσμούς οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων, ιδίως αυτών που εξέφραζαν GABA, καθώς και στα γαγγλιακά κύτταρα και τους άξονές τους (Straiker και συν., 1999). Τέλος, λιγότερο έντονος φθορισμός υπήρχε στα εσωτερικά και εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων του πιθήκου, του μυός, του επίμυος και του κοτόπουλου (Straiker και συν., 1999). Από την άλλη πλευρά, στον αμφιβληστροειδή του χρυσόψαρου οι CB1 υποδοχείς εντοπίστηκαν στους φωτοϋποδοχείς, στα δίπολα και στα βραχύινα κύτταρα, είτε ενδοκυτταρικά, είτε στην πλασματική μεμβράνη (Yazulla και συν., 2000).

Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις σε μεταθανάτιο υλικό, προερχόμενο από ανθρώπους, υποδεικνύουν την ύπαρξη μέτριου φθορισμού στις δύο συναπτικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, μετά την εφαρμογή αντισώματος έναντι του CB1 υποδοχέα (Straiker και συν., 1999). Μέτρια χρώση παρατηρήθηκε στις στιβάδες INL και GCL, ενώ η χρώση ήταν εντονότερη στο εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων (Straiker και συν., 1999· Porcella και συ., 2000). Ακόμη, μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη CB1 υποδοχέων στα κύτταρα του RPE, σε ιστούς ανθρώπου (Wei και συν., 2009).

Σε αντίθεση με τον CB1 υποδοχέα, η έκφραση του CB2 στον αμφιβληστροειδή, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, πιθανώς εξαιτίας των μεθοδολογικών ζητημάτων που προκύπτουν, όπως η ειδικότητα του αντισώματος έναντι του CB2 υποδοχέα (Cecyre και συν., 2014). Αρχικές μελέτες απέτυχαν να εντοπίσουν τους CB2 υποδοχείς στον αμφιβληστροειδή επίμυων (Buckley και συν., 1998). Ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη CB2 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες με την χρήση in situ υβριδοποίησης, εντόπισαν το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) των CB2 υποδοχέων στην GCL, στην INL και στο εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων (Lu και συν., 2000). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε πρωτεϊνικό επίπεδο από μεταγενέστερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες, οι οποίες εντόπισαν τον φθορισμό των CB2 υποδοχέων στις προαναφερθείσες περιοχές, όπως επίσης και στην στιβάδα RPE και σε ορισμένους άξονες στην IPL (Lopez και συν., 2010). Ανάλογη τοπογραφική οργάνωση φαίνεται πως παρουσιάζουν οι CB2 υποδοχείς και στον αμφιβληστροειδή των μυών, όπως φάνηκε από την μελέτη των Cecyre και συν., (2013). Από την άλλη πλευρά, στον αμφιβληστροειδή των πρωτευόντων, η παρουσία των CB2 υποδοχέων περιορίζεται μόνο στα κύτταρα του Muller,

στα γλοιακά δηλαδή κύτταρα, ενώ φαίνεται να απουσιάζει πλήρως από το νευρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς (Bouskila και συν., 2013). Τέλος, στον αμφιβληστροειδή του ανθρώπου οι CB2 υποδοχείς εκφράζονται κατά κύριο λόγο στα κύτταρα του RPE (Wei και συν., 1999).

Εκτός από τους CB1 και CB2 υποδοχείς, το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών περιλαμβάνει δύο ακόμη υποδοχείς, τον υποδοχέα transient receptor potential cation channel subfamily V member 1(TRPV1), έναν ιοντοτροπικό υποδοχέα που ελέγχει ένα διάυλο ασβεστίου (Zygmunt και συν., 1999) και τον ορφανό υποδοχέα GPR55 (Ryberg και συν., 2009). Όσον αφορά τον υποδοχέα TRPV1, εντοπίστηκε για πρώτη φορά στις συναπτικές απολήξεις των φωτοϋποδοχέων και σε βραχύινα κύτταρα χρυσόψαρου και zebrafish (Zimov & Yazulla, 2004). Στον αμφιβληστροειδή επίμυων, ο TRPV1 υποδοχέας εντοπίστηκε σε αστροκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα, σε αιμοφόρα αγγεία, καθώς και σε νευρωνικούς πληθυσμούς στην INL και την GCL (Leonelli και συν., 2009). Παράλληλα το mRNA των TRPV1 υποδοχέων έχει εντοπιστεί και σε κύτταρα του Muller σε επίμυες (Sappington και συν., 2009). Τέλος οι Martinez-Garcia και συν., (2013), εξετάζοντας την έκφραση του TRPV1 σε αμφιβληστροειδείς ανθρώπων και κουνελιών, παρατήρησαν κοινό μοτίβο εντόπισης του υποδοχέα στα κύτταρα του RPE, ενώ στα κουνέλια ο TRPV1 ήταν παρών στις στιβάδες ONL και INL και στα κύτταρα του Muller. Τέλος οι Bouskila και συν., (2013), αναφέρουν στην μελέτη τους την παρουσία του GPR55, κατά κύριο λόγο στο εσωτερικό τμήμα των ραβδίων και σε πολύ μικρότερο βαθμό στον υπόλοιπο αμφιβληστροειδή πιθήκων.

1.6.2. Ενδογενή κανναβινοειδή στον αμφιβληστροειδή

Η ύπαρξη CB1 και CB2 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή, δε θα σήμαινε τίποτα χωρίς την ύπαρξη ενδογενών προσδετών για να τους ενεργοποιήσουν. Η AEA και η 2-AG είναι παρούσες στον αμφιβληστροειδή των τρωκτικών (Straiker και συν., 1999), των βοοειδών (Bisogno και συν., 1999) και των ανθρώπων (Chen και συν., 2005). Μάλιστα η πλειοψηφία των μελετών οδηγείται στο συμπέρασμα, ότι τα επίπεδα της 2-AG είναι αρκετά υψηλότερα από αυτά της AEA, γεγονός που εξηγεί την δυσκολία ορισμένων μελετών στην ανίχνευση των επιπέδων της AEA (Straiker και συν., 1999). Εκτός από την AEA και την 2-AG, παρόντα στον αμφιβληστροειδή είναι και δύο άλλα ενδογενή κανναβινοειδή, η παλμιτυλεθανολαμίδη (PEA) και η ολευλεθανολαμίδη (OEA) (Straiker και συν., 1999). Η PEA έχει ανιχνευτεί στον αμφιβληστροειδή επίμυος και ανθρώπου (Straiker και συν., 1999), ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρουσία της OEA στον αμφιβληστροειδή των επίμυων (Straiker και συν., 1999), ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς ότι πρόκειται για αγωνιστή των CB2 υποδοχέων (Caligano και συν., 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει στο σημείο αυτό, το γεγονός ότι τα ενδογενή κανναβινοειδή παρουσιάζουν διαφορετική εντόπιση στους ιστούς του οφθαλμού, αφού η 2-AG είναι αυτή που εκφράζεται κατά κύριο λόγο στον

αμφιβληστροειδή του ανθρώπου, ενώ η AEA και η PEA εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στην ίριδα (Chen και συν., 2005).

Ο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζουν τα ενδογενή κανναβινοειδή στην διατήρηση της ομοιόστασης και κατ' επέκταση της υγείας του αμφιβληστροειδούς, φαίνεται από το γεγονός ότι τα επίπεδά τους παρουσιάζουν αυξομειώσεις σε διάφορες αμφιβληστροειδοπάθειες (Chen και συν., 2005). Τα επίπεδα της 2-AG για παράδειγμα, μειώνονται στο ακτινωτό σώμα ασθενών με γλαύκωμα (Chen και συν., 2005), αλλά αντιθέτως παρουσιάζουν αύξηση στην ίριδα ασθενών με ΔΑ (Matias και συν., 2006). Οι ερευνητές προτείνουν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των ενδοκανναβινοειδών, αποτελούν αντισταθμιστικές προσπάθειες του οργανισμού να μειώσει τον κυτταρικό θάνατο (Matias και συν., 2006), γεγονός που ενισχύεται αν αναλογιστεί κανείς τις νευροπροστατευτικές (Kokona και συν., 2015) και αντιφλεγμονώδεις δράσεις των ενδογενών κανναβινοειδών (Krishnan & Chatterjee, 2012).

1.6.3. Βιοσυνθετικά και αποδομητικά ένζυμα των ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή

Αρκετές μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη των καταβολικών ενζύμων των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή. Η FAAH, το ένζυμο μεταβολισμού της AEA, έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή μυών (Hu και συν., 2010), επίμυων (Yazulla και συν., 1999) και πρωτευόντων (Bouskila και συν., 2012). Στους επίμυες η ανοσοδραστικότητα της FAAH είναι πιο έντονη στους πληθυσμούς των μεγάλων γαγγλιακών κυττάρων (Yazulla και συν., 1999). Πιο αδύναμος φθορισμός παρατηρήθηκε στα κυτταρικά σώματα των οριζόντιων κυττάρων και των ντοπαμινεργικών βραχύινων, καθώς και στους δενδρίτες των χολινεργικών βραχύινων κυττάρων (Yazulla και συν., 1999). Μεταγενέστερες μελέτες, οι οποίες εξέτασαν την έκφραση της FAAH σε επίμυες κατά την μεταγεννητική περίοδο, επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα ευρήματα (Zabouri και συν., 2011). Παράλληλα φάνηκε, ότι στην πορεία της ανάπτυξης η FAAH εντοπίστηκε επίσης στα κωνία και στα δίπολα κύτταρα, με την ανακατανομή αυτή του ενζύμου κατά την μεταγεννητική περίοδο, να υποδηλώνει τον κρίσιμο ρόλο του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών σε διεργασίες ανάπτυξης (Zabouri και συν., 2011). Όσον αφορά τα πρωτεύοντα, η FAAH εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στους φωτοϋποδοχείς, στα δίπολα και στα γαγγλιακά κύτταρα (Bouskila και συν., 2012).

Η MAGL, το μεταβολικό ένζυμο της 2-AG, εντοπίστηκε πρώτη φορά στον αμφιβληστροειδή μυών (Hu και συν., 2010). Αναλυτικότερα η ανοσοδραστικότητα της MAGL, εντοπίστηκε στις δύο συναπτικές στιβάδες (OPL και IPL), καθώς και στην GCL. Στην OPL, η πιο έντονη χρώση παρατηρήθηκε στις τελικές απολήξεις των φωτοϋποδοχέων (Hu και συν., 2010). Σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη οι Cecyre και συν., (2014), εξέτασαν την

έκφραση της MAGL στον αμφιβληστροειδή επίμυων, από την μεταγεννητική ημέρα 1 έως την ενηλικίωσή τους. Σε αντίθεση με την DAGLα, το βιοσυνθετικό ένζυμο της 2-AG που ήταν παρούσα στους περισσότερους πληθυσμούς κυττάρων, η MAGL εμφανίστηκε στα κύτταρα του Muller κατά την μεταγεννητική ημέρα 11 και στις απολήξεις των OFF κωνιοφόρων δίπολων κυττάρων τύπου 2 και αυτό το πρότυπο έκφρασης παρέμεινε ίδιο και κατά την ενηλικίωση των ζώων (Cecyre και συν., 2014). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία ακόμη απόδειξη της εμπλοκής του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών στην ρύθμιση της λειτουργικής και δομικής ωρίμανσης του αμφιβληστροειδούς. Πέρα από την MAGL στον αμφιβληστροειδή μυών έχει αναφερθεί και η παρουσία της ABHD6, της υδρολάσης που είναι υπεύθυνη για τον μεταβολισμό της 2-AG, η οποία εντοπίζεται σε GABAεργικά βραχύινα κύτταρα, σε γαγγλιακά κύτταρα και στους δενδρίτες τους (Hu και συν., 2010).

Παρόντα στον αμφιβληστροειδή είναι και τα βιοσυνθετικά ένζυμα των ενδογενών κανναβινοειδών. Η NAPE-PLD, το κυριότερο βιοσυνθετικό ένζυμο της AEA, φαίνεται πως εκφράζεται στον αμφιβληστροειδή επίμυων, ήδη από τα πρώτα στάδια της μεταγεννητικής περιόδου (Zabouri και συν., 2011). Όσον αφορά την DAGLα, το βιοσυνθετικό ένζυμο της 2-AG, στον αμφιβληστροειδή μυών εκφράζεται στις δύο συναπτικές στιβάδες, όπου συνεντοπίζεται με την MAGL (Hu και συν., 2010). Αναλυτικότερα η ανοσοδραστικότητα της DAGLα εντοπίζεται στις απολήξεις των OFF κωνιοφόρων δίπολων κυττάρων τύπου 1, καθώς και στους δενδρίτες μη αναγνωρισμένων δίπολων κυττάρων (Hu και συν., 2010). Στον αμφιβληστροειδή επίμυων, η DAGLα εκφράζεται στους φωτοϋποδοχείς, στις αποφυάδες των οριζόντιων κυττάρων, δε ορισμένα κωνιοφόρα δίπολα κύτταρα και στα γαγγλιακά κύτταρα, από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης (Cecyre και συν., 2014).

1.6.4. Λειτουργίες του συστήματος ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή

Όπως στον εγκέφαλο έτσι και στον αμφιβληστροειδή, το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νευροδιαβίβασης, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης διαύλων ιόντων και της ενζυματικής δραστηριότητας εκεί (Schwitzer και συν., 2015).

Μελέτες έχουν αναδείξει την ύπαρξη διαύλων νατρίου, καλίου, ασβεστίου και χλωρίου σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς, όπως οι φωτοϋποδοχείς, τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα και την εμπλοκή αυτών των διαύλων στην εκπόλωση ή την υπερπόλωση των κυττάρων (Hoon και συν., 2014). Όπως είδαμε μία από τις βασικότερες λειτουργίες του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών, είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών (Bossong & Niesinu, 2010). Οι Opere και συν., (2009),

μελετώντας απομονωμένους αμφιβληστροειδείς βοοειδών, παρατήρησαν ότι η χορήγηση αγωνιστών του CB1 υποδοχέα μπλόκαρε την επαγόμενη από το κάλιο ή την ισχαιμία, απελευθέρωση [^{3}H]D-aspartate, ενός αναλόγου του γλουταμινικού. Ο αγωνιστής των CB1 υποδοχέων, WIN55,212-2, προκάλεσε το ισχυρότερο αποτέλεσμα, ενώ μικρότερου μεγέθους επίδραση παρατηρήθηκε μετά την χορήγηση AEA και μεθανανδαμίδης (methAEA) (Opere και συν., 2009).

Εκτός από το γλουταμινικό, τα κανναβινοειδή είναι σε θέση να ρυθμίζουν και την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως το GABA, η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η σωματοστατίνη (Kokona et al., 2016). Οι Warrier και Wilson (2007) παρατήρησαν μία αύξηση της συχνότητας των αυθόρμητων μετασυναπτικών μικροδυναμικών σε καλλιέργειες GABAεργικών βραχύινων κυττάρων κοτόπουλου, μετά την χορήγηση του συνθετικού κανναβινοειδούς WIN55,212-2. Η αύξηση αυτή προκλήθηκε μέσω της επαγόμενης από $G_{i/o}$ μείωσης του cAMP, εξαιτίας της ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων (Warrier & Wilson, 2007). Σε μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων από το WIN55,212-2, μείωσε την επαγόμενη από το ασβέστιο απελευθέρωση ντοπαμίνης σε απομονωμένους αμφιβληστροειδείς τρωκτικών (guinea pig) (Schlicker και συν., 1996). Αντιθέτως η χορήγηση του ανταγωνιστή των CB1 υποδοχέων SR141716, όχι μόνο κατήργησε την επαγόμενη από το WIN55,212-2 μείωση, αλλά αντιθέτως αύξησε την απελευθέρωση ντοπαμίνης (Schlicker και συν., 1996). Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα από την έρευνα των Weber και Schlicker (2002), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η χορήγηση WIN55,212-2 μείωσε την ηλεκτοεπαγόμενη απελευθέρωση ντοπαμίνης και νορεπινεφρίνης, μέσω G_i πρωτεϊνών, αλλά όχι μέσω G_S ή G_q. Παρόμοια ευρήματα για τον νευρορυθμιστικό ρόλο των κανναβινοειδών λαμβάνουμε και από μελέτες στον αμφιβληστροειδή χρυσόψαρων. Οι Fan και Yazulla (2003), παρατήρησαν ότι το WIN55,212-2 έχει διφασικές επιδράσεις στα ρεύματα καλίου, χλωρίου και ασβεστίου, στα κωνία χρυσόψαρου. Το WIN55,212-2 αύξησε τα ρεύματα σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1μM, μέσω G_s πρωτεϊνών, ενώ μείωσε τα ρεύματα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1μM, μέσω $G_{i/o}$ πρωτεϊνών (Fan & Yazulla, 2003). Καθοριστικό ρόλο σε αυτές τις επιδράσεις έπαιξε η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), ενώ όλες οι επιδράσεις καταργήθηκαν με την χορήγηση του ανταγωνιστή SR141716A Fan & Yazulla, 2003). Ενδιαφέρον τέλος παρουσιάζει το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα από ενδογενή κανναβινοειδή, δύναται να ρυθμίσει με διαφορετικό τρόπο τους ιοντικούς διαύλους, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο στον οποίο εντοπίζονται οι υποδοχείς. Οι Straiker και Sullivan (2003), αναφέρουν ότι το WIN55,212-2 ενισχύει το ρεύμα ασβεστίου στα ραβδία κατά 39%, ενώ το μειώνει κατά 50% στα μεγάλα κωνία της σαλαμάνδρας. Παράλληλα η χορήγηση WIN55,212-2 καταστέλλει τα ρεύματα καλίου των ραβδίων και των μεγάλων κωνίων κατά 44% και 48% αντίστοιχα (Straiker & Sullivan, 2003).

1.7. Κανναβινοειδή και νευροπροστασία στον αμφιβληστροειδή

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των μελετών έχει επικεντρωθεί στα κανναβινοειδή, εξαιτίας των θεραπευτικών επιδράσεων που επιδεικνύουν σε διάφορες διαταραχές του ΚΝΣ. Μελέτες υποδεικνύουν ότι τόσο τα ενδογενή, όσο και τα εξωγενώς χορηγούμενα κανναβινοειδή, εμφανίζουν νευροπροστατευτικές δράσεις ενάντια στην διεγερσιτοξικότητα, σε καταστάσεις όπως η εγκεφαλική ισχαιμία (Amantea και συν., 2007), ο εγκεφαλικός τραυματισμός (Panikashvili και συν., 2007) και η επιληψία (Marsicano και συν., 2003). Παράλληλα τα κανναβινοειδή παρουσιάζουν προστατευτικές αποκρίσεις και σε αρκετές χρόνιες εκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος Huntington (Pintor και συν., 2006· Palazuelos και συν., 2009), η νόσος Parkinson (Lastres-Becker και συν., 2005· Garcia-Arencibia και συν., 2007), η νόσος Alzheimer (Martin-Moreno και συν., 2011· Ramirez και συν., 2005) και η πολλαπλή σκλήρυνση (Pryce και συν., 2003· Docagne και συν., 2007). Ωστόσο πρέπει να αναφέρουμε, ότι η πλειοψηφία των μελετών που εξετάζουν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών, αφορά προκλινικές μελέτες, οι οποίες εξετάζουν την αποτελεσματικότητα των κανναβινοειδών σε ζωικά μοντέλα.

Αρχικές παρατηρήσεις της επίδρασης του καπνίσματος κάνναβης στην μείωση της ΕΦΠ (Helper & Frank, 1971), έστρεψαν το ενδιαφέρον των μελετών στην μελέτη των θεραπευτικών επιδράσεων των κανναβινοειδών σε παθολογικές καταστάσεις του οφθαλμού. Το ενδιαφέρον εντάθηκε ακόμη περισσότερο μετά την ανακάλυψη ενός οργανωμένου συστήματος ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή (Straiker και συν., 1999). Αρκετές μελέτες στην βιβλιογραφία, οι οποίες θα παρατεθούν συνοπτικά παρακάτω, υποστηρίζουν ότι τα κανναβινοειδή παρουσιάζουν ένα νευροπροστατευτικό προφίλ σε αρκετές αμφιβληστροειδοπάθειες.

Σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη, οι El-Remessy και συν., (2003), παρατήρησαν ότι η συστηματική χορήγηση Δ9-THC ή κανναβιδιόλης (ενός μη ψυχοτρόπου φυτοκανναβινοειδούς), μείωσε τον επαγόμενο από ενδοφθάλμια έγχυση NMDA, θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων σε επίμυες. Η παρατηρούμενη επίδραση ήταν δοσοεξαρτώμενη και καταργήθηκε ως ένα βαθμό, από την χορήγηση του ανταγωνιστή των CB1 υποδοχέων, SR141716A, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις των δύο κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται εν μέρει μέσω του CB1 υποδοχέα (El-Remessy και συν., 2003). Σύμφωνα με τους ερευνητές η νευροπροστασία που παρείχαν τα δύο κανναβινοειδή, σχετίστηκε με την μείωση του σχηματισμού υπεροξειδίων και μονοξειδίου του αζώτου, δύο τοξικών για τα κύτταρα προϊόντων (El-Remessy και συν., 2003). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα από την μελέτη των Crandall και συν., (2007), οι οποίοι μελετώντας της επιδράσεις της Δ9-THC σε ένα ζωικό πρότυπο του γλαυκώματος,

παρατήρησαν ότι η συστηματική χορήγηση της μείωσε την ΕΦΠ, καθώς και τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων κατά 75%. Στο ίδιο μήκος κύματος, κινήθηκαν και τα αποτελέσματα των Nucci και συν., (2007), οι οποίοι αναφέρουν ότι η χορήγηση του αναστολέα URB597 της FAAH, μείωσε τον επαγόμενο από την ισχαιμία θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων. Αυτά τα δεδομένα επαληθεύτηακν αι από την μελέτη των Sulsar και συν., (2013), οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση της βιωσιμότητας των γαγγλιακών κυττάρων μετά την χορήγηση URB597, σε ένα μοντέλο διατομής του οπτικού νεύρου. Σύμφωνα με τους Nucci και συν., (20070, φάνηκε ότι η ενδοφθάλμια χορήγηση methAEA, ενός συνθετικού αναλόγου της AEA, μείωσε με παρόμοιο τρόπο την επαγόμενη από την ισχαιμία απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων, επίδραση η οποία καταργήθηκε από την συστηματική χορήγηση του ανταγβνιστή SR141716A. Κατά παρόμοιο τρόπο, σε μία πιο πρόσφατη μελέτη φάνηκε, ότι η τοπική εφαρμογή σε επίμυες, μέσω σταγόνων του WIN55,212-2, κατόρθωσε να μειώσει τον επαγόμενο από την ισχαιμία θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων (Pinar-Sueiro και συν., 2013).

Τα κανναβινοειδή επιδεικνύουν νευροπροστατευτικές επιδράσεις και για άλλους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς, οι οποίοι πλήττονται σε διαφορετικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Οι Lax και συν., (2014), αναφέρουν ότι η i.p χορήγηση HU-210, ενός αγωνιστή των CB1 υποδοχέων, μείωσε τον θάνατο των φωτοϋποδοχέων σε ένα μοντέλο αυτοσωμικής κυρίαρχης μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας (MA). Το HU-210 διατήρησε την δομή, την λειτουργία και τις συναπτικές συνδέσεις των φωτοϋποδοχέων με τα δίπολα και τα οριζόντια κύτταρα, μειώνοντας την απώλεια της όρασης στα πειραματόζωα, όπως φάνηκε από τις ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές (Lax και συν., 2014).

Στο μοντέλο της επαγόμενης από τη στρεπτοζωτοκίνη ΔΑ, η συστηματική χορήγηση κανναβιδιόλης μείωσε το οξειδωτικό στρες, τον κυτταρικό θάνατο και την διαπερατότητα των αγγείων στον αμφιβληστροειδή. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της κανναβιδιόλης ήταν αποτέλεσμα της μείωσης που αυτή προκάλεσε στα επίπεδα του TNFα και του VEGF (El-Remessy και συν., 2006). Οι επιδράσεις της κανναβιδιόλης στην προστασία των κυττάρων, του ΑΑΦ, καθώς και οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της, θεωρείται ότι ήταν αποτέλεσμα της μείωσης της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK, μιας κινάσης η οποία εμφανίζεται υπερφωσφορυλιωμένη στην ΔΑ και παίζει καθοριστικό ρόλο στην αφύπνιση των παθολογικών γεγονότων που οδηγούν σε αυτήν (El-Remessy και συν., 2006).

Ένα άλλο πειραματικό μοντέλο στο οποίο τα κανναβινοειδή επιδεικνύουν νευροπροστατευτικές επιδράσεις, είναι αυτό της χημικής ισχαιμίας (Kokona και συν., 2016). Βάσει προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου, η χημική ισχαιμία επηρεάζει την βιωσιμότητα των βραχύινων και των ραβδιοφόρων δίπολων κυττάρων, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει τα γαγγλιακά κύτταρα και τους φωτοϋποδοχείς (Mastrodimou και συν., 2005).

Πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι η χορήγηση HU-210 προστατεύσε τα χολινεργικά βραχύινα κύτταρα και τα ραβδιοφόρα δίπολα κύτταρα, όπως φάνηκε από την ανοσοδραστικότητα της χολινοακετυλοτρανφεράσης (ChAT) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) αντίστοιχα (Kokona και συν., 2016). Η χορήγηση του ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή των CB1 υποδοχέων, κατήργησε τις δράσεις του HU-210, υποδεικνύοντας ότι η νευροπροστασία επιτελείται μέσω του CB1 υποδοχέα (Kokona και συν., 2016).

Το in vivo μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας, όπως είδαμε επηρεάζει την βιωσιμότητα διαφόρων τύπων βραχύινων κυττάρων αλλά και των οριζόντιων κυττάρων (Kiagiadaki και συν., 2010· Kokona και συν., 2012). Μελέτες του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι η ενδοφθάλμια χορήγηση σε επίμυες, των κανναβινοειδών HU-210, methAEA και AEA μείωσε τον επαγόμενο από το AMPA θάνατο των χολινεργικών βραχύινων κυττάρων και των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν bNOS με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Kokona & Thermos, 2015). Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις των τριών κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται μέσω του CB1 υποδοχέα, αφού η συγχορήγησή τους με τον ανταγωνιστή AM251, τις κατήργησε (Kokona & Thermos, 2015). Σύμφωνα με τους ερευνητές τα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών είναι, το PI3K/Akt για το HU-210 και την AEA, ενώ το μονοπάτι MEK/ERK1/2 φαίνεται ότι εμπλέκεται μόνο στις νευροπροστατευτικές δράσις της AEA (Kokona & Thermos, 2015). Ανάλογες νευροπροστατευτικές δράσεις στο μοντέλο του AMPA, αναφέρονται και για την 2-AG (Kokona και συν., 2016). Η 2-AG χορηγούμενη ενδοφθαλμίως σε CB1 και CB2 knock out ποντίκια, προστάτευσε τα bNOS βραχύινα κύτταρα στα αγρίου τύπου και στα CB2 knock out ποντίκια, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στα CB1 knock out ποντίκια (Kokona και συν., 2016). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία ακόμη απόδειξη για την εμπλοκή των CB1 υποδοχέων στις νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου δείχνουν ότι η ενδοφθάλμια χορήγηση του αναστολέα της FAAH , AM6642, καθώς και του διπλού αναστολέα για την FAAH και την MAGL, AM9928, μείωσαν με παρόμοιο τρόπο την επαγόμενη από το AMPA, απώλεια των bNOS βραχύινων κυττάρων (Kokona και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Τέλος εκτός από την οξεία ενδοφθάλμια χορήγηση κανναβινοειδών στο μοντέλο του AMPA, μελέτες του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι η υποχρόνια (4 ημέρες), i.p χορήγηση HU-210 σε επίμυες, μειώνει τον θάνατο των bNOS κυττάρων στις δόσεις 12.5 και 25 μg/kg, παρέχοντας μερική νευροπροστασία στον ιστό (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Στα περισσότερα ζωικά μοντέλα που αναφέραμε ως τώρα, φαίνεται πως οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται κυρίως μέσω του CB1 υποδοχέα. Ωστόσο σε μία πρόσφατη μελέτη, οι Araujo και συν., (2017) παρατήρησαν πως ο συνδυασμός του WIN55,212-2 είτε με τον AM251 (ανταγωνιστή των CB1 υποδοχέων), είτε με τον AM630 (ανταγωνιστή των CB2 υποδοχέων), παρουσίασε νευροπροστατευτικές δράσεις σε ένα μοντέλο ισχαιμίας, στον αμφιβληστροειδή κοτόπουλου. Αντιθέτως όταν το WIN55,212-2 και οι δύο ανταγωνιστές χορηγήθηκαν από μόνοι τους, δεν κατάφεραν να προστατεύσουν τον ιστό (Araujo και συν., 2017). Παράλληλα οι ερευνητές αναφέρουν ότι ο υποδοχέας transient receptor potential 1 (TRPA1) παίζει σημαντικό ρόλο στις διεργασίες κυτταρικού θανάτου και προστασίας, αφού η επιλεκτική ενεργοποίησή του ενίσχυσε τον κυτταρικό θάνατο, ενώ το μπλοκάρισμά του τον μείωσε (Araujo και συν., 2017). Σε μία άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη οι Krishnan & Chatterjee (2014), έδειξαν ότι AEA και η 2-AG κατάφεραν να προστατέψουν τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς από το θάνατο εξαιτίας της αυξημένης φλεγμονώδους απόκρισης που δημιουργεί ο ιός HIV στον αμφιβληστροειδή. Οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες της AEA και της 2-AG, βασίστηκαν στην δυνατότητά τους να ενεργοποιήσουν την κινάση MAPK, με τελικό αποτέλεσμα την μείωση των προφλεφμονωδών κυτοκινών (Krishnan & Chatterjee, 2014). Μάλιστα η δράση τους αυτή επιτεύχθηκε μέσω των CB1, αλλά και των CB2 υποδοχέων, αφού η χορήγηση των ανταγωνιστών AM251 και AM630, ανέστειλε μερικώς αυτές τις επιδράσεις (Krishnan & Chatterjee, 2014).

Σε αντίθεση με τα όσα αναφέραμε μέχρι στιγμής, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν πως η αναστολή και όχι η ενεργοποίηση του CB1, παρουσιάζει νευροπροστατευτικές δράσεις. Οι Chen και συν., (2018), αναφέρουν ότι ο ανταγωνιστής των CB1 υποδοχέων, SR141716A, παρείχε νευροπροστασία μειώνοντας των θάνατο των φωτοϋποδοχέων και των δίπολων κυττάρων, σε ένα ζωικό μοντέλο της μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Παράλληλα ο ανταγωνισμός του CB1 υποδοχέα ήταν σε θέση να μειώσει την αντιδραστικότητα- ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων, καθώς και τον σχηματισμό ανώμαλων αγγειακών συμπλεγμάτων (Chen και συν., 2018). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Wei και συν., (2013), οι οποίοι παρατήρησαν πως η χορήγηση του ανταγωνιστή SR141716A σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων του RPE, κατόρθωσε προστατεύσει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Τα ευρήματα για της νευροπροστατευτικές δράσεις των ανταγωνιστών των CB1 υποδοχέων, επαληθεύονται και στο μοντέλο της επαγόμενης από στρεπτοζωτοκίνη ΔΑ. Οι El-Remessy και συν., (2011), αναφέρουν ότι η γενετική διαγραφή ή το μπλοκάρισμα του CB1 υποδοχέα με τον ανταγωνιστή SR141716A, μείωσε τον κυτταρικό θάνατο, τόσο in vivo (μύες που έλαβαν στρεπτοζωτοκίνη), όσο και in vitro (σε καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων).

Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των μελετών που υποστηρίζουν τις νευροπροστατευτικές δράσεις των αγωνιστών των CB1 υποδοχέων και αυτών που αναφέρουν νευροπροαστατευτικές ιδιότητες για τους ανταγωνιστές, πιθανότατα οφείλονται στην χρήση διαφορετικών ζωικών μοντέλων για διαφορετικές αμφιβληστροειδοπάθειες. Για παράδειγμα σε ζωικά πρότυπα για την ΔΑ και την ΜΑ, σε αντίθεση με άλλα η φλεγμονή παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου και αποτελεί ένα από τα βασικότερα συμπτώματά της. Επιπλέον, εάν λάβει κανείς υπόψη του ότι ο CB1 υποδοχέας μπορεί να προάγει την φλεγμονή σε μοντέλα νεφροπαθειών (Barutta και συν., 2010), καρδιομυοπαθειών (Mukhopadhyay και συν., 2010) κ.α, γίνεται εύκολα κατανοητό γιατί ο ανταγωνισμός του CB1 υποδοχέα είναι ευεργετικός σε τέτοιες καταστάσεις.

Εκτός από τους CB1 υποδοχείς, οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών φαίνεται πως διαμεσολαβούνται και μέσω των CB2 υποδοχέων. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Imamura και συν., (2018), παρατήρησαν ότι ο αγωνιστής των CB2 υποδοχέων, HU-308, μείωσε την νευροεκφύλιση σε ένα in vitro μοντέλο της ΓΕΩ. Πιο συγκεκριμένα ο αγωνιστής HU-308 μείωσε τον επαγόμενο από το φως θάνατο των φωτοϋποδοχέων, επίδραση η οποία καταργήθηκε από την χορήγηση του SR144528, ενός ανταγωνιστή των CB2 υποδοχέων (Imamura και συν., 2018). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και μέσα από in vivo μελέτες, όπου η ενδοφθάλμια έγχυση του HU-308 βελτίωσε την όραση των πειραματόζωων, όπως φάνηκε από τις ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές και επιπροσθέτως αύξησε το πάχος της στιβάδας ONL, στην οποία εντοπίζονται οι φωτοϋποδοχείς (Imamura και συν., 2018).

Όπως είδαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, τα κανναβινοειδή ασκούν τις δράσεις τους και μέσω του TRPV1 υποδοχέα, ο οποίος φαίνεται να διαμεσολαβεί ορισμένες από τις νευροπροστατευτικές τους δράσεις. Μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι η ενδοφθάλμια συγχορήγηση AEA, methAEA ή HU-210 με τον ανταγωνιστή του TRPV1, καψαζεπίνη, μειώνει τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες αυτών των κανναβινοειδών στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας (Kokona και συν., 2016). Από την άλλη πλευρά, η καψαϊκίνη, ένας αγωνιστής του TRPV1 υποδοχέα, δεν κατόρθωσε να προστατέψει τα bNOS βραχύινα κύτταρα (Kokona και συν., 2016). Ωστόσο οι Sakamoto και συν., (2014), αναφέρουν ότι η καψαϊκίνη, μέσω του TRPV1 υποδοχέα κατάφερε να μειώσει τον επαγόμενο από NMDA, θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων.

Απ’ όλα τα παραπάνω γίνεται κατανοητό, ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται κατά κύριο λόγο μέσω των CB1 και CB2 υποδοχέων. Ανάλογα με το εκάστοτε ζωικό πρότυπο που χρησιμοποιείται και λαμβάνοντας υπόψη την εντόπιση των υποδοχέων στους διάφορους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς, η

ενεργοποίησή τους με αγωνιστές ή το μπλοκάρισμά τους με ανταγωνιστές, μπορεί να παρέχει προστασία από διεργασίες κυτταρικού θανάτου και από τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

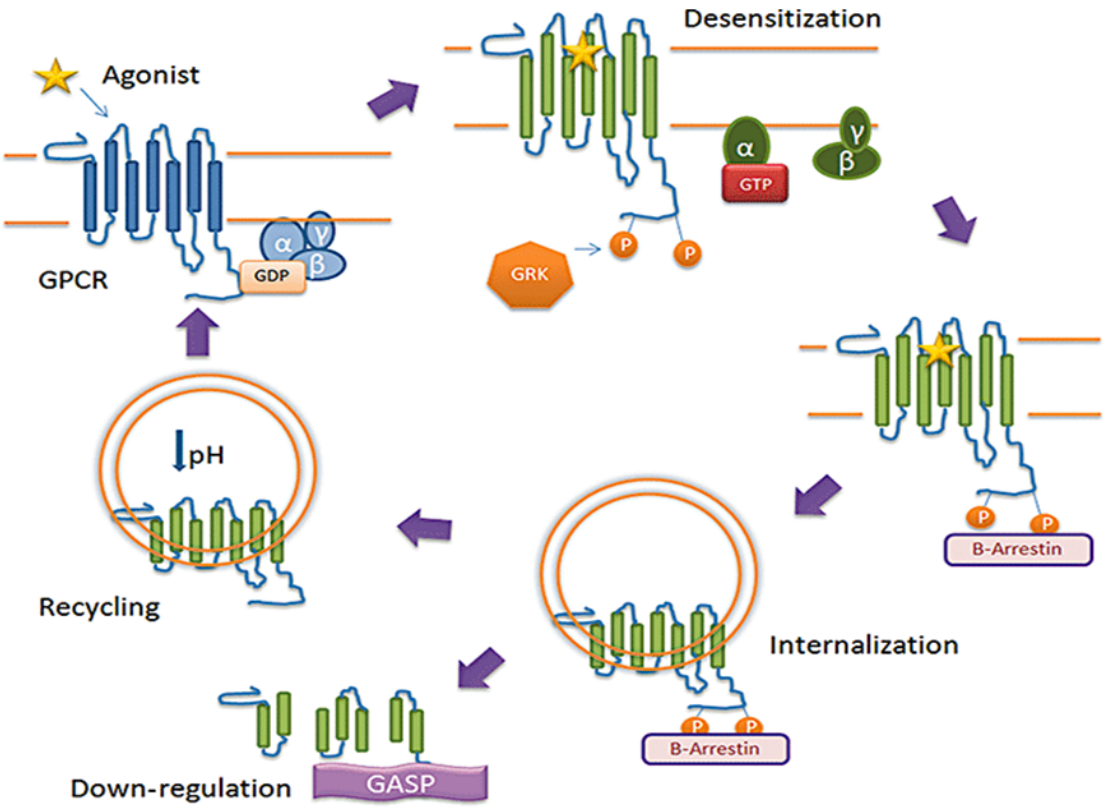
1.8. Επιδράσεις της υποχρόνιας και χρόνιας χορήγησης κανναβινοειδών στην έκφραση του CB1 υποδοχέα

Μία από τις βασικότερες προϋποθέσεις για την διατήρηση της ομοιόστασης είναι η ικανότητα των κυττάρων να αντιλαμβάνονται τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στο εξωκυττάριο περιβάλλον και να προσαρμόζονται σε αυτές. Μία τέτοια λειτουργία είναι η ικανότητα των υποδοχέων και ιδιαίτερα των GPCRs, να ενδοκυτταρώνονται σαν απόκριση στην πρόσδεση αγωνιστών σε αυτούς. Η διαδικασία της ενδοκυττάρωσης των GPCRs έγινε γνωστή μέσα από μελέτες σε ζώα, με την χρήση ραδιενεργών προσδετών για τους υποδοχείς (Wang και συν., 1989).

Αρκετοί GPCRs υφίστανται ενδοκυττάρωση μετά από χρόνια ενεργοποίησή τους από κάποιον αγωνιστή ή έπειτα από ενεργοποίησή τους από μεγάλες δόσεις του αγωνιστή (Drake και συν., 2006). Το έναυσμα για την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα δίνεται από την πρόσδεση σε αυτόν ενός αγωνιστή (Fergusson και συν., 1996). Η πρόσδεση του αγωνιστή, εκτός ότι ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι με το οποίο είναι συζευγμένος ο υποδοχέας, προκαλεί και μία αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, μετατρέποντάς τον σε υπόστρωμα για τις κινάσες που τον φωσφορυλιώνουν (GRKs) (Fergusson και συν., 1996). Ακολούθως οι GRKs φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης, γεγονός που ελκύει στον υποδοχέα την πρωτεΐνη β-αρρεστίνη, η οποία εμποδίζει την επικοινωνία του με την G πρωτεΐνη και κατ' επέκταση την σηματοδότηση μέσω του ενδοκυττάριου μονοπατιού (Fergusson και συν., 1996). Η διαδικασία αυτή της μείωσης της σηματοδότησης του υποδοχέα, ονομάζεται απευαισθητοποίηση (Fergusson και συν., 1996). Επιπλέον η πρόσδεση της β-αρρεστίνης στον υποδοχέα, παίζει καθοριστικό ρόλο και στην ενδοκυττάρωση του, μέσω κυστιδίων επικαλυμμένων η μη με κλαθρίνη (Laporte και συν., 1999). Μετά την ενδοκυττάρωσή τους οι υποδοχείς ενδέχεται να ακολουθήσουν δύο διαφορετικά μονοπάτια. Είτε το σύμπλοκο του αγωνιστή με τον υποδοχέα θα διαχωριστεί και ο υποδοχέας θα ανακυκλωθεί προς την πλασματική μεμβράνη, είτε ο υποδοχέας θα κατευθυνθεί στα λυσοσωμάτια προς αποδόμηση (Lefkowitz, 1998).

Το μονοπάτι της αποδόμησης στα λυσοσωμάτια, αποτελεί αυτό που ονομάζουμε μειορύθμιση (downregulation) των υποδοχέων. Ως μειορύθμιση ορίζεται η μείωση στο συνολικό αριθμό της πρωτεΐνης των υποδοχέων και διαχωρίζεται από την ενδοκυττάρωση γενικά, στην οποία μπορεί να παρατηρηθεί απλώς ανακατανομή των υποδοχέων στην μεμβράνη (Wang και συν., 1989). Η μειορύθμιση αποτελεί ουσιαστικά μία πτυχή της

ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάκαμψη από την μειορύθμιση εξαρτάται από την δημιουργία νέων πρωτεϊνών (Doss και συν., 1981).



Εικόνα 6. Ο μηχανισμός της απευαισθητοποίησης και της ενδοκυττάρωσης των GPCRs. Μετά την ενδοκυττάρωσή τους, οι GPCRs μπορεί να ακολουθήσουν το μονοπάτι της ανακύκλωσης προς την μεμβράνη ή της αποδόμησης στα λυσοσωμάτια (μειορύθμιση) (λήφθηκε από Smith και συν., 2010).

Η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων αρχικά πιστευόταν ότι συμβάλει στην απευαισθητοποίησή τους, όμως αργότερα φάνηκε ότι δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο, αφού η απευαισθητοποίηση των υποδοχέων πραγματοποιείται ταχέως, σε πρωιμότερο στάδιο από αυτό της ενδοκυττάρωσης (Lohse, 1993). Ουσιαστικά η φωσφορυλίωση του υποδοχέα από τις GRKs και η πρόσδεση σε αυτόν της β-αρρεστίνης, συμβάλλουν στην ταχεία απευαισθητοποίησή του (Laporte και συν., 1999). Μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων, όχι μόνο δεν συμμετέχει στην απευαισθητοποίηση τους, αλλά αντιθέτως παίζει καθοριστικό ρόλο στην επανευαισθητοποίησή των υποδοχέων, την αποκατάσταση δηλαδή της φυσιολογικής σηματοδοτικής τους ικανότητας (Sibley και συν., 1986). Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται στο μονοπάτι της ανακύκλωσης των υποδοχέων, στο οποίο οι ενδοκυτταρωμένοι υποδοχείς περνούν από τα ενδοσωμάτια (Sibley και συν., 1986). Τα ενδοσωμάτια είναι μεμβρανικά διαμερίσματα, τα οποία είναι πλούσια σε φωσφατάσες που

αποφωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς, συμβάλλοντας στην επανευαισθητοποίησή τους (Yu και συν., 1993).

Μελέτες στην βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι οι CB1 υποδοχείς υφίστανται απευαισθητοποίηση και μειορύθμιση μετά από παρατεταμένη ενεργοποίησή τους από κάποιον αγωνιστή. Η πλειοψηφία των ευρημάτων αφορούν τον εγκέφαλο. Η παρατεταμένη έκθεση νευρώνων του ιπποκάμπου σε WIN55,212-2, μείωσε την επαγόμενη από το κανναβινοειδές προσυναπτική αναστολή της γλουταμινεργικής διαβίβασης, υποδεικνύοντας την εμφάνιση απευαισθητοποίησης (Kouznetsova και συν., 2002). Η ύπαρξη απευαισθητοποίησης επιβεβαιώθηκε και από το γεγονός, ότι η παρουσία κυρίαρχων αρνητικών μεταλλάξεων για την GRK2 και την β-αρρεστίνη, δύο σημαντικών για την απευαισθητοποίηση πρωτεϊνών, μείωσε την παρατηρούμενη απευαισθητοποίηση (Kouznetsova και συν., 2002). Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρουν και οι Jin και συν., (1999), οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο αγωνιστής WIN55,212-2, απευαισθητοποίησε τους CB1 υποδοχείς in vitro, όπως φάνικε από την μειωμένη ενεργοποίηση των διαύλων ανορθωτών καλίου (GIRKs), ενώ σημαντικό ρόλο σε αυτή την διαδικασία έπαιξαν οι πρωτεΐνες GRK3 και β-αρρεστίνη 2.

Τα παραπάνω δεδομένα από in vitro πειράματα για την απευαισθητοποίηση του CB1 υποδοχέα, συμφωνούν και με αυτοραδιογραφικές μελέτες σε ιστούς ζώων, στις οποίες η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα υπολογίζεται με βάση την πρόσδεση στην G πρωτεΐνη του [^{35}S]GTPγS, ενός αναλόγου του GTP που είναι ανθεκτικό στην υδρόλυση (Sim και συν., 1996). Κατ' αυτόν τον τρόπο φαίνεται πως η χρόνια χορήγηση Δ9-THC (10 mg/kg) σε επίμυες, μειώνει την επαγόμενη από το WIN55,212-2 πρόσδεση του [^{35}S]GTPγS, υποδεικνύοντας την ανάπτυξη απευαισθητοποίησης όσον αφορά τις σηματοδοτικές ικανότητες του CB1 υποδοχέα. Η απευαισθητοποίηση των CB1 υποδοχέων παρατηρήθηκε ε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές που δοκιμάστηκαν, παρουσιάζοντας μικρές μόνο διαφορές μεταξύ τους στην πρόσδεση του [^{35}S]GTPγS, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην διαφορετική κατανομή των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απευαισθητοποίηση των CB1 υποδοχέων (Sim και συν., 1996).

Εκτός από την απευαισθητοποίηση, μελέτες στην βιβλιογραφία υποστηρίζουν ότι οι CB1 υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται σαν απόκριση της πρόσδεσης αγωνιστών σε αυτούς. Οι Oviedo και συν., (1993) αναφέρουν ότι η χρόνια ,αλλά όχι η οξεία χορήγηση σε επίμυες, Δ9-THC και CP55,940, μείωσε τον αριθμό των CB1 υποδοχέων στο ραβδωτό των πειραματόζωων. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και από ένα πλήθος άλλων ερευνών, οι οποίες χρησιμοποιούν παρόμοιες μεθοδολογικές προσεγγίσεις για την μέτρηση της μειορύθμισης των CB1 υποδοχέων (De Fonseca και συν., 1994· Romero και συν., 1997·

Breivogel και συν., 1999· Rubino και συν., 2000· Sim-Selley και συν., 2003). Το ποσοστό της μειορύθμισης που παρατηρείται διαφέρει από περιοχή σε περιοχή, υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση των CB1 υποδοχέων από πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην μειορύθμιση, μπορεί επίσης να διαφέρει από περιοχή σε περιοχή (Romero και συν., 1998). Εκτός από την χρόνια χορήγηση και η υποχρόνια χορήγηση κανναβινοειδών είναι σε θέση να προκαλέσει μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων. Σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη οι Dalton και συν., (2009), παρατήρησαν ότι εκτός από την χρόνια (14 ημέρες) και η υποχρόνια χορήγηση (4 ημέρες) του HU-210 προκάλεσε μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων στον εγκέφαλο επίμυων, όπως φάνηκε από την δοσοεξαρτώμενη μείωση της πρόσδεσης του ραδιενεργού [^{3}H]CP55,940. Η μεγαλύτερη δόση των 100 μg/kg που χρησιμοποιήθηκε, προκάλεσε μειορύθμιση και κατά την οξεία χορήγησή της (Dalton και συν., 2009).

Η β-αρρεστίνη φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην ενδοκυττάρωση των CB1 υποδοχέων. Οι Ahn και συν., (2013), αναφέρουν στην μελέτη τους ότι οι διαφορετικές ισομορφές της β-αρρεστίνης συμμετέχουν σε διαφορετικές λειτουργίες που σχετίζονται με τον CB1 υποδοχέα. Ειδικότερα η β-αρρεστίνη 1 φαίνεται πως διαμεσολαβεί την σηματοδότηση του CB1 υποδοχέα, ενεργοποιώντας τις κινάσες ERK1/2 και MEK1/2, ενώ αντιθέτως η β-αρρεστίνη 2 συμβάλλει στην ενδοκυττάρωση του CB1 υποδοχέα, μετά από παρατεταμένη ενεργοποίησή του με τον αγωνιστή CP55,940. Παραμένοντας στο πεδίο της ενδοκυττάρωσης, σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη, οι Jin και συν., (1999), εφαρμόζοντας μεταλλάξεις σε διάφορα σημεία του CB1 υποδοχέα, παρατήρησαν ότι διαφορετικές περιοχές ευθύνονται για την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα και άλλες για την απευαισθητοποίησή του. Κατά παρόμοιο τρόπο οι Roche και συν., (1999), αναφέρουν ότι η πρόκληση μετάλλαξης στην δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή του CB1, εμπόδισε την ενδοκυττάρωσή του, ενώ παράλληλα δεν επηρέασε την πλειοψηφία των σηματοδοτικών του ικανοτήτων.

Στο σημείο αυτό, εύλογα θα μπορούσε να αναρωτηθεί κανείς, για το ποιο μονοπάτι ακολουθεί ο CB1 μετά την ενδοκυττάρωσή του, αυτό της ανακύκλωσης ή αυτό της αποδόμησης. Οι Wu και συν., (2008) αναφέρουν ότι η χορήγηση σε καλλιέργειες HEK293 κυττάρων, Δ9-THC ή WIN55,212-2, οδήγησε σε ενδοκυττάρωση των υποδοχέων , οι οποίοι ακολουθώντας το μονοπάτι της ανακύκλωσης επανήλθαν και πάλι προς την πλασματική μεμβράνη. Μάλιστα οι δύο αγωνιστές διέφεραν ως προς τις ιδιότητές τους, αφού η Δ9-THC προκάλεσε ταχύτερη απευαισθητοποίηση και πιο αργή επανευαισθητοποίηση από το WIN55,212-2 (Wu και συν., 2008). Παρόμοια αποτελέσματα ανφέρουν στην μελέτη τους και οι Hsieh και συν., (2002), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η επαγόμενη από το WIN55,212-2, CP55,940 και HU-210 ενδοκυττάρωση των υποδοχέων, οδήγησε τελικά στην επανευαισθητοποίησή τους και στην επαναφορά τους στην μεμβράνη. Τα παραπάνω

δεδομένα καθώς και η ύπαρξη στα κύτταρα μιας ενδοκυττάριας «αποθήκης για τους CB1 υποδοχείς, η οποία παρουσιάζει μηδενικό συνεντοπισμό με οργανίδια πρωτεΐνοσύνθεσης (Rozenfield & Devi, 2008), συνηγορούν υπερ της άποψης ότι οι CB1 υποδοχείς ανακυκλώνονται προς την πλασματική μεμβράνη.

Σε αντίθεση με τα όσα υποστηρίζει η υπόθεση της ανακύκλωσης των CB1 υποδοχέων, μελέτες στην βιβλιογραφία υποστηρίζουν ότι η ενδοκυτταρωμένοι CB1 υποδοχείς ακολουθούν κατά κύριο λόγο το μονοπάτι της αποδόμησης. Οι Grimsey και συν., (2010), εξετάζοντας τέσσερις κυτταρικές σειρές, μία εκ των οποίων εξέφραζε ενδογενώς τον CB1, αναφέρουν ότι μετά την παρατεταμένη παρουσία αγωνιστή οι CB1 υποδοχείς ενδοκυτταρώθηκαν και ακολούθησαν το αποδομητικό μονοπάτι. Παρομοίως οι Tape-Theodor και συν., (2007), παρατήρησαν ότι οι CB1 υποδοχείς μετά την ενδοκυττάρωσή τους, κατευθύνθηκαν στα λυσοσωμάτια προς αποδόμηση και καθοριστικό ρόλο σε αυτή την διαδικασία έπαιξε η πρωτεΐνη GASP1 (G protein associating sorting protein 1), η οποία κατευθύνει τους υποδοχείς προς τα λυσοσωμάτια (Theodor και συν., 2007). Ο ρόλος της GASP1 φαίνεται και από το γεγονός ότι, η έκφραση μιας κυρίαρχης αρνητικής μετάλλαξης γι’ αυτήν καταργεί την αποδόμηση των CB1 υποδοχέων (Martini και συν., 2007). Μία άλλη πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στην καθοδήγηση των CB1 υποδοχέων προς τα λυσοσωμάτια είναι η πρωτεΐνη προσαρμογέας AP-3 (Rozenfield & Devi, 2008). Η μείωση της έκφρασης της AP-3 μέσω siRNA, οδηγεί σε αύξηση της παρουσίας των CB1 υποδοχέων στην μεμβράνη (Rozenfield & Devi, 2008).

Για τις επιδράσεις των κανναβινοειδών στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή, δεν υπάρχουν ακόμη ευρήματα στην βιβλιογραφία. Ωσόσο ανοσοϊστοχημικές μελέτες του εργαστηρίου, υποδεικνύουν ότι η χρόνια (14 ημερες), συστηματική (i.p) χορήγηση των κανναβινοειδών AEA, methAEA και HU-210 σε επίμυες, μειώνει την έκφραση του CB1 υποδοχέα στην στιβάδα GCL του αμφιβληστροειδούς (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η μείωση της έκφρασης των CB1 υποδοχέων παρατηρείται για τις δόσεις 50 και 100 μg/kg, ενώ δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στις δόσεις 12,5 και 25 μg/kg. Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα και μετά την υποχρόνια (4 ημέρες) χορήγηση των κανναβινοειδών, ενώ το HU-210 στην δόση των 100 μg/kg, προκαλεί μείωση της έκφρασης του CB1 υποδοχέα και κατά την οξεία χορήγησή του (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Λαμβάνοντας υπόψη όσο αναφέραμε, γίνεται κατανοητό πως η μελέτη της μειορύθμισης των υποδοχέων των κανναβινοειδών, αποτελεί ένα πεδίο με μεγάλο ενδιαφέρον. Η μελέτη του θα μπορούσε να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε καλύτερα την

λειτουργία του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών, καθώς και του ρόλου του σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ και του αμφιβληστροειδούς.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι τα κανναβινοειδή παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές επιδράσεις σε αρκετά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, ενισχύοντας την βιωσιμότητα διαφορετικών κυτταρικών τύπων στον αμφιβληστροειδή (για ανασκόπηση βλ. Kokona και συν., 2016). Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, συνέβαλαν στην αναγνώριση των νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων καναβινοειδών όπως, η AEA, η 2-AG και το HU-210, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυων (Kokona και συν., 2015). Παράλληλα εκτός από την οξεία χορήγηση των κανναβινοειδών, δεδομένα υποδεικνύουν πως και η χρόνια αλλά και η υποχρόνια συστηματική χορήγησή τους μπορεί να παρέχει προστασία στον αμφιβληστροειδή (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Ωστόσο μεγάλο μέρος των ερευνών υποστηρίζει ότι η χρόνια και η υποχρόνια χορήγηση κανναβινοειδών, επάγει την μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου (Dalton και συν., 2009· de Fonseca και συν., 1994). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται, μέσα από ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις και στον αμφιβληστροειδή επίμυων, όπου οι CB1 υποδοχείς υφίστανται μειορύθμιση μετά από χρόνια και υποχρόνια χορήγηση ενδογενών ή συνθετικών κανναβινοειδών (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι Α) να διερευνηθούν οι πιθανές νευροπροστατευτικές δράσεις του συνθετικού κανναβινοειδούς WIN55,212-2 , μετά από οξεία και υποχρόνια (4 ημέρες) χορήγηση, στο in vivo μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας και Β) να ελεγχθούν οι επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στην έκφραση του CB1 υποδοχέα, στον υγιή αμφιβληστροειδή και στο μοντέλο του AMPA, σε επίμυες.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Πειραματόζωα και συνθήκες διαβίωσης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί Sprague - Dawley επίμυες, οι οποίοι ζύγιζαν 250-300 gr. Τα ζώα στεγάζονταν ανά 2-3 σε κάθε κλωβό ανάλογα με το φύλο τους. Η θερμοκρασία στο ζωοκομείο ήταν σταθερή στους 22±2ºC, ενώ υπήρχε και ένας 12ωρος κύκλος εναλλαγής φωτός-σκότους, όπου τα φώτα άναβαν στις 08:00 am και έσβηναν στις 20:00 pm. Η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα κατά βούληση. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τις ελληνικές διατάξεις (Animal Act., P.D. 160/1991, ΦΕΚ Α 127/2010) και τις διατάξεις της εταιρείας ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) για τη χρήση των πειραματόζωων.

3.2. Ουσίες

Για τις ενδοφθάλμιες εγχύσεις και την πρόκληση διεγερσιτοξικότητας, χρησιμοποιήθηκε το διεγερτικό αμινοξύ (RS)-a-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA, Tocris), το οποίο διαλύθηκε σε water for injection. Επιπροσθέτως για τις ενδοφθάλμιες εγχύσεις χρησιμοποιήθηκε το (+)WIN 55,212-2 (mesylate), ένας αγωνιστής των CB1/CB2 υποδοχέων, διαλυμένο αρχικά σε DMSO και έπειτα σε PBS (50 mM). Για τα πειράματα της υποχρόνιας, ενδοπεριτοναϊκής (i.p) χορήγησης, το (+)WIN 55,212-2 (mesylate), διαλύθηκε αρχικά σε DMSO και έπειτα σε water for injection (wfi).

3.3. Πειράματα

Στα πλαίσια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν τρία επιμέρους πειράματα:

Α. Στο πρώτο πείραμα ελέγθηκαν οι δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στη βιωσιμότητα οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας.

Β. Στο δεύτερο πείραμα εξετάσθηκαν οι δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις οι δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις της υποχρόνιας (4 ημέρες), i.p χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιή αμφιβληστροειδή.

Γ. Στο τρίτο πείραμα μελετήθηκαν οι οι δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην βιωσιμότητα οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων και στην έκφραση του CB1 υποδοχέα, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας.

Για το σκοπό του πρώτου πειράματος, τη μελέτη της δοσοεξαρτώμενης δράσης του (+)WIN 55,212-2 έναντι της διεγερσιτοξικότητας, διαφορετικές δόσεις του WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} & 10^{-4}M) συγχορηγήθηκαν ενδοφθάλμια με το AMPA σε μία ομάδα πειραματόζωων. Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές εγχύσεις σε κάθε οφθαλμό. Για παράδειγμα ένα ζώο μπορεί να λάμβανε PBS στο δεξί του μάτι και AMPA στο αριστερό. Οι οφθαλμοί, ανάλογα με την χορήγηση που λάμβαναν, χωρίστηκαν σε τρείς βασικές ομάδες:

1. Οφθαλμοί στους οποίους πραγματοποιήθηκε έγχυση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS (50 mM K2HPO4/NaH2PO4, 0.9% NaCl, pH 7.4), οι οποίοι αποτελούν την ομάδα ελέγχου (CTRL) (n=14).

2. Οφθαλμοί που έλαβαν εγχύσεις AMPA (42 nmol ανά οφθαλμό, διαλυμένα σε 50 mM PBS, Tocris, Bristol UK) (n=12).

3. Οφθαλμοί στους οποίους πραγματοποιήθηκε συγχορήγηση του AMPA (30 mM), με μία από τις ακόλουθες δόσεις του WIN55,212-2: 10^{-6} M (n=6), 10^{-5} M (n=6) & 10^{-4} M (n=8).

Παράλληλα, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι επιδράσεις του WIN55,212-2 διαμεσολαβούνται μέσω του CB1 υποδοχέα, στους οφθαλμούς μιας άλλης ομάδας πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε ενδοφθάλμια συγχορήγηση του AMPA(8.4 mM), του WIN55,212-2 στην δόση 10^{-5} M και του ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή των CB1 υποδοχέων, AM251 στην δόση 10^{-4} M (n=4).

Τα πειραματόζωα του πρώτου πειράματος, θανατώθηκαν 24 ώρες μετά τις ενδοφθάλμιες εγχύσεις με εισπνοή διαιθυλαιθέρα και τα μάτια τους αφαιρέθηκαν. Αφού αφαιρέθηκε ο πρόσθιος πόλος (κερατοειδής χιτώνας, υδατοειδές υγρό, φακός, υαλώδες υγρό), ο οπίσθιος πόλος (σκληρός, χοριοειδής και αμφιβληστροειδής χιτώνας) του εκάστοτε ματιού συνελέγη για να υποβληθεί σε ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις με την χρήση αντισωμάτων έναντι της bNOS (brain nitric oxide synthase/ συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου), η οποία εκφράζεται από ορισμένους πληθυσμούς βραχύινων κυττάρων), της calbindin (CB D-28K, μια πρωτεΐνη που προσδένει ασβέστιο και εκφράζεται από GABAεργικά οριζόντια και βραχύινα κύτταρα) και της Iba1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1), μιας πρωτεΐνης που εντοπίζεται στη μικρογλοία και προσδένει ασβέστιο (Ohsawa και συν., 2004).

Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση του χρονοδιαγράμματος που ακολουθήθηκε για τα πειραματόζωα του πρώτου πειράματος, στο οποίο μελετήθηκαν οι επιδράσεις της ενδοφθάλμιας χορήγησης του WIN55,212-2, στο AMPA μοντέλο της διεγερσιτοξικότητας.

Στο δεύτερο πείραμα, όπου εξετάστηκαν οι δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις της υποχρόνιας i.p χορήγησης του WIN55,212-2 στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιή αμφιβληστροειδή, τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Τα ζώα της ομάδας ελέγχου έλαβαν i.p χορηγήσεις εκδόχου (wfi + DMSO) (n=11), ενώ τα ζώα της πειραμτικής ομάδας έλαβαν χορηγήσεις WIN55,212-2 (διαλυμένο σε έκδοχο), στις δόσεις 25 (n=5), 50 (n=4) ή 100 μg/kg (n=5).

Εικοσιτέσσερις ώρες (24 ώρες) μετά την τελευταία i.p χορήγηση τα πειραματόζωα θανατώθηκαν και λήφθηκαν οι οφθαλμοί τους. Ο ένας οφθαλμός κρατήθηκε για μεταγενέστερες ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις, με την χρήση αντισώματος έναντι του CB1 υποδοχέα, ενώ από τον άλλο αφαιρέθηκε ο αμφιβληστροειδής για μελλοντική ανάλυσή του, με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot).

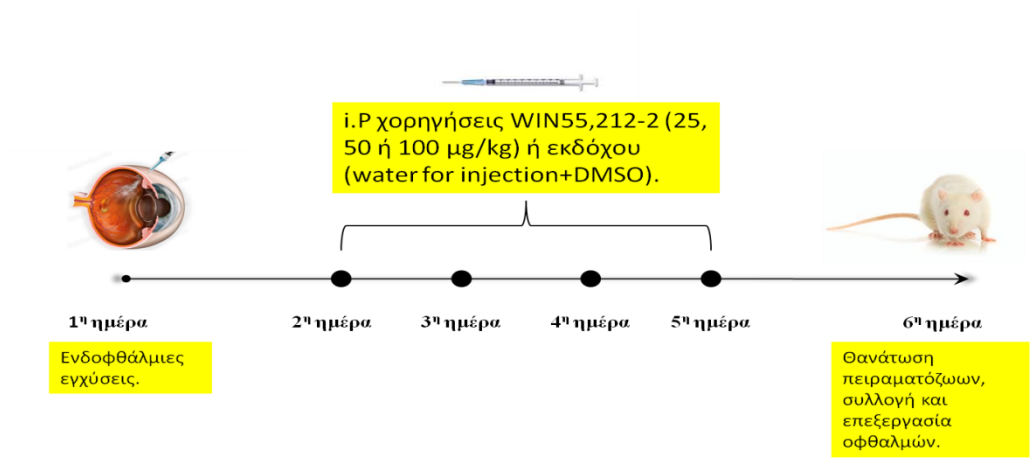
Στο τρίτο πείραμα εξετάσθηκαν οι επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, τόσο στην προστασία των κυττάρων, όσο και στην έκφραση του CB1 υποδοχέα, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις είτε PBS (50 mM) για τα ζώα της ομάδας ελέγχου είτε AMPA (8.4 mM). Κάθε ζώο λάμβανε ενδοφθάλμια έγχυση με τον ίδιο παράγοντα και στους δύο οφθαλμούς του. Μετά το πέρας 24 ωρών από τις ενδοφθάλμιες εγχύσεις, πραγματοποιήθηκαν για 4 ημέρες, i.p χορηγήσεις είτε εκδόχου είτε WIN55,212-2 στις δόσεις 25 και 100 μg/kg. Με βάση τον παραπάνω πειραματικό σχεδιασμό, δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες πειραματόζωων, οι οποίες είχαν ως εξής:

1. Πειραματόζωα που έλαβαν ενδοφθάλμια εγχύσεις PBS (50 mM) και έπειτα i.p χορηγήσεις εκδόχου (n=5).

2. Πειραματόζωα που έλαβαν ενδοφθάλμια εγχύσεις AMPA (8.4 mM) και ακολούθως i.p χορηγήσεις εκδόχου (n=4).

3. Πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε ενδοφθάλμιες εγχύσεις AMPA (8.4 mM) και ύστερα σε i.p χορηγήσεις WIN55,212-2 στις δόσεις 25 μg/kg (n=4) και 100 μg/kg (n=3).

Μία ημέρα μετά την τελευταία i.p χορήγηση τα ζώα θανατώθηκαν και λήφθηκαν οι οφθαλμοί τους. Ένας οφθαλμός από κάθε ζώο χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή ανοσοϊστοχημικών μελετών με αντισώματα έναντι της bNOS, της calbindin και του CB1 υποδοχέα, ενώ το άλλο χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική ανάλυση των επιπέδων του CB1, με την χρήση της Western Blot.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση του χρονοδιαγράμματος που ακολουθήθηκε για την μελέτη των επιδράσεων του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA, μετά από υποχρόνια χορήγησή του.

3.4. Μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας.

Για την πρόκληση διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή, χρησιμοποιήθηκε το in vivo μοντέλο του AMPA (Kiagiadaki & Thermos, 2008). Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με i.p χορήγηση κεταμίνης (100 mg/kg) και ξυλαζίνης (10 mg/kg). Μετά την επίτευξη αναισθησίας τοποθετήθηκαν στην στερεοταξική συσκευή, με σκοπό την ακινητοποίηση της κεφαλής τους, ώστε να πραγματοποιηθούν οι ενδοφθάλμιες εγχύσεις. Οι εγχύσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση βελόνων 27G συνδεδεμένων μέσω ενός λεπτού σωληνίσκου σιλικόνης με μία σύριγγα Hamilton. Η σύριγγα ήταν προσαρμοσμένη σε μία

αντλία σταθερής ροής (minipump, CMA Microdialysis Ltd). Για την επίτευξη των εγχύσεων η βελόνα εισερχόταν λίγο πίσω από το όριο του σκληρού με τον κερατοειδή, επί σκληρού, μέσα στο υαλώδες σώμα του οφθαλμού. Κάθε οφθαλμός λάμβανε 5 μl είτε PBS (50 mM), είτε AMPA (8.4 mM, 42 nmol ανά οφθαλμό, διαλυμένα σε PBS 50 mM), ή AMPA μαζί με WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} ή 10^{-4} M, διαλυμένα σε PBS 50 mM). Η ροή των εγχύσεων ήταν σταθερή και ορίστηκε ως 1μl/min, ενώ κάθε έγχυση διαρκούσε 5 min.

Για την μελέτη των επιδράσεων της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA, τα πειραματόζωα θανατώθηκαν 24 ώρες μετά τις ενδοφθάλμιες εγχύσεις, ενώ για την μελέτη των επιδράσεων της υποχρόνιας χορήγησης WIN55,212-2, τα πειραματόζωα θανατώθηκαν 24 ώρες μετά την τελευταία i.p χορήγηση του φαρμάκου.

3.5. Αφαίρεση και προετοιμασία ιστών

Για τα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας, οι οφθαλμοί αφού αφαιρέθηκαν, τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0.1 M). Με την βοήθεια μιας βελόνας 21G, πραγματοποιήθηκε διάτρηση στο κεντρικό σημείο του κερατοειδούς, προκειμένου να εισέλθει στο εσωτερικό του οφθαλμού η παραφολμαλδεΰδη (PFA). Ακολούθως οι οφθαλμοί επωάστηκαν για 45 min σε διάλυμα PFA(4%). Ύστερα, ο πρόσθιος πόλος των οφθαλμών αφαιρέθηκε και ο οπίσθιος πόλος (που εμπεριέχει και τον αμφιβληστροειδή), τοποθετήθηκε προς μονιμοποίηση στην PFA (4%) για 1 h και 30 min. Μετά την επίτευξη της μονιμοποίησης, οι ιστοί επωάστηκαν overnight σε διάλυμα σουκρόζης 30% (διαλυμένης σε PB 0.1 M), για την επίτευξη κρυοπροστασίας. Εν συνεχεία ακολούθησε η ψύξη των ιστών, με την τοποθέτηση σε αυτούς OCT (optimal cutting temperature compound) και την εμβύθισή τους για 1 min σε ισοπεντάνιο, στους -45ºC. Οι παγωμένοι ιστοί αποθηκεύτηκαν στους -80ºC, μέχρι την κοπή τους. Για τις ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις που ακολούθησαν, λήφθηκαν κάθετες τομές πάχους 10 μm, στους -25ºC με την χρήση κρυοτόμου (Leica). Οι τομές από κάθε οφθαλμό, συνελέγησαν σε 4 ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες (6 τομές σε κάθε πλάκα), με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε πλάκα να περιέχει αντιπροσωπευτικό αριθμό τομών από τον κεντρικό αμφιβληστροειδή. Τέλος οι τομές τοποθετήθηκαν στους -20ºC μέχρι την διεξαγωγή των ανοσοϊστοχημικών αναλύσεων.

Για τις αναλύσεις με την χρήση Western Blot, οι οφθαλμοί αφού αφαιρέθηκαν, τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0.1 M). Ακολούθως με την χρήση ενός νυστεριού, πραγματοποιήθηκε μια τομή στο επίπεδο του κερατοειδούς και ο πρόσθιος πόλος των οφθαλμών, αφαιρέθηκε. Με την βοήθεια μίας σπάτουλας ο αμφιβληστροειδής απομακρύνθηκε από τον οπίσθιο πόλο των οφθαλμών και αποθηκεύτηκε στους -80ºC, μέχρι την μελλοντική ανάλυσή του.

3.6. Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, αφού πλύθηκαν σχολαστικά με dH_2O αφέθηκαν να στεγνώσουν για ένα 24ωρο στους 30ºC. Στην συνέχεια η ζελατινοποίηση πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα 0.5% w/v ζελατίνης (~300 bloom, Merck) και 1mM θειϊκού χρωμιούχου καλίου (Merck), το οποίο βρισκόταν σε θερμοκρασία 62-67 °C. Οι πλάκες αφέθηκαν στους 30ºC για ένα 24ωρο, έως ότου πήξει η ζελατίνη.

3.7. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές, αρχικά αφέθηκαν ώστε να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις, 10 min η κάθε μια, με την χρήση TBS (0.1 M, pH=7.4) και ακολούθησε επώαση σε 3,3% φυσιολογικό ορό αίγας (NGS, normal goat serum, διαλυμένου σε TBS 0,1M), προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του πρώτου αντισώματος. Ύστερα πραγματοποιήθηκαν τρείς πλύσεις (5 min η κάθε μια) με TBS (0.1 M). Ακολούθως, οι τομές επωάστηκαν στα εκάστοτε πρωτογενή αντισώματα για 16-18 h. Τα πρωτογενή αντισώματα διαλύθηκαν σε διάλυμα 0, 5% NGS και 0, 3% Triton X-100 σε TBS 0,1M. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν:

1. πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλια, έναντι της bNOS (σε αραίωση 1:2000, Sigma), για τη σήμανση των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν bNOS .
2. πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλια, έναντι του CB1 (σε αραίωση 1:300, Abcam).
3. πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλια, έναντι της calbindin (σε αραίωση 1:1000, Millipore).
4. πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλια, έναντι της Iba1(σε αραίωση 1:500, Biocare/CP290A).

Μετά το πέρας της επώασης των τομών στο πρωτογενές αντίσωμα, ακολούθησαν τρεις 5λεπτες πλύσεις με TBS (0.1 M) και ύστερα επώαση για 1h και 30min στο δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα CF543, το οποίο είναι αντίσωμα ανεπτυγμένο σε αίγα, έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού (σε αραίωση 1:1000, Biotium). Τέλος, μετά την επώαση στο δευτερογενές αντίσωμα, πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις (5 min η κάθε μία) και οι τομές καλύφθηκαν με την χρήση, μέσου κάλυψης φθορισμού (mounting medium) DAPI και επικαλυπτρίδων. Οι τομές φυλάχθηκαν σε σκοτεινές θήκες, εντός του ψυγείου, μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

3.8. Μικροσκοπία

Για την ανάλυση των τομών μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού και λήφθηκαν φωτογραφίες με την χρήση κάμερας (Leica DC 300F 40/0.70; Leica DMLB). Ακολούθως με την βοήθεια του προγράμματος Adobe Photoshop ver. 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA), πραγματοποιήθηκαν οι ρυθμίσεις διαφόρων παραμέτρων των φωτογραφιών, όπως η φωτεινότητα και η αντίθεση.

Για την bNOS ανοσοϊστοχημεία, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων θετικών στην bNOS, σε τρεις τομές ανά οφθαλμό, σε όλο το μήκος του αμφιβληστροειδούς. Για κάθε οφθαλμό προέκυπτε μία τιμή, η οποία ήταν ο μέσος όρος των τιμών που προέρχονταν από τις τρεις τομές. Τα κύτταρα εντοπίστηκαν κατά κύριο λόγο στην στιβάδα INL και δευτερευόντως ορισμένα από αυτά ήταν παρόντα στις στιβάδες IPL και GCL (έκτοπα κύτταρα).

Για την ποσοτικοποίηση του σήματος του CB1 υποδοχέα, λήφθηκαν συνολικά έξι φωτογραφίες ανά οφθαλμό (δύο φωτογραφίες ανά τομή και συνολικά υπολογίστηκαν τρεις τομές σε κάθε οφθαλμό). Ακολούθως πραγματοποιήθηκε περικοπή στις φωτογραφίες με την χρήση του προγράμματος Adobe Photoshop ver. 7.0, ώστε να έχουν όλες τις ίδιες διαστάσεις και να είναι συγκρίσιμες. Με την χρήση του προγράμματος ImageJ, απομονώθηκε η GCL και υπολογίστηκε το ποσοστό του φθορισμού της. Κατ' αυτόν τον τρόπο προέκυψαν έξι τιμές για κάθε οφθαλμό, ο μέσος όρος των οποίων αποτελούσε και την τελική τιμή για κάθε οφθαλμό. Ο ανοσοφθορισμός του CB1 εντοπίστηκε στις στιβάδες OPL, INL, IPL και GCL. Για την ποσοτικοποίηση όπως είδαμε επιλέχθηκε η GCL, καθώς είχε το εντονότερο σήμα από τις υπόλοιπες και επιπροσθέτως γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι η παρουσία του CB1 είναι πιο εκτεταμένη στην GCL (Straiker et al., 1999).

Στην ανοσοϊστοχημεία της calbindin, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία με αυτήν που παρουσιάστηκε προηγουμένως για τον CB1 υποδοχέα, με την μόνη διαφορά ότι εδώ το σήμα υπολογίστηκε από τις στιβάδες OPL και INL και όχι από την GCL. Η χρώση της calbindin, σήμανε οριζόντια κύτταρα στα σύνορα την INL με την OPL, τους άξονές τους στην OPL και βραχύινα κύτταρα στα όρια της INL με την IPL.

Όσον αφορά την Iba1, η λήψη των φωτογραφιών έγινε με αντίστοιχο τρόπο με αυτόν του CB1 και της calbindin, με την χρήση όμως του 20άρη φακού του μικροσκοπίου. Επιπροσθέτως για κάθε τομή, εκτός από την φωτογραφία της Iba1, λήφθηκε και μία για την DAPI, στην οποία απεικονίζονταν οι πυρήνες όλων των κυττάρων. Ύστερα οι φωτογραφίες της Iba1 ενώθηκαν με τις αντίστοιχες της DAPI, με τη χρήση του ImageJ, προκειμένου να γίνουν πλήρως εμφανή τα κύτταρα της μικρογλοίας. Σε δεύτερο χρόνο πραγματοποιήθηκε

καταμέτρηση των κυττάρων τόσο της ενεργοποιημένης (στρογγυλό σχήμα), όσο και της απενεργοποιημένης μικρογλοίας (χαρακτηριστικές δομές στο μικροσκόπιο με αποφυάδες που έχουν το σχήμα βεντάλιας). Με την χρήση του ImageJ, υπολογίστηκε το εμβαδόν(μm^2) της περιοχής της εκάστοτε τομής, στην οποία βρίσκονταν τα κύτταρα της μικρογλοίας και αποτελούταν από τις στιβάδες OPL, INL, IPL και GCL. Τα κύτταρα που εντοπίζονταν εκτός των ορίων που ορίζονταν από τις προαναφερθείσες στιβάδες (όπως για παράδειγμα στον σκληρό χιτώνα), δεν συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε μόνο ο αριθμός των κυττάρων της ενεργοποιημένης μικρογλοίας, ο οποίος συνυπολογίστηκε και με βάση το εμβαδόν της εκάστοτε τομής. Στην τελική φάση προέκυψαν έξι τιμές για κάθε οφθαλμό, ο μέσος όρος των οποίων αποτέλεσε την τελική τιμή κάθε οφθαλμό.

3.9. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα από τις μελέτες ποσοτικοποίησης των ανοσοϊστοχημικών αναλύσεων, εκφράστηκαν ως ποσοστό επί της % των CTRL (100%) και για την στατιστική ανάλυσή τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA). Αναλυτικότερα, οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν με την χρήση Μονής Ανάλυσης Διακύμανσης (One Way Anova), ακολουθούμενης από post hoc αναλύσεις, χρησιμοποιώντας το στατιστικό κριτήριο Newman-Keuls. Τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικώς σημαντικά, εάν $p<0.05$. Τέλος για την παρουσίαση των δεδομένων, επιλέχθηκαν ραβδογράμματα, στα οποία κάθε ράβδος αντιπροσώπευε τον μέσο όρο κάθε ομάδας, συμπεριλαμβανομένου και του τυπικού σφάλματος (standar error of the mean, S.E.M).

3.10. Western Blot

Τα πειράματα της Western, πραγματοποιήθηκαν από την Σοφία Παπαδογκωνάκη.

3.10.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Σε δείγματα αμφιβληστροειδών προστέθηκαν 500 μL ειδικού διαλύματος, που επάγει τη λύση των ιστών (lysis buffer), το οποίο περιείχε 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% DOC, 0.1 mM PMSF και ένα μείγμα από αναστολείς πρωτεασών (Sigma) και φωσφατασών (Thermo Scientific). Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού με την χρήση υπερήχων (sonication) και φυγοκέντρηση στα 20.000 g, για 20 min στους 4ºC. Το υπερκείμενο που προέκυψε από την φυγοκέντρηση, συλλέχθηκε και χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη (250 μL το καθένα), όπου στο καθένα προστέθηκαν 1250 μL παγωμένης μεθανόλης και τα δείγματα φυλάχθηκαν για 24 ώρες στους -20ºC. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, συλλέγοντας αυτήν την φορά το ίζημα. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 30 μL Laemnli sample buffer, αποτελούμενο από 0.1 M

Tris-HCl pH: 7.5, 4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20ºC, μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

3.10.2. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε νερό, θερμοκρασίας 55-60ºC. Ακολούθως 10 μL από κάθε δείγμα φορτώθηκαν στο gel επιστίβαξης, που περιείχε 4% ακρυλαμίδη. Στην συνέχεια με την εφαρμογή ρεύματος σταθερής τάσης 85V, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση, μέχρι τα δείγματα να κατέβουν στο επίπεδο του gel διαχωρισμού, το οποίο περιείχε 12.5% ακρυλαμιδη. Μόλις τα δείγματα έφταναν στο gel διαχωρισμού, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιηθηκε στα 110V. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν στο gel διαχωρισμού με βάση το μοριακό τους βάρος. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των gel, πραγματοποιήθηκε μέσα σε running buffer.

3.10.3. Ανοσοαποτύπωση

Κατά την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel διαχωρισμού σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Macherey-Nagel, Düren, Germany), με την εφαρμογή ρεύματος εντάσεως 350mA, για 1 h και 15 min στους 4ºC. Μετά τη μεταφορά τους, η μεμβράνη επωάστηκε σε διάλυμα BSA 3% (bovine serum albumin), προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης για το πρωτογενές αντίσωμα. Έπειτα ακολούθησαν 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBST (10 min η κάθε μία) και στην συνέχεια επώαση στο πρωτογενές αντίσωμα, στους 4ºC, μέχρι την επόμενη ημέρα. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλια, έναντι του CB1 υποδοχέα (Abcam), σε αραίωση 1:200.

Στην συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε σε HRP- δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο περοξειδάση , ανεπτυγμένο σε κατσίκα, έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού (σε αραίωση 1:5000, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την πρόσθεση ECL (LumiSensor Chemiluminescent HRP Substrate Kit, Genscript), του υποστρώματος δηλαδή της περοξειδάσης. Προκειμένου να ομαλοποιηθούν τα επίπεδα του CB1 υποδοχέα στην μεμβράνη, πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης σε stripping buffer και στην συνέχεια σε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού, έναντι της GAPDH (Cell Signaling), σε αραίωση 1:1000.Τέλος ακολούθησε επανάληψη της διαδικασίας επώασης στο δευτερογενές αντίσωμα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ. Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως η αναλογία CB1/GAPDH, προκειμένου η παρουσία του CB1 να παρουσιαστεί ομαλοποιημένη ως προς τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης.

3.11. Διαλύματα

PB 0,2M (Vτελ. = 600 ml)

2,76gr NaH2PO4 + ddH_2O (Vτελ.= 100ml) (διάλυμα 1)

17,42gr K2HPO4 + ddH_2O (Vτελ.= 500ml) (διάλυμα 2)

Ενώνουμε το διάλυμα 1 και 2 για να φτάσουμε στον τελικό όγκο των 600 ml του PB 0.2M

PBS 50mM (Vτελ. = 100 ml)

0.9gr NaCl

0.2M PB 25ml

PBS 0,1M (Vτελ. = 200 ml)

1,8gr NaCl

0.2M PB 100ml

TBS 0,1M (Vτελ. = 500 ml)

6,055gr Trisma Base

4,5gr NaCl

Διάλυμα ζελατίνης (Vτελ.=1L)

5gr ζελατίνης

0.5gr Chrom Alum (AlCrO3)

Διάλυμα σουκρόζης 30% (Vτελ.=10ml)

3gr σουκρόζης

0.1M PB (10ml)

PFA 4% (Vτελ. = 100 ml)

(40ml ddH2O + 4gr PFA → ανάδευση στους 55ºC) + 4 σταγόνες NaOH 4% + ddH2O σε τελικό όγκο 50ml. Προσθήκη επιπλέον 50ml PB 0,2M και φιλτράρισμα.

3.12. Διαλύματα για την ανάλυση κατά Western

1. **Παρασκευή gel επιστίβαξης:**

	Gel επιστίβαξης	**7%**		**10%**		**12.5 %**	
		1 Gel	**2 Gels**	**1 Gel**	**2 Gels**	**1 Gel**	**2 Gels**
1º	**dH_2O**	4.72 mL	9.44 mL	3.85 mL	7.7 mL	3.125 mL	6.25 mL
2º	**1.5M TRIS-HCl pH=8.8**	1.875 mL	3.75 mL	1.875 mL	3.75 mL	1.875 mL	3.75 mL
3º	**Acrylamide (30%)**	2.03 mL	4.06 mL	2.9 mL	5.8 mL	3.625 mL	7.25 mL
4º	**SDS (20%)**	37.5 μL	75 μL	37.5 μL	75 μL	37.5 μL	75 μL
5º	**TEMED**	3.75 μL	7.5 μL	3.75 μL	7.5 μL	3.75 μL	7.5 μL
6º	**APS (10%)**	37.5 μL	75 μL	37.5 μL	75 μL	37.5 μL	75 μL

2. **Παρασκευή gel διαχωρισμού:**

Gel διαχωρισμού 4 %	**1 Gel**	**2 Gels**
dH_2O	2.035 mL	4.61 mL
0.5M TRIS-HCl pH=6.8	0.937 mL	1.875 mL
Acrylamide (30%)	0.502 mL	1.005 mL
SDS (20%)	18.75 μL	37.5 μL
TEMED	3.75 μL	7.5 μL
APS (10%)	18.75 μL	37.5 μL

3. **Διαλύματα:**

TBS 10X (Vτελ. = 1L)

23.02 g TRIS-HCl (TRIZMA BASE; Sigma; Mw = 121,14g/mol)

80 g NaCl

2.01 g KCl

Ρύθμιση pH στο 7.4

TBST (Vτελ. = 500 mL)

50 mL TBS 10X

450 mL dH_2O

250 μL Tween-20

Running Buffer 10X (Vτελ. = 1L)

30.3 g TRIS-HCl (TRIZMA BASE; Sigma; Mw = 121,14 g/mol). Adjust pH at 8.3

144.2 g Glycine (Sigma; Mw = 75,07 g/mol)

10 g SDS (Dodecylsulfate.Na-salt; SERVA; Mw = 288,4 g/mol)

1 L dH_2O (V_f = 1L)

Για την παρασκευή Running Buffer 1X (το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα), προσθέτουμε 100 ml Running Buffer 10X + 900 ml d H_2O.

Transfer Buffer 10X (Vτελ. = 1L)

30.3 g TRIS-HCl (TRIZMA BASE; Sigma; Mw = 121,14 g/mol).

144.2 g Glycine (Sigma; Mw = 75,07 g/mol)

Ρύθμιση του pH στο 8.3.

Για την παρασκευή Transfer Buffer 1X (το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα), προσθέτουμε 100 ml Transfer Buffer 10X + 100 ml μεθανόλη + 800 ml d H_2O.

Laemmli sample buffer 2X (Vτελ. = 50 mL)

5mL 1M Tris-HCl pH:7.4

20 mL SDS 10%

0.1 gr bromophenol blue

10 mL glycerol 100%

15 mL dH_2O

TRIS-HCL 0.5M pH 6.8:

3.02 g TRIS-HCl (TRIZMA BASE; Sigma; Mw = 121,14g/mol)

50 ml dH_2O ($V_{τελ.}$ = 50ml)

Ρύθμιση του pH στο 6.8

TRIS-HCL 1.5M pH 8.8:

9.08 g TRIS-HCl (TRIZMA BASE; Sigma; Mw = 121,14g/mol)

50 ml dH_2O ($V_{τελ.}$ = 50ml)

Ρύθμιση του pH στο 8.8

Mild Stripping buffer (Vτελ. = 100 ml)

1.5 g Glycine

0.1 g SDS

1 ml Tween20

100 ml dH_2O

Ρύθμιση του pH στο 2.2

Harsh Stripping buffer pH 6.8 (Vτελ. = 100 mL)

20 mL SDS 10%

12.5 mL TRIS-HCl pH 6.8

67.5 mL dH_2O

0.8 mL β-ME

SDS 20% (Vτελ. = 10 mL)

2 g SDS (Dodecylsulfate.Na-salt; SERVA; Mw = 288,4 g/mol)

10 mL dH_2O

APS 10% (Vτελ. = 10 mL)

1 g APS

10 ml dH_2O

Acrylamide 30% (Vτελ.= 100 mL)

Ζεσταίνουμε 60 ml dH_2O στους 37ºC και προσθέτουμε:

29 g Acrylamide (Sigma; Mw = 71,08 g/mol)

1g N,-N'-methylene-bisacrylamide (Fluka; Mw = 154,17 g/mol)

Ρυθμίζουμε τον τελικό όγκο στα 100 ml με dH_2O.

Το pH, θα πρέπει να είναι 7.

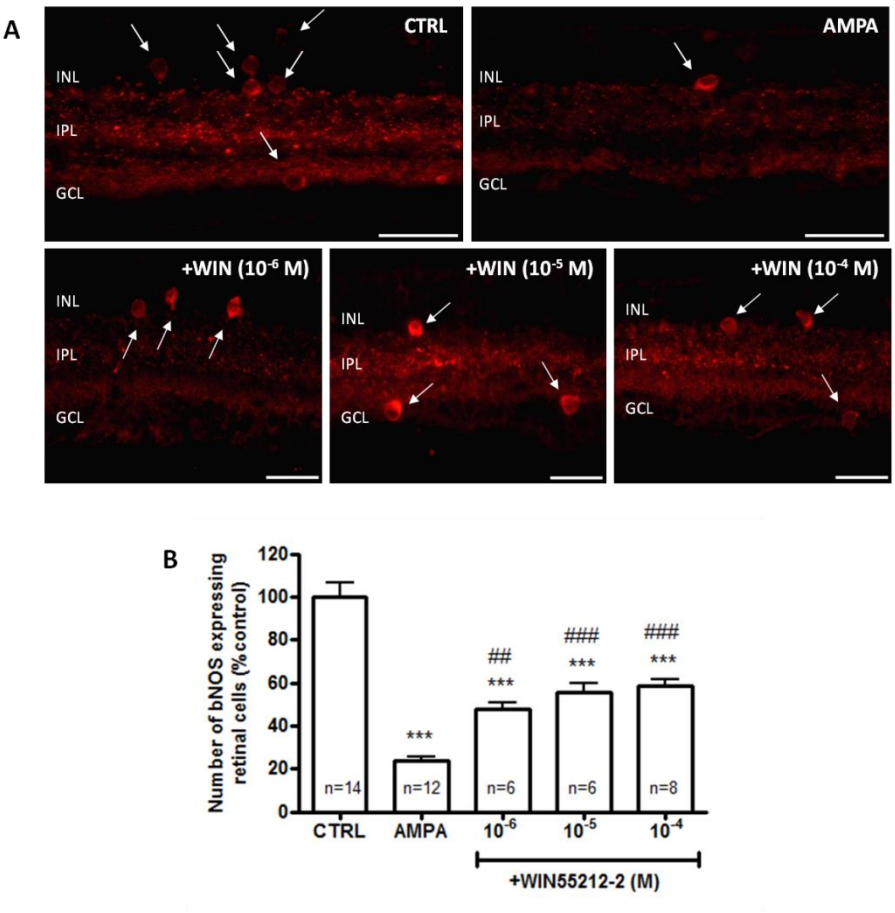
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν οι πιθανές νευροπροστατευτικές επιδράσεις της οξείας και της υποχρόνιας χορήγησης WIN55,212-2 στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή. Για τον σκοπό αυτό διεξήχθησαν ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις με την χρήση αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της bNOS, η οποία εκφράζεται από βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου, έναντι της calbindin, η οποία εκφράζεται από οριζόντια και βραχύινα GABAεργικά κύτταρα και τέλος έναντι της Iba1, η οποία εκφράζεται σε μικρογλοιακά κύτταρα.

Παράλληλα εξετάστηκαν οι επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή, τόσο στον υγιειή ιστό, όσο και στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. Κατ' αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντι του αμινοτελικού άκρου (C-terminus) του CB1 υποδοχέα.

4.1. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας

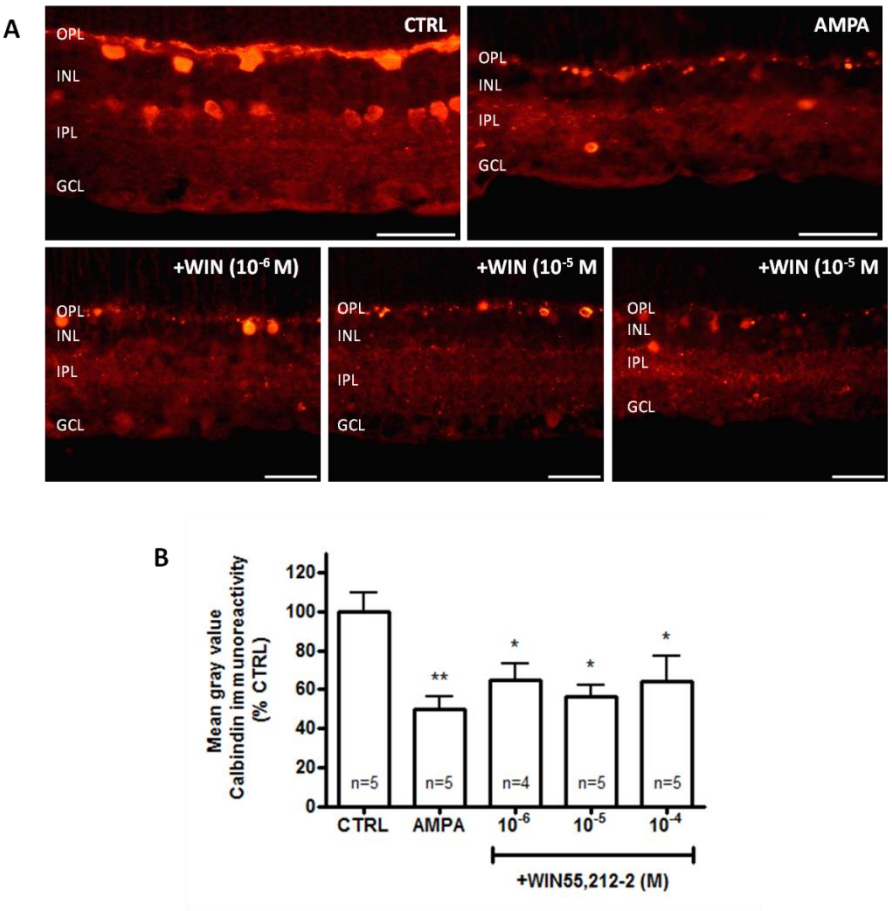
Οι επιδράσεις του αγωνιστή των CB1/CB2 υποδοχέων στο μοντέλο της διεγερσιτοξικότητας , εξετάστηκαν αρχικά μέσω ανοσοϊστοχημικών μελετών, με την χρήση αντισωμάτος έναντι της bNOS. Η ανοσοδραστικότητα της bNOS εντοπίστηκε σε βραχύινα κύτταρα στην INL, καθώς και σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στην GCL (Εικόνα 9A). Η ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA προκάλεσε δραστική μείωση του αριθμού των κυττάρων θετικών για την bNOS, τόσο στην INL, όσο και στην GCL(Εικόνα 9A). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το AMPA προκάλεσε, περίπου 77% μείωση στον αριθμό των κυττάρων (Εικόνα 9B, *** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} και 10^{-4} M) μαζί με το AMPA, παρείχε μερική νευροπροστασία των κυττάρων και στις τρείς δοσεις που χρησιμοποιήθηκαν (10^{-6}M: ## $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA, 10^{-5} και 10^{-4}M: ### $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA) (Εικόνα 9A & 9B). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών δόσεων του WIN55,212-2 , γεγονός που υποδηλώνει την απουσία δοσοεξαρτώμενων επιδράσεων. Ο αριθμός των bNOS εκφράζοντων κυττάρων για τις δόσεις 10^{-6} , 10^{-5} και 10^{-4} M, έφτασε στο 48%, 55% και 58% αντίστοιχα, του επιπέδου των CTRL (Εικόνα 9B), γεγονός που δικαιολογεί τον όρο μερική νευροπροστασία (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL).



Εικόνα 9. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA: bNOS ανοσοδραστικότητα. **A.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα της bNOS. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς η ανοσοδραστικότητα της bNOS εντοπίστηκε σε βραχύινα κύτταρα στην INL και σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στην GCL. Το AMPA μείωσε τον αριθμό των bNOS κυττάρων, ενώ η ενδοφθάλμια συγχορήγηση AMPA+WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} & 10^{-4} M), μείωσε μερικώς την παρατηρούμενη απώλεια των κυττάρων. Τα βέλη υποδεικνύουν βραχύινα κύτταρα θετικά για την bNOS. Κλίμακα: 50 μm. **B**. Μελέτες ποσοτικοποίησης. Το AMPA προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των bNOS κυττάρων κατά 77% (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL), ενώ η συγχορήγησή του μαζί με WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} & 10^{-4} M), παρείχε μερική νευροπροστασία και στις τρείς δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, αυξάνοντας τον αριθμό των b NOS κυττάρων κατά 25% για την δόση 10^{-6}, κατά 32% για την δόση 10^{-5} και κατά 35% για την δόση 10^{-4} σε σύγκριση με το AMPA (### $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA, ## $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA). Ωστόσο ο αριθμός των bNOS κυττάρων δεν επέστρεψε στα επίπεδα του CTRL (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL).

Προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν ότι εκτός από τα βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν bNOS, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας πλήττονται επίσης οριζόντια και βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν calbindin (Kokona και συν., 2012), μία πρωτεΐνη, η οποία προσδένει ασβέστιο (Hamano και συν., 1990). Για αυτόν το λόγο, θελήσαμε να εξετάσουμε τις πιθανές νευροπροστατευκές δράσεις του WIN55,212-2 και γι' αυτόν τον πληθυσμό των κυττάρων.

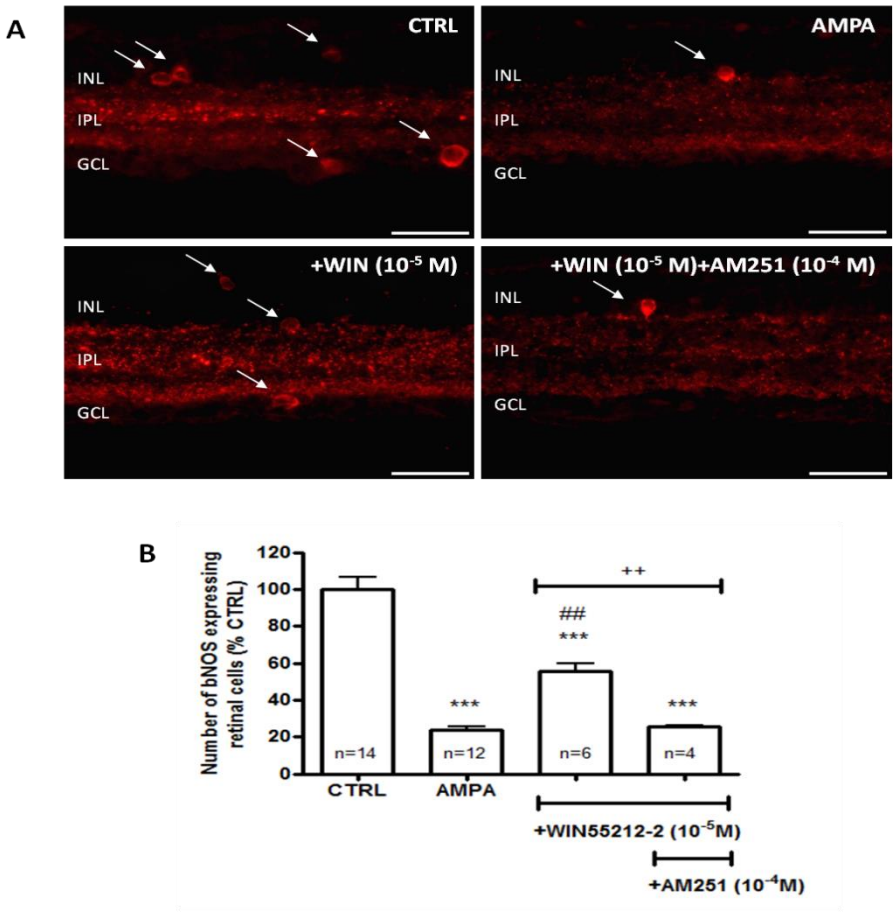
Οι επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στον αμφιβληστροειδή, εξετάστηκαν επίσης με την διεξαγωγή ανοσοϊστοχημικών αναλύσεων, με την χρήση αντισωμάτων έναντι της calbindin. Η ανοσοδραστικότητα της calbindin εντοπίστηκε σε οριζόντια κύτταρα στην INL, στα σύνορά της με την OPL και σε βραχύινα κύτταρα στην INL, στα σύνορά της με την IPL (Εικόνα 10A).Η χορήγηση του AMPA, μείωσε την ανοσοδραστικότητα της calbindin (Εικόνα 10A), περίπου κατά 50% (** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 10B), γεγονός που επιβεβαίωσε την παρουσία, επαγόμενου από το AMPA, κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του WIN55,212-2 με το AMPA, δεν κατόρθωσε να προστατέψει τα κύτταρα που εκφράζουν calbindin, σε καμία από τις τρεις δόσεις (10^{-6} , 10^{-5} και 10^{-4} M) ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA) (Εικόνα 10B). Η μεγαλύτερη επίδραση παρατηρήθηκε στις δόσεις 10^{-6} και 10^{-4} M, όπου το ποσοστό της ανοσοδραστικότητας της calbindin έφτασε στο 64% των επιπέδων του CTRL, ενώ για την δόση 10^{-5} M, το ποσοστό αυτό ήταν 56% (* $p<0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 10B).



Εικόνα 10. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA: calbindin ανοσοδραστικότητα. **A.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα της calbindin. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς η ανοσοδραστικότητα της calbindin εντοπίστηκε σε οριζόντια κύτταρα στην INL, στα όριά της με την OPL, στους άξονές τους στην OPL και σε βραχύινα κύτταρα στην INL, στα όριά της με την IPL. Στις φωτογραφίες φαίνεται η μείωση που προκλήθηκε από το AMPA στην ανοσοδραστικότητα της calbindin, καθώς και η αδυναμία της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 να προστατέψει τα θετικά για την calbindin κύτταρα. Κλίμακα: 50 μm. **B**. Μελέτες ποσοτικοποίησης. Το AMPA μείωσε με στατιστικώς σημαντικό τρόπο την ανοσοδραστικότητα της calbindin κατά 50% (** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Το WIN55,212-2 (10^{-6}, 10^{-5} & 10^{-4} M), συγχορηγούμενο με το AMPA ενδοφθαλμίως, δεν κατόρθωσε να προστατεύσει τα θετικά για την calbindin κύτταρα, σε καμία από τις τρεις δόσεις ($p>0.05$ σε σύγκριση με το την ομάδα AMPA).

4.2.Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του επιλεκτικού ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή AM251 του CB1 υποδοχέα, στις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2

Προκειμένου να εξεταστεί το αν οι νευροπροστατευτικές δράσεις που επέδειξε το WIN55,212-2 στα κύτταρα που εφράζουν bNOS, διαμεσολαβούνται μέσω του CB1 υποδοχέα, σε μία ομάδα οφθαλμών πραγματοποιήθηκε συγχορήγηση AMPA, WIN55,212-2 (10^{-5}M) και AM251 (10^{-4} M). Τα αποτελέσματα από τις ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις έδειξαν, ότι η ενδοφθάλμια συγχορήγηση, AMPA+WIN55,212-2 (10^{-5}M) + AM251 (10^{-4} M), προκάλεσε μείωση της τάξεως του 75% στον αριθμό των bNOS κυττάρων (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL), η οποία μάλιστα ερχόταν σε συμφωνία με τη μείωση που προκάλεσε το AMPA (77% μείωση του αριθμού των κυττάρων, *** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 11A & 11B). Παράλληλα, η παρουσία του ανταγωνιστή AM251 μπλόκαρε τις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2, καθώς παρουσία του ανταγωνιστή, ο αριθμός των κυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένος (++ $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα του WIN55,212-2) (Εικόνα 11A & 11B). Τέλος η συγχορήγηση του AMPA μαζί με WIN55,212-2 (10^{-5} M), κατέφερε να εμποδίσει μερικώς, την επαγόμενη από το AMPA απώλεια των κυττάρων, αυξάνοντας τον αριθμό τους κατά 33% σε σχέση με το AMPA (## $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA), ενώ ο αριθμός των κυττάρων έφτασε στο 55% των επιπέδων του CTRL(*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 11A & 11B).

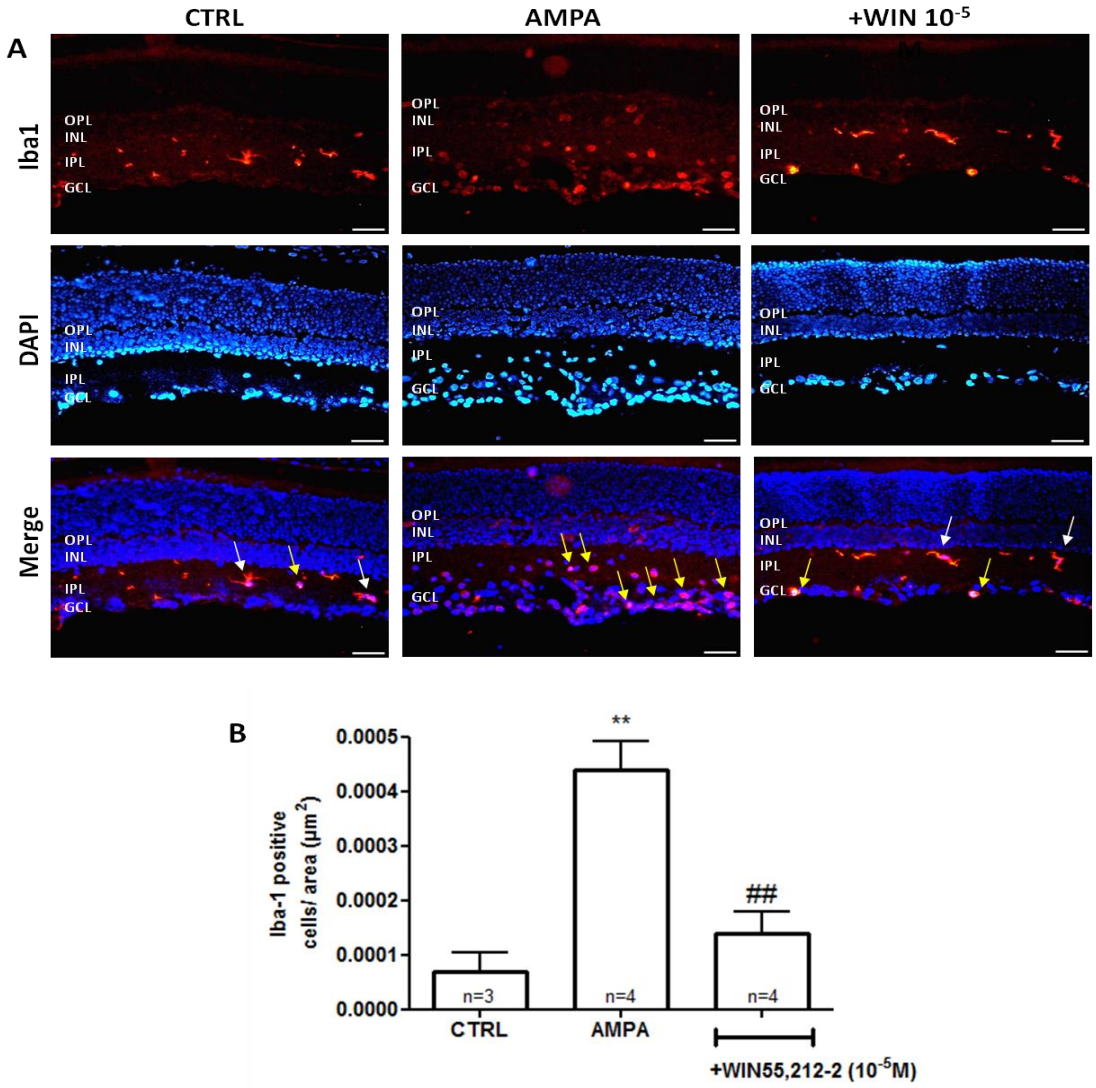


Εικόνα 11. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα, AM251, στις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2: bNOS ανοσοδραστικότητα. **A.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα της bNOS. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς η ανοσοδραστικότητα της bNOS εντοπίστηκε σε βραχύινα κύτταρα στην INL και σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στην GCL. Κλίμακα: 50 μm. **B**. Μελέτες ποσοτικοποίησης. Το AMPA μείωσε τον αριθμό των bNOS κυττάρων κατά 77% (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Η συγχορήγηση του WIN55,212-2 (10^{-5} M) μαζί με το AMPA, αύξησε τον αριθμό των bNOS κυττάρων κατά 33% σε σχέση με το AMPA (## $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA), παρέχοντας μερική νευροπροστασία (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα, AM251 (10^{-4} M), μαζί με AMPA και WIN55,212-2(10^{-5} M), μπλόκαρε τις νευροπροστατευτικές επιδράσεις του WIN55,212-2 στα bNOS κύτταρα [$p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL, ++ $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα WIN55,212-2 (10^{-5} M)].

4.3. Επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερτοξικότητας

Η Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1), μία πρωτεΐνη που προσδένει ασβέστιο και συναντάται στα μικρογλοιακά κύτταρα και στα μακροφάγα (Ohsawa και συν., 2004). Μελέτες έχουν δείξει ότι αποτελεί έναν πολύ αποτελεσματικό δείκτη για τον εντοπισμό της μικρογλοίας σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Ahmed και συν., 2007).

Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις της οξείας χορήγησης του WIN55,212-2 στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας, ορισμένες τομές, που προέρχονταν από τα ζώα που είχαν λάβει ενδοφθάλμιες εγχύσεις PBS (50 m M), AMPA (8.4 m M) ή AMPA+WIN55,212-2 (10^{-5} M), υπεβλήθησαν σε ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις, με την χρήση αντισώματος έναντι της Iba1. Η ανοσοδραστικότητα της Iba1, εντοπίστηκε κυρίως στις στιβάδες OPL, INL, IPL και GCL. Στους CTRL ιστούς η παρουσία κυττάρων ενεργοποιημένης μικρογλοίας ήταν πολύ μικρή, ενώ κατά κύριο λόγο υπήρχαν κύτταρα απενεργοποιημένης μικρογλοίας (Εικόνα 12A). Το AMPA προκάλεσε έντονη αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων, η οποία όμως μειώθηκε από την συγχορήγησή του μαζί με WIN55,212-2 (10^{-5} M) (Εικόνα 12A). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις ανοσοϊστοχημείες, έδειξε ότι η ενδοφθάλμια έγχυση του AMPA αύξησε τον αριθμό των ενεργοποιημένων γλοιακών κυττάρων (** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 12A & 12B). Ωστόσο η ενδοφθάλμια συγχορήγησή του μαζί με WIN55,212-2 (10^{-5} M), εμπόδισε την επαγόμενη από το AMPA αύξηση (## $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA), κρατώντας τον αριθμό των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων σε επίπεδα, παρόμοια με αυτά του CTRL ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 12A & 12B).

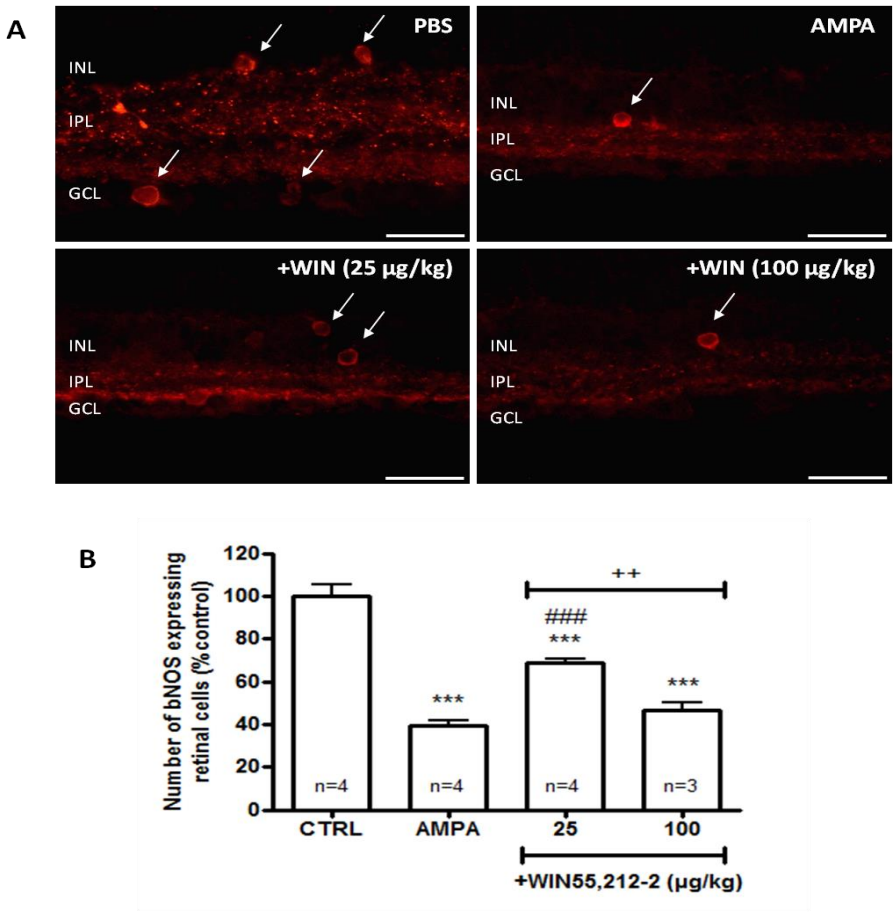


Εικόνα 12. . Επιδράσεις της οξείας χορήγησης WIN55,212-2 στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας, στο μοντέλο του AMPA: Iba1 ανοσοδραστικότητα. Α. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες, στις οποίες φαίνεται η ανοσοδραστικότητα της Iba1, της DAPI (κυτταρικοί πυρήνες) και ο συνεντοπισμός (Merge) μεταξύ των δύο, προκειμένου να γίνουν εμφανή τα κύτταρα της ανενεργής και ενεργής μικρογλοίας. Τα άσπρα βέλη υποδεικνύουν κύτταρα απενεργοποιημένης μικρογλοίας (μωβ σχηματισμοί με κόκκινες αποφυάδες), ενώ τα κίτρινα σηματοδοτούν κύτταρα ενεργοποιημένης μικρογλοίας (μωβ κυκλικοί σχηματισμοί). Στους CTRL αμφιβληστροειδείς και εκείνους στους οποίους συγχορηγήθηκε AMPA+WIN55,212-2 (10^{-5}M), παρατηρήθηκε ελάχιστη παρουσία ενεργής μικρογλοίας. Αντιθέτως, στους αμφιβληστροειδείς που έλαβαν AMPA, η παρουσία της ενεργής μικρογλοίας ήταν αυξημένη Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με την χρήση του 20άρη φακού στο μικροσκόπιο. Κλίμακα: 50μm. Β. Μελέτες ποσοτικοποίησης. Τα δεδομένα εκφράστηκαν, ως ο μέσος όρος ενεργοποιημένων γλοιακών κυττάρων ανά μm^2 ιστού. Η ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA, προκάλεσε ξεκάθαρη αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων γλοιακών κυττάρων (**

p<0.01, σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Η συγχορήγηση AMPA+WIN55,212-2 (10^{-5} M), μείωσε τον αριθμό των ενεργοποιημένων γλοιακών κυττάρων (## p<0.01, σε σύγκριση με την ομάδα AMPA), επαναφέροντάς τον και πάλι στα επίπεδα του CTRL (p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL).

4.4. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας

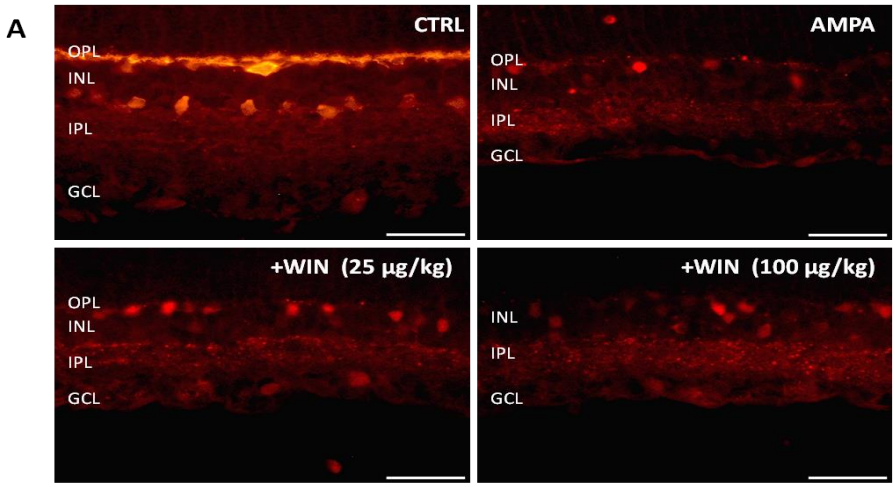
Για την μελέτη των επιδράσεων της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA, τα πειραματόζωα αφού έλαβαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις είτε με PBS (50 mM), είτε με AMPA (8.4 mM), δέχθηκαν i.p χορηγήσεις για 4 ημέρες, είτε με έκδοχο (wfi+DMSO), είτε με WIN55,212-2 (25 και 100 μg/kg). Στις ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις που ακολούθησαν, εκτιμήθηκε αρχικά η ικανότητα του WIN55,212-2 στην προστασία βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν bNOS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το AMPA, μείωσε τον αριθμό των θετικών στην bNOS κυττάρων, κατά 69% (*** p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 13A & 13B). Το WIN55,212-2 στην δόση 100 μg/kg δεν κατόρθωσε να προστατεύσει τα bNOS κύτταρα (p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα AMPA) και ο αριθμός των κυττάρων έφτασε στο 46% των επιπέδων του CTRL (*** p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 13B). Από την άλλη πλευρά η δόση 25 μg/kg του WIN55,212-2, παρείχε μερική νευροπροστασία των bNOS κυττάρων, αυξάνοντας τον αριθμό τους κατά 29% σε σχέση με το AMPA (### p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα AMPA), με τον αριθμό τους να φτάνει στο 68% των επιπέδων των CTRL (Εικόνα 13B). Τέλος, όπως ήταν επόμενο η δόση 25 μg/kg παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά από την δόση των 100 μg/kg (++ p<0.01 σε σύγκριση με τα 100 μg/kg WIN55,212-2) (Εικόνα 13B).

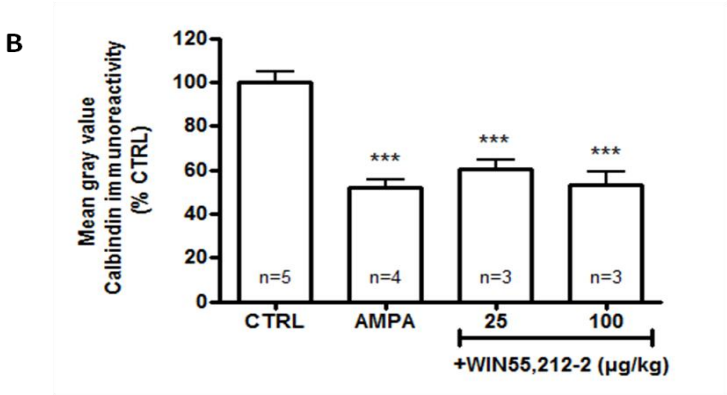


Εικόνα 13. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA: bNOS ανοσοδραστικότητα. **A.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα της bNOS. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς η ανοσοδραστικότητα της bNOS εντοπίστηκε σε βραχύινα κύτταρα στην INL και σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στην GCL. Η ενδοφθάλμια χορήγηση AMPA, μείωσε τον αριθμό των bNOS κυττάρων, ενώ η i.p υποχρόνια χορήγηση του WIN55,212-2 (25 μg/kg), προστάτευσε μερικώς τον ιστό. Κλίμακα: 50 μm. **B.** Μελέτες ποσοτικοποίησης. Το AMPA μείωσε τον αριθμό των bNOS κυττάρων κατά 61% (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Η i.p χορήγηση 25 μg/kg WIN55,212-2 προστάτευσε μερικώς τον ιστό (*** $p<0.001$ σε σύκγριση με την ομάδα CTRL),καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των bNOS κυττάρων κατά 29% σε σχέση με το AMPA (### $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA). Η δόση 100 μg/kg WIN55,212-2 δεν κατόρθωσε να μειώσει την επαγόμενη από το AMPA απώλεια των bNOS κυττάρων (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL, $p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA).

Πέρα από την bNOS, για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, αξιοποιήθηκε και η calbindin. Κατά παρόμοιο τρόπο το AMPA προκάλεσε μείωση του ανοσοφθορισμού της calbindin κατά 49% (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL),

γεγονός που μεταφράζεται ως κυτταρικός θάνατος των θετικών για την calbindin κυττάρων (Εικόνα 14A & 14B). Ωστόσο το WIN55,212 δεν παρείχε προστασία των θετικών στην calbindin κυττάρων, ούτε στην δόση 100 μg/kg (p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα AMPA), ούτε στην δόση των 25 μg/kg (p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα AMPA) (Εικόνα 14A & 14B). Η ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι, για την δόση 100 μg/kg, ο αριθμός των κυττάρων έφτασε στο 53%, ενώ για την δόση 25 μg/kg έφτασε στο 60% των επιπέδων του CTRL (*** p<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 14B).



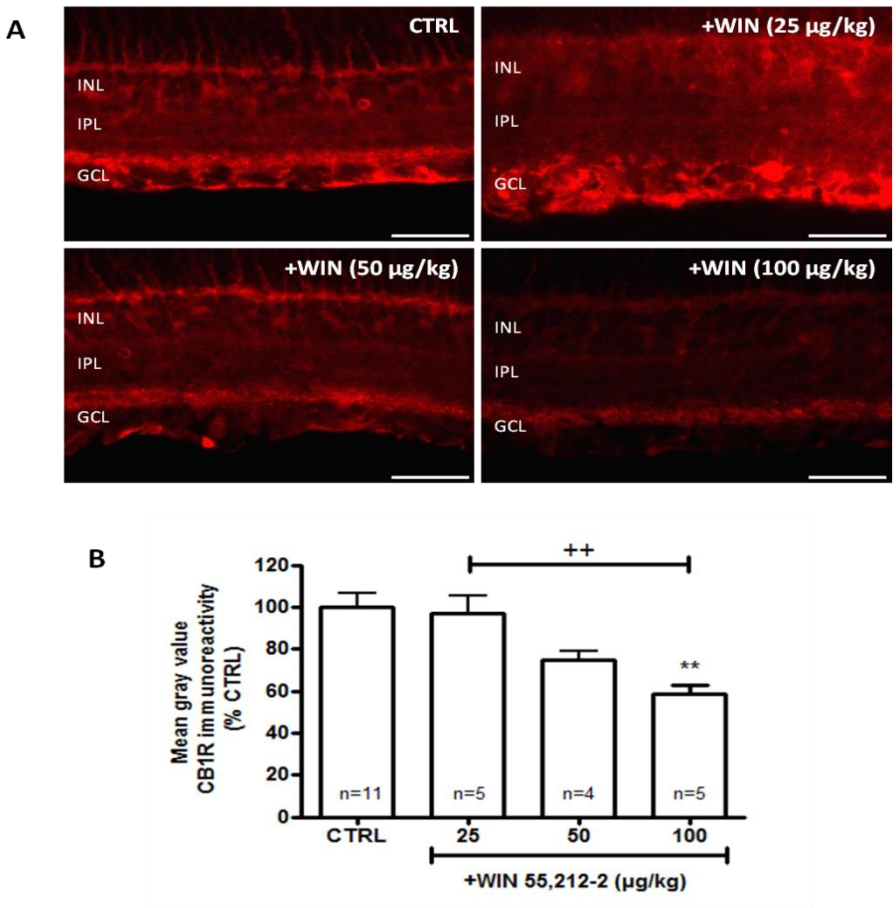


Εικόνα 14. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στο μοντέλο του AMPA- calbindin ανοσοδραστικότητα. **A.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα της calbindin. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς η ανοσοδραστικότητα της calbindin εντοπίστηκε σε οριζόντια κύτταρα στην INL, στα όριά της με την OPL, στους άξονές τους στην OPL και σε βραχύινα κύτταρα στην INL , στα όριά της με την IPL. Το AMPA μείωσε την ανοσοδραστικότητα της calbindin, ενώ η i.p, υποχρόνια χορήγηση WIN55,212-2 (25 & 100 μg/kg), δεν κατόρθωσε να περιορίσει την απώλεια των θετικών για την calbindin κυττάρων. Στην δόση 100 μg/kg, η ανοσοδραστικότητα της calbindin, έχει χαθεί πλήρως από την OPL. Κλίμακα: 50 μm. **B.** Μελέτες ποσοτικοποίησης. Παρατηρήθηκε μείωση της ανοσοδραστικότητας της calbindin από το AMPA, κατά 49% (*** p<0.001 σε

σύγκριση με την ομάδα CTRL), ενώ καμία από τις δόσεις του WIN55,212-2 (25 & 100 μg/kg), δεν επέδειξε νευροπροστατευτικές ιδιότητες για την calbindin (*** $p<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL, $p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA).

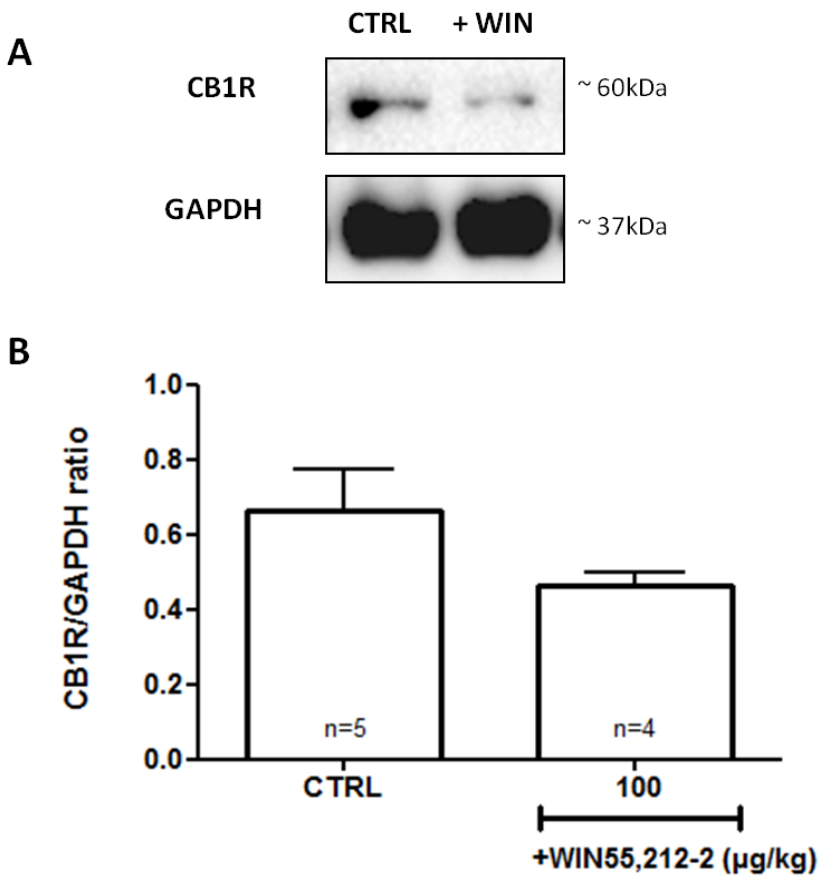
4.5. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιειή αμφιβληστροειδή

Μία διαφορετίκή ομάδα πειραματόζωων (n=25), τα οποία δεν έλαβαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης WIN55,212-2 στον υγιειή ιστό. Τα ζώα έλαβαν για τέσσερις ημέρες i.p εγχύσεις είτε εκδόχου (wfi+DMSO), είτε WIN55,212-2 σε τρεις διαφορετικές δόσεις (25, 50 και 100 μg/ kg). Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις που διεξήχθησαν, έδειξαν ότι στα CTRL πειραματόζωα που δεν έλαβαν WIN55,212-2, η ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα ήταν παρούσα στις στιβάδες OPL, INL, IPL και GCL, με την εντονότερη παρουσία να εντοπίζεται στην GCL (Εικόνα 15A), η οποία επιλέχθηκε και για τις μελέτες ποσοτικοποίησης που ακολούθησαν. Η i.p χορήγηση του WIN55,212-2, στην δόση 100 μg/kg, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της ανοσοδραστικότητας του CB1 υποδοχέα στην GCL κατά 42% περίπου (** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 15A & 15B). Απ' την άλλη πλευρά. Οι δύο μικρότερες δόσεις των 50 και 100 μg/kg, δεν μειωσαν την ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα στην GCL ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 15A & 15B).



Εικόνα 15. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιειή ιστό: CB1 ανοσροδραστικότητα. **A.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα του CB1. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς, η ανοσοδραστικότητα του CB1 εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στις στιβάδες INL, IPL και GCL. Το εντονότερο σήμα παρατηρήθηκε στην GCL. Η υποχρόνια i.p χορήγηση WIN55,212-2 μείωσε την ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα στην GCL. Κλίμακα: 50 μm. **B.** Μελέτες ποσοτικοποίησης. Στις δόσεις των 25 και 50 μg/kg του WIN55,212-2, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανοσοδραστικότητας του CB1 υποδοχέα στην GCL ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Αντιθέτως η μεγαλύτερη δόση των 100 μg/kg, προκάλεσε 42% μείωση στην ανοσοδραστικότητα του CB1 στην GCL (** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL).

Επιπλέον για την υψηλότερη δόση του WIN5212-2 (100 μg/kg), πραγματοποιήθηκε και ανάλυση κατά Western, προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα του CB1 υποδοχέα στον υγιή αμφιβληστροειδή. Ωστόσο η ανάλυση υπέδειξε ότι το WIN55,212-2 (100 μg/kg), δεν επηρέασε με στατιστικά σημαντικό τρόπο τα επίπεδα του CB1 υποδοχέα σε σχέση με την ομάδα CTRL, η οποία αποτελούταν από ζώα που είχαν λάβει εγχύσεις εκδόχου ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 16A & 16B).



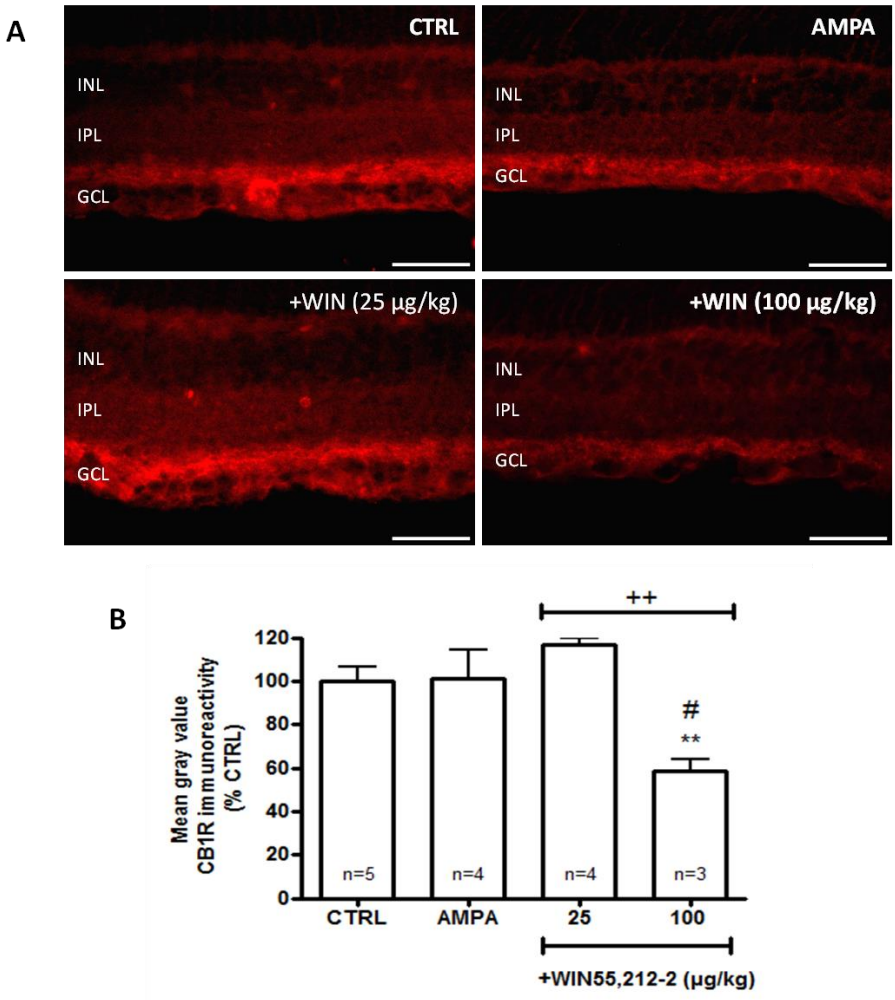
Εικόνα 16. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 (100 μg/kg), στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιειή ιστό: ανάλυση κατά Western. **Α.** Φωτογραφία μεμβράνης, όπου φαίνεται η έκραση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή ζώων που έχουν λάβει έκδοχο και ζώων που έχουν λάβει WIN (WIN55,212-2 100 μg/kg). **Β.** Μελέτες ποσοτικοποίησης. Η δόση 100 μg/kg του WIN55,212-2 δεν επηρέασε την έφραση του CB1 υποδοχέα στον υγιή αμφιβληστροειδή ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL).

Τα πειράματα της Western, πραγματοποιήθηκαν από την Σοφία Παπαδογκωνάκη.

4.6. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας

Στις τομές των ζώων που δέχθηκαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις PBS (50 mM) ή AMPA (8.4 mM), ακολουθούμενες από i.p χορηγήσεις εκδόχου (wfi+DMSO) ή WIN55,212-2 (25 και 100 μg/kg), πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις, προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης WIN55,212-2 στην ανοσοδραστικότητα του CB1υποδοχέα στο μοντέλο του AMPA. Η ενδοφθάλμια χορήγηση

του AMPA σε συνδυασμό με την i.p χορήγηση εκδόχου, δεν επηρέασε την ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα στην GCL (p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) (Εικόνα 17A & 17B). Αντιθέτως η δόση 100 μg/kg του WIN55,212-2, προκάλεσε μείωση του ανασοφθορισμού του CB1 υποδοχέα στην GCL κατά 42% σε σχέση με την ομάδα CTRL (** p<0.01 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) και κατά 34% σε σχέση με το AMPA (# p<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα AMPA) (Εικόνα 17A & 17B), γεγονός που ερμηνεύται ως μειορύθμιση (downregulation) του CB1 υποδοχέα, εξαίτιας της υποχρόνιας χορήγησης του αγωνιστή WIN55,212-2. Τέλος η μικρότερη δόση των 25 μg/kg WIN55,212-2, δεν επηρέασε την ανοσοδραστικότητα του CB1 στην GCL (p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα CTRL, p>0.05 σε σύγκριση με την ομάδα AMPA) (Εικόνα 17A & 17B).



Εικόνα 17. Επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2, στην έκφραση του CB1 υποδοχέα στο μοντέλο του AMPA:CB1 ανοσοδραστικότητα. **A**. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για την ανοσοδραστικότητα του CB1. Στους CTRL αμφιβληστροειδείς που έλαβαν ενδοφθάλμιες εγχύσεις PBS (50 mM), ακολουθούμενες από i.p χορηγήσεις εκδόχου, η ανοσοδραστικότητα του CB1 εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στις στιβάδες INL, IPL και

GCL, με το εντονότερο σήμα να παρατηρείται στην GCL. Η υποχρόνια χορήγηση WIN55,212-2 (100 μg/kg) μείωσε το σήμα του CB1 υποδοχέα στην GCL. Κλίμακα: 50 μm. **B.** Η ενδοφθάλμια χορήγηση AMPA, δεν επηρέασε την ανοσοδραστικότητα του CB1 στην GCL ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL). Η υποχρόνια, i.p χορήγηση 100 μg/kg WIN55,212-2, μείωσε την ανοσοδραστικότητα του CB1στους αμφιβληστροειδείς που είχαν δεχτεί ενδοφθάλμιες εγχύσεις AMPA κατά 42% σε σχέση με το CTRL (** $p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL) και κατά 34% σε σχέση με το AMPA (# $p<0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA). Η δόση των 25 μg/kg WIN55,212-2 δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην ανοσοδραστικότητα του CB1 στην GCL ($p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα CTRL, $p>0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα AMPA).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν στοιχεία για τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες του WIN55,212-2 στο in vivo μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας, στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Παράλληλα, φαίνεται πως η συστηματική χορήγηση του WIN55,212-2, είναι σε θέση να επάγει την μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή των επίμυων.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, η ενδοφθάλμια έγχυση AMPA σε επίμυες, προκάλεσε την απώλεια διάφορων κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες υπέδειξαν ότι το AMPA επηρέασε την βιωσιμότητα των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν bNOS, όπως επίσης των οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν calbindin. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν πως η ενδοφθάλμια έγχυση AMPA, μειώνει τον αριθμό αυτών των κυττάρων καθώς και των χολινεργικών βραχύινων κυττάρων (Kiagiadaki & Thermos, 2008· Kiagiadaki και συν., 2010· Kokona και συν., 2012· Kokona & Thermos, 2015).

Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου η επαγόμενη από το AMPA διεγερσιτοξικότητα προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Αρκετές μελέτες σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, έχουν επιβεβαιώσει ότι ο θάνατος των κυττάρων επιτελείται μέσω απόπτωσης, καθοριστικό ρόλο στην οποία παίζει η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (Kermer καισυν., 1999· Yoshizawa και συν., 2000· Chen και συν., 2001). Από την άλλη πλευρά μελέτες υποδεικνύουν ότι η απόπτωση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, μπορεί να είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (Donovan & Gotter, 2002· Doonan και συν., 2003· Zulliger και συν., 2011· Kokona & Thermos, 2015). Οι Kokona & Thermos (2015) αναφέρουν ότι η χορήγηση του αναστολέα της κασπάσης 3, Z-DEVD-FMK, δεν κατόρθωσε να περιορίσει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις του AMPA. Παράλληλα δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην φωσφορυλίωση των κινασών SAPK/JNK (Kokona & Thermos, 2015), ενός σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο διαμεσολαβεί τις αποπτωτικές διεργασίες (Lin, 2003). Σύμφωνα με τους ερευνητές, είναι πιθανό ο θάνατος των κυττάρων στο μοντέλο του AMPA, να αποτελεί αποτέλεσμα νέκρωσης ή νεκρόπτωσης (Kokona & Thermos, 2015). Η άποψη αυτή ενισχύεται από την παρουσία μελετών στη βιβλιογραφία, οι οποίες αναδεικνύουν το νεκρωτικό θάνατο των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Joo και συν., 1999· Ientile και συν., 2008). Μάλιστα σύμφωνα με τους Ientile και συν., (2008), η απόπτωση και η νέκρωση φαίνεται πως καθορίζονται με βάση τον υπότυπο των γλουταμινεργικών υποδοχέων που διαμεσολαβούν την διεγερσιτοξικότητα. Αναλυτικότερα η επώαση απομονωμένου αμφιβληστροειδούς κοτόπουλου σε NMDA, οδήγησε σε θάνατο των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς μέσω απόπτωσης, όπως φάνηκε

από την αυξημένη δραστηριότητα της κασπάσης 3 (Ientile και συν., 2008). Αντιθέτως η επώαση του αμφιβληστροειδούς σε AMPA ή καϊνικό οξύ, προκάλεσε τον νεκρωτικό θάνατο των κυττάρων (Ientile και συν., 2008). Από την άλλα πλευρά όμως, πέρα από την κασπάση 3, σε αποπτωτικούς μηχανισμούς φαίνεται πως συμμετέχει και η κασπάση 7 (Walsh και συν., 2008), η οποία μαζί με την κασπάση 3, αποτελούν τις δύο κυριότερες κασπάσες- «τελεστές», τον τελευταίο δηλαδή σταθμό στο σηματοδοτικό μονοπάτι των κασπασών, οι οποίες είναι σε θέση να διασπούν διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα οδηγώντας στην απόπτωση (Walsh και συν., 2008). Μελέτες υποδεικνύουν ότι η κασπάση 7 εμφανίζει αύξηση της παρουσίας της και της ενεργοποίησή της στον εγκέφαλο επίμυων μετά από τραυματισμό (Larner και συν., 2005). Μάλιστα μία βασική ιδιότητά της που την ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες κασπάσες, είναι ότι ενεργοποιείται από την καλπαίνη 1, μία ασβεστιοεξαρτώμενη πρωτεΐνη, υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η κασπάση 7 ως ανιχνευτής των αλλαγών στις συγκεντρώσεις του ασβεστίου, στο κύτταρο (Gafni και συν., 2009). Η ενεργοποίηση της κασπάσης 7 και η εμπλοκής της στην απόπτωση έχει αξιολογηθεί και στον αμφιβληστροειδή. Αναλυτικότερα, knock out ποντίκια για την κασπάση 7, παρουσιάζουν μειωμένη απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, σε ένα μοντέλο τραυματισμού του οπτικού νεύρου (Choudhury και συν., 2015).

Εκτός από την απόπτωση και την νέκρωση, υπάρχει και ένα τρίτο είδος θανάτου, που ονομάζεται νεκρόπτωση. Η νεκρόπτωση είναι ένα είδους κυτταρικού θανάτου, ανεξάρτητου από τις κασπάσες, που προκαλείται από την ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου και τα μορφολογικά της χαρακτηριστικά μοιάζουν αρκετά με αυτά της νέκρωσης (διαστολή του κυττάρου και των οργανιδίων του και έπειτα λύση αυτών) (Hitomi και συν., 2008). Τα τελευταία χρόνια μάλιστα έχουν αναπτυχθεί παράγοντες, οι οποίοι αναστέλλουν την νεκρόπτωση και καλούνται νεκροστατίνες (Dekterev και συν., 2008). Η νεκρόπτωση φαίνεται ότι συμβάλει στον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται στον αμφιβληστροειδή. Οι Rosenbaum και συν. (2010), αναφέρουν στην μελέτη τους, ότι η χορήγηση της νεκροστατίνης Nec-1, μείωσε τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων, σε ένα μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, στον αμφιβληστροειδή επίμυων, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο κυτταρικός θάνατος στο εν λόγω μοντέλο, συντελείται μέσω νεκρόπτωσης.

Η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του WIN55,212-2 μαζί με το AMPA, κατάφερε να μειώσει τον επαγόμενο από AMPA θάνατο των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν bNOS. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν ότι η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του AMPA μαζί με AEA, methAEA ή HU-210, κατάφερε να προστατεύσει τα bNOS κύτταρα στο μοντέλο του AMPA (Kokona & Thermos, 2015). Επιπλέον η νευροπροστατευτική δράση του WIN55,212-2, έρχεται σε συμφωνία με μία

πληθώρα μελετών της βιβλιογραφίας, οι οποίες αναδεικνύουν τις νευροπροστατευτικές δράσεις ποικίλων κανναβινοειδών σε διαφορετικά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών (El-Remessy και συν., 2003· Lax και συν., 2014· Nucci και συν., 2007). Στην βιβλιογραφία η μοναδική μελέτη που έχει εξετάσει τις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 στον αμφιβληστροειδή είναι αυτή των Pinar-Sueiro και συν., (2013), οι οποίοι αναφέρουν ότι η χορήγηση WIN55,212-2 μέσω σταγόνων, παρείχε μερική νευροπροστασία των γαγγλιακών κυττάρων, από την ισχαιμία. Οι Kokona και Thermos, (2015) αναφέρουν ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις της methAEA και του HU-210 ήταν δοσοεξαρτώμενες, με την μεγαλύτερη δόση να προκαλεί το μεγαλύτερο ποσοστό νευροπροστασίας. Ειδικότερα, όσον αφορά το HU-210, ο αριθμός των bNOS κυττάρων έφθασε σε επίπεδα, παρόμοια με αυτά της ομάδας ελέγχου (Kokona & Thermos, 2015). Αντιθέτως στην παρούσα μελέτη το WIN55,212-2 δεν παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη δράση, αφού οι δόσεις των 10^{-6}, 10^{-5} και 10^{-4} M, δεν διέφεραν μεταξύ τους, ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Η επίδραση του WIN55,212-2 στην βιωσιμότητα των bNOS κυττάρων προσομοιάζει περισσότερο σε αυτή της AEA, για την οποία δεν αναφέρονται δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις (Kokona & Thermos, 2015). Η απουσία δοσοεξαρτώμενων επιδράσεων μετά την χορήγηση WIN55,212-2, πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το WIN55,212-2 αν και είναι πλήρης αγωνιστής των CB1/CB2 υποδοχέων, εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για τους CB2 υποδοχείς σε σύγκριση με τους CB1 (Pertwee, 1997).

Σε αντίθεση με την methAEA και το HU-210 (Kokona και συν., 2015), στην συγκεκριμένη μελέτη, η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του WIN55,212-2 μαζί με AMPA, παρείχε μερική νευροπροστασία στον ιστό, επαναφέροντας τον αριθμό των bNOS κυττάρων, περίπου στο 60% των επιπέδων της ομάδας CTRL. Η δράση του WIN55,212-2 μοιάζει με τη δράση που οι Kokona και Thermos (2015), αναφέρουν για την AEA, η οποία δεν παρείχε καθολική νευροπροστασία στον ιστό. Ωστόσο το WIN55,212-2 διαφέρει από την AEA, ως προς το γεγονός ότι η AEA αποτελεί μερικό αγωνιστή των CB1 υποδοχέων (Pertwee, 2010), ενώ το WIN55,212-2 από την άλλη πλευρά δρα ως πλήρης αγωνιστής στους CB1 υποδοχείς, με αποτελεσματικότητα παρόμοια με αυτή του HU-210 γι' αυτούς (Pertwee, 1997). Μία πιθανή εξήγηση για την ύπαρξη μερικής νευροπροστασίας των bNOS κυττάρων στην παρούσα μελέτη, αποτελεί το γεγονός ότι το WIN55,212-2 εμφανίζει ελαφρώς μεγαλύτερη συγγένεια για τους CB2 υποδοχείς σε σύγκριση με τους CB1 (Pertwee, 1997). Εξάλλου, μελέτες in situ υβριδοποίησης (Lu και συν., 2000) και ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Lopez και συν., 2011), αναφέρουν την παρουσία CB2 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή επίμυων, στις στιβάδες INL, IPL και GCL όπου εντοπίζονται bNOS βραχύινα κύτταρα. Είναι πιθανόν λοιπόν το WIN55,212-2, προσδεόμενο στους CB2 υποδοχείς, να μην ενεργοποιεί μεγάλο

πλήθος CB1 υποδοχέων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μερικής νευροπροστασίας των κυττάρων.

Παρότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 πιθανόν να διεκπεραιώνονται μέσω των CB1 και CB2 υποδοχέων, η ενδοφθάλμια συγχορήγηση του WIN55,212-2 μαζί με τον ανταγωνιστή/αντίστροφο αγωνιστή του CB1 υποδοχέα, AM251, κατήργησε τις νευροπροστατευτικές του ιδιότητες. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν τη συμμετοχή του CB1 στις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 και βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν, ότι οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται μέσω του CB1 υποδοχέα, τόσο στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας (Kokona & Thermos, 2015), όσο και σε άλλα μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών (El-Remessy και συν., 2003· Nucci και συν., 2007). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία CB1 υποδοχέων σε οριζόντια και βραχύινα κύτταρα στην στιβάδα INL, καθώς και σε γαγγλιακά κύτταρα στην GCL, σε επίμυες (Straiker και συν., 1999· Yazulla και συν., 1999). Ωστόσο εκτός από τον CB1 υποδοχέα, οι νευροπροστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή, διαμεσολαβούνται και μέσω του CB2 υποδοχέα (Imamura και συν., 2018· Araujo και συν., 2017). Δεδομένου ότι το WIN55,212-2 παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερη συγγένεια για τους CB2 υποδοχείς (Pertwee, 1997), αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι νευροπροστατευτικές του ιδιότητες σε in vivo και in vitro μοντέλα κυτταροτοξικότητας στον εγκέφαλο, διαμεσολαβούνται μέσω του CB1 και του CB2 υποδοχέα (Sheng και συν., 2004· Feradez-Lopez και συν., 2006· Price και συν., 2009). Η νευροπροστασία που παρέχει το WIN55,212-2 σε αυτά τα μοντέλα βασίζεται στην ικανότητά του να μειώνει την απελευθέρωση του γλουταμινικού από το προσυναπτικό κύτταρο, την απελευθέρωση προφλεγμονοδών παραγόντων, όπως ο TNFα, καθώς και να μειώνει την έκφραση της NOS, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής NO (Sheng και συν., 2004· Feradez-Lopez και συν., 2006). Η εμπλοκή των CB1 και CB2 υποδοχέων στις παραπάνω μελέτες φαίνεται από το γεγονός ότι, η χορήγηση του ανταγωνιστή των CB1 υποδοχέων SR141716, καθώς και του ανταγωνιστή των CB2 υποδοχέων, SR144528 μπλόκαραν τις προαναφερόμενες δράσεις του WIN55,212-2 (Sheng και συν., 2004· Feradez-Lopez και συν., 2006).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το WIN55,212-2 προστάτευσε τα bNOS κύτταρα δεν είναι γνωστός. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι, ότι η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων από το WIN55,212-2 μείωσε την εισροή ασβεστίου στο κύτταρο, μειώνοντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα από τα κανναβινοειδή, είναι σε θέση να αναστείλει τασεοελεγχόμενους διαύλους ασβεστίου τύπου N και P/Q (Twitchell και συν., 1997· Shen & Tayler, 1998), ευρήματα που επαληθεύονται και

από μελέτες στον αμφιβληστροειδή (Fan & Yazulla, 2003). Επιπλέον η δράση του WIN55,212-2 θα μπορούσε να οφείλεται στην αναστολή διαύλων νατρίου (Nicholson και συν., 2003) και στην ενεργοποίηση διαύλων ανορθωτών καλίου (GIRKs) (Vasquez και συν., 2003), γεγονός που συμβάλει στην μείωση της υπερδιεγερσιμότητας του κυττάρου που παρατηρείται σε καταστάσεις διεγερσιτοξικότητας, μειώνοντας εμμέσως την εισροή ασβεστίου στο κύτταρο και τον κυτταρικό θάνατο. Επιπροσθέτως οι νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 στα bNOS βραχύινα κύτταρα, ενδεχομένως να βασίζονται στην ικανότητά του να αναστέλλει την απελευθέρωση γλουταμινικού από το προσυναπτικό κύτταρο (Shen & Tayler, 1998· Levenes και συν., 1998· Gerderman & Lovinger, 2001· Domenici και συν., 2006), η οποία διαμεσολαβείται μέσω των CB1 υποδοχέων. Επομένως η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων μειώνει με αυτόν τον τρόπο το ενδεχόμενο κυτταρικού θανάτου, μιας και το γλουταμινικό αποτελεί εκλυτικό παράγοντα της εκδήλωσης διεγερσιτοξικότητας (Choi, 1992). Στην προκειμένη περίπτωση ως προσυναπτικά κύτταρα θεωρούνται τα δίπολα κύτταρα, για τα οποία ανοσοϊστοχημικές μελέτες αναφέρουν την παρουσία CB1 υποδοχέων, στον αμφιβληστροειδή επίμυων (Straiker και συν., 1999· Yazulla και συν., 1999).

Πέρα από τον έλεγχο διαύλων και τον έλεγχο της απελευθέρωσης γλουταμινικού, οι προστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού, αποτελούμενου από κινάσες που ελέγχουν σημαντικές αποκρίσεις του κυττάρου, όπως το PI3K/Akt ή το MEK/ERK1/2. Προηγούμενες μελέτες με την χρήση του μοντέλου της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας, υποδεικνύουν ότι το HU-210 και η AEA προστάτευσαν τα bNOS βραχύινα κύτταρα μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/Akt, όπως φάνηκε από την αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt (Kokona & Thermos, 2015). Η συγχορήγηση μαζί με το HU-210 ή με την AEA, ενός αναστολέα του PI3K/Akt μονοπατιού, κατήργησε τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών, προκαλώντας μείωση του αριθμού των bNOS βραχύινων κυττάρων (Kokona & Thermos, 2015). Επιπλέον οι ερευνητές αναφέρουν ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις της AEA διαμεσολαβούνται και μέσω της ενεργοποίησης του MEK/ERK1/2 μονοπατιού (Kokona & Thermos, 2015). Όσον αφορά το WIN55,212-2, φαίνεται πως είναι σε θέση να ενεργοποιήσει το μονοπάτι PI3K/Akt (Su και συν., 2016). Ειδικότερα οι Su και συν., (2016) αναφέρουν, ότι η χορήγηση WIN55,212-2 αύξησε την φωσφορυλίωση της Akt, βελτιώνοντας τα ελλείμματα στην μάθηση και στην μνήμη σε ένα μοντέλο χρόνιας ισχαιμίας στον εγκέφαλο. Η χορήγηση του αναστολέα της PI3K/Akt, LY294002, μαζί με το WIN55,212-2, κατήργησε τις προστατευτικές του ιδιότητες, επιδεινώνοντας τα ελλείμματα στην μάθηση και τη μνήμη (Su και συν., 2016). Τέλος σε μία άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη, οι Sun και συν., (2013) αναφέρουν

ότι το WIN55,212-2, μέσω του CB1 υποδοχέα και του μονοπατιού MEK/ERK1/2, ενίσχυσε την διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων των ολιγοδενδροκυττάρων, βελτιώνοντας την επαναμυελίνωση σε ένα μοντέλο απομυελίνωσης, επαγόμενης από την ισχαιμία (Sun και συν., 2013). Από τα παραπάνω γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3K/Akt και MEK/ERK1/2 από το WIN55,212-2, είναι σε θέση να παρέχει προστασία στα κύτταρα.

Οι επιδράσεις του WIN55,212-2 στην ενίσχυση της βιωσιμότητας των bNOS βραχύινων κυττάρων, μπορεί επίσης να οφείλονται και στη δράση του επάνω στην NOS. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή, κυρίως μέσω του CB1 υποδοχέα, μειώνουν την έκφραση της NOS και την παραγωγή NO, γεγονός που θεωρείται ως ένας από τους πολλούς μηχανισμούς, μέσω των οποίων τα κανναβινοειδή ασκουν τις νευροπροστατευτικές τους επιδράσεις (Jeon και συν., 1996· Waksman και συν., 1999· Cabral και συν., 2002). Το NO συντίθεται από την NOS με την χρήση L-αργινίνης και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ισχαιμίας (Kaur και συν., 2006). Η NOS συναντάται σε τρείς ισομορφές, την nNOS ή bNOS (neuronal ή brain NOS), την eNOS (endothelial NOS) και την iNOS (inducible NOS) (Kaur και συν., 2006). Η δραστηριότητα της bNOS και της eNOS πυροδοτείται μετά από αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ασβεστίου, ενώ η ενεργοποίηση της iNOS είναι ανεξάρτητη από το ασβέστιο (Kaur και συν., 2006). Σε συνθήκες διεγερσιτοξικότητας, η έκφραση της bNOS και της eNOS αυξάνεται, αυξάνοντας παράλληλα και τη δημιουργία NO, ένα τοξικό για τα κύτταρα προϊόν (Zubrow και συν., 2002). Αναλυτικότερα οι αυξημένες συγκεντρώσεις ασβεστίου κατά την διάρκεια της διεγερσιτοξικότητας, οδηγούν σε υπερπαραγωγή του NO, η οποία με την σειρά της οδηγεί στην επαγόμενη από τον CREB μεταγραφή αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bax, η Bad και η Bcl-xl, οι οποίες τελικά κινητοποιούν τις διεργασίες του κυτταρικού θανάτου (Mishra και συν., 2002· Zubrow και συν., 2002). Επίσης το NO μπορεί να συμβάλει στη διαμόρφωση κυτταροτοξικών συνθηκών και μέσα από μηχανισμούς οξειδωτικής βλάβης (Beckman και συν., 1990). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες αναφέρουν την παρουσία της NOS στον αμφιβληστροειδή επίμυων, σε ορισμένους πληθυσμούς βραχύινων κυττάρων στην INL, σε έκτοπα βραχύινα κύτταρα στην GCL, καθώς και σε γαγγλιακά κύτταρα στην GCL (Kim και συν., 1999· Neufeld και συν., 2000). Στον αμφιβληστροειδή η NOS φαίνεται πως είναι υπεύθυνη για την απόπτωση των κυττάρων σε καταστάσεις ισχαιμίας (Hangai και συν., 1996· Roth και συν., 1997· Sennlaub και συν., 2002). Η εμπλοκή της NOS στην παθογένεια της ισχαιμίας φαίνεται και από το γεγονός ότι αναστολείς της NOS, όπως ο L-NNA και ο L-NMMA, προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή επίμυων από την ισχαιμική βλάβη (Geyer και συν., 1995· Lam & Tso, 1996). Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το WIN55,212-2, μελέτες

έχουν δείξει ότι μειώνει την έκφραση της iNOS σε ένα in vitro μοντέλο ισχαιμικής βλάβης (Fernadez-Lopez και συν., 2006).

Επιπλέον σε συνάρτηση με τα όσα αναφέραμε προηγουμένως για την ενεργοποίηση της PI3K/Akt από το WIN55,212-2 (Su και συν., 2016), μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της Akt αναστέλλει τις επαγόμενες από το NO αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax, οι οποίες σχετίζονται με την απόπτωση (Matsuzaki και συν., 1999). Κατ' αυτόν τον τρόπο η ενδοφθάλμια χορήγηση του WIN55,212-2, ενδεχομένως προστάτευσε τα bNOS βραχύινα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν μία ισομορφή της NOS, είτε άμεσα μειώνοντας την παραγωγή NO, είτε έμμεσα μέσω του PI3K/Akt μονοπατιού.

Μία άλλη σημαντική επίδραση του WIN55,212-2 στην συγκεκριμένη μελέτη, ήταν η ικανότητά του να μειώσει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, η οποία παρουσιάστηκε αυξημένη στους αμφιβληστροειδείς που είχαν λάβει AMPA. Αντιθέτως στους οφθαλμούς που έλαβαν PBS και εκείνους στους οποίους το AMPA συγχορηγήθηκε μαζί με WIN55,212-2 (10^{-5} M), ο αριθμός των κυττάρων της ενεργοποιημένης μικρογλοίας στους αμφιβληστροειδείς ήταν σημαντικά μειωμένος και κατά κύριο λόγο εντοπίσθηκαν κύτταρα απενεργοποιημένης μικρογλοίας.

Η μικρογλοία αποτελεί τα ανοσοποιητικά κύτταρα του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς, την αμυντική τους γραμμή απέναντι στις απειλές (Tmompson και συν., 1993· Prinz & Priller, 2004). Σε φυσιολογικές καταστάσεις, απουσία απειλής, η μικρογλοία εντοπίζεται σε μία απενεργοποιημένη μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μορφολογίας με αποφυάδες να εκφύονται από το κυτταρικό της σώμα προς κάθε κατεύθυνση (Davalos και συν., 2005). Σε καταστάσεις τραυματισμού, όπως για παράδειγμα κατά την διάρκεια ισχαιμικών επεισοδίων και παρουσία φλεγμονής, η μικρογλοία ενεργοποιείται ταχέως αποσύροντας τα φιλοπόδια της, γεγονός που αλλάζει ριζικά την μορφολογία της και προκαλώντας αυξορύθμιση των μορίων και των υποδοχέων που βρίσκονται στην μεμβράνη της (Cho και συν., 2006). Ωστόσο, πέρα από τον ενεργό της ρόλο στην προστασία των κυττάρων, σε ορισμένες περιπτώσεις η υπερενεργοποίηση της μικρογλοίας μπορεί να αποδειχθεί καταστροφική για την επιβίωση των κυττάρων, εξαιτίας της αυξημένης απελευθέρωσης προφλεγμονοδών παραγόντων, οι οποίοι είναι τοξικοί για τα κύτταρα (Zeng, 2005). Μελέτες υποδεικνύουν την εμπλοκή του συστήματος των ενδογενών κανναβινοειδών στη δραστηριότητα της ενεργοποιημένης μικρογλοίας (Tham και συν., 2007· Burgos και συν., 2012). Η άποψη αυτή επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι κατά την ενεργοποίησή της η μικρογλοία προκαλεί αύξηση της έκφρασης των CB1 και CB2 υποδοχέων στην μεμβράνη της (Mares και συν., 2005· Schmidt και συν., 2012). Η δράση των κανναβινοειδών στη μικρογλοία φαίνεται ότι διαμεσολαβείται κυρίως μέσω των CB2 υποδοχέων, η

ενεργοποίηση των οποίων μειώνει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων από τα μικρογλοιακά κύτταρα (Facchinetti και συν., 2003). Στους προφλεγμονώδεις παράγοντες που ελέγχονται από τους CB2 υποδοχείς μπορεί να περιλαμβάνονται το NO, ο TNFα, η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) κ.α (Molina-Holdago και συν., 2003). Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι τα κανναβινοειδή μέσω του CB2 υποδοχέα, αναστέλλουν την μετανάστευση της μικρογλοίας σε μοντέλα ισχαιμίας (Fernadez-Lopez και συν, 2006), σε μοντέλα νευροπαθητικού πόνου (Racz και συν., 2008), σε μοντέλα της νόσου Huntington (Palazuelos και συν., 2009), της νόσου Alzherimer (Martin-Moreno και συν., 2011) κ.α. Πέρα από τους CB2 υποδοχείς, μελέτες αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των CB1 υποδοχέων στην ρύθμιση της μικρογλοίας. Για παράδειγμα σε ένα ζωικό μοντέλο αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, ο συνθετικός αγωνιστής CB52 μείωσε την ενεργοποίηση της μικρογλοίας μέσω του CB1 υποδοχέα (Ribeiro και συν., 2013), ενώ ο ανταγωνιστής των CB1 υποδοχέων, SR141716A, έδρασε ενισχυτικά στην παρουσία των προφλεγμονοδών παραγόντων (Lou και συν., 2018). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι CB1 και οι CB2 υποδοχείς εμπλέκονται άμεσα στην ρύθμιση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Ωστόσο πειραματικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα νευρικά κύτταρα εκφράζουν μια πληθώρα μορίων, όπως το NCAM (neuronal cell adhesion molecule), το CD22, το CD200 κ.α, τα οποία επικοινωνούν με την μικρογλοία και άλλους πληθυσμούς γλοιακών κυττάρων και είναι σε θέση να αναστείλουν την ενεργοποίησή της (Chang και συν., 2000· Tan και συν., 2000· Zhang και συν., 2011). Μάλιστα δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα μόρια επιτυγχάνουν τον στόχο τους μέσω μονοπατιών, αποτελούμενων από κινάσες που ρυθμίζονται από τα κανναβινοειδή, όπως η MAPK, η JNK και η ERK1/2 (Bosier και συν., 2008· Kokona & Thermos, 2015), συμπεραίνουμε πως τα κανναβινοειδή πιθανόν ασκούν εμμέσως τις επιδράσεις τους στην μικρογλοία, μέσω CB1 υποδοχέων, οι οποίοι εντοπίζονται σε νευρικά κύτταρα. Σε μία αρκετά πρόσφατη μελέτη οι Ativie και συν., (2018) έδειξαν ότι αγωνιστές του CB1 υποδοχέα, ρυθμίζουν την δραστηριότητα της μικρογλοίας στον ιππόκαμπο εμμέσως, μέσω CB1 υποδοχέων που εντοπίζονται σε GABAεργικούς νευρώνες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα αναφέραμε παραπάνω, οι επιδράσεις της ενδοφθάλμια χορήγησης του WIN55,212-2 στην μείωση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, θα μπορούσαν να διαμεσολαβούνται εμμέσως μέσω του CB1 υποδοχέα, που εντοπίζεται σε διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων στον αμφιβληστροειδή επίμυων, συμπεριλαμβανομένων και των βραχύινων (Straiker και συν., 1999, Yazulla και συν., 1999). Ωστόσο όπως έχουμε ήδη αναφέρει, το WIN55,212-2 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τους CB2 υποδοχείς (Pertwee, 1997), των οποίων η παρουσία στον αμφιβληστροειδή έχει επιβεβαιωθεί (Lopez και συν., 2011) και γι’ αυτό το λόγο είναι πιθανό οι δράσεις του στην μείωση της μικρογλοίας να διαμεσολαβούνται άμεσα, μέσω CB2 υποδοχέων, ευρισκόμενων

στην μεμβράνη των μικρογλοιακών κυττάρων. Οι επιδράσεις του WIN55,212-2 στην ρύθμιση της μικρογλοίας μέσω των CB2 υποδοχέων, επιβεβαιώνονται και από την μελέτη των Ramirez και συν., (2005), οι οποίοι αναφέρουν πως το WIN55,212-2, μείωσε την ενεργοποίηση της μικρογλοίας μέσω του CB2 υποδοχέα και παρείχε νευροπροστασία σε ένα ζωικό μοντέλο του Alzheimer. Μία πιθανή εξήγηση για την μείωση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας από το WIN55,212-2, μέσω του CB2 υποδοχέα, θα μπορούσε να αποτελέσει αυτή που παραθέτουν στην μελέτη τους οι Eljaschewitsch και συν., (2005). Πιο συγκεκριμένα αναφέρουν ότι η AEA, τόσο μέσω του CB1, όσο και μέσω του CB2 υποδοχέα, μείωσε την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, μειώνοντας την παρατηρούμενη φλεγμονή στο ΚΝΣ. Επίσης, οι ερευνητές αναφέρουν ότι η AEA φωσφορυλιώνοντας την ιστόνη H3 στο γονίδιο του mkp-1, το οποίο κωδικοποιεί την φωσφατάση MKP-1, ενεργοποίησε αυτή την φωσφατάση αυξάνοντας την έκφρασής της στα μικρογλοιακά κύτταρα.. Στην συνέχεια η MKP-1 αποφωσφορυλιώνοντας την MAPK, απενεργοποίησε ουσιαστικά το σηματοδοτικό μονοπάτι που διαμεσολαβείται από αυτήν και είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων (Eljaschewitsch και συν., 2005).

Σε αντίθεση με τις νευροπροστατευτικές δράσεις του WIN55,212-2 στα bNOS βραχύινα κύτταρα, η ενδοφθάλμια συγχορήγησή του μαζί με AMPA, δεν κατόρθωσε να προστατεύσει τα οριζόντια και βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν calbindin. Ωστόσο ανοσοϊστοχημικές μελέτες που έχουν εξετάσει την έκφραση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή επίμυων, αναφέρουν ότι εκφράζεται από αυτούς του πληθυσμούς κυττάρων στην INL (Straiker και συν., 1999· Yazulla και συν., 1999· Zabouri και συν., 2011). Παρά το γεγονός αυτό, στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες που να αξιολογούν με κάποια σχετική ακρίβεια την έκφραση του CB1 υποδοχέα στους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς του αμφιβληστροειδούς και οι υπάρχουσες ανοσοϊστοχημικές μελέτες δεν ενδείκνυνται για το σκοπό αυτό, καθώς δεν εμφανίζουν καλή ποσοτική ακρίβεια. Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι πιθανό ο CB1 υποδοχέας να εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση σε ορισμένα κύτταρα και μικρότερη σε κάποια άλλα και σε αυτό να οφείλεται η αδυναμία του WIN55,212-2 να παρέχει προστασία στα οριζόντια και βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν calbindin. Μία άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να αποτελέσει, ότι η μη ύπαρξη προστασίας για τα εκφράζοντα calbindin οριζόντια και βραχύινα κύτταρα, οφείλεται στις διαφορετικές λειτουργίες που επιτελεί ο CB1 υποδοχέας, οι οποίες επηρεάζονται άμεσα από την εντόπισή του στα κύτταρα. Για παράδειγμα οι Straiker και Sullivan (2003) αναφέρουν ότι το WIN55,212-2, μέσω του CB1 υποδοχέα, ενισχύει τα ρεύματα ασβεστίου στα ραβδία, ενώ τα μειώνει στα κωνία, στον αμφιβληστροειδή σαλαμάνδρας. Κατά παρόμοιο τρόπο οι Fan και Yazulla (2003), αναφέρουν την ύπαρξη διφασικών δράσεων στην ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων από το WIN55,212-2, στον αμφιβληστροειδή χρυσόψαρου. Το WIN55,212-2 φαίνεται να αυξάνει τα

ρεύματα ασβεστίου μέσω G_s πρωτεϊνών στα κωνία, ενώ τα μειώνει μέσω $G_{i/o}$ πρωτεϊνών (Fan & Yazulla, 2003). Επιστρέφοντας στην παρούσα μελέτη, η διαφορά ανάμεσα στην προστασία των bNOS βραχύινων κυττάρων και στην αδυναμία προστασίας των οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν calbindin, πιθανώς να σχετίζεται με τις επιδράσεις του WIN55,212-2 στο NO. Είδαμε προηγουμένως ότι το WIN55,212-2 ενδεχομένως προστάτευσε τα bNOS κύτταρα μέσω της μείωσης της παραγωγής NO, όπως φαίνεται και από άλλες μελέτες (Jeon και συν., 1996· Fernadez-Lopez και συν., 2006). Ωστόσο η NOS , η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του NO, δεν εκφράζεται στα οριζόντια κύτταρα και στην πλειοψηφία των βραχύινων κυττάρων που εκφράζουν calbindin (Neufeld και συν., 2000), γεγονός που θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή εξήγηση για την αδυναμία του WIN55,212-2, να προστατέψει τα κύτταρα που εκφράζουν calbindin.

Η υποχρόνια, i.p χορήγηση του WIN55,212-2, προκάλεσε μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων στην GCL, στην υψηλότερη δόση των 100 μg/kg, τόσο στους υγιείς αμφιβληστροειδείς, όσο και στο μοντέλο του AMPA. Μελέτες ανοσο-αποτύπωσης (Western blot analysis) έδειξαν ότι η χορήγηση WIN55,212-2 σε υγιή πειραματόζωα που έλαβαν 100 μg/kg (i.p.), οδήγησε σε μείωση του CB1 υποδοχέα στους αμφιβληστροειδείς, σε σύγκριση με τα ζώα που είχαν λάβει έκδοχο. Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν ήταν σταστιστικά σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα να οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις. Παράλληλα η δόση των 50 μg/kg στους υγιείς αμφιβληστροειδείς, μείωσε την ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα, αλλά όχι με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Αντιθέτως η μικρότερη δόση των 25 μg/kg, δεν επηρέασε την ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα, ούτε στους υγιείς αμφιβληστροειδείς, ούτε σε αυτούς που είχαν λάβει AMPA, όπως φάνηκε από τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες του εργαστηρίου που υποστηρίζουν πως τα κανναβινοειδή HU-210, AEA και methAEA προκαλούν μείωση της ανοσοδραστικότητας του CB1 υποδοχέα, μετά από υποχρόνια (4 ημέρες) και χρόνια (14 ημέρες) χορήγησή τους, στον αμφιβληστροειδή επίμυων, τόσο σε υγιείς ιστούς, όσο και σε ισχαιμικούς (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Τα παραπάνω ευρήματα επαληθεύονται επίσης και από μελέτες στον εγκέφαλο, στις οποίες φαίνεται πως ανάλογες δόσεις του HU-210 (100 & 50 μg/kg), επάγουν την μειορύθμιση του CB1 υποδοχέα σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, όπως φαίνεται από την μειωμένη πρόσδεση ραδιενεργών προσδετών σε αυτούς (Dalton και συν., 2009· Dalton & Zavitsanou, 2010). Ωστόσο σε αντίθεση με τις προαναφερόμενες έρευνες, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων, μετά την υποχρόνια χορήγηση 50 μg/kg WIN55,212-2. Η ενδοφθάλμια χορήγηση AMPA δεν επηρέασε την ανοσοδραστικότητα του CB1 υποδοχέα

στον αμφιβληστροειδή, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου διαμεσολαβείται η απευαισθητοποίηση και η ενδοκυττάρωση των CB1 υποδοχέων από το WIN55,212-2, έχει μελετηθεί εκτενώς σε μελέτες στον εγκέφαλο και περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση του υποδοχέα από τις GRKs και την πρόσδεση σε αυτόν της β-αρρεστίνης (Jin και συν., 1999· Hsieh και συν., 2001· Kouznetsova και συν., 2002· Wu και συν., 2008). Η μοίρα ωστόσο που θα ακολουθήσει ο CB1 υποδοχέας μετά την ενδοκυττάρωσή του, παραμένει ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα, με ορισμένες μελέτες να υποστηρίζουν ότι οι ενδοκυτταρωμένοι υποδοχείς ακολουθούν το μονοπάτι της ανακύκλωσης προς την μεμβράνη, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην επανευαισθητοποίησή τους (Hsieh και συν., 2002· Wu και συν., 2008) και άλλες να υποστηρίζουν ότι οι υποδοχείς κατευθύνονται στα λυσοσωμάτια προς αποδόμηση, γεγονός που αντιστοιχεί στην μειορύθμιση (Martini και συν., 2007· Tappe-Theodor και συν., 2007· Rozenfeld & Devi, 2008). Σύμφωνα με τους Hsieh και συν., (2002), σημαντικό ρόλο στο καθορισμό της μοίρας των ενδοκυτταρωμένων CB1 υποδοχέων, διαδραματίζει ο χρόνος έκθεσης τους στον αγωνιστή, με τον μικρό χρόνο έκθεσης να αντιστοιχεί στο μονοπάτι της ανακύκλωσης και τον μεγαλύτερο να αντιστοιχεί στο μονοπάτι της αποδόμησης. Τέλος ανάλογο ρόλο φαίνεται πως παίζει και η δόση του αγωνιστή που χρησιμοποιείται, αφού σύμφωνα με τους Martini και συν., (2007), η έκθεση του CB1 υποδοχέα σε υψηλές συγκεντρώσεις αγωνιστή, οδηγεί στην αποδόμησή του.

Η αδυναμία της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 να παρέχει προστασία στα bNOS βραχύινα κύτταρα, στην υψηλότερη δόση των 100 μg/kg, οφείλεται στο γεγονός ότι στην συγκεκριμένη δόση παρατηρήθηκε μειορύθμιση του CB1 υποδοχέα, με αποτέλεσμα το WIN55,212-2 να μη μπορεί να αξιοποιήσει όλο το δυναμικό των CB1 υποδοχέων, για να ασκήσει τις νευροπροστατευτικές του δράσεις. Αντιθέτως η μικρότερη δόση των 25 μg/kg, στην οποία δεν παρατηρήθηκε μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων, κατάφερε να παρέχει προστασία στα bNOS κύτταρα. Αυτά τα ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες του εργαστηρίου, στις οποίες αναφέρεται ότι μεγαλύτερες δόσεις του HU-210 (50 & 100 μg/kg), καθώς και άλλων κανναβινοειδών όπως η AEA και η methAEA, προκαλούν μειορύθμιση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή επίμυων και αδυνατούν να προστατέψουν τα bNOS κύτταρα, ενώ μικρότερες δόσεις (25 & 12,5 μg/kg), δεν επηρεάζουν τον CB1 υποδοχέα και προστατεύον τα bNOS κύτταρα, στο μοντέλο του AMPA (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Περαιτέρω αποδείξεις για την σχέση ανάμεσα στην μειορύθμιση του CB1 υποδοχέα και τις νευροπροστατευτικές δράσεις που διαμεσολαβούνται μέσω αυτού, αποκτούμε από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου. Σε αυτές τις μελέτες η

συγχορήγηση των AEA, 2-AG ή HU-210 μαζί με αναστολείς της FAAH (AM6642) και της MAGL (AM9948), ένζυμα τα οποία μεταβολίζουν την AEA και τη 2-AG, αντίστοιχα, απέτυχαν να προστατεύσουν τα bNOS κύτταρα πιθανόν λόγω της μειορύθμισης των CB1 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή (Kokona και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Οι αναστολείς των ενζύμων όταν χορηγήθηκαν χωρίς την παρουσία εξωγενών καννανβινοειδών προστατέυσαν τα bNOS κύτταρα (Kokona και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Η μείωση της έκφρασης του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή, μετά από χρόνια και υποχρόνια χορήγηση 100 μg/kg HU-210, επιβεβαιώθηκε και μέσα από μελέτες με την χρήση Western. Οι αναλύσεις υπέδειξαν μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt στα ζώα που έλαβαν 100 μg/kg HU-210, γεγονός που υποδεικνύει μείωση της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt (Papadogkonaki και συν., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), το οποίο διαμεσολαβεί τις νευροπροστατευτικές του ιδιότητες (Kokona & Thermos, 2015). Κατ' ανάλογο τρόπο, εφόσον το WIN55,212-2 φαίνεται να ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt στον εγκέφαλο (Su και συν., 2016), είναι πιθανό η μειορύθμιση που προκαλείται στους CB1 υποδοχείς στον αμφιβληστροειδή από WIN55,212-2, να αντιστοιχεί και σε μειωμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt, το οποίο μπορεί να διαμεσολαβεί τις νευροπροστατευτικές του δράσεις στα bNOS κύτταρα. Ουσιαστικά η μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων από το WIN55,212-2, οδηγεί στην ανάπτυξη απευαισθητοποίησης-αντοχής στις νευροπροστατευτικές δράσεις του.

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνονται και από μελέτες στον εγκέφαλο, οι οποίες υποδεικνύουν ότι η απευαισθητοποίηση και η μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων από τα κανναβινοειδή, ευθύνονται για τη μείωση της σηματοδοτικής τους ικανότητας μέσω G πρωτεϊνών (Hsieh και συν., 2002· Sim-Selley και συν., 2002· Wu και συν., 2008). Οι Schlosburg και συν. (2010) αναφέρουν, ότι η επαναλαμβανόμενη χορήγηση του αναστολέα της MAGL, JZL184, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αντοχής στις αναλγητικές του ιδιότητες και διασταυρούμενης αντοχής με αγωνιστές του CB1 υποδοχέα. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η παρατεταμένη χορήγηση του αναστολέα, αύξησε τα επίπεδα της 2-AG κατά πολύ, το οποίο οδήγησε σε μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αντοχής (Schlosburg και συν., 2010). Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και από την γενετική διαγραφή (knock out) της MAGL, σε μύες (Schlosburg και συν., 2010). Τέλος όσον αφορά το WIN55,212-2, σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη οι Blair και συν., (2009), αναφέρουν ότι η παρατεταμένη έκθεση νευρώνων του ιπποκάμπου σε WIN55,212-2, προκάλεσε μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων, οδηγώντας παράλληλα στην ανάπτυξη αντοχής στις αντιεπιληπτικές του δράσεις.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης παρέχουν πληροφόρηση για τις νευροπροστατευτικές δράσεις του συνθετικού κανναβινοειδούς WIN55,212-2, στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Επιπροσθέτως παρέχονται στοιχεία για τις επιδράσεις της υποχρόνιας χορήγησης του WIN55,212-2 στην μειορύθμιση των CB1 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή, οι οποίες φαίνεται πως σχετίζονται άμεσα και με τις νευροπροστατευτικές του δράσεις, στο μοντέλο του AMPA. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός, μέσω του οποίου το WIN55,212-2 προστατεύει τα βραχύινα κύτταρα μέσω του CB1 υποδοχέα, καθώς και να αποσαφηνιστεί ο πιθανός ρόλος του CB2 υποδοχέα σε αυτή τη διαδικασία. Επιπλέον βαρύτητα θα πρέπει να δοθεί και στον ακριβή μηχανισμό μέσω του οποίου το WIN55,212-2, μειώνει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, μία ευεργετική επίδραση για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τέλος, θα πρέπει να ελεγχθεί το μονοπάτι που ακολουθεί ο CB1 υποδοχέας μετά την ενδοκυττάρωσή του, στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και γενικότερα η ενδοκυττάρια διακίνησή του υποδοχέα, καθώς και από ποιους παράγοντες αυτή επηρεάζεται.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aarum, J., Sandberg, K., Haeberlein, S. L. B., & Persson, M. A. (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*, 15983-15988.

Ahn, K. H., Mahmoud, M. M., Joong-Youn Shim, & Kendall, D. A. (2013). Distinct Roles of β-Arrestin 1 and β-Arrestin 2 in ORG27569-induced Biased Signaling and Internalization of the Cannabinoid Receptor 1 (CB1). *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 9790–9800. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438804

Amantea, D., Spagnuolo, P., Bari, M., Fezza, F., Mazzei, C., Tassorelli, C. et al. (2007). Modulation of the endocannabinoid system by focal brain ischemia in the rat is involved in neuroprotection afforded by 17β-estradiol. *The FEBS Journal*, *274*, 4464-4775.

Ambati, J., & Fowler, B. J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, *75*, 26-39.

Anderson, D. H., Talaga, K. C., Rivest, A. J., Barron, E., Hageman, G. S., & Johnson, L. V. (2004). Characterization of β amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, *78*, 243-256.

Antonetti, D. A., Barber, A. J., Bronson, S. K., Freeman, W. M., Gardner, T. W., Jefferson, L. S. et al. (2006). Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*, *55*, 2401-2411.

Araújo, D. S. M., Miya-Coreixas, V. S., Pandolfo, P., & Calaza, K. C. (2017). Cannabinoid receptors and TRPA1 on neuroprotection in a model of retinal ischemia. *Experimental Eye Research*, *154*, 116-125.

Araujo, S. V., Spaeth, G. L., Roth, S. M., & Starita, R. J. (1995). A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroids after trabeculectomy. *Ophthalmology*, *102*, 1753-1759.

Ashwell, K. W. S., Holländer, H., Streit, W., & Stone, J. (1989). The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Visual Neuroscience*, *2*, 437-448.

Asnaghi, V., Gerhardinger, C., Hoehn, T., Adeboje, A., & Lorenzi, M. (2003). A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes*, *52*, 506-511.

Balaiya, S., Edwards, J., Tillis, T., Khetpal, V., & Chalam, K. V. (2011). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) levels in aqueous humor of primary open angle glaucoma. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *5*, 553–556. http://doi.org/10.2147/OPTH.S19453

Ban, Y., & Rizzolo, L. J. (2000). Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *279*, 744-750.

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

Barutta, F., Corbelli, A., Mastrocola, R., Gambino, R., Di Marzo, V., Pinach, S. et al. (2010). Cannabinoid Receptor 1 Blockade Ameliorates Albuminuria in Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, *59*, 1046–1054. http://doi.org/10.2337/db09-1336

Beatty, S., Koh, H. H., Phil, M., Henson, D., & Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, *45*, 115-134.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*, 1620–1624.

Bisogno, T., Delton-Vandenbroucke, I., Milone, A., Lagarde, M., & Di Marzo, V. (1999). Biosynthesis and inactivation of N-arachidonoylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenoylethanolamine in bovine retina. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *370*, 300-307.

Blair, R. E., Deshpande, L. S., Sombati, S., Elphick, M. R., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2009). Prolonged exposure to WIN55, 212-2 causes downregulation of the CB1 receptor and the development of tolerance to its anticonvulsant effects in the hippocampal neuronal culture model of acquired epilepsy. *Neuropharmacology*, *57*, 208-218.

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

Block, M. L., Zecca, L., Jau-Shyong Hong, & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 57–69. https://doi.org/10.1038/nrn2038

Bodnarenko, S. R., & Chalupa, L. M. (1993). Stratification of ON and OFF ganglion cell dendrites depends on glutamate-mediated afferent.. *Nature*, *364*, 144.

Bok, D. (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci*, *1993*(Supplement 17), 189-195.

Bosier, B., Muccioli, G. G., Hermans, E., & Lambert, D. M. (2010). Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochemical Pharmacology*, *80*, 1-12.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., et al. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemical Journal*, *312*, 637-641.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., & Casellas, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral

cannabinoid receptor: involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *European Journal of Biochemistry*, *237*, 704-711.

Boulton, M., & Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye*, *15*, 384.

Bouskila, J., Javadi, P., Casanova, C., Ptito, M., & Bouchard, J. F. (2013). Müller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *Journal of Comparative Neurology*, *521*, 2399-2415.

Bouskila, J., Javadi, P., Casanova, C., Ptito, M., & Bouchard, J. F. (2013). Rod photoreceptors express GPR55 in the adult vervet monkey retina. *PLoS One*, *8*(11), e81080.

Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Vogt, L. J., & Sim-Selley, L. J. (1999). Chronic△ 9-Tetrahydrocannabinol Treatment Produces a Time-Dependent Loss of Cannabinoid Receptors and Cannabinoid Receptor-Activated G Proteins in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, *73*, 2447-2459.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, *414*, 813.

Buckley, N. E., Hansson, S., Harta, G., & Mezey, E. (1997). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*, *82*, 1131-1149.

Cabral, G. A., Harmon, K. N., & Carlisle, S. J. (2002). Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB 1 receptor participation. In Friedman, H., Klein, T. W., & Madden, J. J. (Eds.). Boston, MA: Spriger. (pp. 207-214).

Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J., & Marciano-Cabral, F. (2008). CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *British Journal of Pharmacology*, *153*, 240-251.

Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., & Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, *394*, 277.

Cao, W., Tombran-Tink, J., Chen, W., Mrazek, D., Elias, R., & McGinnis, J. F. (1999). Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *Journal of Neuroscience Research*, *57*, 789-800.

Cécyre, B., Monette, M., Beudjekian, L., Casanova, C., & Bouchard, J. F. (2014). Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 150.

Cécyre, B., Thomas, S., Ptito, M., Casanova, C., & Bouchard, J. F. (2014). Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *387*, 175-184.

Cécyre, B., Zabouri, N., Huppé-Gourgues, F., Bouchard, J. F., & Casanova, C. (2013). Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*, 8079-8090.

Chen, J., Matias, I., Dinh, T., Lu, T., Venezia, S., Nieves, A. et al. (2005). Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *330*, 1062-1067.

Chen, T. A., Yang, F., Cole, G. M., & Chan, S. O. (2001). Inhibition of caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in adult rat retina1. *Brain Research*, *904*, 177-188.

Chen, Y., Luo, X., Liu, S., & Shen, Y. (2018). Neuroprotective effect of cannabinoid receptor 1 antagonist in the MNU-induced retinal degeneration model. *Experimental Eye Research*, *167*, 145-151.

Chew, E. Y., Klein, M. L., Ferris, F. L., Remaley, N. A., Murphy, R. P., Chantry, K. et al. (1996). Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Archives of Ophthalmology*, *114*, 1079-1084.

Chihara, E., Matsuoka, T., Ogura, Y., & Matsumura, M. (1993). Retinal nerve fiber layer defect as an early manifestation of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, *100*, 1147-1151.

Chiu, K., Lam, T. T., Li, W. W. Y., Caprioli, J., & Kwong, J. M. K. (2005). Calpain and N-methyl-d-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity in rat retinas. *Brain Research*, *1046*, 207-215.

Cho, B. P., Song, D. Y., Sugama, S., Shin, D. H., Shimizu, Y., Kim, S. S. et al. (2006). Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia*, *53*, 92-102.

Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology*, *23*, 1261-1276.

Choudhury, S., Liu, Y., Clark, A. F., & Pang, I. H. (2015). Caspase-7: a critical mediator of optic nerve injury-induced retinal ganglion cell death. *Molecular Neurodegeneration*, *10*, 40.

Ciulla, T. A., Amador, A. G., & Zinman, B. (2003). Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care*, *26*, 2653-2664.

Colton, C. A., & Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS letters*, *223*, 284-288.

Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *37*, 205-237.

Connaughton V. Glutamate and Glutamate Receptors in the Vertebrate Retina. (2005). In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R (editors). Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11526/

Cousins, S. W., Espinosa-Heidmann, D. G., Alexandridou, A., Sall, J., Dubovy, S., & Csaky, K. (2002). The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation. *Experimental Eye Research*, *75*, 543-553.

Crandall, J., Matragoon, S., Khalifa, Y. M., Borlongan, C., Tsai, N. T., Caldwell, R. B., & Liou, G. I. (2007). Neuroprotective and intraocular pressure-lowering effects of (–) Δ9-tetrahydrocannabinol in a rat model of glaucoma. *Ophthalmic Research*, *39*, 69-75.

Crooks, J., & Kolb, H. (1992). Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina. *Journal of Comparative Neurology*, *315*, 287-302.

Cvenkel, B., Kopitar, A. N., & Ihan, A. (2010). Inflammatory Molecules in Aqueous Humour and on Ocular Surface and Glaucoma Surgery Outcome. *Mediators of Inflammation*, *2010*, 939602.

Dalton, V. S. & Zavitsanou, K. (2010). Cannabinoid effects on CB1 receptor density in the adolescent brain: an autoradiographic study using the synthetic cannabinoid HU210. *Synapse*, *64*, 845-854.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S. et al. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, *8*, 752.

Davanger, S., Ottersen, O. P., & Storm-Mathisen, J. (1991). Glutamate, GABA, and glycine in the human retina: an immunocytochemical investigation. *Journal of Comparative Neurology*, *311*, 483-494.

Daw, N. W., Brunken, W. J., & Parkinson, D. (1989). The function of synaptic transmitters in the retina. *Annual review of neuroscience*, *12*, 205-225.

Dawson, W. W., Jimenez-Antillon, C. F., Perez, J. M., & Zeskind, J. A. (1977). Marijuana and visionafter ten years' use in Costa Rica. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *16*, 689-699.

De Fonseca, F. R., Gorriti, M. A., Fernandez-Ruiz, J. J., Palomo, T., & Ramos, J. A. (1994). Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic Δ9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *47*, 33-40.

Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Xin Teng et al. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, *4*, 313–321.

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

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G. et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, *258*, 1946-1949.

Di Marzo, V., Bisogno, T., Melck, D., Ross, R., Brockie, H., Stevenson, L. et al. (1998). Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS letters*, *436*, 449-454.

Di Marzo, V., & Fontana, A. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, *372*, 686.

Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L. et al. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 10819-10824.

Docagne, F., Muñetón, V., Clemente, D., Ali, C., Loría, F., Correa, F. et al. (2007). Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *34*, 551-561.

Domenici, M. R., Azad, S. C., Marsicano, G., Schierloh, A., Wotjak, C. T., Dodt, H. U. et al. (2006). Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*, *26*, 5794-5799.

Donovan, M., & Cotter, T. G. (2002). Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death and Differentiation*, *9*, 1220.

Doonan, F., Donovan, M., & Cotter, T. G. (2003). Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. *Journal of Neuroscience*, *23*, 5723-5731.

Doss, R. C., Perkins, J. P., & Harden, T. K. (1981). Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *256*, 12281-12286.

Drake, M. T., Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2006). Trafficking of G protein–coupled receptors. *Circulation Research*, *99*, 570-582.

Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R., & Hjelmeland, L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*, *62*, 155-170.

El-Asrar, A. M. A., Dralands, L., Missotten, L., Al-Jadaan, I. A., & Geboes, K. (2004). Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *45*, 2760-2766.

El-Remessy, A. B., Al-Shabrawey, M., Khalifa, Y., Tsai, N. T., Caldwell, R. B., & Liou, G. I. (2006). Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *The American Journal of Pathology*, *168*, 235-244.

El-Remessy, A. B., Khalil, I. E., Matragoon, S., Abou-Mohamed, G., Tsai, N. J., Roon, P. et al. (2003). Neuroprotective effect of (−) Δ9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *The American Journal of Pathology*, *163*, 1997-2008.

El-Remessy, A. B., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Horvath, B., Patel, V., Al-Gayyar, M. M. H., & Pacher, P. (2011). Cannabinoid 1 receptor activation contributes to vascular inflammation and cell death in a mouse model of diabetic retinopathy and a human retinal cell line. *Diabetologia*, *54*, 1567-1578.

Engerman, R. L., & Kern, T. S. (1984). Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes*, *33*, 97-100.

Fan, S. F., & Yazulla, S. (2003). Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Visual Neuroscience*, *20*, 177-188.

Fan, S. F., & Yazulla, S. (2005). Reciprocal inhibition of voltage-gated potassium currents (I K (V)) by activation of cannabinoid CB 1 and dopamine D1 receptors in ON bipolar cells of goldfish retina. *Visual Neuroscience*, *22*, 55-63.

Fan, Y., Qiao, Y., Huang, J., & Tang, M. (2016). Protective effects of Panax notoginseng saponins against high glucose-induced oxidative injury in rat retinal capillary endothelial cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, *2016*.

Farrar, G. J., Kenna, P. F., & Humphries, P. (2002). On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *The EMBO Journal*, *21*, 857-864.

Feit-Leichman, R. A., Kinouchi, R., Takeda, M., Fan, Z., Mohr, S., Kern, T. S., & Chen, D. F. (2005). Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *46*, 4281-4287.

Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J., & Caron, M. G. (1996). G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *74*, 1095-1110.

Fernández-López, D., Martínez-Orgado, J., Nuñez, E., Romero, J., Lorenzo, P., Moro, M. Á., & Lizasoain, I. (2006). Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatric Research*, *60*, 169.

Ferreira, I. L., Duarte, C. B., & Carvalho, A. P. (1998). Kainate-induced retina amacrine-like cell damage is mediated by AMPA receptors. *Neuroreport*, *9*, 3471-3475.

FitzGibbon, T. (1997). The human fetal retinal nerve fiber layer and optic nerve head: a DiI and DiA tracing study. *Visual Neuroscience*, *14*, 433-447.

Franklin, A., Parmentier-Batteur, S., Walter, L., Greenberg, D. A., & Stella, N. (2003). Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *Journal of Neuroscience*, *23*, 7767-7775.

Fuchs, C., Forster, V., Balse, E., Sahel, J. A., Picaud, S., & Tessier, L. H. (2005). Retinal-Cell–Conditioned Medium Prevents TNF-α-Induced Apoptosis of Purified Ganglion Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *46*, 2983-2991.

Gafni, J., Cong, X., Chen, S. F., Gibson, B. W., & Ellerby, L. M. (2009). Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *Journal of Biological Chemistry*, *284*, 25441-25449.

Gallego, A. (1986). Comparative studies on horizontal cells and a note on microglial cells. *Progress in Retinal Research*, *5*, 165-206.

Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M. L., del Pulgar, T. G., Izquierdo, M., & Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine*, *6*, 313.

Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, *86*, 1646-1647.

García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J. A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Research*, *1134*, 162-170.

Gasic, G. P., & Hollmann, M. (1992). Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annual Review of Physiology*, *54*, 507-536.

Gastinger, M. J., Kunselman, A. R., Conboy, E. E., Bronson, S. K., & Barber, A. J. (2008). Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of Ins2Akita diabetic mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*, 2635-2642.

Gastinger, M. J., Singh, R. S., & Barber, A. J. (2006). Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *47*, 3143-3150.

Gatley, S. J., Lan, R., Pyatt, B., Gifford, A. N., Volkow, N. D., & Makriyannis, A. (1997). Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sciences*, *61*, PL191-PL197.

Gehrs, K. M., Anderson, D. H., Johnson, L. V., & Hageman, G. S. (2006). Age-related macular degeneration—emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Annals of Medicine*, *38*, 450-471.

Gerdeman, G. L., Ronesi, J., & Lovinger, D. M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature Neuroscience*, *5*, 446.

Gerdeman, G., & Lovinger, D. M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *Journal of Neurophysiology*, *85*, 468-471.

Geyer, O., Almog, J., Lupu-Meiri, M., Lazar, M., & Oron, Y. (1995). Nitric oxide synthase inhibitors protect rat retina against ischemic injury. *FEBS Letters*, *374*, 399-402.

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

Goldblum, D., & Mittag, T. (2002). Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vision Research*, *42*, 471-478.

Grimsey, N. L., Graham, E. S., Dragunow, M., & Glass, M. (2010). Cannabinoid receptor 1 trafficking and the role of the intracellular pool: implications for therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, *80*, 1050-1062.

Grueter, B. A., Brasnjo, G., & Malenka, R. C. (2010). Postsynaptic TRPV1 triggers cell type–specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, *13*, 1519.

Gupta, N., & Yücel, Y. H. (2007). Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, *18*, 110-114.

Hamano, K., Kiyama, H., Emson, P. C., Manabe, R., Nakauchi, M., & Tohyama, M. (1990). Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. *Journal of Comparative Neurology*, *302*, 417-424.

Hangai, M., Yoshimura, N., Hiroi, K., Mandai, M., & Honda, Y. (1996). Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Experimental Eye Research*, *63*, 501-509.

Hansen, H. H., Schmid, P. C., Bittigau, P., Lastres-Becker, I., Berrendero, F., Manzanares, J., & Hansen, H. S. (2001). Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, *78*, 1415-1427.

Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *The Lancet*, *368*, 1795-1809.

Hartveit, E. (1997). Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *Journal of Neurophysiology*, *77*, 1716-1730.

Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J., & Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, *135*, 1311-1323.

Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., & Wong, R. O. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, *42*, 44-84.

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

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A. et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews 54*, 161-202.

Howlett, A. C., Qualy, J. M., & Khachatrian, L. L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Molecular Pharmacology*, *29*, 307-313.

Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., & Mackie, K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Neurochemistry*, *73*, 493-501.

Hu, S., Arnold, A., Hutchens, J. M., Radicke, J., Cravatt, B. F., Wager-Miller, J. et al. (2010). Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, *518*, 3848-3866.

Hughes, B. A., Gallemore, R. P., & Miller, S. S. (1998). Transport mechanisms in the retinal pigment epithelium. *The Retinal Pigment Epithelium*, *80*, 103-134.

Hungund, B. L., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B. S., & Vadasz, C. (2003). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*, *84*, 698-704.

Hunter, S. A., Burstein, S., & Renzulli, L. (1986). Effects of cannabinoids on the activities of mouse brain lipases. *Neurochemical Research*, *11*, 1273-1288.

Ibán-Arias, R., Lisa, S., Mastrodimou, N., Kokona, D., Koulakis, E., Iordanidou, P. et al. (2018). The Synthetic Microneurotrophin BNN27 Affects Retinal Function in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes*, *67*, 321-333.

Ientile, R., Macaione, V., Teletta, M., Pedale, S., Torre, V., & Macaione, S. (2001). Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. *Journal of Neurochemistry*, *79*, 71-78.

Imamura, T., Tsuruma, K., Inoue, Y., Otsuka, T., Ohno, Y., Ogami, S. et al. (2018). Involvement of cannabinoid receptor type 2 in light-induced degeneration of cells from mouse retinal cell line in vitro and mouse photoreceptors in vivo. *Experimental Eye Research*, *167*, 44-50.

Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S. et al. (2006). Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 11282-11287.

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

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. (2001). The complement system and innate immunity.In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/

Jeon, Y. J., Yang, K. H., Pulaski, J. T., & Kaminski, N. E. (1996). Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor-kappa B/Rel activation. *Molecular Pharmacology*, *50*, 334-341.

Jin, W., Brown, S., Roche, J. P., Hsieh, C., Celver, J. P., Kovoor, A. et al. (1999). Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *Journal of Neuroscience*, *19*, 3773-3780.

Joo, C. K., Choi, J. S., Ko, H. W., Park, K. Y., Sohn, S., Chun, M. H. et al. (1999). Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *40*, 713-720.

Joo, C. K., Choi, J. S., Ko, H. W., Park, K. Y., Sohn, S., Chun, M. H. et al. (1999). Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *40*, 713-720.

Department of Biochemistry and Molecular Biophysics Thomas Jessell, Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4, pp. 1227-1246). E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds.). New York: McGraw-hill.

Kapin, M. A., Doshi, R., Scatton, B., DeSantis, L. M., & Chandler, M. L. (1999). Neuroprotective effects of eliprodil in retinal excitotoxicity and ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *40*, 1177-1182.

Karten, H. J., & Brecha, N. (1980). Localisation of substance P immunoreactivity in amacrine cells of the retina. *Nature*, *283*, 87.

Katona, I., Sperlágh, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, *19*, 4544-4558.

Kaur, C., Sivakumar, V., & Foulds, W. S. (2006). Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *47*, 1126-1141.

Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M. et al. (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *Journal of Neuroscience*, *26*, 2991-3001.

Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M. et al. (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *Journal of Neuroscience*, *26*, 2991-3001.

Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M., Thomsen, S., Srinivasan, A., & Bähr, M. (1999). Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS letters*, *453*, 361-364.

Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M., Thomsen, S., Srinivasan, A., & Bähr, M. (1999). Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS letters*, *453*, 361-364.

Kiagiadaki, F., & Thermos, K. (2008). Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*, 3080-3089.

Kiagiadaki, F., Savvaki, M., & Thermos, K. (2010). Activation of somatostatin receptor (sst5) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology*, *58*, 297-303.

Kim, I. B., Lee, E. J., Kim, K. Y., Ju, W. K., Oh, S. J., Joo, C. K., & Chun, M. H. (1999). Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the mammalian retina. *Neuroscience Letters*, *267*, 193-196.

Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., & Cruickshanks, K. J. (1998). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: XVII: The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes1. *Ophthalmology*, *105*, 1801-1815.

Kokona, D., & Thermos, K. (2015). Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity in vivo, via activation of CB1 receptors: involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Experimental Eye Research*, *136*, 45-58.

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

Kokona, D., Georgiou, P.-C., Kounenidakis, M., Kiagiadaki, F., & Thermos, K. (2016). Endogenous and Synthetic Cannabinoids as Therapeutics in Retinal Disease. *Neural Plasticity*, 1–12.

Kolb, H. (2011). Simple Anatomy of the Retina by Helga Kolb. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System.* Retrieved from http://webvision. med. utah. edu/book/part-i-foundations/simpleanatomy-of-the-retina.

Kolb, H. (2018). *Gross anatomy of the eye.* Ανακτήθηκε από: https://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/gross-anatomy-of-the-ey/

Kolb, H. (2018). *Simple anatomy of the retina.* Ανακτήθηκε από: https://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina/

Kolb, H., Linberg, K. A., & Fisher, S. K. (1992). Neurons of the human retina: a Golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, *318*, 147-187.

Kouznetsova, M., Kelley, B., Shen, M., & Thayer, S. A. (2002). Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Molecular Pharmacology*, *61*, 477-485.

Kozak, K. R., Prusakiewicz, J. J., & Marnett, L. J. (2004). Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Current Pharmaceutical Design*, *10*, 659-667.

Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, *19*, 312-318

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

Krishnan, G. & Chatterjee, N. (2014). Endocannabinoids affect innate immunity of Muller glia during HIV-1 Tat cytotoxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *59*, 10-23.

Kroll, A. J. (1968). Experimental central retinal artery occlusion. *Archives of Ophthalmology*, *79*, 453-469.

Kwong, J. M., & Lam, T. T. (2000). N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced apoptosis in adult rabbit retinas. *Experimental Eye Research*, *71*, 437-444.

Lagnado, L. & Baylor, D. (1992). Signal flow in visual transduction. *Neuron*, *8*, 995-1002.

Lam, T. T. & Tso, M. O. (1996). Nitric oxide synthase (NOS) inhibitors ameliorate retinal damage induced by ischemia in rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, *92*, 329-340.

Lam, T. T., Abler, A. S., Kwong, J. M., & Tso, M. O. (1999). N-methyl-D-aspartate (NMDA)–induced apoptosis in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *40*, 2391-2397.

Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., & Barak, L. S. (1999). The β2-adrenergic receptor/βarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 3712-3717.

Larner, S. F., McKinsey, D. M., Hayes, R. L., & W. Wang, K. K. (2005). Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurochemistry*, *94*, 97-108.

Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J. A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *19*, 96-107.

Lax, P., Esquiva, G., Altavilla, C., & Cuenca, N. (2014). Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, *120*, 175-185.

Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and β-arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 18677-18680.

Leist, M., Fava, E., Montecucco, C., & Nicotera, P. (1997). Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience*, *9*, 1488-1498.

Leonelli, M., Martins, D. O., Kihara, A. H., & Britto, L. R. (2009). Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *27*, 709-718.

Lévénès, C., Daniel, H., Soubrié, P., & Crépel, F. (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Physiology*, *510*, 867-879.

Levin, L. A. (2003). Adler's Physiology of the Eye: Clinical Application, 10th Edition,: edited by Paul L. Kaufman and Albert Alm, St. Louis, Mosby. *Survey of Ophthalmology*, *48*,464.

Ligresti, A., Cascio, M. G., & Marzo, V. D. (2005). Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, *4*, 615-623.

Lin, A. (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, *25*, 17-24.

Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, *79*, 1431-1568.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B. X., Kim, H. Y., Luquet, S. et al. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*, *54*, 1-7.

Lohse, M. J. (1993). Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1179*, 171-188.

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

Lorén, I., Tornqvist, K., & Alumets, J. (1980). VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-immunoreactive neurons in the retina of the rat. *Cell and tissue research*, *210*(1), 167-170.

Lu, Q., Straiker, A., Lu, Q., & Maguire, G. (2000). Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Visual Neuroscience*, *17*, 91-95.

Ludányi, A., Erőss, L., Czirják, S., Vajda, J., Halász, P., Watanabe, M. et al. (2008). Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *28*, 2976-2990.

Madeira, M. H., Rashid, K., Ambrósio, A. F., Santiago, A. R., & Langmann, T. (2018). Blockade of microglial adenosine A2A receptor impacts inflammatory mechanisms, reduces ARPE-19 cell dysfunction and prevents photoreceptor loss in vitro. *Scientific Reports*, *8*, 2272.

Malek, G., & Lad, E. M. (2014). Emerging roles for nuclear receptors in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*, 4617-4636.

Malek, G., Busik, J., Grant, M. B., & Choudhary, M. (2018). Models of retinal diseases and their applicability in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *13*, 359-377.

Marc, R. E., Murry, R. F., & Basinger, S. F. (1995). Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons. *Journal of Neuroscience*, *15*, 5106-5129.

Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A. et al. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, *302*, 84-88.

Martin, P. M., Roon, P., Van Ells, T. K., Ganapathy, V., & Smith, S. B. (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *45*, 3330-3336.

Martínez-García, M. C., Martínez, T., Pañeda, C., Gallego, P., Jimenez, A. I., & Merayo, J. (2013). Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes. *Histology and Histopathology*, *11*, 1507-1516.

Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J. H. et al. (2007). Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *The FASEB Journal*, *21*, 802-811.

Martín-Moreno, A. M., Reigada, D., Ramírez, B. G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., & de Ceballos, M. L. (2011). Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Molecular Pharmacology*, *79*, 964-73.

Masland, R. H., & Ames 3rd, A. (1976). Responses to acetylcholine of ganglion cells in an isolated mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, *39*, 1220-1235.

Massey, S. C., & Miller, R. F. (1988). Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. *The Journal of Physiology*, *405*, 635-655.

Mastrodimou, N., Lambrou, G. N., & Thermos, K. (2005). Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *371*, 44-53.

Matias, I., Wang, J. W., Moriello, A. S., Nieves, A., Woodward, D. F., & Di Marzo, V. (2006). Changes in endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in eye tissues of patients with diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *75*, 413-418.

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

Matsuzaki, H., Tamatani, M., Mitsuda, N., Namikawa, K., Kiyama, H., Miyake, S. I., & Tohyama, M. (1999). Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, *73*, 2037-2046.

Mayer, M. L., & Westbrook, G. L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of Physiology*, *394*, 501-527.

McAllister, S. D., & Glass, M. (2002). CB1 and CB2 receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, *66*, 161-171.

McCarthy, R.D (2018). *Anatomy of the Eye*. Ανακτήθηκε από: http://orsillovisioncare.com/articles/anatomy_a1.htm

McKinney, M. K., & Cravatt, B. F. (2005). Structure and Function of Fatty Acid Amide Hydrolase. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 411–432.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R. et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, *50*, 83-90.

Mechoulam, R., Braun, P., & Gaoni, Y. (1967). Stereospecific synthesis of (-)-. DELTA. 1- and (-)-. DELTA. 1 (6)-tetrahydrocannabinols. *Journal of the American Chemical Society*, *89*, 4552-4554.

Mishra, O. P., Ashraf, Q. M., & Delivoria-Papadopoulos, M. (2002). Phosphorylation of cAMP response element binding (CREB) protein during hypoxia in cerebral cortex of newborn piglets and the effect of nitric oxide synthase inhibition. *Neuroscience*, *115*, 985-991.

Morgan, I. G. (1987). AMPA is a powerful neurotoxin in the chicken retina. *Neuroscience Letters*, *79*, 267-271.

Mosinger, J. L., & Altschuler, R. A. (1985). Aspartate aminotransferase-like immunoreactivity in the guinea pig and monkey retinas. *Journal of Comparative Neurology*, *233*, 255-268.

Mosinger, J. L., Price, M. T., Bai, H. Y., Xiao, H., Wozniak, D. F., & Olney, J. W. (1991). Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Experimental Neurology*, *113*, 10-17.

Moss, D. W., & Bates, T. E. (2001). Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-γ causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *European Journal of Neuroscience*, *13*, 529-538.

Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Batkai, S., Patel, V., Kashiwaya, Y., Liaudet, L. et al. (2009). CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *85*, 773-784.

Nakanishi, S., & Masu, M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *23*, 319-348.

Nawy, S., & Jahr, C. E. (1990). Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature*, *346*, 269.

Netzeband, J. G., Conroy, S. M., Parsons, K. L., & Gruol, D. L. (1999). Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca2+ signals in cerebellar granule neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, *19*, 8765-8777.

Neufeld, A. H., Shareef, S., & Pena, J. (2000). Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, *416*, 269-275.

Newman, E. A. (2000). Muller cells and the retinal pigment epithelium. *Principles and Practice of Ophthalmology* (2nd ed., pp. 1763-1785), United States: WB Saunders

Nicholson, R. A., Liao, C., Zheng, J., David, L. S., Coyne, L., Errington, A. C. et al. (2003). Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Research*, *978*, 194-204.

Noailles, A., Fernández-Sánchez, L., Lax, P., & Cuenca, N. (2014). Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. *Journal of Neuroinflammation*, *11*, 186.

Nucci, C., Gasperi, V., Tartaglione, R., Cerulli, A., Terrinoni, A., Bari, M. et al. (2007). Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure–induced ischemia in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *48*, 2997-3004.

Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, *88*, 844-856.

Ong, J., & Kerr, D. I. (2000). Recent advances in GABAB receptors: from pharmacology to molecular biology. *Acta Pharmacologica Sinica*, *21*, 111-123.

Opere, C. A., Zheng, W. D., Zhao, M., Lee, J. S., Kulkarni, K. H., & Ohia, S. E. (2006). Inhibition of potassium-and ischemia-evoked [3H] D-aspartate release from isolated bovine retina by cannabinoids. *Current Eye Research*, *31*, 645-653.

Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P., Chidlow, G., Graham, M., & Melena, J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, *23*, 91-147.

Oviedo, A., Glowa, J., & Herkenham, M. (1993). Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Research*, *616*, 293-302.

Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M. R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E. et al. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*, *132*, 3152-3164.

Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanuš, L., Breuer, A., Mechoulam, R., & Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, *413*, 527.

Pascolini, D., & Mariotti, S. P. (2012). Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*, *96*, 614-618.

Patwardhan, A. M., Jeske, N. A., Price, T. J., Gamper, N., Akopian, A. N., & Hargreaves, K. M. (2006). The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 11393-11398.

Pellegrini-Giampietro, D. E., Gorter, J. A., Bennett, M. V., & Zukin, R. S. (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca2+-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends in Neurosciences*, *20*, 464-470.

Pennesi, M. E., Neuringer, M., & Courtney, R. J. (2012). Animal models of age related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*, 487-509.

Perry, V. H., Andersson, P. B., & Gordon, S. (1993). Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends in Neurosciences*, *16*, 268-273.

Pertwee, R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *74*, 129-180.

Pertwee, R. G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Current Medicinal Chemistry*, *17*, 1360-1381.

Pinar-Sueiro, S., Hurtado, J. Á. Z., Veiga-Crespo, P., Sharma, S. C., & Vecino, E. (2013). Neuroprotective effects of topical CB1 agonist WIN 55212-2 on retinal ganglion cells after acute rise in intraocular pressure induced ischemia in rat. *Experimental Eye Research*, *110*, 55-58.

Pintor, A., Tebano, M. T., Martire, A., Grieco, R., Galluzzo, M., Scattoni, M. L. et al. (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates the effects induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neuropharmacology*, *51*, 1004-1012.

Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S. Y., Goutopoulos, A., Xie, X. Q., & Makriyannis, A. (1999). Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 5802-5807.

Porcella, A., Maxia, C., Gessa, G. L., & Pani, L. (2000). The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *European Journal of Neuroscience*, *12*(3), 1123-1127.

Porcella, A., Maxia, C., Gessa, G. L., & Pani, L. (2000). The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *European Journal of Neuroscience*, *12*, 1123-1127.

Price, D. A., Martinez, A. A., Seillier, A., Koek, W., Acosta, Y., Fernandez, E. et al. (2009). WIN55, 212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, *29*, 2177-2186.

Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*, 300.

Provis, J. M. (2001). Development of the primate retinal vasculature. *Progress in Retinal and Eye Research*, *20*, 799-821.

Pryce, G., Ahmed, Z., Hankey, D. J., Jackson, S. J., Croxford, J. L., Pocock, J. M. et al. (2003). Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain*, *126*, 2191-2202.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors.(2001) Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Anatomy of the Eye.Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11120/

Qu, J., Wang, D., & Grosskreutz, C. L. (2010). Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Experimental Eye Research*, *91*, 48-53.

Quigley, H. A. (1999). Neuronal death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, *18*, 39-57.

Quigley, H. A. & Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*, *90*, 262-267.

Ramírez, B. G., Blázquez, C., del Pulgar, T. G., Guzmán, M., & de Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *Journal of Neuroscience*, *25*, 1904-1913.

Reichenbach, A., & Robinson, S. R. (1995). The involvement of Müller cells in the outer retina. In *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina* (pp. 395-416). Springer, Dordrecht.

Reiner, P. B., Laycock, A. G., & Doll, C. J. (1990). A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neuroscience Letters*, *119*, 175-178.

Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'Ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., & Mariotti, S. P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, *82*, 844-851.

Roche, J. P., Bounds, S., Brown, S., & Mackie, K. (1999). A mutation in the second transmembrane region of the CB1 receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization. *Molecular Pharmacology*, *56*, 611-618.

Roh, M., Zhang, Y., Murakami, Y., Thanos, A., Lee, S. C., Vavvas, D. G. et al. (2012). Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor-α (TNF-α), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PLoS One*, *7*, 40065.

Romero, J., Berrendero, F., Manzanares, J., Pérez, A., Corchero, J., Fuentes, J. A. et al. (1998). Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to Δ9-tetrahydrocannabinol. *Synapse*, *30*, 298-308.

Romero, J., Garcia-Palomero, E., Castro, J. G., Garcia-Gil, L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1997). Effects of chronic exposure to Δ9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Molecular Brain Research*, *46*, 100-108.

Roof, D. J., & Makino, C. L. (2000). The structure and function of retinal photoreceptors. *Principles and Practice of Ophthalmology*,*26*, 1624-1673.

Rosenbaum, D. M., Degterev, A., David, J., Rosenbaum, P. S., Roth, S., Grotta, J. C. et al. (2010). Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. *Journal of Neuroscience Research*, *88*, 1569-1576.

Roth, S. (1997). Role of nitric oxide in retinal cell death. *Clinical neuroscience (New York, NY)*, *4*, 216-223.

Rozenfeld, R., & Devi, L. A. (2008). Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *The FASEB Journal*, *22*, 2311-2322.

Rubino, T., Vigano, D., Massi, P., & Parolaro, D. (2000). Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55, 940. *Journal of Neurochemistry*, *75*, 2080-2086.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J. et al. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British journal of Pharmacology*, *152*, 1092-1101.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J. & Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, *152*, 1092-1101.

Sakamoto, K., Kuroki, T., Okuno, Y., Sekiya, H., Watanabe, A., Sagawa, T. et al. (2014). Activation of the TRPV1 channel attenuates N-methyl-D-aspartic acid-induced neuronal injury in the rat retina. *European Journal of Pharmacology*, *733*, 13-22.

Sappington, R. M., Sidorova, T., Long, D. J., & Calkins, D. J. (2009). TRPV1: contribution to retinal ganglion cell apoptosis and increased intracellular Ca2+ with exposure to hydrostatic pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *50*, 717-728.

Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., & Marunouchi, T. (1989). Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Research*, *491*, 394-397.

Schlicker, E., & Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*, 565-572.

Schlicker, E., Timm, J., & Göthert, M. (1996). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *354*, 791-795.

Schlicker, E., & Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*, 565-572.

Schlosburg, J. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Nomura, D. K., Pan, B., Kinsey, S. G. et al. (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nature Neuroscience*, *13*, 1113.

Schnitzer, J. (1988). Astrocytes in mammalian retina. *Progress in Retinal Research*, *7*, 209-231.

Schomacher, M., Müller, H. D., & Sommer, C. (2006). Short-term ischemia usually used for ischemic preconditioning down-regulates central cannabinoid receptors in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathologica*, *111*, 8-14.

Schultz, K., & Stell, W. K. (1996). Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neuroscience Letters*, *211*, 191-194.

Schwitzer, T., Schwan, R., Angioi-Duprez, K., Ingster-Moati, I., Lalanne, L., Giersch, A., & Laprevote, V. (2015). The cannabinoid system and visual processing: a review on experimental findings and clinical presumptions. *European Neuropsychopharmacology*, *25*, 100-112.

Sennlaub, F., Courtois, Y., & Goureau, O. (2002). Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *Journal of Neuroscience*, *22*, 3987-3993.

Sharma, R. K., & Ehinger, B. E. J. (2003). Development and structure of the retina. *Adler's Physiology of the Eye: Clinical Applications*, *10*, 319-347.

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

Sheng, W. S., Hu, S., Min, X., Cabral, G. A., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2005). Synthetic cannabinoid WIN55, 212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1β-stimulated human astrocytes. *Glia*, *49*, 211-219.

Sibley, D. R., Strasser, R. H., Benovic, J. L., Daniel, K., & Lefkowitz, R. J. (1986). Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*, 9408-9412.

Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological Reviews*, *47*, 181-234.

Siliprandi, R., Canella, R., Carmignoto, G., Schiavo, N., Zanellato, A., Zanoni, R., & Vantini, G. (1992). N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Visual Neuroscience*, *8*, 567-573.

Sim, L. J., Hampson, R. E., Deadwyler, S. A., & Childers, S. R. (1996). Effects of chronic treatment with Δ9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S] GTPγS autoradiography in rat brain. *Journal of Neuroscience*, *16*, 8057-8066.

Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P., & Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, *49*, 489-502.

Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2010). Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Molecular BioSystems*, *6*, 1411-1418.

Sim-Selley, L. J. (2003). Regulation of Cannabinoid CB1 Receptors in the Central Nervous System by Chronic Cannabinoids. *Critical Reviews in Neurobiology*, *15*, 91–119.

Singhal, S., Lawrence, J. M., Salt, T. E., Khaw, P. T., & Limb, G. A. (2010). Triamcinolone attenuates macrophage/microglia accumulation associated with NMDA-induced RGC death and facilitates survival of Müller stem cell grafts. *Experimental Eye Research*, *90*, 308-315.

Slusar, J. E., Cairns, E. A., Szczesniak, A. M., Bradshaw, H. B., Di Polo, A., & Kelly, M. E. (2013). The fatty acid amide hydrolase inhibitor, URB597, promotes retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of optic nerve axotomy. *Neuropharmacology*, *72*, 116-125.

Snell, R. S., & Lemp, M. A. (2013). *Clinical anatomy of the eye*. John Wiley & Sons.
Steinberg, R. H. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica*, *60*, 327-346.

Straiker, A., & Sullivan, J. M. (2003). Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *Journal of Neurophysiology*, *89*, 2647-2654.

Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H. J., & Maguire, G. (1999). Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 14565-14570.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, *85*, 845-881.

Streit, W. J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, *40*, 133-139.

Su, S. H., Wang, Y. Q., Wu, Y. F., Wang, D. P., Lin, Q., & Hai, J. (2016). Cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against cognitive impairment in rats of chronic cerebral hypoperfusion via PI3K/AKT signaling. *Behavioural Brain Research*, *313*, 334-344.

Sun, J., Fang, Y., Chen, T., Guo, J., Yan, J., Song, S. et al. (2013). WIN55, 212-2 promotes differentiation of oligodendrocyte precursor cells and improve remyelination through regulation of the phosphorylation level of the ERK 1/2 via cannabinoid receptor 1 after stroke-induced demyelination. *Brain Research*, *1491*, 225-235.

Tanihara, H., Inatani, M., & Honda, Y. (1997). Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, *16*, 271-301.

Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J. et al. (2007). A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *Journal of Neuroscience*, *27*, 4165-4177.

Thanos, S., Mey, J. G., & Wild, M. (1993). Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience*, *13*, 455-466.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, *62*, 405-496.

Tuo, J., Bojanowski, C. M., Zhou, M., Shen, D., Ross, R. J., Rosenberg, K. I. et al. (2007). Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *48*, 3827-3836.

Twitchell, W., Brown, S., & Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit N-and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, *78*, 43-50.

Ullian, E. M., Barkis, W. B., Chen, S., Diamond, J. S., & Barres, B. A. (2004). Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *26*, 544-557.

Upender, M. B., & Naegele, J. R. (1999). Activation of microglia during developmentally regulated cell death in the cerebral cortex. *Developmental Neuroscience*, *21*, 491-505.

van der Stelt, M., Veldhuis, W. B., Maccarrone, M., Bär, P. R., Nicolay, K., Veldink, G. A., ... & Vliegenthart, J. F. (2002). Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Molecular Neurobiology*, *26*, 317-346.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K. et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, *310*, 329-332.

Vaney, D. I. (1986). Morphological identification of serotonin-accumulating neurons in the living retina. *Science*, *233*, 444-446.

Vásquez, C., Navarro-Polanco, R. A., Huerta, M., Trujillo, X., Andrade, F., Trujillo-Hernández, B., & Hernández, L. (2003). Effects of cannabinoids on endogenous K+ and Ca2+ currents in HEK293 cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *81*, 436-442.

Villarroel, M., Ciudin, A., Hernández, C., & Simó, R. (2010). Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World Journal of Diabetes*, *1*, 57-64.

Waksman, Y., Olson, J. M., Carlisle, S. J., & Cabral, G. A. (1999). The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *288*, 1357-1366.

Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 12815-12819.

Walton, N. M., Sutter, B. M., Laywell, E. D., Levkoff, L. H., Kearns, S. M., Marshall, G. P. et al. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*, *54*, 815-825.

Wang, H. Y., Berrios, M., & Malbon, C. C. (1989). Localization of β-adrenergic receptors in A431 cells in situ. Effect of chronic exposure to agonist. *Biochemical Journal*, *263*, 533-538.

Warrier, A., & Wilson, M. (2007). Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Visual neuroscience*, *24*, 25-35.

Wassle, H., & Chun, M. H. (1988). Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the cat retina. *Journal of Neuroscience*, *8*, 3383-3394.

Wässle, H., Heinze, L., Ivanova, E., Majumdar, S., Weiss, J., Harvey, R. J., & Haverkamp, S. (2009). Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *2*, 6.

Weber, B., & Schlicker, E. (2001). Modulation of dopamine release in the guinea-pig retina by Gi-but not by Gs-or Gq-protein-coupled receptors. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *15*, 393-400.

Weerasekera, L. Y., Balmer, L. A., Ram, R., & Morahan, G. (2015). Characterization of retinal vascular and neural damage in a novel model of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(6), 3721-3730.

Wei, Y., Wang, X., & Wang, L. (2009). Presence and regulation of cannabinoid receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Molecular vision*, *15*, 1243-1251.

Wei, Y., Wang, X., Zhao, F., Zhao, P. Q., & Kang, X. L. (2013). Cannabinoid receptor 1 blockade protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative injury. *Molecular vision*, *19*, 357-366.

Weinreb, R. N., & Khaw, P. T. (2004). Primary open-angle glaucoma. *The Lancet*, *363*, 1711-1720.

Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., & Remé, C. E. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, *24*, 275-306.

Wert, K. J., Lin, J. H., & Tsang, S. H. (2014). General pathophysiology in retinal degeneration. In (Casaroli-Marano, R.P & Zarbin, M.A., edrs) *Cell-Based Therapy for Retinal Degenerative Disease* (Vol. 53, pp. 33-43). Karger Publishers.

Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, *410*, 588.

Wu, D. F., Yang, L. Q., Goschke, A., Stumm, R., Brandenburg, L. O., Liang, Y. J. et al. (2008). Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *Journal of Neurochemistry*, *104*, 1132-1143.

Wurtz, R. H., & Kandel, E. R. (2000). Central visual pathways. *Principles of Neural Science*, *4*, 523-545.

Yamada, T., Marshak, D., Basinger, S., Walsh, J., Morley, J., & Stell, W. (1980). Somatostatin-like immunoreactivity in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*, 1691-1695.

Yang, J. H., & WU, S. M. (1997). Characterization of glutamate transporter function in the tiger salamander retina. *Vision Research*, *37*, 827-838.

Yazulla, S. (2008). Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Progress in Retinal and Eye Research*, *27*, 501-526.

Yazulla, S., Studholme, K. M., McIntosh, H. H., & Deutsch, D. G. (1999). Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, *415*, 80-90.

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

Yoles, E., & Schwartz, M. (1998). Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies. *Experimental Neurology*, *153*, 1-7.

Yu, S. S., Lefkowitz, R. J., & Hausdorff, W. P. (1993). Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *Journal of Biological Chemistry*, *268*, 337-341.

Yu, W., & Miller, R. F. (1995). NBQX, an improved non-NMDA antagonist studied in retinal ganglion cells. *Brain Research*, *692*, 190-194.

Yücel, Y. H., Zhang, Q., Gupta, N., Kaufman, P. L., & Weinreb, R. N. (2000). Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, *118*, 378-384.

Zabouri, N., Ptito, M., Casanova, C., & Bouchard, J. F. (2011). Fatty acid amide hydrolase expression during retinal postnatal development in rats. *Neuroscience*, *195*, 145-165.

Zeng, H. Y., Zhu, X. A., Zhang, C., Yang, L. P., Wu, L. M., & Tso, M. O. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *46*, 2992-2999.

Zhang, J., & Diamond, J. S. (2006). Distinct perisynaptic and synaptic localization of NMDA and AMPA receptors on ganglion cells in rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, *498*, 810-820.

Zimov, S., & Yazulla, S. (2004). Localization of vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1)-like immunoreactivity in goldfish and zebrafish retinas: restriction to photoreceptor synaptic ribbons. *Journal of Neurocytology*, *33*, 441-452.

Zubrow, A. B., Delivoria-Papadopoulos, M., Ashraf, Q. M., Ballesteros, J. R., Fritz, K. I., & Mishra, O. P. (2002). Nitric oxide-mediated expression of Bax protein and DNA fragmentation during hypoxia in neuronal nuclei from newborn piglets. *Brain Research*, *954*, 60-67.

Zulliger, R., Lecaudé, S., Eigeldinger-Berthou, S., Wolf-Schnurrbusch, U. E., & Enzmann, V. (2011). Caspase-3-independent photoreceptor degeneration by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induces morphological and functional changes in the mouse retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *249*, 859-869.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. H., Sørgård, M., Di Marzo, V. et al. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, *400*, 452.