



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
MEDICAL SCHOOL

Διδακτορική διατριβή με θέμα:

Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών ως θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση αμφιβληστροειδοπαθειών

Doctoral thesis entitled:

The endocannabinoid system as a therapeutic target for retinopathies

Δημήτρης Σπυριδάκος

Ψυχολόγος, MSc

Μέντορας

Κυριακή Θερμού

Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Ηράκλειο, 2023

Έναρξη διδακτορικής διατριβής: **26/03/2019**

Υποστήριξη διδακτορικής διατριβής: **04/09/2023**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο:

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Τομέας Βασικών Επιστημών

Ιατρική Σχολή

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μέντορας

Κυριακή Θερμού, Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κυριακή Θερμού, Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Ανδρέας Καστελλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κυριακή Θερμού, Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Ανδρέας Καστελλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας

Γιώργος Παναγής, Καθηγητής Βιοψυχολογίας

Ιωάννης Χαραλαμπίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας

Κυριακή Σιδηροπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νευροφυσιολογίας

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

«Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	5
Συντομογραφίες.....	7
Περίληψη.....	10
Abstract	14
1. Εισαγωγή.....	17
1.1. Ανατομία του οφθαλμού	17
1.2. Ανατομία του αμφιβληστροειδούς	18
1.2.1. Κυτταροαρχιτεκτονική και τύποι κυττάρων του αμφιβληστροειδούς	19
1.2.2. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή	29
1.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.....	30
1.3.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια: Μία νόσος της «νευροαγγειακής μονάδας»	32
1.3.2. Προς ένα αναθεωρημένο μοντέλο παθογένειας της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.....	42
1.3.3. Υπάρχουσες θεραπείες και μελλοντικές οπτικές για την αντιμετώπιση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας	44
1.4. Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών.....	45
1.4.1. Ενδογενή και συνθετικά κανναβινοειδή.....	46
1.4.2. Τα ενδογενή κανναβινοειδή ως ανάδρομοι αγγελιοφόροι και ρυθμιστές της συναπτικής δραστηριότητας.....	47
1.4.3. Υποδοχείς κανναβινοειδών και σηματοδότηση	48
1.4.4. Ένζυμα βιοσύνθεσης και αποδόμησης των ενδογενών κανναβινοειδών	51
1.5. Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή.....	55
1.6. Προστατευτικές επιδράσεις των CB1 και CB2 κανναβινοειδικών υποδοχέων σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών.....	59
1.7. Εμπλοκή των CB1 και των CB2 υποδοχέων στην παθοφυσιολογία των επιλοκών του διαβήτη	63
2. Σκοπός της μελέτης.....	67
3. Μεθοδολογία	69
3.1. Πειραματόζωα και συνθήκες διαβίωσης	69
3.2. Ουσίες.....	69
3.3. Επαγωγή του διαβήτη.....	69
3.3.1. <i>In vivo</i> μοντέλο επαγόμενης από STZ διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας	70
3.4. Μέτρηση της αγγειακής διαπερατότητας με την τεχνική Evans Blue.....	71
3.5. Μελέτη της έκφρασης του TNF-α και του VEGF με την χρήση ELISA	73

3.6. Μέτρηση των επιπέδων του AM1710 και του SR141716 στον αμφιβληστροειδή, με την χρήση υγρής χρωμα-τογραφίας υψηλής απόδοσης, συζευγμένης με σύστημα φασματογραφίας μάζας (HR-LC/MS/MS).....	73
3.7. <i>In vivo</i> μοντέλο επαγόμενης από AMPA διεγερσιτο-ξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυος	74
3.8. Αφαίρεση και προετοιμασία ιστών	75
3.9. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις	76
3.10. Ιστολογική χρώση	78
3.11. Μικροσκοπία και μελέτες ποσοτικοποίησης.....	78
3.12. Στατιστική ανάλυση	80
4. Αποτελέσματα	81
1 ^ο Μέρος: Επιδράσεις των κανναβινοειδών σε ένα <i>in vivo</i> μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας πρώιμου σταδίου.....	81
4.1. Επιδράσεις των κανναβινοειδών στα επίπεδα γλυκόζης και στο βάρος των ζώων μετά την χορήγηση STZ	81
4.2. Χορήγηση CB2 αγωνιστή, CB1 ανταγωνιστή ή του συνδυασμού τους, προστατεύει τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων στον διαβητικό αμφιβληστροειδή.....	82
4.3. Χορήγηση CB2 αγωνιστή ή CB1 ανταγωνιστή επαναφέρει το πάχος του διαβητικού αμφιβληστροειδούς σε φυσιολογικά επίπεδα.....	84
4.4. Επιδράσεις των μονών θεραπειών και της συνδυαστικής θεραπείας με κανναβινοειδή στην βιωσιμότητα των βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν bNOS.....	86
4.5. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα αναστέλλει τον επαγόμενο από την κασπάση 3 αποπτωτικό θάνατο στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς	88
4.6. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα αναστέλλει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς.....	89
4.7. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα αναστέλλει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την απελευθέρωση TNFα στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς.....	90
4.8. Θεραπεία με CB2 αγωνιστή, CB1 ανταγωνιστή ή συνδυασμό τους, μειώνει το νιτρικό στρες στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς.....	91
4.9. Θεραπεία με CB2 αγωνιστή ή CB1 ανταγωνιστή διατηρεί την ακεραιότητα του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού	93
4.10. Ανίχνευση του AM1710 και του SR141716 στον αμφιβληστροειδή.....	94
2 ^ο Μέρος: Επιδράσεις των αναστολέων μεταβολισμού του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG σε ένα <i>in vivo</i> μοντέλο επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυος	95
4.11. Οι αναστολείς AM12100 (ABHD6 αναστολέας) και AM11920 (διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας), παρέχουν προστασία στα bNOS βραχύνια κύτταρα εναντίον της AMPA διεγερσιτοξικότητας	95
4.12. Ο διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας, AM11920, μειώνει την επαγόμενη από το AMPA ενεργοποίηση της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή.....	97

4.13. Οι αναστολείς AM12100 (ABHD6 αναστολέας) και AM11920 (διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας), μειώνουν την επαγόμενη από το AMPA ενεργοποίηση της μακρογλοίας στον αμφιβληστροειδή.....	98
5. Συζήτηση.....	101
6. Συμπεράσματα.....	118
7. Βιβλιογραφία.....	120
Παράρτημα Α: Βιογραφικό Σημείωμα.....	161
Παράρτημα Β: Δημοσιεύσεις.....	166

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί τον επίλογο ενός τετραετούς ταξιδιού γεμάτου ανάμεικτα συναισθήματα. Το 2016 όταν εντάχθηκα στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Νευροεπιστημών» της Ιατρικής Σχολής, δεν περίμενα ποτέ ότι θα φτάσει κάποτε η στιγμή που θα ολοκληρώνα διδακτορική διατριβή και μάλιστα στο πεδίο της φαρμακολογίας. Ωστόσο, τίποτα δε θα ήταν εφικτό χωρίς την πολύτιμη συμβολή αρκετών ανθρώπων, στους οποίους οφείλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου και Ομότιμη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κα Κυριακή Θερμού, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό της. Η συνεργασία μου με την κα Θερμού ξεκίνησε πίσω το 2017 όταν, ως μεταπτυχιακός φοιτητής, έκανα το πρώτο rotation στο εργαστήριό της. Αρκετά αγχωμένος και φοβισμένος τότε, καθ' ότι προερχόμουν από ένα θεωρητικό υπόβαθρο, η κα Θερμού έδειξε τιάνια κατανόηση, πίστεψε σε μένα και με βοήθησε ώστε και εγώ ο ίδιος να πιστέψω στις δυνατότητές μου, γεγονός που αργότερα οδήγησε στην επιτυχή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου στο εργαστήριό. Η κα Θερμού αποτελεί υπόδειγμα ενός άριστου μέντορα. Καθ' όλη την διάρκεια του διδακτορικού, ήταν πάντα παρούσα, οποιαδήποτε στιγμή και να την χρειαζόμουν. Ακόμη και σε δύσκολες προσωπικές της στιγμές, πρωταρχικό της μέλημα ήταν οι υποψήφιοι διδάκτορες και διδακτόρισσές της και η εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου. Η κα Θερμού με βοήθησε να κατανοήσω πως λειτουργεί ο συναρπαστικός κόσμος της επιστήμης και να υιοθετήσω τον επιστημονικό τρόπο σκέψης. Παρατηρώντας το πάθος της και την ακατάπαυστη όρεξή της για την δουλειά της, κατανόησα για πρώτη φορά τι σημαίνει να αγαπάει κανείς αυτό που κάνει. Η αισιόδοξη οπτικής της για τη ζωή γενικότερα, συνέβαλαν στο να αναθεωρήσω άρδην τον τρόπο σκέψης μου, καθ' ότι πριν συνήθιζα να υπερτονίζω τα αρνητικά στοιχεία σε οποιαδήποτε κατάσταση, παραβλέποντας τα θετικά. Επιπροσθέτως, σε περιόδους όπου βρισκόμουν σε δίλημμα σχετικά με την μελλοντική επαγγελματική μου ενασχόληση, μέσα από τις πολλές συζητήσεις μας κατάφερα τελικά να συνειδητοποιήσω τι είναι αυτό που με ευχαριστεί να κάνω. Οι πολύτιμες συμβουλές της και η συνεχή της καθοδήγηση, όχι μόνο σε θέματα του εργαστηρίου, με βοήθησαν να γίνω καλύτερος επιστήμονας, αλλά και να εξελιχθώ ως άνθρωπος. Ευχαριστώ λοιπόν κα Θερμού, διότι πέρα από μία άριστη επιστήμονα, δίπλα σας είχα την ευκαιρία να γνωρίσω και ένα άριστο άνθρωπο και ελπίζω κάποια στιγμή να καταφέρω να σας μοιάσω, έστω και στο ελάχιστο.

Θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής κ. Τσιλιμπάρη, Καθηγητή Οφθαλμολογίας και κ. Καστελλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχοφυσιολογίας για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές σε όλη την διάρκεια του διδακτορικού. Ακόμη ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής κ. Παναγή, Καθηγητή Βιοψυχολογίας, κ. Χαραλαμπίδου, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, κα Βασιλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και κα Σιδηροπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νευροφυσιολογίας, για τον χρόνο που θα αφιερώσουν στην ανάγνωση και αξιολόγηση της παρούσας διατριβής. Ένα μεγάλο, ξεχωριστό ευχαριστώ αξίζει στον κο Καστελλάκη και τον κο Παναγή, καθώς κατά τα προπτυχιακά μου χρόνια αποτέλεσαν τους πρώτους «δασκάλους» που μου μετέδωσαν την αγάπη τους για τον συναρπαστικό κόσμο της νευροεπιστήμης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφερθώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Σοφία Παπαδογκωνάκη, καθώς 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. Ύστερα ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Νίκη Μαστροδήμου, η οποία ήταν πάντα εκεί για οτιδήποτε χρειαζόμουν, λύνοντάς μου τυχόν απορίες και προβληματισμούς σχετικά με τα πειράματα και τα ζώα. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Σύλβια Διονυσοπούλου, η βοήθεια της οποίας σε καθημερινή βάση ήταν καθοριστική για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τις τρεις προαναφερθείσες κυρίες, για την συμβολή τους στην κατανόηση μαθηματικών υπολογισμών, μέσω των ταχύρυθμων, ιδιαίτερων μαθημάτων που μου παρείχαν στην άλγεβρα και την χημεία. Το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και αλληλοβοήθειας που υπήρχε ανάμεσά μας ήταν καθοριστικός παράγοντας, που έκανε την εκπόνηση της διατριβής μου στο συγκεκριμένο εργαστήριο μία μοναδική εμπειρία. Τέλος πέρα από τρεις εξαιρετες συναδέλφους, απέκτησα τρεις νέες φίλες, τις οποίες και ευχαριστώ για τις όμορφες και διασκεδαστικές στιγμές που περάσαμε και εκτός εργαστηρίου.

Η πορεία προς την ολοκλήρωση του διδακτορικού παρά το γεγονός ότι αποτελεί μία μοναδική εμπειρία, είναι επίσης ένα δύσκολο ταξίδι με ποικίλες συναισθηματικές διακυμάνσεις. Γι' αυτό τον σκοπό χρειάζεσαι τους φίλους, ανθρώπους που θα σου σταθούν σε τυχόν δυσκολίες και θα κάνουν αυτό το ταξίδι να μοιάζει εύκολο. Έτσι λοιπόν θέλω να ευχαριστήσω τους Χρυσάνθη Παχάκη, Γιάννη Τσεκούρα και Βίκυ Κατσιδώνη για την ηθική υποστήριξη που παρείχαν κατά την διάρκεια όλων αυτών των χρόνων, καθώς για την συμβολή τους στο να γίνει η παραμονή μου στο Ηράκλειο μία πιο ευχάριστη και συναρπαστική εμπειρία.

Τέλος, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον πατέρα μου Γιάννη, τον άνθρωπο που πάντα με στήριζε και τον μόνο που με προέτρεπε πάντα να κάνω ότι με ευχαριστεί στην ζωή μου, οτιδήποτε και να ήταν αυτό. Παρά το γεγονός ότι «έφυγε» νωρίς από κοντά μου, η ευχάριστη ανάμνηση των στιγμών που ζήσαμε μαζί αποτελεί για εμένα πηγή δύναμης, ώστε να συνεχίσω να πετυχαίνω στην ζωή μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, οφείλω στον παππού μου, Μιχάλη, την γιαγιά μου, Παναγιώτα, την αδερφή μου, Μιχαέλα και την μητέρα μου, Μαρία οι οποίοι πάντα πίστευαν στις δυνατότητές μου και αποτέλεσαν σημαντικό στήριγμα στις δύσκολες καταστάσεις. Χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια τους, δεν θα ήμουν τώρα στην ευχάριστη θέση να γράφω αυτές τις γραμμές.

Συντομογραφίες

2-AG: 2-Arachidonoyl-glycerol, 2-Αραχιδονοϋλ-γλυκερόλη

ABHD6: alpha/beta-Hydrolase domain containing 6

ABHD12: alpha/beta-Hydrolase domain containing 12

AEA: N-arachidonoyl-ethanolamine, N-αραχιδονοϋλ-εθανολαμίνη (ανανταμίδιο)

AGEs: Advanced Glycation End products

AMPA: α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

BRB: Blood Retina Barrier, Αιματο-Αμφιβληστροειδικός Φραγμός

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

bNOS: brain nitric oxide synthase, συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου

cAMP: cyclic adenosine Monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

CB1: Cannabinoid receptor type 1

CB2: Cannabinoid receptor type 2

CD-31: Cluster of Differentiation 31

CNS: Central Nervous System

DAG: Diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη

DAGL: Diacylglycerol Lipase, λιπάση της διακυλογλυκερόλης

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DR: Diabetic Retinopathy

DSE: Depolarization-induced Suppression of Excitation, επαγόμενη από εκπόλωση καταστολή της διέγερσης

DSI: Depolarization-induced Suppression of Inhibition, επαγόμενη από εκπόλωση καταστολή της αναστολής

EB: Evans Blue

ECS: Endocannabinoid System, ενδοκανναβινοειδικό σύστημα (η σύστημα των ενδογενών κνναβινοειδών)

ELAM-1: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1

FAAH: Fatty Acid Amide Hydrolase, αμιδο-υδρολάση των λιπαρών οξέων

GABA: Gamma-AminoButyric Acid, γ-αμινοβουτυρικό οξύ

GCL: Ganglion Cell Layer, γαγγλιακή στιβάδα

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GLAST: Glutamate–Aspartate Transporter

GPCR: G Protein Coupled Receptor

H&E: Hematoxylin and Eosin

Iba1: Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1

iBRB: inner Blood Retina Barrier, εσωτερικός Αιματο- Αμφιβληστροειδικός Φραγμός

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

ILM: Inner Limiting Membrane, Εσωτερική Αφοριστική Μembrάνη

INL: Inner Nuclear Layer, εσωτερική πυρηνική στιβάδα

i.p: intraperitoneal, ενδοπεριτοναϊκά

LTD: Long Term Depression, μακροπρόθεσμη καταστολή

LTP: Long Term Potentiation, μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση

LPS: Lipopolysaccharides, λιποπολυσακχαρίτες

MAGL: Monoacylglycerol Lipase, Λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

methAEA: μεθανανταμίδιο

NAM: Negative Allosteric Modulator, αρνητικός αλλωστερικός ρυθμιστής

NAPE-PLD: N-Acylphosphatidylethanolamine phospholipase D, N-αραχιδονοϋλ-φωσφατιδυλοεθανολαμίνη

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NFL: Nerve Fiber Layer

NGF: Nerve Growth Factor, αυξητικός παράγοντας των νεύρων

NGS: Normal Goat Serum

NT: Nitrotyrosine, νιτροτυροσίνη

oBRB: outer Blood Retina Barrier, εξωτερικός Αιματο- Αμφιβληστροειδικός Φραγμός

OCT: Optical Coherence Tomography, οπτική τομογραφία συνοχής

OLM: Outer Limiting Membrane, Εξωτερική Αφοριστική Μεμβράνη

ONL: Outer Nuclear Layer, εξωτερική πυρηνική στιβάδα

OPL: Outer Plexiform Layer, εξωτερική δικτυωτή στιβάδα

PAM: Positive Allosteric Modulator, θετικός αλλωστερικός ρυθμιστής

PARPγ: Poly (ADP-ribose) polymerases

PBS: Phosphate Buffer Saline

PEDF: Pigment Epithelium-Derived Factor

PFA: Paraformaldehyde

PHARC: Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa, and Cataract, Πολυνευροπάθεια, απώλεια ακοής, Αταξία, Μελαγχρωστική Αμφιβληστροειδοπάθεια και Καταρράκτης

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

PLC: Phospholipase C, Φωσφολιπάση C

RAGEs: Receptor for Advanced Glycation End products

ROS: Reactive Oxygen Species, Αντιδραστικές Ρίζες Οξυγόνου

RPE: Retinal Pigment Epithelium, μελάγχρον επιθήλιο

SEM: Standard Error of Mean, τυπικό σφάλμα του μέσου όρου

STZ: Streptozotocin

TBS: Tris-Buffer Saline

TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, αυξητικός παράγοντας των αγγείων

VIP: Vasoactive Intestinal Peptide, αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο

wfi: water for injection

ΑΑΦ: Αιματο-αμφιβληστροειδικός
Φραγμός

ΔΑ: Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

ΔΑΕΣ: Διαβητική Αμφιβληστροειδο-
πάθεια Εξελιγμένου Σταδίου

ΔΑΠΣ: Διαβητική Αμφιβληστροειδο-
πάθεια Πρώιμου Σταδίου

ΔΚ: Διαβητική Καρδιοπάθεια

ΔΝ: Διαβητική Νεφροπάθεια

ΔΝΕΥ: Διαβητική Νευροπάθεια

ΕΚΣ: Σύστημα ενδογενών κανναβι-
νοειδών

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΜΠΔΑ: Μη Πολλαπλασιαστική
Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

NAM: Νευροαγγειακή Μονάδα

ΟΩΚ: Οίδημα Ωχράς Κηλίδας

ΠΔΑ: Πολλαπλασιαστική Διαβητική
Αμφιβληστροειδοπάθεια

ΠΝΣ: Περιφερικό Νευρικό Σύστημα

Περίληψη

Εισαγωγή: Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ), αποτελεί μία από τις κυριότερες επιπλοκές του διαβήτη και χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες βλάβες στα αγγεία του αμφιβληστροειδούς, την παρουσία φλεγμονής και την προοδευτική εκφύλιση διαφόρων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, που οδηγεί σε μείωση της οπτικής οξύτητας και τύφλωση. Το βασικό γεγονός που οδηγεί στην εκδήλωση της ΔΑς, είναι η διαταραχή στην ομοιόσταση της «νευροαγγειακής μονάδας» (neurovascular unit) στον αμφιβληστροειδή, ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την στενή λειτουργική σύνδεση και αλληλεξάρτηση μεταξύ των νευρώνων, των γλοιακών κυττάρων και των αγγείων του αμφιβληστροειδούς. Η χρόνια υπεργλυκαιμία στον διαβήτη, μειώνει την έκφραση προστατευτικών νευροτροφικών παραγόντων και αυξάνει την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως οι κυτοκίνες και ο αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF). Αυτή η ανισορροπία συμβάλει στην προοδευτική καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων, που απαρτίζουν τα τοιχώματα των αγγείων και συνθέτουν τον εσωτερικό αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό (ΑΑΦ), με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και την είσοδο στον αμφιβληστροειδή κυτταροτοξικών παραγόντων, που οδηγούν στην εκδήλωση φλεγμονής, ισχαιμίας και οξειδωτικού στρες. Παράλληλα παρατηρείται προοδευτική εκφύλιση των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, μέσω αποπτωτικών μηχανισμών. Εξαιτίας των εκτεταμένων αλλαγών που συμβαίνουν κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς, παρατηρείται και το φαινόμενο της αντιδραστικής γλοιώσης, κατά το οποίο τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα του Muller ενεργοποιούνται και ενδέχεται να διαμεσολαβήσουν προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενισχύοντας καθ' αυτόν τον τρόπο την νευρο-φλεγμονή. Η παλαιότερη άποψη που θεωρούσε την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια απλά μία μικρο-αγγειακή διαταραχή, έχει αναθεωρηθεί, καθ' ότι πλέον οι μελέτες, λαμβάνουν σοβαρά υπόψη τους και την συνεισφορά της νευροεκφύλισης στην παθοφυσιολογία της νόσου. Ολοένα και περισσότερες ενδείξεις, υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες, η νευροεκφύλιση και η φλεγμονή εκδηλώνονται κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις προηγούνται των διαταραχών στα αγγεία. Οι υπάρχουσες θεραπείες για την ΔΑ (λείζερ, ενδοφθάλμια έγχυση παραγόντων που αναστέλλουν τον VEGF και τα κορτικοστεροειδή), εφαρμόζονται σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου, όπου η όραση του ασθενούς έχει πλέον υποστεί μεγάλη βλάβη, ενώ στοχεύουν κυρίως την αγγειακή συνιστώσα της νόσου και δευτερευόντως την φλεγμονή. Κατά τα αρχικά στάδια της νόσου, οι όποιες παρεμβάσεις περιορίζονται απλά στον έλεγχο των παραγόντων κινδύνου για την νόσο, όπως τα επίπεδα γλυκόζης και η υπέρταση. Η ανάγκη για την εύρεση φαρμακευτικών παραγόντων με νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις και η εφαρμογή τους κατά τα αρχικά στάδια γένεσης της ΔΑς είναι επιτακτική, καθ' ότι θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της εξέλιξης της νόσου.

Το ΕΚΣ διαθέτει το ρόλο του νευρορρυθμιστή στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς είναι σε θέση να ελέγχει τασεοελεγχόμενους διαύλους ιόντων, την προσυναπτική απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η επιβίωση ή η διαφοροποίηση του κυττάρου. Στον αμφιβληστροειδή, οι CB1 υποδοχείς εκφράζονται σε διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων, όπως οι φωτοϋποδοχείς, τα βραχύινα και τα γαγγλιακά κύτταρα. Οι CB2 υποδοχείς εκφράζονται κατά κύριο λόγο σε κύτταρα της γλοίας, όπως τα κύτταρα του Muller και η μικρογλοία, όπου διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ρύθμιση των

φλεγμονωδών αποκρίσεων. Οι προστατευτικές επιδράσεις που επιδεικνύει το ΕΚΣ σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές στο νευρικό σύστημα, έχουν μελετηθεί εκτενώς. Στον αμφιβληστροειδή μελέτες αναφέρουν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών, μέσω της ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων, σε αρκετά μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Ωστόσο, ευρήματα από μελέτες σε μοντέλα επιπλοκών του διαβήτη, υποδεικνύουν, ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα ενισχύει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή, ενώ η χρήση ανταγωνιστών για τον CB1 υποδοχέα, μειώνει τον κυτταρικό θάνατο, το οξειδωτικό στρες, την φλεγμονή και παρουσιάζει αγγειοπροστατευτικές δράσεις, σε παθήσεις που σχετίζονται με το διαβήτη. Τα ευρήματα για τις προστατευτικές δράσεις που προκύπτουν από την αναστολή της ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων, αναφέρονται και σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές στο οπτικό σύστημα. Εν αντιθέσει με τον CB1 υποδοχέα, η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα των κανναβινοειδών, διαμεσολαβεί κατά κύριο λόγο προστατευτικές επιδράσεις, αφού είναι σε θέση να μειώνει την φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και τον κυτταρικό θάνατο. Οι προστατευτικές δράσεις των CB2 αγωνιστών έχουν επαληθευθεί σε μοντέλα επιπλοκών του διαβήτη, όπως η διαβητική νεφροπάθεια, καθώς και σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή. Στον αντίποδα, πλήθος μελετών αναφέρουν τις νευροπροστατευτικές επιδράσεις αγωνιστών για τους κανναβινοειδικούς υποδοχείς (CB1/CB2) σε αρκετές αμφιβληστροειδοπάθειες και ειδικότερα σε μοντέλα διεγερσιτοζικότητας στον αμφιβληστροειδή. Πέραν των άμεσων αγωνιστών, η χορήγηση αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο χειρισμού της σηματοδότησης τους μέσω των κανναβινοειδικών υποδοχέων. Παρά την πληθώρα ευρημάτων στον εγκέφαλο, στον αμφιβληστροειδή, τα ευρήματα για τις δράσεις των αναστολέων των ενζύμων μεταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών είναι ελάχιστα.

Στόχος: Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος της συγκεκριμένης διατριβής είναι η μελέτη των προστατευτικών ιδιοτήτων των κανναβινοειδών σε δύο μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών και για τον σκοπό αυτό χωρίστηκε σε δύο μέρη: Α. Στο πρώτο μέρος χρησιμοποιήθηκε ένα *in vivo* μοντέλο δύο εβδομάδων, επαγόμενης από στρεπτοζοτοκίνη ΔΑς σε επίμυες, το οποίο προσομοιάζει στα πρώιμα στάδια της νόσου και εξετάστηκαν οι νευροπροστατευτικές, οι αντιφλεγμονώδεις και οι αγγειοπροστατευτικές δράσεις, της χορήγησης τοπικά μέσω σταγόνων: α) SR141716, ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα, β) AM1710, αγωνιστή του CB2 υποδοχέα και γ) συνδυασμού των παραπάνω, SR141716+AM1710. Β. Στο δεύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκε ένα *in vivo* μοντέλο διεγερσιτοζικότητας επαγόμενης από AMPA στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Εξετάστηκαν οι νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης των ακόλουθων αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG: α) AM12100 [αναστολέας της alpha/beta-Hydrolase domain containing 6 (ABHD6)] and β) AM11920 [διπλός αναστολέας της alpha/beta-Hydrolase domain containing 6/monoacylglycerol lipase (ABHD6/MAGL)].

Μεθοδολογία: Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί Sprague-Dawley επίμυες (250-300 g). Για τα πειράματα της ΔΑ, η επαγωγή του διαβήτη πραγματοποιήθηκε με μία ενδοπεριτοναϊκή (i.p) χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (STZ) (70mg/kg). Τα πειραματόζωα των οποίων η γλυκόζη ήταν >250 mg/dL θεωρούνταν διαβητικά. Τα προς μελέτη κανναβινοειδή χορηγήθηκαν καθημερινά για 14 ημέρες με την μορφή οφθαλμικών σταγόνων σε δοσολογία 10 mg/ml, ξεκινώντας δύο ημέρες μετά την χορήγηση του STZ. Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που εφαρμόστηκε προέκυψαν

οι ακόλουθες ομάδες: 1. Ομάδα ελέγχου+ έκδοχο, 2. Διαβητικά+ έκδοχο, 3. Διαβητικά+ AM1710, 4. Διαβητικά+ SR141716, 5. Διαβητικά+ AM1710+SR141716. Μία ημέρα μετά την τελευταία χορήγηση των κανναβινοειδών τα πειραματόζωα θανατώθηκαν, οι οφθαλμοί τους αφαιρέθηκαν και απομονώθηκε ο αμφιβληστροειδής. Για την εκτίμηση της νευροπροστασίας πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες έναντι του NFL (neurofilament, δείκτης αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων), της cleaved caspase 3 (δείκτης αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου), της bNOS (brain nitric oxide synthase, δείκτης βραχύνων κυττάρων) και του NT (nitrotyrosine, δείκτης οξειδωτικής βλάβης). Επιπλέον εκτιμήθηκε το πάχος του αμφιβληστροειδούς με την χρήση της ιστολογικής χρώσης Ηωσίνης/ Αιματοξυλίνης. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των κανναβινοειδών αξιολογήθηκαν με την χρήση αντισωμάτων έναντι της GFAP (Glial fibrillary acidic protein, δείκτης αστροκυττάρων και κυττάρων του Muller), της Iba1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1, δείκτης μικρογλοίας) και την πραγματοποίηση ELISA για την προφλεγμονώδη κυτοκίνη TNF α (Tumor necrosis factor alpha). Για την αξιολόγηση των αγγειοπροστατευτικών δράσεων των κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκε μελέτη συνεντοπισμού του NT με τον αγγειακό δείκτη CD-31 (cluster of differentiation 31, δείκτης ενδοθηλιακών κυττάρων), καθώς και ELISA για τον VEGF (Vascular endothelial growth factor A). Επιπροσθέτως για την εκτίμηση της αγγειακής διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Evans Blue. Για τα πειράματα της AMPA διεγερσιτοξικότητας τα ζώα έλαβαν ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις του AMPA (42 nmol/οφθαλμός) είτε μόνου του, είτε σε συνδυασμό με το AM12100 (10^{-5} - 10^{-3} M) ή το AM11920 (10^{-6} - 10^{-4} M). Μία ημέρα μετά την πραγματοποίηση των εγχύσεων τα πειραματόζωα θανατώθηκαν και αφαιρέθηκαν οι ιστοί τους. Η νευροπροστασία αξιολογήθηκε με την χρήση αντισώματος έναντι της bNOS, ενώ για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις, χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες των γλοιακών κυττάρων GFAP και Iba1.

Αποτελέσματα: Στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας η θεραπεία με τα κανναβινοειδικά ανάλογα επέδειξε ποικίλες νευροπροστατευτικές αποκρίσεις. Αναλυτικότερα η επαγόμενη από τον διαβήτη μείωση του πάχους και της ανοσοδραστικότητας του NFL, αποκαταστάθηκε από την χορήγηση του AM1710, του SR141716 και του συνδυασμού τους. Επιπλέον τόσο το AM1710, όσο και το SR141716 αποκατέστησαν το μειωμένο πάχος του αμφιβληστροειδούς και ειδικότερα της INL. Ωστόσο, μόνο ο CB2 αγωνιστής, AM1710, ανέστειλε αποτελεσματικά τον αυξημένο αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στην εσωτερική πυρηνική στιβάδα (INL). Το AM1710 και η συνδυαστική θεραπεία (AM1710+SR141716) προστάτευσαν επαρκώς τα βραχύινα κύτταρα που εκφράζουν b NOS, στην INL, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια σημαντική επίδραση από την μεμονωμένη χορήγηση του SR141716. Ακόμη, οι τρεις κανναβινοειδικές θεραπείες ανέστειλαν τα αυξημένα επίπεδα της νιτροτυροσίνης (NT) στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς, με την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα να επιτυγχάνεται από την συνδυαστική θεραπεία AM1710+SR141716. Σε επίπεδο φλεγμονής μόνο ο CB2 αγωνιστής, AM1710, ήταν αποτελεσματικός. Ειδικότερα, το AM1710 μείωσε την αντιδραστική μακρογλοία, τον αριθμό των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNF α στον αμφιβληστροειδή. Τα κανναβινοειδικά ανάλογα διαμεσολάβησαν επίσης και αγγειοπροστατευτικές δράσεις. Τόσο το AM1710 όσο και το SR141716, μείωσαν τα επίπεδα του VEGF και την αυξημένη αγγειακή διαρροή στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών ζώων. Στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας Το χειρισμός των ενδογενών επιπέδων της 2-AG εξυπηρετεί νευροπροστατευτικές δράσεις. Πιο συγκεκριμένα ο αναστολέας της ABHD6 (AM12100) και ο διπλός αναστολέας της ABHD6/MAGL (AM11920), προστάτευσαν τα bNOS κύτταρα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο,

με την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα να παρατηρείται κατά την χορήγηση του διπλού αναστολέα, AM11920. Τέλος κατά την χορήγηση των αναστολέων προέκυψαν και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Ο διπλός αναστολέας της ABHD6/MAGL (AM11920), μείωσε τον αυξημένο αριθμό των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, ενώ και οι δύο αναστολείς (AM12100 & AM11920) παρουσίασαν δόσοεξαρτώμενη επίδραση στην μείωση της ενεργοποίησης της μακρογλοίας, χωρίς να διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Συμπεράσματα: Συμπερασματικά, γίνεται κατανοητό ότι η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς, θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή στρατηγική για την αναχαίτιση της ανεξέλεγκτης εξέλιξης της παθοφυσιολογίας της νόσου. Επιπλέον, πέρα από τους άμεσους αγωνιστές, ο χειρισμός των ενδογενών κανναβινοειδών με την χορήγηση αναστολέων του μεταβολισμού των ενδογενών κανναβινοειδών, αποτελεί μια καλή επιλογή για τον περιορισμό της επαγόμενης από την διεγερσιτοξικότητα, νευροεκφύλισης και φλεγμονής, σε συνθήκες ισχαιμίας. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω στοιχεία, γίνεται κατανοητό ότι τα κανναβινοειδή αποτελούν τον ιδανικό υποψήφιο, στη βάση του οποίου θα μπορούσαν να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις για την αντιμετώπιση των αμφιβληστροειδοπαθειών. Προτού όμως γίνει αυτό, περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου το ΕΚΣ ασκεί τις προστατευτικές του δράσεις και παράλληλα να ξεπεραστούν τυχόν περιορισμοί που προκύπτουν από την θεραπευτική χορήγηση των κανναβινοειδών.

Abstract

Introduction: Diabetic Retinopathy (DR) is one of the major complications of diabetes mellitus. It is characterized by microvascular disruption, the presence of inflammation and progressive degeneration of neuronal cells, which collectively lead to attenuation of optical acuity and eventually blindness. The major event that leads to the manifestation of DR is the disruption of the “neurovascular unit” (NVU) homeostasis, a term used to describe the functional interaction and interdependency among neural, glial cells and blood vessels in the retina. Chronic hyperglycemia reduces expression of protective neurotrophic factors and favors an increase in the expression of pro-inflammatory mediators, such as cytokines and vascular endothelial growth factor (VEGF). This imbalance contributes to the progressive loss of endothelial cells, the tight junctions of which form the inner blood retina barrier (iBRB). As a result, there is an increase in vascular permeability which allows cytotoxic factors enter the retina and induce the development of inflammation and oxidative stress. This is also accompanied by the progressive degeneration of neural cells, through the activation of apoptotic pathways. Furthermore, due to the drastic changes in retina physiology at the early stages of DR, glial cells become activated and participate and mediate pro-inflammatory responses. The earlier tenet that DR is only a microvascular complication has been revised, with studies examining the critical contribution of neurodegeneration in the pathophysiology of DR. A growing body of evidence suggests that oxidative stress, neurodegeneration and inflammation are present at the early stage of the disease, even before the development of the microvascular complications. Current treatments for DR (laser, intravitreal injection of anti-VEGF agents and corticosteroids) are applied during the advanced stage of the disease, where patient’s vision is already compromised. These treatments mainly focus on the treatment of vasculopathy and inflammation. Therapeutic intervention at the early stage of DR is only limited in the tight control of risk factors for the development of the disease, such as blood glucose and blood pressure. Finding and implementing new treatments with neuroprotective and anti-inflammatory properties at the early stage of DR is imperative, since this could be a good strategy for intercepting the development of the disease towards the vision threatening advanced stage.

The endocannabinoid system (ECS) has a neuromodulatory role in the central nervous system (CNS), as it controls the activation of voltage gated ion channels, the presynaptic release of glutamate and the activation of pro-survival cell signaling pathways. In retina CB1 receptors are expressed in various neuronal cell populations, like photoreceptors, amacrine and ganglion cells. CB2 receptors are mainly located in glial cells, where they participate in the regulation of inflammatory responses. Numerous studies have reported the neuroprotective properties of the ECS in the CNS. In the retina the neuroprotective properties, mediated by CB1 receptor activation, are also well described in various models of retinopathies. However extensive data indicate that in diabetic complications, other than DR, CB1 receptor activation promotes oxidative stress and inflammation, while the use of CB1R antagonists reduces cell death, inflammation and vascular damage. The protective properties, mediated by inhibition of CB1 receptor activity, have also been confirmed in neurodegenerative conditions in the ocular system. In contrast to CB1 receptor activation, CB2 receptor activation displays neuroprotective effects, since it reduces inflammation, oxidative stress and cell death. The protective properties of CB2 agonists have also been evaluated in diabetic complications, such as diabetic nephropathy and also in neurodegenerative diseases in brain and retina. Numerous studies have confirmed the neuroprotective properties of cannabinoid receptors

agonists in various retinopathies, including excitotoxicity models. Apart from direct cannabinoid agonists, inhibition of the metabolic enzymes of endocannabinoids seems to be an effective strategy for indirectly controlling signaling through cannabinoid receptors. Although numerous reports in the brain have confirmed the neuroprotective action of the inhibitors of the endocannabinoids metabolism, the data in the retina are limited.

Aim of the study: The goal of the present thesis was the study of the neuroprotective properties of the ECS in two *in vivo* animal model of retinopathy: A. In the first part, an *in vivo* two week, streptozotocin (STZ) induced model of DR, which resembles the phenotype observed at the early stages of the disease, was employed for the study of the neuroprotective, anti-inflammatory and vasculoprotective actions of the eyedrop administration of a) SR141716 (CB1 antagonist), b) AM1710 (CB2 agonist) and c) their combination (SR141716+AM1710). B. In the second part we employed an *in vivo* model of AMPA induced retinal excitotoxicity, in order to study the neuroprotective and anti-inflammatory actions of two novel inhibitors of 2-AG hydrolytic enzymes: a) AM12100 [alpha/beta-Hydrolase domain containing 6 (ABHD6) inhibitor] and b) AM11920 [dual alpha/beta-Hydrolase domain containing 6/ monoacylglycerol lipase (ABHD6/MAGL) inhibitor].

Methods: Male and female rats weighting 250-300 g were employed for all the experiments. For the DR study, diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p) injection of STZ (70 mg/kg). Animals with blood glucose levels >250 mg/dL were considered diabetic. Cannabinoids were administered daily as eyedrops for 14 days at a dosage of 10 mg/ml, starting two days post STZ injection. The experimental design was as following: 1. Control+vehicle, 2. Diabetic+vehicle, 3. Diabetic+AM1710, 4. Diabetic+SR141716 and 5. Diabetic+AM1710+SR141716. Twenty-four hours after the last eyedrop, animals were euthanized and their retinas were collected. Immunohistochemical studies with antibodies against NFL (neurofilament, ganglion cell axon marker), cleaved caspase 3 (apoptotic cell death marker) and bNOS (brain nitric oxide synthase, amacrine cell marker) were conducted for the estimation of neuroprotection. An antibody against NT (nitrotyrosine, nitrative/oxidative stress marker) was used for the study of the oxidative damage. Furthermore a histological stain with Eosin/Hematoxylin was employed in order to assess retina thickness. For the study of the anti-inflammatory actions of the cannabinoid treatment we used antibodies against GFAP (Glial fibrillary acidic protein, microglia marker) and Iba1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1, microglia marker) and ELISA for TNF α (Tumor necrosis factor α). Finally, for the estimation of the vasculoprotective actions of cannabinoids we performed a colocalization study between CD-31 (cluster of differentiation 31, endothelial cell marker), ELISA for VEGF (Vascular endothelial growth factor A) and Evans Blue (EB) assay (assessment of vascular leakage). For the AMPA excitotoxicity experiments animals received intravitreal injections of AMPA (42 nmol/ eye), either alone or in combination with AM12100 (10^{-5} - 10^{-3} M) or AM11920 (10^{-6} - 10^{-4} M). Twenty-four hours after the injections, retinas were collected after euthanization of the animals. Cannabinoid-mediated neuroprotection was assessed by an immunohistochemical study with an antibody against bNOS, while for the anti-inflammatory actions antibodies against GFAP and Iba1 were employed.

Results: Topical administration of cannabinoids via eyedrops displayed various protective actions in the DR model. The diabetes induced reduction in NFL-immunoreactivity (IR) thickness and intensity was blocked by AM1710, SR141716 and their combination. AM1710 and SR141716 also blocked the diabetes induced reduction in total retinal thickness and

especially in the inner nuclear layer (INL). Only AM1710 inhibited apoptotic cell death in the INL. AM1710 and the dual treatment (SR141716+AM1710) protected bNOS⁺ cells in the INL. All of the three cannabinoid treatments effectively attenuated oxidative damage in the diabetic rat retina. AM1710 was the only cannabinoid treatment that displayed significant anti-inflammatory actions, since it reduced microglia and microglia activation, as well as the levels of TNF- α . Single administration of AM1710 and SR141716 attenuated vascular leakage and the levels of VEGF in the retina. In the AMPA excitotoxicity model, the manipulation of endogenous 2-AG levels by the use of inhibitors of its hydrolytic enzymes displayed protective properties, too. AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor) provided protection against AMPA in a dose dependent manner, with the greatest efficacy observed after administration of the dual inhibitor. Both inhibitors also mediated significant anti-inflammatory actions, by attenuating macroglia activation, but only the dual inhibitor, AM11920, reduced the number of reactive microglial cells in the retina.

Conclusions: The employment of CB2 agonists and CB1 antagonists at the early stages of DR, may be a beneficial therapeutic strategy for attenuating the early pathophysiological symptoms and intercepting disease progression towards the vision threatening, advanced stages. The manipulation of endogenous cannabinoid levels with the use of inhibitors of 2-AG metabolism seems to be an alternative method for attenuating neurodegeneration and inflammation induced by excitotoxicity, which in fact possesses several advantages over the use of direct cannabinoid agonists. Collectively, data from the present study suggest that ECS represents a promising target for the treatment of retinopathies. However, more studies are needed in order to study the exact mechanism via which cannabinoids exert their protective properties and eliminate any limitations resulting from the use of cannabinoids as therapeutic agents.

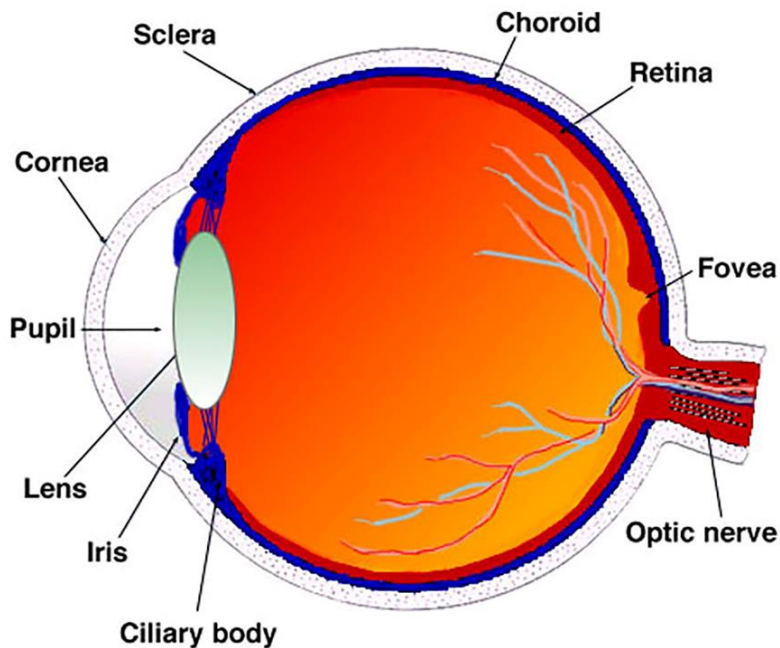
1. Εισαγωγή

1.1. Ανατομία του οφθαλμού

Η όραση ή οπτική αντίληψη αποτελεί μία από τις πέντε αισθήσεις, ίσως την σπουδαιότερη όλων, καθ' ότι βοηθά το άτομο να σχηματίζει μια τρισδιάστατη αναπαράσταση του εξωτερικού του περιβάλλοντος. Γενικότερα η απώλεια της όρασης στην πλειοψηφία των έμβιων όντων, μειώνει δραματικά τις πιθανότητες επιβίωσής τους. Στον σύγχρονο άνθρωπο, η απώλεια της όρασης μπορεί να μην σχετίζεται άμεσα με ζητήματα επιβίωσης, ωστόσο έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα της ζωής του. Το αισθητήριο όργανο της όρασης είναι ο οφθαλμός, ο οποίος εκμεταλλεύόμενος το φως, συμβάλει στην δημιουργία αναπαραστάσεων του περιβάλλοντα χώρου, οι οποίες αφού υποστούν περαιτέρω επεξεργασία από τον εγκέφαλο, δημιουργούν την οπτική αντίληψη. Ο ανθρώπινος οφθαλμός έχει εξελιχθεί για να αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο εύρος μήκους κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που κυμαίνεται από περίπου 380 nm (για το ιώδες) έως 760 nm (για το κόκκινο). Το εύρος αυτό καλείται το ορατό μέρος του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Η δυνατότητα του οφθαλμού να συλλέγει και να επεξεργάζεται την φωτεινή ακτινοβολία, διαφαίνεται σε μεγάλο βαθμό και από την ανατομική του οργάνωση, η οποία είναι διαρθρωμένη με τέτοιο τρόπο, που του επιτρέπει να εκμεταλλεύεται στο μέγιστο βαθμό το φως που αντανακλάται από τα αντικείμενα. Εξετάζοντας μακροσκοπικά τον οφθαλμό, κατανοεί κανείς ότι πρόκειται για ένα σφαιρικό σχηματισμό, ο οποίος αποτελείται από τρεις στιβάδες ιστού και εντοπίζεται προστατευμένος μέσα στο κογχικό οστό. Εξωτερικά, κατά κύριο λόγο, αποτελείται από μια σκληρή άσπρη μεμβράνη, τον σκληρό χιτώνα, ο οποίος στο πρόσθιο μέρος μετατρέπεται σε μια διάφανη μεμβράνη, τον κερατοειδή χιτώνα, ο οποίος επιτρέπει στην φωτεινή ακτινοβολία να εισέλθει στον οφθαλμό (Purves και συν., 2001). Η μεσαία στιβάδα αποτελείται από την ίριδα, το ακτινωτό σώμα και το χοριοειδές. Η ίριδα, η οποία δίνει το χαρακτηριστικό του χρώματος στον εκάστοτε οφθαλμό, είναι ένα σύστημα μυών και είναι σε θέση να ελέγχει την ποσότητα του φωτός που περνά προς το οπίσθιο μέρος του οφθαλμού, ελέγχοντας το μέγεθος της κόρης, της οπής δηλαδή δια μέσου της οποίας διέρχεται το φως (Purves και συν., 2001). Το ακτινωτό σώμα χωρίζεται σε ένα μυϊκό τμήμα που είναι σε θέση να ελέγχει την ανακλαστική δυνατότητα του φακού και σε ένα αγγειακό τμήμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του υδατοειδούς υγρού στον επονομαζόμενο οπίσθιο θάλαμο (χώρος μεταξύ φακού και ίριδας) και στην συνέχεια, δια μέσου της κόρης ρέει προς τον πρόσθιο θάλαμο (χώρος μεταξύ φακού και κερατοειδούς) του οφθαλμού (Purves και συν., 2001). Το χοριοειδές αποτελεί το τρίτο επιμέρους τμήμα της μεσαίας στιβάδας και ελέγχει την αιματική κυκλοφορία προς τον αμφιβληστροειδή.

Μεταξύ του φακού και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα διαμεσολαβεί ένας μεγάλος χώρος, ο οποίος είναι πλήρης από ένα παχύρρευστο, ζελατινώδες υγρό, το υαλώδες υγρό, που συμβάλει στην διατήρηση του σχήματος του οφθαλμού. Στο υαλώδες υγρό εμπεριέχονται επίσης κύτταρα με φαγοκυτταρικές ιδιότητες που απομακρύνουν τυχόν υπολείμματα, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο την απρόσκοπτη μετάδοση της φωτεινής ακτινοβολίας προς τον αμφιβληστροειδή (Purves και συν., 2001). Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελεί την τρίτη και ίσως σημαντικότερη στιβάδα του οφθαλμού, όντας υπεύθυνος για την συλλογή και επεξεργασία της φωτεινής ακτινοβολίας (Purves και συν., 2001).



Εικόνα 1.1. Οβελιαία τομή του ανθρώπινου οφθαλμού που απεικονίζει την ανατομική του οργάνωση. Ο οφθαλμός χωρίζεται σε τρεις στιβάδες: την εξωτερική (σκληρός και κερατοειδής/ sclera and cornea), την ενδιάμεση (ίριδα, ακτινωτό σώμα και χοριοειδής/ iris, ciliary body and choroid) και την οπίσθια (αμφιβληστροειδής/retina). Λήφθηκε από: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/gross-anatomy-of-the-ey/>.

1.2. Ανατομία του αμφιβληστροειδούς

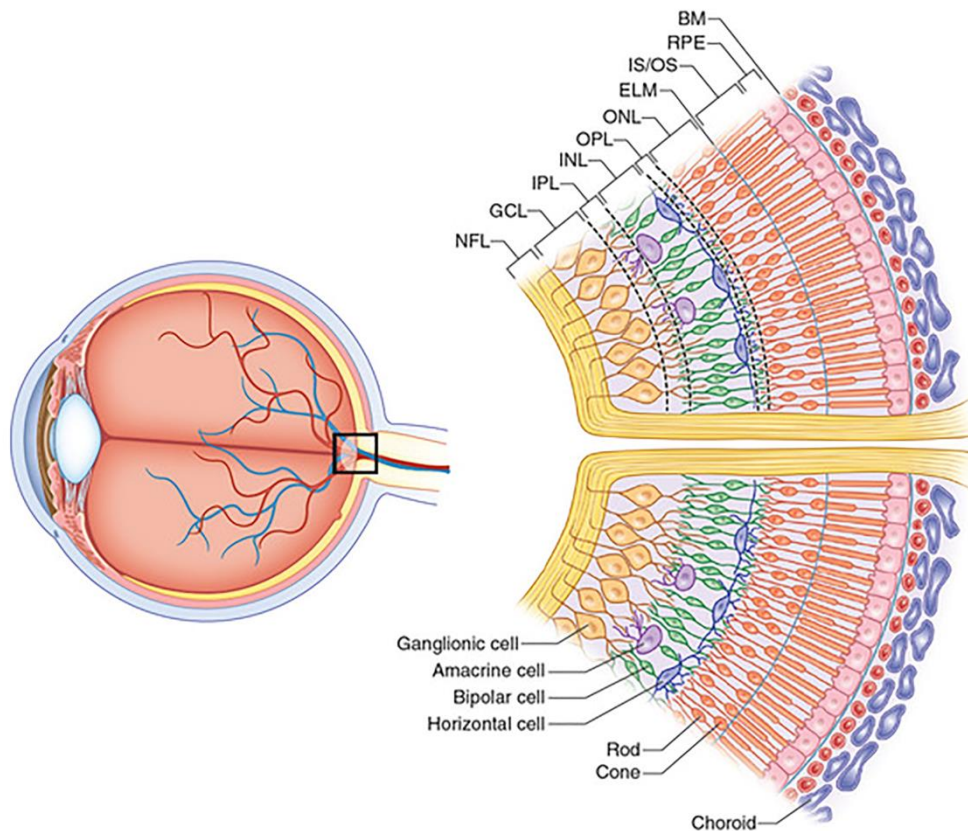
Ευρισκόμενος στο οπίσθιο τμήμα της εσωτερικής επιφάνειας του οφθαλμού, ο αμφιβληστροειδής, αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της φωτεινής ακτινοβολίας και το σημείο μετατροπής της σε ηλεκτρικό ερέθισμα, το οποίο μέσω του οπτικού νεύρου θα μεταδοθεί προς τις οπτικές περιοχές του εγκεφάλου, προκειμένου να προκύψει η οπτική αντίληψη. Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί κατ' αυτόν τον τρόπο τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και μάλιστα το πιο καλά μελετημένο, λόγω του ότι είναι εύκολα προσβάσιμος με την χρήση μη επεμβατικών τεχνικών, όπως η οφθαλμοσκόπηση. Ο σπουδαίος ρόλος του αμφιβληστροειδούς και της όρασης γενικότερα, διαφαίνεται από το γεγονός ότι περίπου το 80% όλων των αισθητικών ερεθισμάτων που φθάνουν στον εγκέφαλο, είναι οπτικά ερεθίσματα, προερχόμενα από τον αμφιβληστροειδή (Massey, 2006).

Ανατομικά ο αμφιβληστροειδής μπορεί να αναγνωριστεί ως ένας δίσκος, συνολικής διαμέτρου 30-40 mm και πάχους 0.5 mm (Masland, 2012). Στο κεντρικό σημείο του αμφιβληστροειδούς, εντοπίζεται το οπτικό νεύρο, που σχηματίζεται από τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων που εξέρχονται από τον αμφιβληστροειδή, ενώ παράλληλα αποτελεί και το κύριο σημείο εισόδου αγγείων που ελέγχουν την αιματική κυκλοφορία στον αμφιβληστροειδή (Masland, 2012). Αριστερά του οπτικού νεύρου, στο κεντρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς, εντοπίζεται ένας ελλειπτικός σχηματισμός, κίτρινου χρωματισμού που παρουσιάζει απουσία αγγείωσης και ονομάζεται ωχρά κηλίδα (Kingham, 1976). Το κεντρικό τμήμα της ωχράς κηλίδας, με διάμετρο 200 μm, ονομάζεται κεντρικό βοθρίο και αποτελεί το σημείο του αμφιβληστροειδούς με την υψηλότερη οπτική οξύτητα, εξαιτίας της πληθώρας κωνίων που διαθέτει (Masland, 2012).

Το κυκλικό πεδίο διαμέτρου περίπου 6 mm που εντοπίζεται γύρω από το κεντρικό βοθρίο, αποτελεί τον κεντρικό αμφιβληστροειδή, ενώ όλο το υπόλοιπο κομμάτι γύρω από αυτήν την περιοχή, με διάμετρο 21 mm, αποτελεί τον περιφερειακό αμφιβληστροειδή (Masland, 2012). Ο κεντρικός και ο περιφερειακός αμφιβληστροειδής παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, τόσο ως προς την ανατομική, όσο και ως προς τη λειτουργική οργάνωσή τους. Ο κεντρικός αμφιβληστροειδής, που όπως προαναφέρθηκε χαρακτηρίζεται από την μέγιστη οπτική οξύτητα, είναι πιο παχύς από τον περιφερειακό, εξαιτίας της υψηλής πυκνότητας σε αυτή την περιοχή των φωτοϋποδοχέων και των σχετιζόμενων κυττάρων τους (δίπολα και γαγγλιακά κύτταρα) (Masland, 2012). Είναι χαρακτηριστικό επίσης, ότι στον κεντρικό αμφιβληστροειδή, η πλειοψηφία των φωτοϋποδοχέων είναι κωνία, ενώ αντιθέτως στον περιφερειακό αμφιβληστροειδή, την πρωτοκαθεδρία κατέχουν τα ραβδία (Masland, 2012).

1.2.1. Κυτταροαρχιτεκτονική και τύποι κυττάρων του αμφιβληστροειδούς

Ο αμφιβληστροειδής, όντας τμήμα του ΚΝΣ, περιλαμβάνει πέντε διαφορετικούς τύπους νευρικών κυττάρων, τους φωτοϋποδοχείς, τα οριζόντια, τα δίπολα, τα βραχύνια και τα γαγγλιακά κύτταρα, όπου το καθένα συμβάλλει με τον δικό του τρόπο στην επεξεργασία της οπτικής ακτινοβολίας που εισέρχεται στον οφθαλμό. Τα κυτταρικά σώματα των διαφορετικών νευρωνικών τύπων του αμφιβληστροειδούς συνθέτουν τρεις διαφορετικές πυρηνικές στιβάδες, ενώ οι μεταξύ τους συνάψεις οργανώνονται σε δύο δικτυωτές στιβάδες. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η έξω πυρηνική στιβάδα (ONL, Outer Nuclear Layer) περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων, η έσω πυρηνική στιβάδα (INL, Inner Nuclear Layer) τα κυτταρικά σώματα των οριζόντιων, δίπολων και βραχύνων κυττάρων, ενώ τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων απαρτίζουν την γαγγλιακή στιβάδα (GCL, Ganglion Cell Layer) (Masland, 2012). Η έξω δικτυωτή στιβάδα (OPL, Outer Plexiform Layer), περιλαμβάνει τις συνάψεις των φωτοϋποδοχέων με τα δίπολα και τα οριζόντια κύτταρα, ενώ η έσω δικτυωτή στιβάδα (IPL, Inner Plexiform Layer) απαρτίζεται από τις συνδέσεις των δίπολων και των βραχύνων κυττάρων με τα γαγγλιακά κύτταρα. Εκτός από τις δύο βασικές δικτυωτές στιβάδες στον αμφιβληστροειδή συναντάμε και μία τρίτη δικτυωτή στιβάδα, την στιβάδα των νευρικών ινών (NFL, Nerve Fiber Layer), που σχηματίζεται από τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων (Masland, 2012). Ακριβώς έξω από το νευρωνικό-αισθητικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς, μεταξύ του χοριοειδούς από τη μία και των φωτοϋποδοχέων από την άλλη, εντοπίζεται η στιβάδα του μελάγχρου επιθηλίου (RPE, Retinal Pigment Epithelium), αποτελούμενη από επιθηλιακά κύτταρα εξαγωνικού σχήματος που περιέχουν την χρωστική μελανίνη, στην οποία εξάλλου, οφείλεται και η ονοματολογία της συγκεκριμένης στιβάδας (Strauss, 2005).



Εικόνα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της ανατομικής διοργάνωσης του αμφιβληστροειδούς σε στιβάδες. Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν την στιβάδα των νευρικών ιών (Nerve Fiber Layer/ NFL). Τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν την στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Ganglion Cell Layer/ GCL). Τα σώματα των διπόλων, των βραχύνων και των οριζόντιων κυττάρων σχηματίζουν την εσωτερική πυρηνική στιβάδα (Inner Nuclear Layer), ενώ τα κυτταρικά σώματα των φωτοϋποδοχέων συνθέτουν την εξωτερική πυρηνική στιβάδα (Outer Nuclear Layer/ ONL). Οι συνάψεις των διπόλων και των βραχύνων με τα γαγγλιακά κύτταρα πραγματοποιούνται στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (Inner Plexiform Layer/ IPL). Τα κυτταρικά σώματα των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου σχηματίζουν την στιβάδα του μελάγχρου επιθηλίου (Retinal Pigment Epithelium/ RPE). Η φωτεινή ακτινοβολία διαπερνά όλες τις στιβάδες από την NFL και έπειτα και προσπίπτει στο πίσω μέρος του αμφιβληστροειδούς, στα εξωτερικά και εσωτερικά τμήματα (Inner and Outer Segments/ IS and OS) των φωτοϋποδοχέων, ενώ η περίσσεια του φωτός απορροφάται από τα κύτταρα του RPE συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην βελτίωση της οπτικής πληροφορίας. Λήφθηκε από: <https://www.retinareference.com/anatomy/>

α. Κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου

Τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου είναι επιθηλιακά κύτταρα εξαγωνικού σχήματος, που σχηματίζουν όπως προαναφέραμε την στιβάδα του RPE. Ο σκούρος χρωματισμός τους οφείλεται στην παρουσία υψηλών επιπέδων μελανίνης, γεγονός που τα καθιστά ικανά να απορροφούν την περίσσεια της φωτεινής ακτινοβολίας που προσπίπτει στον αμφιβληστροειδή, βελτιώνοντας έτσι σημαντικά την ποιότητα της οπτικής πληροφορίας (Bok, 1993). Εξαιτίας της άμεσης γεινιάσής τους με τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων από την μία πλευρά και με το χοριοειδές από την άλλη, με το οποίο διαχωρίζονται με την διαμεσολάβηση της μεμβράνης του Bruch, συμμετέχουν ενεργά σε διεργασίες ανταλλαγής στοιχείων μεταξύ του αμφιβληστροειδούς και της αιματικής κυκλοφορίας (Strauss, 2005). Έτσι, τα κύτταρα του RPE είναι υπεύθυνα για την μεταφορά

νερού, ιόντων και μεταβολικών υποπροϊόντων από τον αμφιβληστροειδή προς την αιματική κυκλοφορία, ενώ συμμετέχουν και στην μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, όπως η γλυκόζη από τα αιμοφόρα αγγεία προς τον αμφιβληστροειδή (Steinberg, 1985). Μέσω των στενών συνδέσεων των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου, δημιουργείται και ο εξωτερικός αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός (ΑΑΦ), που εμποδίζει την είσοδο τοξικών παραγόντων στον αμφιβληστροειδή από την αιματική κυκλοφορία (Strauss, 2005). Τα κύτταρα του RPE ελέγχουν επίσης τον οπτικό κύκλο της ρετινάλης, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της διεγερσιμότητας των φωτοϋποδοχέων. Η all-trans-ρετινάλη που έχει προκύψει από την αλληλεπίδραση με το φως στα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων, προσλαμβάνεται από το RPE και επαναϊσομερίζεται στην 11-cis-ρετινάλη, προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθεί και πάλι από τους φωτοϋποδοχείς για την επεξεργασία της φωτεινής ακτινοβολίας (Steinberg και συν., 1983). Η εύρυθμη λειτουργία των φωτοϋποδοχέων εξασφαλίζεται επίσης και μέσω της φαγοκυττάρωσης από τα κύτταρα του RPE των εξωτερικών τμημάτων τους, που υφίστανται οξείδωση εξαιτίας της συνεχούς αλληλεπίδρασής τους με την φωτεινή ακτινοβολία (Finnemann, 2003).

Η σωστή λειτουργία όλων των προαναφερθεισών διεργασιών που διαμεσολαβούνται από τα κύτταρα του RPE, είναι αναγκαίος παράγοντας για την διατήρηση της ομοιοστατικής ισορροπίας του αμφιβληστροειδούς. Διαταραχές της ομαλής λειτουργίας των κυττάρων του RPE, οδηγούν στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Motozawa και συν., 2022), οι οποίες συσχετίζονται με έκπτωση της οπτικής οξύτητας και εν τέλει, τύφλωση.

β. Φωτοϋποδοχείς

Οι φωτοϋποδοχείς είναι νευρικά κύτταρα που συνιστούν το αισθητικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς. Η σύζευξή τους με φωτοευαίσθητες χρωστικές, τους καθιστά ικανούς να απορροφούν τα φωτόνια από την φωτεινή ακτινοβολία και να τα μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο έχοντας ως τερματικό σταθμό τις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την όραση, συμβάλει στην δημιουργία της οπτικής αντίληψης (Molday και Moritz, 2015). Με βάση την μορφολογία τους, την ποσότητα και το είδος της φωτοευαίσθητης χρωστικής που φέρουν, αλλά και την κατανομή τους στον αμφιβληστροειδή, μπορούμε να διακρίνουμε δύο είδη φωτοϋποδοχέων, τα ραβδία και τα κωνία.

Μορφολογικά τα κωνία και τα ραβδία αποτελούνται από τέσσερα επιμέρους τμήματα, το εσωτερικό τμήμα που περιέχει τα οργάνια του κυττάρου, το πυρηνικό τμήμα με τον πυρήνα του κυττάρου, το εξωτερικό τμήμα που διαθέτει τις εξειδικευμένες πρωτεΐνες οψίνες που επεξεργάζονται το φως και τις συναπτικές απολήξεις μέσω των οποίων δημιουργούν συνδέσεις με άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς για την μετάδοση της πληροφορίας (Kolb, 2005). Η ονοματολογία κωνίο και ραβδίο οφείλεται στο σχήμα του εξωτερικού τμήματος του εκάστοτε κυττάρου, με τα ραβδία να διαθέτουν σχηματισμό ράβδου και τα κωνία κωνικό σχήμα. Το εξωτερικό τμήμα των φωτοϋποδοχέων σχηματίζεται μέσω μιας σειράς αναδιπλώσεων της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου και διαθέτει μεγάλο αριθμό της φωτοευαίσθητης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης οψίνης, η οποία αλληλεπιδρώντας με το μόριο της ρετινάλης, σχηματίζει την ροδοψίνη (Kolb, 2005). Αναλυτικότερα με την παρουσία ενός φωτεινού ερεθίσματος, η 11-cis-ρετινάλη ισομερίζεται στην all-trans ρετινάλη, γεγονός που προκαλεί μία αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωση της οψίνης, που θα μεταφραστεί έπειτα μέσω μιας αλληλουχίας γεγονότων στο εσωτερικό του

κυττάρου σε αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης και επομένως σε ηλεκτρικό σήμα (Kolb, 2005). Η διαδικασία της μετατροπής του φωτεινού ερεθίσματος σε ηλεκτρικό σήμα, καλείται φωτομετατροπή και αποτελεί την βάση για την δημιουργία της οπτικής αντίληψης.

Τα ραβδία εκφράζοντας μεγαλύτερη ποσότητα της φωτοευαίσθητης οπτικής χρωστικής, ροδοψίνης, είναι πιο ευαίσθητα από τα κωνία στην επεξεργασία των φωτονίων και γι' αυτό εξάλλου είναι υπεύθυνα για την αχρωματική σκοτοπική όραση, δηλαδή την όραση σε συνθήκες ημίφωτος (Bertalmio, 2020). Τα κωνία από την άλλη, σχετίζονται με την όραση υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού, την φωτοπική όραση, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των χρωμάτων. Ανάλογα με την ευαισθησία τους στα διαφορετικά μήκη κύματος του ορατού φάσματος της ακτινοβολίας, διακρίνονται στα S ή μπλε κωνία (μικρού μήκους κύματος με κορυφή στα 420 nm), στα M ή πράσινα κωνία (μεσαίου μήκους κύματος με κορυφή στα 534 nm) και στα L ή κόκκινα κωνία (μεγάλου μήκους κύματος με κορυφή στα 564 nm) (Solomon και Rennie, 2007). Η ευαισθησία των τριών τύπων κωνίων στα διαφορετικά μήκη κύματος της ακτινοβολίας και η διαφορετική συνδεσμολογία τους με τα υπόλοιπα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, συνθέτει την τριχρωματική οπτική αντίληψη στον άνθρωπο (Kolb, 2005). Η εξαιρετική διακριτική ικανότητα των κωνίων στην αναγνώριση λεπτομερειών, διαφαίνεται από το γεγονός, ότι λιγότερα κωνία συνάπτονται με ένα δίπολο κύτταρο, ενώ αντιθέτως περισσότερα ραβδία συνδέονται με ένα δίπολο κύτταρο (Langado & Baylor, 1992).

Μία ακόμη σημαντική διαφορά μεταξύ των κωνίων και των ραβδίων, αφορά την χωροταξική τους κατανομή στον αμφιβληστροειδή. Στο κεντρικό βοθρίο, το σημείο με την μέγιστη οπτική οξύτητα, εντοπίζεται μεγάλος αριθμός κωνίων και καθόλου ραβδία, ενώ όσο προχωρούμε από το κέντρο προς την περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς, ο αριθμός των κωνίων μειώνεται και αυξάνονται τα ραβδία (Langado & Baylor, 1992). Μάλιστα στο κεντρικό, βοθρίο κάθε κωνίο συνάπτεται και με διαφορετικό δίπολο κύτταρο γεγονός που συμβάλει τα μέγιστα στην διακριτική ικανότητα των κωνίων (Langado & Baylor, 1992).

γ. Ενδονευρώνες

Οι ενδονευρώνες ή ενδιάμεσοι νευρώνες στον αμφιβληστροειδή, συνιστούν μια ετερογενή ομάδα νευρικών κυττάρων, που αποτελούν διάμεσους σταθμούς στην μετάδοση της οπτικής πληροφορίας από τους φωτοϋποδοχείς προς τα γαγγλιακά κύτταρα, σχηματίζοντας ποικίλες νευρικές οδούς. Τρεις βασικές κατηγορίες ενδονευρώνων έχουν αναγνωρισθεί στον αμφιβληστροειδή, τα δίπολα, τα οριζόντια και τα βραχύνια κύτταρα.

Τα δίπολα κύτταρα «γεφυρώνουν» τους φωτοϋποδοχείς, που αποτελούν την πύλη εισόδου της οπτικής πληροφορίας με τα γαγγλιακά κύτταρα, που συνιστούν την πύλη εξόδου προς τον εγκέφαλο. Οι δένδριτες των δίπολων κυττάρων συνδέονται με τους άξονες των φωτοϋποδοχέων στην OPL, ενώ με τους άξονές τους τα δίπολα κύτταρα σχηματίζουν συνδέσεις με τους δένδριτες των βραχύνων και των γαγγλιακών κυττάρων στην IPL (Wassle και συν., 2009). Η ομαδοποίηση των δίπολων κυττάρων γίνεται ως προς την μορφολογία τους, την λειτουργία τους, αλλά και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και βάσει αυτών έχουν αναγνωρισθεί δεκαπέντε υπότυποι δίπολων κυττάρων (West και Cerko, 2022). Μία βασική κατηγοριοποίηση, γίνεται βάσει των συνδέσεων που αναπτύσσουν τα δίπολα κύτταρα με τους φωτοϋποδοχείς και έτσι προκύπτουν τα ραδιοφόρα (συνδέονται με ραβδία) και τα κωνιοφόρα δίπολα κύτταρα (συνδέονται με κωνία) (West και Cerko, 2022). Λαμβάνοντας υπόψη την διαφορετική απόκρισή τους στα φωτεινά ερεθίσματα, τα δίπολα κύτταρα

διακρίνονται σε τύπου ON, που εκπολώνονται από φωτεινά ερεθίσματα που προσπίπτουν στο κέντρο του υποδεκτικού τους πεδίου και τύπου OFF, τα οποία υπερπολώνονται από αντίστοιχα ερεθίσματα (Dowling και Werblin, 1969). Η διάκριση ανάμεσα σε ON και OFF των δίπολων κυττάρων, φαίνεται να συνεχίζεται και στο επίπεδο των συνάψεων τους στην IPL, αφού τα OFF προβάλλουν τους άξονές τους στο πάνω μισό τμήμα της IPL, ενώ τα ON έχουν τους άξονές τους στο κάτω μισό της IPL (Euler και συν., 1996).

Τα οριζόντια κύτταρα, αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία ενδονευρώνων στον αμφιβληστροειδή και συμμετέχουν στον σχηματισμό πλάγιων οδών μετάδοσης της οπτικής πληροφορίας στην OPL. Λαμβάνουν συναπτικές προβολές από τους φωτοϋποδοχείς με τη διαμεσολάβηση ιοντοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού και υπερπολώνονται ως απόκριση στα ερεθίσματα που δέχονται, κατά παρόμοιο τρόπο όπως και τα OFF δίπολα κύτταρα (Diamond, 2017). Ειδικότερα τα οριζόντια κύτταρα επιτελούν δύο βασικές λειτουργίες, την ανάδρομη αναστολή στις συναπτικές απολήξεις των φωτοϋποδοχέων και την ορθόδρομη αναστολή στους δενδρίτες των δίπολων κυττάρων (Dowling και Boycott, 1966), συμβάλλοντας στην δημιουργία υποδεκτικών πεδίων με ανταγωνιστική οργάνωση κέντρου και περιφέρειας, γεγονός που αυξάνει την χωρική διακριτική ικανότητα του οπτικού συστήματος (Diamond, 2017). Οι δύο προαναφερθείσες διαδικασίες επιτελούνται μέσω του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA, γ-aminobutyric acid), του βασικού ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή, που απελευθερώνεται από τα οριζόντια κύτταρα και δρα σε υποδοχείς GABA, ευρισκόμενων είτε στις απολήξεις των φωτοϋποδοχέων, είτε στους δενδρίτες των δίπολων κυττάρων (Kaneko και Tachibana 1986).

Τα βραχύινα κύτταρα αποτελούν την τρίτη κατηγορία ενδονευρώνων στον αμφιβληστροειδή και είναι υπεύθυνα για την διαμόρφωση πλάγιων οδών της οπτικής πληροφορίας στον εσωτερικό αμφιβληστροειδή και συγκεκριμένα στην στιβάδα IPL. Όπως και τα οριζόντια κύτταρα στον εξωτερικό αμφιβληστροειδή, τα βραχύινα κύτταρα σχετίζονται με την ανάδρομη αναστολή των δίπολων κυττάρων, μέσω συνάψεων που πραγματοποιούν στις απολήξεις τους και την ορθόδρομη αναστολή ή διέγερση των δενδριτών των γαγγλιακών κυττάρων (Grimes και συν., 2015). Τα βραχύινα κύτταρα εκφράζουν GABA ή γλυκίνη, τους δύο βασικότερους ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές, που δρουν ως «γρήγοροι» νευροδιαβιβαστές, ενώ είναι σε θέση να απελευθερώνουν και «αργούς» νευροδιαβιβαστές, όπου ως επί το πλείστον είναι κάποιο πεπτίδιο, όπως είναι για παράδειγμα το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP, Vasoactive Intestinal Peptide) (O'Malley και Masland 1989; Casini και Brecha, 1992), γεγονός που τα καθιστά βασικά κύτταρα στην επεξεργασία της οπτικής πληροφορίας σε πολλαπλά επίπεδα. Αξίζει να αναφερθούμε στο σημείο αυτό, σε μία ειδική υποκατηγορία βραχύνων κυττάρων, τα starburst βραχύινα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν και απελευθερώνουν GABA, αλλά και τον διεγερτικό νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (Ding και συν., 2016). Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα βραχύινα κύτταρα δρουν ως ενδιάμεσοι σταθμοί ενίσχυσης της χωρικής και χρονικής συνιστώσας της οπτικής πληροφορίας και αναμετάδοσης της προς τα γαγγλιακά κύτταρα.

δ. Γαγγλιακά κύτταρα

Τα γαγγλιακά κύτταρα αποτελούν τον τελευταίο σταθμό της οπτικής πληροφορίας στον αμφιβληστροειδή, από τον οποίο θα προωθηθεί μέσω του οπτικού νεύρου, που σχηματίζεται από τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, προς τις οπτικές περιοχές του

εγκεφάλου. Τα γαγγλιακά κύτταρα λαμβάνουν διεγερτικές προβολές από τα δίπολα κύτταρα και ανασταλτικές προβολές από τα βραχύινα κύτταρα στην IPL (Diamond, 2017). Η αρχική κατηγοριοποίησή τους αφορούσε το διαχωρισμό των γαγγλιακών σε τύπου ON και OFF, βάσει των συνάψεών τους με τα αντίστοιχου τύπου δίπολα κύτταρα. Ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι τα γαγγλιακά κύτταρα είναι σε θέση να αποκρίνονται σε μια πληθώρα πολύπλοκων πληροφοριών της οπτικής πληροφορίας, όπως το μέγεθος, το χρώμα και η κατεύθυνση της κίνησης του οπτικού ερεθίσματος (Baden και συν., 2016). Όντας ο τερματικός σταθμός στην πορεία της οπτικής πληροφορίας στον αμφιβληστροειδή, τα υποδεκτικά τους πεδία είναι αρκετά μεγαλύτερα από των υπόλοιπων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, καθ' ότι σχηματίζονται από την σύνθεση πολλών υποδεκτικών πεδίων των φωτοϋποδοχέων και των δίπολων κυττάρων (Baden και συν., 2016). Η απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων είναι υπεύθυνη για τα προβλήματα όρασης που συναντώνται σε αρκετές αμφιβληστροειδοπάθειες (Kang και συν., 2021), όπως το γλαύκωμα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) κ.ά.

ε. Γλοιακά κύτταρα

Στον αμφιβληστροειδή απαντώνται τρεις τύποι γλοιακών κυττάρων, τα μικρογλοιακά, τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα του Müller. Τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα του Müller εντάσσονται στην κατηγορία της μακρογλοίας. Καθένα από τα προαναφερθέντα γλοιακά κύτταρα έχει τις δικές του λειτουργίες, οι οποίες συμβάλουν στην διατήρηση της ομοιοστατικής ισορροπίας του αμφιβληστροειδούς.

Τα κυτταρικά σώματα των κυττάρων του Müller βρίσκονται στην INL και είναι εξοπλισμένα με αποφυάδες που διατρέχουν όλο το πάχος του αμφιβληστροειδούς από την εξωτερική αφοριστική (OLM, Outer Limiting Membrane) μέχρι την εσωτερική αφοριστική μεμβράνη (ILM, Inner Limiting Membrane), η οποία σχηματίζεται από τις κυτταρικές απολήξεις των κυττάρων του Müller (Reichenbach και Bringmann, 2010). Τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να επηρεάζουν και να ρυθμίζουν την συναπτική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, επιτελώντας ποικίλες λειτουργίες όπως η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, η ανακύκλωσή τους, η διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων και του νερού, η παροχή τροφικών παραγόντων στους νευρώνες, κρίσιμων για την επιβίωσή τους, η διατήρηση του σχήματος και της δομικής ακεραιότητας του αμφιβληστροειδούς κ.ά. (Reichenbach και Bringmann, 2010). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του αντίκτυπου των κυττάρων του Muller στην νευρωνική λειτουργία είναι ο κύκλος του γλουταμινικού. Τα νευρικά κύτταρα δεν διαθέτουν κάποιον μηχανισμό επαναπρόσληψης και απομάκρυνσης του γλουταμινικού από την σύναψη. Για τον σκοπό αυτό φροντίζουν τα κύτταρα του Muller, όπου μέσω του γλοιακού μεταφορέα του γλουταμινικού και του ασπαρτικού οξέος (GLAST, Glutamate Aspartate Transporter) προσλαμβάνουν το γλουταμινικό και το μετατρέπουν σε γλουταμίνη, η οποία στην συνέχεια προσλαμβάνεται από τα νευρικά κύτταρα και χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο για την σύνθεση γλουταμινικού και GABA (Rauen και συν., 1998). Ανάλογη δράση επιτελείται και μετά την επαναπρόσληψη του GABA από τα κύτταρα του Muller, με την μόνη διαφορά ότι το GABA μετατρέπεται σε γλουταμινικό και στην συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία (Rauen και συν., 1998). Ο κύκλος του γλουταμινικού εκτός του ότι είναι υπεύθυνος για την αύξηση της διαθεσιμότητας του γλουταμινικού στα νευρικά κύτταρα, συμβάλλει επίσης και στην βελτίωση της ποιότητας της οπτικής πληροφορίας, καθ' ότι εμποδίζει την ανεξέλεγκτη εξάπλωση του γλουταμινικού προς τις γειτονικές συνάψεις (Bringman και συν., 2013). Τέλος, τα κύτταρα του Muller

συμμετέχουν και στην διαμόρφωση της άμυνας του οργανισμού, εξυπηρετώντας προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, οι οποίες αν και έχουν προστατευτικό χαρακτήρα στην αρχή, ενδέχεται να έχουν αντίστροφα αποτελέσματα μετά από παρατεταμένη παρουσία τους, ενισχύοντας την ήδη υπάρχουσα βλάβη (Reichenbach και Bringmann, 2015).

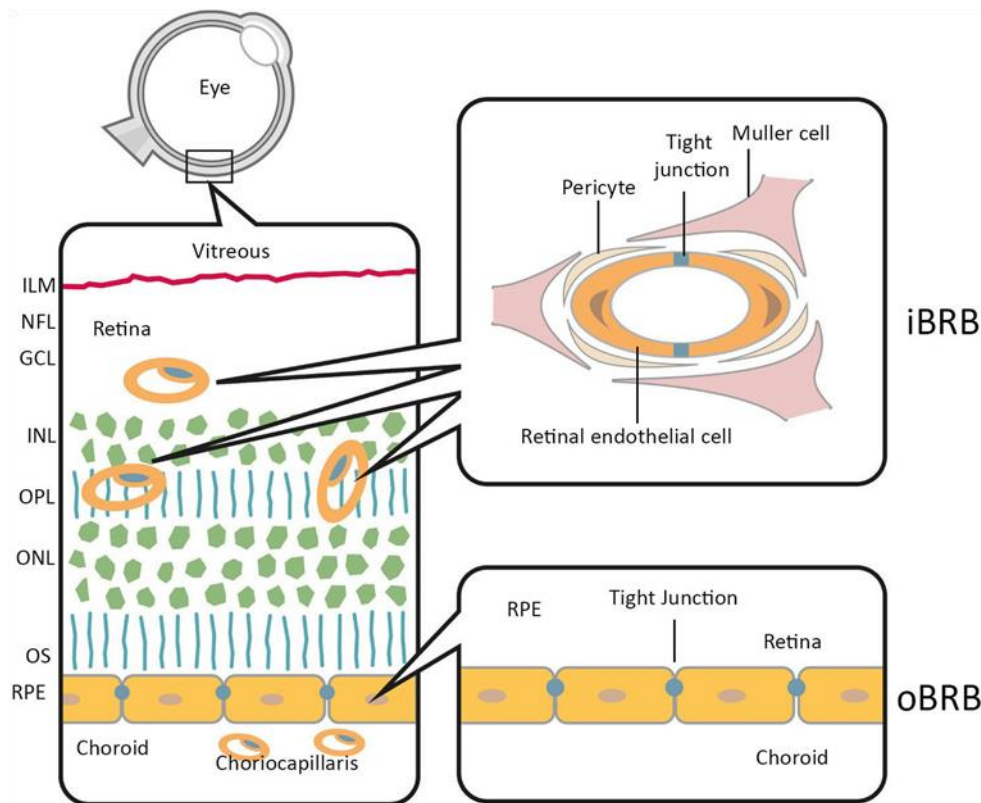
Τα αστροκύτταρα αποτελούν την δεύτερη κατηγορία μακρογλοίας, προέρχονται από τον εγκέφαλο και εντοπίζονται κυρίως στην στιβάδα των νευρικών ινών (NFL) και στην GCL (Reichenbach και Bringmann, 2020). Έχουν τις αποφυάδες τους προσδεσμένες με αιμοφόρα αγγεία, καθώς και με τα σώματα και τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων (Holländer και συν., 1991). Τα αστροκύτταρα επιτελούν ανάλογες δράσεις, με αυτές των κυττάρων του Muller, όπως η ιοντική ισορροπία, η διατήρηση της ακεραιότητας του ΑΑΦ (Αιματο-Αμφιβληστροειδικού Φραγμού), η ρύθμιση του εξωκυττάρου pH και γενικότερα η διατήρηση της ομοιόστασης και της απρόσκοπτης λειτουργίας των γαγγλιακών κυττάρων (Provis, 2001). Μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες των αστροκυττάρων στον αμφιβληστροειδή, είναι η ικανότητά τους να αντιμετωπίζουν εξωτερικές απειλές. Ως απόκριση σε κάποιο βλαπτικό ερέθισμα, όπως τοξικές ουσίες ή τραυματισμοί, τα αστροκύτταρα υφίστανται ενεργοποίηση, συνοδευόμενη από αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων παραγόντων, όπως η πρωτεΐνη GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Reichenbach και Bringmann, 2015). Βασικός σκοπός αυτής της ενεργοποίησης, η οποία καλείται αντιδραστική αστρογλοίωση, είναι η προστασία των γαγγλιακών κυττάρων από την απειλή μέσω της απομάκρυνσης της περίσσειας του γλουταμινικού, της παροχής νευροτροφικών παραγόντων και της αποκατάστασης της ακεραιότητας του ΑΑΦ (Reichenbach και Bringmann, 2015). Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση των κυττάρων του Muller, η μακροχρόνια ενεργοποίηση των αστροκυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην προοδευτική εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων, μέσω προφλεγμονωδών και οξειδωτικών αποκρίσεων (Calandrella και συν., 2007). Εξαιτίας της στενής σχέσης τους με τα αγγεία, η εκφυλιστική απώλεια των αστροκυττάρων είναι υπεύθυνη για τις βλάβες στα αγγεία, που οδηγούν στην διατάραξη του ΑΑΦ, σε διάφορες νευροεκφυλιστικές αμφιβληστροειδοπάθειες, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ, Ly και συν., 2011).

Ο τρίτος τύπος γλοίας που απαντάται στον αμφιβληστροειδή είναι η μικρογλοία. Στην ουσία, δεν εντάσσεται στην ευρύτερη κατηγορία της νευρικής γλοίας, καθ' ότι πρόκειται για κύτταρα μεσοδερμικής και όχι εξωδερμικής προέλευσης, όπως είναι τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα του Muller (Zahs και Esgura, 2006). Τα μικρογλοιακά εισέρχονται στον αμφιβληστροειδή μέσω του ακτινωτού σώματος, των αγγείων και του οπτικού νεύρου κατά την εμβρυική και την πρώιμη μεταγεννητική ηλικία (Provis και συν., 1996). Παρουσιάζουν ευρεία κατανομή σε όλες τις κυτταρικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, με την μεγαλύτερη πυκνότητα να εντοπίζεται στην GCL, στην IPL, στην OPL, καθώς και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία (Reichenbach και Bringmann, 2015). Βάσει πειραματικών παρατηρήσεων, η μικρογλοία φαίνεται να διαχωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες, την περι-αγγειακή μικρογλοία, η οποία ελέγχει στενά την ανταλλαγή προϊόντων μεταξύ του αμφιβληστροειδούς και του κυκλοφορικού συστήματος και την παρεγχυματική μικρογλοία, η οποία έχει το ρόλο του ελεγκτή της ορθής λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς, παρεμβαίνοντας σε καταστάσεις που διαταράσσουν την ομοιόσταση του (Provis και συν., 1996). Ο δεύτερος τύπος της παρεγχυματικής μικρογλοίας, αξίζει ιδιαίτερη μνεία, καθ' ότι πρόκειται για κύτταρα που διαμεσολαβούν ανοσολογικές αποκρίσεις κατ' αντιστοιχία με τα μακροφάγα και ενεργοποιούνται από απειλητικά ερεθίσματα, όπως ο τραυματισμός, διάφοροι

νευροτοξικοί παράγοντες και η παρουσία φλεγμονής (Pronis και συν., 1996). Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας συνοδεύεται και από μορφολογικές αλλαγές. Από κύτταρα αστεροειδούς μορφολογίας με πληθώρα λεπτών αποφυάδων με διακλαδώσεις που συναντάμε στην κατάσταση ηρεμίας, κατά την φάση της ενεργοποίησης, η αντιδραστική μικρογλοία αποκτά αμοιβαδοειδή μορφολογία με πλήρη η μερική απόσυρση των αποφυάδων της (Savage και συν., 2019). Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας μπορεί να γίνει προς δύο διαφορετικές πολικότητες, τον φαινότυπο M1 ή τον M2 (Tang και Le, 2016). Ο φαινότυπος M1 χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση κυτταροτοξικών, προφλεγμονωδών παραγόντων από τα μικρογλοιακά κύτταρα, οι οποίοι μπορεί να εντείνουν την υπάρχουσα φλεγμονή και να προκαλέσουν το θάνατο των νευρώνων. Αντιθέτως στον M2 φαινότυπο, η μικρογλοία παράγει και απελευθερώνει νευροτροφικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, που εξυπηρετούν νευροπροστατευτικές αποκρίσεις.

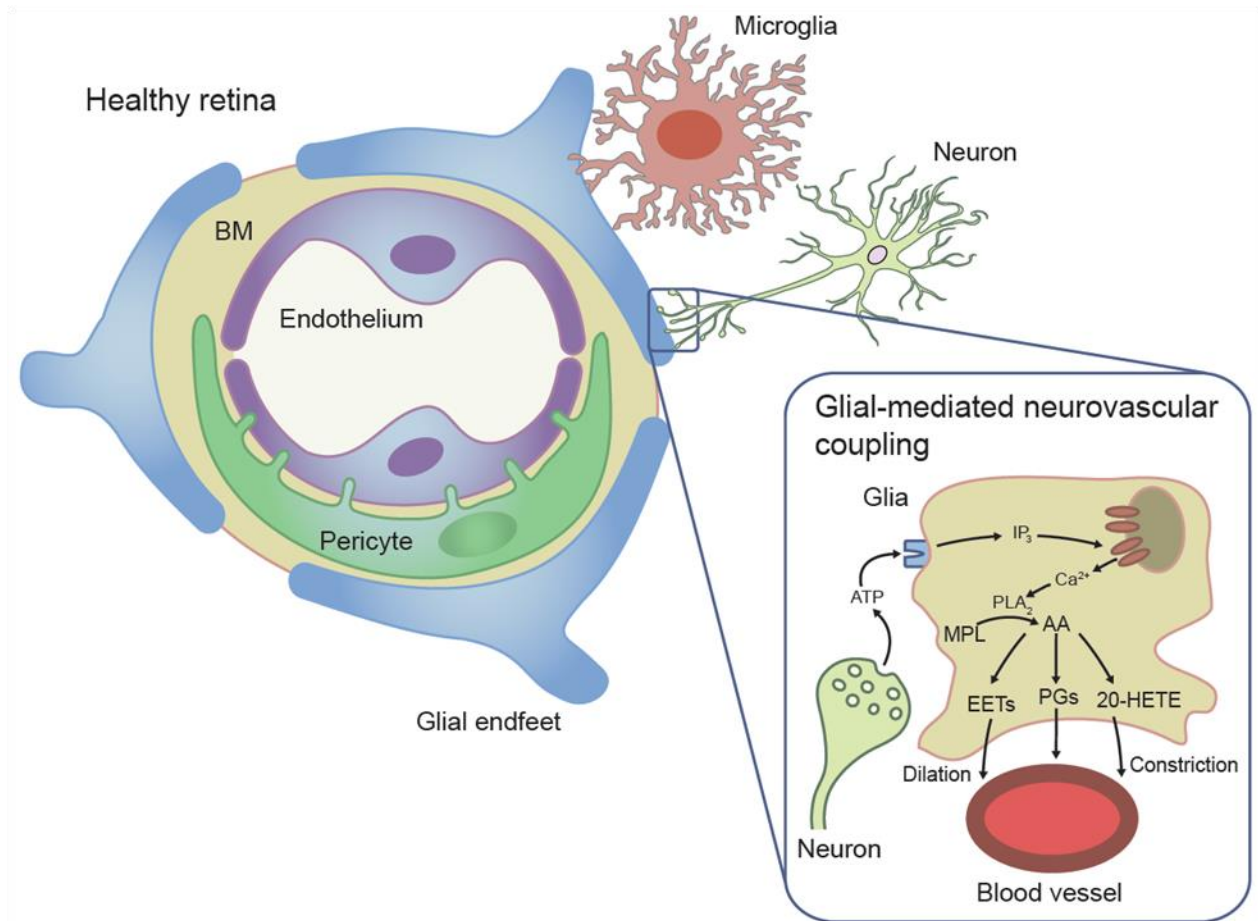
στ. Ενδοθηλιακά κύτταρα και η «νευροαγγειακή μονάδα»

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Τα κύτταρα αυτά ελέγχουν την συστολή και την διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, απελευθερώνοντας παράγοντες όπως το μονοξειδίο του αζώτου, το αραχιδονικό οξύ, η ενδοθελίνη-1 κ.ά. και κατ' αυτόν τον τρόπο ελέγχουν την αιματική ροή (Roumpagas και συν., 2008). Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες που επιτελούν, είναι ο σχηματισμός του εσωτερικού ΑΑΦ, μέσω των στενών συνδέσεων που δημιουργούν μεταξύ τους. Η αιμάτωση στον αμφιβληστροειδή παρέχεται από την κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς και ο εσωτερικός ΑΑΦ δημιουργείται στα αιμοφόρα αγγεία που εισέρχονται στις τρεις βασικές δικτυωτές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, την NFL, την IPL και την OPL (Hormel και συν., 2021). Μαζί με τον εξωτερικό ΑΑΦ, ο οποίος σχηματίζεται από τις στενές συνδέσεις των κυττάρων του Muller, ο εσωτερικός ΑΑΦ διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του αμφιβληστροειδούς, αφού εμποδίζει την είσοδο κυτταροτοξικών παραγόντων από την αιματική κυκλοφορία προς τον αμφιβληστροειδή (Mflugacz και συν., 2021) (βλ. Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Ανατομική διοργάνωση του εξωτερικού και του εσωτερικού ΑΑΦ. Ο εξωτερικός ΑΑΦ (oBRB) σχηματίζεται από τις στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων του RPE. Ο εσωτερικός ΑΑΦ (iBRB) σχηματίζεται από τις στενές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων που συνθέτουν τα εσωτερικά τοιχώματα των αγγείων. Ο αμφιβληστροειδής δέχεται αιμάτωση από αγγεία που εισέρχονται στο επίπεδο της NFL, της IPL και της OPL. Λήφθηκε από O’Leary και Campbell (2021).

Ο εσωτερικός ΑΑΦ όπως είδαμε βασίζεται στις στενές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, ωστόσο έχει αποδοθεί και με τον όρο «νευροαγγειακή μονάδα» (“neurovascular unit”), ο οποίος αναφέρεται στην στενή λειτουργική σύνδεση και αλληλεξάρτηση μεταξύ των νευρικών, των γλοιακών κυττάρων, των περικυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων στον αμφιβληστροειδή (Nian και συν., 2021). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών στοιχείων που συνθέτουν την «νευροαγγειακή μονάδα» (NAM), συμβάλει στην διατήρηση της ακεραιότητας του εσωτερικού ΑΑΦ και κατ’ επέκταση στην αρμονική λειτουργία του αμφιβληστροειδούς. Σημαντική συμμετοχή σε αυτήν την σταθερότητα διαδραματίζουν τα περικύτταρα, τα οποία ευρισκόμενα στην βασική μεμβράνη των αγγείων και σε άμεση γειτνίαση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλουν στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του εσωτερικού ΑΑΦ, ρυθμίζουν την αιματική ροή και ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Gardner και Davila, 2017). Τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα του Muller, έρχονται σε επαφή με τις αποφυάδες τους με τα αιμοφόρα αγγεία, συμβάλλοντας και αυτά με την σειρά τους στην δομικής και λειτουργικής συνοχής του εσωτερικού ΑΑΦ, μέσω της απελευθέρωσης τροφικών παραγόντων, αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών μορίων (Fresta και συν., 2020; Newman, 2015) (βλ. Εικόνα 1.4). Τέλος τα περι-αγγειακά μικρογλοιακά κύτταρα συμβάλουν στην απομάκρυνση μέσω της φαγοκυττάρωσης άχρηστων μεταβολικών και κυτταρικών υποπροϊόντων (Nian και συν., 2021).



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση της «νευροαγγειακής μονάδας», η οποία αποτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα περικύτταρα, τα γλοιακά (αστροκύτταρα και κύτταρα του Muller), τα μικρογλοιακά και τα νευρικά κύτταρα. Απεικονίζεται επίσης η λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Τα νευρικά κύτταρα απελευθερώνουν ATP, το οποίο προσδένεται σε πουργεργικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των γλοιακών κυττάρων, οδηγώντας στην παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) και την απελευθέρωση ασβεστίου (Ca^{2+}) ενδοκυτταρικά. Το ασβέστιο διεγείρει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης 2 (PLA_2), η οποία με τη σειρά της μετατρέπει τα πρόδρομα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (PLA σε αραχιδονικό οξύ (AA). Από το αραχιδονικό οξύ θα προκύψουν έπειτα διάφορες ενώσεις με αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, όπως οι προσταγλανδίνες (PGs) και άλλες με αγγειοσυσταλτικές ιδιότητες, όπως το 20-υδροξυ-εικοσιτετρανοϊκό οξύ (20-HETE, τα οποία θα προκαλέσουν αγγειοδιαστολή ή αγγειοσυστολή αντίστοιχα, των αιμοφόρων αγγείων. Λήφθηκε από Simo και συν. (2018).

Συμπερασματικά, γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι η NAM αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο του αμφιβληστροειδούς, ενώ όπως θα δούμε αναλυτικότερα σε επόμενο κεφάλαιο, η διαταραχή της ομοιοστατικής ισορροπίας της NAM, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως η ΔΑ. Ωστόσο, εύλογα θα μπορούσε να ισχυριστεί κανείς, ότι εφόσον μιλάμε για διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων ο όρος «μονάδα» δεν είναι δόκιμος και ίσως θα έπρεπε να αντικατασταθεί με τον όρο «ομάδα». Ωστόσο, ο όρος «μονάδα», χρησιμοποιείται για να δώσει έμφαση στο γεγονός ότι η αμοιβαία εξάρτηση μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς είναι τόσο μεγάλη, ώστε φθάνουν στο σημείο να νοούνται και να δρουν ως εννιαία «μονάδα».

1.2.2. Νευροδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή

Στον αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών το γλουταμινικό, το GABA και η γλυκίνη αποτελούν τους βασικούς νευροδιαβιβαστές του κατακόρυφου και του οριζόντιου μονοπατιού μετάδοσης της οπτικής πληροφορίας (Wu και Maple, 1998). Το κατακόρυφο μονοπάτι σχηματίζεται μεταξύ των φωτοϋποδοχέων, των δίπολων και των γαγγλιακών κυττάρων και χρησιμοποιεί το διεγερτικό αμινοξύ γλουταμινικό για την μετάδοση της πληροφορίας (Wu και Maple, 1998). Το οριζόντιο ή πλάγιο μονοπάτι, περιλαμβάνει την διαμεσολάβηση ανασταλτικών ενδονευρώνων, όπως είναι τα οριζόντια και τα βραχύνα κύτταρα και επιστρατεύει για την διακυτταρική επικοινωνία είτε το GABA είτε τη γλυκίνη, που αποτελούν τους βασικότερους ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές (Wu και Maple, 1998).

Η διαβίβαση της οπτικής πληροφορίας από τους νευρώνες του κατακόρυφου μονοπατιού πραγματοποιείται με την διαμεσολάβηση ιοντοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού. Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού είναι συζευγμένοι με ένα διάλυο ιόντων και η ενεργοποίησή τους, είτε από το γλουταμινικό είτε από κάποιο ανάλογο του, συνεπάγεται την είσοδο κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) ή νατρίου (Na^+) στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα να έχουμε μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης και κατ' επέκταση μία συναπτική απόκριση (Greger και συν., 2017; Stroebel και συν., 2018). Οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού ανήκουν στην οικογένεια των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs, G protein-coupled receptors), οι οποίοι πραγματοποιούν κυτταρικές αποκρίσεις μέσω της ενεργοποίησης ή της αναστολής ποικίλων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Higgs και συν., 2002). Πέρα από τους υποδοχείς του γλουταμινικού, στον αμφιβληστροειδή έχει επιβεβαιωθεί και η παρουσία πέντε διαφορετικών υποτύπων μεταφορέων του γλουταμινικού (EAAT 1-5, Excitatory Amino Acid Transporters), οι οποίοι παρουσιάζουν ευρεία εντόπιση σε γλοιακά και νευρικά κύτταρα και φροντίζουν για την απομάκρυνση του γλουταμινικού από τον εξωκυττάριο χώρο (Rauen, 2000). Οι γλουταμινεργικοί υποδοχείς και μεταφορείς, μαζί με το γλουταμινικό και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις αποτελούν βασικά στοιχεία που διαμορφώνουν την γλουταμινεργική διαβίβαση και ελέγχον την μετάδοση της οπτικής πληροφορίας στον αμφιβληστροειδή.

Όπως έχουμε ήδη διαπιστώσει η οπτική πληροφορία, εμπεριέχει σύνθετες πληροφορίες, οι οποίες επεξεργάζονται και απαρτιώνονται από διαφορετικούς νευρώνες στον αμφιβληστροειδή. Η ικανότητα αυτή της μετάδοσης και επεξεργασίας ποικίλων πτυχών της οπτικής πληροφορίας οφείλεται εν μέρει στους διαφορετικούς υποδοχείς γλουταμινικού και στην διαφορική κατανομή τους στους νευρώνες που συνθέτουν το κατακόρυφο μονοπάτι. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μονοπάτια τύπου ON και OFF επεξεργασίας της οπτικής πληροφορίας. Αναλυτικότερα, υπό συνθήκες σκότους οι φωτοϋποδοχείς εκπολώνονται και απελευθερώνουν γλουταμινικό, ενώ ως απόκριση σε κάποιο φωτεινό ερέθισμα παρατηρείται υπερπόλωση των φωτοϋποδοκτικών κυττάρων, η οποία όπως είναι φυσικό συνοδεύεται και από μείωση της απελευθέρωσης γλουταμινικού (Witkovsky και συν., 2001). Στο ανώτερο στάδιο επεξεργασίας, τα OFF δίπολα κύτταρα που εκφράζουν τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς AMPA του γλουταμινικού που είναι συζευγμένοι με ένα διάλυο ιόντων Na^+ , παραμένουν εκπολωμένοι σε συνθήκες σκότους εξαιτίας της πρόσδεσης γλουταμινικού σε αυτούς και υπερπολώνονται μετά από κάποιο φωτεινό ερέθισμα, εξαιτίας της μειωμένης επάρκειας γλουταμινικού (Porona, 2015). Από την άλλη πλευρά τα ON δίπολα κύτταρα, εκφράζουν τον μεταβολοτροπικό υποδοχέα του γλουταμινικού mGluR6, ο οποίος μέσω ενός καταρράκτη γεγονότων οδηγεί σε αναστολή της εισροής ιόντων, υπερπολώνοντας το κύτταρο. Έχει επομένως αντίστροφη δράση από τα OFF, αφού

υπερπολώνεται σε συνθήκες σκότους και εκπολώνεται σαν απόκριση στην αύξηση της έντασης του φωτός (Vardi και συν., 2000).

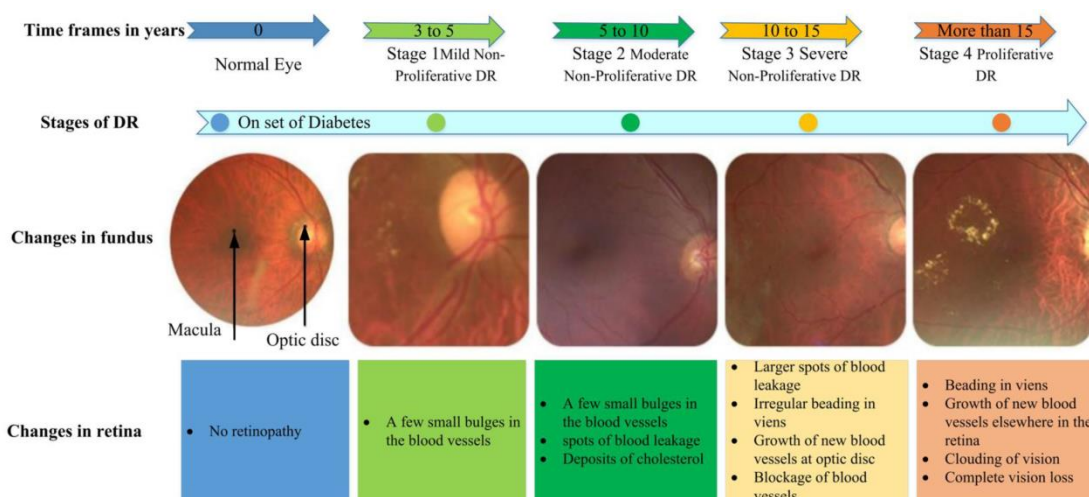
Η πλάγια οδός, στην οποία συμμετέχουν τα οριζόντια και τα βραχύινα κύτταρα, χρησιμοποιεί την GABAεργική νευροδιαβίβαση. Το GABA, ο κυριότερος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα οριζόντια και στα μεσαίου και μεγάλου υποδεκτικού πεδίου βραχύινα κύτταρα (Lukasiewicz και Shields, 1998). Ο δεύτερος κατά σειρά ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής μετά το GABA, η γλυκίνη εκφράζεται κυρίως από τα βραχύινα κύτταρα μικρού υποδεκτικού πεδίου (Lukasiewicz και Shields, 1998). Οι υποδοχείς, ιδιαίτερα του GABA, αλλά και της γλυκίνης, παρουσιάζουν ευρεία προσυναπτική και μετασυναπτική εντόπιση στην πλειοψηφία των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς (Lukasiewicz και Shields, 1998), όπου μέσω της ορθόδρομης και της ανάδρομης αναστολής που επιτελούν στους νευρώνες του κατακόρυφου μονοπατιού (Dowling και Boycott, 1966; Grimes και συν., 2015), διασφαλίζουν την μέγιστη δυνατή ποιότητα της οπτικής πληροφορίας κατά την μετάδοσή της από τους φωτοϋποδοχείς προς τα γαγγλιακά κύτταρα. Στον αμφιβληστροειδή έχει επιβεβαιωθεί και η παρουσία άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως η ντοπαμίνη, η ακετυλοχολίνη, η σεροτονίνη, η αδενosίνη καθώς και διαφόρων νευροτροποποιητικών πεπτιδίων, όπως η σωματοστατίνη, το VIP, οι οποίοι κατά κύριο λόγο εκφράζονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς βραχύνων κυττάρων (Kolb, 2009). Τέλος στον αμφιβληστροειδή, παρόν είναι και ένα πλήρως λειτουργικό σύστημα ενδογενών κανναβινοειδών, το οποίο όπως θα δούμε εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο συμμετέχει σε μια πληθώρα διεργασιών που σχετίζονται με την όραση (Schwitzer και συν., 2016).

1.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η ΔΑ αποτελεί μία από τις δευτερεύουσες επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη και συνιστά ένα κρίσιμο πρόβλημα για την δημόσια υγεία σε παγκόσμια κλίμακα, το οποίο αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως οδηγεί σε προβλήματα στην όραση των ασθενών. Ο επιπολασμός της νόσου είναι μεγαλύτερος στους ασθενείς με διαβήτη τύπου I απ' ότι σε αυτούς με διαβήτη τύπου II (Yau και συν., 2012). Περίπου 4.4 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν διαγνωστεί με ΔΑ, εκ των οποίων 3.3 εκατομμύρια παρουσιάζουν κάποιου είδους διαταραχή στην οπτική τους ικανότητα και περίπου 1 εκατομμύριο είναι τυφλοί (IAPB, 2022). Ανάμεσα στους βασικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ΔΑ περιλαμβάνονται η διάρκεια του διαβήτη, η υπεργλυκαιμία, η υπέρταση και η δυσλιπιδαιμία (Scanlon, 2022). Δευτερευόντως, έχουν αναγνωριστεί και άλλοι παράγοντες, όπως ηλικία, η εθνικότητα, η γενετική προδιάθεση, το κάπνισμα, η εγκυμοσύνη κ.ά. (Scanlon, 2022).

Σε βάθος χρόνου έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες για την διάκριση της ΔΑΣ σε επιμέρους κατηγορίες, βάσει της σοβαρότητας των συμπτωμάτων που συναντάμε στους ασθενείς. Μία γενικότερη αδρή διάκριση της ΔΑΣ, είναι η κατηγοριοποίησή της σε μη πολλαπλασιαστική (ΜΠΔΑ), όπου έχουμε απουσία νέο-αγγείωσης και σε πολλαπλασιαστική (ΠΔΑ), όπου η παρουσία νέο-αγγείωσης είναι εκτεταμένη. Μία από τις πρώτες οργανωμένες προσπάθειες διάκρισης έγινε το 1968 και αφορά την κατηγοριοποίηση Airlie House (Goldberg και Jampol, 1978), ενώ στα τέλη της δεκαετίας του '70, χρησιμοποιήθηκε μια τροποποίηση της Airlie House κατηγοριοποίησης στην μελέτη της Πρώιμης Θεραπείας για την Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) (ETDRS, 1991). Παρά το γεγονός ότι και οι δύο αυτές κατηγοριοποιήσεις αποτέλεσαν πολύ χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των κλινικών για αρκετά χρόνια, σήμερα πλέον δεν χρησιμοποιούνται εξαιτίας της πολυπλοκότητάς του και έχουν αντικατασταθεί από πιο απλές.

Σήμερα στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται ευρέως το σύστημα κατηγοριοποίησης του Διεθνούς Συμβουλίου Οφθαλμολογίας (International Council of Ophthalmology), το οποίο βασίζεται στην αναγνώριση διαφορετικών ανατομικών βλαβών στον αμφιβληστροειδή. Βάσει αυτής της κατηγοριοποίησης η ΜΠΔΑ διαχωρίζεται σε ήπια, μέτρια και σοβαρή (Solomon και συν., 2017). Η ήπια χαρακτηρίζεται από ελάχιστη ή καθόλου παρουσία μικροανευρυσμάτων, ενώ στην μέτρια η περαιτέρω απώλεια της δομικής συνοχής και η απόφραξη των αγγείων, οδηγεί στην εμφάνιση αιμορραγικών επεισοδίων, ισχαιμίας κατά την οποία περιοχές του αμφιβληστροειδή δεν αιματώνονται σωστά και εξιδρωμάτων εξαιτίας της διαρροής υγρού από τα τριχοειδή αγγεία στον αμφιβληστροειδή (Kusuhara και συν., 2018). Στην σοβαρή μορφή παρατηρείται η παρουσία σοβαρότερων αγγειακών βλαβών εξαιτίας της ακανόνιστης συστολής ή διαστολής των τριχοειδών αγγείων του αμφιβληστροειδούς (Kusuhara και συν., 2018). Ένα ξεχωριστό στάδιο στην πορεία εξέλιξης της ΔΑ αποτελεί το οίδημα της ωχράς κηλίδας (ΟΩΚ), κατά το οποίο εξαιτίας της διαρροής των αιμοφόρων αγγείων, παρατηρείται οίδημα στην κεντρική περιοχή της ωχράς κηλίδας που πλήττει την οπτική οξύτητα του ασθενούς (Das και συν., 2015). Στην ΠΔΑ, εξαιτίας της εντεινόμενης παρουσίας της ισχαιμίας και σε μια προσπάθεια του ιστού να αποκαταστήσει την αιμάτωση στον αμφιβληστροειδή, πραγματοποιείται ανεξέλεγκτη δημιουργία νέων μη φυσιολογικών αγγείων που οδηγούν σε υαλοειδική αιμορραγία και στις σοβαρότερες των περιπτώσεων μπορεί να προκαλέσουν αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς, με καταστροφικές συνέπειες για την όραση του ασθενούς (Cheung και συν., 2010).



Εικόνα 1.5. Στάδια της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Λήφθηκε από Asia και συν. (2022).

Νεώτερες κλινικές παρατηρήσεις της εικόνας των συμπτωμάτων που συναντάμε σε καθένα από τα διακριτά στάδια της νόσου, αλλά και του αντίκτυπού τους στην οπτική ικανότητα των ασθενών, οδήγησαν στην περαιτέρω διάκριση της ΔΑΣ σε δύο κατηγορίες, την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια πρώιμου σταδίου (ΔΑΠΣ) και την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια εξελιγμένου σταδίου (ΔΑΕΣ) (Simó και Hernández, 2022). Η ΔΑΠΣ περιλαμβάνει την πλήρη απουσία συμπτωμάτων, την ήπια και την μέτρια ΜΠΔΑ, στις οποίες η οπτική ικανότητα δεν επηρεάζεται, ενώ στην ΔΑΕΣ, πλήττεται η οπτική οξύτητα των ασθενών και συγκροτείται από την σοβαρή μορφή της ΜΠΔΑ, το ΟΩΚ και την ΠΔΑ. (Simó και Hernández, 2022).

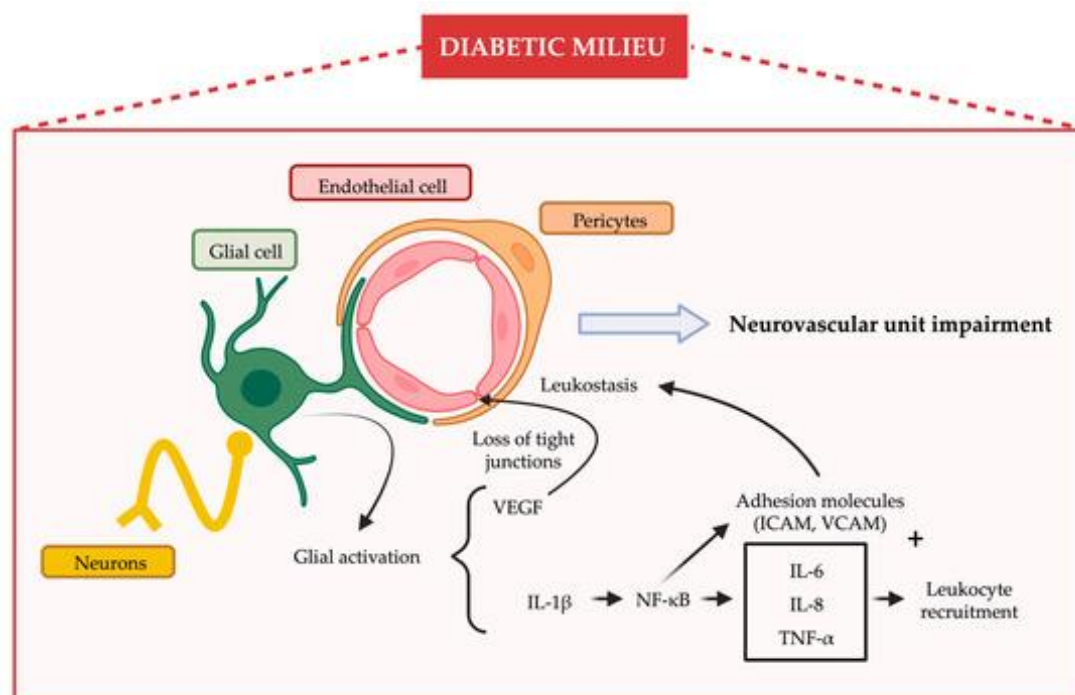
Στο σημείο αυτό, εύλογα θα μπορούσε κάποιος να αναρωτηθεί για την χρησιμότητα όλων αυτών των κατηγοριοποιήσεων της ΔΑΣ. Η σωστή αναγνώριση του επιμέρους σταδίου

της ΔΑΣ στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής βοηθά αρχικά στην πρόβλεψη της επικινδυνότητας της νόσου και της εμφάνισης προβλημάτων στην όραση, αλλά το κυριότερο, συμβάλει στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για το κάθε στάδιο. Μάλιστα, ιδίως όταν πρόκειται για την ΔΑΠΣ, αξίζει να ειπωθεί ότι δεν υπάρχει κανένα θεραπευτικό μέσο μέχρι στιγμής, ενώ οι λιγοστές παρεμβάσεις που έχουν προταθεί, αφορούν τον στενό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης και της πίεσης της αιματικής κυκλοφορίας (Simó και Hernández, 2022). Επιπροσθέτως όλες οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη επικεντρώνονται στην αντιμετώπιση της ΔΑΕΣ και αφορούν επεμβατικές τεχνικές όπως το λέιζερ και η ενδοϋαλοειδική χορήγηση κορτικοστεροειδών και αντι-VEGF παραγόντων, οι οποίες μάλιστα χαρακτηρίζονται από αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες για τον ασθενή (Simó και Hernández, 2015). Κατά πάσα πιθανότητα, η έλλειψη θεραπευτικών παρεμβάσεων στην ΔΑΠΣ οφείλεται στο γεγονός ότι η όραση του ασθενούς δεν έχει επηρεαστεί και επομένως όλες οι προσπάθειες για εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας επικεντρώθηκαν μέχρι σήμερα στο εξελιγμένο στάδιο της νόσου. Εντούτοις όπως θα δούμε και σε επόμενο κεφάλαιο, η ΔΑΠΣ αποτελεί πλέον τον βασικότερο στόχο της πλειοψηφίας των ερευνητικών μελετών για την ανάπτυξη νέων θεραπειών, καθ' ότι φαίνεται πως το κλειδί για την επιτυχή θεραπεία της ΔΑΣ, έγκειται στην αποτελεσματική αντιμετώπιση της παθοφυσιολογίας του πρώιμου σταδίου της και κατ' επέκταση στην αναχαίτιση της πορείας της νόσου προς το εξελιγμένο στάδιο.

1.3.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια: Μία νόσος της «νευροαγγειακής μονάδας»

Όπως αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η «νευροαγγειακή μονάδα» (NAM) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις στενές νευροχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νευρικών, των γλοιακών κυττάρων και των εξειδικευμένων αγγείων που την αποτελούν. Η διαρκής επικοινωνία και αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών αυτών διαφορετικών στοιχείων της NAM, συμβάλει στην διαμόρφωση της ακεραιότητας του εσωτερικού ΑΑΦ και ρυθμίζει την αιματική ροή σύμφωνα με τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων (Newman, 2013). Η πρόοδος των τεχνικών απεικόνισης του αμφιβληστροειδούς, με την πάροδο των χρόνων συνέβαλλε τα μέγιστα στην αναγνώριση των πρώιμων παθολογικών γεγονότων, που οδηγούν στην εμφάνιση της ΔΑΣ. Οι μεταβολικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στον σακχαρώδη διαβήτη, όπως η χρόνια υπεργλυκαιμία, το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή διαταράσσουν την ομοιόσταση της NAM, μειώνοντας την έκφραση προστατευτικών τροφικών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων, ενώ παράλληλα αυξάνουν την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως οι κυτοκίνες και οι χημειοκίνες (Antonetti και συ., 2006). Η παρατηρούμενη ανισορροπία μεταξύ προστατευτικών και προφλεγμονωδών παραγόντων πλήττει την δομική ακεραιότητα του εσωτερικού ΑΑΦ, μέσω της προοδευτικής εκφύλισης των ενδοθηλιακών κυττάρων και των περικυττάρων (Hawkins και Davis, 2005), με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων. Η απώλεια των στενών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και η προοδευτική τους καταστροφή επιτρέπει την είσοδο μακροφάγων από την αιματική κυκλοφορία στον αμφιβληστροειδή, τα οποία απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις παράγοντες που εντείνουν την ήδη υπάρχουσα βλάβη στα αγγεία και τη φλεγμονή (Das και συν., 2012) και επάγουν την εκφύλιση των νευρικών κυττάρων (Simo και συν., 2018). Εξαιτίας των εκτεταμένων αλλαγών που συμβαίνουν κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ, παρατηρείται και το φαινόμενο της αντιδραστικής γλοίωσης, κατά το οποίο τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα του Muller ενεργοποιούνται και ενδέχεται να διαμεσολαβήσουν προφλεγμονώδεις

αποκρίσεις, ενισχύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την νευρο-φλεγμονή (Rungger-Brändle και συν., 2000).



Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση των βασικότερων παθοφυσιολογικών γεγονότων που απαντώνται στα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ. Η υπερενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων (αντιδραστική γλοιώση) που παρατηρείται εξαιτίας της υπεργλυκαιμίας, οδηγεί στην αύξηση της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών και του VEGF, τα οποία πλήττουν την ακεραιότητα του ΑΑΦ. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την επαγόμενη από την αύξηση της έκφρασης μορίων πρόσδεσης (ICAM, VCAM) ενισχυμένη λευκόσταση, αυξάνει την αγγειακή διαρροή, εντείνει την προ-φλεγμονώδη απόκριση και επάγει τον νευρωνικό θάνατο, διαταράσσοντας με αυτόν τον τρόπο την ομοιόσταση της NAM. Λήφθηκε από Ramos και συν. (2023).

Από όλα τα παραπάνω, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι διάφορες μεταβολικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στον διαβήτη, είναι υπεύθυνες για την διατάραξη της ομοιόστασης της NAM στον αμφιβληστροειδή και την εμφάνιση ΔΑΣ. Έτσι, ήδη από τα πρώιμα στάδια της νόσου έχουμε την παρουσία μικρο-αγγειοπάθειας, αντιδραστικής γλοιώσης, φλεγμονής και νευροεκφύλισης. Ας εξετάσουμε όμως αναλυτικότερα, καθένα από αυτά τα βασικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν την παθοφυσιολογία της ΔΑΣ.

α. Μικρο-αγγειοπάθεια

Η μικρο-αγγειοπάθεια, οι βλάβες δηλαδή στα αιμοφόρα αγγεία στο μικροπεριβάλλον του αμφιβληστροειδούς, αποτελούν βασικό σύμπτωμα των πρώιμων σταδίων της ΔΑΣ. Η τροποποίηση της αιματικής ροής, εξαιτίας της ανισορροπίας που παρατηρείται στο ισοζύγιο μεταξύ αγγειοδιασταλτικών παραγόντων (όπως το NO) και αγγειοσυσταλτικών παραγόντων (όπως η ενδοθηλίνη-1, ET-1), συμβάλλουν μέσω μιας αλυσίδας σηματοδοτικών γεγονότων στις πρώιμες μικροαγγειακές βλάβες στην ΔΑ, όπως η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και ο περιορισμός της αιματικής ροής εξαιτίας της στένωσης-συστολής των αγγείων (Sorrentino και συν., 2018). Αξίζει να αναφερθεί εδώ, ότι τα αγγεία στον αμφιβληστροειδή δεν δέχονται κάποιου είδους νεύρωση που να μπορέσει να καθορίσει τις αποκρίσεις τους, αλλά αντιθέτως η ρύθμιση της αιματικής ροής διαμορφώνεται από μη νευρικούς

μηχανισμούς, οι οποίοι διαμεσολαβούνται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα περικύτταρα (Deanfield και συν., 2007). Άμεσο απότοκο των προαναφερθεισών αλλαγών αποτελεί η απώλεια των στενών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων που συνθέτουν τον εσωτερικό ΑΑΦ και η προοδευτική καταστροφή τους (Koya και King, 1998). Κρίσιμο ρόλο σε αυτή την διαδικασία διαδραματίζει και η συστηματική απώλεια των περικυττάρων, τα οποία συμβάλλουν στην διατήρηση της ακεραιότητας του εσωτερικού ΑΑΦ και ρυθμίζουν την αιματική ροή (Armulik και συν., 2005), με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων προς τον αμφιβληστροειδή και την εμφάνιση ισχαιμίας εξαιτίας της περιορισμένης αιματικής ροής (Chakrabarti και συν., 1998). Η πρώιμη διαταραχή της δομικής ακεραιότητας του εσωτερικού ΑΑΦ εμφανίζεται στην κλινική εικόνα με την μορφή μικρο-ανευρυσμάτων και μικρο-αιμορραγικών επεισοδίων, ενώ στο μέτριας δριμύτητας στάδιο της νόσου, η περαιτέρω απώλεια της δομικής συνοχής και η απόφραξη των αγγείων οδηγεί στην εμφάνιση αιμορραγικών επεισοδίων, ισχαιμίας κατά την οποία περιοχές του αμφιβληστροειδή δεν αιματώνονται σωστά και εξιδρωμάτων εξαιτίας της διαρροής υγρού από τα τριχοειδή αγγεία στον αμφιβληστροειδή (Kusuhara και συν., 2018).

Η διαταραχή στο σύστημα της ενδοθηλίνης φαίνεται να αποτελεί το εναρκτήριο ερέθισμα για την εμφάνιση των μικροαγγειακών ανωμαλιών κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς. Η ET-1 θεωρείται το βασικότερο αγγειοδραστικό πεπτίδιο, ικανό να προκαλέσει αγγειοσυστολή, δρώντας μέσω των GPCR υποδοχέων της, ET_A και ET_B (Yanagisawa και συν., 1988; Ergul, 2003). Η ET-1 παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλεί αγγειοσυστολή δρώντας στους υποδοχείς της που εκφράζονται κατά κύριο λόγο στους λείους μύες των αγγείων, ενώ είναι σε θέση να ελέγχει και τον πολλαπλασιασμό αυτών των μυών (Stow και συν., 2011). Στον διαβήτη έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων της ET-1 στο πλάσμα των ασθενών (Takahashi και συν., 1990; Kawamura και συν., 1992). Η αυξημένη έκφραση της ET-1 στον αμφιβληστροειδή και η επακόλουθη αύξηση της αγγειοσυστολής που προκαλεί είναι υπεύθυνη για την διατάραξη της αυτορρύθμισης της αιματικής ροής στα τριχοειδή αγγεία, που παρατηρείται στο πρώιμο στάδιο της ΔΑς (Lam, 2001). Η χορήγηση ανταγωνιστών για τους υποδοχείς της ET-1 αποκαθιστά την διαταραγμένη αιματική ροή (Wang και συν., 2010). Αξιοσημείωτο στο σημείο αυτό είναι το γεγονός ότι η διατάραξη της αιματικής ροής συντηρείται επίσης από την μείωση της έκφρασης της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS, Nitric Oxide Synthase), η οποία συνθέτει και απελευθερώνει το αγγειοδιασταλτικής φύσεως, μονοξείδιο του αζώτου (NO, Nitric Oxide) (Roufail και συν., 1998). Ωστόσο η ET-1 συμβάλλει επίσης στην διατάραξη της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής (Idris-Khodja και συν., 2016; Alrashdi και συν., 2018). Πέρα από τις δράσεις της στα αγγεία, η ET-1 στην ΔΑ συμμετέχει επίσης ενεργά και σε νευροεκφυλιστικές διεργασίες, όπως είναι ο θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων (Chaphalkar και συν., 2020; Marola και συν., 2020).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση των μικρο-αγγειακών διαταραχών στην ΔΑ, είναι το οξειδωτικό στρες. Η υπεργλυκαιμία που παρατηρείται στον σακχαρώδη διαβήτη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του οξειδωτικού στρες στον αμφιβληστροειδή, το οποίο συνοδεύεται από την ταυτόχρονη μείωση της διαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών μορίων (Masuda και συν., 2017). Εξαιτίας της υπερενεργοποίησης των NADPH οξειδασών (Drummond και συν., 2011) παρατηρείται αύξηση της παραγωγής των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), με βασικότερο

εκπρόσωπο το υπεροξειδίο του οξυγόνου (O_2^-), που συνδυάζεται με το NO και οδηγεί στον σχηματισμό περοξυνιτριτών ($ONOO^-$), το οποίο πλήττει με την σειρά του τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Sena και συν., 2011). Ακόμη η υπερπαραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγούν σε διατάραξη της σωστής λειτουργίας των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση αυτής των ενδοθηλιακών κυττάρων (Kowluru και συν., 2003). Κρίσιμο ρόλο στις οξειδωτικές αποκρίσεις διαδραματίζει και η μείωση της έκφρασης του πυρηνικού υποδοχέα PARPγ [Poly (ADP-ribose) polymerase] στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο οποίος ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο Nrf2 που ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (Deliyanti και συν., 2018).

Η φλεγμονή αποτελεί επίσης καθοριστικό παράγοντα που συμβάλει στην καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην αποδιοργάνωση του εσωτερικού ΑΑΦ. Καίριο ρόλο στην εμφάνιση φλεγμονής, διαδραματίζει η αύξηση της έκφρασης διαφόρων μορίων πρόσδεσης στις στενές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως το ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1), το VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) και το ELAM-1 (Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1), τα οποία συζευγνύονται με λευκοκύτταρα της αιματικής κυκλοφορίας και προκαλούν λευκόσταση (Chibber και συν., 2007). Η επαγόμενη από τον διαβήτη αύξηση της έκφρασης των μορίων πρόσδεσης είναι μάλιστα μεγαλύτερη στον αμφιβληστροειδή σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο ιστό (Lessieur και συν., 2022). Η λευκόσταση εκτός του ότι λειτουργεί ως φράγμα μειώνοντας την αιματική ροή κατά μήκους των αγγείων (Abiko και συν., 2003), μέσω των αλληλεπιδράσεων των μορίων πρόσδεσης με τα λευκοκύτταρα συμβάλλει στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και στην μετάβαση των λευκοκυττάρων από το εσωτερικό των αγγείων προς τον αμφιβληστροειδή (Miyamoto και συν., 1999). Η συσσώρευση λευκοκυττάρων στον αμφιβληστροειδή σε συνεργασία με την αύξηση της αντιδραστικής γλοιώσης που παρατηρείται, συμβάλλουν στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) (Aveleira και συν., 2010), η ιντερλευκίνη-1β (Yun, 2021), η ιντερλευκίνη-6 (Mysliwiec και συν., 2008) κ.ά., οι οποίες συντηρούν και ενισχύουν την προφλεγμονώδη απόκριση και οδηγούν σε περαιτέρω βλάβες στα αγγεία.

Ο αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF, Vascular Endothelium Growth Factor), αποτελεί ένα από τους βασικότερους υπαίτιους για τις μικροαγγειακές ανωμαλίες στην ΔΑΠΣ. Ο VEGF είναι ένας χρήσιμος τροφικός παράγοντας που συμμετέχει σε διεργασίες αγγειογένεσης (Takahashi και Shibuya, 2005) και υπό φυσιολογικές συνθήκες ελέγχει την αγγειακή διαπερατότητα που είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία των αγγείων (Roberts και Palade, 1995). Ωστόσο στην ΔΑ τα AGEs (Advanced Glycation End-products) (Mamputu και συν., 2002) οδηγούν σε μία ανεξέλεγκτη αύξηση της έκφρασης του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αυξημένη έκφραση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμβάλλει στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων πέρα από τα φυσιολογικά όρια και διαταράσσει την δομική ακεραιότητα του εσωτερικού ΑΑΦ (Antonetti και συν., 1999; Kim και συν., 2009). Ο VEGF είναι επίσης υπεύθυνος και για την αύξηση της έκφρασης του ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την πρόκληση λευκόστασης κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς (Joussen και συν., 2002). Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μικρογλοιακά (Ding και συν., 2018), τα αστροκύτταρα (Schmid-Brunclik και συν., 2008) και τα κύτταρα του Muller (Brooks και συν., 1998) εκφράζουν και απελευθερώνουν VEGF σαν απόκριση σε παθολογικές συνθήκες. Ο VEGF συμμετέχει και σε διεργασίες φλεγμονής, αφού δύναται να αυξήσει την έκφραση μορίων πρόσδεσης, όπως το ICAM-1 (Joussen και συν., 2001) και διαφόρων προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α,

πιθανότατα μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Choudhouri και συν., 2015). Η σχέση αυτή είναι αμφίδρομη, αφού οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να αυξήσουν την έκφραση και την απελευθέρωση του VEGF (Naginepi και συν., 2012). Στην ΠΔΑ, η περαιτέρω αύξηση της παραγωγής και απελευθέρωσης VEGF εξαιτίας της παρουσίας ισχαιμίας από την περιορισμένη αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς, επάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων προς σχηματισμό νέων μη φυσιολογικών αγγείων (Witmer και συν., 2003). Η νέο-αγγείωση αυτή που οφείλεται στην αυξημένη ενεργότητα του VEGF, αποτελεί το σοβαρότερο σύμπτωμα της ΠΔΑΣ και αντιμετωπίζεται με την ενδοφθάλμια χορήγηση παραγόντων με αντι-VEGF ιδιότητες (Arrigo και συν., 2022).

Εν κατακλείδι, φαίνεται πως η εμφάνιση των μικροαγγειακών ανωμαλιών κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ, είναι ένα φαινόμενο με πολυπαραγοντική αιτιολογία. Αρχικά η αύξηση της έκφρασης αγγειοσυσταλτικών παραγόντων όπως η ET-1 και η μείωση της έκφρασης αγγειοδιασταλτικών παραγόντων όπως το NO, οδηγούν από κοινού σε τροποποίηση της αιμοδυναμικής απόκρισης, μειώνοντας σημαντικά την αιματική ροή στα μικρο-αγγεία του αμφιβληστροειδούς. Ακολούθως η παρουσία οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και η αύξηση της έκφρασης τροφικών παραγόντων όπως ο VEGF, καταστρέφουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα που συνθέτουν τον εσωτερικό ΑΑΦ, προκαλώντας την αγγειακή διαρροή προς το εσωτερικό του αμφιβληστροειδούς.

β. Νευροεκφύλιση

Η παραδοσιακή άποψη κατέτασσε την ΔΑ ως μία μικρο-αγγειακή διαταραχή του αμφιβληστροειδούς, λαμβάνοντας μόνο υπόψιν τις αγγειακές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν τη νόσο. Νεώτερα όμως ερευνητικά δεδομένα οδήγησαν στην αναθεώρηση αυτής της άποψης, αναδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο της νευροεκφύλισης, η οποία μάλιστα προηγείται των αγγειακών ανωμαλιών, στην εκδήλωση της παθοφυσιολογίας της νόσου (Barber και συν., 1998; Simo και συν., 2018). Μελέτες σε ασθενείς με την χρήση οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCT, Optical Coherence Tomography), αλλά και σε μεταθανάτιους ιστούς ασθενών, αναφέρουν την παρουσία ελλειμμάτων στο πάχος συγκεκριμένων στιβάδων του αμφιβληστροειδούς, όπως η NFL και η GCL, που υποδεικνύουν την παρουσία νευροεκφύλισης κατά τα αρχικά στάδια της νόσου, ενώ παράλληλα δεν παρατηρούνται μικρο-αγγειακές ανωμαλίες (Jonsson και συν., 2016; Sohn και συν., 2016; Tavares Ferreira και συν., 2016). Υπέρ του προβαδίσματος που κατέχει η νευροεκφύλιση στην χρονική ακολουθία της ΔΑΣ συνηγορούν και μελέτες σε ζώα, που αναφέρουν την παρουσία παθολογικών ευρημάτων που σχετίζονται με τον νευρωνικό κυτταρικό θάνατο, με παράλληλη απουσία μικρο-αγγειακών διαταραχών (Barber και συν., 1998; Carrasco και συν., 2007; Sohn και συν., 2016). Ο κρίσιμος ρόλος της νευροεκφύλισης στην πορεία της ΔΑΣ διαφαίνεται επίσης από το γεγονός ότι αυτή ανιχνεύεται στον αμφιβληστροειδή ασθενών με διαβήτη, χωρίς άλλα σημάδια εμφανούς ΔΑΣ (van Dijk και συν., 2010; Ferreira και συν., 2016; Garcia-Martin και συν., 2019; Toprak και συν., 2020). Η διαβητική αμφιβληστροειδική νευροεκφύλιση (ΔΑΝ), όπως έχει ονομαστεί, αποτελεί ένα αρκετό πρώιμο στοιχείο της ΔΑΣ, παρόν ήδη κατά το στάδιο της προκλινικής ΔΑΣ, κατά το οποίο δεν αναγνωρίζεται κανένα άλλο γνωστό σημάδι της ΔΑΣ κατά την εξέταση των ασθενών, πέρα από την ΔΑΝ (Soni και συν., 2021).

Η νευρωνική ακεραιότητα βασίζεται στην ορθή λειτουργία των επιμέρους νευρώνων του αμφιβληστροειδούς και αποτελεί προαπαιτούμενο παράγοντα για την απρόσκοπτη μεταφορά της οπτικής πληροφορίας στον εγκέφαλο και το σχηματισμό της όρασης (Jackson και Barber, 2010). Η νευροεκφύλιση, ο θάνατος δηλαδή συγκεκριμένων νευρικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς διαταράσσει αυτή την ακεραιότητα και είμαστε πλέον βέβαιοι ότι αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της πρώιμης παθοφυσιολογίας της ΔΑς (Villarreal και συν., 2010). Μέχρι πρότινος δεν έχει δοθεί στην νευροεκφύλιση η απαιτούμενη προσοχή και αυτό διότι κατά την οφθαλμοσκοπική εξέταση των ασθενών μόνο οι αγγειακές αλλαγές ήταν ορατές και συνέβαλαν στην διάγνωση της ΔΑς και όχι τα ευρήματα νευροεκφύλισης (Barber, 2015). Ωστόσο ήδη από την δεκαετία του '60, προτού ακόμη η απόπτωση χαρακτηριστεί ως μια μορφή κυτταρικού θανάτου, μελέτες σε μεταθανάτιο υλικό ασθενών με ΔΑ άρχισαν να αναγνωρίζουν την παρουσία στοιχείων κυτταρικού θανάτου και εκφύλισης μέσω της διαδικασίας της πύκνωσης (Wolter, 1961), η οποία οφείλει το όνομά της στην εμφάνιση των ιστολογικών ευρημάτων και αργότερα μετονομάστηκε σε απόπτωση. Μεταγενέστερες μελέτες σε ζώα, χρησιμοποιώντας την τεχνική TUNEL για την ανγνώριση αποπτωτικών κυττάρων σε ολόκληρους αμφιβληστροειδείς (flat-mount), ανέδειξαν εκτεταμένη παρουσία TUNEL⁺ κυττάρων, τα οποία δεν περιορίζονταν μόνο στα αγγεία αλλά επεκτείνονταν και σε νευρικά και πιθανότατα γλοιακά κύτταρα (Barber και συν., 1998). Μεταγενέστερες μελέτες χρησιμοποιώντας την τεχνική TUNEL, σε μοντέλα διαβήτη επαγόμενου από STZ, επιβεβαίωσαν την παρουσία απόπτωσης στους αμφιβληστροειδείς διαβητικών μυών και επίμυων (Park και συν., 2003; Martin και συν., 2004; Gastinger και συν., 2006), ενώ τα ευρήματα αυτά επαληθεύτηκαν και με την χρήση γενετικών μοντέλων του διαβήτη (Ning και συν., 2004; Barber και συν., 2005). Ως προς την ύπαρξη νευρωνικού κυτταρικού θανάτου, συνηγορούν επίσης και μελέτες σε μεταθανάτιους ιστούς ασθενών με ΔΑ (Barber και συν., 1998). Το ενδιαφέρον που προκύπτει όμως μέσα από τις συγκεκριμένες μελέτες, είναι ότι η εμφάνιση της νευροεκφύλισης πολύ νωρίς στο χρονικό συνεχές της ΔΑς (δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή υπεργλυκαιμίας) (Gastinger και συν., 2006) και η συντήρησή της και σε μεταγενέστερα στάδια (αρκετούς μήνες μετά την επαγωγή υπεργλυκαιμίας) (Barber και συν., 1998), υποδεικνύουν ότι δεν πρόκειται για μία πρόσκαιρη αλλαγή, αλλά για μία χρόνια διαταραχή που πρέπει να τεθεί υπό έλεγχο.

Η χρήση και άλλων δεικτών, όπως η κασπάση-3 που συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργοποίησης των αποπτωτικών διεργασιών (Fan και συν., 2005), επιβεβαιώνουν την παρουσία της απόπτωσης στην ΔΑ. Οι Gastinger και συν. (2006) αναφέρουν στην μελέτη τους ότι η κασπάση-3 συνεντοπίζεται με συγκεκριμένους νευρωνικούς δείκτες στον αμφιβληστροειδή διαβητικών μυών, υποδεικνύοντας ότι οι νευρώνες αυτοί υπόκεινται σε απόπτωση. Οι Brucklacher και συν. (2008), έδειξαν ότι η δραστηριότητα της κασπάσης-3, παρουσιάστηκε αυξημένη στον αμφιβληστροειδή διαβητικών επίμυων τρεις μήνες μετά την επαγωγή του διαβήτη, ενώ οι Krady και συν. (2005) αναφέρουν αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3, τέσσερις μόλις εβδομάδες μετά την έναρξη του διαβήτη με χορήγηση STZ. Μελέτες σε ζώα υποδεικνύουν ότι τα γαγγλιακά είναι από τα πρώτα νευρικά κύτταρα που επηρεάζονται από τον διαβήτη, καθ' ότι υφίστανται μορφολογικές αλλαγές, όπως η μεγέθυνση του δενδριτικού τους πεδίου σαν αντισταθμιστική απόκριση στην μείωση της πυκνότητάς τους στον αμφιβληστροειδή (Qin και συν., 2006). Με την περαιτέρω επιδείνωση της ΔΑς, παρατηρείται εκτεταμένη εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (Kim και συν., 2015; Zhang και συν., 2018). Η επιδράσεις όμως της υπεργλυκαιμίας επεκτείνονται και στα βραχύνα κύτταρα. Εξαιτίας του διαβήτη παρατηρείται μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας της ντοπαμίνης (Nishimura και Kuriyama, 1985)

και της ακετυλοχολίνης (Sánchez-Chávez και Salceda, 2001) στα βραχύινα κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές στην λειτουργία των βραχύνων κυττάρων οδηγούν τελικά στον θάνατό τους μέσω της ενεργοποίησης αποπτωτικών διεργασιών (Gastinger και συν., 2006; Ibán-Arias και συν., 2018). Τέλος οι φωτοϋποδοχείς φαίνεται ότι αποτελούν ακόμη ένα από τα «θύματα» του διαβήτη, αφού ο θάνατος τους μέσω απόπτωσης έχει επιβεβαιωθεί σε ζωικά μοντέλα της ΔΑΣ (Kumar και συν., 2013; Lv και συν., 2020).

Τα προαναφερθέντα ευρήματα, σχετικά με την παρουσία νευροεκφύλισης στον αμφιβληστροειδή, επιβεβαιώνονται και από μελέτες σε μεταθανάτιους ιστούς ασθενών με ΔΑ, όπου έχουν παρατηρηθεί μορφολογικές αλλαγές, όπως ακανόνιστη πάχυνση των αξόνων και σμίκρυνση των δενδριτικών πεδίων των γαγγλιακών κυττάρων (Meyer-Rüsenberg και συν., 2006). Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν αυξήσεις στην έκφραση της κασπάσης-9, των προ-αποπτωτικών Fas και Bax και της κασπάσης-3 στα γαγγλιακά κύτταρα (Abu El-Asrar και συν., 2004; Oshitari και συν., 2008), οι οποίες συνοδεύονται από παράλληλη μείωση τα έκφρασης πρωτεϊνών που αναστέλλουν την απόπτωση, όπως η Akt, η Cox-2 και η Mcl-1 (Abu El-Asrar και συν., 2004). Ενδιαφέρον μάλιστα παρουσιάζει το γεγονός, ότι η δριμύτητα της ΔΑΣ παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την ποσότητα της κασπάσης-3 που ανιχνεύεται σε ιστούς ασθενών (Tian και συν., 2019).

Η παρουσία νευροεκφύλισης στα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ αποδεικνύεται και μέσα από κλινικές μελέτες, όπου με την χρήση απεικονιστικών τεχνικών επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ελλειμμάτων στο νευρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς. Τα ελλείμματα αυτά εκφράζονται ως μείωση στο πάχος συγκεκριμένων στιβάδων του αμφιβληστροειδούς, εξαιτίας της προοδευτικής εκφύλισης των κυττάρων που την αποτελούν. Ένα από τα πρωταρχικά ευρήματα σε αυτές τις μελέτες, είναι η μείωση του πάχους τις στιβάδας των νευρικών ινών (NFL), παρατηρούμενη μάλιστα σε διαβητικούς ασθενείς χωρίς άλλα εμφανή σημάδια ΔΑΣ (Lopes de Faria και συν., 2002; Lonneville και συν., 2002). Με την χρήση της οπτικής τομογραφίας, φαίνεται ότι η μείωση στο πάχος της στιβάδας NFL παρατηρείται επίσης και στην περιοχή της ωχράς σφαίρας, την περιοχή με την μέγιστη οπτική οξύτητα στον αμφιβληστροειδή και πιθανότατα σχετίζεται με την εκφύλιση των ίδιων των γαγγλιακών κυττάρων στην GCL (Biallostowski και συν., 2007). Πέρα από την μορφολογική ανάλυση του αμφιβληστροειδούς, χρήσιμες πληροφορίες για την νευροεκφύλιση λαμβάνουμε έμμεσα από την μελέτη της λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς με την χρήση ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών σε ασθενείς. Τέτοιες καταγραφές μπορεί να είναι για παράδειγμα το ηλεκτο-αμφιβληστροειδο-γράφημα (ERG), το οποίο αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών και των κλινικών γιατρών, βοηθώντας στην έγκαιρη διάγνωση λειτουργικών ελλειμμάτων στην νευρωνική δραστηριότητα του αμφιβληστροειδούς (Prager και συν., 1990). Ελλείμματα όπως το μειωμένο πλάτος και η καθυστέρηση στην έναρξη των αποκρίσεων, έχουν ανιχνευθεί σε ERGs ασθενών με διαβήτη τύπου I, χωρίς εμφανή διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Falsini και συν., 1989; Di Leo και συν., 1990), ενώ τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και μέσα από μελέτες σε ζώα (Hancock και συν., 2004). Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής υπάρχοντα ευρήματα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα λειτουργικά ελλείμματα εμφανίζονται αρκετά νωρίς, πριν ακόμα γίνουν εμφανείς οι δομικές αλλαγές, όπως η μείωση του πάχους συγκεκριμένων στιβάδων (Santos και συν., 2017). Ο συνδυασμός των δομικών με τις λειτουργικές ανωμαλίες στο νευρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή μέθοδο για την ανίχνευση και αναγνώριση της νευροεκφύλισης κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ.

Μέχρι στιγμής αναλύσαμε εκτενώς τις διαφορετικές εκφάνσεις της νευροεκφύλισης στα πρώιμα στάδια της ΔΑ, χωρίς όμως να αναφερθούμε στην αιτιολογία του φαινομένου. Ανάμεσα στους ποικίλους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την προοδευτική απώλεια των νευρικών κυττάρων στην ΔΑ, ίσως ο σημαντικότερος είναι το γλουταμινικό οξύ. Στην ΔΑ η συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος στον αμφιβληστροειδή εμφανίζεται αυξημένη, γεγονός που επιβεβαιώνεται τόσο από μελέτες σε μοντέλα ζώων (Lieth και συν., 2000; Kowluru και συν., 2001; Zeng και συν., 2010) όσο και από μελέτες σε ιστούς ασθενών (Ambati και συν., 1997). Στην ΔΑ παρατηρούνται ανωμαλίες στον μεταβολισμό του γλουταμινικού. Η μείωση της μετατροπής του γλουταμινικού σε γλουταμίνη, εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης της συνθετάσης της γλουταμίνης στα κύτταρα του Muller (Lieth και συν., 2000), η μειωμένη επαναπρόσληψη του γλουταμινικού από τα κύτταρα του Muller, εξαιτίας της μείωσης της έκφρασης του μεταφορέα GLAST (Li και Puro, 2002) και η μειωμένη δυνατότητα του αμφιβληστροειδούς προς οξείδωση του γλουταμινικού (Lieth και συν., 2000), συμβάλλουν στην υπερσυσσώρευση γλουταμινικού στον εξωκυττάριο χώρο. Η περίσσεια γλουταμινικού οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των ιοντοτροπικών AMPA και NMDA υποδοχέων του γλουταμινικού, με αποτέλεσμα την αύξηση εισροής Ca^{2+} στο εσωτερικό των κυττάρων (Carvajal και συν., 2016). Το αυξημένο ασβέστιο προκαλεί μεταβολικές αλλαγές και δύναται να ενεργοποιήσει ασβεστιο-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν προ-αποπτωτικές αποκρίσεις, με τελικό αποτέλεσμα τον θάνατο του κυττάρου (Carvajal και συν., 2016).

Η αύξηση του οξειδωτικού στρες, εξαιτίας της χρόνιας υπεργλυκαιμίας (Masuda και συν., 2017) αποτελεί ακόμη ένα κρίσιμο εκλυτικό παράγοντα για την εμφάνιση νευροεκφύλισης στην ΔΑ. Η υπερπαραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια προκαλεί βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA, που έχουν σαν αποτέλεσμα την διαταραχή του μεταβολισμού της ενέργειας στα μιτοχόνδρια (Jarrett και συν., 2008). Αυτό σε συνδυασμό με την οξειδωτική βλάβη που προκαλούν οι ROS σε πρωτεΐνες και λιπίδια οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Jarrett και συν., 2008). Τα γαγγλιακά κύτταρα φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις καταστροφικές επιδράσεις των ROS, οι οποίες διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία των γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή διαβητικών db/db μύων, ενώ η χορήγηση αντιοξειδωτικών μορίων διασώζει την λειτουργία τους (Xiao και συν., 2012). Σύμφωνα με τους Li και Puro (2002) το επαγόμενο από τον διαβήτη οξειδωτικό στρες μέσω ενός άγνωστου μέχρι στιγμής μηχανισμού, ευθύνεται για την μείωση της λειτουργίας του μεταφορέα GLAST του γλουταμινικού στα κύτταρα του Muller, με αποτέλεσμα την αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων γλουταμινικού και την σε δεύτερο χρόνο εμφάνιση διεγερσιτοξικότητας. Στην οξειδωτική βλάβη συντελεί τέλος και η μείωση της έκφρασης στον αμφιβληστροειδή αντιοξειδωτικών μορίων όπως η γλουταθειόνη, η οποία έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα ζώων του σακχαρώδους διαβήτη (Kowluru και συν., 1994).

Η ανισορροπία μεταξύ τροφικών/αυξητικών παραγόντων που επάγουν την νευροπροστασία και αυτών που επάγουν την νευροεκφύλιση αποτελεί ίσως την βασικότερη αιτία για την επαγωγή του νευρωνικού κυτταρικού θανάτου. Στην ΔΑ έχει παρατηρηθεί μείωση της έκφρασης του προερχόμενου από το μελάγχρουν επιθήλιο παράγοντα (PEDF, Pigment Epithelium-Derived Factor) (Shen και συν., 2011), ο οποίος έχει νευροπροστατευτικές και αντι-αγγειογενεσιακές ιδιότητες (Barnstable και Tombran-Tink, 2004). Η σωματοστατίνη αποτελεί ένα νευροπεπτίδιο που αναστέλλει την νέο-αγγείωση και διαμεσολαβεί νευροπροστατευτικές αποκρίσεις (Simo και συν., 2006; Hernández και συν., 2013) και η μειωμένη έκφρασή της σε ιστούς ασθενών με ΔΑ, έχει συσχετιστεί με την

παρουσία εκτεταμένης νευροεκφύλισης (Carrasco και συν., 2007). Ανάλογα ευρήματα προκύπτουν και εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης της κορτιστατίνης στην ΔΑ, η οποία παρουσιάζει υψηλή δομική συγγένεια με την σωματοστατίνη (Carrasco και συν., 2008). Τα επίπεδα της γλυκοπρωτεΐνης insulin receptor binding protein (IRBP), που εκφράζεται από τους φωτοϋποδοχείς και είναι απαραίτητη για την σωστή λειτουργία τους, είναι μειωμένα στα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ και αυτή η μείωση έχει συσχετιστεί με την διατάραξη της λειτουργίας των φωτοϋποδοχέων (García-Ramírez και συν., 2009). Η λειτουργία του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (NGF, Nerve Growth Factor), που υποστηρίζει την επιβίωση των νευρώνων μειώνεται στην ΔΑ και σε συνδυασμό με την αύξηση του πρόδρομου μορίου του, pro-NGF, ο οποίος σηματοδοτεί μέσω του υποδοχέα θανάτου p75, επάγουν την απόπτωση των γαγγλιακών κυττάρων και την εμφάνιση αντιδραστικής γλοιώσης (Kummer και συν., 2003). Με την χρήση ζωικών μοντέλων του διαβήτη, επαγόμενου από STZ, έχουν ανιχνευθεί μειωμένα επίπεδα έκφρασης του νευροτροφικού παράγοντα του εγκεφάλου (BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor) στον αμφιβληστροειδή, γεγονός που οδηγεί στην προοδευτική απώλεια των ντοπαμινεργικών βραχύνων κυττάρων (Seki και συν., 2004). Πέρα από την μείωση της έκφρασης των προαναφερθέντων παραγόντων, στην ΔΑ παρατηρείται επίσης και αύξηση της έκφρασης του VEGF και της ερυθροπρωτεΐνης (Epo) (Li και Sun, 2010; Hernández και συν., 2006), τα οποία παρά το γεγονός ότι σύμφωνα με ορισμένα ευρήματα κατέχουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Nishijima και συν., 2007; Rex και συν., 2009), στην ΔΑ δεν φαίνεται να επιτελούν αυτόν τον ρόλο. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση της έκφρασης των δύο αυτών μορίων ενισχύει την νευρωνική απώλεια, έμμεσα μέσω των μικροαγγειακών ανωμαλιών που προκαλούν κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ (Chen και συν., 2008).

Εν κατακλείδι γίνεται πλέον κατανοητό ότι η νευροεκφύλιση αποτελεί μία βασική συνιστώσα των πρώιμων σταδίων της ΔΑΣ. Η σύγχρονη άποψη ότι η νευροεκφύλιση δύναται να προηγείται των μικρο-αγγειακών ανωμαλιών, αναδιαμορφώνει εντελώς τον επιστημονικό τρόπο σκέψης σχετικά με τα παθοφυσιολογικά στοιχεία που είναι παρόντα στα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ και καθορίζουν την μετέπειτα ανάπτυξή της. Η εύρεση λοιπόν νέων, αποτελεσματικών θεραπειών που στοχεύουν στην αντιμετώπιση της νευροεκφύλισης, κρίνεται επιτακτική για την επιτυχή αντιμετώπιση της συνολικής παθολογίας της νόσου.

γ. Φλεγμονή

Η ανακάλυψη της εμπλοκής της φλεγμονής στην ΔΑ, μπορεί να αναζητηθεί πίσω στην δεκαετία του '60, όταν πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες παρατηρήσεις σε διαβητικούς ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία με παράγωγα του αντιφλεγμονώδους σαλικυλικού οξέος για την θεραπεία της αρθρίτιδας και στους οποίους παρατηρήθηκε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης ΔΑΣ (Powell και Field, 1964). Σήμερα πλέον, με την διαμεσολάβηση αρκετών μελετών σε ζώα αλλά και κλινικών μελετών, γνωρίζουμε ότι η φλεγμονή κατέχει εξέχουσα θέση στην παθοφυσιολογία της ΔΑΣ (Tang και Kern, 2011; Rübsam και συν., 2018). Αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και μορίων πρόσδεσης έχουν ανιχνευθεί στον αμφιβληστροειδή και στο υδατοειδές υγρό ασθενών με ΔΑ (Hernández-Da Mota και συν., 2015; Hernandez και συν., 2005), αλλά και στον αμφιβληστροειδή διαβητικών ζώων (Kradly και συν., 2005; Iban-Arias και συν., 2018).

Η συνεισφορά της φλεγμονής στην νευροεκφύλιση πιθανότατα γίνεται μέσω της αύξησης της αντιδραστικής γλοιώσης κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ. Η αντιδραστική

γλοίωση νοείται ως η αυξημένη ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων της NAM και η αύξηση της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών μορίων στον αμφιβληστροειδή, σαν απόκριση των διαταραχών που παρατηρούνται στην ομοίωση (de Hoz και συν., 2016). Η πρόωμη αύξηση της αντιδραστικής γλοίωσης, ωφελεί τον αμφιβληστροειδή κυρίως μέσω της φαγοκυττάρωσης κυτταροτοξικών ουσιών, άχρηστων υπολειμμάτων και αποπτωτικών νευρώνων (Cuenca και συν., 2014). Ωστόσο η χρόνια συντήρηση της αντιδραστικής γλοίωσης στην ΔΑ, διαταράσσει την δομική συνοχή του εσωτερικού ΑΑΦ και οδηγεί στον νευρωνικό θάνατο, μέσω των προφλεγμονωδών μορίων που απελευθερώνονται από τα γλοιακά κύτταρα (Cuenca και συν., 2014). Μάλιστα παρά το γεγονός ότι δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί αν η αντιδραστική γλοίωση προηγείται της νευροεκφύλισης, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αντιδραστική γλοίωση αποτελεί ένα αρκετά πρώιμο κομμάτι της παθοφυσιολογίας της ΔΑΣ, παρόν πριν την έναρξη του νευρωνικού θανάτου και στην ουσία είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της νευροεκφύλισης (Gaucher και συν., 2007; Hernández και συν., 2013).

Τα κύτταρα του Muller, αποτελούν τον έναν από τους δύο τύπους μακρογλοίας που συναντάμε στον αμφιβληστροειδή. Ήδη από τα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ, τα κύτταρα του Muller υφίστανται δομικές αλλαγές, όπως η υπερπλασία και η αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις, όπως η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης GFAP (Rungger-Brandle και συν., 2000; Gerhardinger και συν., 2005). Μελέτες σε ζώα έχουν επιβεβαιώσει ότι η υπερενεργοποίηση των κυττάρων του Muller φαίνεται ότι συμβαίνει αρκετά νωρίς, μόλις δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη (Hernández και συν., 2013). Στην ΔΑ η ενεργοποίηση των κυττάρων του Muller συνοδεύεται από αλλαγές στην έκφραση 78 γονιδίων τους, εκ των οποίων το 1/3 αφορά γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή, μεταξύ των οποίων εντοπίζονται και οι παράγοντες VEGF, ICAM-1 και ιντερλευκίνη-1β (Gerhardinger και συν., 2005). *In vitro* μελέτες επιβεβαιώνουν τις αλλαγές στο γονιδιακό προφίλ των κυττάρων του Muller σε γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή, μετά την έκθεσή τους σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας (Wang και συν., 2012). Πέρα από την αύξηση της έκφρασης της GFAP, σαν απόκριση σε παθολογικές καταστάσεις, η ενεργοποίηση των κυττάρων του Muller συνοδεύεται και από την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-6 (Liu και συν., 2015). Υπό συνθήκες υπεργλυκαιμίας, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα των γλυκοσυλιωμένων πρωτεϊνών (RAGE) στα κύτταρα του Muller, ο οποίος μέσω της MAPK κινάσης και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αυξάνει την παραγωγή και απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων από τα κύτταρα του Muller όπως η ιντερλευκίνη-1β, ο TNF-α, η ιντερλευκίνη-8, η ιντερλευκίνη-6 και το NO (Zong και συν., 2010; Liu και συν., 2014). Ανάλογες προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, παρατηρούνται και κατά την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων συνοδεύεται και από αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, κατά την οποία παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των κυτοκινών TNF-α και ιντερλευκίνης-1β και της χημειοκίνης MCP-1 (Shin και συν., 2014).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα φαίνεται ότι αποτελούν τον πρώτο τύπο γλοιακών κυττάρων που ενεργοποιούνται ως απάντηση στην διατάραξη της ομοίωσης του αμφιβληστροειδούς από τον διαβήτη (Sorrentino και συν., 2016). Μελέτες σε ιστούς ασθενών, υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας αποτελεί ένα από τα πρωταρχικά ιστοπαθολογικά ευρήματα στον αμφιβληστροειδή και συμβαίνει πριν την ενεργοποίηση των κυττάρων του Muller (Zeng και συν., 2008). Η υπεργλυκαιμία και το

οξειδωτικό στρες αποτελούν το εναρκτήριο λάκτισμα για την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, μέσω ειδικά διαμορφωμένων υποδοχέων ευρισκόμενων στην επιφάνεια τους, οι οποίοι αναγνωρίζουν τις παθολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στην ΔΑΠΣ (Ibrahim και συν., 2011; Zhu και συν., 2017). Επιπλέον τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών που εντοπίζονται στα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και στην περαιτέρω απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, συντηρώντας και ενισχύοντας την υπάρχουσα φλεγμονή (Grady και συν., 2005). Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας γίνεται είτε προς τον M2 φαινότυπο, στον οποίο τα μικρογλοιακά απελευθερώνουν αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικούς παράγοντες, είτε προς τον M1 όπου από τα μικρογλοιακά κύτταρα απελευθερώνονται νευροτοξικοί και προφλεγμονώδεις παράγοντες (Li και συν., 2021). Η χρόνια ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων στην ΔΑ ενισχύει την πόλωσή τους προς τον M1 φαινότυπο, όπου παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1β, η ιντερλευκίνη-6, η ιντερλευκίνη-12, ο VEGF και ο TNF-α, τα οποία επάγουν το θάνατο των νευρικών κυττάρων σηματοδοτώντας μέσω αποπτωτικών μονοπατιών (Yang και συν., 2009; Grigsby και συν., 2014; Altmann και Schmidt, 2018). Στο γενετικό μοντέλο για τον διαβήτη των db/db μυών, έχει προταθεί ότι στα αρκετά πρώιμα στάδια του διαβήτη η μικρογλοία στον αμφιβληστροειδή υιοθετεί τον M2 φαινότυπο εξυπηρετώντας προστατευτικές αποκρίσεις, ενώ σε μεταγενέστερα στάδια μετά από χρόνια χορήγηση, αλλάζει πόλωση προς τον προφλεγμονώδη M1 φαινότυπο ενισχύοντας την νευρωνική βλάβη (Atgoba και συν., 2016).

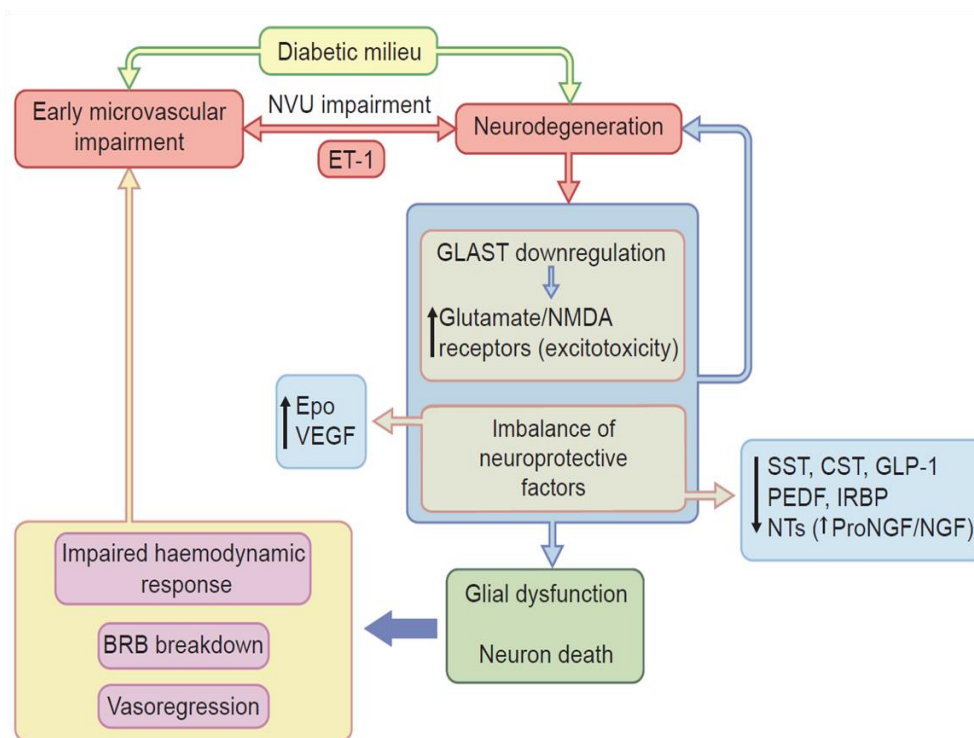
Εκτός από την νευροεκφύλιση, η χρόνια φλεγμονώδης απόκριση που παρατηρείται στην ΔΑ, είναι υπεύθυνη και για την εμφάνιση των μικροαγγειακών ανωμαλιών. Για παράδειγμα ο VEGF (Quam και συν., 2001) και ο TNF-α (Aveleira και συν., 2010) αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων και ενισχύουν την φλεγμονή εξαιτίας της εσόδου προφλεγμονωδών παραγόντων από την αιματική κυκλοφορία στο εσωτερικό του αμφιβληστροειδούς. Ωστόσο η συνεισφορά της φλεγμονής στις αγγειακές ανωμαλίες διαφαίνεται, ιδιαίτερα εάν εξετάσει κανείς τις επιπτώσεις της λευκόστασης (Chibber και συν., 2007), στην οποία αναφερθήκαμε εκτενώς στο κεφάλαιο για την μικροαγγειοπάθεια. Η αυξανόμενη εισροή λευκοκυττάρων στον αμφιβληστροειδή εξαιτίας της λευκόστασης αυξάνει την παραγωγή και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα λευκοκύτταρα (Adamis και Berman, 2008) και σε συνδυασμό με την έντονη αντιδραστική γλοιώση που παρατηρείται (Mendiola και συν., 2017), επάγουν την εμφάνιση ανωμαλιών στα μικρο-αγγεία του αμφιβληστροειδούς.

Συμπερασματικά η χρόνια φλεγμονώδης απόκριση που παρατηρείται στην ΔΑ είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση των μικρο-αγγειακών ανωμαλιών και την προοδευτική εκφύλιση του νευρικού τμήματος του αμφιβληστροειδούς. Φαίνεται λοιπόν πως η φλεγμονή θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως το χαμένο κομμάτι στο πάζλ της παθογένειας της ΔΑΣ, καθ' ότι φαίνεται να αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ της μικρο-αγγειοπάθειας και της νευροεκφύλισης που εκδηλώνονται στα πρώιμα στάδια της ΔΑΣ.

1.3.2. Προς ένα αναθεωρημένο μοντέλο παθογένειας της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας

Η αυξανόμενη εμφάνιση της ΔΑΣ σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη κάνει επιτακτική την ανάγκη εύρεσης θεραπειών που θα μπορούσαν να ανακόψουν νωρίς την πορεία της ΔΑΣ προς τα εξελιγμένα στάδια της νόσου, όπου κάνουν πλέον την εμφάνισή τους

τα προβλήματα στην όραση. Η επιλογή ωστόσο της καταλληλότερης θεραπευτικής παρέμβασης θα πρέπει να γίνεται με γνώμονα τα παθοφυσιολογικά στοιχεία της νόσου. Μέχρι σήμερα η κλινική διάγνωση της ΔΑΣ βασίζεται σε εμφανή οφθαλμολογικά ευρήματα, όπως τα μικρο-ανευρύσματα, οι αιμορραγίες και τα εξιδρώματα (Simo και συν., 2018). Όπως αναφέραμε όμως και σε προηγούμενο κεφάλαιο είναι συχνό το φαινόμενο δομικά και λειτουργικά ελλείμματα, σύμφωνα με την παρουσία νευροεκφύλισης, να προηγούνται των αγγειακών βλαβών σε μια μεγάλη μερίδα ασθενών (van de Kreeke και συν., 2020). Εντούτοις, αυτό δεν φαίνεται να αποτελεί καθολικό κανόνα, αφού σε κάποιους ασθενείς με διαβήτη τύπου II αναγνωρίζονται μικρο-αγγειακές ανωμαλίες, χωρίς την παρουσία νευρωνικών διαταραχών, γεγονός που σημαίνει ότι η νευροεκφύλιση δεν αποτελεί πάντα το πρωταρχικό παθολογικό γνώρισμα στην ΔΑ (Santos και συν., 2017). Γενικευμένοι ισχυρισμοί, όπως ότι η νευροεκφύλιση ή η αγγειοπάθεια εμφανίζεται πρώτη στην πορεία της νόσου, περιπλέκουν ακόμη περισσότερο την ήδη πολύπλοκη κατάσταση και θα πρέπει να αντικατασταθούν από ένα μοντέλο το οποίο ενοποιεί τις δύο αυτές παραμέτρους στην προσπάθεια εξήγησης της παθογένειας της ΔΑΣ. Ένα τέτοιο μοντέλο παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.7 και έχει προταθεί από τους Simo και συν. (2018).



Εικόνα 1.7. Προτεινόμενο μοντέλο για την παθογένεια της ΔΑΣ. Παρουσιάζονται οι βασικότεροι μηχανισμοί που συνδέουν την νευροεκφύλιση με την μικρο-αγγειοπάθεια. Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται στον διαβήτη, προκαλεί αγγειοσυστολή μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων ET_B και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση πρώιμων αγγειακών ανωμαλιών. Επίσης μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων ET_A μπορεί να επάγει νευροεκφυλιστικές αποκρίσεις. Επιπροσθέτως η αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων του γλουταμινικού, εξαιτίας της δυσλειτουργίας του μεταφορέα του γλουταμινικού GLAST στα γλοιακά κύτταρα, προκαλεί διεγερσιτοξικότητα και εν τέλει τον αποπτωτικό θάνατο των νευρώνων. Η επακόλουθη ανισορροπία που παρατηρείται, με την μειορύθμιση νευροπροστατευτικών παραγόντων, όπως η σωματοστατίνη (SST), η κορτιστατίνη (CST) και οι νευροτροφίνες (NTs) και την αύξηση της έκφρασης παραγόντων όπως ο VEGF και η ερυθροπρωτεΐνη (Epo), συμβάλλουν στην νευροεκφύλιση και στην δυσλειτουργία των γλοιακών κυττάρων, η οποία εμφανίζεται με την αύξηση της αντιδραστικής γλοιώσης. Με την σειρά τους αυτά διαταράσσουν την δομική ακεραιότητα του ΑΑΦ (BRB) και κατ' επέκταση την

φυσιολογική αιματική ροή, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση μικροαγγειακών ανωμαλιών. Λήφθηκε από Simo και συν. (2018).

1.3.3. Υπάρχουσες θεραπείες και μελλοντικές οπτικές για την αντιμετώπιση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας

Οι υπάρχουσες θεραπείες που εφαρμόζονται κλινικά στοχεύουν στο προχωρημένο στάδιο της ΔΑς και περιλαμβάνουν τεχνικές όπως το λέιζερ, οι ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις κορτικοστεροειδών και παραγόντων που αναστέλλουν τον VEGF, καθώς και την χειρουργική αφαίρεση τμημάτων του αμφιβληστροειδούς και του υαλώδους. Η εφαρμογή της θεραπείας με λέιζερ ενδείκνυται στην ΠΔΑ και στο ΟΩΚ και είναι σε θέση να μειώσει την νέο-αγγείωση που παρατηρείται στην ΠΔΑ (Alasil και συν., 2014). Αυτή η προσέγγιση ανακόπτει σε ορισμένες περιπτώσεις την ανάπτυξη περαιτέρω ελλειμμάτων στην όραση των ασθενών, ωστόσο δεν βελτιώνει την οπτική ικανότητα, ενώ φαίνεται πως είναι υπεύθυνη και για την εμφάνιση αρκετών ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως η μερική απώλεια της οπτικής οξύτητας και της περιφερειακής όρασης, η καθυστερημένη προσαρμογή σε αλλαγές της φωτεινότητας και η επιδείνωση του οιδήματος (Tomita και συν., 2021). Η ενδοφθάλμια χορήγηση κορτικοστεροειδών εφαρμόζεται κατά κύριο λόγο για την αντιμετώπιση του ΟΩΚ. Τα κορτικοστεροειδή έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και συμβάλουν στην μείωση των προφλεγμονωδών μορίων και των παραγόντων που συμμετέχουν στην νέο-αγγείωση (Bandello και συν., 2014). Εξαιτίας της περιορισμένης διάρκειας δράσης τους κρίνεται απαραίτητη η επαναλαμβανόμενη χορήγησή τους, μέσω μιας επεμβατικής τεχνικής όπως είναι η ενδοϋαλοειδική χορήγηση. Για την λύση αυτού του προβλήματος έχουν υιοθετηθεί συστήματα εμφυτευμάτων τα οποία απελευθερώνουν βραδέως τα κορτικοστεροειδή στον αμφιβληστροειδή (Gillies και συν., 2014). Ωστόσο τόσο οι ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις, όσο και τα εμφυτεύματα βραδείας απελευθέρωσης εγείρουν σημαντικά ζητήματα ως προς την ασφάλειά τους καθ' ότι η χρήση τους μπορεί να προκαλέσει αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης και τον σχηματισμό καταρράκτη, τα οποία οδηγούν σε επιδείνωση της οπτικής ικανότητας (Simo και Hernandez, 2015). Οι ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις με παράγοντες που αναστέλλουν τον VEGF, αποτελούν την θεραπεία επιλογής σε προχωρημένα στάδια της ΠΔΑ και στόχο έχουν την αναστολή της εκτεταμένης νέο-αγγείωσης (Do και συν., 2013). Παρότι η αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπείας στην διατήρηση και την βελτίωση της οπτικής ικανότητας των ασθενών, πρόκειται για μία ακόμη επεμβατική τεχνική, η οποία εκτός από τις παρενέργειες έχει σχετιστεί και με συστηματικές παρενέργειες εξαιτίας της ικανότητας των αντι-VEGF παραγόντων να περνούν στην αιματική κυκλοφορία (Simo και Hernandez, 2008). Τέλος, όσον αφορά την χειρουργική επέμβαση στο υαλώδες και στον αμφιβληστροειδή, αυτή αποτελεί μία πολύπλοκη και αρκετά δαπανηρή διαδικασία, η οποία εφαρμόζεται ως η έσχατη λύση σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις ΠΔΑς (Newman, 2010). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της δεν είναι εξασφαλισμένη στο 100% των ασθενών και σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθείται από την εμφάνιση μετεγχειρητικών επιπλοκών που δυσχεραίνουν την όραση (Newman, 2010).

Στα πρώιμα στάδια της ΔΑς δεν χρησιμοποιούνται προς το παρόν εξειδικευμένες θεραπείες και οι λιγοστές παρεμβάσεις για την αναχαίτιση της εξέλιξης της νόσου, περιορίζονται στον στενό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης και της αρτηριακής πίεσης του αίματος. Μολοταύτα, φαίνεται πως αυτό δεν είναι ικανό να ανακόψει την εξελικτική πορεία της ΔΑ, καθώς κάποιοι διαβητικοί ασθενείς, με καλό έλεγχο της γλυκόζης και της αρτηριακής τους πίεσης, θα αναπτύξουν εν τέλει ΔΑ (Zhang και συν., 2001). Επιπροσθέτως,

όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο σε μια μερίδα ασθενών παρατηρούνται πρώιμες δομικές και λειτουργικές αλλαγές σχετικές με την παρουσία νευροεκφύλισης, πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων, οι οποίες δεν ανιχνεύονται με τις παραδοσιακές μεθόδους οφθαλμοσκοπικής εξέτασης που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση της ΔΑς και βασίζονται κατά κόρον στην αναγνώριση των μικρο-αγγειακών ανωμαλιών. Αυτό το χρονικό περιθώριο από την ανίχνευση των δομικών και λειτουργικών ελλειμμάτων μέχρι την εμφάνιση των κλινικά αναγνωρίσιμων ανωμαλιών, όσο ακόμα η όραση των ασθενών παραμένει ακέραιη, αποτελεί την ιδανική ευκαιρία για την χρήση νέων θεραπευτικών μέσων που θα μπορούσαν να βάλουν φρένο στην υπό άλλες συνθήκες, απρόσκοπτη εξέλιξη της νόσου προς τα εξελιγμένα στάδια της νόσου, όπου πλήττεται η όραση. Ωστόσο η υιοθέτηση νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς, προϋποθέτει την σωστή ανίχνευση των πρώιμων ανωμαλιών στην δομή και τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς, γεγονός που μπορεί να επιτευχθεί με την διεύρυνση των υπάρχοντων διαγνωστικών τεχνικών με την συμπερίληψη νέων μεθόδων, ώστε εκτός από τις μικρο-αγγειακές ανωμαλίες να ανιχνεύονται και τα ελλείμματα στην νευρωνική λειτουργία (Simo και συν., 2018). Όσον αφορά τις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις ιδανικά αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνουν ουσίες που καταπολεμούν τις περισσότερες, αν όχι όλες τις συνιστώσες της ΔΑΠΣ, όπως είναι η νευροεκφύλιση, η φλεγμονή και οι μικρο-αγγειακές ανωμαλίες. Επιπλέον δεδομένου ότι η θεραπεία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε χρόνια βάση, ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί και στην οδό χορήγησης του φαρμάκου, με την επιλογή ενός φιλικού προς τον ασθενή τρόπου χορήγησης, όπως η τοπική χορήγηση μέσω σταγόνων, προκειμένου να αποφύγουμε τις πιθανές παρενέργειες των επεμβατικών οδών χορήγησης που χρησιμοποιούνται σήμερα για την θεραπεία. Προς αυτή την κατεύθυνση, ήδη υπάρχουν πολλά υποσχόμενα ευρήματα από μία κλινική μελέτη (Φάση II-III), στην οποία η χορήγηση μέσω σταγόνων της οκτρεοτίδης (ανάλογο της σωματοστατίνης) σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, κατάφερε να ανακόψει την πρόοδο της ΔΑς, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των δομικών και λειτουργικών αλλαγών που σχετίζονται με την νευροεκφύλιση και βελτίωσε σημαντικά τις μικρο-αγγειακές διαταραχές (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2012-001200-38/results>).

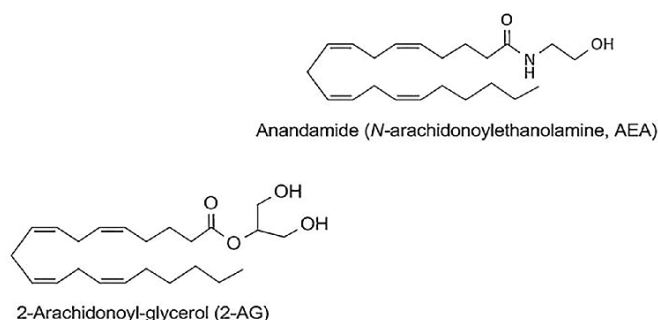
1.4. Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών

Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών (ΕΚΣ) αποτελείται από τους υποδοχείς των κανναβινοειδών, τα ενδογενή κανναβινοειδή και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση και την αποδόμηση των ενδοκανναβινοειδών (Lu και Mackie, 2016). Η απαρχή της ανακάλυψης του ΕΚΣ μπορεί να αναζητηθεί πίσω στην δεκαετία του '60, όταν αναγνωρίστηκε το πρώτο φυτοκανναβινοειδές, η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), ως το βασικό ψυχοδραστικό συστατικό του φυτού της *Cannabis sativa* (Gaoni και Mechoulam, 1964). Ακολούθησε η δημιουργία συνθετικών δομικών αναλόγων της Δ9-THC, τα οποία μέσω από φαρμακολογικές μελέτες βρέθηκαν να έχουν ισχύ και αποτελεσματικότητα, ανάλογη με αυτή της Δ9-THC (Hardman και συν., 1971). Οι ανακαλύψεις αυτές αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την αναγνώριση και κλωνοποίηση του κανναβινοειδικού υποδοχέα 1 (CB1) στον εγκέφαλο, μέσω του οποίου ασκούν τις βιολογικές τους αποκρίσεις τα ενδογενή και τα συνθετικά κανναβινοειδή (Matsuda και συν., 1990). Λίγο αργότερα ακολούθησε και η κλωνοποίηση ενός άλλου υποδοχέα, ευρισκόμενου στην περιφέρεια, του κανναβινοειδικού υποδοχέα 2 (CB2) (Munro και συν., 1993). Την ίδια περίπου εποχή, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πρώτου ενδογενούς κανναβινοειδούς που ονομάστηκε ανανταμίδιο (AEA) (Devane και συν., 1992). Το 1995, η 2-αραχιδιλογλυκερόλη (2-AG) αναγνωρίστηκε ως το δεύτερο κατά σειρά ενδοκανναβινοειδές που προσδένεται και

ενεργοποιεί τον CB1 υποδοχέα (Mechoulam και συν., 1995). Σήμερα, με την διαμεσολάβηση πληθώρας μελετών, γνωρίζουμε ότι το ΕΚΣ παρουσιάζει εκτεταμένη εντόπιση στο ΚΝΣ (Mechoulam και Parker, 2013), συμπεριλαμβανομένου και του αμφιβληστροειδούς (Bouchard και συν., 2016). Στο ΕΚΣ έχει προσδοθεί ο χαρακτηρισμός του νευρορυθμιστή, καθότι συμμετέχει σε μια πληθώρα βιολογικών αποκρίσεων, οι οποίες εκτείνονται από την ρύθμιση της νευρωνικής δραστηριότητας (Mechoulam και Parker, 2013) μέχρι την συμμετοχή σε κρίσιμες λειτουργίες, όπως η νευροεκφύλιση (Vasincu και συν., 2022) και η φλεγμονή (Downer, 2022).

1.4.1. Ενδογενή και συνθετικά κανναβινοειδή

Το ΑΕΑ και η 2-AG, οι δύο σημαντικότεροι εκπρόσωποι των ενδοκανναβινοειδών ανήκουν στην οικογένεια των εικοσανοειδών, η οποία απαρτίζεται από ενώσεις που είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος. Είναι βιοδραστικά λιπίδια και συντίθενται χρησιμοποιώντας ως «πρώτη ύλη», πρόδρομα φωσφολιπίδια από την κυτταρική μεμβράνη (Piomelli, 2003). Τόσο η ΑΕΑ, όσο και η 2-AG επιτελούν τις δράσεις τους μέσω της ενεργοποίησης των CB1 και CB2 υποδοχών. Το ΑΕΑ δρα ως μερικός αγωνιστής στον CB1, παρουσιάζοντας υψηλή συγγένεια δέσμευσης και ουσιαστικά παρουσιάζεται ανενεργή για τον CB2 υποδοχέα, ενώ η 2-AG δρα ως πλήρης αγωνιστής και στους δύο κανναβινοειδικούς υποδοχείς, με μικρότερη όμως συγγένεια δέσμευσης από την ΑΕΑ (Pertwee και συν., 2010).

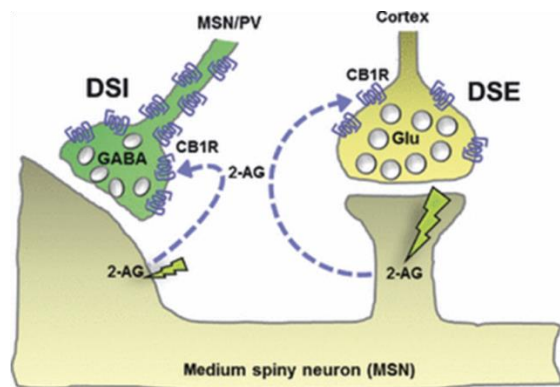


Εικόνα 1.8. Χημική δομή του ΑΕΑ και της 2-AG, των δύο βασικότερων ενδογενών κανναβινοειδών.

Τις βιολογικές ιδιότητες του ΑΕΑ και της 2-AG, μιμούνται και διάφοροι συνθετικοί κανναβινοειδικοί αγωνιστές που έχουν αναπτυχθεί με το πέρασμα των χρόνων. Με βάση την χημική δομή τους τα συνθετικά κανναβινοειδή χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τα κλασσικά, τα μη κλασσικά κανναβινοειδή και τις αμινοαλκυλινδόλες (Howlett και συν., 2002). Στα κλασσικά περιλαμβάνονται κανναβινοειδή με υψηλή δομική ομοιότητα με την Δ9-THC, όπως το HU-210, ενώ η ομάδα των μη κλασσικών περιλαμβάνει δικυκλικά και τρικυκλικά ανάλογα της Δ9-THC, όπως το CP55,940, η ραδιενεργή μορφή του οποίου έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη σε μελέτες δέσμευσης του CB1 υποδοχέα (Howlett και συν., 2002). Τέλος οι αμινοαλκυλινδόλες, με σημαντικότερο εκπρόσωπο το κανναβινοειδές WIN55,212-2, αποτελούν την τρίτη μεγάλη κατηγορία κανναβινοειδών, τα οποία δημιουργήθηκαν ως πιο επιλεκτικοί αγωνιστές του CB2 υποδοχέα (Howlett και συν., 2002).

1.4.2. Τα ενδογενή κανναβινοειδή ως ανάδρομοι αγγελιοφόροι και ρυθμιστές της συναπτικής δραστηριότητας

Η παρουσία του CB1 υποδοχέα στις συναπτικές απολήξεις των νευρώνων οδήγησε στην υπόθεση ότι τα κανναβινοειδή εμπλέκονται κατά κάποιον τρόπο στην συναπτική απόκριση των νευρώνων. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες υπέδειξαν ότι η εκπόλωση μετασυναπτικών νευρώνων οδήγησε σε μία μείωση της απελευθέρωσης GABA από τους προσυναπτικούς νευρώνες στον ιππόκαμπο. Οι προσυναπτικά ευρισκόμενοι CB1 υποδοχείς κατέχουν κομβικό ρόλο σε αυτήν την απόκριση, η οποία ονομάστηκε «επαγόμενη από εκπόλωση καταστολή της αναστολής» (**Depolarization-induced Suppression of Inhibition, DSI**) (Wilson και Nicoll, 2001). Κατά ανάλογο τρόπο, την ίδια περίπου περίοδο, οι Kreitzer και Regehr (2001) έδειξαν ότι το ΕΚΣ εμπλέκεται και στην παρόμοιας φύσης απόκριση, την «επαγόμενη από εκπόλωση καταστολή της διέγερσης» (**Depolarization-induced Suppression of Excitation, DSE**) σε διεγερτικές συνάψεις των κυττάρων Purkinje στην παρεγκεφαλίδα. Σήμερα πλέον, γνωρίζουμε καλά ότι τόσο η DSI όσο και η DSE, αποτελούν δύο από τους βασικότερους τύπους συναπτικής πλαστικότητας που είναι σε θέση να διαμεσολαβεί το ΕΚΣ, μέσω της ανάδρομης διαβίβασης που επιτελεί (βλ. Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της συναπτικής δραστηριότητας από το ενδοκανναβινοειδές 2-AG. Η εκπόλωση του μετασυναπτικού κυττάρου, μέσω μιας αλληλουχίας σηματοδοτικών γεγονότων διεγείρει την σύνθεση της 2-AG. Η 2-AG απελευθερώνεται από το μετασυναπτικό κύτταρο και δρώντας ανάδρομα προσδένεται και ενεργοποιεί CB1 υποδοχείς, ευρισκόμενους στις προσυναπτικές απολήξεις. Η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων μειώνει την απελευθέρωση GABA από τον προσυναπτικό νευρώνα στις GABAεργικές συνάψεις προκαλώντας DSI, ενώ δύναται να μειώσει και την προσυναπτική απελευθέρωση γλουταμινικού (Glu), επάγοντας DSE. Λήφθηκε από Savinainen και συν. (2012).

Τι ακριβώς σημαίνουν ωστόσο ο χαρακτηρισμός του «ανάδρομου αγγελιοφόρου» που προσδίδεται συχνά στα ενδογενή κανναβινοειδή; Τα ενδογενή κανναβινοειδή σε αντίθεση με τους κλασσικούς νευροδιαβιβαστές δεν αποθηκεύονται σε συναπτικά κυστίδια, αντιθέτως συντίθενται “on demand”, δηλαδή όταν υπάρχει ανάγκη για την χρήση τους, από πρόδρομα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Martinez Ramirez και συν., 2023). Η εκπόλωση του μετασυναπτικού νευρώνα, η αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου ασβεστίου ή η ενεργοποίηση GPCRs, συζευγμένων με Gq πρωτεΐνες, αποτελούν όλα ερεθίσματα που διεγείρουν την βιοσύνθεση των ενδογενών κανναβινοειδών στο μετασυναπτικό κύτταρο (Kano και συν., 2005). Μετά την σύνθεσή τους τα ενδοκανναβινοειδή απελευθερώνονται από το μετασυναπτικό κύτταρο και δρώντας ανάδρομα προσδένονται στους CB1 υποδοχείς που βρίσκονται στις τελικές απολήξεις του προσυναπτικού κυττάρου, μειώνοντας την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή από τον προσυναπτικό νευρώνα και προκαλώντας είτε DSI

αν μιλάμε για ανασταλτικό, είτε DSE αν πρόκειται για διεγερτικό διαβιβαστή (Freund και συν., 2003).

Συνοψίζοντας, γίνεται πλέον σαφές ότι το ΕΚΣ συμμετέχει ενεργά σε βραχυπρόθεσμες αλλαγές της συναπτικής δραστηριότητας, επάγοντας DSI ή DSE στις συνάψεις μεταξύ των νευρώνων. Η εμπλοκή του ΕΚΣ στην συναπτική πλαστικότητα, φαίνεται και από το γεγονός ότι διαμεσολαβεί μακροπρόθεσμες αλλαγές της συναπτικής απόκρισης, όπως είναι η «μακροπρόθεσμη καταστολή» (**Long Term Depression, LTD**), η οποία προκαλείται από επαναλαμβανόμενο χαμηλής συχνότητας ερεθισμό των διεγερτικών συνάψεων (Robbe και συν., 2002).

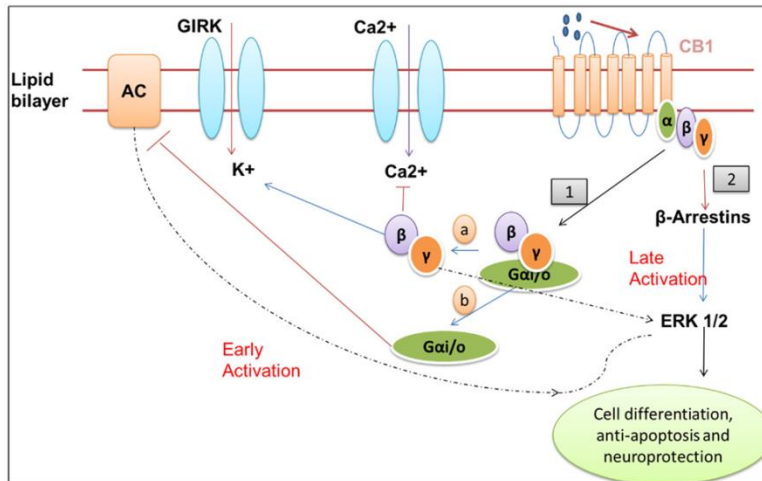
1.4.3. Υποδοχείς κανναβινοειδών και σηματοδότηση

Οι βιολογικές δράσεις των ενδοκανναβινοειδών, των φυτοκανναβινοειδών και των συνθετικών κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται ως επί το πλείστον μέσω δύο κανναβινοειδικών υποδοχέων, τους CB1 και τους CB2. Οι δύο αυτοί υποδοχείς ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs, G-protein-coupled receptors), οι οποίοι αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές αέλικες και ενεργοποιούν ευαίσθητα στην τοξίνη του κοκίτη, ετεροτριμερή συμπλέγματα ανασταλτικών G πρωτεϊνών, υπεύθυνων για την επακόλουθη ενεργοποίηση ποικίλων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Latorraca και συν., 2017). Οι CB1 υποδοχείς παρουσιάζουν ευρεία έκφραση στο ΚΝΣ, όπου εντοπίζονται κυρίως στους άξονες και στις συναπτικές απολήξεις των νευρώνων (Hu και Mackie, 2015). Παράλληλα οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ), αλλά και σε μια πληθώρα οργάνων όπως το ήπαρ, το δέρμα, οι μύες κ.ά., όπου διαμεσολαβούν σημαντικές λειτουργίες (Busquets Garcia και συν., 2016). Από την άλλη πλευρά οι CB2 υποδοχείς εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Galiegue και συν., 1995) και γλοιακά κύτταρα, όπως τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία (Stella, 2010), όπου συμμετέχουν στην ρύθμιση των φλεγμονής (Tanaka και συν., 2020), ενώ πειραματικά ευρήματα έχουν αναδείξει την παρουσία τους σε νευρώνες στο ΚΝΣ (Onaini και συν., 2006).

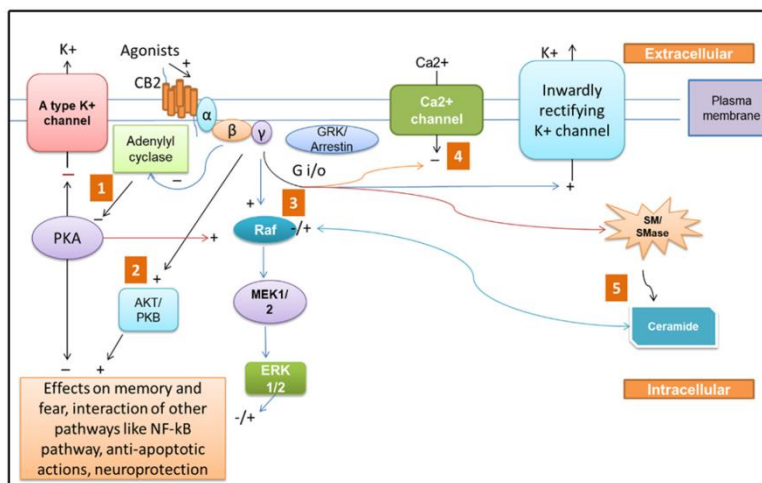
Οι προσδέτες των κανναβινοειδικών υποδοχέων, περιλαμβάνουν τους ορθοστερικούς αγωνιστές και μερικούς αγωνιστές που προσδέονται στην ορθοστερική θέση δέσμευσης του υποδοχέα, προκαλώντας αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωσή του και εκκινώντας την σηματοδοτική απόκριση, τους ανταγωνιστές που απλά καταλαμβάνουν την ορθοστερική θέση δέσμευσης των αγωνιστών και τους αντίστροφους αγωνιστές που ενισχύουν την ανενεργή κατάσταση των υποδοχέων μειώνοντας την αυθόρμητη ενεργοποίησή τους (constitutive activity) (Martinez Ramirez και συν., 2023). Πέρα από τα προαναφερθέντα, μία άλλη κατηγορία προσδετών είναι οι αλλοστερικοί προσδέτες, οι οποίοι προσδεόμενοι σε διαφορετική θέση δέσμευσης από τους ορθοστερικούς, μπορούν να επηρεάσουν την πρόσδεση και την σηματοδοτική ικανότητα των ορθοστερικών αγωνιστών. Οι αλλοστερικοί ρυθμιστές μπορεί να είναι είτε αρνητικοί (**Negative Allosteric Modulators, NAM**), οι οποίοι αναστέλουν την σηματοδότηση των ορθοστερικών, είτε θετικοί (**Positive Allosteric Modulators, PAM**), οι οποίοι ενισχύουν την σηματοδότηση των ορθοστερικών (Slosky και συν., 2021). Όπως και οι υπόλοιποι GPCRs, οι κανναβινοειδικοί υποδοχείς επιδεικνύουν λειτουργική εκλεκτικότητα, κατά την οποία διαφορετικοί αγωνιστές προκαλούν διαφορετικές αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση των υποδοχέων, πυροδοτώντας σηματοδοτικές αποκρίσεις μέσω διαφορετικών μονοπατιών (biased agonism) που μπορεί να έχουν διαφορετικές

βιολογικές δράσεις (Atwood και συν., 2012; Al-Zoubi και συν., 2019). Το σηματοδοτικό ρεπερτόριο των κανναβινοειδικών υποδοχέων μπορεί επίσης να επεκταθεί και εξαιτίας της ικανότητάς τους να δημιουργούν ετερομερή συμπλέγματα μεταξύ τους (Callén και συν., 2012) ή με άλλους GPCRs (Rozenfeld και συν., 2012).

Οι CB1 και οι CB2 υποδοχείς διαμεσολαβούν μία πληθώρα ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών (βλ. Εικόνα 1.10 και 1.11). Το πρώτο μονοπάτι που μελετήθηκε, αφορά την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα και περιλαμβάνει την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης από την ανασταλτική G_i πρωτεΐνη και την επακόλουθη μείωση της παραγωγής της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP, cyclic Adenosine Monophosphate), η οποία δρα ως «δεύτερος αγγελιοφόρος» για τον έλεγχο σημαντικών κυτταρικών αποκρίσεων (Bidaut-Russell και Hewlett, 1991). Ωστόσο, υπό ορισμένες προϋποθέσεις οι συζευγμένοι με διεγερτικές G_s πρωτεΐνες, CB1 υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιήσουν την αδενυλική κυκλάση, αυξάνοντας την παραγωγή του cAMP (Calandra και συν., 1999). Οι CB1 υποδοχείς έχουν συνδεθεί και με ασβεστιο-εξαρτώμενες αποκρίσεις, όπως η δραστηριότητα της φωσφολιπάσης A και C (Felder και συν., 1995). Επιπλέον η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων οδηγεί στην φωσφορυλίωση και μετέπειτα ενεργοποίηση της mitogen-activated protein kinase p42/ p44 (p42/ p44 MAPK) και της Jun N-terminal kinase (JNK), οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές αποκρίσεις όπως η επιβίωση, ο θάνατος ή ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου (Howlett και συν., 2010). Τα κανναβινοειδή συμμετέχουν όπως ήδη αναφέραμε, στην ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας, καθώς μέσω των CB1 υποδοχέων είναι σε θέση να μειώνουν την προσυναπτική απελευθέρωση γλουταμινικού και GABA (Freund και συν., 2003). Πέραν τούτου, ο CB1 υποδοχέας συμμετέχει ενεργά στην ρύθμιση της διεγερσιμότητας των νευρώνων, ενεργοποιώντας διαύλους ανορθωτές καλίου (GIRKs) (Bacci και συν., 2004) και αναστέλλοντας την ενεργοποίηση τασεοελεγχόμενων διαύλων Ca^{2+} τύπου L, N και P/Q (Bosier και συν., 2010). Οι CB2 υποδοχείς, ένεκα και της εντόπισής τους σε γλοιακά κύτταρα ως επί το πλείστον, σχετίζονται κυρίως με νευρο-ανοσολογικές αντιδράσεις και κατέχουν την πρωτοκαθεδρία σε αποκρίσεις που σχετίζονται με την φλεγμονή (Shahbazi και συν., 2020). Παρ' όλα αυτά, τα ευρήματα υποδεικνύουν πως οι CB2 υποδοχείς μοιράζονται αρκετές παρόμοιες φαρμακολογικές και βιοχημικές ιδιότητες με τους CB1, ενεργοποιώντας κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό της αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης (Felder και συν., 1995). Τέλος οι CB1 και οι CB2 υποδοχείς μετά την ενεργοποίησή τους μπορεί να επιστρατεύσουν την β-αρρεστίνη, οι διαφορετικοί υπότυποι της οποίας μπορούν είτε να συμμετέχουν στην σηματοδοτική απόκριση των δύο υποδοχέων (Ibsen και συν., 2019) ή να προκαλέσουν την απευαισθητοποίηση και ενδοκυττάρωσή τους (Chen και συν., 2014).

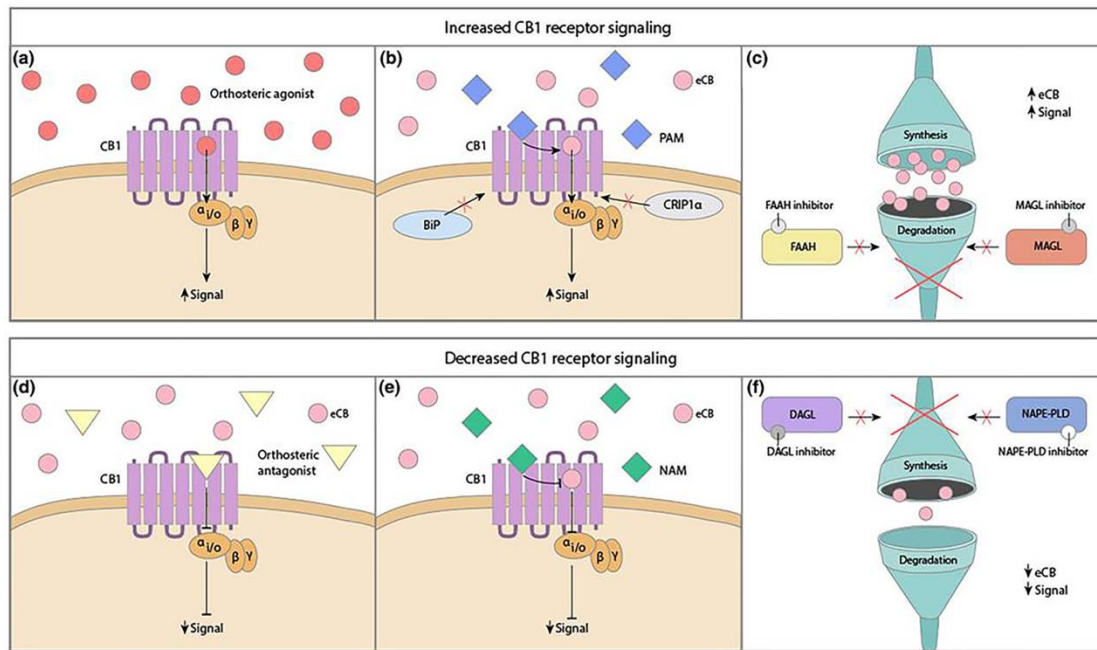


Εικόνα 1.10. Η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα ενεργοποιεί ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Μέσω της Ga υπομονάδας αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση και ενεργοποιεί την ERK1/2. Μέσω της Gβγ υπομονάδας αναστέλλει διαύλους Ca^{2+} και ενεργοποιεί διαύλους ανορθωτές καλίου (GIRKs). Εναλλακτικά, μπορεί να ενεργοποιήσει την ERK1/2 μέσω της β-αρρεστίνης 2. Η ERK1/2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών διεργασιών, όπως η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος. Λήφθηκε από Magham και συν. (2021).



Εικόνα 1.11. Σηματοδότηση μέσω της ενεργοποίησης των CB2 υποδοχέων. Η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης μειώνει την ενεργοποίηση της PKA επηρεάζοντας την γονιδιακή έκφραση. Ο CB2 μπορεί επίσης να αναστείλει διαύλους Ca^{2+} και να διεγείρει την ενεργοποίηση διαύλων ανορθωτών καλίου. Ακόμη μπορεί να διεγείρει την Akt/ PKB, καθώς και το μονοπάτι της MAPK(MEK1/2), επηρεάζοντας έτσι μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την φλεγμονή και τον κυτταρικό θάνατο. Λήφθηκε από Magham και συν. (2021).

Από τα παραπάνω εξάγεται αβίαστα το συμπέρασμα ότι οι υποδοχείς των κανναβινοειδών συμμετέχουν στην ρύθμιση μιας πληθώρας ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Ο έλεγχος της σηματοδότησης δια μέσω των CB1 και CB2 υποδοχέων (βλ. Εικόνα 1.12) και ο επακόλουθος έμμεσος έλεγχος των κυτταρικών λειτουργιών, προφέρει αρκετές ευκαιρίες για την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών προσεγγίσεων που θα αποδεικνύονταν ιδιαίτερα χρήσιμες για την διαχείριση ποικίλων παθολογικών καταστάσεων.



Εικόνα 1.12. Φαρμακολογικές τεχνικές για την αύξηση (a, b, c) ή την μείωση της σηματοδότησης μέσω των CB1 υποδοχέων (d, e, f). **(a)** Οι ορθοστερικοί αγωνιστές προσδεόμενοι στον CB1 υποδοχέα πυροδοτούν την σηματοδότηση μέσω αυτού. **(b)** Οι θετικοί αλλοστερικοί ρυθμιστές (PAMs) προσδέονται σε φιαφορετική θέση δέσμευσης από τους ορθοστερικούς και ενισχύουν την δέσμευση και την σηματοδοτική ικανότητα των ενδοκανναβινοειδών και των ορθοστερικών αγωνιστών. Επίσης η αναστολή των πρωτεϊνών CRIP1a και BIP, που παρεμποδίζουν την σηματοδότηση των CB1 υποδοχέων, μπορεί να αυξήσει την σηματοδοτική τους απόκριση. **(c)** Αναστολείς των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών (MAGL και FAAH), αυξάνουν τα επίπεδα των ενδογενών κανναβινοειδών (eCB) και παρατείνουν την σηματοδοτική τους απόκριση μέσω του CB1 υποδοχέα. **(d)** Οι ορθοστερικοί ανταγωνιστές καταλαμβάνουν την θέση δέσμευσης των ορθοστερικών αγωνιστών και των ενδοκανναβινοειδών, μη επιτρέποντας την σηματοδότηση μέσω του CB1 υποδοχέα. **(e)** Οι αρνητικοί αλλοστερικοί ρυθμιστές (NAMs), προσδέονται σε αλλοστερικές θέσεις δέσμευσης και αναστέλουν την σηματοδότηση μέσω του CB1 υποδοχέα. **(f)** Οι αναστολείς των βιοσυνθετικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών (NAPE-PLD και DAGL), μειώνουν την διαθεσιμότητα των ενδογενών κανναβινοειδών που μπορούν να σηματοδοτήσουν μέσω του CB1 υποδοχέα. Λήφθηκε από Martinez Ramirez και συν. (2023).

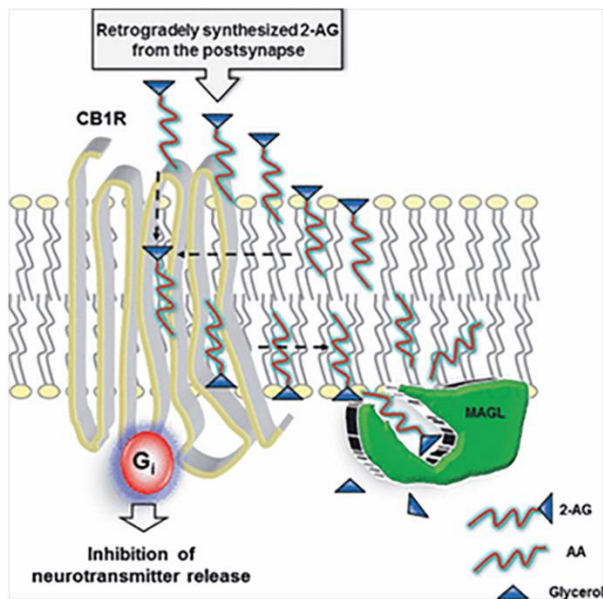
1.4.4. Ένζυμα βιοσύνθεσης και αποδόμησης των ενδογενών κανναβινοειδών

Τα ενδογενή κανναβινοειδή σε αντίθεση με τους υπόλοιπους κλασσικούς νευροδιαβιβαστές, δεν αποθηκεύονται σε συναπτικά κυστίδια, αλλά αντιθέτως συντίθενται “on demand” από πρόδρομα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (Martinez Ramirez και συν., 2023), με την διαμεσολάβηση συγκεκριμένων βιοσυνθετικών ενζύμων που ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των λιπασών (Lu και Mackie, 2021). Η “on demand” σύνθεση της 2-AG και του AEA πυροδοτείται από συγκεκριμένα σήματα, όπως για παράδειγμα η αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} κατά την εκπόλωση του κυττάρου ή η ενεργοποίηση G_q συζευγμένων GPCRs, όπως είναι οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού (mGluRs) και οι μουσκαρινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Kano και συν., 2005). Η κυριότερη βιοσυνθετική οδός της 2-AG, περιλαμβάνει μία διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά, με την διαμεσολάβηση της φωσφολιπάσης C (PLC), απελευθερώνεται διακυλογλυκερόλη (DAG) από το πρόδρομο φωσφολιπίδιο, διφωσφορική φωσφοτιδυλοϊνσιτογόλη (PIP_2). Ακολούθως η DAG, υδrolύεται από το ένζυμο λιπάση της διακυλογλυκερόλης (DAGL) και προκύπτει η 2-AG (Baggelaar και

συν., 2018). Συνολικά έχουν αναγνωριστεί δύο βασικές ισομορφές της DAGL, η DAGL α που εκφράζεται κυρίως σε νευρώνες στο ΚΝΣ και η DAGL β που εντοπίζεται στην περιφέρεια (Bisogno και συν., 2003). Η μείωση της έκφρασης της DAGL α μέσω της τεχνικής RNA interference (RNAi), αναστέλλει την επαγόμενη από τον mGluR σύνθεση της 2-AG (Jung και συν., 2007).

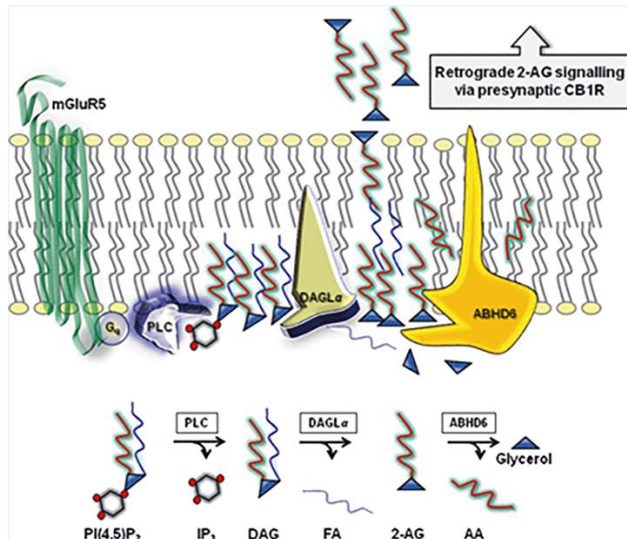
Ποικίλα βιοσυνθετικά μονοπάτια έχουν αναγνωριστεί και για την βιοσύνθεση του ΑΕΑ. Το πιο γνωστό από αυτά, περιλαμβάνει την μετατροπή του πρόδρομου φωσφολιπίδιου, φωσφατιδυλοεθανολαμίνη από την N-ακετυλοτρανσφεράση (NAT) στην N-αραχιδονοϋλ-φωσφατιδυλοεθανολαμίνη (NAPE). Ύστερα ακολουθεί η υδρόλυση της NAPE από την φωσφολιπάση D (PLD) και από αυτήν την αντίδραση προκύπτει ΑΕΑ και φωσφατιδικό οξύ (Rahman και συν., 2014). Για την “on demand” βιοσύνθεση του ΑΕΑ έχει προταθεί και ένα άλλο βιοσυνθετικό μονοπάτι, το οποίο περιλαμβάνει την υδρόλυση της NAPE από την φωσφολιπάση C (PLC) και την δημιουργία φωσφο-ΑΕΑ, η οποία αποφωσφορυλιώνεται από φωσφατάσες και μετατρέπεται σε ΑΕΑ (Simon και Gravatt, 2010). Η αναστολή της NAPE-PLD σε μύες μειώνει σημαντικά τα επίπεδα του ΑΕΑ στον εγκέφαλο, ενώ φαίνεται να παράγει επιδράσεις παρόμοιες με αυτές που προκύπτουν από τον ανταγωνισμό του CB1 υποδοχέα (Mock και συν., 2020).

Η διάρκεια δράσης των ενδοκανναβινοειδών ελέγχεται με την διαμεσολάβηση διαφόρων καταβολικών ενζύμων, υπεύθυνων για την ενζυματική απενεργοποίηση της 2-AG και του ΑΕΑ. Για τον καταβολισμό του ΑΕΑ υπεύθυνη είναι η αμιδουδρολάση των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH), η οποία μεταβολίζει το ΑΕΑ σε αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη (Hillard και συν., 1995). Η FAAH είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, που εντοπίζεται ωστόσο σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες οργανιδίων και όχι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Hillard και συν., 1995). Ενδιαφέρον παρουσιάζει στο σημείο αυτό το γεγονός ότι ειδικά για το ΑΕΑ, εκτός από την απλή διάχυσή της δια μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, πειραματικά ευρήματα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης ενός πρωτεϊνικού μεταφορέα, υπεύθυνου για την επαναπρόσληψη του ΑΕΑ από τον εξωκυττάριο χώρο (Glaser και συν., 2005). Όσον αφορά την 2-AG, το υψηλότερο ποσοστό του μεταβολισμού της επιτελείται από την λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL), η οποία διασπά την 2-AG σε αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη (Dinh και συν., 2002). Η MAGL είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος και παρουσιάζει προσυναπτική εντόπιση στις συναπτικές απολήξεις του άξονα, όπου βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τον CB1 υποδοχέα (Kano και συν., 2009). Ως εκ τούτου, παρουσιάζει την ιδανική εντόπιση που της επιτρέπει να απενεργοποιεί την 2-AG στο σημείο δράσης της και κατ' επέκταση να τερματίζει την σηματοδότηση μέσω του CB1 υποδοχέα. Αναλυτικότερα η απενεργοποίηση της 2-AG ξεκινά με την αποσύνδεση της από τον CB1 υποδοχέα και την διάχυσή της προς την MAGL, μέσω ενός υδρόφοβου τούνελ που προσανατολίζει την πολική κεφαλή της γλυκερόλης της προς τον πυθμένα, εκεί που βρίσκεται και η καταλυτική υπομονάδα της MAGL (Bertrand και συν., 2010) (βλ. Εικόνα 1.13).



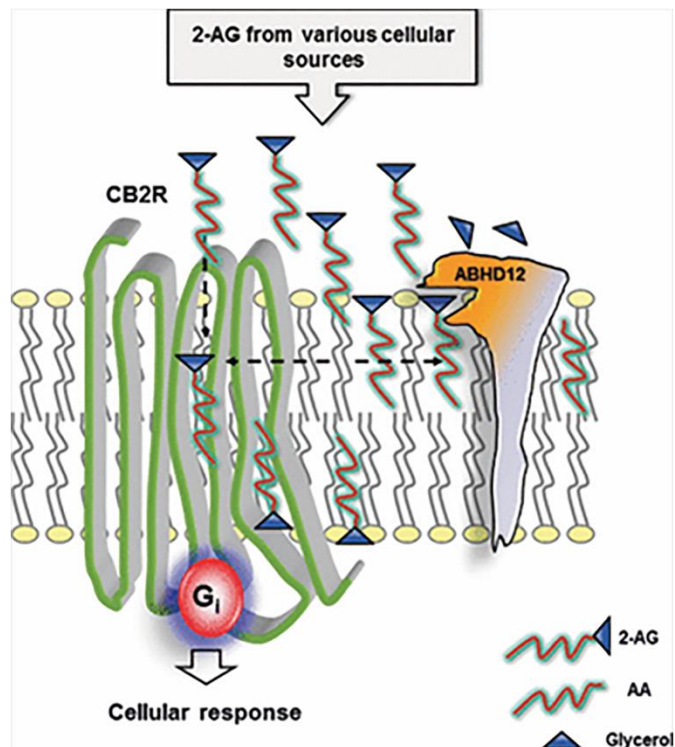
Εικόνα 1.13. Σχηματική αναπαράσταση της ενζυματικής απενεργοποίησης της 2-AG από την MAGL. Η MAGL είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος, που εντοπίζεται προσυναπτικά μαζί με τους CB1 υποδοχείς. Η εντόπιση της αυτή, δίνει την δυνατότητα στην MAGL να ελέγχει τα επίπεδα της 2-AG στο σημείο που αυτή επιτελεί της δράσεις της. Μετά την αποσύνδεσή της από τον CB1 υποδοχέα η 2-AG διαχέεται προς την MAGL, μέσω ενός υδρόφοβου τούνελ που προσανατολίζει την πολική κεφαλή της γλυκερόλης της προς τον πυθμένα, εκεί που βρίσκεται και η καταλυτική υπομονάδα της MAGL. Η 2-AG τερματίζει την δράση της 2-AG διασπώντας τη σε αραχιδονικό οξύ (AA) και γλυκερόλη. Λήφθηκε από Savinainen και συν. (2012).

Καθώς η MAGL φαίνεται να είναι υπεύθυνη για το 85% περίπου του μεταβολισμού της 2-AG, το εναπομείναν 15% πραγματοποιείται από τις υδρολάσες ABHD6 και ABHD12, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των α/β domain containing hydrolases. Η ABHD6 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται μετασυναπτικά, σε γλουταμινεργικούς και GABAεργικούς νευρώνες και παρατάσσεται σε αντιδιαμετρικά αντίθετες θέσεις σε σχέση με τους προσυναπτικά ευρισκόμενους CB1 υποδοχείς (Marrs και συν., 2010). Η μετασυναπτική της εντόπιση και το γεγονός ότι η καταλυτική της υπομονάδα βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου, καθιστά ικανή την ABHD6 να ελέγχει τα επίπεδα της 2-AG στο σημείο σύνθεσής (Blankman και συν., 2007) (βλ. Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14. Σχηματική αναπαράσταση της ενζυματικής απενεργοποίησης της 2-AG από την υδρολάση ABHD6. Η ABHD6 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη και η στρατηγική της εντόπιση σε μετασυναπτικό επίπεδο, πλησίον του βιοσυνθετικού ενζύμου DAGLα της επιτρέπει να ελέγχει τα επίπεδα της 2-AG στο σημείο σύνθεσής της. Το μονοπάτι PLC-DAGLα παράγει 2-AG από το πρόδρομο φωσφολιπίδιο PIP₂ της μεμβράνης και ακολούθως η ABHD6, η καταλυτική υπομονάδα της οποίας είναι στραμμένη προς το κυτταρόπλασμα, μεταβολίζει την 2-AG σε αραχιδονικό οξύ (AA) και γλυκερόλη. Λήφθηκε από Savinainen και συν. (2012).

Η ABHD12 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με την καταλυτική της υπομονάδα στραμμένη προς τον εξωκυττάριο χώρο (Blankman και συν., 2007). Παρουσιάζει ευρεία έκφραση στο ΚΝΣ, όπου συναντάται κατά κύριο λόγο σε μικρογλοιακά κύτταρα, γεγονός που της επιτρέπει να ελέγχει τις ανοσολογικές αποκρίσεις αυτών των κυττάρων, σε συνεργασία με τον CB2 υποδοχέα στα μικρογλοιακά κύτταρα (Fiskerstrand και συν., 2010). Η ABHD12 συμμετέχει σε κρίσιμες φυσιολογικές αποκρίσεις στο ΚΝΣ, καθώς μεταλλάξεις που αναστέλλουν την δραστηριότητα της καταλυτικής της υπομονάδας, προκαλούν ένα νευροεκφυλιστικό σύνδρομο με την ονομασία **PHARC**, που αποτελεί ακρωνύμιο των βασικών συμπτωμάτων της νόσου (**P**olyneuropathy, **H**earing loss, **A**taxia, **R**etinitis pigmentosa, **C**ataract) (Fiskerstrand και συν., 2010) (βλ. Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15. Σχηματική αναπαράσταση της ενζυματικής απενεργοποίησης της 2-AG από την υδρολάση ABHD12. Η ABHD12 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με την καταλυτική της υπομονάδα, προσανατολισμένη προς τον εξωκυττάριο χώρο. Παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στα μικρογλοιακά κύτταρα και ο ρόλος της στην ουσία είναι ο έλεγχος της σηματοδότησης της 2-AG μέσω του CB2 υποδοχέα. Μεταλλάξεις της ABHD12 που περιορίζουν την λειτουργία της σχετίζονται με την εμφάνιση του νευροεκφυλιστικού συνδρόμου **PHARC** (**P**olyneuropathy, **H**earing loss, **A**taxia, **R**etinitis pigmentosa, **C**ataract). Λήφθηκε από Savinainen και συν. (2012).

Συνοψίζοντας, είδαμε πως τα δύο ενδογενή κανναβινοειδή, AEA και 2-AG συντίθενται με την διαμεσολάβηση ενζύμων από πρόδρομα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, ενώ και για τον τερματισμό της δράσης τους φροντίζουν ένζυμα. Η χρήση παραγόντων που αναστέλλουν ή ενεργοποιούν τα ένζυμα βιοσύνθεσης ή αποδόμησής τους, αποτελεί μία καλή στρατηγική για την ρύθμιση των επιπέδων των ενδογενών κανναβινοειδών και κατ' επέκταση της σηματοδοτικής ικανότητας του ΕΚΣ. Η στρατηγική αυτή ενέχει και θεραπευτικές προεκτάσεις και θα μπορούσε να αντικαταστήσει επιτυχώς την χορήγηση άμεσων αγωνιστών για τους κανναβινοειδικούς υποδοχείς.

1.5. Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή

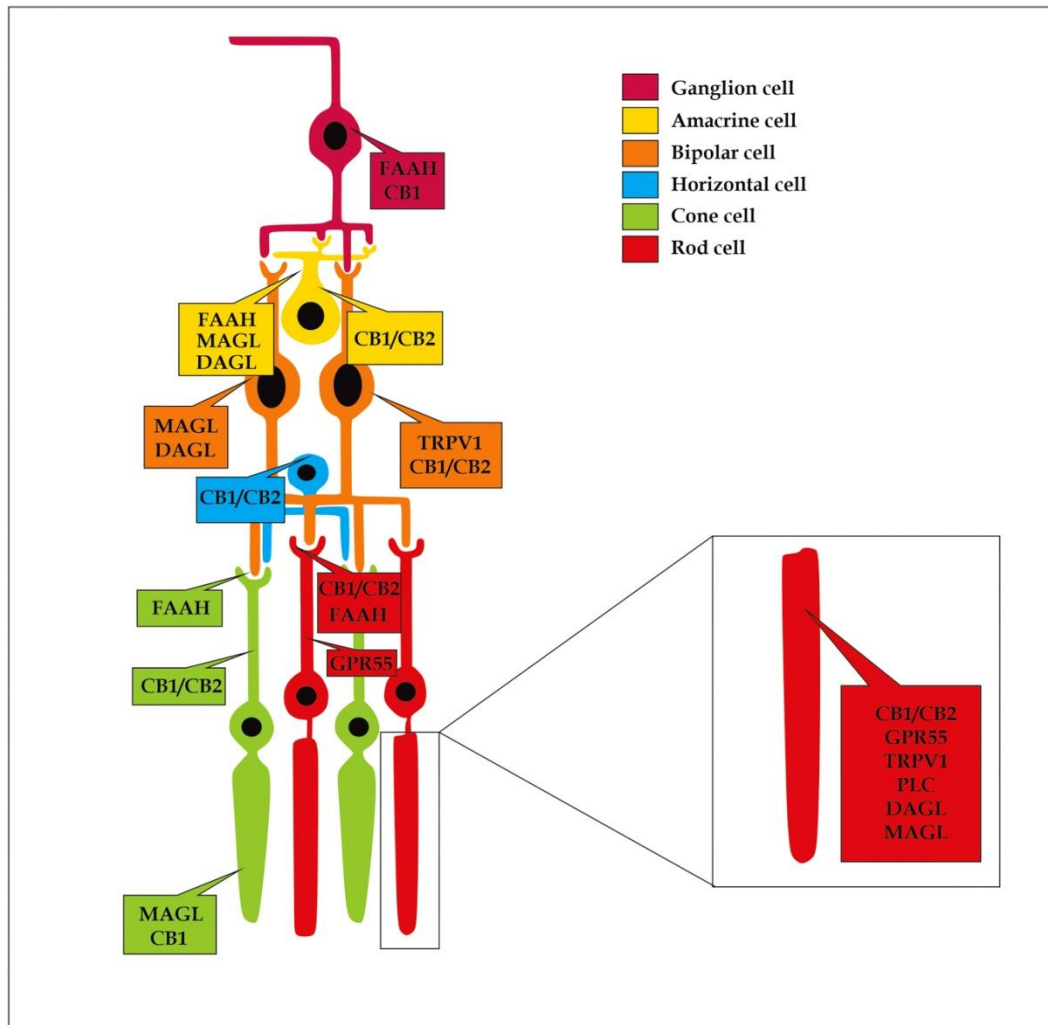
Ο αμφιβληστροειδής είναι εξοπλισμένος με ένα πλήρως λειτουργικό ΕΚΣ. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία του CB1 υποδοχέα τον αμφιβληστροειδή ποικίλων σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων και των επίμυων, όπου εντοπίζεται κυρίως στις δύο συναπτικές στιβάδες, OPL και IPL, στα βραχύνια κύτταρα, καθώς και στα γαγγλιακά κύτταρα και τους άξονές τους (Straiker και συν., 1999). Μικρότερα επίπεδα έκφρασης του CB1 έχουν εντοπιστεί στα εξωτερικά και τα εσωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων (Straiker και συν., 1999). Επιπλέον στον αμφιβληστροειδή των επίμυων η ανοσοδραστικότητα του CB1 συναντάται επίσης στα ραβδιοφόρα δίπολα κύτταρα, στα οριζόντια και στα βραχύνια κύτταρα (Yazulla και συν., 1999). Κατά παρόμοιο τρόπο στον

αμφιβληστροειδή πρωτευόντων, ο CB1 εκφράζεται από τους φωτοϋποδοχείς, τις δύο συναπτικές στιβάδες (OPL και IPL), από κύτταρα στην INL και τέλος από τα γαγγλιακά κύτταρα (Bouskila και συν., 2012). Συγκριτικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι η έκφραση του CB1 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή είναι καλά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Bouskila και συν., 2016). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε μεταθανάτιους ιστούς ανθρώπων, έχουν αναδείξει ισχυρή παρουσία του CB1 υποδοχέα στα εξωτερικά τμήματα των φωτούποδοχέων και μέτρια επίπεδα έκφρασης στις στιβάδες OPL, INL, IPL και GCL (Straiker και συν., 1999; Porcella και συν., 2000), ενώ η παρουσία τους επιβεβαιώνεται και στα κύτταρα του RPE (Wei και συν., 2009).

Αρχικά υπήρξε αδυναμία εντοπισμού του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή (Buckley και συν., 1997). Μεταγενέστερες μελέτες, με την χρήση της *in situ* υβριδοποίησης ωστόσο υπέδειξαν την παρουσία του mRNA του CB2 στα εσωτερικά τμήματα των φωτούποδοχέων, την INL και την GCL στον αμφιβληστροειδή επίμυων, ενώ η χρήση real time-PCR επιβεβαίωσε την παρουσία του CB2 και στον αμφιβληστροειδή μυών (Lu και συν., 2000). Τα δεδομένα για την παρουσία του CB2 στον αμφιβληστροειδή ισχυροποιήθηκαν από μεταγενέστερα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα που επιβεβαίωσαν την εντόπιση του CB2 στις προαναφερθείσες περιοχές και επιπλέον ανίχνευσαν την πρωτεΐνη του CB2 υποδοχέα σε ορισμένους άξονες στην IPL και στα κύτταρα του RPE (Lopez και συν., 2011). Ανάλογη τοπογραφική οργάνωση του CB2 υποδοχέα παρατηρείται και στον αμφιβληστροειδή των μυών (Cécylge και συν., 2013). Παρ' όλα αυτά, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες ο CB2 υποδοχέας δεν ανιχνεύεται με την χρήση αντισωμάτων σε υγιείς αμφιβληστροειδείς μυών, παρά μόνο σε παθολογικές καταστάσεις, όπου και παρατηρείται αύξηση της έκφρασής του (Borowska-Fielding και συν., 2018). Σε αντίθεση με τον CB1, του οποίου η εντόπιση είναι διατηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών, αυτό δεν φαίνεται να ισχύει για τον CB2, καθώς στον αμφιβληστροειδή των πρωτευόντων η έκφρασή του περιορίζεται στα κύτταρα Muller (Bouskila και συν., 2013; Bouskila και συν., 2016), ενώ στον άνθρωπο φαίνεται να εκφράζεται μόνο από τα κύτταρα του RPE (Wei και συν., 2009). Παράλληλα στον αμφιβληστροειδή διαφορετικών ειδών έχουν ανιχνευθεί και οι υποδοχείς TRPV1 και GPR55, που φαίνεται να διμεσολαβούν κάποιες από τις δράσεις των κανναβινοειδών (Zimon και συν., 2004; Bouskila και συν., 2013).

Μελέτες έχουν προσδιορίσει τα επίπεδα των δύο βασικότερων ενδοκανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή. Τα επίπεδα της 2-AG παρουσιάζονται αρκετά υψηλότερα σε σχέση με αυτά του AEA στον αμφιβληστροειδή τρωκτικών (Straiker και συν., 1999) και ανθρώπων (Chen και συν., 2005). Μάλιστα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ΔΑ σημειώνεται αύξηση των επιπέδων των ενδοκανναβινοειδών στον αμφιβληστροειδή (Matias και συν., 2006), γεγονός που πιθανότατα αντανάκλα μια αντισταθμιστική απόπειρα του οργανισμού να αποκαταστήσει την ομοιόσταση. Παρόντα στον αμφιβληστροειδή είναι και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση και την αποδόμηση των ενδοκανναβινοειδών. Στον αμφιβληστροειδή επίμυων το βιοσυνθετικό ένζυμο της 2-AG, DAGLa, εμφανίζεται αρκετά νωρίς κατά την μεταγεννητική περίοδο και εκφράζεται στους φωτοϋποδοχείς, τα οριζόντια, τα βραχύινα και τα γαγγλιακά κύτταρα, ενώ η MAGL, το βασικότερο ένζυμο αποδόμησης της 2-AG εμφανίζεται μετέπειτα στην αναπτυξιακή πορεία του αμφιβληστροειδούς και η έκφρασή της περιορίζεται στα βραχύινα κύτταρα και τα κύτταρα του Muller (Cécylge και συν., 2014). Ωστόσο στον αμφιβληστροειδή μυών η DAGLa εκφράζεται κυρίως στα OFF δίπολα κύτταρα τύπου 1 καθώς και σε ορισμένους δενδρίτες δίπολων κυττάρων, ενώ η

παρουσία της MAGL ανιχνεύεται στα ραβδία, στα εξωτερικά τμήματα των κωνίων, στην OPL και στην IPL (Hu και συν., 2010). Επιπλέον, η παρουσία της υδρολάσης ABHD6 που συμμετέχει στον μεταβολισμό της 2-AG έχει αναφερθεί στον αμφιβληστροειδή μυών, όπου εντοπίζεται σε GABAεργικά βραχύνια κύτταρα, σε γαγγλιακά κύτταρα και τους δενδρίτες τους (Hu και συν., 2010). Η FAAH, το μεταβολικό ένζυμο του AEA παρουσιάζει ευρεία έκφραση στην ONL και την GCL σε μύες, σε κάποιους πληθυσμούς βραχύνων και δίπολων κωνιοφόρων δίπολων κυττάρων, ενώ παρουσιάζει συνεντοπισμό με τον CB1 υποδοχέα στις τελικές απολήξεις των ραβδίων στην OPL (Hu και συν., 2010). Στους επίμυες η FAAH παρουσιάζει έντονη ανοσοδραστικότητα στα γαγγλιακά κύτταρα και πιο αδύναμη στα κυτταρικά σώματα των οριζόντιων κυττάρων, των ντοπαμινεργικών βραχύνων, καθώς και στους δενδρίτες των χολινεργικών βραχύνων κυττάρων (Yazulla και συν., 1999). Η FAAH, το ένζυμο μεταβολισμού του 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 βραχύνων, καθώς και στους δενδρίτες των χολινεργικών βραχύνων κυττάρων (Yazulla και συν., 1999). Τα ευρήματα για την εντόπιση της FAAH στον αμφιβληστροειδή επίμυων, επιβεβαιώνονται και από την μελέτη των Zabouiri και συν. (2011), ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η FAAH παρουσιάζει ανακατανομή της έκφρασής της σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς κατά την αναπτυξιακή περίοδο.



Εικόνα 1.16. Κατανομή των επιμέρους στοιχείων του ΕΚΣ στον αμφιβληστροειδή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εντόπιση των CB1 και CB2 υποδοχέων και των ενζύμων αποδόμησης (FAAH και MAGL) των ενδοκανναβινοειδών στα βραχύινα κύτταρα. Λήφθηκε από Pasquare & συν. (2023).

Σε άμεση αντιστοιχία με τον νευρορρυθμιστικό προφίλ που παρουσιάζει το ΕΚΣ στον εγκέφαλο, προκλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το ΕΚΣ στον αμφιβληστροειδή εμπλέκεται ενεργά στην φυσιολογία της όρασης, ρυθμίζοντας την νευροδιαβίβαση και την διεγερσιμότητα των νευρικών κυττάρων. Μελέτες υποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή μέσω του CB1 υποδοχέα ελέγχουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών στον αμφιβληστροειδή, όπως το γλουταμινικό (Opere και συν., 2009), το GABA (Warrier και Wilson, 2007) και η ντοπαμίνη (Weber και Schlicker, 2001). Επιπλέον τα κανναβινοειδή ρυθμίζουν την διεγερσιμότητα των νευρώνων, μέσω της ενεργοποίησης ή αναστολής διαύλων ιόντων. Στον αμφιβληστροειδή χρυσόψαρου το συνθετικό κανναβινοειδές R-WIN55,212-2, ενεργοποιώντας τον CB1 υποδοχέα παρουσιάζει μία διαφασική επίδραση στην ρύθμιση διαύλων Ca^{2+} , K^+ και Cl^- στα εσωτερικά τμήματα των φωτούποδοχέων, κατά την οποία σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1 μM ενεργοποιεί όλους τους διαύλους, ενώ σε υψηλότερες του 1 μM συγκεντρώσεις, τους αναστέλλει (Fan και Yazulla, 2003). Στο ίδιο ζωικό μοντέλο, στα ON δίπολα κύτταρα, όπου ο CB1 παρουσιάζει ευρεία εντόπιση, η παρουσία κανναβινοειδικών αγωνιστών αναστέλλει το ρεύμα K^+ (Yazulla και συν., 2000). Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι σύμφωνα με τα στοιχεία τα κανναβινοειδή επάγουν διαφορικές

αποκρίσεις στον εκάστοτε κυτταρικό τύπο στον αμφιβληστροειδή. Φερ' ειπείν στον αμφιβληστροειδή της σαλαμάνδρας τίγρης το R-WIN55,212-2 ενισχύει το ρεύμα Ca^{2+} στα ραβδία και το μειώνει στα κωνία, ενώ αναστέλλει το ρεύμα K^+ τόσο στα κωνία, όσο και στα ραβδία (Straiker και Sullivan, 2003). Στον αμφιβληστροειδή των επίμυων η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα αναστέλλει το ρεύμα ασβεστίου στα δίπολα κύτταρα (Straiker και συν., 1999) και στα γαγγλιακά κύτταρα (Lalonde και συν., 2006; Qian και συν., 2017).

Η εμπλοκή του ΕΚΣ στην φυσιολογία της όρασης μπορεί να αποκαλυφθεί και έμμεσα εξετάζοντας ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές του αμφιβληστροειδούς, όπως το ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ΗΑΓ). Σε μύες knock out για τον CB2 υποδοχέα παρατηρείται αύξηση του πλάτους των α κυμάτων, τα οποία αντικατοπτρίζουν την αρχική υπερπόλωση των φωτοϋποδοχέων (Cécycne και συν., 2013). Παράλληλα φαίνεται πως και η χρόνια χορήγηση του CB2 ανταγωνιστή, AM630, έχει ανάλογες δράσεις στο ΗΑΓ με αυτές που παρουσιάζουν οι CB2 knock out μύες (Borowska-Fielding και συν., 2018). Κατά ανάλογο τρόπο οι Cécycne και συν. (2020) αναφέρουν ότι το ΕΚΣ μόνο μέσω των CB2 και όχι των CB1 υποδοχέων, επηρεάζει βασικές παραμέτρους του ΗΑΓ υπό συνθήκες σκότους. Στην συγκεκριμένη μελέτη ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι μύες knock out για τον CB2, η χορήγηση του CB2 ανταγωνιστή, AM630, καθώς και η χορήγηση αναστολέα του βιοσυνθετικού ενζύμου της 2-AG ενισχύουν την οπτική οξύτητα, ενώ η χορήγηση αναστολέα του μεταβολικού ενζύμου της 2-AG, φαίνεται να επιδεινώνει την οπτική οξύτητα (Cécycne και συν., 2020). Όσον αφορά τον ρόλο του CB1 υποδοχέα φαίνεται πως και αυτός εμπλέκεται στην ροή της οπτικής πληροφορίας. Αύξηση του πλάτους των β κυμάτων έχει παρατηρηθεί κατά την ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων από το HU-210 (Lax και συν., 2014). Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνονται και από μελέτες σε ανθρώπους, καπνιστές κάνναβης, στους οποίους οι τροποποιημένες αποκρίσεις που εμφανίζονται στο ΗΑΓ ισχυροποιούν την άποψη περί εμπλοκής του ΕΚΣ στην φυσιολογία της όρασης (Schwitzer και συν., 2016).

Εν κατακλείδι, το ΕΚΣ παρουσιάζει ευρεία εντόπιση στους επιμέρους νευρωνικούς τύπους του αμφιβληστροειδούς. Παρά τα διαφορετικά μοτίβα έκφρασης που παρατηρούνται μεταξύ των ειδών, η εμπλοκή του στην φυσιολογία της όρασης είναι καλά συντηρημένη και όπως θα εξετάσουμε στο επόμενο κεφάλαιο, μπορεί να αποτελέσει στόχο στην βάση του οποίου θα μπορούσαν να αναπτυχθούν προστατευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση ποικίλων παθολογικών καταστάσεων του αμφιβληστροειδούς.

1.6. Προστατευτικές επιδράσεις των CB1 και CB2 κανναβινοειδικών υποδοχέων σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών

Αρχικές παρατηρήσεις των επιδράσεων που είχε το κάπνισμα της κάνναβης στην μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης, ένα χαρακτηριστικό παθολογικό γνώρισμα του γλαυκώματος, αποτέλεσαν το βασικότερο κίνητρο για την διερεύνηση του ρόλου του ΕΚΣ στην φυσιολογία του οφθαλμού (Helper και Frank, 1971). Μεταγενέστερες μελέτες κατέδειξαν την παρουσία ενός πλήρως λειτουργικού ΕΚΣ στον αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών (Straiker και συν., 1999; Yazulla και συν., 1999), ενώ πλέον είναι αδιαμφισβήτητη η εμπλοκή των CB1 και CB2 υποδοχέων στην λειτουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων του αμφιβληστροειδούς (Borowska-Fielding και συν., 2018; Middleton και συν., 2019). Σε αυτή την βάση και δεδομένης της συμμετοχής του ΕΚΣ σε σημαντικές διεργασίες που σχετίζονται με την βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων, όπως η

νευροεκφύλιση, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες, τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις προστατευτικές επιδράσεις που επιδεικνύουν τα κανναβινοειδή σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών (Rapino και συν., 2018).

Σε ζωικά μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία διεγερσιτοξικότητας που επάγει τον θάνατο των νευρώνων, η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα διαμεσολαβεί προστατευτικές αποκρίσεις. Η Δ9-THC και η κανναβιδιόλη μείωσαν το οξειδωτικό στρες και παρείχαν νευροπροστασία στα γαγγλιακά κύτταρα σε ένα μοντέλο NMDA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Η συγχορήγηση του CB1 ανταγωνιστή SR141716A μαζί με τα δύο κανναβινοειδή, κατήργησε μερικώς την παρατηρούμενη νευροπροστασία, υποδεικνύοντας την μερική εμπλοκή του υποδοχέα στις δράσεις τους (El-Remessy και συν., 2003). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, η Δ9-THC μείωσε την ενδοφθάλμια πίεση και τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων σε ένα μοντέλο γλαυκώματος σε επίμυες (Crandall και συν., 2007). Ανάλογες δράσεις στην διαμεσολαβούμενη μέσω του CB1, διατήρηση της βιωσιμότητας των γαγγλιακών κυττάρων, παρατηρήθηκαν και μετά την ενδοϋαλοειδική χορήγηση του συνθετικού κανναβινοειδούς μεθανανταμίδιο (methAEA), σε ένα μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης στον αμφιβληστροειδή επίμυος (Nucci και συν., 2007). Το συνθετικό κανναβινοειδές R-WIN55,212-2, μέσω της ενεργοποίησης του CB1 μείωσε την ενδοφθάλμια πίεση και την απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων σε ένα μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Pinar-Sueiro και συν., 2013) και προστάτευσε τα γαγγλιακά κύτταρα από την NMDA διεγερσιτοξικότητα (Maguire και συν., 2022).

Οι προστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών επιβεβαιώνονται και στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή, όπου σε αντίθεση με το NMDA, επηρεάζει την βιωσιμότητα των βραχύνων και των οριζόντιων κυττάρων και όχι των γαγγλιακών (Kiagiadaki και Thermos, 2008). Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση AEA παρείχε προστασία στα βραχύνια κύτταρα, μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού MEK/ERK1/2, ενώ η 2-AG και τα συνθετικά κανναβινοειδή HU-210 και methAEA μείωσαν τον επαγόμενο από το AMPA κυτταρικό θάνατο, σηματοδοτώντας μέσω του μονοπατιού PI3K/ Akt (Kokona και Thermos, 2015; Kokona και συν., 2021). Οι δράσεις όλων των προαναφερθέντων κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκαν μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα, ενώ ειδικά για την 2-AG σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα, όπως φάνηκε από την μερική κατάργηση των προστατευτικών της δράσεων κατά την συγχορήγησης της με τον CB2 ανταγωνιστή, AM630 (Kokona και συν., 2021). Παράλληλα, η συστηματική χρόνια και υποχρόνια χορήγηση των κανναβινοειδών HU-210, methAEA, AEA και R-WIN55,212-2 σε δόσεις που δεν επάγουν μειορρύθμιση των CB1 υποδοχέων στον αμφιβληστροειδή, έχει αποδειχθεί ότι εξυπηρετεί νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας (Paradogkonaki και συν., 2019; Spyridakos και συν., 2021). Η διαμεσολαβούμενη μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα νευροπροστασία των κανναβινοειδών επιβεβαιώνεται και σε άλλα μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Το συνθετικό κανναβινοειδές HU-210 διέσωσε τους φωτοϋποδοχείς από την εκφύλιση, σε ένα μοντέλο μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε επίμυες, συμβάλλοντας στην διατήρηση της ομαλής κυτταροαρχιτεκτονικής οργάνωσης και λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς (Lax και συν., 2014). Κατά ανάλογο τρόπο η χορήγηση του CB1 αγωνιστή, ACEA, μείωσε τον επαγόμενο από το φως θάνατο των φωτοϋποδοχέων και την αντιδραστικότητα της μακρογλοίας, ενώ κατά την συγχορήγησης του με τον CB1 ανταγωνιστή, AM251, παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργοποίηση του αποπτωτικού

μονοנוπατιού της κασπάσης 3, ενίσχυση της αντιδραστικής μακρογλοίας και αύξηση της έκφρασης του TNF α (Solino και συν., 2022).

Πέρα από την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα, κάποιες μελέτες αναδεικνύουν τις προστατευτικές δράσεις που προκύπτουν από την αναστολή της λειτουργίας του. Ο CB1 ανταγωνιστής, SR141716A, μείωσε την απώλεια των φωτοϋποδοχέων, την αντιδραστική γλοιώση και την δημιουργία μη φυσιολογικών αγγειακών συμπλεγμάτων σε ένα μοντέλο επαγόμενης από N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) νευροεκφύλισης στον αμφιβληστροειδή μυών, που προσομοιάζει την μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Chen και συν., 2018). Οι προστατευτικές αποκρίσεις του SR141716A επαληθεύονται και σε ένα άλλο μοντέλο μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδοπάθειας, επαγόμενης από το φως, όπου παρατηρήθηκε βελτίωση του πλάτους των α και β κυμάτων και διατήρηση του πάχους της ONL κατά την χορήγηση του SR141716A (Imamura και συν., 2017). Στην ΔΑ ο CB1 ανταγωνιστής SR141716A ή η γενετική διαγραφή του CB1 υποδοχέα έπαυσε τον επαγόμενο από τον διαβήτη, θάνατο των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (El-Remessy και συν., 2011). Ανάλογα αποτελέσματα από την εφαρμογή CB1 ανταγωνιστών προκύπτουν και μέσα από *in vitro* μελέτες, όπου ο ανταγωνιστής SR141716A φαίνεται να μειώνει το οξειδωτικό στρες, την απόπτωση και τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις σε καλλιέργειες ανθρώπινων RPE, εκτεθειμένων σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Wei και συν., 2013) και ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργεια υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης (El-Remessy και συν., 2011).

Παρ' ότι αρχικά αποτέλεσε ζήτημα αντιπαράθεσης μεταξύ των ερευνών, η έκφραση του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή επιβεβαιώνεται πλέον από ολόένα και περισσότερα ευρήματα, τα οποία αναδεικνύουν την ύπαρξη και την ενεργή εμπλοκή του CB2 στην φυσιολογία του αμφιβληστροειδούς (Qian και συν., 2017; Bogowska-Fielding και συν., 2018; Spyridakos και συν., 2021). Μάλιστα σε αυτά τα δεδομένα έρχονται να προστεθούν και νέα ευρήματα που συνιστούν ότι οι προστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, διεκπεραιώνονται και μέσω των CB2 υποδοχέων. Στην επαγόμενη από το AMPA διεγερσιτοξικότητα, οι νευροπροστατευτικές δράσεις του εξωγενώς χορηγούμενου ενδοκανναβινοειδούς 2-AG (Kokona και συν., 2021) και του συνθετικού κανναβινοειδούς R-WIN55,212-2 (Spyridakos και συν., 2021) περατώνονται εν μέρει μέσω της ενεργοποίησης του CB2 υποδοχέα, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του WIN55,212-2 πραγματοποιούνται εξ' ολοκλήρου μέσω του CB2 στα μικρογλοιακά κύτταρα (Spyridakos και συν., 2021). Η εφαρμογή του επιλεκτικού CB2 αγωνιστή, HU-308 προστάτησε τους φωτοϋποδοχείς μυών σε ένα μοντέλο εκφύλισης, επαγόμενης από το φως και βελτίωσε σημαντικά όλες τις παραμέτρους του ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφήματος, ενώ αυτές οι επιδράσεις καταργήθηκαν κατά την συγχορήγηση του με τον CB2 ανταγωνιστή, SR144528 (Imamura και συν., 2018). Παράλληλα, οι ευεργετικές δράσεις που προκύπτουν από την ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή, επιβεβαιώνονται και σε ένα μοντέλο ραγοειδίτιδας, όπου η χορήγηση του επιλεκτικού CB2 αγωνιστή, JWH 133, μείωσε καθοριστικά την φλεγμονή (Xu και συν., 2007). Σε αντίθεση με όσα αναφέραμε μέχρι στιγμής για τις προστατευτικές δράσεις που επιτελούνται μέσω της ενεργοποίησης των CB2 υποδοχέων, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι και ο ανταγωνισμός στο επίπεδο του CB2 ενέχει θεραπευτικά οφέλη. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Honig και συν. (2022) αναφέρουν ότι η χορήγηση ραλοξιφένης, η οποία δρα ως αντίστροφος αγωνιστής στους CB2 υποδοχείς, κατάφερε να μειώσει την απώλεια των φωτοϋποδοχέων, των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, βελτιώνοντας σημαντικά και τα ελλείμματα που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα, σε ένα μοντέλο μηχανικού τραυματισμού του οφθαλμού

σε μύες. Η δράση αυτή της ραλοξιφένης βασίστηκε στην δυνατότητά της να επαγάγει την μετάβαση της μικρογλοίας από τον M1 προφλεγμονώδη φαινότυπο προς τον αντιφλεγμονώδη M2 (Honig και συν., 2022).

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει να γίνει στο σημείο αυτό και στις επιδράσεις των κανναβινοειδών στα κύτταρα του Muller, τα γλοιακά κύτταρα που αποτελούν μοναδικό χαρακτηριστικό του αμφιβληστροειδούς. Στον αμφιβληστροειδή κοτόπουλου, η ενίσχυση της σηματοδότησης του ΕΚΣ είτε μέσω εγχύσεων ΑΕΑ και 2-AG, είτε μέσω ενός αναστολέα της MAGL, διεγείρει τον επαναπρογραμματισμό τους σε προγενήτορες των Muller κυττάρων (Campbell και συν., 2021), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από πολυδυναμία και συμμετέχουν ως επιδιορθωτικοί μηχανισμοί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η νευροεκφύλιση (Too και Simunovic, 2021). Αντιθέτως, η χορήγηση ανταγωνιστών του CB1 υποδοχέα, καθώς και αναστολέων των βιοσυνθετικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών ανέστειλαν την μετατροπή των Muller κυττάρων σε προγενήτορες (Campbell και συν., 2021). Η σηματοδότηση μέσω του CB1 υποδοχέα, παίζει καθοριστικό ρόλο και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις των κυττάρων του Muller, αφού στον αμφιβληστροειδή μύων, υπό συνθήκες διεγερσιοξικότητας με NMDA, το κανναβινοειδές R-WIN55,212-2 αναστέλλει την ενεργοποίηση του NFκB που συμμετέχει σε προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενώ ο CB1 ανταγωνιστής, SR141716A αύξησε την ενεργοποίηση του NFκB (Campbell και συν., 2021). Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάζονται και στη μελέτη των Krishnan και Chatterjee (2012), όπου τα ενδογενή κανναβινοειδή επέδειξαν γλοιοπροστατευτικές ιδιότητες μειώνοντας τον επαγόμενο από λιποπολυσακχαρίτες (LPS, Lipopolysaccharides), θάνατο των κυττάρων του Muller *in vitro*, επίδραση διαμεσολαβούμενη μέσω των CB1 και CB2 υποδοχέων, όπως φάνηκε κατά την χορήγηση των ανταγωνιστών AM251 και AM630 αντίστοιχα.

Παρά την ύπαρξη πληθώρας δεδομένων που υποστηρίζουν ότι οι προστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών ολοκληρώνονται είτε μέσω των CB1 είτε μέσω των CB2 υποδοχέων, κάποιες μελέτες συνιστούν ότι η προστασία επιτελείται μέσω της ενεργοποίησης και των δύο κανναβινοειδικών υποδοχέων σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών. Η ενεργοποίηση για παράδειγμα των CB1 και CB2 υποδοχέων, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην μείωση της νευροεκφύλισης επαγόμενης από τον ιό HIV (Krishnan και Chatterjee, 2014) είτε από την AMPA διεγερσιοξικότητα στον αμφιβληστροειδή (Spyridakos και συν., 2021). Στον αντίποδα όμως, η αναστολή της λειτουργίας των κανναβινοειδικών υποδοχέων με την χορήγηση ανταγωνιστών εξυπηρετεί και αυτή νευροπροστατευτικές αποκρίσεις στον αμφιβληστροειδή (Maccarone και συν., 2016). Μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται πως προαπαιτούμενο για την επίτευξη νευροπροστασίας είναι ο συνδυασμός ενός κανναβινοειδικού αγωνιστή μαζί με CB1 είτε CB2 ανταγωνιστή, όπως στην περίπτωση του R-WIN55,212-2, το οποίο συνδυαζόμενο είτε με το AM630 (ανταγωνιστής των CB2 υποδοχέων) είτε με το AM251 (ανταγωνιστής των CB1 υποδοχέων) επέδειξε νευροπροστατευτικές δράσεις σε ένα μοντέλο αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας (Araujo και συν., 2017).

Σε κάποια μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών η χορήγηση άμεσων αγωνιστών των κανναβινοειδικών υποδοχέων εξυπηρετεί νευροπροστατευτικές αποκρίσεις. Μία εναλλακτική προσέγγιση στο χειρισμό του ΕΚΣ, η οποία προσομοιάζει αρκετά στην χορήγηση κανναβινοειδικών αγωνιστών, αποτελεί η χορήγηση αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών, με στόχο την αύξηση της διαθεσιμότητάς τους και την παράταση της διάρκειας δράσης τους στους υποδοχείς. Συνολικά τα ευρήματα από μελέτες στον εγκέφαλο υποδεικνύουν ότι οι αναστολείς των μεταβολικών ενζύμων των

ενδοκανναβινοειδών ενέχουν θεραπευτικά οφέλη σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία νευροεκφύλισης (Mounsey και συν., 2015; Choi και συν., 2018; Yamasaki και συν., 2021). Ωστόσο στον αμφιβληστροειδή οι μελέτες είναι περιορισμένες. Πειραματικά ευρήματα έχουν ανδείξει τις προστατευτικές δράσεις του αναστολέα της FAAH, URB597, η χορήγηση του οποίου ενίσχυσε τη βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων σε ένα μοντέλο διατομής του οπτικού νεύρου (Slusar και συν., 2013) καθώς και σε ένα μοντέλο ισχαιμίας –επαναιμάτωσης στον αμφιβληστροειδή (Nucci και συν., 2007). Τέλος πολλά υποσχόμενα ευρήματα προέρχονται και από μία πρόσφατη μελέτη στην οποία ο αναστολέας της MAGL, MAGL17b, διαλυμένος σε ειδικό σκεύασμα με κατάλληλα έκδοχα για την χορήγηση υπό την μορφή σταγόνων αποδείχθηκε αποτελεσματικός στην μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης σε οφθαλμούς κουνελιών (Chetoni και συν., 2022).

Εν ολίγοις καθίσταται σαφές ότι η ευρεία κατανομή του ΕΚΣ στον αμφιβληστροειδή το ορίζει συμμετοχο στην παθοφυσιολογία της πλειοψηφίας των αμφιβληστροειδοπαθειών. Η χρήση παραγόντων που ελέγχουν την σηματοδότηση μέσω του ΕΚΣ, όπως οι αγωνιστές, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων και οι αναστολείς των αποδομητικών ενζύμων των το ΕΚΣ αποτελεί το ιδανικό σύστημα για την ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων έναντι των αμφιβληστροειδοπαθειών.

1.7. Εμπλοκή των CB1 και των CB2 υποδοχέων στην παθοφυσιολογία των επιπλοκών του διαβήτη

Στην βιβλιογραφία συναντάμε επαρκείς ενδείξεις που εμπλέκουν το ΕΚΣ στην παθοφυσιολογία του διαβήτη και αρκετών επιπλοκών του. Η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων στο ΚΝΣ έχει ορεξιογόνο δράση πυροδοτώντας την λήψη τροφής (Di Marzo και συν., 2005). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση των CB1 σε περιφερικά όργανα, που ενισχύει την λιπογένεση στον λιπώδη ιστό και το ήπαρ, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση παχυσαρκίας και άλλων μεταβολικών ανωμαλιών που σχετίζονται με τον σακχαρώδη διαβήτη (Osei-Hyiaman και συν., 2005; Cota και συν., 2003). Επιπροσθέτως οι CB1 υποδοχείς στο ήπαρ ενεργοποιούμενοι, επάγουν την εμφάνιση αντίστασης/ αντοχής στις δράσεις της ινσουλίνης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ, αυξάνοντας κατακόρυφα τις πιθανότητες εμφάνισης διαβήτη τύπου II (Liu και συν., 2012). Στο ίδιο μήκος κύματος κινούνται και μελέτες που υποδεικνύουν τον χρήσιμο ρόλο περιφερικά περιορισμένων ανταγωνιστών του CB1 υποδοχέα στην βελτίωση των μεταβολικών ελλειμμάτων που συναντώνται στον διαβήτη (Tam και συν., 2012; Kim και συν., 2012; Eid και συν., 2020). Παράλληλα, σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ινσουλίνης διαδραματίζουν και οι CB1 υποδοχείς στο ΚΝΣ, αφού η ενδοεγκεφαλοκυβιακή χορήγηση CB1 αγωνιστών είναι ικανή να διαταράξει την δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ, με την χορήγηση ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα να την επαναφέρει και πάλι σε φυσιολογικά επίπεδα (O'Hare και συν., 2011). Η εμπλοκή των CB1 υποδοχέων στον διαβήτη αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι είναι σε θέση να επάγουν τον θάνατο των β κυττάρων του παγκρέατος (Kim και συν., 2012), οδηγώντας σε έκπτωση της παγκρεατικής λειτουργίας, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του διαβήτη τύπου I και II (Thomas και συν., 2009). Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων στα παγκρεατικά β κύτταρα αναστέλλει την σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της ινσουλίνης και ενεργοποιεί αποπτωτικά μονοπάτια που συντελούν στον θάνατο αυτών των κυττάρων (Kim και συν., 2012). Εναλλακτικά έχει προταθεί ότι οι CB1 υποδοχείς στα M1 μακροφάγα ενεργοποιούν το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Nlr3-ASC, το οποίο σχετίζεται με την φλεγμονή και μέσω της

απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών επάγει τον θάνατο των β κυττάρων του παγκρέατος (Jourdan και συν., 2013). Συνοψίζοντας, η αυξημένη ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα, η οποία φαίνεται να αποτελεί απόκριση στα αυξημένα επίπεδα ενδογενών κανναβινοειδών που εντοπίζονται σε διαβητικούς ασθενείς (Matias και συν., 2006), αποτελεί ένα από το βασικότερα αίτια της παθογένειας του διαβήτη και συμβάλλει στην εμφάνιση διαφόρων επιπλοκών που σχετίζονται με αυτόν.

Η εμπλοκή των CB1 και CB2 υποδοχέων στην παθογένεια του διαβήτη φαίνεται και από το γεγονός ότι οι δύο αυτοί υποδοχείς ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο τις οξειδωτικές (Pagano και συν., 2023) και φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Downer, 2022), οι οποίες αποτελούν τον κοινό παρονομαστή στην παθοφυσιολογία των επιπλοκών του διαβήτη. Σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ), παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του CB1 υποδοχέα στα ποδοκύτταρα (Jourdan και συν., 2014; Barutta και συν., 2018). Η υπερενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα που προκαλείται εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων του ΑΕΑ, πυροδοτεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών αποπτωτικών μονοπατιών που διαμεσολαβούνται από την p38 MAPK, ενισχύει τις προφλεγμονώδεις αντιδράσεις και επάγει την εμφάνιση οξειδωτικού στρες, συμβάλλοντας στην νεφρική δυσλειτουργία (Mukhopadhyay και συν., 2010). Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και σε μία πρόσφατη μελέτη, κατά την οποία η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα συνέβαλε στην αύξηση των προφλεγμονωδών παργόντων TNF-α και TGF-β στο πλάσμα επίμυων με ΔΝ (Medapati και συν., 2021). Δεδομένου λοιπόν ότι η ενεργοποίηση του CB1 αποτελεί παράγοντα ενίσχυσης της παθολογίας της ΔΝ, θα περίμενε κανείς ότι η αναστολή της λειτουργίας του θα μπορούσε να έχει αντίθετα αποτελέσματα. Πράγματι, πλήθος μελετών σε ζώα αναφέρουν ότι η εφαρμογή ανταγωνιστών του CB1 υποδοχέα στην ΔΝ ενέχει θεραπευτικά οφέλη, καθώς είναι σε θέση να μειώνει τον θάνατο των νεφρικών κυττάρων, το οξειδωτικό στρες και την παρουσία φλεγμονής (Mukhopadhyay και συν., 2010; Nam και συν., 2012; Hinden και συν., 2018; Barutta και συν., 2018; Medapati και συν., 2021). Η διαβητική καρδιοπάθεια (ΔΚ) αποτελεί μία ακόμη σημαντική επίπτωση του διαβήτη, στην οποία η ενεργοποίηση του CB1 έχει τις ίδιες καταστροφικές συνέπειες που έχει και στην ΔΝ, με την αύξηση του κυτταρικού θανάτου, της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες (Rajesh και συν., 2012). Η γενετική διαγραφή καθώς και η φαρμακολογική αναστολή του CB1 υποδοχέα με τον ανταγωνιστή SR141716, καταργούν αυτές τις επιδράσεις διατηρώντας ανέπαφη την καρδιακή λειτουργία (Rajesh και συν., 2012). Προστατευτικές επιδράσεις έχουν αναδειχθεί από την χρήση ανταγωνιστών του CB1 υποδοχέα και σε μοντέλα διαβητικής νευροπάθειας (ΔΝΕΥ). Ειδικότερα ο CB1 ανταγωνιστής SR141716 κατάφερε να διατηρήσει μερικώς την πυκνότητα των ενδοδερμικών νεύρων, να μειώσει την απώλεια των αγγείων, να αυξήσει την αιματική ροή και να μειώσει τα επίπεδα του TNF-α σε ένα μοντέλο περιφερικής ΔΝΕΥ σε μύες (Liu και συν., 2010). Τα ευρήματα αυτά επαληθεύονται και από την μελέτη των Comelli και συν. (2010), σύμφωνα με τους οποίους ο ανταγωνιστής SR141716 μείωσε την αλλοδυνία, το οξειδωτικό στρες στα περιφερικά νεύρα, καθώς και την έκφραση του TNF-α στην σπονδυλική στήλη διαβητικών μυών.

Κρίσιμος φαίνεται πως είναι ο ρόλος του CB1 υποδοχέα και στην εκδήλωση της παθοφυσιολογίας της ΔΑς. Πειράματα *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων του RPE υποδεικνύουν ότι η υπεργλυκαιμία αυξάνει την έκφραση του CB1 υποδοχέα και μειώνει την έκφραση της FAAH, προκαλώντας την συσσώρευση ΑΕΑ (Lim και συν., 2012). Ο συνδυασμός αυτών των δύο γεγονότων οδηγεί σε υπερενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα, ο οποίος με την σειρά του συμβάλλει στον αποπτωτικό θάνατο αυτών των κυττάρων (Lim και

συν., 2012). Η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή, AM251, μείωσε τον κυτταρικό θάνατο, αναστέλλοντας την αποπτωτική σηματοδότηση δια μέσω του CB1 υποδοχέα (Lim και συν., 2012). Οι προστατευτικές δράσεις της αναστολής της λειτουργίας του CB1 υποδοχέα επιβεβαιώνονται και σε καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων εκτεθειμένων σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, όπου η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή SR141716, μείωσε το οξειδωτικό στρες, την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών αποκρίσεων μέσω του NF-κΒ και την έκφραση των μορίων πρόσδεσης ICAM-1 και VCAM-1 (El-Remessy και συν., 2011). Στην μελέτη των El-Remessy και συν. (2011), οι προαναφερθείσες προστατευτικές επιδράσεις επιβεβαιώθηκαν και *in vivo*, σε ένα μοντέλο επαγόμενης από STZ ΔΑΣ κατά την γενετική διαγραφή των CB1 υποδοχέων, καθώς και μετά τον φαρμακολογικό αποκλεισμό τους με το SR141716.

Οι CB2 αγωνιστές εξυπηρετούν προστατευτικές αποκρίσεις σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με την άποψη αυτή να βασίζεται στην παρατήρηση ότι η ενεργοποίηση των CB2 υποδοχέων προλαμβάνει τον κυτταρικό θάνατο και εμποδίζει τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις και το οξειδωτικό στρες, τόσο στο ΚΝΣ (Javed και συν., 2016), όσο και σε ιστούς στην περιφέρεια (Parlar και συν., 2018). Επομένως ο αγωνισμός μέσω του CB2 υποδοχέα θα μπορούσε να αποδειχθεί αποτελεσματικός και στην αντιμετώπιση του διαβήτη. Πράγματι, η συστηματική χορήγηση αγωνιστών για τους CB2 υποδοχείς διασώζει την λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων, μειώνει το οξειδωτικό στρες και τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών, αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και ελαττώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος, σε ζωικά μοντέλα για τον διαβήτη (Zhang και συν., 2016; Basha και Sankaranarayanan, 2016). Στην ΔΝ παρατηρείται μείωση της έκφρασης του CB2 υποδοχέα στα νεφρικά ποδοκύτταρα και σε συνδυασμό με τη μείωση της διαθεσιμότητας της 2-AG, του βασικού ενδοκανναβινοειδούς που ενεργοποιεί τους CB2, παρατηρείται μείωση της σηματοδοτικής ικανότητας του CB2 υποδοχέα (Barutta και συν., 2011). Το γεγονός αυτό αν συνδυαστεί με την αύξηση της «βλαπτικής» σηματοδότησης μέσω του CB1 υποδοχέα που προαναφέραμε (Lim και συν., 2012), δικαιολογεί την εμπλοκή του ΕΚΣ στην παθοφυσιολογία τη ΔΝ. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, η χορήγηση του CB2 αγωνιστή AM1241, σε ένα ζωικό μοντέλο ΔΝς, μείωσε την λευκωματουρία και την μειορύθμιση σημαντικών για την λειτουργία των ποδοκυττάρων, πρωτεϊνών και έπαυσε την συσσώρευση μονοκυττάρων στα νεφρά, επιδεικνύοντας αντιφλεγμονώδη δράση (Barutta και συν., 2011). Ανάλογα ήταν τα ευρήματα και από την χορήγηση ενός άλλου αγωνιστή του CB2 υποδοχέα, του HU-910, ο οποίος επέδειξε νεφροπροστατευτικές ιδιότητες (Zoja και συν., 2016). Οι προστατευτικές επιδράσεις της ενεργοποίησης του CB2 υποδοχέα, επεκτείνονται και σε μοντέλα ΔΝΕΥ, όπου οι CB2 αγωνιστές επιδεικνύουν αναλγητικές ιδιότητες (McDonnell και συν., 2017), βελτιώνουν την λειτουργία των περιφερικών νεύρων και εμποδίζουν την εκφύλισή τους (Jahanabadi και συν., 2016). Προστατευτικές δράσεις μέσω της ενεργοποίησης του CB2 υποδοχέα, έχουν παρατηρηθεί και σε μία πρόσφατη μελέτη σε ένα μοντέλο ΔΚς, όπου ο CB2 αγωνιστής, JWH-133 μείωσε την επαγόμενη από τον διαβήτη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και την ίνωση, διασώζοντας την λειτουργία του μυοκαρδίου, ενώ αντιθέτως η γενετική διαγραφή του CB2 υποδοχέα επιδείνωσε την κατάσταση (Rajesh και συν., 2022). Για την ΔΑ δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής *in vivo* μελέτες, σχετικά με τις δράσεις των αγωνιστών του CB2 υποδοχέα στη νόσο.

Ανακεφαλαιώνοντας, απ' όλα τα στοιχεία που παρατέθηκαν παραπάνω επιβεβαιώνεται η εμπλοκή του ΕΚΣ στην παθογένεια της πλειοψηφίας των επιπλοκών του διαβήτη. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα έχει καταστροφικό

αντίκτυπο στην παθοφυσιολογία όλων των διαβητικών επιπλοκών, με την αναστολή της λειτουργίας του να επιδεικνύει θεραπευτικά οφέλη. Από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα, σε αντίθεση με τον CB1, εξυπηρετεί προστατευτικές επιδράσεις στον διαβήτη.

2. Σκοπός της μελέτης

Οι υπάρχουσες θεραπείες για την ΔΑ περιορίζονται στα εξελιγμένα στάδια της νόσου (ΠΔΑ) και στοχεύουν κυρίως στην φλεγμονή και τις αγγειακές ανωμαλίες, χωρίς να επηρεάζουν την νευροεκφύλιση, η οποία είναι υπεύθυνη για τα ελλείμματα που παρουσιάζονται στην όραση των ασθενών (Mansour και συν., 2020). Μάλιστα είναι πλέον εμφανές, ότι δομικά και λειτουργικά ελλείμματα σύμφωνα με την παρουσία νευροεκφύλισης, είναι παρόντα ήδη κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου, ακόμα και πριν την εκδήλωση των μικροαγγειακών ανωμαλιών (Simo και συν., 2018). Η υιοθέτηση λοιπών νέων φαρμακολογικών παραγόντων με προστατευτικές ιδιότητες, που δρουν αναστέλλοντας την νευροεκφύλιση, το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή, βασικών συμπτωμάτων της πρώιμης παθοφυσιολογίας της ΔΑς, αποτελεί την ιδανική στρατηγική για την αναχαίτιση της εξέλιξης της νόσου προς τα εξελιγμένα στάδια όπου πλήττεται η οπτική ικανότητα των ασθενών.

Η ευρεία εντόπιση του ΕΚΣ στον εγκέφαλο (Cohen και συν., 2019) και στον αμφιβληστροειδή (Schwitzer και συν., 2016), υποδεικνύουν τον σπουδαίο ρόλο που διαδραματίζει η σηματοδότηση μέσω αυτού στην φυσιολογία των δύο αυτών οργάνων. Το ΕΚΣ εξαιτίας του νευρορρυθμιστικού του ρόλου και των πλειοτροπικών του ιδιοτήτων, συμμετέχει στην ρύθμιση αρκετών κρίσιμων διεργασιών που συνιστούν τις γενεσιουργές αιτίες της πλειοψηφίας των αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως το οξειδωτικό στρες (Pagano και συν., 2023), η φλεγμονή (Downer και συν., 2022) και η νευροεκφύλιση (Milano και Carasso, 2018). Όπως είδαμε το ΕΚΣ, μέσω των κανναβινοειδικών υποδοχέων CB1 και CB2, εμπλέκεται επίσης και στην παθογένεια των επιπλοκών του διαβήτη, με την ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων να έχει ενοχοποιηθεί για την επιδείνωση της παθολογίας, ενώ η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα εξυπηρετεί προστατευτικές αποκρίσεις. Υπό αυτό το πρίσμα, η γενετική διαγραφή ή η φαρμακολογική αναστολή του CB1 σε ένα ζωικό μοντέλο, επαγόμενης από STZ ΔΑς, αποδείχθηκε ικανή να βελτιώσει την παθοφυσιολογία της νόσου (El-Remessy και συν., 2011). Μολαταύτα, στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μέχρι τούδε στοιχεία για τις δράσεις του CB2 υποδοχέα στην ΔΑ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει στο σημείο αυτό, μια μελέτη σε ένα ζωικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝς), στην οποία φαίνεται ότι η συνδυαστική θεραπεία με CB1 ανταγωνιστή και CB2 αγωνιστή, παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση των δομικών και λειτουργικών ελλειμμάτων της ΔΝς, σε σχέση με τις μεμονωμένες θεραπείες (Barutta και συν., 2017). Έχοντας αυτό ως δεδομένο, λαμβάνοντας υπόψη τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις που διαμεσολαβούνται μέσω του CB2 υποδοχέα αλλά και βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η ΔΑ και η ΔΝ μοιράζονται κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή (Lopes de Faria και συν., 2011), εύλογα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η εφαρμογή CB2 αγωνιστών αποτελεί μια καλή στρατηγική για την αντιμετώπιση της ΔΑς.

Πλήθος μελετών αναφέρουν τις νευροπροστατευτικές επιδράσεις αγωνιστών για τους κανναβινοειδικούς υποδοχείς σε αρκετές αμφιβληστροειδοπάθειες και ειδικότερα σε μοντέλα διεγερσιοξικότητας (Rapino και συν., 2018; Kokona και Thermos, 2015; Spyridakos και συν., 2021). Ωστόσο πέρα από τους άμεσους αγωνιστές των κανναβινοειδικών υποδοχέων, ο έμμεσος αγωνισμός με την χορήγηση αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών, αυξάνει τα επίπεδά τους και παρατείνει την δράση τους στους κανναβινοειδικούς υποδοχείς. Στον εγκέφαλο υπάρχει πληθώρα δεδομένων που υποδεικνύει

τις προστατευτικές δράσεις των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών (Ren και συν., 2020), ωστόσο στον αμφιβληστροειδή τα ευρήματα είναι λιγιστά.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος της συγκεκριμένης διατριβής είναι η μελέτη των προστατευτικών ιδιοτήτων των κανναβινοειδών σε δύο μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών και για τον σκοπό αυτό χωρίστηκε σε δύο μέρη:

A. Στο πρώτο μέρος χρησιμοποιήθηκε ένα *in vivo* μοντέλο δύο εβδομάδων, επαγόμενης από στρεπτοζοτοκίνη ΔΑς σε επίμυες, το οποίο προσομοιάζει στα πρώιμα στάδια της νόσου και εξετάστηκαν οι νευροπροστατευτικές, οι αντιφλεγμονώδεις και οι αγγειοπροστατευτικές δράσεις, της χορήγησης τοπικά μέσω σταγόνων: α) SR141716, ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα, β) AM1710, αγωνιστή του CB2 υποδοχέα και γ) συνδυασμού των παραπάνω, SR141716+AM1710

B. Στο δεύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκε ένα *in vivo* μοντέλο διεγερσιτοξικότητας επαγόμενης από AMPA στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Εξετάστηκαν οι νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης των ακόλουθων αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG: α) AM12100, αναστολέας της ABHD6 και β) AM11920, διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας

3. Μεθοδολογία

3.1. Πειραματόζωα και συνθήκες διαβίωσης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί Sprague-Dawley επίμυες, βάρους 250-350g. Για τα πειράματα της επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας, τα πειραματόζωα στεγάζονταν 2-3 ανά κλωβό με βάση το φύλο τους. Στο μοντέλο της επαγόμενης από στρεπτοζοτοκίνη (STZ) διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (ΔΑ), το μεγαλύτερο ποσοστό των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούταν από θηλυκά ζώα, εξαιτίας της υψηλής θνησιμότητας των αρσενικών, και τα ζώα στεγάζονταν 1 ανά κλωβό. Η θερμοκρασία στο ζωοκομείο ήταν σταθερή στους $22\pm 2^\circ\text{C}$, ενώ εφαρμόστηκε και ένας 12ωρος κύκλος εναλλαγής φωτός-σκότους. Η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα κατά βούληση καθ' όλη την διάρκεια των μελετών. Μετά το πέρας των πειραμάτων, η ευθανασία των πειραματόζωων πραγματοποιούνταν μέσω εισπνοής αυξανόμενων συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), μέσα σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο.

3.2. Ουσίες

Η στρεπτοζοτοκίνη (2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose, STZ) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich (Germany). Το διεγερτικό αμινοξύ (RS)-α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA) αγοράστηκε από την Tocris Bioscience (Bristol, UK) και διαλύθηκε σε water for injection (wfi). Οι συνθετικές ουσίες, το AM1710 (αγωνιστής CB2 υποδοχέων), το SR141716 (ανταγωνιστής CB1 υποδοχέων), το AM12100 (αναστολέας της ABHD6) και το AM11920 (διπλός αναστολέας ABHD6/MAGL), ήταν ευγενική χορηγία του καθηγητή Αλέξανδρου Μακρυγιάννη (Center for Drug Discovery, Northeastern University, Boston, USA). Το AM251 (CB1 ανταγωνιστής) αγοράστηκε από την MedChemExpress (MCE, New Jersey, USA). Το Evans Blue (E2129-10G) και η φορμαμίδη (formamide, 4767L-250ML-F) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Germany).

3.3. Επαγωγή του διαβήτη

Για την επαγωγή του διαβήτη χρησιμοποιήθηκε η στρεπτοζοτοκίνη (STZ). Πρόκειται για ένα αντιβιοτικό, προερχόμενο από τον μύκητα *Streptomyces achromogenes*, όπου αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικό φάρμακο στην χημειοθεραπεία (White, 1963). Ωστόσο μεταγενέστερες πειραματικές παρατηρήσεις της διαβητογενούς επίδρασης που είχε η ενδοπεριτοναϊκή (i.p) χορήγησή της σε επίμυες και σκύλους (Rakeiten και συν., 1963), οδήγησαν σταδιακά στην επιλογή της STZ ως παράγοντα πρόκλησης σακχαρώδους διαβήτη σε πειραματικά μοντέλα. Ο μηχανισμός της επαγωγής του διαβήτη έγκειται στην επιλεκτική καταστροφή των παγκρεατικών νησίδων του Langerhans και των β κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση και απελευθέρωση ινσουλίνης (Rakeiten και συν., 1963). Η έλλειψη ινσουλίνης είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη χρόνιας υπεργλυκαιμίας, η οποία με την σειρά της οδηγεί στην εκδήλωση άλλων φαινοτυπικών γνωρισμάτων του διαβήτη, όπως η πολυδιψία και η πολουρία (Rakeiten και συν., 1963).

Πριν την επαγωγή του διαβήτη, η τροφή αφαιρέθηκε από τα πειραματόζωα, τα οποία παράλληλα υποβλήθηκαν σε μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης στην αιματική κυκλοφορία. Η STZ διαλυτοποιήθηκε σε 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού (pH=4.7),

αποτελούμενου από 0.1 M κιτρικό οξύ και 0.1 M κιτρικό νάτριο. Για την πρόκληση του διαβήτη τα πειραματόζωα έλαβαν μία i.p (σύριγγα 1 ml, εξοπλισμένη με βελόνη 27G) χορήγηση STZ, σε δοσολογία 70 mg/kg, 6-8 ώρες μετά την στέρηση τροφής. Η ομάδα ελέγχου (μη διαβητικά ζώα, Control) έλαβε μία i.p χορήγηση 500 μ L διαλύματος κιτρικού. Αμέσως μετά την χορήγηση της STZ, στα πειραματόζωα προσφέρθηκε ζαχαρούχο νερό 10% προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν υπογλυκαιμικά επεισόδια και τοποθετήθηκε πίσω η τροφή. Την επόμενη ημέρα μετά την χορήγηση της STZ, μετρήθηκαν ξανά τα επίπεδα γλυκόζης στην αιματική κυκλοφορία και τα πειραματόζωα θεωρούνταν διαβητικά αν η γλυκόζη \geq 250 mg/dl. Όσα από τα πειραματόζωα δεν πληρούσαν το προαναφερθέν κριτήριο για να θεωρηθούν διαβητικά, αφαιρούνταν από την μελέτη.

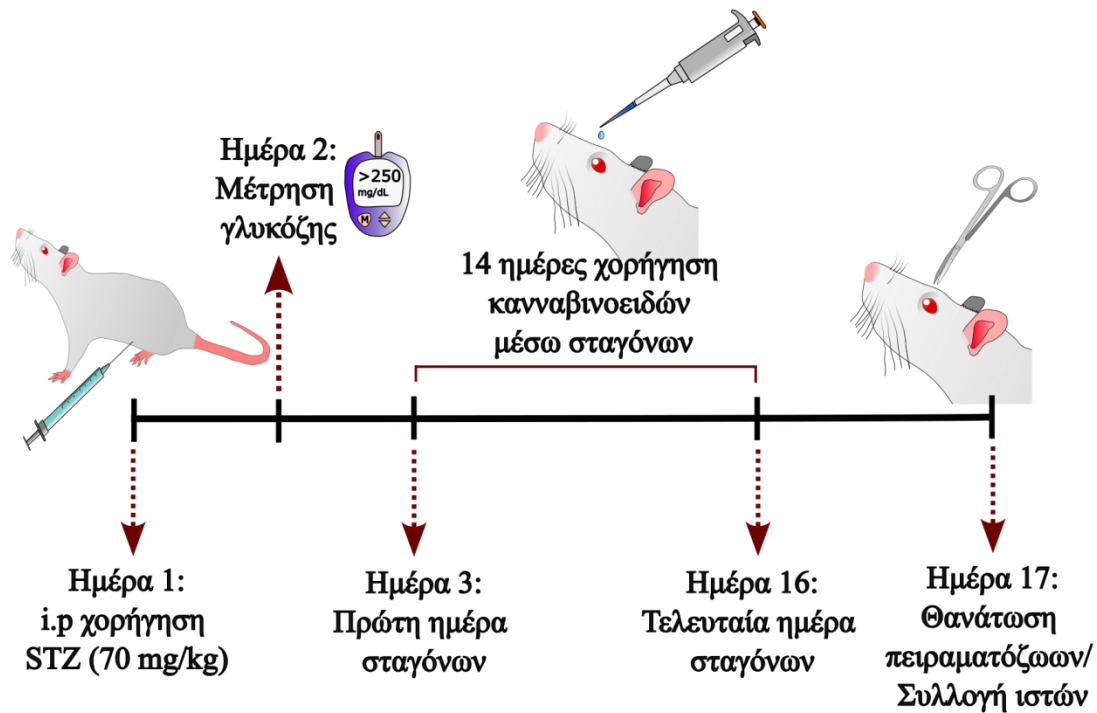
3.3.1. *In vivo* μοντέλο επαγόμενης από STZ διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας

Δύο ημέρες μετά την επαγωγή του διαβήτη με την χρήση STZ, ξεκίνησαν οι χορηγήσεις των προς μελέτη κανναβινοειδών, τοπικά μέσω σταγόνων και διήρκησαν 14 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο 14 ημερών, το οποίο προσομοιάζει το πρώιμο στάδιο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (ΔΑΠΣ) (Hernandez et al., 2013) (βλ. Εικόνα 2.3.1). Ο CB2 αγωνιστής, AM1710 και ο CB1 ανταγωνιστής, SR141716, διαλύθηκαν σε DMSO και χορηγήθηκαν είτε μεμονωμένα είτε ως συνδυαστική θεραπεία. Η δοσολογία που ακολουθήθηκε ήταν 10 mg/mL και συνολικά σε κάθε οφθαλμό χορηγούνταν 20 μ L, μία φορά την ημέρα. Με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό δημιουργήθηκαν οι ακόλουθες ομάδες: 1. Control και διαβητικά ζώα (χωρίς θεραπεία) που έλαβαν σταγόνες DMSO, 2. Διαβητικά ζώα που έλαβαν AM1710 (CB2 αγωνιστής) ή SR141716 (CB1 ανταγωνιστής) ή συνδυασμό AM1710 και SR141716. Οι πειραματικές ομάδες που προέκυψαν αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Πειραματικός σχεδιασμός στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας

Ομάδες	Θεραπεία
Control	DMSO
Διαβητικά χωρίς θεραπεία	DMSO
Διαβητικά με AM1710	AM1710 (10 mg/mL)
Διαβητικά με SR141716	SR141716 (10 mg/mL)
Διαβητικά με AM1710+ SR141716	AM1710+ SR141716 (10mg/mL)

Μία ημέρα μετά την δέκατη-τέταρτη και τελευταία ημέρα σταγόνων, τα πειραματόζωα θανατώνονταν και οι οφθαλμοί προετοιμάζονταν είτε για ανοσοϊστοχημικές μελέτες, είτε για την πραγματοποίηση ELISA ή για την μέτρηση της αγγειακής διαπερατότητας, με την τεχνική Evans Blue.



Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού χρονοδιαγράμματος που ακολουθήθηκε στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας πρώιμου σταδίου (ΔΑΠΣ).

3.4. Μέτρηση της αγγειακής διαπερατότητας με την τεχνική Evans Blue

Η αγγειακή διαπερατότητα βασίζεται στην ουσία στην δυνατότητα του πλάσματος από την αιματική κυκλοφορία να διαπερνά τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό (ΑΑΦ) Αποτελεί σημαντικό κομμάτι για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, καθώς επιτρέπει την εκροή σημαντικών μορίων από την αιματική κυκλοφορία προς τον αμφιβληστροειδή, όπως το νερό, τα ιόντα και διάφορα θρεπτικά συστατικά, τα οποία συμβάλουν στην διατήρηση της ομοιόστασης του αμφιβληστροειδούς (Nidavani και συν., 2014). Ωστόσο σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ΔΑ, που χαρακτηρίζονται από παρουσία φλεγμονής, έχει παρατηρηθεί αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, όπου οι στενές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων που συνθέτουν τον ΑΑΦ χαλαρώνουν, επιτρέποντας την διαρροή επιβλαβών, προφλεγμονωδών μορίων από την αιματική κυκλοφορία, επιδεινώνοντας έτσι την φλεγμονή και διαταράσσοντας την ομοιοστατική ισορροπία του αμφιβληστροειδούς (Ogura και συν., 2017; Kokona και συν., 2018).

Η τεχνική Evans Blue (EB) για την μέτρηση της διαπερατότητας των αγγείων, βασίζεται στην ενδοφλέβια έγχυση της χρωστικής EB. Πρόκειται για μία μη τοξική χρωστική, η οποία μετά την είσοδό της στην αιματική κυκλοφορία, έχει την ιδιότητα να συζευγνύεται με την πρωτεΐνη αλβουμίνη του πλάσματος (Rawson, 1943), ενώ παράλληλα η συγκέντρωσή της στο πλάσμα παραμένει σταθερή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, καθιστώντας την, ιδανικό μέσο για την μέτρηση της διαπερατότητας (Yen και συν., 2013). Η εξαγωγή του EB από τον επιλεγμένο ιστό, εν προκειμένω τον αμφιβληστροειδή, γίνεται με την επώασή του σε φορμαμίδιο και εν συνεχεία μέσω σπεκτροφωτομέτρησης, μπορεί κανείς

να υπολογίσει το ποσοστό της χρωστικής που περιέχεται στον συγκεκριμένο ιστό και κατ' επέκταση την αγγειακή διαπερατότητα (Xu και συν., 2001).

Στην παρούσα μελέτη, το EB διαλύθηκε σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0.9% σε συγκέντρωση 30 mg/mL. Μία ημέρα μετά την τελευταία χορήγηση των σταγόνων, τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν μέσω i.p χορήγησης κεταμίνης (100 mg/mL) και ξυλαζίνης (10 mg/mL), με την χρήση σύριγγας ινσουλίνης, συζευγμένης με βελόνη 27 G. Ακολούθως τα πειραματόζωα έλαβαν ενδοφλεβίως το EB σε μία από τις δύο πλευρικές φλέβες της ουράς, σε δόση 45 mg/kg, μέσω φλεβοκαθετήρα 24G (Braun Introcán). Η αξιολόγηση της σωστής έγχυσης του EB, βασίστηκε αρχικά την ανεμπόδιστη είσοδο του EB στην αιματική κυκλοφορία, ενώ μετά την ολοκλήρωση της ένεσης το πειραματόζωο γινόταν απευθείας μπλέ σε σημεία με εμφανή αγγεία (μύτη, αυτιά, πατούσες, μάτια). Στις περιπτώσεις που δεν πληρούνταν τα δύο προαναφερθέντα κριτήρια, τα πειραματόζωα αφαιρούνταν από την μελέτη. Τα πειραματόζωα στην συνέχεια αφέθηκαν για 2 ώρες, ώστε να επέλθει ομαλή κατανομή του EB στο κυκλοφορικό σύστημα. Μετά το πέρας των δύο ωρών και κάτω από συνθήκες πλήρους αναισθησίας πραγματοποιήθηκε θωρακοτομή και λήφθηκε δείγμα αίματος από την αριστερή κοιλία της καρδιάς με την χρήση σύριγγας 3 ml, εξοπλισμένης με βελόνη 19 G. Το δείγμα αίματος τοποθετήθηκε σε φιαλίδια (μωβ) που περιείχαν τον αντιπηκτικό παράγοντα EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10 λεπτά. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε perfusion (αφαίμαξη) με διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0.9% στους 37°C, για την αποφυγή της συστολής των αγγείων. Αναλυτικότερα πραγματοποιήθηκε έγχυση 40 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου 0.9% στην αριστερή κοιλία της καρδιάς, το οποίο εισερχόμενο στο κυκλοφορικό σύστημα απομάκρυνε το αίμα μέσω οπής που είχε δημιουργηθεί με ψαλίδι, στον δεξιό κόλπο της καρδιάς. Η όλη διαδικασία του perfusion είχε διάρκεια 3-4 λεπτά και μετά το πέρας της οι οφθαλμοί αφαιρούνταν και τοποθετούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 0.1 M στον πάγο. Ο πρόσθιος πόλος που περιείχε τον κερατοειδή, τον κρυσταλοειδή φακό και το υαλώδες υγρό αφαιρούνταν και από τον οπίσθιο πόλο συλλεγόταν ο αμφιβληστροειδής χιτώνας.

Μετά την απομόνωση και την ζύγιση του αμφιβληστροειδούς, 300 μL φορμαμίδιου τοποθετούνταν σε κάθε δείγμα αμφιβληστροειδούς και γινόταν επώαση στους 72°C για 18 ώρες, μέχρις ότου ολοκληρωθεί η εξαγωγή του EB από τον αμφιβληστροειδή. Παράλληλα στα δείγματα αίματος που προηγουμένως είχαν συλλεχθεί, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 2100 g, στους 4°C για 10 λεπτά για να απομονωθεί το πλάσμα. Τα δείγματα του πλάσματος αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 1/1000 σε φορμαμίδιο, μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Πιο συγκεκριμένα 2 μL πλάσματος τοποθετήθηκαν σε 198 μL φορμαμίδιου (1/100) και αφέθηκαν προς επώαση καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα, 50 μL από το ήδη αραιωμένο πλάσμα, προστέθηκαν σε 450 μL φορμαμίδιου (1/10). Μετά το πέρας της επώασης των 18 ωρών τα δείγματα του αμφιβληστροειδούς φυγοκεντρήθηκαν στα 22000 g για 1 ώρα, στους 4°C. Το υπερκείμενο από την φυγοκέντρηση των δειγμάτων του αμφιβληστροειδούς, όπως και τα αραιωμένα δείγματα πλάσματος συνελέγησαν και τοποθετήθηκαν σε πιάτο ELISA 96 θέσεων. Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων σε EB, δημιουργήθηκε καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις του EB σε φορμαμίδιο με εύρος 1000 μg/ml – 0.48 μg/ml. Τα σημεία της καμπύλης, τα δείγματα του αμφιβληστροειδούς και του πλάσματος τοποθετήθηκαν ως διπλές, προς μέτρηση της οπτικής απορρόφησής τους σε σπεκτροφωτόμετρο. Η μέτρηση έγινε στα 620 nm (μέγιστη απορρόφηση του EB στο φορμαμίδιο) και στα 740 nm (ελάχιστη απορρόφηση του EB στο

φορμαμίδιο) (Quam και συν, 2001). Η διαπερατότητα του ΑΑΦ, υπολογίστηκε με την χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$BRB\ leakage = (retina\ EB\ concentration / plasma\ EB\ concentration) / retina\ wet\ weight$

3.5. Μελέτη της έκφρασης του TNF- α και του VEGF με την χρήση ELISA

Στα πειράματα της ΔΑ, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής, sandwich ELISA, με στόχο την διερεύνηση της έκφρασης της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNF- α στον αμφιβληστροειδή των πειραματόζωων. Η τεχνική της sandwich ELISA, όπως υποδηλώνει και το όνομά της, βασίζεται στην αιχμαλώτιση του επιθυμητού αντιγόνου μεταξύ ενός αντισώματος αιχμαλώτισης (capture) και ενός αντισώματος ανίχνευσης (detection). Το αντίσωμα ανίχνευσης εν προκειμένω, είναι συζευγμένο με την βιοτίνη (biotin), μια πρωτεΐνη η οποία έχει υψηλή συγγένεια δέσμευσης για το τετραμερές ένζυμο στρεπταβιδίνη (streptavidin) (Green, 1975). Με την δημιουργία του συμπλόκου βιοτίνης-στρεπταβιδίνης, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα, το οποίο καταλύεται από το σύμπλοκο, δίνοντας ένα χρωματιστό προϊόν που μπορεί να μετρηθεί και επομένως να προσδιοριστεί η ποσότητα του αντιγόνου που περιέχει το δείγμα (Lakshmiriya και συν., 2016).

Για τα πειράματα της παρούσας διατριβής η ELISA για την ανίχνευση του TNF- α (ab100785, Cambridge, U.K) και του VEGF (ab100787, Cambridge, U.K) σε ιστό επίμυος, αγοράστηκε από την abcam. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν διπλέτες και η ποσότητα του TNF- α και του VEGF προσδιορίστηκε μέσω της δημιουργίας καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις τους. Ο προσδιορισμός της ακριβούς συγκέντρωσης τους, έγινε με φωτομέτρηση των δειγμάτων σε σπεκτροφωτόμετρο στα 50 nm (Biorad). Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, η ποσότητα του TNF- α και του VEGF, ομαλοποιήθηκε ως προς την συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης του εκάστοτε δείγματος.

3.6. Μέτρηση των επιπέδων του AM1710 και του SR141716 στον αμφιβληστροειδή, με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, συζευγμένης με σύστημα φασματογραφίας μάζας (HR-LC/MS/MS)

Σε μια διαφορετική υποομάδα υγιών πειραματόζωων, χορηγήθηκε μέσω σταγόνων το AM1710 (10 mg/ml), το SR141716 (10 mg/ml) ή DMSO (έκδοχο). Είκοσι-τέσσερις ώρες μετά την χορήγηση τα πειραματόζωα θανατώθηκαν, απομονώθηκαν οι αμφιβληστροειδείς και αφού ζυγίστηκαν αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Για την εκχύλιση των κανναβινοειδικών αναλόγων 500 μ l ακετονιτρίλιο (0°C) προστέθηκε σε κάθε δείγμα (1 δείγμα= 1 αμφιβληστροειδής). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των δειγμάτων με υπέρηχους (sonication) στον πάγο για 30 δευτερόλεπτα και στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.500 rpm στους 4°C για 1 ώρα. Το υπερκείμενο συνελέγη και τοποθετήθηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυσή του με την χρήση HR-LC/MS/MS.

Για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν διαλύματα του AM1710 και του SR141716 σε συγκεντρώσεις: 0,1, 10, 25, 50, 100 και 250 ng/mL. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός διεξήχθη σε QExactive™ PlusQuadrupole-Orbitrap™ MassSpectrometer (ThermoScientific, MA, USA). Η ποσοτικοποίηση του AM1710 και του SR141716

πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας (ThermoScientific, MA, USA). Χρησιμοποιήθηκε στήλη διαχωρισμού HypersilGoldC18 (100mm × 4,6mm i.d, 5µm) στους 50°C. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες A: H₂O, 0,1% φορμικό οξύ και B: ακετονιτρίλιο, 0,1% φορμικό οξύ. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλουση και ταχύτητα ροής 0,4 mL/min. Το ιόν που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του AM1710 και την παρασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν το 309.2060. Τα ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του και την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν το 283.0963 ως ιόν ποσοτικοποίησης και το 269.0806 ως ιόν επιβεβαίωσης. Για την ανίχνευση του SR141716 και την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε το ιόν 463.0845. Τα ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του και την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν το 362.9849 ως ιόν ποσοτικοποίησης και το 380.9951 ως ιόν επιβεβαίωσης.

Η ανάλυση HR-LC/MS/MS πραγματοποιήθηκε από την Εμμανουέλα Λαποκωνσταντάκη στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Χανιωτάκη Νικόλαου.

3.7. *In vivo* μοντέλο επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυος

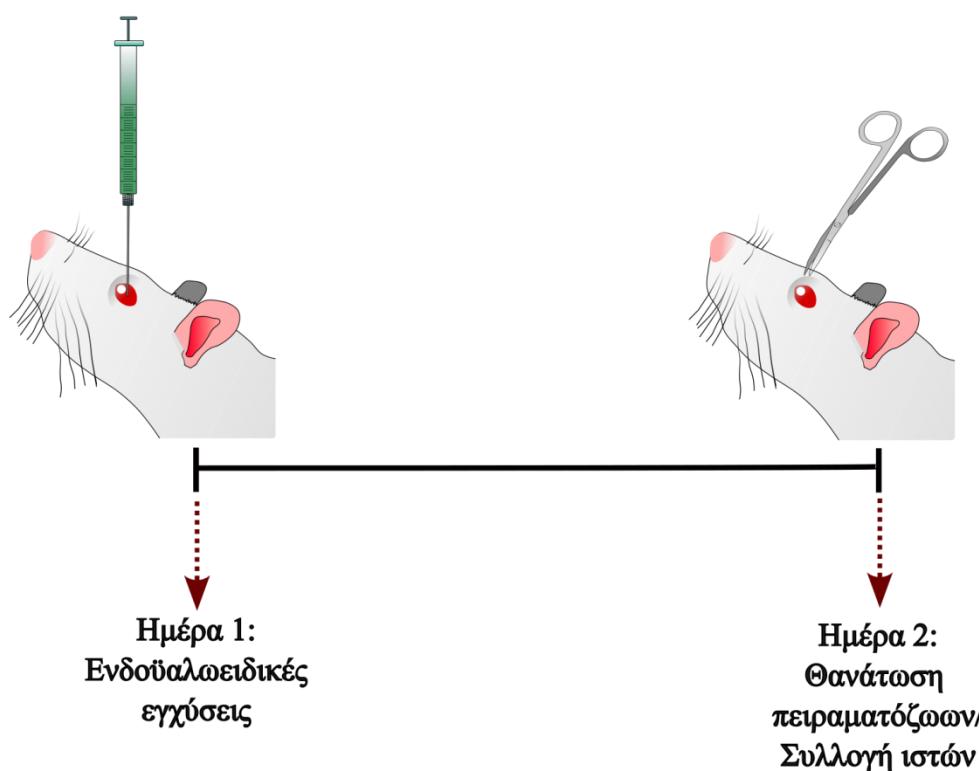
Το διεγερτικό αμινοξύ AMPA χορηγήθηκε ενδοφθαλμώς για την επαγωγή διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή των πειραματόζωων (Kiagiadaki και Themos, 2008). Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με i.p ένεση κεταμίνης (100 mg/kg) και ξυλαζίνης (10 mg/kg) και το κεφάλι τους ακινητοποιήθηκε με την βοήθεια στερεοσταξικής συσκευής. Για τις εγχύσεις χρησιμοποιήθηκαν βελόνες 27G συζευγμένες με λεπτά σωληνάκια σιλικόνης, τα οποία με την σειρά τους ήταν συνδεδεμένα σε σύριγγες Hamilton. Η σύριγγα Hamilton ήταν προσαρμοσμένη σε ειδική αντλία έγχυσης (minipump, CMA Microdialysis Ltd), εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ομαλή ροή του διαλύματος προς τον αμφιβληστροειδή, η οποία ορίστηκε ως 1µl/min, με ένα συνολικό όγκο 5 µl να διοχετεύεται σε κάθε οφθαλμό. Η διάτρηση των οφθαλμών για την πραγματοποίηση των εγχύσεων πραγματοποιούταν 8-10 χιλιοστά πίσω από το όριο του σκληρού με τον κερατοειδή χιτώνα, μέσα στο υαλώδες υγρό του οφθαλμού.

Τα πειραματόζωα έλαβαν ενδοφθαλμώς PBS 50 m M (Control), ή AMPA (42 nmol). Για την εκτίμηση των επιδράσεων της αναστολής των αποδομητικών ενζύμων του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG, σε μια ξεχωριστή ομάδα πειραματόζωων το AMPA συγχορηγήθηκε είτε με AM1200 (αναστολέας της ABHD6, 10⁻⁵-10⁻³ M) ή με το AM11920 (διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας, 10⁻⁶-10⁻⁴ M) (βλ. Πίνακα 2).

Πίνακας 2. Πειραματικός σχεδιασμός στο *in vivo* μοντέλο της επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας

Ομάδα ελέγχου	Πειραματικές ομάδες		
Control	AMPA	AMPA+αναστολείς μεταβολισμού του 2-AG	
Έγχυση PBS 50 mM	Έγχυση AMPA (42 nmol/οφθαλμό)	AMPA+AM12100 (10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M)	AMPA+AM11920 (10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M)

Είκοσι- τέσσερις ώρες μετά την ολοκλήρωση των εγχύσεων τα πειραματόζωα θανατώνονταν (βλ. Εικόνα 3.2), οι οφθαλμοί τους αφαιρούνταν και επεξεργάζονταν καταλλήλως για την ανάλυση που θα ακολουθούσε.



Εικόνα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού χρονοδιαγράμματος που ακολουθήθηκε στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας.

3.8. Αφαίρεση και προετοιμασία ιστών

Για τις ανοσοϊστοχημικές και ιστοχημικές αναλύσεις, οι οφθαλμοί μετά την αφαίρεση τους από τα ζώα, τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 0.1 M. Ακολούθως μετά την αφαίρεση των εναπομεινάντων μυών περιμετρικά των οφθαλμών, με την χρήση βελόνης 21 G, πραγματοποιήθηκε διάτρηση στο κεντρικό σημείο του κερατοειδούς. Οι οφθαλμοί τοποθετήθηκαν σε διάλυμα παραφολμαδεΰδης 4% (PFA 4%) για 45 λεπτά, προκειμένου να μονιμοποιηθούν μερικώς. Ύστερα, με την βοήθεια ψαλιδιού, ο πρόσθιος πόλος του οφθαλμού (κερατοειδής χιτώνας, φακός, υαλώδες υγρό) αφαιρέθηκαν και ο οπίσθιος πόλος (σκληρός χιτώνας και αμφιβληστροειδής) επώαστηκε για 1.5 ώρα σε PFA 4%, μέχρις ότου μονιμοποιηθεί πλήρως. Για την επίτευξη κρυοπροστασίας, οι μονιμοποιημένοι ιστοί επώαστηκαν καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας σε διάλυμα σουκρόζης 30% (σε PB 0.1 M), στους 4°C. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε το πάγωμα των δειγμάτων, όπου αρχικά τοποθετήθηκε στο εσωτερικό των δειγμάτων optimal cutting temperature compound (OCT) και εμβυθίστηκαν σε ισοπεντάνιο στους -45 έως -55°C, σε ξηρό πάγο. Οι ιστοί αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Με την χρήση κρυοτόμου (Leica), λήφθηκαν κάθετες τομές πάχους 10 μm στους -25°C. Οι τομές λήφθηκαν από το κέντρο του αμφιβληστροειδούς, πλησίον του επιπέδου του οπτικού νεύρου και τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα έφερε από 6-9 τομές και για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 7 αντικειμενοφόρες πλάκες. Μετά την

ολοκλήρωση της κοπής, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση των ανοσοϊστοχημικών μελετών.

Για πειράματα, όπου απαιτούνταν η λήψη ιστών, όπως η μέτρηση της διαπερατότητας με την τεχνική EB και η ELISA, αρχικά διαχωρίστηκε ο πρόσθιος από τον οπίσθιο πόλο του οφθαλμού, κατά παρόμοιο τρόπο όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Εν συνεχεία με την βοήθεια σπάτουλας απομονώθηκε ο αμφιβληστροειδής από τον οπίσθιο πόλο και τοποθετήθηκε στους -80°C μέχρι την μελλοντική ανάλυσή τους.

3.9. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Για τις μελέτες ανοσοφθορισμού, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές αφαιρέθηκαν από τους -20°C και αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ποιότητα και η ενίσχυση του σήματος της ανοσοϊστοχημείας, έπρεπε να εξασφαλιστεί η απρόσκοπτη πρόσδεση του αντισώματος με τον αντίστοιχο επίτοπο του αντιγόνου. Πολλές φορές η μονιμοποίηση των ιστών με φορμαλίνη οδηγεί στο «καμουφλάρισμα» των επιτόπων, με αποτέλεσμα το αντίσωμα να αδυνατεί να προσδεθεί με τον συγκεκριμένο επίτοπο. Γι' αυτόν τον λόγο πραγματοποιήθηκε επαγόμενη από θερμότητα ανάκληση επιτόπου (heat-induced epitope retrieval) κατά την οποία αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με TBS 0.1 M και ακολούθησε επώαση των τομών σε διάλυμα κιτρικού (10mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, p.H=6.0), στους 95-100°C για δέκα λεπτά. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις πέντε λεπτών η καθεμία, σε TBS 0.1M με 0.025% Triton X-100. Το Triton X-100 εκτός από την ιδιότητά του ως απορρυπαντικού να ανοίγει οπές στην μεμβράνη των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε επίσης και εξαιτίας της ικανότητάς του να μειώνει την επιφανειακή τάση, γεγονός που επέτρεψε την εύκολη κάλυψη όλου του εμβαδού των τομών. Εν συνεχεία, προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης στον ιστό, ακολούθησε επώαση των τομών σε 10% φυσιολογικό ορό αίγας (normal goat serum, NGS, Sigma-Aldrich) και 1% ορό αλβουμίνης βοοειδών (Bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich) σε TBS 0.1 M για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα οι τομές επωάστηκαν με το εκάστοτε πρωτογενές αντίσωμα (βλ. Πίνακα 3), διαλυμένο σε TBS 0.1 M με 1% BSA, καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας (16-18 ώρες), στους 4°C.

Πίνακας 3. Αναλυτική περιγραφή των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Πρωτογενή Αντισώματα						
Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραίωση	Στόχος	Εταιρεία	Code no.	Lot no.
bNOS (brain nitric oxide synthetase) (πολυκλωνικό)	Κουνέλι	1/2000	Δείκτης βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου	Sigma, St. Louis, MO	N7280	062M483 9
NFL (neurofilament)	Μυς	1/500	Δείκτης των	Millipore, Darmstadt,	MAB161	2736736

(μονοκλωνικό)			αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων	Germany	5	
Cleaved-caspase 3 (μονοκλωνικό)	Κουνέλι	1/300	Δείκτης αποκομμένης κασπάσης 3 (αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος)	Cell Signaling, Massachusetts, USA	9661S	47
NT (nitrotyrosine) (πολυκλωνικό)	Κουνέλι	1/1000	Δείκτης νιτροτυροσίνης (νιτρικού στρες)	Millipore, Darmstadt, Germany	06-284	3199176
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Μυς	1/2000	Δείκτης μακρογλοίας (αστοκύτταρα και κύτταρα του Muller)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	AB5804	2424641
Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)	Κουνέλι	1/2500	Δείκτης μικρογλοιακών κυττάρων και μακροφάγων	WAKO Chemicals, Osaka, Japan	019-19741	-
CD31/PECAM1 (Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1)	Κουνέλι	1/100	Δείκτης ενδοθηλιακών κυττάρων	Novus Biologicals, Cambridge, UK	NB100-64796	-
Δευτερογενή αντισώματα						
Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραίωση	Στόχος	Εταιρεία	Code no.	Lot no.
CF543 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Αίγα	1/1000	Κουνέλι	Biotium, Fremont, CA	20309	12C0213
CF488A goat anti-mouse IgG (H+L)	Αίγα	1/400	Μυς	Biotium, Fremont, CA	20010	13C0619
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Αίγα	1/1000	Μυς	Invitrogen, Waltham, Massachusetts	A11029	2306576

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στο πρωτογενές αντίσωμα, πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις πέντε λεπτών σε TBS 0.1 M με 0.025% Triton X-100. Ακολούθησε η επώαση στο δευτερογενές αντίσωμα (βλ. Πίνακα 3), διαλυμένο σε TBS 0.1 M με 1% BSA, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες πλήρους συσκότισης εξαιτίας της φωτοευαισθησίας

φύσης των δευτερογενών αντισωμάτων. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στο δευτερογενές αντίσωμα, πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις πέντε λεπτών η καθεμία, σε TBS 0.1 M. Οι τομές επώαστηκαν επίσης σε TBS 0.1 M με τον δείκτη των κυτταρικών πυρήνων DAPI (1/3000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) για 1 λεπτό. Στις τομές προστέθηκε μέσο κάλυψης φθορισμού Ibbidi (Ibbidi mounting medium) και καλύφθηκαν με την βοήθεια καλυπτρίδων. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε σκοτεινά κουτιά και φυλάχθηκαν στους 4°C, μέχρι την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού. Για τις μελέτες συνεντοπισμού, όπου απαιτούνταν η επώαση των ιστών σε περισσότερα του ενός αντισώματα, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το ακόλουθο: 1. επώαση στο 1^ο πρωτογενές αντίσωμα, 2. επώαση στο 1^ο δευτερογενές αντίσωμα, 3. επώαση στο 2^ο πρωτογενές αντίσωμα και 4. επώαση στο 2^ο δευτερογενές αντίσωμα, σύμφωνα με τις οδηγίες που προαναφέρθηκαν.

3.10. Ιστολογική χρώση

Σε μια συγκεκριμένη υποομάδα δειγμάτων, στα πειράματα της ΔΑ, χρησιμοποιήθηκε η χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (Hematoxylin-Eosin, H&E), προκειμένου να μετρηθεί το πάχος των ιστών και κατά πόσο αυτό επηρεάζεται από τις θεραπείες με τα κανναβινοειδή. Η αιματοξυλίνη βάφει τους κυτταρικούς πυρήνες με σκούρο μπλε, ενώ η ηωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα με ανοιχτό ροζ χρώμα. Η χρώση H&E αγοράστηκε από την Abcam (ab245880) και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αναφέρεται παρακάτω. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα προς μελέτη δείγματα αφέθηκαν για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μισής ώρας πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις με αποσταγμένο νερό, δέκα λεπτών έκαστη, προκειμένου να ενυδατωθούν οι τομές. Οι τομές στην συνέχεια καλύφθηκαν με αιματοξυλίνη, στην οποία επώαστηκαν για τέσσερα λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις με αποσταγμένο νερό για να απομακρυνθεί η αιματοξυλίνη. Ακολούθως οι τομές καλύφθηκαν με Bluing Reagent για 10-15 δευτερόλεπτα και πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις σε αποσταγμένο νερό για την αφαίρεση του Bluing Reagent. Ύστερα οι αντικειμενοφόρες πλάκες, με τις τομές, εμβαπτίστηκαν μία φορά σε 100% αιθυλική αλκοόλη και η περισσευούμενη ποσότητα αλκοόλης γύρω από τις τομές, απομακρύνθηκε με την βοήθεια χαρτιού. Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την επώαση των τομών στην ηωσίνη για δύο λεπτά. Δύο πλύσεις με 100% αιθυλική αλκοόλη, βοήθησαν στην απομάκρυνση της ηωσίνης από τις αντικειμενοφόρες πλάκες, οι οποίες στην συνέχεια εμβαπτίστηκαν τρεις φορές σε 100% αιθυλική αλκοόλη, για να αφυδατωθούν. Τέλος για την κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών, χρησιμοποιήθηκε το μέσο κάλυψης για ιστολογία, DPX (Sigma-Aldrich, 44581) και οι πλάκες φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο.

3.11. Μικροσκοπία και μελέτες ποσοτικοποίησης

Οι φωτογραφίες από τις ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις λήφθηκαν με την χρήση μικροσκοπίου ανοσοφθορισμού Leica DMLB (HCX PL Fluotar, 40x/0.70 or 20x/0.50 φακός, Leica Microsystems, Germany), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με μία Leica DC 300 F κάμερα. Η επεξεργασία παραμέτρων όπως η φωτεινότητα, η αντίθεση κ.λπ., πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ειδικού λογισμικού Leica. Για περαιτέρω επεξεργασία, όπως η περικοπή, η περιστροφή των εικόνων ή η αλλαγή της ανάλυσής τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Photoshop ver. 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων, αναφέρεται εκτενώς παρακάτω:

Ανοσοδραστικότητα bNOS: Τα βραχύνια κύτταρα που εκφράζουν bNOS μετρήθηκαν χειροκίνητα από τον πειραματιστή, καθ' όλο το μήκος της τομής. Συνολικά μετρήθηκαν τρεις τομές για κάθε δείγμα, ο μέσος όρος των οποίων μας έδινε τον μέσο όρο του συγκεκριμένου δείγματος.

Ανοσοδραστικότητα NFL: Δύο μη αλληλεπικαλυπτόμενες φωτογραφίες λήφθηκαν για κάθε τομή, στο κεντρικό τμήμα του αμφιβληστροειδούς και συνολικά για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις τομές (6 φωτογραφίες/δείγμα). Για την περικοπή των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Photoshop ver. 7.0. Στην συνέχεια η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους. 1. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ 1.44, μετρήθηκε η μέση τιμή του γκρι (mean gray value) της NFL ανοσοδραστικότητας για κάθε φωτογραφία. Ο μέσος όρος των έξι τιμών που προέκυπταν από την ανάλυση των έξι διαφορετικών φωτογραφιών, αποτελούσε την τιμή του δείγματος. 2. Ο δεύτερος τρόπος ποσοτικοποίησης, περιλάμβανε την μέτρηση του πάχους της NFL ανοσοδραστικότητας, με την χρήση του ImageJ 1.44. Για κάθε φωτογραφία το πάχος της NFL ανοσοδραστικότητας, μετρήθηκε σε τρία διαφορετικά σημεία του πλάτους της εικόνας (100, 200 και 300 μm), με το συνολικό πλάτος της εικόνας να είναι 400 μm . Ο μέσος όρος των τριών τιμών χρησιμοποιούταν για τον υπολογισμό της τιμής της κάθε τομής και οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνταν στην συνέχεια για τον υπολογισμό του μέσου όρου κάθε δείγματος.

Ανοσοδραστικότητα cleaved caspase 3: Κατά παρόμοιο τρόπο, λήφθηκαν συνολικά έξι φωτογραφίες από κάθε δείγμα (2 φωτογραφίες/τομή, 3 τομές/δείγμα). Ο αριθμός των θετικών στην cleaved caspase 3 κυττάρων, μετρήθηκε χειροκίνητα σε όλες τις φωτογραφίες, όπως επίσης και το εμβαδό της περιοχής (μm^2) που αντιστοιχούσε σε αυτά τα κύτταρα, με τη χρήση του ImageJ 1.44. Η τελική τιμή για κάθε δείγμα εκφραζόταν, ως ο λόγος του συνολικού αριθμού κυττάρων για κάθε δείγμα, προς το εμβαδόν της αντίστοιχης περιοχής που καταλάμβαναν.

Ανοσοδραστικότητα NT: Για την ποσοτικοποίηση του NT ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε πιο πάνω για την ποσοτικοποίηση της cleaved caspase 3.

Ανοσοδραστικότητα Iba1: Με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά τα μικρογλοιακά κύτταρα χωρίστηκαν σε απενεργοποιημένα (resting) και αντιδραστικά (reactive) (Spyridakos και συν., 2021). Η απενεργοποιημένη μικρογλοία είναι η κατάσταση στην οποία συναντάται η μικρογλοία υπό φυσιολογικές συνθήκες και μορφολογικά χαρακτηρίζεται από αστεροειδές σχήμα με μικρό πυρήνα και κυτταρικό σώμα από το οποίο εκφύονται λεπτές αποφυάδες (Davis και συν., 2017). Αντιθέτως, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η παρουσία φλεγμονής, η μικρογλοία «ενεργοποιείται» και παρουσιάζει μια δραματική μορφολογική αλλαγή, αποκτώντας μια αμοιβαδοειδή μορφολογία με μεγάλο πυρήνα και κυτταρικό σώμα με ελάχιστες παχιές αποφυάδες να εκφύονται από αυτά. Μάλιστα, σε αρκετά προχωρημένα στάδια ενεργοποίησης, τα αντιδραστικά μικρογλοιακά κύτταρα όπως ονομάζονται, μπορεί να εμφανίζονται και με μια εντελώς κυκλική μορφολογία, με πλήρη απουσία αποφυάδων (Davis και συν., 2017). Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο αριθμός των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων και πραγματοποιήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο, όπως αυτή της cleaved caspase 3.

Ανοσοδραστικότητα GFAP: Για την ποσοτικοποίηση της GFAP ανοσοδραστικότητας χρησιμοποιήθηκε μία κλίμακα βαθμολόγησης από 0 έως 5 (Anderson και συν., 2008), η

οποία βασίζεται στην περιοχή που καλύπτουν οι θετικές στην GFAP αποφυάδες των κυττάρων Muller. Αναλυτικά η κλίμακα παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αναλυτική περιγραφή της κλίμακας βαθμολόγησης που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της GFAP ανοσοδραστικότητας. Λήφθηκε από Anderson και συν. (2008) και τροποποιήθηκε.

Βαθμολογία	Περιγραφή
0	Ανύπαρκτη χρώση
1	Απολήξεις των κυττάρων Muller μόνο στην GCL
2	Απολήξεις των κυττάρων Muller στην GCL και μερικές εκτός των ορίων της GCL
3	Απολήξεις των κυττάρων Muller και πολλές προεκβολές, που όπως δεν φθάνουν μέχρι την ONL
4	Απολήξεις των κυττάρων Muller και πολλές προεκβολές, με μερικές να φθάνουν μέχρι την ONL
5	Απολήξεις των κυττάρων Muller και πολλές έντονες προεκβολές, από την GCL μέχρι το ανώτατο όριο της ONL

Ιστολογική χρώση Ηωσίνης/ Αιματοξυλίνης (H&E): Η ποσοτικοποίηση της χρώσης H&E έγινε χρησιμοποιώντας δύο μη αλληλεπικαλυπτόμενες εικόνες από το κεντρικό σημείο κάθε τομής και συνολικά αναλύθηκαν τρεις τομές από κάθε δείγμα (συνολικά έξι φωτογραφίες για κάθε δείγμα). Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν αρχικά με το Photoshop ver. 7, για να γίνει η περιστροφή και η περικοπή τους. Το συνολικό πάχος των τομών για κάθε δείγμα, καθώς και το ξεχωριστό πάχος των επιμέρους στιβάδων, μετρήθηκε με την χρήση του λογισμικού ImageJ 1.44. Αναλυτικότερα το πάχος μετρήθηκε σχεδιάζοντας τρεις ευθείες γραμμές σε συγκεκριμένα σημεία του πλάτους της εικόνας (100, 200 και 300 μm), με το συνολικό πλάτος της εικόνας να κυμαίνεται στα 400 μm. Η μέση τιμή για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική ανάλυση. Επιπροσθέτως ο αριθμός των γαγγλιακών κυττάρων στην GCL, μετρήθηκε χειροκίνητα, ξεκινώντας 50 μm μετά το αριστερό μέρος της κάθε φωτογραφίας και τελειώνοντας 50 μm πριν το δεξιό μέρος της φωτογραφίας.

3.12. Στατιστική ανάλυση

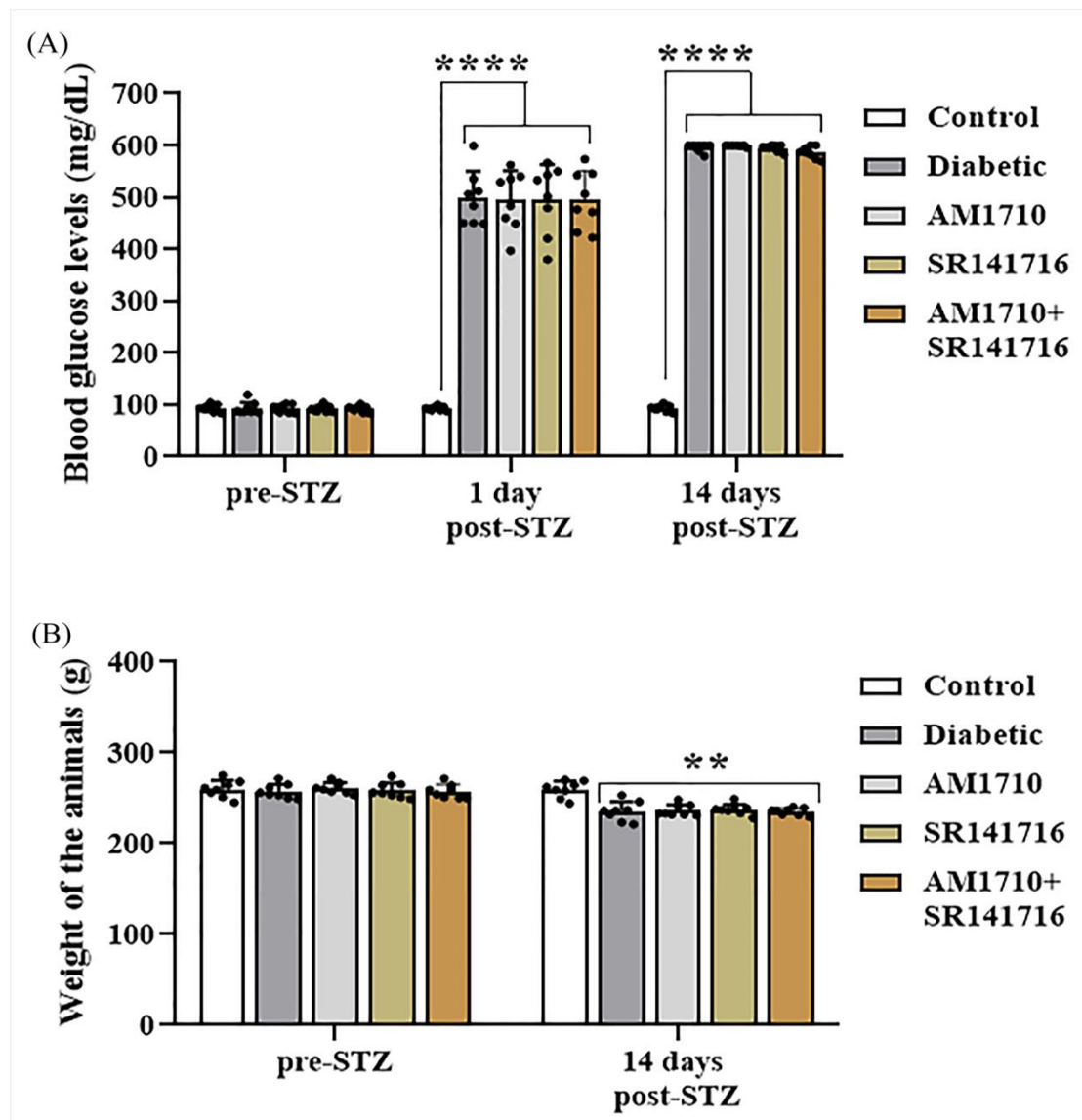
Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Graph Pad Prism 8.0.1 και τα δεδομένα από όλες τις αναλύσεις, εκτός από την ELISA και το EB, εκφράστηκαν ως ποσοστό επί της % του Control. Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση κάθε δείγματος και για την παρουσίασή τους επιλέχθηκε συνδυασμός ραβδογράμματος με διάγραμμα διασποράς. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την χρήση μονής ανάλυσης διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Η διπλή ανάλυση διακύμανσης (Two Way ANOVA), χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των διαφορετικών ομάδων στην μέτρηση του πάχους των ξεχωριστών στιβάδων στην χρώση H&E, ακολουθούμενη από ανάλυση Sidak's για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές όταν $p < 0.05$

4. Αποτελέσματα

1^ο Μέρος: Επιδράσεις των κανναβινοειδών σε ένα *in vivo* μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας πρώιμου σταδίου.

4.1. Επιδράσεις των κανναβινοειδών στα επίπεδα γλυκόζης και στο βάρος των ζώων μετά την χορήγηση STZ

Πριν την χορήγηση του STZ, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των πέντε διαφορετικών ομάδων ($p > 0.05$). Μία ημέρα και δεκατέσσερις ημέρες μετά την χορήγηση STZ, σε όλα τα διαβητικά ζώα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (***) $p > 0.0001$ σε σύγκριση με το Control), ενώ η χορήγηση μέσω σταγόνων των κανναβινοειδών δεν επηρέασε τα επίπεδα γλυκόζης των διαβητικών ζώων ($p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated) (Εικόνα 4.1.A). Ποσοτική ανάλυση του βάρους των ζώων, πριν και μετά την χορήγηση του STZ. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε στο βάρος των ζώων, ανάμεσα στις πέντε διαφορετικές ομάδες, πριν την χορήγηση του STZ ($p > 0.05$) (Εικόνα 4.1.B). Δεκατέσσερις ημέρες μετά την χορήγηση του STZ, όλα τα διαβητικά ζώα επέδειξαν σημαντική μείωση στο βάρος τους σε σχέση με τα Control (Diabetic untreated: ** $p=0.0067$, AM1710: ** $p=0.0052$, SR141716: ** $p=0.0023$, AM1710+SR141716: ** $p=0.0045$) (Εικόνα 4.1.B). Μεταξύ των διαβητικών ζώων που δεν έλαβαν θεραπεία και αυτών που έλαβαν, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά, ως προς το βάρος τους ($p > 0.05$), (Εικόνα 4.1.B).



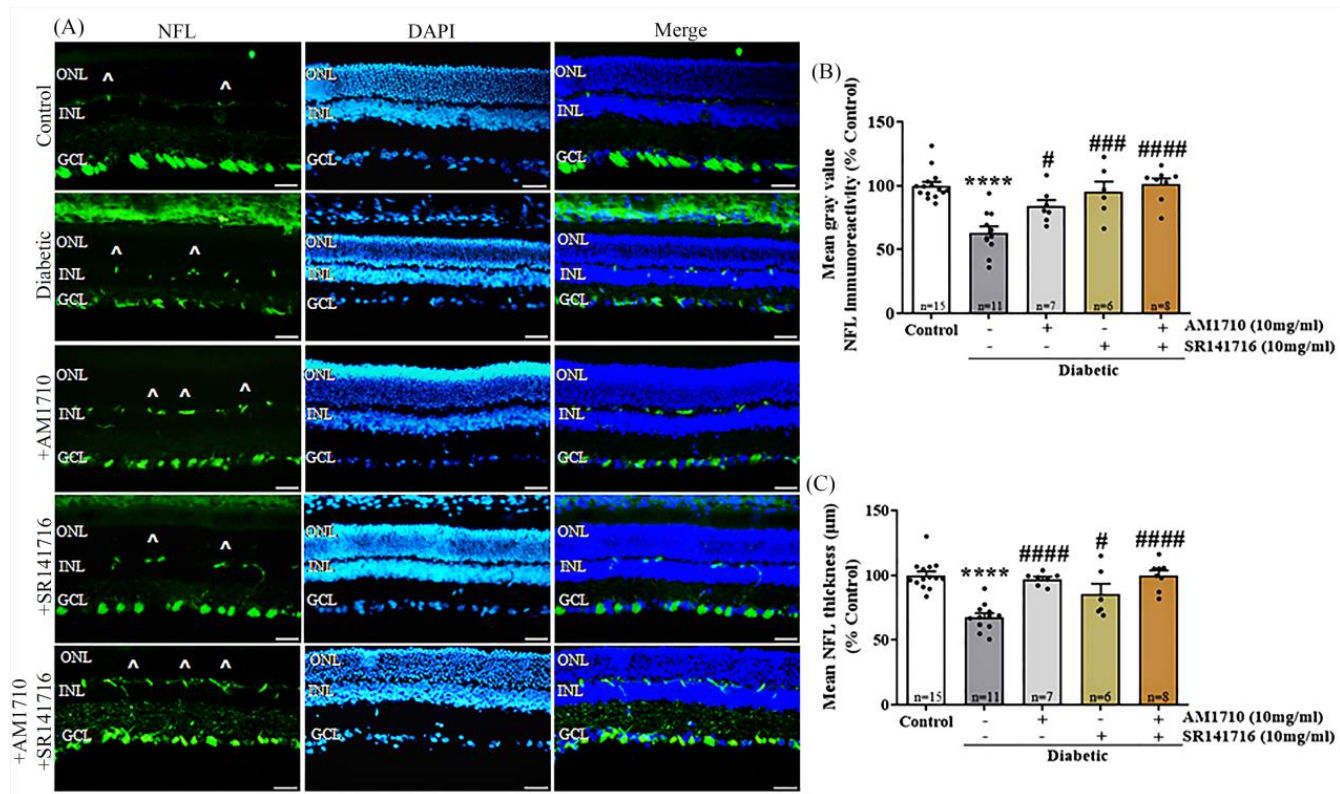
Εικόνα 4.1. Επιδράσεις του STZ και της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στα επίπεδα γλυκόζης και στο βάρος των ζώων. (A) Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των πέντε διαφορετικών πειραματικών ομάδων, πριν και μετά την χορήγηση του STZ. (B) Ποσοτική ανάλυση του βάρους των ζώων, πριν και μετά την χορήγηση του STZ. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.2. Χορήγηση CB2 αγωνιστή, CB1 ανταγωνιστή ή του συνδυασμού τους, προστατεύει τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων στον διαβητικό αμφιβληστροειδή

Η χορήγηση τοπικά, μέσω σταγόνων CB2 αγωνιστή (AM1710), CB1 ανταγωνιστή (SR141716) ή του συνδυασμού τους, ανέστειλε την επαγόμενη από τον διαβήτη απώλεια των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, όπως φάνηκε από την NFL ανοσοδραστικότητα (Εικόνα

4.2). Αρχικά εκτιμήθηκε η ένταση της ανοσοδραστικότητας του NFL. Όπως φάνηκε από τις μελέτες ποσοτικοποίησης, τα διαβητικά ζώα που δεν έλαβαν θεραπεία (Diabetic untreated), υπέστησαν περίπου 38% μείωση στην ένταση της NFL ανοσοδραστικότητας, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Control) (Control: $n=15$, 100 ± 11.46 . Diabetic untreated: $n=11$, 62.96 ± 16.73 , $***p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.2.B). Η τοπική χορήγηση τόσο του CB2 αγωνιστή AM1710, όσο και του CB1 ανταγωνιστή, SR141716 κατήργησαν την απώλεια της NFL ανοσοδραστικότητας, παρέχοντας σημαντική προστασία στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων (AM1710: $n=7$, 83.66 ± 13.25 , $\#p=0.0403$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control. SR141716: $n=6$, 94.99 ± 20.09 , $###p=0.0008$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ως προς την αποτελεσματικότητά τους (AM1710, $p > 0.05$ compared to SR141716) (Εικόνα 4.2.B). Κατά παρόμοιο τρόπο με τις μονές, η συνδυαστική θεραπεία (AM1710+SR141716) προστάτευσε τους άξονες, όπως φάνηκε από την επαναφορά της έντασης της NFL ανοσοδραστικότητας σε φυσιολογικά επίπεδα, παρόμοια με αυτά του Control (AM1710+SR141716: $n=8$, 101.1 ± 13.08 , $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control), χωρίς μάλιστα να έχει κάποια διαφορά από τις μονές θεραπείες (AM1710+SR141716: $p > 0.05$ σε σύγκριση είτε με το AM1710 είτε το SR141716) (Εικόνα 4.2.B).

Για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων, προχωρήσαμε και σε διαφορετικό τρόπο επεξεργασίας των ευρημάτων, κατά τον οποίο εξετάσαμε τις επιδράσεις των κανναβινοειδών στο πάχος της NFL στιβάδας. Κατά παρόμοιο τρόπο, εξετάζοντας το πάχος της NFL ανοσοδραστικότητας, προέκυψε μια σημαντική μείωση του πάχους στα διαβητικά ζώα σε σχέση με τα Control (Control: 100 ± 11.07 . Diabetic untreated: 67.71 ± 10.36 , $***p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.2.C). Η τοπική χορήγηση των μονών θεραπειών με τα κανναβινοειδή, συνέβαλε στην διατήρηση του πάχους της NFL ανοσοδραστικότητας στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς (AM1710: 97.06 ± 4.88 , $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control. SR141716: 85.73 ± 18.81 , $\#p=0.0183$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.2.C). Η διπλή θεραπεία με τα κανναβινοειδή κατάφερε και αυτή να διατηρήσει εξίσου αποτελεσματικά το πάχος της NFL ανοσοδραστικότητας σε φυσιολογικά επίπεδα (AM1710+SR141716: 99.80 ± 11.00 , $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το AM1710, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το SR141716) (Εικόνα 4.2.C).



Εικόνα 4.2. Επιδράσεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στην βιωσιμότητα των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων. **(Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της ανοσοδραστικότητας NFL σε τομές αμφιβληστροειδούς. Το σύμβολο ^ υποδεικνύει την μη ειδική χρώση του δευτερογενούς αντισώματος CF488 goat anti-mouse στην IPL. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μ m. **(Β)** Ποσοτική ανάλυση της έντασης φθορισμού της NFL ανοσοδραστικότητας, **(C)** ποσοτική ανάλυση του πάχους (μ m) της στιβάδας NFL και των επιδράσεων της χορήγησης AM1710, SR141716 και του συνδυασμού τους. **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

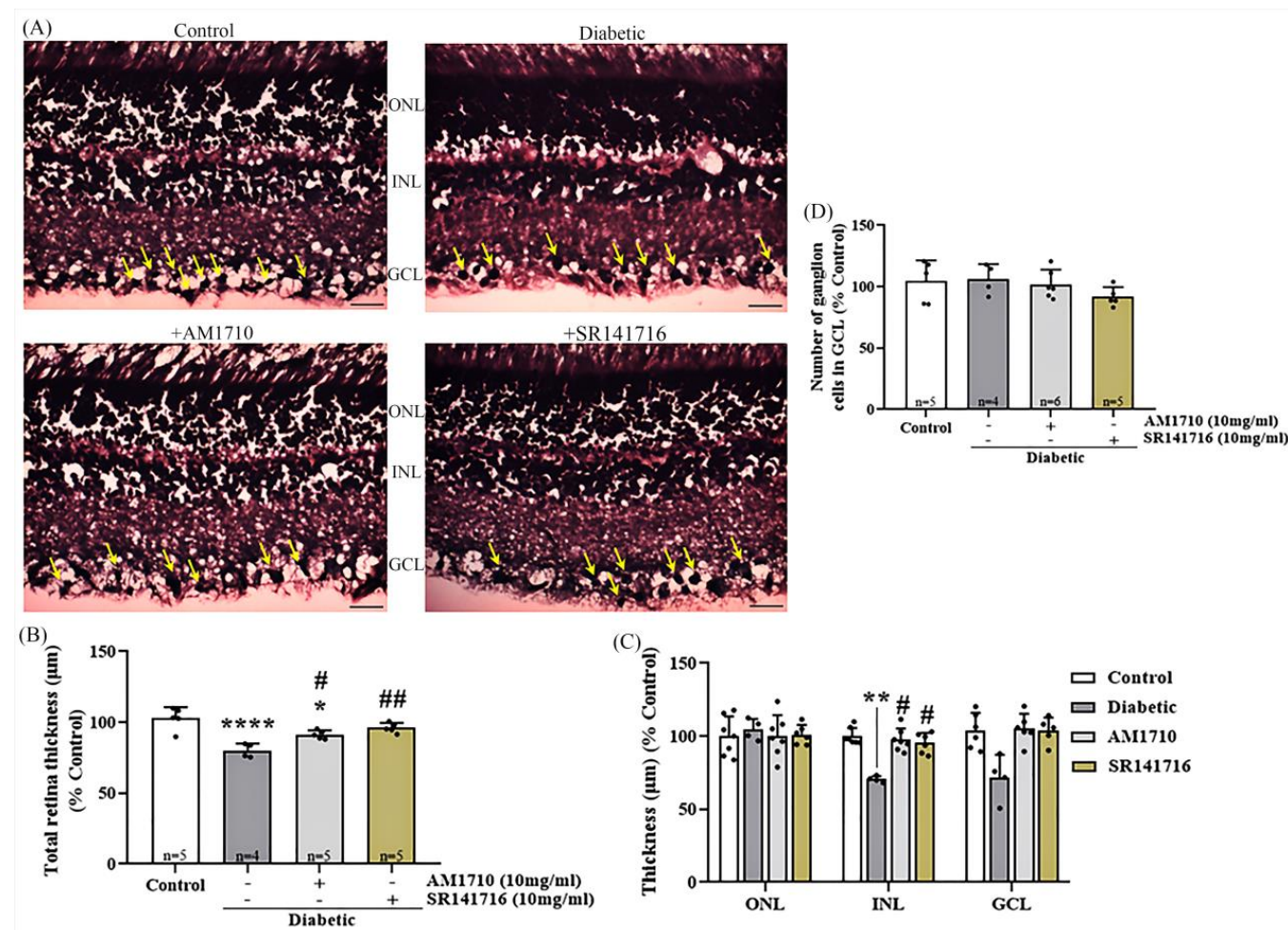
4.3. Χορήγηση CB2 αγωνιστή ή CB1 ανταγωνιστή επαναφέρει το πάχος του διαβητικού αμφιβληστροειδούς σε φυσιολογικά επίπεδα

Προκειμένου να εξεταστούν οι επιδράσεις των κανναβινοειδών στην ιδιαίτερη κυτταροαρχιτεκτονική του αμφιβληστροειδούς κατά το πρώιμο στάδιο της ΔΑ, πραγματοποιήθηκε μορφομετρική ανάλυση, με την χρήση της ιστολογικής χρώσης H&E (Εικόνα 4.2.A). Η ποσοτική ανάλυση του συνολικού πάχους του αμφιβληστροειδούς, υπέδειξε σημαντική μείωση του πάχους στα διαβητικά ζώα σε σύγκριση με τα υγιή (Control: n=5, 100 \pm 7.9. Diabetic untreated: n=4, 80.11 \pm 4.86, **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control). Η χορήγηση του CB2 αγωνιστή, AM1710, επανέφερε μερικώς το πάχος του αμφιβληστροειδούς στα διαβητικά ζώα (AM1710: n=5, 91.33 \pm 3.07, # $p = 0.0271$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, * $p = 0.0161$ σε σύγκριση με το Control). Ο CB1 ανταγωνιστής, SR141716, επανέφερε πλήρως το μειωμένο πάχος του αμφιβληστροειδούς στα διαβητικά ζώα

(SR141716: $n=5$, 96.06 ± 3.50 , $^{##}p=0.0019$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p>0.05$ σε σύγκριση με το Control).

Έχοντας εξακριβώσει τις επιδράσεις του διαβήτη και των κανναβινοειδών στο συνολικό πάχος του αμφιβληστροειδή, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του πάχους των ξεχωριστών πυρηνικών στιβάδων του αμφιβληστροειδούς (ONL, INL & GCL). Ο διαβήτης προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους, μόνο της στιβάδας INL (Control: $n=5$, 100 ± 5.6 . Diabetic untreated: $n=4$, 70.57 ± 2.10 , $^{**}p=0.0034$ σε σύγκριση με το Control), ενώ δεν είχε καμία επίπτωση στις άλλες δύο στιβάδες (Εικόνα 4.2.B). Τόσο το AM1710, όσο και το SR141716 επανέφεραν πλήρως το πάχος της INL σε επίπεδα, όμοια με αυτά του Control AM1710: $n=5$, 97.50 ± 7.77 , $^{#}p=0.0244$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p>0.05$ σε σύγκριση με το Control. SR141716: $n=5$, 95.42 ± 6.93 , $^{#}p=0.0383$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p>0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.2.B).

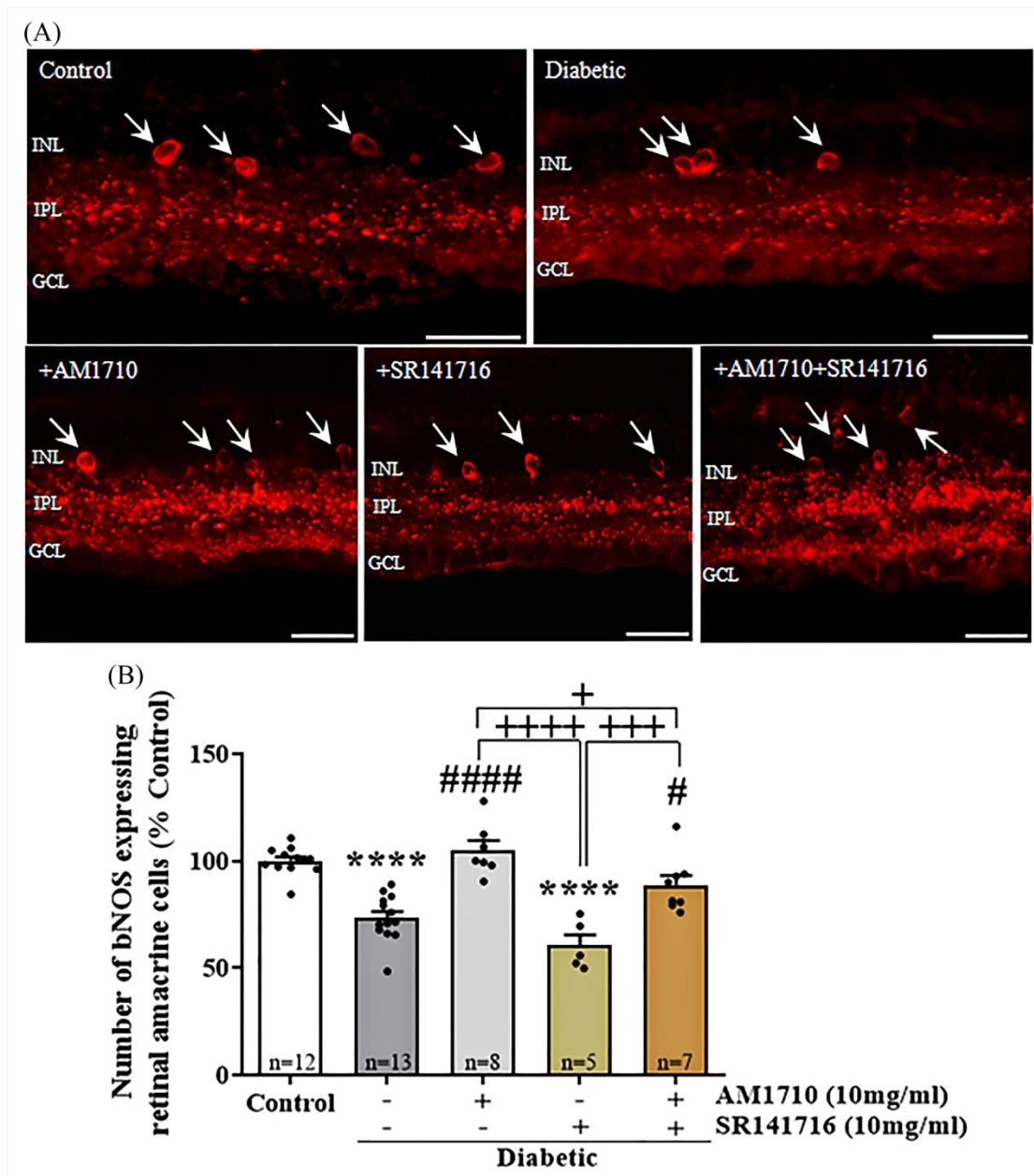
Για την μελέτη των επιπτώσεων του διαβήτη στην βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων, πραγματοποιήσαμε καταμέτρηση του πληθυσμού τους κατά μήκος της GCL. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού τους στα διαβητικά ζώα (Control: $n=5$, 104.3 ± 17.17 . Diabetic untreated: $n=4$, 106.1 ± 12.33 , $p>0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.2.C), ενώ καμία επίδραση δεν είχαν και οι θεραπείες με τα κανναβινοειδή (AM1710: $n=6$, 102 ± 11.77 , $p>0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p>0.05$ σε σύγκριση με το Control. SR141716: $n=5$, 91.66 ± 7.864 , $p>0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p>0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.2.C).



Εικόνα 4.3. Επιδράσεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στο πάχος του αμφιβληστροειδούς και στον αριθμό των γαγγλιακών κυττάρων. **(Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου της χρώσης Ηωσίνης-Αιματοξυλίνης σε τομές αμφιβληστροειδούς. Τα γαγγλιακά κύτταρα σημαίνονται με τα κίτρινα βέλη. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μm . **(Β)** Ποσοτική ανάλυση του συνολικού πάχους (μm) του αμφιβληστροειδούς από την στιβάδα RPE έως την GCL. **(C)** Ποσοτική ανάλυση του πάχους των τριών πυρηνικών στιβάδων του αμφιβληστροειδούς (ONL, INL, GCL). **(D)** Ποσοτική ανάλυση του αριθμού των γαγγλιακών κυττάρων στην GCL. *** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις (B,D). Για την ανάλυση των ξεχωριστών στιβάδων χρησιμοποιήθηκε διπλή ανάλυση διακύμανσης (Two Way ANOVA), ακολουθούμενη από Sidak's ανάλυση για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.4. Επιδράσεις των μονών θεραπειών και της συνδυαστικής θεραπείας με κανναβινοειδή στην βιωσιμότητα των βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν bNOS

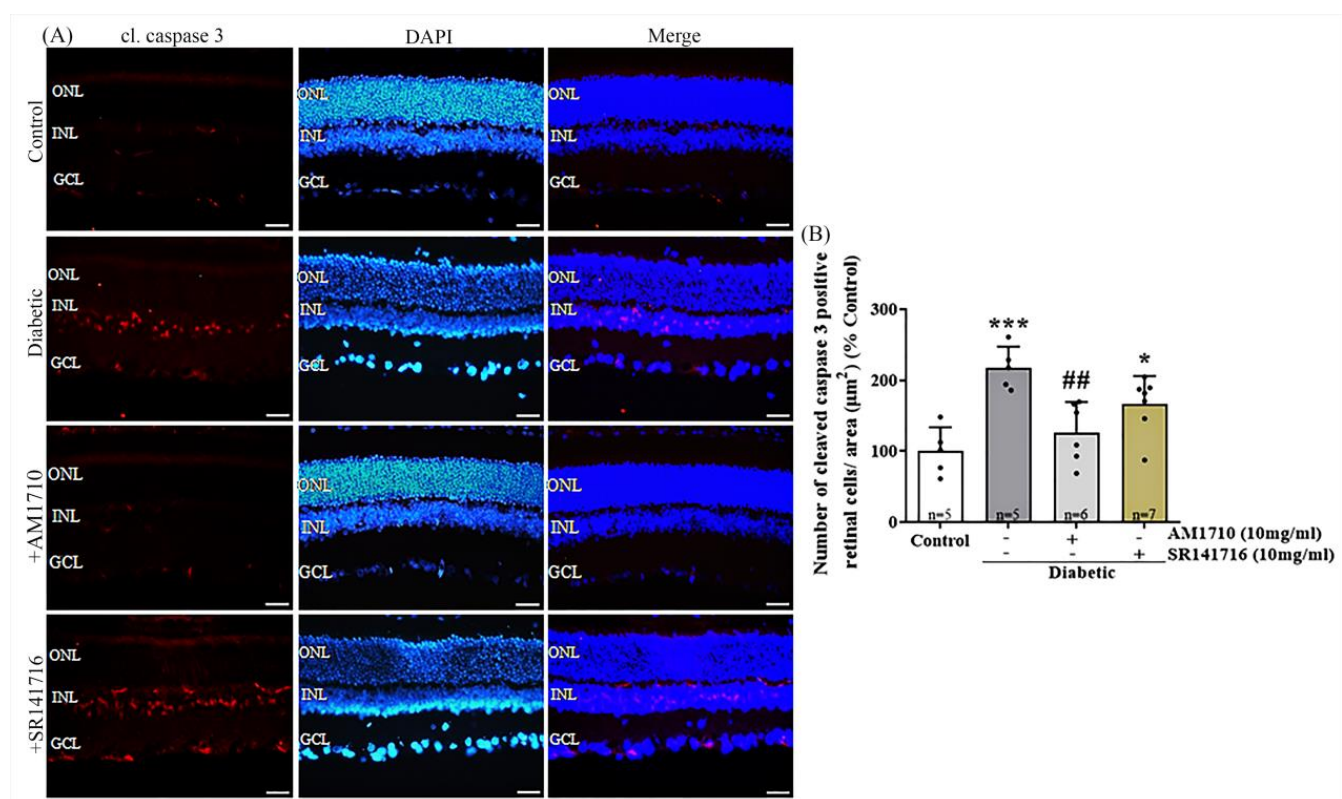
Δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν bNOS, την οποία ανέστειλε η θεραπεία με τα κανναβινοειδή (Εικόνα 4.4.A). Μέσα από την ποσοτικοποίηση φάνηκε ότι τα διαβητικά ζώα επέδειξαν μία μείωση της τάξης του 27%, στον αριθμό των bNOS βραχύνων κυττάρων, σε σύγκριση με τα Control ζώα (Control: $n=12$, 100 ± 6.48 . Diabetic untreated: $n=13$, 73.47 ± 10.80 , *** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.4.B). Η τοπική χορήγηση του αγωνιστή του CB2 υποδοχέα, AM1710, έπαυσε την επαγόμενη από τον διαβήτη μείωση στον αριθμό των βραχύνων κυττάρων, διατηρώντας τον πληθυσμό τους σε φυσιολογικά επίπεδα (AM1710: $n=7$, 104.9 ± 12.26 , #### $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.4.B). Αντιθέτως η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή SR141716, δεν είχε καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των bNOS βραχύνων κυττάρων (SR141716: $n=5$, 60.51 ± 11.28 , $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, *** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control, +++ $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.4.B). Τέλος, η συγχορήγηση του AM1710 με το SR141716, μέσω της συνδυαστικής θεραπείας, παρείχε σημαντική προστασία στα βραχύνια κύτταρα στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς AM1710+SR141716: $n=8$, # $p=0.0192$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control, +++ $p=0.0003$ σε σύγκριση με το SR141716, + $p=0.0388$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.4.B).



Εικόνα 4.4. Επιδράσεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στην βιωσιμότητα των βραχύνων κυττάρων που εκφράζουν συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (bNOS). **(Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της bNOS ανοσοδραστικότητας. Τα θετικά στην bNOS βραχύνια κύτταρα εντοπίστηκαν στην INL και σημαίνονται με τα λευκά βέλη. Μεγέθυνση: 40x. Κλίμακα: 50 μ m. **(Β)** Ποσοτική ανάλυση της bNOS ανοσοδραστικότητας. *** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. # $p < 0.05$, #### $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$, ++++ $p < 0.0001$ σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών θεραπειών με τα κανναβινοειδή. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.5. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα αναστέλλει τον επαγόμενο από την κασπάση 3 αποπτωτικό θάνατο στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.5.A, ο διαβήτης προκάλεσε μια κατακόρυφη αύξηση των κυττάρων θετικών στην κασπάση 3, στην INL, γεγονός που υποδεικνύει την αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Τα θετικά στην κασπάση 3 κύτταρα στην INL ήταν στατιστικά σημαντικά περισσότερα στα διαβητικά ζώα σε σχέση με τα Control (Control: n=5, 100±33.71. Diabetic untreated: n=5, 217.4±29.84, ***p=0.0004 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.5.B). Η τοπική χορήγηση του AM1710 για 14 ημέρες, παρείχε νευροπροστασία, μπλοκάροντας τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς (AM1710: n=6, 126.7±42.53, ##p=0.0038 σε σύγκριση με το Diabetic untreated, p>0.05 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.5.B). Από την άλλη πλευρά, η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή, SR141716, δεν είχε καμία επίδραση στον επαγόμενο από τον διαβήτη αποπτωτικό θάνατο των νευρικών κυττάρων στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς (SR141716: n=7, 166.6±39.41, p>0.05 σε σύγκριση με το Diabetic untreated, *p=0.0308 σε σύγκριση με το Control, p>0.05 σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.5.B).

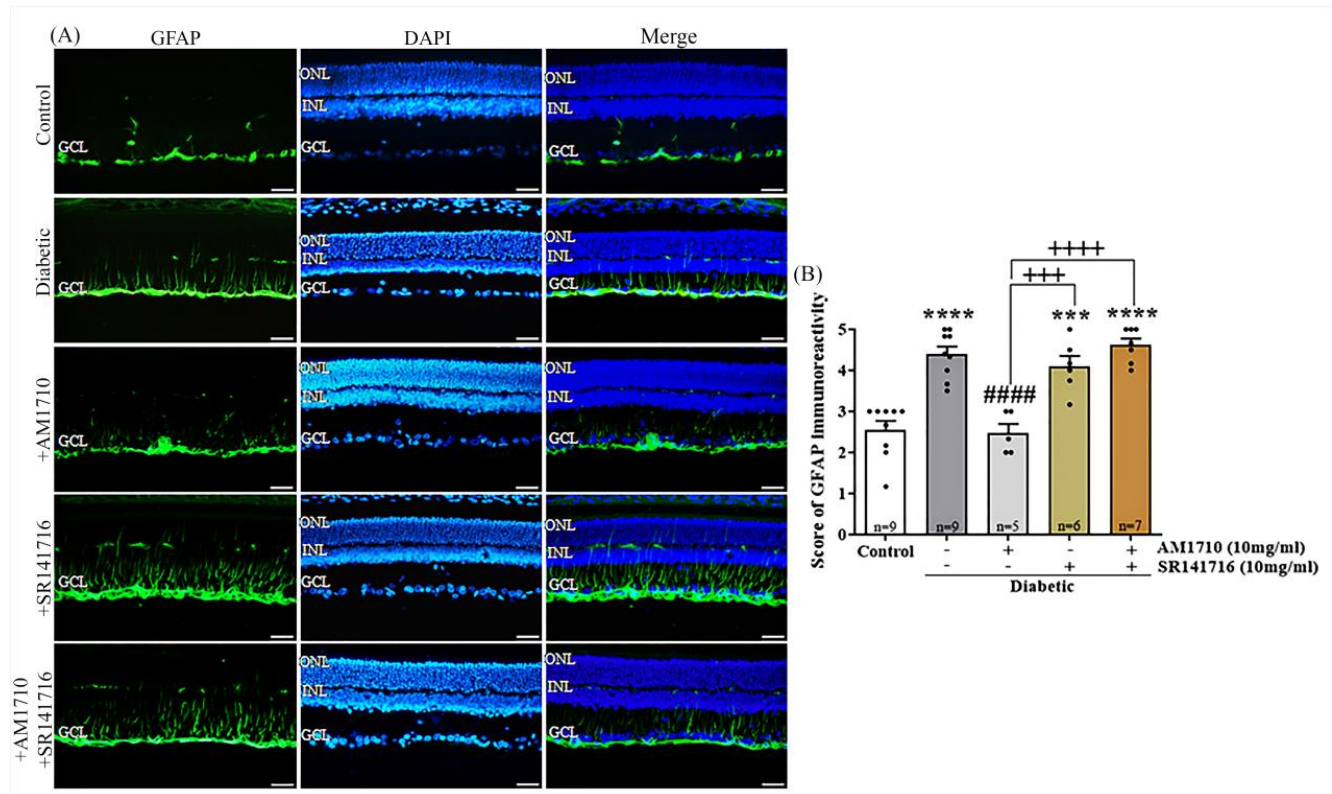


Εικόνα 4.5. Επίδρασεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, διαμεσολαβούμενο από την κασπάση 3 (cl. caspase 3). **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της cl. caspase 3. Τα θετικά στην cl. caspase 3 κύτταρα, εντοπίστηκαν κυρίως μέσα στα όρια της INL. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 µm. **(B)** Ποσοτική ανάλυση της cl. caspase 3 ανοσοδραστικότητας. *p < 0.05, ***p < 0.001 σε σύγκριση με το Control. ##p < 0.01 σε σύγκριση με το Diabetic untreated. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση

χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.6. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα αναστέλλει την ενεργοποίηση της μακρογλοίας στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς

Δύο εβδομάδες με διαβήτη, ήταν αρκετό χρονικό διάστημα για να οδηγήσουν σε μία αύξηση της ενεργοποίησης της μακρογλοίας στον αμφιβληστροειδή των ζώων, όπως φάνηκε από την ανάλυση της GFAP ανοσοδραστικότητας (Εικόνα 4.6.A). Η ποσοτική ανάλυση των φωτογραφιών αποκάλυψε, στατιστικά σημαντική αύξηση της GFAP ανοσοδραστικότητας στους αμφιβληστροειδείς των διαβητικών ζώων, σε σύγκριση με αυτούς των Control (Control: $n=9$, 2.55 ± 0.65 . Diabetic untreated: $n=9$, 4.39 ± 0.57 , $***p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control). Ο αγωνιστής του CB2 υποδοχέα, AM1710 ανέστειλε την αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP (AM1710: $n=5$, 2.46 ± 0.50 , $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.6.B). Ωστόσο, το μπλοκάρισμα των CB1 υποδοχέων με τον ανταγωνιστή, SR141716, δεν κατάφερε να μειώσει την ενεργοποίηση της μακρογλοίας (SR141716: $n=6$, 4.09 ± 0.62 , $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p = 0.0003$ σε σύγκριση με το Control, $+++p = 0.0008$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.6.B). Στο ίδιο μήκος κύματος με το SR141716, κινήθηκε και η συνδυαστική θεραπεία (AM1710+SR141716), καθώς ούτε αυτή είχε κάποια επίδραση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP (AM1710+SR141716: $n=6$, 4.61 ± 0.41 , $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $***p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control, $++++p < 0.0001$ σε σύγκριση με το AM1710, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το SR141716) (Εικόνα 4.6.B).



Εικόνα 4.6. Επίδρασεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στην ενεργοποίηση της μακρογλοίας (κύτταρα του Muller). (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της GFAP

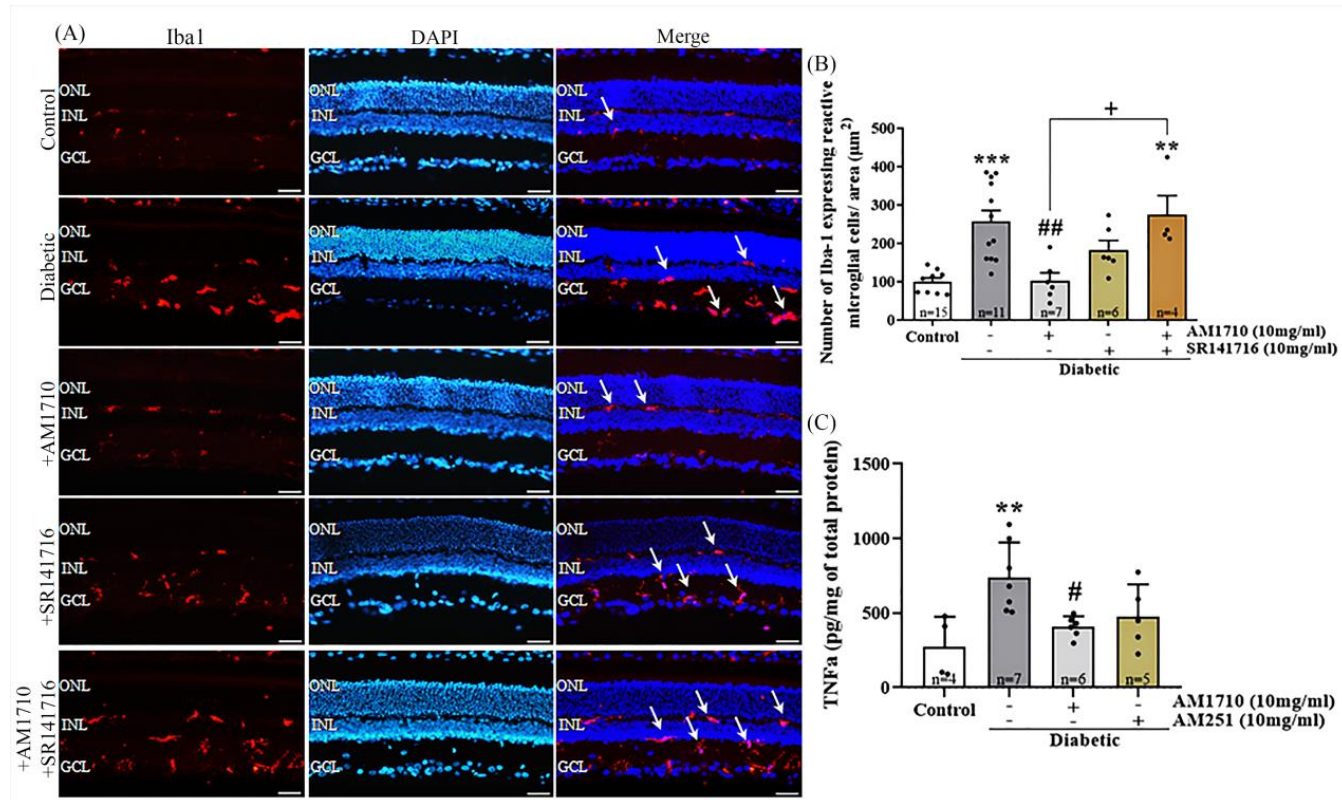
ανοσοδραστικότητας. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μm . **(B)** Ποσοτική ανάλυση της GFAP ανοσοδραστικότητας. *** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. #### $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. +++ $p < 0.001$, ++++ $p < 0.0001$ σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών κανναβινοειδικών θεραπειών. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.7. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα αναστέλλει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την απελευθέρωση TNF α στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς

Για τις επιδράσεις του διαβήτη και των κανναβινοειδών στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας, καταμετρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε ο αριθμός των αντιδραστικών (ενεργοποιημένων) μικρογλοιακών κυττάρων, με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Srygidakos και συν., 2021). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων εξαιτίας του διαβήτη, η οποία μειώθηκε μετά από την χορήγηση του CB2 αγωνιστή, AM1710 (Εικόνα 4.7.A). Αναλυτικότερα τα διαβητικά ζώα που δεν έλαβαν κάποια θεραπεία, παρουσίασαν αύξηση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, στους αμφιβληστροειδείς τους, σε σχέση με τα Control ζώα (Control: $n=9$, 100.0 ± 30.32 . Diabetic untreated: $n=12$, 256.8 ± 101.1 , *** $p=0.0004$ σε σύγκριση με το Control). Η θεραπεία με τον αγωνιστή των CB2 υποδοχέων, AM1710, μείωσε δραστικά τον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς (AM1710: $n=6$, 102.3 ± 51.44 , ## $p=0.0010$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.7.B). Ωστόσο, κατά την χορήγηση του ανταγωνιστή των CB1 υποδοχέων, SR141716, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στον αυξημένο αριθμό της αντιδραστικής μικρογλοίας (SR141716: $n=6$, 183.1 ± 60.25 , $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.7.B). Τέλος, ούτε η διπλή θεραπεία (AM1710+SR141716) δεν επέγαγε καμία απολύτως μείωση στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας (AM1710+SR141716: $n=5$, 273.9 ± 101.2 , $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, ** $p=0.0047$ σε σύγκριση με το Control, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το SR141716, + $p=0.0106$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.7.B).

Για την αξιολόγηση των πιθανών αντιφλεγμονωδών δράσεων των κανναβινοειδών, εκτός από την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, μετρήθηκαν και τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης, TNF α . Αντί του CB1 ανταγωνιστή, SR141716, για το πείραμα του TNF α , χρησιμοποιήθηκε ο CB1 ανταγωνιστής, AM251. Από την επεξεργασία των δεδομένων φάνηκε πως ο διαβητής οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του TNF α στους αμφιβληστροειδείς των ζώων (Control: $n=4$, 271.3 ± 203.2 . Diabetic untreated: $n=7$, 739.3 ± 235.2 , ** $p=0.0055$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.7.C). Τοπική χορήγηση του CB2 αγωνιστή, AM1710, οδήγησε σε ριζική μείωση των επιπέδων του TNF α στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς, σε επίπεδα ίσα με αυτά των Control ζώων (AM1710: $n=6$, 408.0 ± 70.09 , # $p=0.0290$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated) (Εικόνα 4.7.C). Εν αντιθέσει με την προστατευτική δράση του AM1710, ο ανταγωνιστής των CB1 υποδοχέων, AM251 δεν επηρέασε σημαντικά τα αυξημένα επίπεδα του TNF α στα διαβητικά ζώα (AM251: $n=5$,

476.4±215.3, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.7.C).

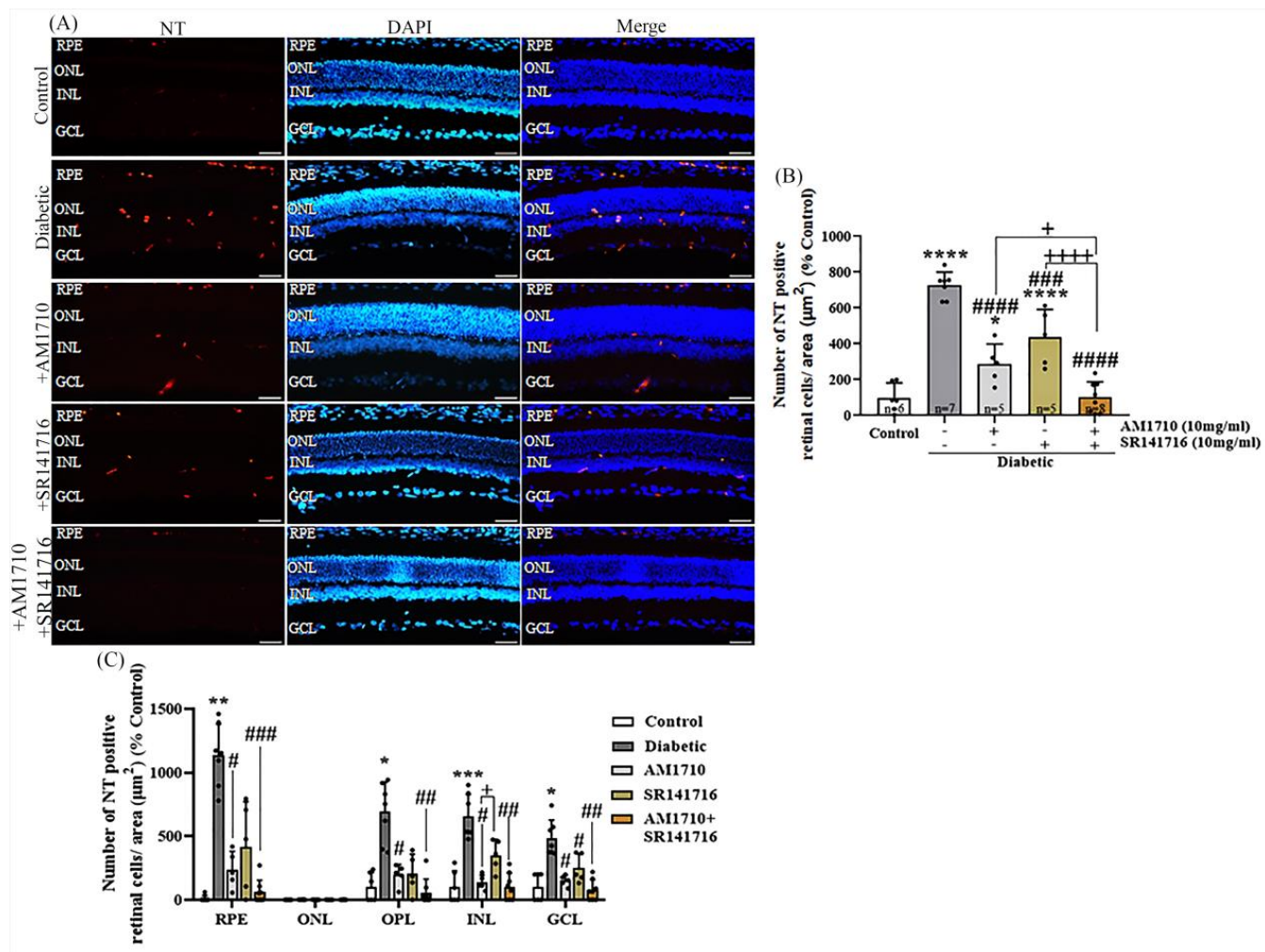


Εικόνα 4.7. Επιδράσεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας και στην απελευθέρωση της προφλεγμονώδους κυττοκίνης TNF α . **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της Iba1 ανοσοδραστικότητας. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν αντιδραστικά μικρογλοιακά κύτταρα. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μm . **(B)** Ποσοτική ανάλυση της Iba1 ανοσοδραστικότητας. **(C)** Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων της προφλεγμονώδους κυττοκίνης TNF α . ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με το Control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. + $p < 0.05$, σύγκριση μεταξύ των κανναβινοειδικών θεραπειών. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.8. Θεραπεία με CB2 αγωνιστή, CB1 ανταγωνιστή ή συνδυασμό τους, μειώνει το νιτρικό στρες στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς

Στο μοντέλο των δύο εβδομάδων της ΔΑΠΣ, παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του νιτροποιητικού στρες στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς, όπως φάνηκε από την αυξημένη ανοσοδραστικότητα του NT στους αμφιβληστροειδείς που δεν έλαβαν θεραπεία (Εικόνα 4.8.A). Από την ποσοτική ανάλυση φάνηκε ότι η επαγωγή του διαβήτη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των θετικών σε NT κυττάρων, υποδεικνύοντας την παρουσία νιτροποιητικού στρες στον αμφιβληστροειδή (Control: $n=6$, 100 ± 81.10 . Diabetic untreated: $n=7$, 726.7 ± 73.33 , *** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control). Η χορήγηση του AM1710,

κατήργησε μερικώς την επαγόμενη από το διαβήτη αύξηση της έκφρασης του NT στα διαβητικά ζώα (AM1710: $n=5$, 287.9 ± 110.5 , $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated animals, $*p = 0.0360$ σε σύγκριση με το Control), ενώ παρόμοια δράση παρατηρήθηκε και κατά την χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή, SR141716 (SR141716: $n=5$, 435.9 ± 156.1 cells, $###p = 0.0004$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $****p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το AM1710) (Εικόνα 4.8.B). Τέλος, η συνδυαστική χορήγηση του AM1710 με το SR141716, παρουσίασε την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τις μονές θεραπείες, επαναφέροντας πλήρως τον αριθμό των θετικών σε NT κυττάρων στα επίπεδα του Control (AM1710+SR141716: $n=7$, 101.1 ± 87.17 cells, $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control, $+p = 0.0243$ σε σύγκριση με το AM1710, $++++p < 0.0001$ σε σύγκριση με το SR141716) (Εικόνα 4.8.B).



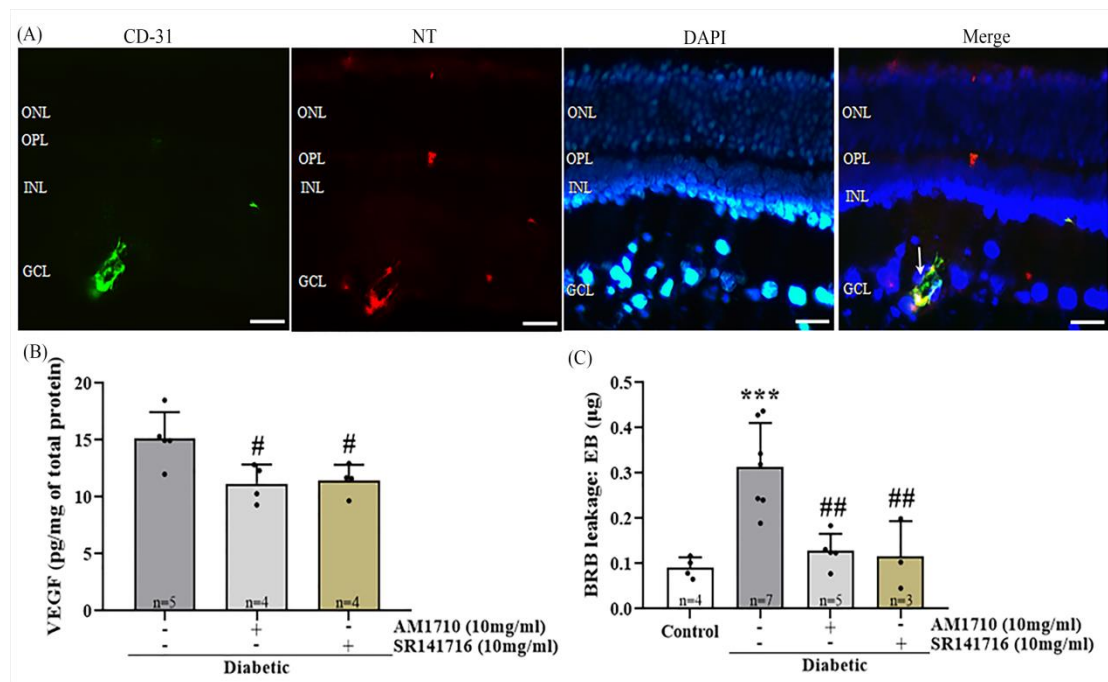
Εικόνα 4.8. Επιδράσεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στο νιτρικό στρες στον αμφιβληστροειδή. **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της NT ανοσοδραστικότητας. Τα θετικά σε NT κύτταρα εντοπίστηκαν σε όλο το πλάτος του αμφιβληστροειδούς. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μm . **(B)** Ποσοτική ανάλυση της NT ανοσοδραστικότητας. **(C)** Ποσοτική ανάλυση της NT ανοσοδραστικότητας στις διαφορετικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, $****p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. $#p < 0.05$, $##p < 0.01$, $###p < 0.001$, $####p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. $+p < 0.05$, $++++p < 0.0001$, σύγκριση μεταξύ των κανναβινοειδικών θεραπειών. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση

διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις (B). Για την ανάλυση των ξεχωριστών στιβάδων (C) χρησιμοποιήθηκε διπλή ανάλυση διακύμανσης (Two Way ANOVA), ακολουθούμενη από Sidak's ανάλυση για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.9. Θεραπεία με CB2 αγωνιστή ή CB1 ανταγωνιστή διατηρεί την ακεραιότητα του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού

Μέσω παρατηρήσεων την χωροταξικής οργάνωσης μεγάλου μέρους της χρώσης NT, υποθέσαμε ότι η χρώση αυτή πιθανόν να εντοπίζεται και σε αγγεία του αμφιβληστροειδούς, εκτός από τα νευρικά κύτταρα. Προκειμένου να επαληθεύσουμε αυτή την υπόθεση πραγματοποιήθηκε μία μελέτη συνεντοπισμού, στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς, του NT, με CD31, ένα δείκτη των ενδοθηλιακών κυττάρων που συνθέτουν τα αγγεία. Πράγματι, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.9.A, παρατηρήθηκε συνεντοπισμός του NT με το CD31, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα στον αμφιβληστροειδή υφίστανται οξειδωτική/νιτροποιητική βλάβη στο μοντέλο της ΔΑΠΣ.

Για την εκτίμηση των αγγειοπροστατευτικών δράσεων των κανναβινοειδικών θεραπειών πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης του VEGF στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς, με την τεχνική της ELISA. Τόσο το AM1710 ($n=4$, 11.19 ± 0.83 , $^{\#}p=0.0256$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated), όσο και το SR141716 ($n=4$, 11.49 ± 0.67 , $^{\#}p=0.0378$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated), μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα του VEGF στον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 4.9.B). Για την αξιολόγηση της ακεραιότητας του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού (ΑΑΦ) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Evans Blue (EB), η οποία βοηθά στον προσδιορισμό της διαρροής των αγγείων του αμφιβληστροειδούς. Δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη παρατηρήθηκε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας στους αμφιβληστροειδείς των πειραματόζωων. Πιο συγκεκριμένα, ο διαβήτης αύξησε την διαρροή των αγγείων στον αμφιβληστροειδή, όπως φάνηκε από την αυξημένη ποσότητα EB, που ανιχνεύτηκε στα διαβητικά ζώα που δεν έλαβαν θεραπεία (Control: $n=4$, 0.09102 ± 0.01150 . Diabetic untreated: $n=7$, 0.3146 ± 0.03621 , $^{***}p=0.0007$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.9.C). Η τοπική χορήγηση τόσο του AM1710 (AM1710: $n=5$, 0.1283 ± 0.01682 , $^{\#}p=0.0021$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control), όσο και του SR141716 (SR141716: $n=3$, 0.1160 ± 0.04494 , $^{\#}p=0.0048$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated, $p > 0.05$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.9.C), συνέβαλαν στην δραστική μείωση της διαρροής των αγγείων και κατ' επέκταση στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του ΑΑΦ.



Εικόνα 4.9. Επιδράσεις της θεραπείας με τα κανναβινοειδή στην ακεραιότητα του ΑΑΦ. **(Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της μελέτης συνεντοπισμού του NT με τον αγγειακό δείκτη CD-31. Παρατίθεται και πυρηνική χρώση με DAPI, για την οπτικοποίηση των κυτταρικών πυρήνων. Παρατηρείται συνεντοπισμός του NT με το CD-31 σε ένα αιμοφόρο αγγείο στην GCL. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 µm. **(Β)** Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων του VEGF στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς. # $p < 0.05$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. **(C)** Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων του EB που ανιχνεύτηκαν στον αμφιβληστροειδή των ζώων. *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με το Control. ## $p < 0.01$ σε σύγκριση με το Diabetic untreated. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.10. Ανίχνευση του AM1710 και του SR141716 στον αμφιβληστροειδή

Η ανάλυση των επιπέδων AM1710 και SR141716, μέσω της χρήσης HR-LC/MS/MS ανίχνευσε τόσο το AM1710, όσο και το SR141716 στον αμφιβληστροειδή των ζώων, είκοσι-τέσσερις ώρες μετά την χορήγησή τους μέσω σταγόνων. Αναλυτικότερα στα Control ζώα ($n=6$), τα οποία έλαβαν σταγόνες DMSO (έκδοχο), δεν ανιχνεύθηκε ούτε το AM1710, ούτε το SR141716. Τα επίπεδα του AM1710 ($n=7$), είκοσι-τέσσερις ώρες μετά την χορήγησή του, κυμαίνονταν στα 49.00 ± 19.00 pg/mg, ενώ του SR141716 ($n=9$), έφτασαν τα 83.00 ± 13.00 pg/mg.

2^ο Μέρος: Επιδράσεις των αναστολέων μεταβολισμού του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG σε ένα *in vivo* μοντέλο επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυος

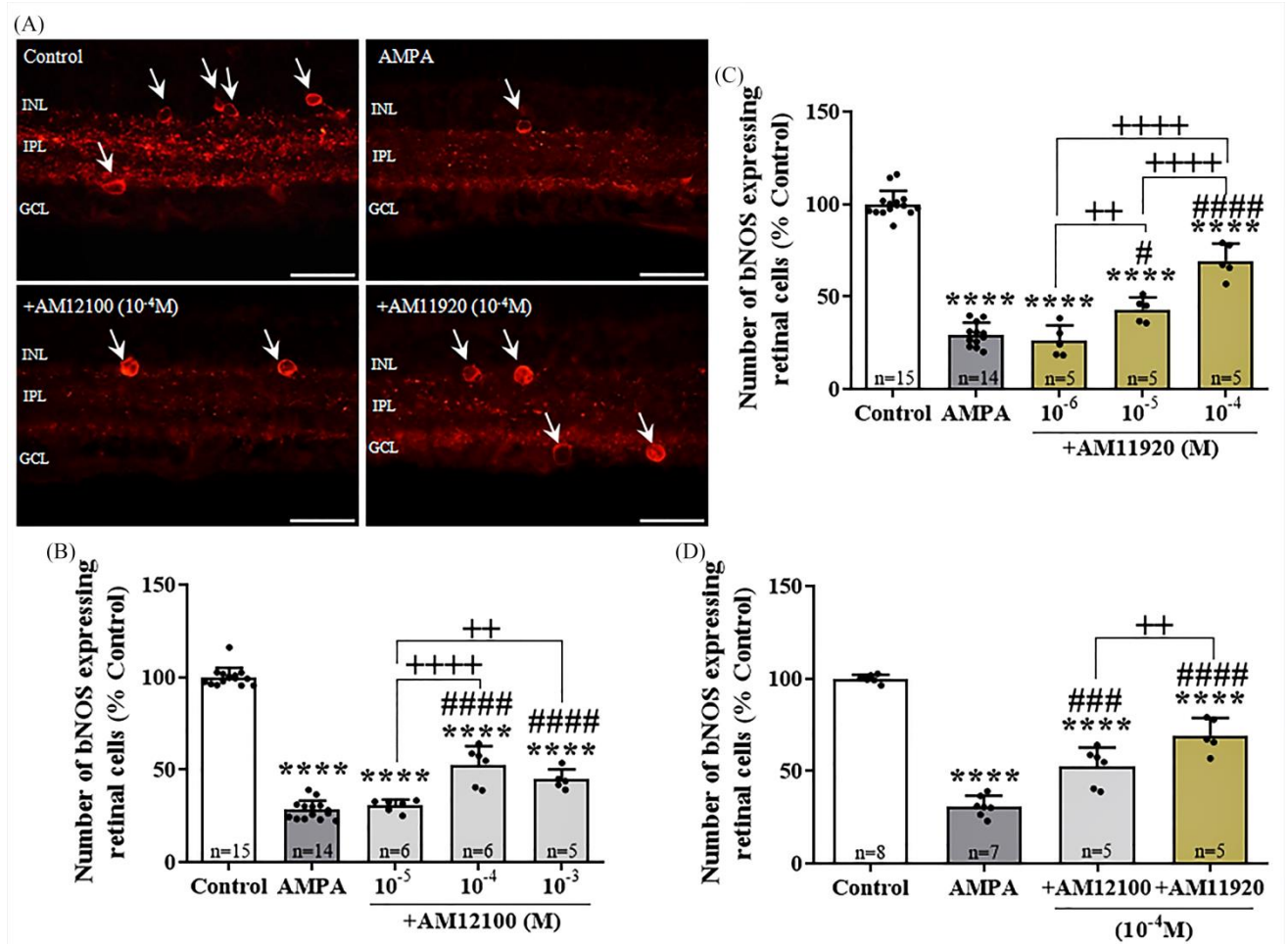
4.11. Οι αναστολείς AM12100 (ABHD6 αναστολέας) και AM11920 (διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας), παρέχουν προστασία στα bNOS βραχύνια κύτταρα εναντίον της AMPA διεγερσιτοξικότητας

Για την εξέταση των πιθανών νευροπροστατευτικών δράσεων των αναστολέων μεταβολισμού της 2-AG, πραγματοποιήθηκε ενδοϋαλοειδική συγχορήγηση του AMPA είτε με το AM12100 (αναστολέας ABHD6, 10^{-5} , 10^{-4} & 10^{-3} M), είτε με το AM11920 (διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας, 10^{-6} , 10^{-5} & 10^{-4} M). Το AMPA μείωσε τον αριθμό των βραχύνιων κυττάρων, ωστόσο οι αναστολείς μεταβολισμού του 2-AG, έπαυσαν μερικώς αυτή την επίδραση (Εικόνα 4.11.A). Από την ποσοτικοποίηση των ευρημάτων, προέκυψε ότι η ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA, μείωσε κατά 71% τον αριθμό των bNOS βραχύνιων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, σε σχέση με τα Control ζώα (Control: n=15, 100 ± 7.056 . AMPA: n= 14, 28.13 ± 1.377 , ****p < 0.0001 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.11.A). Η χορήγηση του αναστολέα AM12100 παρείχε μερική προστασία στα βραχύνια κύτταρα στις δύο υψηλότερες δόσεις (10^{-3} M: n = 5, 41.78 ± 2.460 , ####p<0.0001 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control. 10^{-4} M: n = 6, 52.37 ± 4.226 , ####p< 0.0001 σε σύγκριση με το AMPA, ****p < 0.0001 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.11.B). Αντιθέτως στην χαμηλότερη δόση των 10^{-5} M, το AM12100 δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των βραχύνιων κυττάρων (10^{-5} M: n = 6, 30.57 ± 1.322 , p = 0.9122 σε σύγκριση με το AMPA, ****p < 0.0001 σε σύγκριση με το CTRL, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το 10^{-4} M, ++p = 0.0027 σε σύγκριση με το 10^{-3} M) (Εικόνα 4.11.B).

Δοσοεξαρτώμενες προστατευτικές επιδράσεις αναδείχθηκαν και μετά από την συγχορήγηση του AMPA με τον διπλό αναστολέα AM11920, ο οποίος παρείχε μερική νευροπροστασία στα βραχύνια κύτταρα στις δύο υψηλότερες δόσεις των 10^{-4} M (10^{-4} M: n = 5, 69.31 ± 4.14 , ####p<0.0001 σε σύγκριση με το AMPA, ****p < 0.0001 σε σύγκριση με το CTRL, +++p < 0.0001 σε σύγκριση με το AM11920, 10^{-5} και 10^{-6} M) και των 10^{-5} M (10^{-5} M: n = 5, 42.96 ± 2.97 , #p= 0.0102 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το CTRL, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-4} M, ++p=0.0060 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-6} M) (Εικόνα 4.11.C). Η μικρότερη δόση των 10^{-6} M του AM11920, δεν κατάφερε να ελαττώσει την καταστρεπτική επίδραση του AMPA στα βραχύνια κύτταρα (10^{-6} M: n=5, 25.94 ± 3.780 , p= 0.8980 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το CTRL, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-4} M, ++p=0.0060 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-5} M) (Εικόνα 4.11.C).

Για την σύγκριση της αποτελεσματικότητας μεταξύ των δράσεων των δύο αναστολέων του μεταβολισμού της 2-AG, πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή ανάλυση, κατά την οποία συγκρίθηκαν οι δράσεις του μονού αναστολέα AM12100 και του διπλού AM11920 (Εικόνα 4.11.D). Ο διπλός αναστολέας, AM11920, στην δόση των 10^{-4} M, εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη αποτελεσματικότητα από τον μονό αναστολέα AM12100 (αναστολέας ABHD6, 10^{-4} M), στην διάσωση των βραχύνιων κυττάρων από το AMPA (AM11920 10^{-4} M:

$^{++}p = 0.0044$ σε σύγκριση με το AM1200 10^{-4} M, $^{####}p < 0.0001$ σε σύγκριση με το AMPA, $^{****}p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.11.D), φθάνοντας περίπου το 70% των επιπέδων του Control. Αντιθέτως ο μονός αναστολέας της ABHD6, AM12100, έφθασε περίπου στο 52% των επιπέδων των Control ζώων (AM12100 10^{-4} M: $^{###}p = 0.0001$ σε σύγκριση με το AMPA, $^{****}p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.11.D).



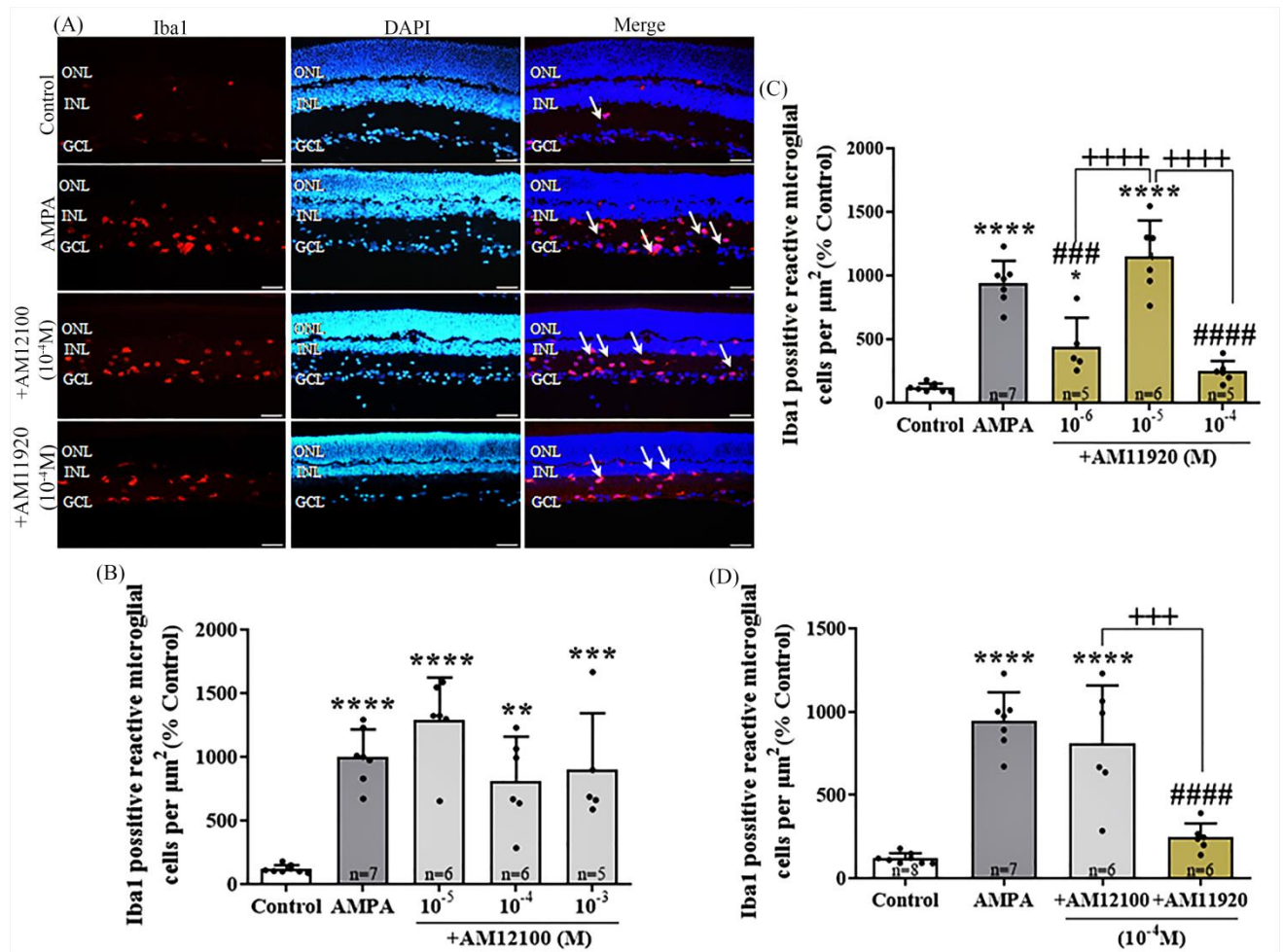
Εικόνα 4.11. Επιδράσεις του AM12100 (αναστολέας της ABHD6) και του AM11920 (διπλός αναστολέας ABHD6/MAGL) στον επαγόμενο από AMPA θάνατο των bNOS βραχύνων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή. **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της bNOS ανοσοδραστικότητας. Τα θετικά στην bNOS βραχύνια κύτταρα σημαίνονται με τα λευκά βέλη και εντοπίστηκαν κατά κύριο λόγο στην INL, ενώ δευτερευόντως κάποια έκτοπα εντοπίστηκαν στην GCL. Μεγέθυνση: 40x. Κλίμακα: 50 μ m. **(B)** Ποσοτική ανάλυση της bNOS ανοσοδραστικότητας, μετά την χορήγηση του AM12100 (10^{-5} , 10^{-4} και 10^{-3} M). **(C)** Ποσοτική ανάλυση της bNOS ανοσοδραστικότητας, μετά την χορήγηση του AM11920 (10^{-6} , 10^{-5} και 10^{-4} M). **(D)** Σύγκριση της αποτελεσματικότητας του AM12100 και του AM11920 στην δόση των 10^{-4} M. $^{****}p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. $^{\#}p < 0.05$, $^{###}p < 0.001$, $^{####}p < 0.0001$ σε σύγκριση με το AMPA. $^{++}p < 0.01$, $^{++++}p < 0.0001$ σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δόσεων (B, C) και μεταξύ των διαφορετικών αναστολέων στην ίδια δόση (D). Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

4.12. Ο διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας, AM11920, μειώνει την επαγόμενη από το AMPA ενεργοποίηση της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή

Προκειμένου να εξεταστούν οι πιθανές αντιφλεγμονώδεις δράσεις των αναστολέων στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας, πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις με την χρήση αντισώματος έναντι της Iba1 (δείκτης μικρογλοίας) και καταμετρήθηκε ο αριθμός της αντιδραστικής μικρογλοίας, βασιζόμενοι στην μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων (Εικόνα 4.12.A). Η ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA, προκάλεσε αύξηση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή, όπως φάνηκε από τον αυξημένο αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων (Control: n=8, 118.2 ± 30.67 . AMPA: n=7, 1001 ± 214.5 , ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.12.B). Η συγχορήγηση με το AMPA, του μονού αναστολέα, AM12100, δεν μείωσε τον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων σε καμία από τις τρεις διαφορετικές δόσεις που χορηγήθηκε (10^{-5} , 10^{-4} & 10^{-3} M) [(AM1200 10^{-3} M: n = 4, 899.7 ± 443.5 , p=0.9737 σε σύγκριση με το AMPA, **p=0.0038 σε σύγκριση με το Control, ++p=0.0075 σε σύγκριση με το AM12100 10^{-5} M) (AM12100 10^{-4} M: n=6, 811.9 ± 364.4 , p=0.7613 σε σύγκριση με το AMPA, ***p=0.0001 σε σύγκριση με το Control, +p=0.0157 σε σύγκριση με το AM12100 10^{-5} M) (AM12100 10^{-5} M: n = 6, 1288 ± 335.4 , p=0.3973 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control, +p=0.0157 σε σύγκριση με το AM12100 10^{-4} M, ++p<0.0075 σε σύγκριση με το AM12100 10^{-3} M)] (Εικόνα 4.12.B).

Εν αντιθέσει με την αδυναμία του AM12100 να επηρεάσει τα μικρογλοιακά κύτταρα, η χρήση του διπλού αναστολέα (ABHD6/MAGL), AM11920, επήγαγε μία δόσοεξαρτώμενη μείωση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Αναλυτικότερα στην χαμηλότερη δόση των 10^{-6} M, ανέστειλε μερικώς την επαγόμενη από το AMPA ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων (AM11920 10^{-6} M: n = 5, 443 ± 224 , ####p=0.0004 σε σύγκριση με το AMPA, *p=0.0227 σε σύγκριση με το Control, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-5} M) (Εικόνα 4.12.C). Πλήρης αναστολή της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, παρατηρήθηκε στην υψηλότερη δόση των 10^{-4} M του AM11920 (AM11920 10^{-4} M: n = 5, 146.3 ± 83.59 , ####p<0.0001 σε σύγκριση με το AMPA, p=0.6572 σε σύγκριση με το Control, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-5} M) (Εικόνα 4.12.C). Ωστόσο, κατά απροσδόκητο τρόπο το AM1120 στην δόση των 10^{-5} M, δεν μείωσε τον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (n=6, 1151 ± 282.3 , p=0.2345 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το AM11920 10^{-4} & 10^{-5} M) (Εικόνα 4.12.C).

Όπως ήταν φυσικό, κατά την σύγκριση της αποτελεσματικότητας μεταξύ του AM12100 και του AM11920, φάνηκε ότι ο διπλός αναστολέας, AM11920, ήταν περισσότερο αποτελεσματικός στην μείωση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας. Στην δόση των 10^{-4} M, ο διπλός αναστολέας, AM11920, κατάφερε, σε αντίθεση με το AM12100, να μειώσει πλήρως τον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων, στα επίπεδα του Control (AM11920 10^{-4} M: n=5, +++p=0.0002 σε σύγκριση με το AM12100 10^{-4} M, ####p<0.0001 σε σύγκριση με το AMPA, p=0.5997 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.12.D).



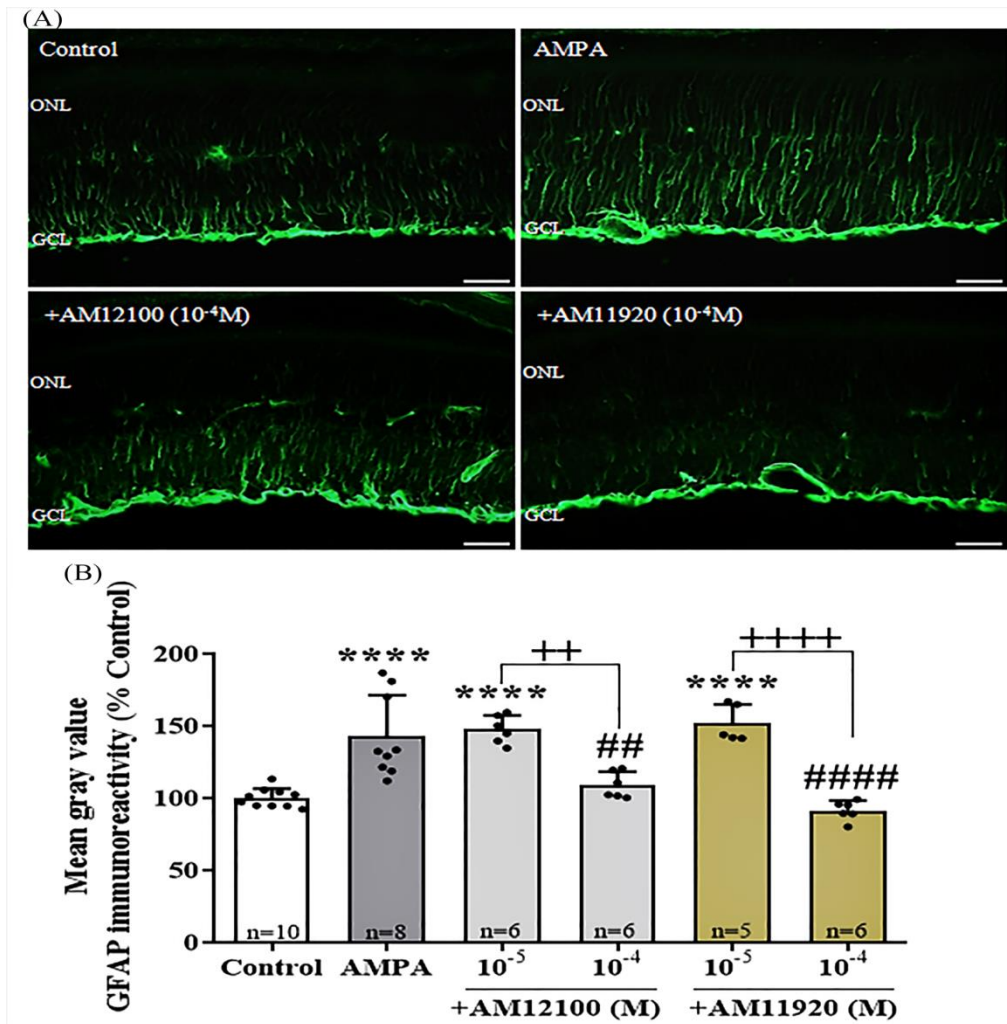
Εικόνα 4.12. Επιδράσεις του AM12100 (αναστολέας της ABHD6) και του AM11920 (διπλός αναστολέας ABHD6/MAGL) στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας στον αμφιβληστροειδή. **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της Iba1 ανοσοδραστικότητας. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν αντιδραστικά μικρογλοϊκά κύτταρα. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μm. **(B)** Ποσοτική ανάλυση της Iba1 ανοσοδραστικότητας μετά την χορήγηση του AM12100 (10⁻⁵, 10⁻⁴ και 10⁻³ M). **(C)** Ποσοτική ανάλυση της Iba1 ανοσοδραστικότητας μετά την χορήγηση του AM11920 (10⁻⁶, 10⁻⁵ και 10⁻⁴ M). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 σε σύγκριση με το Control. ### p < 0.001, #### p < 0.0001 σε σύγκριση με το AMPA. +++ p < 0.001, ++++ p < 0.0001, σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δόσεων (C) και μεταξύ των διαφορετικών αναστολέων στην ίδια δόση (D). Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν p < 0.05.

4.13. Οι αναστολείς AM12100 (ABHD6 αναστολέας) και AM11920 (διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας), μειώνουν την επαγόμενη από το AMPA ενεργοποίηση της μακρογλοίας στον αμφιβληστροειδή

Περαιτέρω εξέταση των αντιφλεγμονωδών δράσεων των δύο αναστολέων, πραγματοποιήθηκε μέσω της μελέτης των επιδράσεων που έχουν στην ενεργοποίηση της

μακρογλοίας. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη, με την χρήση αντισώματος έναντι της GFAP, η οποία αποτελεί δείκτη της μακρογλοίας (αστροκύτταρα και κύτταρα του Muller) (Εικόνα 4.13.A). Οι συνθήκες διεγερσιτοξικότητας που προέκυψαν από την ενδοφθάλμια χορήγηση του AMPA, ενόησαν την ενεργοποίηση της μακρογλοίας, όπως φάνηκε από την αυξημένη έκφραση της GFAP στον αμφιβληστροειδή των ζώων (Control: n=10, 118.2± 31.91. AMPA: n=9, 943.4±173.1, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.13.B). Συγχορήγηση με το AMPA του AM12100, στην υψηλότερη δόση των 10⁻⁴ M, μείωσε σε σημαντικό βαθμό την ενεργοποίηση της μακρογλοίας (AM12100 10⁻⁴ M: n=6, 109.1±9.180, ###p=0.0005 σε σύγκριση με το AMPA, p=0.8372 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.13.B). Από την άλλη πλευρά, στην χαμηλότερη δόση των 10⁻⁵ M, ο αναστολέας AM12100, δεν είχε καμία επίδραση στην μακρογλοία (AM12100 10⁻⁵ M: n=6, 147.7±9.820, p=0.999 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control, ++p=0.0016 σε σύγκριση με το AM12100 10⁻⁴ M) (Εικόνα 4.13.B).

Ανάλογες επιδράσεις παρατηρήθηκαν και κατά την χορήγηση του διπλού αναστολέα, AM11920. Συγχορήγηση με το AMPA, του AM11920, στην δόση των 10⁻⁴ M, μείωσε την ανοσοδραστικότητα της GFAP στον αμφιβληστροειδή των ζώων (AM11920 10⁻⁴ M: n=6, 91.48±9.797, ###p<0.0001 σε σύγκριση με το AMPA, p=0.8706 σε σύγκριση με το Control) (Εικόνα 4.12.B). Ωστόσο, στην χαμηλότερη δόση των 10⁻⁵ M, ο διπλός αναστολέας AM11920, δεν επηρέασε την ανοσοδραστικότητα της GFAP και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της μακρογλοίας (AM11920 10⁻⁵ M: n=6, 151.8±12.92, p=0.9889 σε σύγκριση με το AMPA, ****p<0.0001 σε σύγκριση με το Control, +++p<0.0001 σε σύγκριση με το AM11920 10⁻⁴ M) (Εικόνα 4.13.B).



Εικόνα 4.13. Επιδράσεις του AM12100 (αναστολέας της ABHD6) και του AM11920 (διπλός αναστολέας ABHD6/MAGL) στην ενεργοποίηση της μακρογλοίας στον αμφιβληστροειδή. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της GFAP ανοσοδραστικότητας. Μεγέθυνση: 20x. Κλίμακα: 50 μ m. (B) Ποσοτική ανάλυση της GFAP ανοσοδραστικότητας μετά την χορήγηση του AM12100 (10^{-5} και 10^{-4} M) και του AM11920 (10^{-5} και 10^{-4} M). **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το Control. ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το AMPA. ++ $p < 0.01$, ++++ $p < 0.0001$, σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών δόσεων των αναστολέων. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση και παρουσιάζονται με μια μορφολογία που συνδυάζει το ραβδόγραμμα με το διάγραμμα διασποράς, με την κάθε κουκίδα να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική τιμή. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μονή ανάλυση διακύμανσης (One Way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's post hoc για πολλαπλές συγκρίσεις. Οι διαφορές θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές, όταν $p < 0.05$.

5. Συζήτηση

Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής παρέχουν σαφείς ενδείξεις για την εμπλοκή του ΕΚΣ στην παθογένεια των αμφιβληστροειδοπαθειών, ενώ παράλληλα τίθενται και οι βάσεις για την στόχευση του ΕΚΣ ως θεραπευτικού μέσου για την αντιμετώπιση των βασικών παθοφυσιολογικών πτυχών των αμφιβληστροειδοπαθειών. Το πρώτο μέρος της διατριβής επικεντρώθηκε στον έλεγχο των νευροπροστατευτικών, αντιφλεγμονωδών και αγγειοπροστατευτικών αποκρίσεων που εξυπηρετεί το ΕΚΣ κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς. Η χορήγηση μέσω σταγόνων του επιλεκτικού αγωνιστή για τον CB2 υποδοχέα, AM1710, του CB1 ανταγωνιστή, SR141716, καθώς και η συνδυαστική χορήγηση των δύο αυτών παραγόντων, επέδειξε ποικίλες προστατευτικές αποκρίσεις έναντι των πρώιμων παθολογικών γνωρισμάτων της ΔΑς. Στο δεύτερο μέρος της διατριβής εξετάστηκαν οι νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG, στο μοντέλο της επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή. Αναλυτικότερα, εξετάστηκαν οι δράσεις του αναστολέα της υδρολάσης ABHD6, AM12100, καθώς και του διπλού αναστολέα της ABHD6/MAGL, AM11920.

Το μοντέλο των δύο εβδομάδων της ΔΑς που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, προσομοιάζει τα πρώιμα παθολογικά στοιχεία που συναντώνται σε ανθρώπους ασθενείς με ΔΑ πρώιμου σταδίου (ΔΑΠΣ). Δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη σε επίμυες, με την χορήγηση STZ, ανιχνεύθηκαν παθολογικές αλλαγές στον αμφιβληστροειδή των ζώων, σύμφωνες με την παρουσία νευροεκφύλισης. Οι αλλαγές αυτές περιλάμβαναν τη μείωση του συνολικού πάχους του αμφιβληστροειδούς και ειδικότερα της INL, μείωση του αριθμού των θετικών στην bNOS, βραχύνων κυττάρων και αύξηση των θετικών στην κασπάση 3, κυττάρων στην INL. Επί του παρόντος, τα αυξημένα ποσοστά κυτταρικού θανάτου που εντοπίστηκαν στους αμφιβληστροειδείς των διαβητικών ζώων, βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες στην βιβλιογραφία που αναφέρουν αύξηση του αριθμού των TUNEL⁺ κυττάρων στις στιβάδες ONL, INL και GCL, δύο μόλις εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη (Hernandez και συν., 2013; Hernandez και συν., 2019). Η πλειοψηφία των θετικών στην κασπάση 3, κυττάρων εντοπίστηκαν στην INL, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική χρώση στην GCL, ενώ σύμφωνα με την μορφομετρική ανάλυση της χρώσης Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης δεν επηρεάστηκε ούτε το πάχος της GCL, ούτε ο αριθμός των γαγγλιακών κυττάρων από τον διαβήτη. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η διαταραχές στην GCL εμφανίζονται πιθανότατα, αργότερα στην εξελικτική πορεία της νόσου. Παράλληλα, βρίσκονται σε συμφωνία με την μελέτη των Martín και συν., (2004), στην οποία ανιχνεύθηκε αυξημένος αριθμός θετικών στην κασπάση 3, κυττάρων στην INL μύων, δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη, ενώ αλλαγές στην GCL, όπως μείωση του πάχους της και εμφάνιση κυττάρων θετικών στην κασπάση 3 και σε TUNEL, έκαναν την εμφάνισή τους μετά το πέρας των δέκα εβδομάδων. Κατά ανάλογο τρόπο οι Gastinger και συν. (2006) αναφέρουν, ότι δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή διαβήτη σε επίμυες, παρατηρείται αύξηση της ανοσοδραστικότητας της κασπάσης 3 και του TUNEL σε κυτταρικούς πληθυσμούς στην INL που αντιστοιχούν σε χολινεργικά και ντοπαμινεργικά βραχύινα κύτταρα, υποδεικνύοντας επιβεβαιώνοντας την άποψη, ότι τα βραχύινα κύτταρα είναι από τους πρώτους κυτταρικούς τύπους του αμφιβλήτροειδούς που επηρεάζονται από τον διαβήτη.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία από τις πρώτες αναφορές που επιβεβαιώνουν την εμφάνιση ελλειμμάτων στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, τα οποία επιβεβαιώνονται από την μείωση της ανοσοδραστικότητας του NFL, καθώς και την μείωση του πάχους του, δύο μόλις εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη σε επίμυες. Ανάλογες τροποποιήσεις στην ανοσοδραστικότητα του NFL, έχουν αναφερθεί, πέντε εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη (Iban Arias και συν., 2018), ενώ μορφομετρικές αναλύσεις ιστολογικών χρώσεων, υποδεικνύουν επίσης μείωση του πάχους του NFL, τρεις μήνες μετά την έναρξη του διαβήτη σε επίμυες (Dong και συν., 2019). Οι αλλαγές στο επίπεδο των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, φαίνεται πως αποτελούν ένα από τα πρωταρχικά παθολογικά στοιχεία, το οποίο εμφανίζεται αρκετά νωρίς στο χρονικό συνεχές της ΔΑς. Μελέτες σε ασθενείς με ΔΑ, με την χρήση οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCT, Optical Coherence Tomography), φανερώνουν σημαντική μείωση στο πάχος της στιβάδας NFL (Gungor et al., 2015; Shi et al., 2018; Vujosevic et al., 2018). Φαίνεται μάλιστα, πώς υφίσταται μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πάχους της NFL και της δριμύτητας της ΔΑς (Park και συν., 2011; Shi και συν., 2018). Αξίζει να αναφερθεί εδώ, ότι η πρόωμη μείωση στο πάχος της στιβάδας NFL, εμφανίζεται κατά το στάδιο της προκλινικής ΔΑς, μία κατηγοριοποίηση που χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει το αρχικό στάδιο της νόσου (Peng et al., 2009; Toprak και συν., 2020), ενώ αναφορές έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία ελλειμμάτων στο πάχος του NFL, σε διαβητικούς ασθενείς χωρίς άλλα εμφανή σημεία ΔΑς (Vujosevic και Midena, 2013; Park και συν., 2011).

Στο σημείο αυτό, εύλογα θα μπορούσε να αναρωτηθεί κανείς, τον λόγο για τον οποίο οι μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της υποφαινόμενης, δίνουν τόση σημασία στην μελέτη των ελλειμμάτων που παρατηρούνται στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων. Προκειμένου να δώσουμε απάντηση στο συγκεκριμένο ερώτημα, θα πρέπει να αναλογιστούμε τους άξονες ως αναγκαίο και αναπόσπαστο τμήμα των γαγγλιακών κυττάρων, καθώς διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στη μεταφορά νευροτροφικών παραγόντων προς τα κυτταρικά σώματα (Nickells, 2012). Έχοντας αυτό κατά νου, πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τραυματισμοί και γενικότερα η διατάραξη της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας των αξόνων, δύναται να οδηγήσει σε προοδευτική ατροφία και εν τέλει στην εκφύλιση των κυτταρικών σωμάτων των γαγγλιακών κυττάρων, μέσω αποπτωτικών διεργασιών (Nickells, 2012). Μεγαλύτερη απόδειξη του παραπάνω ισχυρισμού αποτελεί το μοντέλο διατομής του οπτικού νεύρου, ένα ζωικό μοντέλο γλαυκώματος, στο οποίο η διατομή του οπτικού νεύρου οδηγεί σε προοδευτική απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων (Yi και συν., 2016). Η προστασία των αξόνων διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο για την βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων (Munemasa και Kitaoka, 2013; Ribas και συν., 2017). Μάλιστα, αν αναλογιστούμε το γεγονός ότι τα γαγγλιακά κύτταρα έχουν πεπερασμένη ικανότητα αναγέννησης μετά από βλάβη (Goldberg et al., 2002), κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων τρόπων για την διατήρηση της ακεραιότητας των αξόνων τους και κατ' επέκταση την έμμεση προστασία των γαγγλιακών κυττάρων.

Το βασικότερο αίτιο που ευθύνεται για την προοδευτική εκφύλιση των αξόνων και των κυτταρικών σωμάτων των γαγγλιακών κυττάρων, μπορεί να αναζητηθεί στην διατάραξη της ορθόδρομης (από το σώμα προς τις απολήξεις) και της ανάδρομης (από τις απολήξεις προς το σώμα) αξονο-πλασματικής ροής, η οποία αποτελεί ένα από τα πρωταρχικά γνωρίσματα του διαβήτη (Baptista και συν., 2019). Η αξονο-πλασματική ροή είναι ο μοναδικός τρόπος επικοινωνίας του κυτταρικού σώματος με τις απολήξεις του νευρώνα και αποτελεί προαπαιτούμενο παράγοντα για την διατήρηση της ομοιόστασης και της εύρυθμης

λειτουργίας των γαγγλιακών κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, παρά την ύπαρξη ελλειμμάτων στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, όπως αυτά επιβεβαιώθηκαν από την μειωμένη ένταση και το ελαττωμένο πάχος της NFL ανοσοδραστικότητας, δεν προέκυψε καμία αλλαγή ούτε στο πάχος της GCL, ούτε στον αριθμό των γαγγλιακών κυττάρων κατά την ανάλυση της ιστολογικής χρώσης Ηωσίνης-Αιματοξυλίνης. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την ανυπαρξία κυττάρων θετικών στην κασπάση 3 στην GCL, υποδεικνύουν ότι η βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων δεν επηρεάστηκε από τον διαβήτη. Η παρατηρούμενη αναντιστοιχία μεταξύ των ελλειμμάτων στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων και τον ανεπηρέαστο αριθμό των κυτταρικών σωμάτων τους, παρ' ότι με μία πρώτη ματιά φαντάζει περίεργη, εντούτοις έχει λογική βάση. Μία πιθανή εξήγηση αποτελεί το γεγονός ότι το χρονικό διάστημα των δύο εβδομάδων, που μεσολάβησε μετά την επαγωγή του διαβήτη, δεν είναι αρκετό για να έχει ξεκινήσει η εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων, ωστόσο είναι επαρκές για την διαπίστωση των ελλειμμάτων στους άξονες τους. Η διατάραξη της δομικής και λειτουργικής συνέχειας των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, θα έλεγε κανείς ότι αποτελεί το «εναρκτήριο λάκτισμα» για την κινητοποίηση των εκφυλιστικών διεργασιών που θα εξοντώσουν έπειτα τα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων. Η άποψη αυτή βασίζεται εν μέρει σε δεδομένα που συνιστούν, ότι οι βλάβες των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων αποτελούν τα πρωταρχικά παθοφυσιολογικά γνωρίσματα της ΔΑΣ (Toprak και συν., 2020; Fernandez και συν., 2012, αλλά και άλλων αμφιβληστροειδοπαθειών όπως το γλαύκωμα (Maddineni και συν., 2020) και προηγούνται της απώλειας των κυτταρικών σωμάτων τους. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός, ότι υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις η βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων δεν επηρεάζεται άμεσα από την διατάραξη των νευραξόνων τους. Για παράδειγμα, οι Soto και συν. (2008), χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο γλαυκώματος σε μύες, αναφέρουν την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού λειτουργικών γαγγλιακών κυττάρων με απουσία ανάδρομης χρώσης με φθορίζων χρυσό (fluorogold), γεγονός που συνιστά καταστροφή σε κάποιο σημείο του νευράξονά τους. Οι συγγραφείς αναφέρουν, ότι παρά την καταστροφή του άπω τμήματός τους, το εγγύς τμήμα των αξόνων παρέμεινε ανεπηρέαστο, συμβάλλοντας παράλληλα και στην βιωσιμότητα των γαγγλιακών κυττάρων (Soto και συν., 2008), ενώ ανάλογες αποκρίσεις έχουν παρατηρηθεί και σε μοντέλα της ΔΑΣ (Fernandez και συν., 2012). Εν προκειμένω, παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων, αυτό δεν αναιρεί την πιθανή ύπαρξη πρώιμων δομικών και λειτουργικών ελλειμμάτων στα γαγγλιακά κύτταρα, εξαιτίας του διαβήτη. Σε μία πρόσφατη μελέτη, οι Amato και συν. (2022) χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο δύο εβδομάδων ΔΑΣ σε μύες, επαγόμενης από στρεπτοζοτοκίνη, αναφέρουν την απουσία κυτταρικού θανάτου στα γαγγλιακά κύτταρα, ωστόσο μέσα από την πραγματοποίηση μορφομετρικής ανάλυσης, επιβεβαιώνουν την παρουσία δομικών και λειτουργικών ελλειμμάτων σε αυτά, η ανάπτυξη των οποίων φαίνεται να παρεμποδίζεται από την χορήγηση οκτρεοτίδης. Το εύρημα αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως μεγίστης σημασίας στην προσπάθεια επίτευξης νευροπροστασίας, καθώς φαίνεται πως η εφαρμογή προστατευτικών αναλόγων στην πρώιμη φάση της ΔΑΣ, προτού ακόμα την έναρξη των εκφυλιστικών διεργασιών στα γαγγλιακά κύτταρα, μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη ελλειμμάτων στην δομή και την λειτουργία τους, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο ανέπαφη την φυσιολογία τους.

Η προστασία των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων, η οποία προέκυψε μετά την τοπική εφαρμογή, μέσω σταγόνων, του CB2 αγωνιστή AM1710, αποτελεί ίσως ένα από τα σπουδαιότερα ευρήματα της παρούσας διατριβής. Μελέτες *in situ* υβριδοποίησης έχουν αναδείξει την παρουσία των CB2 υποδοχέων σε γαγγλιακά κύτταρα στον αμφιβληστροειδή

επίμυων (Lu και συν., 2000), ενώ τα ευρήματα αυτά έχουν επαληθευθεί και από ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις (Lopez και συν., 2011). Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής στοιχεία που να επιβεβαιώνουν την παρουσία του CB2 υποδοχέα στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, επίμυων. Μολαταύτα, στον αμφιβληστροειδή των μυών, ο CB2 υποδοχέας εκφράζεται κατά την ανάπτυξη στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων, όπου και επιτελεί κρίσιμο ρόλο στην καθοδήγησή τους προς τους τελικούς στόχους (Duff και συν., 2013). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι φαρμακολογικές προσεγγίσεις που αυξάνουν τα επίπεδα του cAMP και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), συμβάλλουν σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν την αναγέννηση του εκφυτικού κώνου των γαγγλιακών αξόνων σε επίμυες (Chierzi και συν., 2005). Έχοντας αυτό κατά νου και δοθείσας της ιδιότητας των CB2 αγωνιστών να αυξάνουν το cAMP και την ενεργοποίηση της PKA σε κάποιες περιπτώσεις (Borner και συν., 2009; Tao και συν., 2016), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι αυτό βρίσκει εφαρμογή και στην προκειμένη περίπτωση, με τον επιλεκτικό CB2 αγωνιστή, AM1710. Ενδεχομένως, το προαναφερθέν μπορεί να αποτελεί και μία πιθανή εξήγηση της αξονο-προστατευτικής δράσης που προέκυψε κατά την χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή/αντίστροφου αγωνιστή, SR141716A. Πιο συγκεκριμένα, είναι γνωστό τοις πάσι, ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα με κάποιον αγωνιστή μειώνει την παραγωγή και απελευθέρωση του cAMP και την επακόλουθη ενεργοποίηση της PKA (Howlett και συν., 1984; Qian και συν., 2017), ενώ η πρόσδεση ανταγωνιστών/αντίστροφων αγωνιστών στον CB1 υποδοχέα έχει την αντίστροφη δράση (Rossi και συν., 2011; Qian και συν., 2017). Επιπλέον, η παρουσία του CB1 υποδοχέα έχει επιβεβαιωθεί τόσο στα γαγγλιακά κύτταρα, όσο και στους άξονές τους, στον αμφιβληστροειδή των επίμυων (Straiker και συν., 1999). Πέραν τούτου, υπάρχουν αδιαμφισβήτητες αποδείξεις που υποστηρίζουν την εμπλοκή του CB1 υποδοχέα στην καθοδήγηση των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων προς τον θάλαμο, κατά το πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο σε μύες και στον *Xenopus laevis*, με τα ευρήματα να συνηγορούν πως η χορήγηση CB1 αγωνιστών αναστέλλει την φυσιολογική ανάπτυξη των αξόνων, εν αντιθέσει με την παρουσία ανταγωνιστών/αντίστροφων αγωνιστών του CB1, η οποία φαίνεται να την υποβοηθά (Argaw και συν., 2011; Elul και συν., 2022). Συνολικά, βασιζόμενοι στα προαναφερθέντα ευρήματα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο CB1 ανταγωνιστής/αντίστροφος αγωνιστής, SR141716A, πέραν της δυναμικής εμπλοκής του στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων κατά την ανάπτυξη, δύναται μέσω ενός άγνωστου, μέχρι στιγμής, μηχανισμού να συμμετέχει και σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, κατά την ενήλικη ζωή.

Αρκετές μελέτες πλέον επιβεβαιώνουν την έκφρασή του CB2 υποδοχέα στον αμφιβληστροειδή των σπονδυλωτών (Lu και συν., 2000; Lopez και συν., 2011; Borowska-Fielding και συν., 2018). Επί του παρόντος, η συγκεκριμένη διατριβή αποτελεί την πρώτη αναφορά στην βιβλιογραφία για τις προστατευτικές δράσεις που προκύπτουν από την ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα, σε ένα *in vivo* ζωικό μοντέλο ΔΑΠΣ. Αναλυτικότερα, η τοπική χορήγηση μέσω σταγόνων του επιλεκτικού CB2 αγωνιστή, AM1710, επέδειξε ποικίλες νευροπροστατευτικές αποκρίσεις στο μοντέλο των δύο εβδομάδων της ΔΑΠΣ, καταργώντας πλήρως την απώλεια των bNOS βραχύνων κυττάρων, μειώνοντας τον αριθμό των θετικών στην κασπάση 3 κυττάρων στην INL και διατηρώντας παράλληλα το πάχος της σε φυσιολογικά επίπεδα. Τα ευρήματα για τις προστατευτικές δράσεις του CB2 αγωνιστή, AM1710, στην μείωση της εκφύλισης των βραχύνων κυττάρων είναι πλήρως δικαιολογημένα, ιδιαίτερα μάλιστα εάν αναλογιστούμε το γεγονός ότι ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία των CB2 υποδοχέων σε βραχύνια κύτταρα στον αμφιβληστροειδή επίμυων (Lopez και συν., 2011). Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου

έχουν επιβεβαιώσει ανάλογες προστατευτικές δράσεις των κανναβινοειδών στα βραχύνια κύτταρα, διαμεσολαβούμενες μέσω του CB2 υποδοχέα, όπου η συγχορήγηση του CB2 ανταγωνιστή, AM630 με τα κανναβινοειδή, κατήργησε μερικώς τις νευροπροστατευτικές τους δράσεις στο μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας (Kokona και Therios, 2015; Spyridakos και συν 2021). Παράλληλα, τα ευρήματα για τις νευροπροστατευτικές αποκρίσεις που διεκπεραιώνονται μέσω του CB2 υποδοχέα σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, επιβεβαιώνονται και από την μελέτη των Imamura και συν. (2018), στην οποία η ενδοϋαλοειδική χορήγηση του CB2 αγωνιστή, HU-308, μείωσε την εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων και βελτίωσε τις αποκρίσεις των α και β κυμάτων του ηλεκτρο-αμφιβληστροειδογραφήματος (ΗΑΓ), σε ένα μοντέλο επαγόμενης από το φως αμφιβληστροειδικής εκφύλισης σε μύες. Παρ' ότι οι λειτουργίες που εξυπηρετούνται από τον CB2 υποδοχέα είναι καλά διατηρημένες μεταξύ των ειδών και η ομολογία του γονιδιώματος του CB2 μεταξύ ανθρώπου και επίμυος κυμαίνεται στο 81% (Brown και συν., 2002), εντούτοις χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την αναγωγή των ευρημάτων από τους επίμυες στον άνθρωπο, καθ' ότι τα πρότυπα έκφρασης του CB2 δύναται να διαφέρουν σημαντικά.

Εν αντιθέσει με τις προστατευτικές δράσεις του CB2 αγωνιστή, AM1710, η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή, SR141716A, δεν επέδειξε προστατευτικές επιδράσεις στα βραχύνια κύτταρα, όπως φάνηκε από την αδυναμία του να αναστείλει την απώλεια των bNOS βραχύνιων κυττάρων και να εμποδίσει την αύξηση των θετικών στην κασπάση 3 κυττάρων στην INL. Τα παρόντα ευρήματα αντιφάσκουν με αναφορές στην βιβλιογραφία, οι οποίες αναδεικνύουν τις προστατευτικές δράσεις που επιτελούνται μέσω της αναστολής της λειτουργίας του CB1, σε ποικίλες επιπλοκές του διαβήτη, όπως η διαβητική νεφροπάθεια (Barutta και συν., 2010; Nam και συν., 2012; Barutta και συν., 2018; Jacquot και συν., 2023) και η διαβητική καρδιομυοπάθεια (Rajesh και συν., 2012). Ωστόσο, πριν προβεί κανείς σε προσπάθειες σύγκρισης, θα πρέπει να αναλογιστεί ότι οι προστατευτικές δράσεις στα προαναφερθέντα μοντέλα, επιτελέστηκαν μέσω περιφερικά ευρισκόμενων CB1 υποδοχέων και επιπλέον δεν αφορούσαν νευρικά κύτταρα. Παράλληλα, οι κυτταρο-προστατευτικές δράσεις στα αναφερόμενα μοντέλα, είναι ως επί το πλείστον, αποτέλεσμα της ικανότητας των CB1 ανταγωνιστών να αναστέλλουν το οξειδωτικό στρες (Rajesh και συν., 2012; Barutta και συν., 2010), γεγονός που αποτελεί σημείο σύγκλισης με την παρούσα μελέτη, καθώς το SR141716A κατάφερε να μειώσει την ανοσοδραστικότητα της νιτροτυροσίνης στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς. Η εφαρμογή ανταγωνιστών του CB1 υποδοχέα δεν αποτελεί πανάκεια για τις επιπλοκές του διαβήτη, πόσω μάλλον όταν αναφερόμαστε στο νευρικό σύστημα, όπου η κατάσταση φαίνεται να διαφέρει σημαντικά. Ενδεικτικά, σε μοντέλα διαβητικής νευροπάθειας που σχετίζονται με τις βλάβες που προκαλεί ο διαβήτης σε περιφερικά νεύρα, κανναβινοειδή όπως το WIN55,212-2 και το HU-210, εξυπηρετούν αναλγητικές και νευροπροστατευτικές επιδράσεις, μέσω της ενεργοποίησης των CB1 υποδοχέων (Ulugol και συν., 2004; Zhang και συν., 2009). Επιπλέον στο ΚΝΣ η συστηματική χορήγηση του ενδοκανναβινοειδούς ΑΕΑ, παρείχε νευροπροστατευτικές δράσεις στον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό διαβητικών επίμυων, οι οποίες καταργήθηκαν κατά την συγχορήγησης της με τον CB1 ανταγωνιστή, AM251 (de Morais και συν., 2016). Εν προκειμένω, η συγκεκριμένη διατριβή αποτελεί την πρώτη αναφορά για τις επιδράσεις ενός CB1 ανταγωνιστή στην βιωσιμότητα των νευρώνων, σε ένα μοντέλο ΔΑς. Οι μόνες άλλες αναφορές που διαθέτουμε για την εμπλοκή του CB1 στην ΔΑ, δεν επικεντρώνονται στα νευρικά κύτταρα και υποδεικνύουν ότι η γενετική διαγραφή (knock out) ή ο φαρμακολογικός αποκλεισμός, μέσω του SR141716A, του CB1 υποδοχέα, περιορίζουν την εκφύλιση των αγγείων *in vivo* και *in vitro* (El-Remessy και συν., 2011). Ανάλογα είναι

και τα ευρήματα που προκύπτουν από *in vitro* μελέτες, όπου η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή, AM251, σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου (RPE), εκτεθειμένων σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης, μείωσε τον κυτταρικό θάνατο (Lim και συν., 2012), ενώ κατά παρόμοιο τρόπο, ο CB1 ανταγωνιστής, SR141716A, κατήργησε τον επαγόμενο από την οξειδωτική βλάβη, θάνατο των κυττάρων του RPE (Wei και συν., 2013).

Η εκτεταμένη παρουσία οξειδωτικού και νιτρογενούς στρες αποτελεί ένα από τα πιο κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της ΔΑς. Η νιτροτυροσίνη (NT), η οποία δημιουργείται κατά την νιτροποίηση των πρωτεϊνών στο αμινοξύ τυροσίνη, αποτελεί βασική έκφραση του νιτρογενούς στρες και προκύπτει κατά την αντίδραση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) ή άλλους μεταβολίτες του NO, δημιουργώντας κυτταροτοξικούς παράγοντες με δυνατότητα νιτροποίησης, τους υπεροξυνιτρίτες (ONOO⁻) (Bartesaghi και Radi, 2018). Η παρουσία της νιτροτυροσίνης έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση την διατάραξη της ομοιόστασης των κυττάρων, με ολέθριες συνέπειες για την βιωσιμότητά τους (Bartesaghi και Radi, 2018). Στην παρούσα εργασία σημειώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της νιτροτυροσίνης στον αμφιβληστροειδή των πειραματόζωων εξαιτίας του διαβήτη, όπως φάνηκε από την ανασοϊστοχημική μελέτη με την χρήση αντισώματος έναντι της NT. Το προαναφερθέν βρίσκεται σε άμεση συμφωνία με μελέτες στην βιβλιογραφία που υποδεικνύουν αύξηση στην έκφραση της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), της απελευθέρωσης NO και των επιπέδων της NT σε προκλινικά μοντέλα της ΔΑς, τόσο *in vivo* (Du et al., 2002; Liu et al., 2013; Hernandez-Ramirez et al., 2017; Bunch και συν., 2022), όσο και *in vitro* (Sun και συν., 2010). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρουσία της νιτροτυροσίνης αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρώιμων σταδίων της ΔΑς, με μελέτες να αναφέρουν αύξηση των επιπέδων της NT, επτά (Hernandez-Ramirez et al., 2017) ή ακόμη και έξι η μέρες (Ellis και συν., 2002) μετά την επαγωγή του διαβήτη σε επίμυες. Εν προκειμένω, η τοπική χορήγηση μέσω σταγόνων του CB1 ανταγωνιστή, SR141716 και του CB2 αγωνιστή AM1710, κατέστειλε σε σημαντικό βαθμό το νιτρογενές στρες, όπως φάνηκε από τα μειωμένα επίπεδα της NT στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς. Η δράση αυτή οφείλεται εν μέρει στην ικανότητα των κανναβινοειδικών υποδοχέων να ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή αναστολή της λειτουργίας των NADPH οξειδασών, οι οποίες αποτελούν τις γενεσιουργές αιτίες για την εκδήλωση του οξειδωτικού και νιτρογενούς στρες (Chung και συν., 2011; Chung και συν., 2012; Jia και συν., 2014; Morris και συν., 2022). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα επάγει προ-οξειδωτικές αποκρίσεις (Rajesh και συν., 2010; Mukhopadhyay και συν., 2010) σε περιφερικά όργανα όπως η καρδιά, ενώ παράλληλα ο αποκλεισμός της λειτουργίας του CB1 αναστέλλει την οξειδωτική βλάβη σε διάφορες παθήσεις των περιφερικών οργάνων (Tiyerili et al., 2010; Comelli et al., 2010; Jorgačević και συν., 2021; Szabo et al., 2022). Στην ΔΑ, η *in vivo* και *in vitro* εφαρμογή του ανταγωνιστή SR141716, σε διαβητικούς μύες και σε καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης, μείωσε ριζικά το οξειδωτικό και το νιτρογενές στρες (El-Remessy et al., 2011). Στον ίδιο παρονομαστή, βρίσκεται και η μελέτη των Wei και συν. (2013), όπου το SR141716 ανέστειλε το επαγόμενο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), οξειδωτικό στρες σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων του RPE, ενισχύοντας παράλληλα την δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Wei και συν., 2013). Οι αντιοξειδωτικές αποκρίσεις του SR141716 σε περιφερικά νεύρα, έχουν επιβεβαιωθεί και στην διαβητική νευροπάθεια (Comelli και συν., 2010). Στον αντίποδα, η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα από ενδογενή και συνθετικά κανναβινοειδή είναι σε θέση να μειώνει τις προ-

οξειδωτικές αποκρίσεις σε παθολογικές καταστάσεις στον εγκέφαλο, γεγονός που έχει επαληθευτεί *in vitro* (Duncan και συν., 2009) και από *in vivo* μελέτες (Rangel-López και συν., 2015; Lucas Luz και συν., 2021). Οι αντιοξειδωτικές δράσεις που διεκπεραιώνονται μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα έχουν επαληθευθεί και σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, με την χρήση *ex vivo* μοντέλων σε απομονωμένο αμφιβληστροειδή βουοειδούς (Bush και συν., 2016) και *in vivo*, σε ένα μοντέλο επαγόμενης από το φως νευροεκφύλισης στον αμφιβληστροειδή του ψαριού zebra (Proano και συν., 2023). Μία πιθανή εξήγηση που μπορεί να δικαιολογήσει την εμφανή ασυμφωνία μεταξύ των μελετών, σχετικά με το αν η ενεργοποίηση ή η αναστολή της λειτουργίας του CB1 υποδοχέα αναστέλλει το οξειδωτικό και το νιτρογενές στρες, μπορεί να αναζητηθεί λαμβάνοντας υπόψη την φύση της μελέτης (*in vitro* vs *in vivo*), καθώς και το προς εξέταση σύστημα (εγκέφαλος, αμφιβληστροειδής ή κάποιο άλλο όργανο). Επιπλέον ακόμη και όταν πρόκειται για το ίδιο σύστημα αναφοράς, εν προκειμένω τον αμφιβληστροειδή, είναι δυνατόν τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης του CB1 υποδοχέα και οι ενδεχόμενες ποικιλότροπες λειτουργίες που αυτός εξυπηρετεί στους επιμέρους κυτταρικούς τύπους, να είναι οι βασικοί υπαίτιοι για αυτήν την διχογνωμία μεταξύ των μελετών. Υπό αυτό το πρίσμα, στην παρούσα μελέτη η ανάλυση των ξεχωριστών στιβάδων του αμφιβληστροειδούς αποκάλυψε πως το SR141716 ανέστειλε με στατιστικά σημαντικό τρόπο την επαγόμενη από τον διαβήτη αύξηση των NT⁺ κυττάρων, μόνο στην GCL (βλ. Εικόνα 4.8.C), γεγονός μάλιστα που βρίσκεται σε απόλυτη σύμπτωση με την προστατευτική δράση του SR141716 στους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων (βλ. Εικόνα 4.2.B και C).

Επί του παρόντος, η υποφαινόμενη μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά στην βιβλιογραφία που υποδεικνύει την ανασταλτική δράση ενός επιλεκτικού αγωνιστή του CB2 υποδοχέα στο νιτρογενές στρες που εκδηλώνεται στον αμφιβληστροειδή. Η ανάλυση των ξεχωριστών στιβάδων του αμφιβληστροειδούς υπέδειξε ότι το AM1710, σε αντίθεση με το SR141716, ανέστειλε την επαγόμενη από τον διαβήτη αύξηση της NT σε όλες τις εξεταζόμενες στιβάδες (βλ. Εικόνα 4.8.C). Η μείωση της NT που προέκυψε κατά την τοπική εφαρμογή του AM1710, παρουσιάζει σημεία σύγκλισης με την πλειονότητα των μελετών στην βιβλιογραφία. Χαρακτηριστικά, η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα σε περιφερικούς ιστούς, όπως η καρδιά, το ήπαρ, οι νεφροί, και το δέρμα εμφανίζει αντιοξειδωτικές δράσεις μειώνοντας την παραγωγή και απελευθέρωση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και άλλων μορίων με προ-οξειδωτική δράση (Mukhopadhyay και συν., 2010; Horváth και συν., 2012; Parlar και συν., 2018; Li και συν., 2020; Rajesh και συν., 2022). Σε αντίθεση με τον διττό ρόλο του CB1 στο οξειδωτικό στρες, μεταξύ περιφερικών οργάνων και ΚΝΣ, μπορεί κανείς να ισχυριστεί με μία σχετική βεβαιότητα, ότι ο CB2 υποδοχέας διαμεσολαβεί αντιοξειδωτικές αποκρίσεις, ανεξαρτήτου της εντόπισής του. Τον ισχυρισμό αυτόν επιβεβαιώνουν μελέτες στο ΚΝΣ που αναδεικνύουν τις ανασταλτικές δράσεις αγωνιστών του CB2 υποδοχέα στο οξειδωτικό στρες (Choi και συν., 2013; Javed και συν., 2016). Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερόμενες δράσεις που προκύπτουν από τον χειρισμό της σηματοδότησης δια μέσου των κανναβινοειδικών υποδοχέων στις οξειδωτικές αποκρίσεις, είναι απολύτως δικαιολογημένο το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη, η συνδυαστική χορήγηση του AM1710 και του SR141716 προκάλεσαν την μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της NT στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς, σε σύγκριση με την μεμονωμένη χορήγησή τους. Η διπλή στόχευση του κανναβινοειδικού συστήματος με αναστολή της λειτουργίας του CB1 υποδοχέα και ταυτόχρονη ενεργοποίηση του CB2, φαίνεται να αποτελεί την ιδανική στρατηγική για την μείωση του οξειδω-νιτρογενούς στρες σε παθολογικές καταστάσεις. Σε σύμπλευση με τα παρόντα ευρήματα, η ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα

στα μακροφάγα αυξάνει την φωσφορυλίωση της p38 MAPK κινάσης οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), ενώ η χορήγηση είτε ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα, είτε αγωνιστή του CB2 υποδοχέα, αναστέλλει την παραγωγή ROS (Han και συν., 2009).

Η φλεγμονή αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην παθογένεια της ΔΑς, με μελέτες να υποδεικνύουν ότι είναι υπεύθυνη για την διατάραξη του ΑΑΦ (Joussen και συν., 2001; Zhang και συν., 2011), ενώ κοινό τόπο αποτελεί επίσης η εμπλοκή της σε διεργασίες νευροεκφύλισης (Costa και συν., 2012; Scholz και συν., 2015). Ένα επιμέρους χαρακτηριστικό της φλεγμονής στην ΔΑ είναι η ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων (αστροκύτταρα, κύτταρα του Müller και μικρογλοιακά), γεγονός που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρώιμων σταδίων της ΔΑς (Rungger-Brändle και συν., 2000; Park και συν., 2021). Αναφορικά με την μικρογλοία, η ενεργοποίησή της συνοδεύεται και από μια μορφολογική αλλαγή, κατά την οποία μεταβαίνει από μία αστεροειδούς μορφής, με λεπτές αποφυάδες κύτταρο, προς μία αμοιβαδοειδή μορφολογία με αποσυρμένες αποφυάδες (Gaucher και συν., 2007; Chen και συν., 2015). Εν συνεχεία, η ενεργοποιημένη μικρογλοία απελευθερώνει κυτταροτοξικές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α, η IL-1β και η IL-6 (Kradny και συν., 2005; Li και συν., 2021) που ενισχύουν την προ-φλεγμονώδη απόκριση και κατ' επέκταση των κυτταρικό θάνατο. Σε άμεση σύνδεση με τα προηγούμενα, στην παρούσα μελέτη, δύο εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη, σημειώθηκε σημαντική αύξηση στον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων και των επιπέδων του TNF-α στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών ζώων (βλ. Εικόνα 4.7.A, B και C).

Πέραν της μικρογλοίας, κατά το πρώιμο στάδιο της ΔΑς παρατηρείται επίσης και ενεργοποίηση της μακρογλοίας. Αναλυτικότερα, η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης GFAP στα κύτταρα του Müller, εξαιτίας της υπεργλυκαιμίας, αποτελεί το αναγνωριστικό σημάδι της ενεργοποίησής τους, γεγονός που επιβεβαιώνεται τόσο σε ιστούς ζώων (Rungger-Brändle και συν., 2000; Barber και συν., 2000; Puro, 2002; Hernandez και συν., 2013 Hernández-Ramírez και συν., 2017; Picconi και συν., 2019), όσο και σε ιστούς ασθενών (Vujosevic και Midena, 2013; Vujosevic και συν., 2015). Τα αντιδραστικά κύτταρα του Müller, κατά ανάλογο τρόπο με τα μικρογλοιακά, αποτελούν πηγή παραγωγής και απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών καθώς και ROS (Tu και συν., 2020; Tu και συν., 2021; Nonparath και συν., 2021; Albert-Garay και συν., 2022; Portillo και συν., 2022), οι οποίες εντείνουν την προφλεγμονώδη απόκριση, αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων του ΑΑΦ (Wang και συν., 2010) και επάγουν τον νευρωνικό θάνατο (Qiu και συν., 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα αντιδραστικά κύτταρα του Müller ρυθμίζουν εμμέσως τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις των μικρογλοιακών και των μακροφάγων, αυξάνοντας την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF-α και IL-1β σε αυτά τα κύτταρα (Portillo και συν., 2017; Hu και συν., 2021). Σε απόλυτη συμφωνία με τα προαναφερθέντα, στο παρόν μοντέλο των δύο εβδομάδων της ΔΑΠΣ, ο διαβήτης αύξησε την έκφραση της GFAP στον αμφιβληστροειδή των ζώων (βλ. Εικόνα 4.6.A και B). Πέραν τούτου, η αύξηση στην έκφραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNFα (βλ. Εικόνα 4.7.C) και του αυξητικού παράγοντα VEGF (βλ. Εικόνα 4.9.B) πιθανότατα ως ένα βαθμό να σχετίζεται με τα αντιδραστικά κύτταρα του Müller, καθ' ότι αποτελούν πηγή παραγωγής και απελευθέρωσης τόσο του TNFα (Yang και συν., 2019; Liu και συν., 2021), όσο και του VEGF (Hirata και συν., 1997; Wang και συν., 2010; Qiu και συν., 2016) σε μοντέλα ΔΑς.

Λαμβάνοντας υπόψη την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η καινοτομία της παρούσας μελέτης έγκειται επίσης στο γεγονός ότι για πρώτη φορά επιβεβαιώνονται οι

αντιφλεγμονώδεις δράσεις που διαμεσολαβούνται από την ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα, σε ένα *in vivo* μοντέλο ΔΑΠΣ. Αναλυτικότερα, η τοπική χορήγηση του επιλεκτικού CB2 αγωνιστή, AM1710, μείωσε την ενεργοποίηση της μικρογλοίας (βλ. Εικόνα 4.7.A και B) και της μακρογλοίας (βλ. Εικόνα 4.6.A και B), καθώς και τα επίπεδα του TNF- α (βλ. Εικόνα 4.7.C) στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών ζώων. Σε αντιστοιχία με τα προαναφερθέντα, η πλειοψηφία των μελετών που αφορούν το ΚΝΣ, συγκλίνει προς την πεποίθηση ότι ο CB2 υποδοχέας διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ρύθμιση των προφλεγμονωδών αποκρίσεων στα μικρογλοιακά κύτταρα. Σε παθολογικές καταστάσεις στο ΚΝΣ, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του CB2 στην μικρογλοία (Maresz και συν., 2005), ενώ η ενεργοποίηση του υποδοχέα από ενδογενή ή συνθετικά κανναβινοειδή μειώνει την αντιδραστικότητα των μικρογλοιακών κυττάρων και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών από αυτά (Ehrhart και συν., 2005; Ma και συν., 2015; Malek και συν., 2015). Πέραν τούτου, η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα στα μικρογλοιακά κύτταρα, είναι σε θέση να επάγει την μετάβασή τους από τον προφλεγμονώδη M1 φαινότυπο, προς τον αντιφλεγμονώδη M2 μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/Nrf2 (Wang και συν., 2023), διεγείροντας παράλληλα την αύξηση της έκφρασης και απελευθέρωσης αντιφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-10 (Cogrea και συν., 2010; Mecha και συν., 2015). Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του CB2 υποδοχέα επιβεβαιώνονται και σε μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών, όπου η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα μειώνει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών (Szczeniak και συν., 2017; Spyridakos και συν., 2021). Τέλος, οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις που προκύπτουν κατά την ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα, έχουν αναφερθεί και σε *in vitro* μοντέλα που προσομοιάζουν τον φαινότυπο ΔΑς, όπου η εφαρμογή CB2 αγωνιστών μειώνει τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF- α , IL-1 β και του μορίου πρόσδεσης ICAM-1 σε καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων του Muller (Ontko και συν., 2021; Stark και συν., 2021). Ο ρόλος του CB2 υποδοχέα στην μακρογλοία φαίνεται πώς είναι παρόμοιος με αυτόν που διαθέτει στην μικρογλοία, καθώς σε παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του στα αντιδραστικά αστροκύτταρα (Fernández-Trapeo και συν., 2017) και στα κύτταρα του Müller (Guley και συν., 2019). Στην παρούσα μελέτη, ο CB2 αγωνιστής AM1710, κατάφερε να μειώσει επιτυχώς την ενεργοποίηση της μακρογλοίας, όπως αποδείχθηκε από την μειωμένη έκφραση της GFAP. Ανάλογα ευρήματα αναφέρονται και στην μελέτη των Sun και συν. (2014), όπου ο CB2 αγωνιστής JWH015 ανέστειλε την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων στο νωτιαίο μυελό επίμυων, μειώνοντας την έκφραση της GFAP σε αυτά.

Βασίζόμενοι σε μελέτες που υποδεικνύουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις που προκύπτουν από την αναστολή της λειτουργίας του CB1 υποδοχέα σε επιπλοκές του διαβήτη (Liu και συν., 2010; Barutta και συν., 2010; Nam και συν., 2012; Chang και συν., 2018), συμπεριλαμβανομένου και ενός μοντέλου ΔΑς (El-Remessy και συν., 2011), στο παρόν μοντέλο της ΔΑΠΣ χρησιμοποιήσαμε τον CB1 ανταγωνιστή, SR141716. Εντούτοις, σε πλήρη αντίθεση με την αρχική μας υπόθεση, το SR141716 δεν επέδειξε σημαντικές αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθώς δεν επηρέασε σημαντικά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας (βλ. Εικόνα 4.7.A και B), της μακρογλοίας (βλ. Εικόνα 4.6.A και B) και τα επίπεδα του TNF- α (βλ. Εικόνα 4.7.C) στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς. Παρά τις αναφερόμενες αντιφλεγμονώδεις δράσεις των ανταγωνιστών του CB1 υποδοχέα, επαρκείς ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η αναστολή της λειτουργίας του στο ΚΝΣ, με την χορήγηση του SR141716, αυξάνει την έκφραση του NF- κ B, των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF- α , IL-1 β and IL-6, των χημειοκινών MCP-1 και CX3CL1, ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση των

αντιφλεγμονωδών κυτοκινών IL-4 και IL-10 (Lou και συν., 2018). Στον αμφιβληστροειδή, η χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή AM251, αύξησε την αντιδραστικότητα της μικρογλοίας και την έκφραση του TNF- α , σε ένα μοντέλο επαγόμενης από το φως εκφύλισης σε επίμυες (Soliño και συν., 2021). Κατά παρόμοιο τρόπο, οι CB1 ανταγωνιστές SR141716 και AM251, αναστέλλουν την αύξηση της έκφρασης της Arg-1, ενός κρίσιμου γονιδίου του M2 φαινότυπου της μικρογλοίας, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την μετάβαση της μικρογλοίας από τον M1 προφλεγμονώδη, προς τον M2 αντιφλεγμονώδη φαινότυπο (Mecha και συν., 2015). Στα προαναφερθέντα δεδομένα, προστίθενται και ευρήματα που αναδεικνύουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις που προκύπτουν από την ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων, είτε από συνθετικά είτε από ενδογενή κανναβινοειδή, σε παθολογικές καταστάσεις στο ΚΝΣ (Panikashvili και συν., 2005; Eljaschewitsch και συν., 2006; Rossi και συν., 2011; de Lago και συν., 2012). Τέλος είναι πιθανό, η αδυναμία του SR141716 να επηρεάσει την φλεγμονή στο μοντέλο της ΔΑΠΣ, να οφείλεται στην ύπαρξη σεξουαλικού διμορφισμού των ζώων, ως προς την απόκριση του ΕΚΣ σε καταστάσεις φλεγμονής στο ΚΝΣ. Υπό αυτό το πρίσμα, οι De Meij και συν. (2021), αναφέρουν στην μελέτη τους, ότι οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις στον εγκέφαλο, εξαρτώνται από τον CB1 υποδοχέα στους αρσενικούς μύες, ενώ στους θηλυκούς διεκπεραιώνονται μέσω του CB2, ένα ιδιαίτερο σημαντικό εύρημα που αποκτά νόημα αν αναλογιστεί κανείς ότι στο παρόν μοντέλο της ΔΑΠΣ, χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο, θηλυκοί επίμυες.

Το οξειδωτικό, το νιτρογενές στρες και η φλεγμονή που παρατηρούνται κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΑς, συμβάλουν επίσης και στην εμφάνιση μικρο-αγγειακών ανωμαλιών, διαταράσσοντας την φυσιολογική λειτουργία του ΑΑΦ (Frey και Antonetti, 2011). Στην παρούσα μελέτη πέρα από την σημαντική αύξηση των επιπέδων της NT στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών ζώων, παρατηρήθηκε επίσης συνεντοπισμός της NT με τον δείκτη των ενδοθηλιακών κυττάρων, CD-31 (βλ. Εικόνα 4.9.A), υποδεικνύοντας έτσι ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που συνθέτουν τον ΑΑΦ, υφίστανται οξειδωτική βλάβη. Το στοιχείο αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με μελέτες στην βιβλιογραφία που υποδεικνύουν αύξηση της έκφρασης της NT στο μικρο-αγγειακό περιβάλλον του αμφιβληστροειδούς διαβητικών ζώων (Mihm και συν., 2000; El-Remessy και συν., 2003; Zhu και συν., 2015; Lamoke και συν., 2015), ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το νιτρογενές στρες επάγει τον θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω της κινητοποίησης αποπτωτικών διεργασιών (Mihm και συν., 2000). Η νιτρογενής βλάβη που υφίστανται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτελεί πιθανότατα και την αιτία της αυξημένης αγγειακής διαρροής που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη (βλ. Εικόνα 4.9.C), όπως αυτή εκτιμήθηκε με την χρήση της τεχνικής Evans Blue. Η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, φαίνεται πώς είναι ένα αρκετά πρώιμο παθολογικό χαρακτηριστικό της ΔΑΠΣ, καθ' ότι ανάλογες μεταβολές στην διαπερατότητα των αγγείων αναφέρονται ήδη έξι (Quam και συν., 2001) ή και επτά ημέρες (Bucolo και συν., 2009), μετά την επαγωγή του διαβήτη με STZ στα πειραματόζωα. Πέρα από το οξειδωτικό και το νιτρογενές στρες, στην διατάραξη του ΑΑΦ συμμετέχουν και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η αύξηση της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών στην ΔΑ, όπως ο TNF- α και η IL-1 β , ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C ζήτα (PKC ζ), με αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών ZO-1 και claudin-5, που είναι υπεύθυνες για την διατήρηση των στενών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την διαπερατότητα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς (Aveleira και συν., 2010). Παράλληλα, τα αυξημένα επίπεδα του VEGF στην ΔΑ (El-Remessy και συν., 2003; Kim και συν., 2009) διαταράσσουν την ακεραιότητα του ΑΑΦ, φωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των στενών συνδέσεων

μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων (Antonetti και συν., 1999; Murakami και συν., 2012). Τα προαναφερθέντα βρίσκονται σε σύγκλιση με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, όπου ανιχνεύθηκε αύξηση των επιπέδων του TNF- α (βλ. Εικόνα 4.7.C) και του VEGF (βλ. Εικόνα 4.9.B), στους αμφιβληστροειδείς των διαβητικών ζώων. Η χορήγηση με την μορφή οφθαλμικών σταγόνων τόσο του CB2 αγωνιστή, AM1710, όσο και του CB1 ανταγωνιστή, SR141716, μείωσαν σημαντικά την αγγειακή διαρροή (βλ. Εικόνα 4.9.C), γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με την μείωση των επιπέδων του VEGF που επετεύχθη από την χορήγηση των δύο κανναβινοειδικών αναλόγων (βλ. Εικόνα 4.9.B). Ειδικότερα για το AM1710, η παρατηρούμενη αγγειο-προστατευτική δράση, ενδεχομένως να είναι αποτέλεσμα της ικανότητάς του να μειώσει και τα επίπεδα του TNF- α (βλ. Εικόνα 4.7.C) στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς. Οι προλεχθείσες, διαμεσολαβούμενες μέσω του CB2 υποδοχέα, αγγειο-προστατευτικές δράσεις, συμφωνούν με ευρήματα στην βιβλιογραφία που υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του, αναστέλλει την φλεγμονώδη απόκριση και κατ' επέκταση τον θάνατο *in vitro*, σε καλλιέργειες ανθρώπινων αμφιβληστροειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ μειώνει επίσης σημαντικά και τα υψηλά ποσοστά αγγειακής διαρροής, επαγόμενης από ενδοϋαλοειδική έγχυση του TNF- α , *in vivo* σε μύες (Ontko και συν., 2021; Stark και συν., 2021). Ανάλογες προστατευτικές δράσεις στο μικρο-αγγειακό περιβάλλον του αμφιβληστροειδούς προκύπτουν και κατά την αναστολή της λειτουργίας του CB1 υποδοχέα, καθ' ότι η χορήγηση του ανταγωνιστή, SR141716 μειώνει την στένωση των αγγείων και αναστέλλει την δημιουργία ανώμαλων αγγειακών συμπλεγμάτων, στο μοντέλο της επαγόμενης από MNU, αμφιβληστροειδικής εκφύλισης (Chen και συν., 2018), ενώ ο ίδιος ανταγωνιστής διασώζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε *in vivo* και *in vitro* μοντέλα της ΔΑΣ (El-Remessy και συν., 2011).

Σε αντίθεση με την αρχική μας υπόθεση, η συνδυαστική χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή με τον CB2 αγωνιστή, δεν ήταν πιο αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της νευροεκφύλισης και της φλεγμονής στο παρόν μοντέλο της ΔΑΠΣ. Μόνη εξαίρεση, αποτέλεσε η επίδραση της συνδυαστικής θεραπείας στο νιτρογενές στρες στον αμφιβληστροειδή των ζώων, καταφέροντας να μειώσει πλήρως τα αυξημένα επίπεδα της NT εκεί (βλ. Εικόνα 4.8.A και B). Πέραν τούτου, ο συνδυασμός του AM1710 και του SR141716, ήταν εξίσου αποτελεσματικός με τις μεμονωμένες θεραπείες, στην αναστολή της απώλειας του NFL στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς (βλ. 4.2.A, B και C). Επιπροσθέτως, παρά την αδυναμία του SR141716 να προστατέψει τα bNOS βραχύινα κύτταρα (βλ. Εικόνα 4.4.B), η συνδυαστική χορήγηση αποδείχτηκε ικανή να παύσει την απώλεια των bNOS κυττάρων στην INL, με μικρότερη όμως αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την μονή θεραπεία με τον CB2 αγωνιστή, AM1710 (βλ. Εικόνα 4.4.B). Στον αντίποδα, κατά τον συνδυασμό του AM1710 και του SR141716, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ούτε της μικρογλοίας (βλ. Εικόνα 4.7.A και B), ούτε της μακρογλοίας (βλ. Εικόνα 4.6.A και B). Παρά την αδυναμία του SR141716 να επηρεάσει την αντιδραστική μικρο- (βλ. Εικόνα 4.7.B) και μακρογλοία (βλ. Εικόνα 4.6.B), θα περίμενε κανείς ότι κατά την συνδυαστική χορήγηση των κανναβινοειδικών αναλόγων, θα παρατηρούσαμε ανάλογη μείωση με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την χορήγηση του CB2 αγωνιστή, AM1710. Το προαναφερθέν, παρ' ότι με μια πρώτη ματιά ενέχει ένα βαθμό λογικής, εντούτοις δεν αντικατοπτρίζει πλήρως την πραγματικότητα. Όπως όλοι οι GPCRs, έτσι και οι CB1 και CB2 κανναβινοειδικοί υποδοχείς δημιουργούν ετερο-διμερή συμπλέγματα σε νευρώνες (Callén και συν., 2012; Rodrigues και συν., 2017) αλλά και σε μικρογλοιακά κύτταρα, τα οποία μάλιστα κατά την ενεργοποίησή τους και σε απόκριση στην παρουσία φλεγμονής, αυξάνουν την έκφραση των ετερο-διμερών συμπλεγμάτων των CB1/CB2 υποδοχέων (Navarro και συν., 2018). Το ιδιαίτερο

χαρακτηριστικό που εμφανίζουν τα ετερο-διμερή αυτά σύμπλοκα των κανναβινοειδικών υποδοχέων, είναι η αλληλεπίδραση που εμφανίζουν στις αποκρίσεις τους, με πιο συχνό το φαινόμενο του διασταυρούμενου ανταγωνισμού, όπου ο ανταγωνιστής για παράδειγμα του CB1 υποδοχέα αναστέλλει επίσης την απόκριση του CB2 υποδοχέα (Callén και συν., 2012; Rodrigues και συν., 2017; Navarro και συν., 2018). Εν προκειμένω, το προαναφερθέν δικαιολογεί την ανικανότητα της συνδυαστικής χορήγησης του SR141716 με το AM1710, να μειώσει την ενεργοποίηση της αντιδραστικής μικρογλοίας και μακρογλοίας, από την άποψη ότι το SR141716, πιθανότατα να ανέστειλε και την ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα, πέρα από τον CB1.

Η ισχαιμία συνιστά μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία ο περιορισμός της αιματικής ροής στα αγγεία οδηγεί σε μειωμένη παροχή οξυγόνου και γλυκόζης, των δύο βασικότερων στοιχείων που χρησιμοποιούνται στον κυτταρικό μεταβολισμό (Ishikawa, 2013). Άμεση συνέπεια της ισχαιμίας είναι η διεγερσιτοξικότητα, η οποία μέσω ενός καταρράκτη γεγονότων οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Αναλυτικότερα, η παρεμπόδιση της παροχής θρεπτικών στοιχείων προς τους νευρώνες συνεπάγεται την μείωση της παραγωγής ATP, γεγονός που διαταράσσει την ομαλή λειτουργία των αντλιών Na^+/K^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ και Ca^{2+} (ATPάσες) (Reyes και συν., 2012; Kirischuk και συν., 2012) και κατ' επέκταση την κατανομή των ιόντων μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου τμήματος, αυξάνοντας την εξωκυττάρωση του γλουταμινικού (Reyes και συν., 2012) και αναστέλοντας την επαναπρόσληψή του (Gerkau και συν., 2017). Η αύξηση των επιπέδων του γλουταμινικού εξαιτίας της ισχαιμίας οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων και στην επακόλουθη αύξηση της εισροής ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου, τα οποία με την σειρά τους διαταράσσουν την φυσιολογική ομοιόσταση του κυττάρου συμμετέχοντας στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και ενεργοποιώντας ασβεστιο-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την απόπτωση του κυττάρου (Sattler και Tymianski, 2000).

Η διεγερσιτοξικότητα αποτελεί μία από τις βασικότερες αιτίες της νευροεκφύλισης και διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην πλειοψηφία των αμφιβληστροειδοπαθειών, συμπεριλαμβανομένης και της ΔΑς. Στον αμφιβληστροειδή διαβητικών ζώων έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδα εξωκυττάριου γλουταμινικού (Lieth και συν., 1998; Puro και συν., 2002; Alomar και συν., 2021). Η αύξηση αυτή είναι άμεση συνέπεια του οξειδωτικού στρες (Mysona και συν., 2009) και της φλεγμονής, που παρατηρούνται κατά το πρώιμο στάδιο της ΔΑς, τα οποία οδηγούν σε δυσλειτουργία του μεταφορέα του γλουταμινικού GLAST στα γλοιακά κύτταρα, (Li και Puro, 2002; Zeng και συν., 2016) καθώς και στην φυσιολογική λειτουργία της συνθετάσης της γλουταμίνης, ενός ενζύμου που συμμετέχει στον μεταβολισμό του γλουταμινικού (Lieth και συν., 2000; Lieth και συν., 1998). Τα αυξημένα επίπεδα του γλουταμινικού που παρατηρούνται κατά το πρώιμο στάδιο της ΔΑς, εκτός από την εκκίνηση νευρο-εκφυλιστικών διεργασιών, συμβάλουν και στην εμφάνιση πρώιμων μικρο-αγγειακών ανωμαλιών, πιθανότατα μέσω της αύξησης στην έκφραση του VEGF, όπου παρατηρείται κατά την υπερενεργοποίηση του NMDA υποδοχέα (Kusari και συν., 2010).

Για την μελέτη του ρόλου της διεγερσιτοξικότητας στην παθοφυσιολογία των αμφιβληστροειδοπαθειών, καθώς και για την ανίχνευση νέων φαρμακολογικών παραγόντων με νευροπροστατευτικές ιδιότητες, έχουν αναπτυχθεί ζωικά μοντέλα διεγερσιτοξικότητας, τα οποία βασίζονται στην ενδοϋαλοειδική έγχυση αναλόγων του γλουταμινικού, όπως το NMDA (Bai και συν., 2013), το καϊνικό οξύ (Lulli και συν., 2012; Fleming και συν., 2019) και το AMPA (Kiagiadaki και Thermos, 2008; Kokona και Thermos, 2015). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας

στον αμφιβληστροειδή επίμυων (Kiagiadaki και Thermos, 2008), προκειμένου να εκτιμήσουμε τις δράσεις που εξυπηρετεί η αναστολή των ενζύμων μεταβολισμού της 2-AG (ABHD6/MAGL) έναντι της διεγερσιτοξικότητας. Η ενδοϋαλοειδική έγχυση του AMPA οδήγησε σε ριζική μείωση στον αριθμό των bNOS⁺ βραχύνων κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, 24 ώρες μετά την χορήγησή του (βλ. Εικόνα 4.11), σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Kokona και Thermos, 2015; Dionysoroulou και συν., 2020; Spyridakos και συν., 2021).

Η υπερσυσσώρευση ασβεστίου εντός του κυττάρου διαδραματίζει, όπως προαναφέρθηκε, κομβικό ρόλο στην διεγερσιτοξικότητα, καθ' ότι διαταράσσει την ομοιοστατική ισορροπία και επάγει τον θάνατο του κυττάρου (Sattler και Tymianski, 2000). Κατ' αυτόν τον τρόπο η διαπερατότητα ή μη σε ιόντα Ca²⁺, των ιοντοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού, καθορίζει την ικανότητά τους να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες διεγερσιτοξικότητας (Sanelli και συν., 2007). Είναι γνωστό ότι οι NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί σε ιόντα ασβεστίου και για αρκετό καιρό θεωρούνταν ως οι βασικοί υπαίτιοι για την εμφάνιση διεγερσιτοξικότητας (Skeberdis και συν., 2006), χωρίς όμως να έχει δοθεί η απαιτούμενη προσοχή στο ρόλο των AMPA υποδοχέων. Αρχικά, εθεωρείτο ότι ο ρόλος των AMPA υποδοχέων στην διεγερσιτοξικότητα περιοριζόταν μόνο στην απομάκρυνση του Mg²⁺ από τον διάυλο του NMDA υποδοχέα, καθιστώντας τον διαπερατό σε ιόντα Ca²⁺ (Ben-Ari και συν., 1997). Με την πάροδο του χρόνου, δεν άργησε να αποκαλυφθεί ο κρίσιμος ρόλος που διαδραματίζει ο AMPA υποδοχέας στην διαμεσολάβηση των γεγονότων της διεγερσιτοξικότητας. Ειδικότερα, αναδείχθηκε ότι η αγωγιμότητα του AMPA υποδοχέα σε ιόντα Ca²⁺, εξαρτάται από την παρουσία ή όχι της υπομονάδας GluA2 στην τετραμερή δομή του υποδοχέα, η απουσία της οποίας τον καθιστά διαπερατό στο Ca²⁺ (Guo και Ma, 2021).

Στον αμφιβληστροειδή επίμυων, η εντόπιση των διαπερατών σε Ca²⁺, AMPA υποδοχέων, σε υπότυπους βραχύνων (Morkve και συν., 2002; Chávez και Diamond, 2008; Chávez και συν., 2010) και οριζόντιων κυττάρων (Osswald και συν., 2007), είναι σύμφωνη με τους αντίστοιχους πληθυσμούς κυττάρων που πλήττονται στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή (Kiagiadaki και Thermos, 2008; Kokona και Thermos, 2015). Στα γαγγλιακά κύτταρα επίμυων, η έκφραση των AMPA υποδοχέων, διαπερατών σε Ca²⁺, έχει επιβεβαιωθεί κατά την αναπτυξιακή περίοδο, όπου φαίνεται ότι αυτοί οι υποδοχείς (Rorig και συν., 1993; Zhang και συν., 1995) συμμετέχουν ενεργά στα γεγονότα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των γαγγλιακών κυττάρων, που συντελείται κατά την περίοδο αυτή. Τα γαγγλιακά κύτταρα ενήλικων επίμυων ωστόσο, φαίνεται να είναι ανθεκτικά στην διαμεσολαβούμενη μέσω των AMPA υποδοχέων διεγερσιτοξικότητα (Kiagiadaki και Thermos, 2008), πιθανότατα εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης διαπερατών σε Ca²⁺, AMPA υποδοχέων σε αυτά. Εντούτοις, κοινός παθοφυσιολογικός μηχανισμός, παρόντες στην πλειοψηφία των αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες, μπορούν να αυξήσουν την έκφραση των διαπερατών σε Ca²⁺, AMPA υποδοχέων στα γαγγλιακά κύτταρα, καθιστώντας τους έτσι ικανούς να διαμεσολαβήσουν αποκρίσεις διεγερσιτοξικότητας και να οδηγήσουν στην εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων (Cueva Vargas και συν., 2015; Park και συν., 2016). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Santiago και συν. (2009), στην οποία παρατήρησαν μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της υπομονάδας GluR2, συνολικά στον αμφιβληστροειδή, μία, τέσσερις και δώδεκα εβδομάδες μετά την επαγωγή του διαβήτη με STZ σε επίμυες, γεγονός που συνιστά ενίσχυση της έκφρασης των διαπερατών σε Ca²⁺,

AMPA υποδοχέων και αύξηση της ευαισθησίας των νευρώνων, στην διαμεσολαβούμενη μέσω των AMPA υποδοχέων διεγερσιτοξικότητα.

Στην παρούσα διατριβή, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση του αναστολέα της ABHD6, AM12100 και του διπλού ABHD6/MAGL αναστολέα, AM11920, παρείχαν μερική προστασία στα bNOS⁺ βραχύνια κύτταρα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, αυξάνοντας τα ενδογενή επίπεδα της 2-AG στον αμφιβληστροειδή. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν απόλυτα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, που υποδεικνύουν ότι νευροπροστατευτικές δράσεις κανναβινοειδικών αναλόγων, όπως το AEA, το μεθανανταμίδιο (methAEA), το HU210 (Kokona και Thermos, 2015) και το WIN55,212-2 (Spyridakos και συν., 2021), επιτελούνται μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα, στο μοντέλο της επαγόμενης από AMPA αμφιβληστροειδικής διεγερσιτοξικότητας. Κατά ανάλογο τρόπο η εξωγενής ενδοϋαλοειδική χορήγηση της 2-AG, έχει διαμεσολαβεί νευροπροστατευτικές αποκρίσεις στο μοντέλο της AMPA διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή, δρώντας μέσω των CB1 και CB2 υποδοχέων και ενεργοποιώντας το προ-επιβιωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt. Σε άμεση σύγκλιση με τα προαναφερθέντα, η διαμεσολαβούμενη μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα νευροπροστασία, επιβεβαιώνεται από πληθώρα μελετών σε ποικίλα μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών (Lax και συν., 2014; Rapino και συν., 2018; Maguire και συν., 2022).

Παρ' ότι οι νευροπροστασία που προκύπτει από την αναστολή του μεταβολισμού των ενδογενών κανναβινοειδών είναι εκτενώς μελετημένη σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές του εγκεφάλου (Mounsey και συν., 2015; Hashem και συν., 2021; Chen, 2023; Santos-García και συν., 2023), στον αμφιβληστροειδή τα διαθέσιμα δεδομένα είναι λιγότερα και περιορίζονται στην μελέτη της νευροπροστασίας που προκύπτει κατά την αναστολή της FAAH, του μεταβολικού ενζύμου του AEA (Nucci και συν., 2007; Slusar και συν., 2013). Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά στην βιβλιογραφία για την επίτευξη νευροπροστασίας, μέσω της αναστολής του μεταβολισμού του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG, σε ένα *in vivo* μοντέλο διεγερσιτοξικότητας στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Ο διπλός ABHD6/MAGL αναστολέας, AM11920, ήταν πιο αποτελεσματικός στην προστασία των bNOS⁺ βραχύνιων κυττάρων, σε σχέση με τον μονό ABHD6 αναστολέα, AM121000 (βλ. Εικόνα 4.11.D), πιθανότατα εξαιτίας της μεγαλύτερης αύξησης που επήγαγε στα ενδογενή επίπεδα της 2-AG. Η προαναφερθείσα υπόθεση βασίζεται σε πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η MAGL είναι υπεύθυνη για το 85% της υδρόλυσης της 2-AG, με το εναπομείναν 15% να αποδίδεται στην υδρολάση ABHD6 (Blankman και συν., 2007; Chanda και συν., 2010). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα, οι Marrs και συν. (2010), αναφέρουν ότι ο συνδυασμός του αναστολέα της ABHD6, WWL70, με τον αναστολέα της MAGL, JZL184, κατέστειλε πλήρως την υδρόλυση της 2-AG σε νευρωνικές καλλιέργειες, επάγοντας μεγαλύτερη αύξηση στα ενδογενή επίπεδα της 2-AG, σε σύγκριση με τους μεμονωμένους αναστολείς.

Η αναστολή του μεταβολισμού της 2-AG, διαμεσολάβησε και αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως φάνηκε κατά τον υπολογισμό της αντιδραστικότητας της μικρογλοίας στο μοντέλο της επαγόμενης από AMPA διεγερσιτοξικότητας. Ειδικότερα, παρ' ότι ο μονός αναστολέας AM12100, δεν κατόρθωσε να μειώσει τον αριθμό των Iba1⁺, αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων (βλ. Εικόνα 4.12.A και B), σε καμία από τις εξεταζόμενες δόσεις, κατά την χορήγηση του διπλού αναστολέα, AM11920, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Η σημειούμενη δράση του AM11920, οφείλεται στην αύξηση των ενδογενών επιπέδων της 2-AG και βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την

μελέτη των Kokona και συν. (2021), στην οποία σημειώνεται ότι η εξωγενής, ενδοϋαλοειδική χορήγηση 2-AG μειώνει την αντιδραστικότητα της μικρογλοίας στο μοντέλο του AMPA. Μάλιστα, μη δημοσιευμένα ευρήματα του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι η επίδραση της 2-AG στην ρύθμιση της «αντιδραστικότητας» της μικρογλοίας, διεκπεραιώνεται μέσω της ενεργοποίησης του CB2 υποδοχέα, καθώς αυτή καταργείται κατά την συγχορήγηση με την 2-AG, του επιλεκτικού CB2 ανταγωνιστή, AM630 (Papadogkonaki και συν.). Οι αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις που διαμεσολαβούνται από το ΕΚΣ και τον CB2 υποδοχέα στα γλοιακά κύτταρα, είναι υψίστης σημασίας, καθ' ότι η νευρωνική επιβίωση σε παθολογικές συνθήκες εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των γλοιακών με τα νευρωνικά κύτταρα (Rojo-Bustamante και συν., 2020).

Σε συνέχεια των προαναφερθέντων, η επίδραση της αναστολής του μεταβολισμού της 2-AG, στην φυσιολογία των γλοιακών κυττάρων, δικαιολογείται από την παρουσία τόσο της ABHD6, όσο και της MAGL στα αστροκύτταρα και την μικρογλοία (Stella, 2004; Marrs και συν., 2010; Tanaka και συν., 2017), εφόσον μάλιστα τα γλοιακά κύτταρα είναι γνωστό ότι παράγουν και απελευθερώνουν τα ενδοκανναβινοειδή AEA και 2-AG (Walter και συν., 2003). Η έκφραση της MAGL στα κύτταρα του Müller επίμυων (Cécycne και συν., 2014), δικαιολογεί τα παρόντα ευρήματα για την μείωση της έκφρασης της GFAP στον αμφιβληστροειδή των ζώων που έλαβαν τον διπλό αναστολέα (ABHD6/MAGL), AM11920 (βλ. Εικόνα 4.13.A και Β). Παρά το γεγονός ότι η έκφραση της ABHD6 έχει αναδειχθεί στον αμφιβληστροειδή μυών, όπου εκφράζεται σε βραχύινα και γαγγλιακά κύτταρα, καθώς και στις μεταξύ τους συνδέσεις στην IPL, δεν υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία που να εξετάζουν την έκφρασή της στον αμφιβληστροειδή επίμυων. Μολοταύτα, η μείωση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας από την χορήγηση του αναστολέα της ABHD6, AM12100 (βλ. Εικόνα 4.13.A και Β), στο παρόν μοντέλο, συνιστά εμμέσως την ύπαρξη της ABHD6 στον αμφιβληστροειδή των επίμυων. Τέλος, εφόσον η έκφραση της ABHD6 αυξάνεται σαν απόκριση σε κάποια παθολογική απειλή στον εγκέφαλο (Manterola και συν., 2018; Liktor-Busa και συν., 2023), είναι πιθανό να παρατηρείται και μια ανάλογη αύξηση αυτής της υδρολάσης στα κύτταρα του Müller, εξαιτίας της AMPA διεγερσιτοξικότητας.

Όσον αφορά τις δράσεις της υδρολάσης ABHD6 στην μικρογλοία, έχει προταθεί ότι αυτή ελέγχει τα επίπεδα της 2-AG και κατ' επέκταση τις διαμεσολαβούμενες μέσω του CB2 υποδοχέα, δράσεις της στην μικρογλοία. Υπέρ αυτής της άποψης, συνηγορούν ευρήματα που υποδεικνύουν ότι η μείωση της έκφρασης της ABHD6 και η επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της 2-AG σε καλλιέργειες BV-2 μικρογλοιακών κυττάρων, αυξάνουν ριζικά την μετανάστευση τους, με την δράση αυτή να καταργείται κατά την χορήγηση του CB2 ανταγωνιστή, SR144528. Σε αυτά προστίθενται επίσης και ευρήματα από *in vivo* μελέτες σε ζωικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών διαταραχών στον εγκέφαλο, όπου η χορήγηση του αναστολέα της ABHD6, WWL70, μειώνει τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις των μικρογλοιακών κυττάρων, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των CB2 υποδοχέων από την 2-AG (Wen και συν., 2015; Xue και συν., 2023). Παρ' όλα αυτά, στην παρούσα μελέτη, όπως ήδη αναφέρθηκε, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων κατά την χορήγηση του αναστολέα της ABHD6, AM12100.

Σε συμφωνία με τα παρόντα ευρήματα, όπου ο διπλός αναστολέας (ABHD6/MAGL), AM11920, μείωσε τον αριθμό των αντιδραστικών μικρογλοιακών κυττάρων στο μοντέλο του AMPA, μελέτες στον εγκέφαλο επιβεβαιώνουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις που προκύπτουν από την αναστολή της MAGL υδρολάσης. Ο αναστολέας της MAGL, JZL184

χορηγούμενος σε διαγονιδιακούς APdE9 μύες, ένα γενετικό μοντέλο της νόσου Alzheimer's, μείωσε τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις των μικρογλοιακών κυττάρων και αύξησε την φαγοκυτταρική τους ικανότητα ως προς το Αβ αμυλοειδές και των πρόδρομων μορίων του, συμβάλλοντας έτσι στην απομάκρυνσή τους (Pihlaja και συν., 2015). Πέραν των μικρογλοιακών κυττάρων, η επιλεκτική γενετική διαγραφή της MAGL στα αστροκύτταρα, φαίνεται ότι μειώνει τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις και βελτιώνει σημαντικά την παθολογία και τα γνωστικά ελλείμματα που παρατηρούνται σε ένα μοντέλο τραυματισμού του εγκεφάλου (Hu και συν., 2022). Οι Zhu και συν. (2023) πραγματοποιώντας ανάλυση μεταγραφώματος σε κύτταρα του φλοιού και του υποκάμπτου, προερχόμενων από MAGL knock out μύες, παρατήρησαν αύξηση στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με ανοσολογικές αποκρίσεις και την φλεγμονή. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, αυτή η απόκριση τονίζει τον κομβικό ρόλο που διαδραματίζει η αναστολή του μεταβολισμού της 2-AG στην ενίσχυση της ανοσολογικής ετοιμότητας-επαγρύπνησης των γλοιακών κυττάρων, γεγονός που φαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμο για την αντιμετώπιση της φλεγμονής και της νευροεκφύλισης σε παθολογικές καταστάσεις (Zhu και συν., 2023). Πέραν των προαναφερθέντων, η αναστολή του μεταβολισμού της 2-AG ενέχει και μία επιπλέον αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία γίνεται κατανοητή εάν προσέξει κανείς τις μεταβολικές οδούς των εικοσανοειδών, στην κατηγορία των οποίων ανήκει και η 2-AG (Rouzer και Marnett, 2011). Πιο συγκεκριμένα, το αραχιδονικό οξύ, το βασικό παραπροϊόν της υδρόλυσης της 2-AG, χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των προφλεγμονωδών προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, τα οποία εντείνουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και χαρακτηρίζονται ως παράγοντες με νευροτοξική δράση (Nomura και συν., 2011). Βάσει των προλεχθέντων λοιπόν, η χρήση αναστολέων της υδρόλυσης της 2-AG, ενέχει διπλό θεραπευτικό όφελος στην ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, κατά το οποίο η επαγόμενη αύξηση της 2-AG εγείρει αντιφλεγμονώδεις δράσεις, σηματοδοτώντας μέσω των κανναβινοειδικών υποδοχέων στα γλοιακά κύτταρα (Hu και συν., 2022), ενώ η παράλληλη αναστολή της παραγωγής του αραχιδονικού οξέος, συμβάλλει στην μείωση των επιπέδων των προφλεγμονωδών εικοσανοειδών (Nomura και συν., 2011; Alhouayek και συν., 2014).

Η χρόνια χορήγηση άμεσων κανναβινοειδικών αγωνιστών επάγει την ανάπτυξη αντοχής στις δράσεις των κανναβινοειδών, εξαιτίας της απευαισθητοποίησης και της μειο-ρύθμισης (downregulation) του CB1 υποδοχέα, γεγονός που επιβεβαιώνεται τόσο στον εγκέφαλο (Zhuang και συν., 1998; Sim-Selley, 2003; Burstyn και συν., 2010), όσο και στον αμφιβληστροειδή (Papadogkonaki και συν., 2019; Spyridakos και συν., 2021). Κατά ανάλογο τρόπο, η αύξηση στα ενδογενή επίπεδα της 2-AG που προκαλείται μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση αναστολέων της MAGL, όπως ο JZL184, οδηγεί στην ανάπτυξη αντοχής και κατ' επέκταση σε αποδυνάμωση της σηματοδοτικής ικανότητας της 2-AG μέσω των CB1 υποδοχέων (Schlosburg και συν., 2010; Chanda και συν., 2010), το οποίο όμως αντιτίθεται ως προς την χρήση αυτών των παραγόντων ως θεραπευτικών μέσων σε χρόνιες παθήσεις. Παρ' όλα αυτά, οι Kinsey και συν., (2013), απέδειξαν ότι η ανάπτυξη αντοχής, επαγόμενη από την επαναλαμβανόμενη χορήγηση (6 ημέρες) του αναστολέα JZL184, είναι δόσο-εξαρτώμενη, καθώς σε δόση μικρότερη των 8mg/kg, διατηρούνται οι αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του αναστολέα, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία και η σηματοδοτική απόκριση δια μέσω του CB1 υποδοχέα παραμένουν ανεπηρέαστες. Το προαναφερθέν έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες στον εγκέφαλο, που επιβεβαιώνουν ότι επαναλαμβανόμενες χαμηλές δόσεις του αναστολέα JZL184 δεν επηρεάζουν την έκφραση του CB1 υποδοχέα και δεν οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής (Ghosh και συν., 2013; Feliszek και συν., 2016). Τα προαναφερθέντα ευρήματα επιβεβαιώνονται και στον αμφιβληστροειδή.

Μη δημοσιευμένα ευρήματα του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι η επαναλαμβανόμενη ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του AM11920 (4 ημέρες, 500 µg/kg), παρέχουν νευροπροστασία στον αμφιβληστροειδή, στο μοντέλο του AMPA, χωρίς να επάγουν την μειορύθμιση του CB1 υποδοχέα (Paradogkonaki και συν.). Καθ' ότι η αναστολή των ενζύμων μεταβολισμού της 2-AG, αυξάνει τα επίπεδά της στον εγκέφαλο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί και στις συμπεριφορικές παρενέργειες που ενδεχομένως προκύψουν από την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα στο ΚΝΣ, όπως γίνεται κατά την ενεργοποίηση του από άμεσους κανναβινοειδικούς αγωνιστές. Υπό αυτό το πρίσμα, έχει αποδειχθεί ότι η συστηματική (ενδοπεριτοναϊκή) χορήγηση του αναστολέα της MAGL, JZL184 (16 mg/kg) σε μύες, οδήγησε στην εμφάνιση αναλγησίας, υποθερμίας και υποκινητικότητας μέσω της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα, όπως αποδείχθηκε από την κατάργηση αυτών των αποκρίσεων κατά την χορήγηση του CB1 ανταγωνιστή, SR141716. Τέλος μία ακόμη αμφιβολία που εγείρεται σχετικά με την θεραπευτική χρήση των αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων της 2-AG, αποτελεί η ανάπτυξη εθισμού μετά από επαναλαμβανόμενη λήψη τους. Ενδεικτικά, η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων στο κύκλωμα ανταμοιβής του εγκεφάλου αυξάνει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα, διαμεσολαβώντας ενισχυτικές αποκρίσεις (Tanda και συν., 2000), ενώ πειραματικά δεδομένα σε μη ανθρωποειδή πρωτεύοντα, υποδεικνύουν ότι η χορήγηση της 2-AG και η επακόλουθη ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα, ενέχουν τον κίνδυνο ανάπτυξης εθισμού (Justinová και συν., 2009). Τα ευρήματα ωστόσο, που έχουμε στην διάθεσή μας, σχετικά με τις επιδράσεις των αναστολέων του μεταβολισμού της 2-AG στις ενισχυτικές ιδιότητες της 2-AG είναι αρκετά περιορισμένα, με την πλειοψηφία να επικεντρώνεται στις δράσεις των αναστολέων μεταβολισμού του AEA (Parsons και Hurd, 2015). Σε μία πρόσφατη μελέτη, αναφέρεται ότι ο αναστολέας της MAGL, MJN110, αύξησε την απόκριση των επίμων τόσο ως προς συνεξαρτημένα ερεθίσματα που σχετίζονταν με τον ενισχυτή (σουκρόζη), όσο και προς τον ίδιο τον ενισχυτή, υποδεικνύοντας ότι η αύξηση της σηματοδοτικής ικανότητας της 2-AG ενισχύει πτυχές του εθισμού, όπως η έντονη αναζήτηση του ενισχυτή (seeking) (Feja και συν., 2020).

6. Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή επιβεβαιώνει τον κομβικό ρόλο που διαδραματίζει το ΕΚΣ στην παθοφυσιολογία των αμφιβληστροειδοπαθειών. Παράλληλα αναδεικνύεται η δυνατότητα φαρμακολογικής στόχευσής του, ως μέσου για την ανάπτυξη νέων θεραπειών με νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Τα ευρήματα στο *in vivo* μοντέλο της ΔΑΠΣ συνιστούν ότι η χορήγηση μέσω οφθαλμικών σταγόνων των κανναβινοειδικών αναλόγων, αποτελεί μια καλή θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της πρώιμης παθολογίας της ΔΑΣ. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού, όπως είδαμε, δεν υπάρχουν προς το παρόν εφαρμοζόμενες θεραπείες σε ασθενείς που να καταπολεμούν παθολογικά γνωρίσματα της ΔΑΣ στο πρώιμο στάδιο, το οποίο όπως φαίνεται συνιστά και το πιο κρίσιμο στην πορεία εξέλιξης της νόσου. Οι επιδράσεις του SR141716 (CB1 ανταγωνιστής) και του AM1710 (CB2 αγωνιστής) στην προστασία των αξόνων των γαγγλιακών κυττάρων υποδεικνύουν ότι και οι δύο αυτοί παράγοντες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά μέσα για την αναστολή της εκφύλισης των γαγγλιακών κυττάρων, τα οποία πλήττονται κατά βάση στην ΔΑ. Ύστερα και οι δύο εξεταζόμενοι παράγοντες επέδειξαν αντι-οξειδωτικές κι αγγειοπροστατευτικές δυνατότητες, αφού κατάφεραν να αναστείλουν αποτελεσματικά το νιτρογενές στρες και την αγγειακή διαρροή στους διαβητικούς αμφιβληστροειδείς. Παρ' όλα αυτά, συνολικά γίνεται κατανοητό πώς ο CB2 υποδοχέας αποτελεί τον ιδανικότερο στόχο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την ΔΑ, αφού εν προκειμένω ο CB2 αγωνιστής, AM1710 ήταν αποτελεσματικός στην αναστολή, της φλεγμονής, του νιτρογενούς στρες, της νευροεκφύλισης και των μικρο-αγγειακών ανωμαλιών, των τεσσάρων δηλαδή πυρηνικών παθοφυσιολογικών στοιχείων της νόσου. Παράλληλα, μέσω της συγκεκριμένης μελέτης, εμμέσως πλην σαφώς, παρέχεται πληροφόρηση για την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κανναβινοειδών, μέσω σταγόνων. Δεδομένης της χρόνιας φύσης της ΔΑΣ, η χορήγηση θεραπευτικών παραγόντων, τοπικά, μέσω σταγόνων αποτελεί την ιδανικότερη και λιγότερο επεμβατική οδό χορήγησης για την αντιμετώπιση της νόσου, ιδιαίτερα μάλιστα αν την συγκρίνουμε με τις υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις (ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις, χειρουργικές επεμβάσεις, λέιζερ κ.ά.). Η μόνη ανησυχία που προκύπτει με την χορήγηση μέσω σταγόνων είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου που οφείλεται στον χαμηλό χρόνο συγκράτησης στον κερατοειδή χιτώνα, το οποίο όμως μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση νέων μέσων, όπως τα νανοσωματίδια ή ειδικών εκδόχων, τα οποία εξασφαλίζουν την μέγιστη δυνατή βιοδιαθεσιμότητα (Jumelle και συν., 2020). Με την επιλογή των οφθαλμικών σταγόνων, δίδεται επίσης η δυνατότητα για την πιο στοχευμένη χορήγηση των προς μελέτη φαρμάκων, ενώ παράλληλα αποφεύγονται τυχόν ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να προκύψουν κατά την συστηματική χορήγηση (ενδοπεριτοναϊκή, ενδοφλέβια κ.ά.) των παραγόντων, είτε πρόκειται για τα κανναβινοειδή είτε για άλλους παράγοντες. Ωστόσο, όταν αναφερόμαστε στα κανναβινοειδή, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην δοσολογία που θα επιλεγεί προς χορήγηση, καθ' ότι όπως προαναφέρθηκε η χρόνια χορήγηση των κανναβινοειδικών αναλόγων οδηγεί σε απευαισθητοποίηση και μειορύθμιση των κανναβινοειδικών υποδοχέων και κατ' επέκταση σε μείωση της σηματοδοτικής τους ικανότητας. Ακόμη, περισσότερες μελέτες χρειάζονται προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του CB2 υποδοχέα στην παθοφυσιολογία της ΔΑΣ, καθώς και ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου ασκεί τις προστατευτικές του επιδράσεις.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής η χορήγηση των αναστολέων των ενζύμων μεταβολισμού του ενδοκανναβινοειδούς 2-AG παρείχε νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις στο *in vivo* μοντέλο της επαγόμενης από το AMPA διεγερσιτοξικότητας. Ο διπλός αναστολέας της ABHD6/MAGL, AM11920, ήταν περισσότερο αποτελεσματικός σε σύγκριση με τον μονό αναστολέα της ABHD6, AM12100, καθ' ότι ανέστειλε την επαγόμενη από το AMPA απώλεια των βραχύνων κυττάρων και μείωσε σημαντικά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και της μακρογλοίας στον αμφιβληστροειδή. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο χειρισμός των ενδογενών επιπέδων της 2-AG, είναι εξίσου αποτελεσματικός με την εξωγενή χορήγηση κανναβινοειδικών αγωνιστών, στην παροχή προστατευτικών δράσεων έναντι της διεγερσιτοξικότητας. Το βασικότερο πλεονέκτημα των αναστολέων σε σύγκριση με τους άμεσους αγωνιστές, είναι η δυνατότητα χρήσης μεγαλύτερου εύρους δόσεων χωρίς την επαγωγή της απευαισθητοποίησης του CB1 υποδοχέα και την επακόλουθη κατάργηση των προστατευτικών του δράσεων που διεκπεραιώνονται μέσω αυτού. Παρά την σωρεία μελετών που αφορούν τον εγκέφαλο, το ακριβές κατώφλι της δόσης του αναστολέα, πάνω από την οποία οδηγούμαστε στην ανάπτυξη φαρμακολογικής αντοχής στις δράσεις της 2-AG, πρέπει να καθοριστεί και στον αμφιβληστροειδή. Επιπλέον, παρά την σχετική ασάφεια σχετικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης εθισμού που προκύπτει από την χορήγηση των αναστολέων των μεταβολικών ενζύμων των ενδοκανναβινοειδών, εξαιτίας της ενεργοποίησης του CB1 υποδοχέα στον εγκέφαλο, τα λιγιστά ευρήματα υποδεικνύουν ότι η χρήση αυτών των αναστολέων είναι πιο ασφαλής από την χορήγηση άμεσων αγωνιστών. Τέλος, εφόσον αναφερόμαστε σε αμφιβληστροειδοπάθειες, ο κίνδυνος εμφάνισης εθιστικών συμπεριφορών και οι ανεπιθύμητες ενέργειες που προκύπτουν από την κεντρική ενεργοποίηση του CB1, μπορούν να αποφευχθούν με σχετική ευκολία, μέσω της υιοθέτησης εναλλακτικών οδών χορήγησης των αναστολέων, όπως η τοπική χορήγηση μέσω σταγόνων.

7. Βιβλιογραφία

- Abiko, T. *et al.* (2003) “Characterization of retinal leukostasis and hemodynamics in insulin resistance and diabetes: role of oxidants and protein kinase-C activation,” *Diabetes*, 52(3), pp. 829–837. doi: 10.2337/diabetes.52.3.829.
- Abu-El-Asrar, A. M. *et al.* (2004) “Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(8), pp. 2760–2766. doi: 10.1167/iovs.03-1392.
- Adamis, A. P. and Berman, A. J. (2008) “Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy,” *Seminars in immunopathology*, 30(2), pp. 65–84. doi: 10.1007/s00281-008-0111-x.
- Alasil, T. and Waheed, N. K. (2014) “Pan retinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy: Pattern scan laser versus argon laser,” *Current opinion in ophthalmology*, 25(3), pp. 164–170. doi: 10.1097/icu.0000000000000048.
- Albert-Garay, J. S., Riesgo-Escovar, J. R. and Salceda, R. (2022) “High glucose concentrations induce oxidative stress by inhibiting Nrf2 expression in rat Müller retinal cells *in vitro*,” *Scientific reports*, 12(1), p. 1261. doi: 10.1038/s41598-022-05284-x.
- Alhouayek, M., Masquelier, J. and Muccioli, G. G. (2014) “Controlling 2-arachidonoylglycerol metabolism as an anti-inflammatory strategy,” *Drug discovery today*, 19(3), pp. 295–304. doi: 10.1016/j.drudis.2013.07.009.
- Alomar, S. Y. *et al.* (2021) “Protective effect of metformin on rat diabetic retinopathy involves suppression of toll-like receptor 4/nuclear factor-κ B expression and glutamate excitotoxicity,” *International immunopharmacology*, 90(107193), p. 107193. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107193.
- Alrashdi, S. F., Deliyanti, D. and Wilkinson-Berka, J. L. (2018) “Intravitreal administration of endothelin type A receptor or endothelin type B receptor antagonists attenuates hypertensive and diabetic retinopathy in rats,” *Experimental eye research*, 176, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.exer.2018.06.025.
- Altmann, C. and Schmidt, M. H. H. (2018) “The role of microglia in diabetic retinopathy: Inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration,” *International journal of molecular sciences*, 19(1). doi: 10.3390/ijms19010110.
- Al-Zoubi, R., Morales, P. and Reggio, P. H. (2019) “Structural insights into CB1 receptor biased signaling,” *International journal of molecular sciences*, 20(8), p. 1837. doi: 10.3390/ijms20081837.
- Amato, R. *et al.* (2022) “Morpho-functional analysis of the early changes induced in retinal ganglion cells by the onset of diabetic retinopathy: The effects of a neuroprotective strategy,” *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 185(106516), p. 106516. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106516.

- Ambati, J. (1997) “Elevated γ -aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy,” *Archives of ophthalmology*, 115(9), p. 1161. doi: 10.1001/archophth.1997.01100160331011.
- Anderson, P. (2008) “Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid- β in the neural retina of the rat,” *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, p. 801. doi: 10.2147/opth.s3967.
- Antonetti, D. A. *et al.* (1999) “Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1: A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors,” *The journal of biological chemistry*, 274(33), pp. 23463–23467. doi: 10.1074/jbc.274.33.23463.
- Antonetti, D. A. *et al.* (2006) “Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease: Seeing beyond glucose-induced microvascular disease,” *Diabetes*, 55(9), pp. 2401–2411. doi: 10.2337/db05-1635.
- Araújo, D. S. M. *et al.* (2017) “Cannabinoid receptors and TRPA1 on neuroprotection in a model of retinal ischemia,” *Experimental eye research*, 154, pp. 116–125. doi: 10.1016/j.exer.2016.11.015.
- Argaw, A. *et al.* (2011) “Concerted action of CB1 cannabinoid receptor and deleted in colorectal cancer in axon guidance,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(4), pp. 1489–1499. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4134-09.2011.
- Armulik, A., Abramsson, A. and Betsholtz, C. (2005) “Endothelial/pericyte interactions,” *Circulation research*, 97(6), pp. 512–523. doi: 10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
- Arrigo, A., Aragona, E. and Bandello, F. (2022) “VEGF-targeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy,” *Annals of medicine*, 54(1), pp. 1089–1111. doi: 10.1080/07853890.2022.2064541.
- Arroba, A. I. *et al.* (2016) “Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice,” *Biochimica et biophysica acta*, 1862(9), pp. 1663–1674. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.05.024.
- Asia, A.-O. *et al.* (2022) “Detection of diabetic retinopathy in retinal fundus images using CNN classification models,” *Electronics*, 11(17), p. 2740. doi: 10.3390/electronics11172740.
- Atwood, B. K. *et al.* (2012) “Functional selectivity in CB₂ cannabinoid receptor signaling and regulation: Implications for the therapeutic potential of CB₂ ligands,” *Molecular pharmacology*, 81(2), pp. 250–263. doi: 10.1124/mol.111.074013.
- Aveleira, C. A. *et al.* (2010) “TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability,” *Diabetes*, 59(11), pp. 2872–2882. doi: 10.2337/db09-1606.
- Bacci, A., Huguenard, J. R. and Prince, D. A. (2004) “Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids,” *Nature*, 431(7006), pp. 312–316. doi: 10.1038/nature02913.

- Baden, T. *et al.* (2016) “The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse,” *Nature*, 529(7586), pp. 345–350. doi: 10.1038/nature16468.
- Baggelaar, M. P., Maccarrone, M. and van der Stelt, M. (2018) “2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain,” *Progress in lipid research*, 71, pp. 1–17. doi: 10.1016/j.plipres.2018.05.002.
- Bai, N. *et al.* (2013) “NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina,” *Molecular brain*, 6(1), p. 34. doi: 10.1186/1756-6606-6-34.
- Bandello, F. *et al.* (2014) “Update of intravitreal steroids for the treatment of diabetic macular edema,” *Ophthalmic research*, 52(2), pp. 89–96. doi: 10.1159/000362764.
- Baptista, F. I. *et al.* (2019) “Impairment of axonal transport in diabetes: Focus on the putative mechanisms underlying peripheral and central neuropathies,” *Molecular neurobiology*, 56(3), pp. 2202–2210. doi: 10.1007/s12035-018-1227-1.
- Barber, A. J. *et al.* (1998) “Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin,” *The journal of clinical investigation*, 102(4), pp. 783–791. doi: 10.1172/JCI2425.
- Barber, A. J. *et al.* (2005) “The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(6), pp. 2210–2218. doi: 10.1167/iovs.04-1340.
- Barber, A. J. (2015) “Diabetic retinopathy: recent advances towards understanding neurodegeneration and vision loss,” *Science China. Life sciences*, 58(6), pp. 541–549. doi: 10.1007/s11427-015-4856-x.
- Barber, A. J., Antonetti, D. A. and Gardner, T. W. (2000) “Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(11), pp. 3561–3568.
- Barnstable, C. J. and Tombran-Tink, J. (2004) “Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential,” *Progress in retinal and eye research*, 23(5), pp. 561–577. doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.05.002.
- Bartesaghi, S. and Radi, R. (2018) “Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration,” *Redox biology*, 14, pp. 618–625. doi: 10.1016/j.redox.2017.09.009.
- Barutta, F. *et al.* (2010) “Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy,” *Diabetes*, 59(4), pp. 1046–1054. doi: 10.2337/db09-1336.
- Barutta, F. *et al.* (2011) “Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy,” *Diabetes*, 60(9), pp. 2386–2396. doi: 10.2337/db10-1809.
- Barutta, F. *et al.* (2017) “Dual therapy targeting the endocannabinoid system prevents experimental diabetic nephropathy,” *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 32(10), pp. 1655–1665. doi: 10.1093/ndt/gfx010.

- Barutta, F. *et al.* (2018) “Reversal of albuminuria by combined AM6545 and perindopril therapy in experimental diabetic nephropathy: AM6545 and perindopril reverse albuminuria in diabetic mice,” *British journal of pharmacology*, 175(23), pp. 4371–4385. doi: 10.1111/bph.14495.
- Basha, R. H. and Sankaranarayanan, C. (2016) “ β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats,” *Chemico-biological interactions*, 245, pp. 50–58. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.019.
- Ben-Ari, Y. (1997) “GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated ‘ménage à trois,’” *Trends in neurosciences*, 20(11), pp. 523–529. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01147-8.
- Bertalmío, M. (2020) “The biological basis of vision: the retina,” in *Vision Models for High Dynamic Range and Wide Colour Gamut Imaging*. Elsevier, pp. 11–46.
- Bertrand, T. *et al.* (2010) “Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition,” *Journal of molecular biology*, 396(3), pp. 663–673. doi: 10.1016/j.jmb.2009.11.060.
- Bialosterski, C. *et al.* (2007) “Decreased optical coherence tomography-measured pericentral retinal thickness in patients with diabetes mellitus type 1 with minimal diabetic retinopathy,” *The British journal of ophthalmology*, 91(9), pp. 1135–1138. doi: 10.1136/bjo.2006.111534.
- Bidaut-Russell, M. and Howlett, A. C. (1991) “Cannabinoid receptor-regulated cyclic AMP accumulation in the rat striatum,” *Journal of neurochemistry*, 57(5), pp. 1769–1773. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb06379.x.
- Bisogno, T. *et al.* (2003) “Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain,” *The journal of cell biology*, 163(3), pp. 463–468. doi: 10.1083/jcb.200305129.
- Blankman, J. L., Simon, G. M. and Cravatt, B. F. (2007) “A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol,” *Chemistry & biology*, 14(12), pp. 1347–1356. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.006.
- Bok, D. (1993) “The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision,” *Journal of cell science. Supplement*, 17, pp. 189–195. doi: 10.1242/jcs.1993.supplement_17.27.
- Börner, C. *et al.* (2009) “Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling,” *The journal of biological chemistry*, 284(51), pp. 35450–35460. doi: 10.1074/jbc.M109.006338.
- Borowska-Fielding, J. *et al.* (2018) “Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina,” *Neuropharmacology*, 141, pp. 21–31. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.007.
- Bosier, B. *et al.* (2010) “Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities,” *Biochemical pharmacology*, 80(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.bcp.2010.02.013.

- Bouskila, J. *et al.* (2012) “Expression and localization of the cannabinoid receptor type 1 and the enzyme fatty acid amide hydrolase in the retina of vervet monkeys,” *Neuroscience*, 202, pp. 117–130. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.041.
- Bouskila, J. *et al.* (2016) “Cannabinoid receptors CB1 and CB2 modulate the electroretinographic waves in Vervet monkeys,” *Neural plasticity*, 2016, p. 1253245. doi: 10.1155/2016/1253245.
- Bringmann, A. *et al.* (2013) “GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells,” *Frontiers in endocrinology*, 4, p. 48. doi: 10.3389/fendo.2013.00048.
- Brooks, S. E. *et al.* (1998) “Modulation of VEGF production by pH and glucose in retinal Müller cells,” *Current eye research*, 17(9), pp. 875–882. doi: 10.1076/ceyr.17.9.875.5134.
- Brown, S. M., Wager-Miller, J. and Mackie, K. (2002) “Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1576(3), pp. 255–264. doi: 10.1016/s0167-4781(02)00341-x.
- Brucklacher, R. M. *et al.* (2008) “Whole genome assessment of the retinal response to diabetes reveals a progressive neurovascular inflammatory response,” *BMC medical genomics*, 1(1), p. 26. doi: 10.1186/1755-8794-1-26.
- Buckley, N. E. *et al.* (1998) “Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat,” *Neuroscience*, 82(4), pp. 1131–1149. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00348-5.
- Bucolo, C. *et al.* (2009) “Protective effects of a coumarin derivative in diabetic rats,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(8), pp. 3846–3852. doi: 10.1167/iovs.08-3328.
- Burston, J. J. *et al.* (2010) “Regional enhancement of cannabinoid CB1 receptor desensitization in female adolescent rats following repeated Δ^9 -tetrahydrocannabinol exposure: THC and adolescent CB1 receptor desensitization,” *British journal of pharmacology*, 161(1), pp. 103–112. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00870.x.
- Bush, L. *et al.* (2016). “Neuroprotective Actions of Hydrogen Sulfide-Releasing Compounds and Cannabinoids in the Bovine Isolated Neural Retina,” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(12), 6399-6399.
- Busquets Garcia, A. *et al.* (2016) “Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas,” *F1000Research*, 5, p. 990. doi: 10.12688/f1000research.8245.1.
- Calandra, B. *et al.* (1999) “Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor,” *European journal of pharmacology*, 374(3), pp. 445–455. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00349-0.
- Calandrella, N. *et al.* (2007) “Degenerative and apoptotic events at retinal and optic nerve level after experimental induction of ocular hypertension,” *Molecular and cellular biochemistry*, 301(1–2), pp. 155–163. doi: 10.1007/s11010-006-9407-0.

- Callén, L. *et al.* (2012) “Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain,” *The journal of biological chemistry*, 287(25), pp. 20851–20865. doi: 10.1074/jbc.m111.335273.
- Campbell, W. A. *et al.* (2021) “Cannabinoid signaling promotes the de-differentiation and proliferation of Müller glia-derived progenitor cells,” *Glia*, 69(10), pp. 2503–2521. doi: 10.1002/glia.24056.
- Carrasco, E. *et al.* (2007) “Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration,” *Diabetes care*, 30(11), pp. 2902–2908. doi: 10.2337/dc07-0332.
- Carrasco, E. *et al.* (2008) “Lowered cortistatin expression is an early event in the human diabetic retina and is associated with apoptosis and glial activation,” *Molecular vision*, 14, pp. 1496–1502.
- Carvajal, F. J., Mattison, H. A. and Cerpa, W. (2016) “Role of NMDA receptor-mediated glutamatergic signaling in chronic and acute neuropathologies,” *Neural plasticity*, 2016, pp. 1–20. doi: 10.1155/2016/2701526.
- Casini, G. and Brecha, N. C. (1992) “Colocalization of vasoactive intestinal polypeptide and GABA immunoreactivities in a population of wide-field amacrine cells in the rabbit retina,” *Visual neuroscience*, 8(4), pp. 373–378. doi: 10.1017/s0952523800005113.
- Cécyre, B. *et al.* (2013) “Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(13), pp. 8079–8090. doi: 10.1167/iovs.13-12514.
- Cécyre, B. *et al.* (2014) “Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina,” *Frontiers in neuroanatomy*, 8, p. 150. doi: 10.3389/fnana.2014.00150.
- Cécyre, B. *et al.* (2020) “Cannabinoids affect the mouse visual acuity via the cannabinoid receptor type 2,” *Scientific reports*, 10(1), p. 15819. doi: 10.1038/s41598-020-72553-y.
- Chakrabarti, S. *et al.* (1998) “Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelinA and endothelinB gene expression in chronic diabetes,” *Current eye research*, 17(3), pp. 301–307. doi: 10.1076/ceyr.17.3.301.5216.
- Chanda, P. K. *et al.* (2010) “Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system,” *Molecular pharmacology*, 78(6), pp. 996–1003. doi: 10.1124/mol.110.068304.
- Chaphalkar, R. M. *et al.* (2020) “Endothelin-1 mediated decrease in mitochondrial gene expression and bioenergetics contribute to neurodegeneration of retinal ganglion cells,” *Scientific reports*, 10(1), p. 3571. doi: 10.1038/s41598-020-60558-6.
- Chávez, A. E. and Diamond, J. S. (2008) “Diverse mechanisms underlie glycinergic feedback transmission onto rod bipolar cells in rat retina,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(31), pp. 7919–7928. doi: 10.1523/jneurosci.0784-08.2008.

- Chávez, A. E., Grimes, W. N. and Diamond, J. S. (2010) “Mechanisms underlying lateral GABAergic feedback onto rod bipolar cells in rat retina,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(6), pp. 2330–2339. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5574-09.2010.
- Chen, C. (2023) “Inhibiting degradation of 2-arachidonoylglycerol as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases,” *Pharmacology & therapeutics*, 244(108394), p. 108394. doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108394.
- Chen, J. *et al.* (2005) “Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma,” *Biochemical and biophysical research communications*, 330(4), pp. 1062–1067. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.095.
- Chen, J. *et al.* (2008) “Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice,” *The journal of clinical investigation*, 118(2), pp. 526–533. doi: 10.1172/JCI33813.
- Chen, X. *et al.* (2014) “Involvement of β -arrestin-2 and clathrin in agonist-mediated internalization of the human cannabinoid CB2 receptor,” *Current molecular pharmacology*, 7(1), pp. 67–80. doi: 10.2174/1874467207666140714115824.
- Chen, Y. *et al.* (2018) “Neuroprotective effect of cannabinoid receptor 1 antagonist in the MNU-induced retinal degeneration model,” *Experimental eye research*, 167, pp. 145–151. doi: 10.1016/j.exer.2017.11.001.
- Chetoni, P. *et al.* (2022) “MAGL inhibitor NanoMicellar formulation (MAGL-NanoMicellar) for the development of an antiglaucoma eye drop,” *International journal of pharmaceutics*, 625(122078), p. 122078. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122078.
- Cheung, N., Mitchell, P. and Wong, T. Y. (2010) “Diabetic retinopathy,” *Lancet*, 376(9735), pp. 124–136. doi: 10.1016/s0140-6736(09)62124-3.
- Chibber, R. *et al.* (2007) “Leukocytes in diabetic retinopathy,” *Current diabetes reviews*, 3(1), pp. 3–14. doi: 10.2174/157339907779802139.
- Chierzi, S. *et al.* (2005) “The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK,” *The European journal of neuroscience*, 21(8), pp. 2051–2062. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04066.x.
- Choi, I.-Y. *et al.* (2013) “Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury,” *The American journal of pathology*, 182(3), pp. 928–939. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.11.024.
- Choi, S.-H. *et al.* (2018) “Neuroprotective effects of MAGL (monoacylglycerol lipase) inhibitors in experimental ischemic stroke,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 49(3), pp. 718–726. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019664.
- Choudhuri, S. *et al.* (2015) “Role of NF- κ B activation and VEGF gene polymorphisms in VEGF up regulation in non-proliferative and proliferative diabetic retinopathy,” *Molecular and cellular biochemistry*, 405(1–2), pp. 265–279. doi: 10.1007/s11010-015-2417-z.
- Chung, E. S. *et al.* (2012) “Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra *in vivo* through inhibition of microglial

activation and NADPH oxidase,” *Brain research*, 1451, pp. 110–116. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.058.

Chung, Y. C. *et al.* (2011) “Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglial activation,” *The journal of immunology*, 187(12), pp. 6508–6517. doi: 10.4049/jimmunol.1102435.

Cohen, K., Weizman, A. and Weinstein, A. (2019) “Modulatory effects of cannabinoids on brain neurotransmission,” *The European journal of neuroscience*, 50(3), pp. 2322–2345. doi: 10.1111/ejn.14407.

Comelli, F. *et al.* (2010) “Rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, attenuates mechanical allodynia and counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in diabetic mice,” *European journal of pharmacology*, 637(1–3), pp. 62–69. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.03.061.

Correa, F. *et al.* (2010) “Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB₂ receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF- κ B: Anandamide Enhances IL-10 Production,” *Glia*, 58(2), pp. 135–147. doi: 10.1002/glia.20907.

Costa, G. N. *et al.* (2012) “Contribution of TNF receptor 1 to retinal neural cell death induced by elevated glucose,” *Molecular and cellular neurosciences*, 50(1), pp. 113–123. doi: 10.1016/j.mcn.2012.04.003.

Cota, D. *et al.* (2003) “The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis,” *The journal of clinical investigation*, 112(3), pp. 423–431. doi: 10.1172/JCI17725.

Crandall, J. *et al.* (2007) “Neuroprotective and intraocular pressure-lowering effects of (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol in a rat model of glaucoma,” *Ophthalmic research*, 39(2), pp. 69–75. doi: 10.1159/000099240.

Cuenca, N. *et al.* (2014) “Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases,” *Progress in retinal and eye research*, 43, pp. 17–75. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.

Cueva Vargas, J. L. *et al.* (2015) “Soluble tumor necrosis factor alpha promotes retinal ganglion cell death in glaucoma via calcium-permeable AMPA receptor activation,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(35), pp. 12088–12102. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1273-15.2015.

Das, A., McGuire, P. G. and Rangasamy, S. (2015) “Diabetic macular edema: Pathophysiology and novel therapeutic targets,” *Ophthalmology*, 122(7), pp. 1375–1394. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.03.024.

Davis, B. *et al.* (2017) “Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction,” *Acta ophthalmologica*, 95. doi: 10.1111/j.1755-3768.2017.03623.

- De Meij, J. *et al.* (2021) “Microglial cannabinoid type 1 receptor regulates brain inflammation in a sex-specific manner,” *Cannabis and cannabinoid research*, 6(6), pp. 488–507. doi: 10.1089/can.2020.0170.
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P. and Rabelink, T. J. (2007) “Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance: Testing and clinical relevance,” *Circulation*, 115(10), pp. 1285–1295. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.
- Deliyanti, D. *et al.* (2018) “Nrf2 activation is a potential therapeutic approach to attenuate diabetic retinopathy,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(2), pp. 815–825. doi: 10.1167/iovs.17-22920.
- Devane, W. A. *et al.* (1992) “Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor,” *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), pp. 1946–1949. doi: 10.1126/science.1470919.
- Di Leo, M. A. *et al.* (1990) “Spatial frequency-selective losses with pattern electroretinogram in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients without retinopathy,” *Diabetologia*, 33(12), pp. 726–730. doi: 10.1007/bf00400342.
- Di Marzo, V. and Matias, I. (2005) “Endocannabinoid control of food intake and energy balance,” *Nature neuroscience*, 8(5), pp. 585–589. doi: 10.1038/nn1457.
- Diamond, J. S. (2017) “Inhibitory interneurons in the retina: Types, circuitry, and function,” *Annual review of vision science*, 3(1), pp. 1–24. doi: 10.1146/annurev-vision-102016-061345.
- van Dijk, H. W. *et al.* (2010) “Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(7), pp. 3660–3665. doi: 10.1167/iovs.09-5041.
- Ding, H. *et al.* (2016) “Species-specific wiring for direction selectivity in the mammalian retina,” *Nature*, 535(7610), pp. 105–110. doi: 10.1038/nature18609.
- Dinh, T. P. *et al.* (2002) “Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), pp. 10819–10824. doi: 10.1073/pnas.152334899.
- Dionysopoulou, S. *et al.* (2020) “Effect of NADPH oxidase inhibitors in an experimental retinal model of excitotoxicity,” *Experimental eye research*, 200, p. 108232. doi: 10.1016/j.exer.2020.108232.
- Do, D. V. *et al.* (2013) “Ranibizumab for edema of the macula in diabetes study: 3-year outcomes and the need for prolonged frequent treatment: 3-Year outcomes and the need for prolonged frequent treatment,” *JAMA ophthalmology*, 131(2), pp. 139–145. doi: 10.1001/2013.jamaophthalmol.91.
- Dong, Y. *et al.* (2019) “Fabrication of resveratrol coated gold nanoparticles and investigation of their effect on diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats,” *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 195, pp. 51–57. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.04.012.

- Dowling, J. E. and Boycott, B. B. (1966) "Organization of the primate retina: electron microscopy," *Proceedings of the Royal Society of London*, 166(1002), pp. 80–111. doi: 10.1098/rspb.1966.0086.
- Downer, E. J. (2022) "Role of cannabinoids in inflammation," *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(2), p. 478. doi: 10.3390/molecules27020478.
- Drummond, G. R. *et al.* (2011) "Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets," *Nature reviews. Drug discovery*, 10(6), pp. 453–471. doi: 10.1038/nrd3403.
- Du, Y. *et al.* (2002) "Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine," *Journal of neurochemistry*, 80(5), pp. 771–779. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00737.x.
- Duff, G. *et al.* (2013) "Cannabinoid receptor CB2 modulates axon guidance," *PloS one*, 8(8), p. e70849. doi: 10.1371/journal.pone.0070849.
- Duncan, R. S., Chapman, K. D. and Koulen, P. (2009) "The neuroprotective properties of palmitoylethanolamine against oxidative stress in a neuronal cell line," *Molecular neurodegeneration*, 4(1), p. 50. doi: 10.1186/1750-1326-4-50.
- Ehrhart, J. *et al.* (2005) "Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation," *Journal of neuroinflammation*, 2(1), p. 29. doi: 10.1186/1742-2094-2-29.
- Eid, B. G. *et al.* (2020) "Effects of the CB1 receptor antagonists AM6545 and AM4113 on insulin resistance in a high-fructose high-salt rat model of metabolic syndrome," *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(11), p. 573. doi: 10.3390/medicina56110573.
- Eljaschewitsch, E. *et al.* (2006) "The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells," *Neuron*, 49(1), pp. 67–79. doi: 10.1016/j.neuron.2005.11.027.
- Ellis, E. A. *et al.* (2002) "Time course of NADH oxidase, inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in diabetic retinopathy in the BBZ/WOR rat," *Nitric oxide: biology and chemistry*, 6(3), pp. 295–304. doi: 10.1006/niox.2001.0419.
- El-Remessy, A. B., Behzadian, M. A., *et al.* (2003) "Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor," *The American journal of pathology*, 162(6), pp. 1995–2004. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64332-5.
- El-Remessy, A. B., Khalil, I. E., *et al.* (2003) "Neuroprotective effect of (-)Δ⁹-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-d-aspartate-induced retinal neurotoxicity," *The American journal of pathology*, 163(5), pp. 1997–2008. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63558-4.
- El-Remessy, A. B. *et al.* (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(6), pp. 1567–1578. doi: 10.1007/s00125-011-2061-4.

Elul, T. *et al.* (2022) “Cannabinoid Receptor Type 1 regulates growth cone filopodia and axon dispersion in the optic tract of *Xenopus laevis* tadpoles,” *The European journal of neuroscience*, 55(4), pp. 989–1001. doi: 10.1111/ejn.15603.

Ergul, A. (2003) “Development of endothelin receptor antagonists as potential therapeutic agents,” *Expert opinion on therapeutic patents*, 13(1), pp. 33–44. doi: 10.1517/eotp.13.1.33.20926.

EudraCT Number 2012-001200-38 - Clinical trial results - EU Clinical Trials Register (no date) *Clinicaltrialsregister.eu*. Available at: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2012-001200-38/results> (Accessed: August 9, 2023).

Euler, T., Schneider, H. and Wässle, H. (1996) “Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(9), pp. 2934–2944. doi: 10.1523/jneurosci.16-09-02934.1996.

Falsini, B. *et al.* (1989) “Steady-state pattern electroretinogram in insulin-dependent diabetics with no or minimal retinopathy,” *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 73(2), pp. 193–200. doi: 10.1007/bf00155037.

Fan, S.-F. and Yazulla, S. (2003) “Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2,” *Visual neuroscience*, 20(2), pp. 177–188. doi: 10.1017/s095252380320208x.

Feja, M. *et al.* (2020) “The novel MAGL inhibitor MJN110 enhances responding to reward-predictive incentive cues by activation of CB1 receptors,” *Neuropharmacology*, 162(107814), p. 107814. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107814.

Felder, C. C. *et al.* (1995) “Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors,” *Molecular pharmacology*, 48(3), pp. 443–450.

Feliszek, M. *et al.* (2016) “Lack of hippocampal CB1 receptor desensitization by Δ^9 -tetrahydrocannabinol in aged mice and by low doses of JZL 184,” *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 389(6), pp. 603–612. doi: 10.1007/s00210-016-1226-6.

Fernandez, D. C. *et al.* (2012) “Early distal axonopathy of the visual pathway in experimental diabetes,” *The American journal of pathology*, 180(1), pp. 303–313. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.018.

Fernández-Trapero, M. *et al.* (2017) “Upregulation of CB2 receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis,” *Disease models & mechanisms*, 10(5), pp. 551–558. doi: 10.1242/dmm.028373.

Finnemann, S. C. (2003) “Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors,” *The EMBO journal*, 22(16), pp. 4143–4154. doi: 10.1093/emboj/cdg416.

Fiskerstrand, T. *et al.* (2010) “Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism,” *The American Journal of Human Genetics*, 87(3), pp. 410–417. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.08.002.

- Fleming, T. *et al.* (2019) “Growth hormone neuroprotection against kainate excitotoxicity in the retina is mediated by Notch/PTEN/Akt signaling,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 60(14), pp. 4532–4547. doi: 10.1167/iavs.19-27473.
- Fresta, C. G. *et al.* (2020) “A new human blood-retinal barrier model based on endothelial cells, pericytes, and astrocytes,” *International journal of molecular sciences*, 21(5), p. 1636. doi: 10.3390/ijms21051636.
- Freund, T. F., Katona, I. and Piomelli, D. (2003) “Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling,” *Physiological reviews*, 83(3), pp. 1017–1066. doi: 10.1152/physrev.00004.2003.
- Frey, T. and Antonetti, D. A. (2011) “Alterations to the blood-retinal barrier in diabetes: cytokines and reactive oxygen species,” *Antioxidants & redox signaling*, 15(5), pp. 1271–1284. doi: 10.1089/ars.2011.3906.
- Galiegue, S. *et al.* (1995) “Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations,” *European journal of biochemistry*, 232(1), pp. 54–61. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x.
- Gaoni, Y. and Mechoulam, R. (1964) “Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish,” *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), pp. 1646–1647. doi: 10.1021/ja01062a046.
- Garcia-Martin, E. *et al.* (2019) “Neurodegeneration in patients with type 2 diabetes mellitus without diabetic retinopathy,” *Journal of ophthalmology*, 2019, p. 1825819. doi: 10.1155/2019/1825819.
- Garcia-Ramírez, M. *et al.* (2009) “Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy,” *Diabetologia*, 52(12), pp. 2633–2641. doi: 10.1007/s00125-009-1548-8.
- Gardner, T. W. and Davila, J. R. (2017) “The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy,” *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 255(1), pp. 1–6. doi: 10.1007/s00417-016-3548-y.
- Gastinger, M. J., Singh, R. S. J. and 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(7), pp. 3143–3150. doi: 10.1167/iavs.05-1376.
- Gaucher, D. *et al.* (2007) “Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy,” *Vision research*, 47(5), pp. 612–623. doi: 10.1016/j.visres.2006.11.017.
- Gerhardinger, C. *et al.* (2005) “Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(1), pp. 349–357. doi: 10.1167/iavs.04-0860.
- Gerkau, N. J. *et al.* (2017) “Differential effects of energy deprivation on intracellular sodium homeostasis in neurons and astrocytes: Effects of energy deprivation on cellular sodium,” *Journal of neuroscience research*, 95(11), pp. 2275–2285. doi: 10.1002/jnr.23995.

- Ghosh, S. *et al.* (2013) “The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model,” *Life sciences*, 92(8–9), pp. 498–505. doi: 10.1016/j.lfs.2012.06.020.
- Gillies, M. C. *et al.* (2014) “A randomized clinical trial of intravitreal bevacizumab versus intravitreal dexamethasone for diabetic macular edema: the BEVORDEX study,” *Ophthalmology*, 121(12), pp. 2473–2481. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.07.002.
- Glaser, S. T., Kaczocha, M. and Deutsch, D. G. (2005) “Anandamide transport: a critical review,” *Life sciences*, 77(14), pp. 1584–1604. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.007.
- Goldberg, J. L. *et al.* (2002) “Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells,” *Science (New York, N.Y.)*, 296(5574), pp. 1860–1864. doi: 10.1126/science.1068428.
- Goldberg, M. F. and Jampol, L. M. (1987) “Knowledge of diabetic retinopathy before and 18 years after the Airlie House Symposium on Treatment of Diabetic Retinopathy,” *Ophthalmology*, 94(7), pp. 741–746. doi: 10.1016/s0161-6420(87)33524-9.
- Green, N. M. (1975) “Avidin,” in *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, pp. 85–133.
- Greger, I. H., Watson, J. F. and Cull-Candy, S. G. (2017) “Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins,” *Neuron*, 94(4), pp. 713–730. doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.009.
- Grigsby, J. G. *et al.* (2014) “The role of microglia in diabetic retinopathy,” *Journal of ophthalmology*, 2014, p. 705783. doi: 10.1155/2014/705783.
- Grimes, W. N. *et al.* (2015) “Complex inhibitory microcircuitry regulates retinal signaling near visual threshold,” *Journal of neurophysiology*, 114(1), pp. 341–353. doi: 10.1152/jn.00017.2015.
- Guley, N. M. *et al.* (2019) “Amelioration of visual deficits and visual system pathology after mild TBI with the cannabinoid type-2 receptor inverse agonist SMM-189,” *Experimental eye research*, 182, pp. 109–124. doi: 10.1016/j.exer.2019.03.013.
- Gungor, A. *et al.* (2015) “Retinal nerve fiber layer thickness in early-stage diabetic retinopathy with vitamin D deficiency,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(11), pp. 6433–6437. doi: 10.1167/iovs.15-16872.
- Guo, C. and Ma, Y.-Y. (2021) “Calcium permeable-AMPA receptors and excitotoxicity in neurological disorders,” *Frontiers in neural circuits*, 15, p. 711564. doi: 10.3389/fncir.2021.711564.
- Han, K. H. *et al.* (2009) “CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages,” *Cardiovascular research*, 84(3), pp. 378–386. doi: 10.1093/cvr/cvp240.
- Hancock, H. A. and Kraft, T. W. (2004) “Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(3), pp. 1002–1008. doi: 10.1167/iovs.03-1080.

- Hardman, H. F., Domino, E. F. and SeEVERS, M. H. (1971) "General pharmacological actions of some synthetic tetrahydrocannabinol derivatives," *Pharmacological reviews*, 23(4), pp. 295–315.
- Hashem, J. *et al.* (2021) "Inhibition of 2-arachidonoylglycerol metabolism alleviates neuropathology and improves cognitive function in a tau mouse model of Alzheimer's disease," *Molecular neurobiology*, 58(8), pp. 4122–4133. doi: 10.1007/s12035-021-02400-2.
- Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease," *Pharmacological reviews*, 57(2), pp. 173–185. doi: 10.1124/pr.57.2.4.
- Hepler, R. S. (1971) "Marihuana smoking and intraocular pressure," *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 217(10), p. 1392. doi: 10.1001/jama.1971.03190100074024.
- Hernández, C. *et al.* (2005) "Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy," *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 22(6), pp. 719–722. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01538.x.
- Hernández, C. *et al.* (2006) "Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema," *Diabetes care*, 29(9), pp. 2028–2033. doi: 10.2337/dc06-0556.
- Hernández, C. *et al.* (2013) "Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes," *Diabetes*, 62(7), pp. 2569–2578. doi: 10.2337/db12-0926.
- Hernández, C. *et al.* (2019) "SOCS1-derived peptide administered by eye drops prevents retinal neuroinflammation and vascular leakage in experimental diabetes," *International journal of molecular sciences*, 20(15), p. 3615. doi: 10.3390/ijms20153615.
- Hernández-Da Mota, S. E. *et al.* (2015) "Pro-inflammatory serum cytokines in diabetic retinopathy," *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 83(2), pp. 100–106. doi: 10.1016/j.circen.2014.09.002.
- Hernández-Ramírez, E. *et al.* (2017) "Nitrosative stress in the rat retina at the onset of streptozotocin-induced diabetes," *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 42(6), pp. 2353–2363. doi: 10.1159/000480007.
- Higgs, M. H., Romano, C. and Lukasiewicz, P. D. (2002) "Presynaptic effects of group III metabotropic glutamate receptors on excitatory synaptic transmission in the retina," *Neuroscience*, 115(1), pp. 163–172. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00381-0.
- Hillard, C. J. *et al.* (1995) "Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain," *Biochimica et biophysica acta*, 1257(3), pp. 249–256. doi: 10.1016/0005-2760(95)00087-s.
- Hinden, L. *et al.* (2018) "Modulation of renal GLUT2 by the cannabinoid-1 receptor: Implications for the treatment of diabetic nephropathy," *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 29(2), pp. 434–448. doi: 10.1681/ASN.2017040371.

- Hirata, C. *et al.* (1997) “Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal Müller cells,” *Biochemical and biophysical research communications*, 236(3), pp. 712–715. doi: 10.1006/bbrc.1997.7036.
- Holländer, H. *et al.* (1991) “Structure of the macroglia of the retina: Sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells: MÜLLER CELLS AND ASTROCYTES IN CAT RETINA,” *The Journal of comparative neurology*, 313(4), pp. 587–603. doi: 10.1002/cne.903130405.
- Honig, M. G. *et al.* (2022) “Raloxifene, a cannabinoid type-2 receptor inverse agonist, mitigates visual deficits and pathology and modulates microglia after ocular blast,” *Experimental eye research*, 218(108966), p. 108966. doi: 10.1016/j.exer.2022.108966.
- Hormel, T. T. *et al.* (2021) “Plexus-specific retinal vascular anatomy and pathologies as seen by projection-resolved optical coherence tomographic angiography,” *Progress in retinal and eye research*, 80(100878), p. 100878. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100878.
- Horváth, B. *et al.* (2012) “A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury: Novel CB2 agonist for reperfusion injury,” *British journal of pharmacology*, 165(8), pp. 2462–2478. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01381.x.
- Howlett, A. C. *et al.* (2002) “International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors,” *Pharmacological reviews*, 54(2), pp. 161–202. doi: 10.1124/pr.54.2.161.
- Howlett, A. C. and Fleming, R. M. (1984) “Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes,” *Molecular pharmacology*, 26(3), pp. 532–538.
- de Hoz, R. *et al.* (2016) “Retinal macroglial responses in health and disease,” *BioMed research international*, 2016, p. 2954721. doi: 10.1155/2016/2954721.
- Hu, M. *et al.* (2022) “Enhancing endocannabinoid signalling in astrocytes promotes recovery from traumatic brain injury,” *Brain: a journal of neurology*, 145(1), pp. 179–193. doi: 10.1093/brain/awab310.
- Hu, S. S.-J. *et al.* (2010) “Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina,” *The Journal of comparative neurology*, 518(18), pp. 3848–3866. doi: 10.1002/cne.22429.
- Hu, S. S.-J. and Mackie, K. (2015) “Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system,” *Handbook of experimental pharmacology*, 231, pp. 59–93. doi: 10.1007/978-3-319-20825-1_3.
- Hu, X. *et al.* (2021) “Interplay between Müller cells and microglia aggravates retinal inflammatory response in experimental glaucoma,” *Journal of neuroinflammation*, 18(1), p. 303. doi: 10.1186/s12974-021-02366-x.
- Ibán-Arias, R. *et al.* (2018) “The synthetic microneurotrophin BNN27 affects retinal function in rats with streptozotocin-induced diabetes,” *Diabetes*, 67(2), pp. 321–333. doi: 10.2337/db17-0391.

- Ibrahim, A. S. *et al.* (2011) “Retinal microglial activation and inflammation induced by amadori-glycated albumin in a rat model of diabetes,” *Diabetes*, 60(4), pp. 1122–1133. doi: 10.2337/db10-1160.
- Ibsen, M. S. *et al.* (2019) “Cannabinoid CB1 and CB2 receptor-mediated arrestin translocation: Species, subtype, and agonist-dependence,” *Frontiers in pharmacology*, 10, p. 350. doi: 10.3389/fphar.2019.00350.
- Idris-Khodja, N. *et al.* (2016) “Endothelin-1 Overexpression Exaggerates Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction by Altering Oxidative Stress,” *American journal of hypertension*, 29(11), pp. 1245–1251. doi: 10.1093/ajh/hpw078.
- Imamura, T. *et al.* (2017) “Rimonabant, a selective cannabinoid1 receptor antagonist, protects against light-induced retinal degeneration *in vitro* and *in vivo*,” *European journal of pharmacology*, 803, pp. 78–83. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.018.
- Imamura, T. *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, pp. 44–50. doi: 10.1016/j.exer.2017.11.003.
- Ishikawa, M. (2013) “Abnormalities in glutamate metabolism and excitotoxicity in the retinal diseases,” *Scientifica*, 2013, p. 528940. doi: 10.1155/2013/528940.
- Jackson, G. R. and Barber, A. J. (2010) “Visual dysfunction associated with diabetic retinopathy,” *Current diabetes reports*, 10(5), pp. 380–384. doi: 10.1007/s11892-010-0132-4.
- Jacquot, L. *et al.* (2023) “Therapeutic potential of a novel peripherally restricted CB1R inverse agonist on the progression of diabetic nephropathy,” *Frontiers in nephrology*, 3. doi: 10.3389/fneph.2023.1138416.
- Jahanabadi, S. *et al.* (2016) “The effect of spinally administered WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on thermal pain sensitivity in diabetic rats,” *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(4), pp. 394–401.
- Jarrett, S. G. *et al.* (2008) “Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration,” *Progress in retinal and eye research*, 27(6), pp. 596–607. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.09.001.
- Javed, H. *et al.* (2016) “Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of Parkinson’s disease,” *Frontiers in neuroscience*, 10, p. 321. doi: 10.3389/fnins.2016.00321.
- Jia, J. *et al.* (2014) “Anandamide protects HT22 cells exposed to hydrogen peroxide by inhibiting CB1 receptor-mediated type 2 NADPH oxidase,” *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, p. 893516. doi: 10.1155/2014/893516.
- Jonsson, K. B., Frydkjaer-Olsen, U. and Grauslund, J. (2016) “Vascular changes and neurodegeneration in the early stages of diabetic retinopathy: Which comes first?,” *Ophthalmic research*, 56(1), pp. 1–9. doi: 10.1159/000444498.

- Jorgačević, B. *et al.* (2021) “The effect of CB1 antagonism on hepatic oxidative/nitrosative stress and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease,” *Current medicinal chemistry*, 28(1), pp. 169–180. doi: 10.2174/0929867327666200303122734.
- Jourdan, T. *et al.* (2013) “Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes,” *Nature medicine*, 19(9), pp. 1132–1140. doi: 10.1038/nm.3265.
- Jourdan, T. *et al.* (2014) “Overactive cannabinoid 1 receptor in podocytes drives type 2 diabetic nephropathy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50). doi: 10.1073/pnas.1419901111.
- Joussen, A. M. *et al.* (2001) “Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina,” *The American journal of pathology*, 158(1), pp. 147–152. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63952-1.
- Joussen, A. M. *et al.* (2002) “Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*,” *The American journal of pathology*, 160(2), pp. 501–509. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64869-9.
- Jumelle, C. *et al.* (2020) “Advances and limitations of drug delivery systems formulated as eye drops,” *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 321, pp. 1–22. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.057.
- Jung, K.-M. *et al.* (2007) “A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization,” *Molecular pharmacology*, 72(3), pp. 612–621. doi: 10.1124/mol.107.037796.
- Justinová, Z. *et al.* (2011) “The endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is intravenously self-administered by squirrel monkeys,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(19), pp. 7043–7048. doi: 10.1523/jneurosci.6058-10.2011.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1986) “Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina,” *The journal of physiology*, 373(1), pp. 443–461. doi: 10.1113/jphysiol.1986.sp016057.
- Kang, E. Y.-C. *et al.* (2021) “Role of oxidative stress in ocular diseases associated with retinal ganglion cells degeneration,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(12), p. 1948. doi: 10.3390/antiox10121948.
- Kano, M. *et al.* (2009) “Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission,” *Physiological reviews*, 89(1), pp. 309–380. doi: 10.1152/physrev.00019.2008.
- Kawamura, M. *et al.* (1992) “Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy,” *Diabetes care*, 15(10), pp. 1396–1397. doi: 10.2337/diacare.15.10.1396.
- Kiagiadaki, F. and Thermos, K. (2008) “Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(7), pp. 3080–3089. doi: 10.1167/iovs.07-1644.

- Kim, Jeong Hun *et al.* (2009) “Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy,” *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(3), pp. 621–628. doi: 10.1038/jcbfm.2008.154.
- Kim, S. P. *et al.* (2012) “CB₁ antagonism restores hepatic insulin sensitivity without normalization of adiposity in diet-induced obese dogs,” *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 302(10), pp. E1261–E1268. doi: 10.1152/ajpendo.00496.2011.
- Kim, S.-J. *et al.* (2016) “Increased O-GlcNAcylation of NF-κB enhances retinal ganglion cell death in streptozotocin-induced diabetic retinopathy,” *Current eye research*, 41(2), pp. 249–257. doi: 10.3109/02713683.2015.1006372.
- Kingham, J. D. (1976) “The vertebrate retina: Principles of structure and function,” *Archives of ophthalmology*, 94(4), pp. 691–691. doi: 10.1001/archopht.1976.03910030345027.
- Kinsey, S. G. *et al.* (2013) “Repeated low-dose administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 retains cannabinoid receptor type 1-mediated antinociceptive and gastroprotective effects,” *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 345(3), pp. 492–501. doi: 10.1124/jpet.112.201426.
- Kirschuk, S., Parpura, V. and Verkhratsky, A. (2012) “Sodium dynamics: another key to astroglial excitability?,” *Trends in neurosciences*, 35(8), pp. 497–506. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.003.
- Kokona, D. *et al.* (2018) “Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents disruption of the blood-retina barrier during chronic inflammation,” *Journal of neuroinflammation*, 15(1), p. 340. doi: 10.1186/s12974-018-1373-4.
- Kokona, D. *et al.* (2021) “The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and dual ABHD6/MAGL enzyme inhibitors display neuroprotective and anti-inflammatory actions in the *in vivo* retinal model of AMPA excitotoxicity,” *Neuropharmacology*, 185(108450), p. 108450. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108450.
- Kokona, D. and 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, pp. 45–58. doi: 10.1016/j.exer.2015.05.007.
- Kolb, H. (2012) *Photoreceptors*. University of Utah Health Sciences Center.
- Kowluru, R. A. *et al.* (2001) “Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants,” *Neurochemistry international*, 38(5), pp. 385–390. doi: 10.1016/s0197-0186(00)00112-1.
- Kowluru, R. A. (2003) “Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats,” *Diabetes*, 52(3), pp. 818–823. doi: 10.2337/diabetes.52.3.818.
- Kowluru, R., Kern, T. S. and Engerman, R. L. (1994) “Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia II. Comparison of γ -glutamyl transpeptidase in retina and cerebral

cortex, and effects of antioxidant therapy,” *Current eye research*, 13(12), pp. 891–896. doi: 10.3109/02713689409015092.

Krady, J. K. *et al.* (2005) “Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy,” *Diabetes*, 54(5), pp. 1559–1565. doi: 10.2337/diabetes.54.5.1559.

van de Kreeke, J. A. *et al.* (2020) “The spatial relation of diabetic retinal neurodegeneration with diabetic retinopathy,” *PloS one*, 15(4), p. e0231552. doi: 10.1371/journal.pone.0231552.

Kreitzer, A. C. and Regehr, W. G. (2001) “Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells,” *Neuron*, 29(3), pp. 717–727. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00246-x.

Krishnan, G. and Chatterjee, N. (2012) “Endocannabinoids alleviate proinflammatory conditions by modulating innate immune response in muller glia during inflammation,” *Glia*, 60(11), pp. 1629–1645. doi: 10.1002/glia.22380.

Krishnan, G. and Chatterjee, N. (2014) “Endocannabinoids affect innate immunity of Muller glia during HIV-1 Tat cytotoxicity,” *Molecular and cellular neurosciences*, 59, pp. 10–23. doi: 10.1016/j.mcn.2014.01.001.

Kumar, B. *et al.* (2013) “Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats,” *Microvascular research*, 87, pp. 65–74. doi: 10.1016/j.mvr.2013.01.002.

Kusari, J. *et al.* (2010) “Inhibition of vitreoretinal VEGF elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(2), pp. 1044–1051. doi: 10.1167/iovs.08-3293.

Kusuhara, S. *et al.* (2018) “Pathophysiology of diabetic retinopathy: The old and the new,” *Diabetes & metabolism journal*, 42(5), p. 364. doi: 10.4093/dmj.2018.0182.

Lagnado, L. and Baylor, D. (1992) “Signal flow in visual transduction,” *Neuron*, 8(6), pp. 995–1002. doi: 10.1016/0896-6273(92)90122-t.

de Lago, E. *et al.* (2012) “Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects,” *Neuropharmacology*, 62(7), pp. 2299–2308. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.01.030.

Lakshmi priya, T., Gopinath, S. C. B. and Tang, T.-H. (2016) “Biotin-streptavidin competition mediates sensitive detection of biomolecules in enzyme Linked Immunosorbent Assay,” *PloS one*, 11(3), p. e0151153. doi: 10.1371/journal.pone.0151153.

Lalonde, M. R. *et al.* (2006) “Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells,” *Molecular vision*, 12, pp. 1160–1166.

Lam, H. C. (2001) “Role of endothelin in diabetic vascular complications,” *Endocrine*, 14(3), pp. 277–284. doi: 10.1385/ENDO:14:3:277.

- Lamoike, F. *et al.* (2015) “Increased oxidative and nitrative stress accelerates aging of the retinal vasculature in the diabetic retina,” *PloS one*, 10(10), p. e0139664. doi: 10.1371/journal.pone.0139664.
- Latorraca, N. R., Venkatakrisnan, A. J. and Dror, R. O. (2017) “GPCR dynamics: Structures in motion,” *Chemical reviews*, 117(1), pp. 139–155. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00177.
- Lax, P. *et al.* (2014) “Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration,” *Experimental eye research*, 120, pp. 175–185. doi: 10.1016/j.exer.2014.01.019.
- Lessieur, E. M. *et al.* (2022) “ICAM-1 on the luminal surface of endothelial cells is induced to a greater extent in mouse retina than in other tissues in diabetes,” *Diabetologia*, 65(10), pp. 1734–1744. doi: 10.1007/s00125-022-05719-0.
- Li, C.-R. and Sun, S.-G. (2010) “VEGF expression and cell apoptosis in NOD mouse retina,” *International journal of ophthalmology*, 3(3), pp. 224–227. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2010.03.10.
- Li, Q. and Puro, D. G. (2002) “Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(9), pp. 3109–3116.
- Li, X.-H. *et al.* (2020) “The critical role of cannabinoid receptor 2 in URB602-induced protective effects against renal ischemia-reperfusion injury in the rat,” *Shock (Augusta, Ga.)*, 54(4), pp. 520–530. doi: 10.1097/SHK.0000000000001517.
- Lieth, E. *et al.* (1998) “Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group,” *Diabetes*, 47(5), pp. 815–820. doi: 10.2337/diabetes.47.5.815.
- Lieth, E. *et al.* (2000) “Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group,” *Experimental eye research*, 70(6), pp. 723–730. doi: 10.1006/exer.2000.0840.
- Liktor-Busa, E. *et al.* (2023) “ABHD6 and MAGL control 2-AG levels in the PAG and allodynia in a CSD-induced periorbital model of headache,” *Frontiers in pain research (Lausanne, Switzerland)*, 4, p. 1171188. doi: 10.3389/fpain.2023.1171188.
- Lim, S. K. *et al.* (2012) “Hyperglycemia induces apoptosis via CB1 activation through the decrease of FAAH 1 in retinal pigment epithelial cells,” *Journal of cellular physiology*, 227(2), pp. 569–577. doi: 10.1002/jcp.22756.
- Liu, J. *et al.* (2012) “Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice,” *Gastroenterology*, 142(5), pp. 1218-1228.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.032.
- Liu, Q. *et al.* (2013) “Nitrosative stress plays an important role in Wnt pathway activation in diabetic retinopathy,” *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), pp. 1141–1153. doi: 10.1089/ars.2012.4583.

- Liu, W. J. *et al.* (2010) “Effect of rimonabant, the cannabinoid CB1 receptor antagonist, on peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetic rat,” *European journal of pharmacology*, 637(1–3), pp. 70–76. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.04.004.
- Liu, X. *et al.* (2014) “IL-1 β upregulates IL-8 production in human Müller cells through activation of the p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways,” *Inflammation*, 37(5), pp. 1486–1495. doi: 10.1007/s10753-014-9874-5.
- Liu, X. *et al.* (2015) “IL-1 β Induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of P38 MAPK/NF- κ B signaling pathway,” *Experimental cell research*, 331(1), pp. 223–231. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.040.
- Liu, Y. *et al.* (2021) “TNF- α released from retinal Müller cells aggravates retinal pigment epithelium cell apoptosis by upregulating mitophagy during diabetic retinopathy,” *Biochemical and biophysical research communications*, 561, pp. 143–150. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.027.
- Lopes de Faria, J. B., Silva, K. C. and Lopes de Faria, J. M. (2011) “The contribution of hypertension to diabetic nephropathy and retinopathy: the role of inflammation and oxidative stress,” *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 34(4), pp. 413–422. doi: 10.1038/hr.2010.263.
- Lopes de Faria, J. M., Russ, H. and Costa, V. P. (2002) “Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy,” *The British journal of ophthalmology*, 86(7), pp. 725–728. doi: 10.1136/bjo.86.7.725.
- López, E. M. *et al.* (2011) “Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina,” *Synapse (New York, N.Y.)*, 65(5), pp. 388–392. doi: 10.1002/syn.20856.
- Lou, Z.-Y. *et al.* (2018) “The inhibition of CB1 receptor accelerates the onset and development of EAE possibly by regulating microglia/macrophages polarization,” *Journal of neuroimmunology*, 317, pp. 37–44. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.02.001.
- Lu, H.-C. and Mackie, K. (2021) “Review of the endocannabinoid system,” *Biological psychiatry: cognitive neuroscience and neuroimaging*, 6(6), pp. 607–615. doi: 10.1016/j.bpsc.2020.07.016.
- Lu, Qingjun *et al.* (2000) “Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina,” *Visual neuroscience*, 17(1), pp. 91–95. doi: 10.1017/s0952523800171093.
- Lucas Luz, W. *et al.* (2020) “Putative activation of the CB1 cannabinoid receptors prevents anxiety-like behavior, oxidative stress, and GABA decrease in the brain of zebrafish submitted to acute restraint stress,” *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, p. 598812. doi: 10.3389/fnbeh.2020.598812.
- Lukasiewicz, P. D. and Shields, C. R. (1998) “A diversity of GABA receptors in the retina,” *Seminars in cell & developmental biology*, 9(3), pp. 293–299. doi: 10.1006/scdb.1998.0238.
- Lulli, M. *et al.* (2012) “Coenzyme Q10 instilled as eye drops on the cornea reaches the retina and protects retinal layers from apoptosis in a mouse model of kainate-induced retinal

damage,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(13), pp. 8295–8302. doi: 10.1167/iovs.12-10374.

Lv, J. *et al.* (2020) “Sulforaphane delays diabetes-induced retinal photoreceptor cell degeneration,” *Cell and tissue research*, 382(3), pp. 477–486. doi: 10.1007/s00441-020-03267-w.

Ly, A. *et al.* (2011) “Early inner retinal astrocyte dysfunction during diabetes and development of hypoxia, retinal stress, and neuronal functional loss,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(13), pp. 9316–9326. doi: 10.1167/iovs.11-7879.

Ma, L. *et al.* (2015) “Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling,” *Biochemical and biophysical research communications*, 458(1), pp. 92–97. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.073.

Maccarone, R. *et al.* (2016) “Modulation of type-1 and type-2 cannabinoid receptors by saffron in a rat model of retinal neurodegeneration,” *PloS one*, 11(11), p. e0166827. doi: 10.1371/journal.pone.0166827.

Maddineni, P. *et al.* (2020) “CNS axonal degeneration and transport deficits at the optic nerve head precede structural and functional loss of retinal ganglion cells in a mouse model of glaucoma,” *Molecular neurodegeneration*, 15(1), p. 48. doi: 10.1186/s13024-020-00400-9.

Magham, S. V. *et al.* (2021) “Cannabinoid receptor 2 selective agonists and Alzheimer’s disease: An insight into the therapeutic potentials,” *Journal of neuroscience research*, 99(11), pp. 2888–2905. doi: 10.1002/jnr.24933.

Maguire, G., Eubanks, C. and Ayoub, G. (2022) “Neuroprotection of retinal ganglion cells *in vivo* using the activation of the endogenous cannabinoid signaling system in mammalian eyes,” *Neuronal signaling*, 6(1), p. NS20210038. doi: 10.1042/NS20210038.

Malek, N. *et al.* (2015) “Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures,” *Neural plasticity*, 2015, p. 130639. doi: 10.1155/2015/130639.

Mamputu, J.-C. and Renier, G. (2002) “Advanced glycation end products increase, through a protein kinase C-dependent pathway, vascular endothelial growth factor expression in retinal endothelial cells,” *Journal of diabetes and its complications*, 16(4), pp. 284–293. doi: 10.1016/s1056-8727(01)00229-x.

Mansour, S. E. *et al.* (2020) “The evolving treatment of diabetic retinopathy,” *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 14, pp. 653–678. doi: 10.2147/OPHTH.S236637.

Manterola, A. *et al.* (2018) “Deregulation of the endocannabinoid system and therapeutic potential of ABHD6 blockade in the cuprizone model of demyelination,” *Biochemical pharmacology*, 157, pp. 189–201. doi: 10.1016/j.bcp.2018.07.042.

Maresz, K. *et al.* (2005) “Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli,” *Journal of neurochemistry*, 95(2), pp. 437–445. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x.

- Marola, O. J. *et al.* (2020) “Endothelin 1-induced retinal ganglion cell death is largely mediated by JUN activation,” *Cell death & disease*, 11(9), p. 811. doi: 10.1038/s41419-020-02990-0.
- Marrs, W. R. *et al.* (2010) “The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors,” *Nature neuroscience*, 13(8), pp. 951–957. doi: 10.1038/nn.2601.
- Martin, P. M. *et al.* (2004) “Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(9), pp. 3330–3336. doi: 10.1167/iovs.04-0247.
- Martinez Ramirez, C. E. *et al.* (2023) “Endocannabinoid signaling in the central nervous system,” *Glia*, 71(1), pp. 5–35. doi: 10.1002/glia.24280.
- Masland, R. H. (2012) “The neuronal organization of the retina,” *Neuron*, 76(2), pp. 266–280. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.002.
- Massey, S. C. (2006) “Functional anatomy of the mammalian retina,” in *Retina*. Elsevier, pp. 43–82.
- Masuda, T., Shimazawa, M. and Hara, H. (2017) “Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger (edaravone),” *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, p. 9208489. doi: 10.1155/2017/9208489.
- Matias, I. *et al.* (2006) “Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia,” *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(8), pp. 3171–3180. doi: 10.1210/jc.2005-2679.
- Matias, I., Bisogno, T. and Di Marzo, V. (2006) “Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake,” *International journal of obesity (2005)*, 30 Suppl 1(S1), pp. S7–S12. doi: 10.1038/sj.ijo.0803271.
- Matsuda, L. A. *et al.* (1990) “Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA,” *Nature*, 346(6284), pp. 561–564. doi: 10.1038/346561a0.
- McDonnell, C., Leánez, S. and Pol, O. (2017) “The inhibitory effects of cobalt protoporphyrin IX and cannabinoid 2 receptor agonists in type 2 diabetic mice,” *International journal of molecular sciences*, 18(11), p. 2268. doi: 10.3390/ijms18112268.
- Mecha, M. *et al.* (2015) “Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia,” *Brain, behavior, and immunity*, 49, pp. 233–245. doi: 10.1016/j.bbi.2015.06.002.
- Mechoulam, R. *et al.* (1995) “Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors,” *Biochemical pharmacology*, 50(1), pp. 83–90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-d.
- Mechoulam, R. and Parker, L. A. (2013) “The endocannabinoid system and the brain,” *Annual review of psychology*, 64(1), pp. 21–47. doi: 10.1146/annurev-psych-113011-143739.

- Medapati, J. R. *et al.* (2021) “Role of endocannabinoid CB1 receptors in Streptozotocin-induced uninephrectomised Wistar rats in diabetic nephropathy,” *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1). doi: 10.1186/s43088-021-00121-y.
- Mendiola, A. S. *et al.* (2016) “Fractalkine signaling attenuates perivascular clustering of microglia and fibrinogen leakage during systemic inflammation in mouse models of diabetic retinopathy,” *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, p. 303. doi: 10.3389/fncel.2016.00303.
- Meyer-Rüsenberg, B. *et al.* (2007) “Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy,” *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(7), pp. 1009–1018. doi: 10.1007/s00417-006-0489-x.
- Middleton, T. P., Huang, J. Y. and Protti, D. A. (2019) “Cannabinoids modulate light signaling in ON-sustained retinal ganglion cells of the mouse,” *Frontiers in neural circuits*, 13, p. 37. doi: 10.3389/fncir.2019.00037.
- Mihm, M. J., Jing, L. and Bauer, J. A. (2000) “Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage,” *Journal of cardiovascular pharmacology*, 36(2), pp. 182–187. doi: 10.1097/00005344-200008000-00007.
- Milano, W. and Capasso, A. (2018) “Neuroprotection by Cannabinoids in Neurodegenerative Diseases,” *Alzheimer’s, Dementia & Cognitive Neurology*, 2(1). doi: 10.15761/adcn.1000120.
- Miyamoto, K. *et al.* (1999) “Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp. 10836–10841. doi: 10.1073/pnas.96.19.10836.
- Mock, E. D. *et al.* (2020) “Discovery of a NAPE-PLD inhibitor that modulates emotional behavior in mice,” *Nature chemical biology*, 16(6), pp. 667–675. doi: 10.1038/s41589-020-0528-7.
- Molday, R. S. and Moritz, O. L. (2015) “Photoreceptors at a glance,” *Journal of cell science*, 128(22), pp. 4039–4045. doi: 10.1242/jcs.175687.
- de Moraes, H. *et al.* (2016) “Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors,” *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 26(10), pp. 1590–1600. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.08.007.
- Mørkve, S. H., Veruki, M. L. and Hartveit, E. (2002) “Functional characteristics of non-NMDA-type ionotropic glutamate receptor channels in AII amacrine cells in rat retina,” *The journal of physiology*, 542(1), pp. 147–165. doi: 10.1113/jphysiol.2002.020305.
- Morris, G. *et al.* (2022) “Intertwined associations between oxidative and nitrosative stress and endocannabinoid system pathways: Relevance for neuropsychiatric disorders,” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 114(110481), p. 110481. doi: 10.1016/j.pnpbp.2021.110481.

- Motozawa, N. *et al.* (2022) “Automated evaluation of retinal pigment epithelium disease area in eyes with age-related macular degeneration,” *Scientific reports*, 12(1), p. 892. doi: 10.1038/s41598-022-05006-3.
- Mounsey, R. B. *et al.* (2015) “Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson’s disease,” *Experimental neurology*, 273, pp. 36–44. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.07.024.
- Mrugacz, M., Bryl, A. and Zorena, K. (2021) “Retinal vascular endothelial cell dysfunction and neuroretinal degeneration in diabetic patients,” *Journal of clinical medicine*, 10(3), p. 458. doi: 10.3390/jcm10030458.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., *et al.* (2010) “Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy,” *Free radical biology & medicine*, 48(3), pp. 457–467. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.022.
- Mukhopadhyay, P., Pan, H., *et al.* (2010) “CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model: CB1 antagonists for nephropathy,” *British journal of pharmacology*, 160(3), pp. 657–668. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00769.x.
- Munemasa, Y. and Kitaoka, Y. (2012) “Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection,” *Frontiers in cellular neuroscience*, 6, p. 60. doi: 10.3389/fncel.2012.00060.
- Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) “Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids,” *Nature*, 365(6441), pp. 61–65. doi: 10.1038/365061a0.
- Murakami, T. *et al.* (2012) “Protein kinase c β phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability *in vivo*,” *Diabetes*, 61(6), pp. 1573–1583. doi: 10.2337/db11-1367.
- Myśliwiec, M. *et al.* (2008) “The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy,” *Diabetes research and clinical practice*, 79(1), pp. 141–146. doi: 10.1016/j.diabres.2007.07.011.
- Mysona, B. *et al.* (2009) “Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc – in mouse retinal Müller glial cells,” *Cell and tissue research*, 335(3), pp. 477–488. doi: 10.1007/s00441-008-0742-1.
- Nagineeni, C. N. *et al.* (2012) “Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration,” *Journal of cellular physiology*, 227(1), pp. 116–126. doi: 10.1002/jcp.22708.
- Nam, D. H. *et al.* (2012) “Blockade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in db/db mice,” *Endocrinology*, 153(3), pp. 1387–1396. doi: 10.1210/en.2011-1423.
- Navarro, G. *et al.* (2018) “Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for

Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia," *Brain, behavior, and immunity*, 67, pp. 139–151. doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.015.

Newman, D. K. (2010) "Surgical management of the late complications of proliferative diabetic retinopathy," *Eye*, 24(3), pp. 441–449. doi: 10.1038/eye.2009.325.

Newman, E. A. (2013) "Functional hyperemia and mechanisms of neurovascular coupling in the retinal vasculature," *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(11), pp. 1685–1695. doi: 10.1038/jcbfm.2013.145.

Newman, E. A. (2015) "Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters," *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1672), p. 20140195. doi: 10.1098/rstb.2014.0195.

Nian, S. *et al.* (2021) "Neurovascular unit in diabetic retinopathy: pathophysiological roles and potential therapeutical targets," *Eye and vision (London, England)*, 8(1), p. 15. doi: 10.1186/s40662-021-00239-1.

Nickells, R. W. (2012) "The cell and molecular biology of glaucoma: mechanisms of retinal ganglion cell death," *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(5), pp. 2476–2481. doi: 10.1167/iovs.12-9483h.

Ning, X. *et al.* (2004) "Neuro-optic cell apoptosis and microangiopathy in KKAY mouse retina," *International journal of molecular medicine*, 13(1), pp. 87–92. doi: 10.3892/ijmm.13.1.87.

Nishijima, K. *et al.* (2007) "Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury," *The American journal of pathology*, 171(1), pp. 53–67. doi: 10.2353/ajpath.2007.061237.

Nishimura, C. and Kuriyama, K. (1985) "Alterations in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes," *Journal of neurochemistry*, 45(2), pp. 448–455. doi: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb04008.x.

Nomura, D. K. *et al.* (2011) "Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation," *Science (New York, N.Y.)*, 334(6057), pp. 809–813. doi: 10.1126/science.1209200.

Nonarath, H. J. *et al.* (2021) "670nm photobiomodulation modulates bioenergetics and oxidative stress, in rat Müller cells challenged with high glucose," *PloS one*, 16(12), p. e0260968. doi: 10.1371/journal.pone.0260968.

Nucci, C. *et al.* (2007) "Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats," *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(7), pp. 2997–3004. doi: 10.1167/iovs.06-1355.

Ogura, S. *et al.* (2017) "Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown," *JCI insight*, 2(3), p. e90905. doi: 10.1172/jci.insight.90905.

- O'Hare, J. D. *et al.* (2011) "Central endocannabinoid signaling regulates hepatic glucose production and systemic lipolysis," *Diabetes*, 60(4), pp. 1055–1062. doi: 10.2337/db10-0962.
- O'Leary, F. and Campbell, M. (2023) "The blood-retina barrier in health and disease," *The FEBS journal*, 290(4), pp. 878–891. doi: 10.1111/febs.16330.
- O'Malley, D. M. and Masland, R. H. (1989) "Co-release of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid by a retinal neuron," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(9), pp. 3414–3418. doi: 10.1073/pnas.86.9.3414.
- Onaivi, E. S. *et al.* (2006) "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain," *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074(1), pp. 514–536. doi: 10.1196/annals.1369.052.
- Ontko, C. *et al.* (2021). Cannabinoid Receptor 2 Agonist HU-308 Demonstrates Therapeutic Potential in Inflammatory Diabetic Retinopathy Models. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(8), 3012-3012.
- Opere, C. A. *et al.* (2006) "Inhibition of potassium- and ischemia-evoked [3H] D-aspartate release from isolated bovine retina by cannabinoids," *Current eye research*, 31(7–8), pp. 645–653. doi: 10.1080/02713680600762747.
- Osei-Hyiaman, D. *et al.* (2005) "Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity," *The journal of clinical investigation*, 115(5), pp. 1298–1305. doi: 10.1172/jci200523057.
- Oshitari, T. *et al.* (2008) "Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy," *The British journal of ophthalmology*, 92(4), pp. 552–556. doi: 10.1136/bjo.2007.132308.
- Osswald, I. K., Galan, A. and Bowie, D. (2007) "Light triggers expression of philanthotoxin-insensitive Ca²⁺-permeable AMPA receptors in the developing rat retina: Ca²⁺-permeable AMPARs during retinal development," *The journal of physiology*, 582(Pt 1), pp. 95–111. doi: 10.1113/jphysiol.2007.127894.
- Ozdek, S. *et al.* (2002) "Assessment of nerve fiber layer in diabetic patients with scanning laser polarimetry," *Eye*, 16(6), pp. 761–765. doi: 10.1038/sj.eye.6700207.
- Pagano, C. *et al.* (2023) "Cannabinoids in the modulation of oxidative signaling," *International journal of molecular sciences*, 24(3), p. 2513. doi: 10.3390/ijms24032513.
- Panikashvili, D. *et al.* (2005) "CB₁ cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-κB inhibition," *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(4), pp. 477–484. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600047.
- Papadogkonaki, S., Theodorakis, K. and Thermos, K. (2019) "Endogenous and synthetic cannabinoids induce the downregulation of cannabinoid CB1 receptor in retina," *Experimental eye research*, 185(107694), p. 107694. doi: 10.1016/j.exer.2019.107694.

- Park, H. Y.-L., Kim, I. T. and Park, C. K. (2011) “Early diabetic changes in the nerve fibre layer at the macula detected by spectral domain optical coherence tomography,” *The British journal of ophthalmology*, 95(9), pp. 1223–1228. doi: 10.1136/bjo.2010.191841.
- Park, S.-H. *et al.* (2003) “Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina,” *Diabetologia*, 46(9), pp. 1260–1268. doi: 10.1007/s00125-003-1177-6.
- Park, Y. H. *et al.* (2016) “Involvement of AMPA receptor and its flip and flop isoforms in retinal ganglion cell death following oxygen/glucose deprivation,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(2), pp. 508–526. doi: 10.1167/iovs.15-18481.
- Parlar, A. *et al.* (2018) “The exogenous administration of CB2 specific agonist, GW405833, inhibits inflammation by reducing cytokine production and oxidative stress,” *Experimental and therapeutic medicine*, 16(6), pp. 4900–4908. doi: 10.3892/etm.2018.6753.
- Parsons, L. H. and Hurd, Y. L. (2015) “Endocannabinoid signalling in reward and addiction,” *Nature reviews. Neuroscience*, 16(10), pp. 579–594. doi: 10.1038/nrn4004.
- Peng, P.-H., Lin, H.-S. and Lin, S. (2009) “Nerve fibre layer thinning in patients with preclinical retinopathy,” *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d’ophthalmologie*, 44(4), pp. 417–422. doi: 10.3129/i09-112.
- Permeability, V. (no date) “Vascular permeability and Evans blue dye: a physiological and pharmacological approach.”
- Pertwee, R. G. *et al.* (2010) “International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB₁ and CB₂,” *Pharmacological reviews*, 62(4), pp. 588–631. doi: 10.1124/pr.110.003004.
- Picconi, F. *et al.* (2019) “Activation of retinal Müller cells in response to glucose variability,” *Endocrine*, 65(3), pp. 542–549. doi: 10.1007/s12020-019-02017-5.
- Pihlaja, R. *et al.* (2015) “Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 reduces neuroinflammatory response in APdE9 mice and in adult mouse glial cells,” *Journal of neuroinflammation*, 12(1), p. 81. doi: 10.1186/s12974-015-0305-9.
- Pinar-Sueiro, S. *et al.* (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, pp. 55–58. doi: 10.1016/j.exer.2013.02.009.
- Piomelli, D. (2003) “The molecular logic of endocannabinoid signalling,” *Nature reviews. Neuroscience*, 4(11), pp. 873–884. doi: 10.1038/nrn1247.
- Popova, E. (2014) “ON-OFF interactions in the retina: Role of Glycine and GABA,” *Current neuropharmacology*, 12(6), pp. 509–526. doi: 10.2174/1570159X13999150122165018.
- Porcella, A. *et al.* (2000) “The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein: CB1 in the human eye,” *The European journal of neuroscience*, 12(3), pp. 1123–1127. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.01027.x.

- Portillo, J.-A. C. *et al.* (2017) “CD40 in retinal Müller cells induces P2X7-dependent cytokine expression in macrophages/microglia in diabetic mice and development of early experimental diabetic retinopathy,” *Diabetes*, 66(2), pp. 483–493. doi: 10.2337/db16-0051.
- Portillo, J.-A. C. *et al.* (2022) “Disruption of retinal inflammation and the development of diabetic retinopathy in mice by a CD40-derived peptide or mutation of CD40 in Müller cells,” *Diabetologia*, 65(12), pp. 2157–2171. doi: 10.1007/s00125-022-05775-6.
- Pournaras, C. J. *et al.* (2008) “Regulation of retinal blood flow in health and disease,” *Progress in retinal and eye research*, 27(3), pp. 284–330. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.02.002.
- Powell, E. U. and Field, R. (1964) “Diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis,” *Lancet*, 284(7349), pp. 17–18. doi: 10.1016/s0140-6736(64)90008-x.
- Prager, T. C. *et al.* (1990) “The pattern electroretinogram in diabetes,” *American journal of ophthalmology*, 109(3), pp. 279–284. doi: 10.1016/s0002-9394(14)74550-7.
- Provis, J. M. (2001) “Development of the primate retinal vasculature,” *Progress in retinal and eye research*, 20(6), pp. 799–821. doi: 10.1016/s1350-9462(01)00012-x.
- Provis, J. M., Diaz, C. M. and Penfold, P. L. (1996) “Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies,” *Perspectives on developmental neurobiology*, 3(3), pp. 213–222.
- Puro, D. G. (2002) “Diabetes-induced dysfunction of retinal Müller cells,” *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 100, pp. 339–352.
- Purves, D. *et al.* (2001) *Anatomy of the eye*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Qaum, T. *et al.* (2001) “VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(10), pp. 2408–2413.
- Qian, W.-J. *et al.* (2017) “Cannabinoid CB1 and CB2 receptors differentially modulate L- and T-type Ca²⁺ channels in rat retinal ganglion cells,” *Neuropharmacology*, 124, pp. 143–156. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.027.
- Qin, Y., Xu, G. and Wang, W. (2006) “Dendritic abnormalities in retinal ganglion cells of three-month diabetic rats,” *Current eye research*, 31(11), pp. 967–974. doi: 10.1080/02713680600987674.
- Qiu, A.-W. *et al.* (2016) “IL-17A exacerbates diabetic retinopathy by impairing Müller cell function via Act1 signaling,” *Experimental & molecular medicine*, 48(12), pp. e280–e280. doi: 10.1038/emm.2016.117.
- Qiu, A.-W. *et al.* (2021) “IL-17A injury to retinal ganglion cells is mediated by retinal Müller cells in diabetic retinopathy,” *Cell death & disease*, 12(11), p. 1057. doi: 10.1038/s41419-021-04350-y.
- Rahman, I. A. S. *et al.* (2014) “New players in the fatty acyl ethanolamide metabolism,” *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 86, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.phrs.2014.04.001.

- Rajesh, M. *et al.* (2010) “Cannabinoid-1 receptor activation induces reactive oxygen species-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase activation and cell death in human coronary artery endothelial cells: CB₁ activation promotes endothelial cell death,” *British journal of pharmacology*, 160(3), pp. 688–700. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00712.x.
- Rajesh, M. *et al.* (2012) “Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy,” *Diabetes*, 61(3), pp. 716–727. doi: 10.2337/db11-0477.
- Rajesh, M. *et al.* (2022) “Correction to: Cannabinoid receptor 2 activation alleviates diabetes-induced cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress, and fibrosis,” *GeroScience*, 44(3), pp. 1743–1745. doi: 10.1007/s11357-022-00593-5.
- Rakieten, N., Rakieten, M. L. and Nadkarni, M. V. (1963) “Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917),” *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, 29, pp. 91–98.
- Ramos, H. *et al.* (2023) “Inflammation: The link between neural and vascular impairment in the diabetic retina and therapeutic implications,” *International journal of molecular sciences*, 24(10). doi: 10.3390/ijms24108796.
- Rangel-López, E. *et al.* (2015) “Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in the rat brain,” *Neuroscience*, 285, pp. 97–106. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.016.
- Rapino, C. *et al.* (2018) “Neuroprotection by (endo)cannabinoids in glaucoma and retinal neurodegenerative diseases,” *Current neuropharmacology*, 16(7), pp. 959–970. doi: 10.2174/1570159x15666170724104305.
- Rauen, T. *et al.* (1997) “High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance,” *Cell and tissue research*, 291(1), pp. 19–31. doi: 10.1007/s004410050976.
- Rauen, T. (2000) “Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina,” *Amino acids*, 19(1), pp. 53–62. doi: 10.1007/s007260070033.
- Rawson, R. A. (1943) “The binding of t-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins,” *The American journal of physiology*, 138(5), pp. 708–717. doi: 10.1152/ajplegacy.1943.138.5.708.
- Reichenbach, A. and Bringmann, A. (2010) “Introduction,” in *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*. New York, NY: Springer New York, pp. 1–33.
- Reichenbach, A. and Bringmann, A. (2015) “Retinal Glia,” *Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine From Physiology to Disease*, 2(1), pp. 1–644. doi: 10.4199/c00122ed1v01y201412ngl003.
- Reichenbach, A. and Bringmann, A. (2020) “Glia of the human retina,” *Glia*, 68(4), pp. 768–796. doi: 10.1002/glia.23727.

- Ren, S.-Y. *et al.* (2020) “Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases-focusing on FAAH/MAGL inhibitors,” *Acta pharmacologica Sinica*, 41(10), pp. 1263–1271. doi: 10.1038/s41401-020-0385-7.
- Rex, T. S. *et al.* (2009) “Neuroprotection of photoreceptors by direct delivery of erythropoietin to the retina of the retinal degeneration slow mouse,” *Experimental eye research*, 89(5), pp. 735–740. doi: 10.1016/j.exer.2009.06.017.
- Reyes, R. C., Verkhatsky, A. and Parpura, V. (2012) “Plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates Ca²⁺-dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes,” *ASN neuro*, 4(1), p. AN20110059. doi: 10.1042/AN20110059.
- Ribas, V. T. *et al.* (2017) “Attenuation of axonal degeneration by calcium channel inhibitors improves retinal ganglion cell survival and regeneration after optic nerve crush,” *Molecular neurobiology*, 54(1), pp. 72–86. doi: 10.1007/s12035-015-9676-2.
- Ro`rig, B. and Grantyn, R. (1993) “Rat retinal ganglion cells express Ca²⁺-permeable non-NMDA glutamate receptors during the period of histogenetic cell death,” *Neuroscience letters*, 153(1), pp. 32–36. doi: 10.1016/0304-3940(93)90070-2.
- Robbe, D. *et al.* (2002) “Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), pp. 8384–8388. doi: 10.1073/pnas.122149199.
- Roberts, W. G. and Palade, G. E. (1995) “Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor,” *Journal of cell science*, 108 (Pt 6), pp. 2369–2379. doi: 10.1242/jcs.108.6.2369.
- Rodrigues, R. S. *et al.* (2017) “Interaction between cannabinoid type 1 and type 2 receptors in the modulation of subventricular zone and dentate gyrus neurogenesis,” *Frontiers in pharmacology*, 8, p. 516. doi: 10.3389/fphar.2017.00516.
- Rojo-Bustamante, E. *et al.* (2020) “CB2 receptors and neuron-Glia interactions modulate neurotoxicity generated by MAGL inhibition,” *Biomolecules*, 10(8), p. 1198. doi: 10.3390/biom10081198.
- Rossi, B. *et al.* (2011) “Inverse agonism of cannabinoid CB1 receptor blocks the adhesion of encephalitogenic T cells in inflamed brain venules by a protein kinase A-dependent mechanism,” *Journal of neuroimmunology*, 233(1–2), pp. 97–105. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.12.005.
- Rossi, S. *et al.* (2011) “Cannabinoid CB1 receptors regulate neuronal TNF- α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Brain, behavior, and immunity*, 25(6), pp. 1242–1248. doi: 10.1016/j.bbi.2011.03.017.
- Roufail, E. *et al.* (1998) “Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine,” *Diabetologia*, 41(12), pp. 1419–1425. doi: 10.1007/s001250051087.
- Rouzer, C. A. and Marnett, L. J. (2011) “Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and

endocannabinoid signaling pathways,” *Chemical reviews*, 111(10), pp. 5899–5921. doi: 10.1021/cr2002799.

Rozenfeld, R. *et al.* (2012) “Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons,” *PloS one*, 7(1), p. e29239. doi: 10.1371/journal.pone.0029239.

Rübsam, A., Parikh, S. and Fort, P. (2018) “Role of inflammation in diabetic retinopathy,” *International journal of molecular sciences*, 19(4), p. 942. doi: 10.3390/ijms19040942.

Rungger-Brändle, E., Dosso, A. A. and Leuenberger, P. M. (2000) “Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(7), pp. 1971–1980.

Sánchez-Chávez, G. and Salceda, R. (2001) “Acetyl- and butyrylcholinesterase molecular forms in normal and streptozotocin-diabetic rat retinal pigment epithelium,” *Neurochemistry international*, 39(3), pp. 209–215. doi: 10.1016/s0197-0186(01)00022-5.

Sanelli, T. *et al.* (2007) “Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons *in vitro* is NMDA receptor dependant,” *Journal of the neurological sciences*, 256(1–2), pp. 39–51. doi: 10.1016/j.jns.2007.02.018.

Santiago, A. R. *et al.* (2009) “Diabetes changes the levels of ionotropic glutamate receptors in the rat retina,” *Molecular vision*, 15, pp. 1620–1630.

Santos, A. R. *et al.* (2017) “Functional and structural findings of neurodegeneration in early stages of Diabetic Retinopathy: Cross-sectional analyses of baseline data of the EUROCONDOR project,” *Diabetes*, 66(9), pp. 2503–2510. doi: 10.2337/db16-1453.

Santos-García, I. *et al.* (2023) “Preclinical investigation in FAAH inhibition as a neuroprotective therapy for frontotemporal dementia using TDP-43 transgenic male mice,” *Journal of neuroinflammation*, 20(1), p. 108. doi: 10.1186/s12974-023-02792-z.

Sattler, R. and Tymianski, M. (2000) “Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity,” *Journal of molecular medicine*, 78(1), pp. 3–13. doi: 10.1007/s001090000077.

Savage, J. C., Carrier, M. and Tremblay, M.-È. (2019) “Morphology of microglia across contexts of health and disease,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2034, pp. 13–26. doi: 10.1007/978-1-4939-9658-2_2.

Savinainen, J. R., Saario, S. M. and Laitinen, J. T. (2012) “The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors: The three guardians of 2-AG signalling,” *Acta physiologica (Oxford, England)*, 204(2), pp. 267–276. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02280.x.

Scanlon, P. H. (2022) “Improving the screening of risk factors in diabetic retinopathy,” *Expert review of endocrinology & metabolism*, 17(3), pp. 235–243. doi: 10.1080/17446651.2022.2078305.

Schlosburg, J. E. *et al.* (2010) “Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system,” *Nature neuroscience*, 13(9), pp. 1113–1119. doi: 10.1038/nn.2616.

- Schmid-Brunclik, N. *et al.* (2008) “Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation,” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(3), pp. R864-73. doi: 10.1152/ajpregu.00536.2007.
- Scholz, R. *et al.* (2015) “Targeting translocator protein (18 kDa) (TSPO) dampens pro-inflammatory microglia reactivity in the retina and protects from degeneration,” *Journal of neuroinflammation*, 12(1). doi: 10.1186/s12974-015-0422-5.
- Schwitzer, T. *et al.* (2016) “The endocannabinoid system in the retina: From physiology to practical and therapeutic applications,” *Neural plasticity*, 2016, p. 2916732. doi: 10.1155/2016/2916732.
- Seki, M. *et al.* (2004) “Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells,” *Diabetes*, 53(9), pp. 2412–2419. doi: 10.2337/diabetes.53.9.2412.
- Sena, C. M. *et al.* (2011) “Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats: Metformin restores endothelial function in type 2 diabetes,” *British journal of pharmacology*, 163(2), pp. 424–437. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01230.x.
- Shahbazi, F. *et al.* (2020) “Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far,” *iScience*, 23(7), p. 101301. doi: 10.1016/j.isci.2020.101301.
- Shen, X. *et al.* (2011) “Effect of pigment epithelium derived factor on the expression of glutamine synthetase in early phase of experimental diabetic retinopathy,” *Ocular immunology and inflammation*, 19(4), pp. 246–254. doi: 10.3109/09273948.2011.580073.
- Shi, R. *et al.* (2018) “Alterations in retinal nerve fiber layer thickness in early stages of diabetic retinopathy and potential risk factors,” *Current eye research*, 43(2), pp. 244–253. doi: 10.1080/02713683.2017.1387669.
- Shin, E. S. *et al.* (2014) “High glucose alters retinal astrocytes phenotype through increased production of inflammatory cytokines and oxidative stress,” *PloS one*, 9(7), p. e103148. doi: 10.1371/journal.pone.0103148.
- Simó, R. *et al.* (2006) “Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy,” *Current diabetes reviews*, 2(1), pp. 71–98. doi: 10.2174/157339906775473671.
- Simó, R. and Hernández, C. (2008) “Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy,” *Diabetologia*, 51(9), pp. 1574–1580. doi: 10.1007/s00125-008-0989-9.
- Simó, R. and Hernández, C. (2015) “Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence,” *Progress in retinal and eye research*, 48, pp. 160–180. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.04.003.
- Simó, R. and Hernández, C. (2022) “New insights into treating early and advanced stage diabetic retinopathy,” *International journal of molecular sciences*, 23(15), p. 8513. doi: 10.3390/ijms23158513.

- Simó, R., Stitt, A. W. and Gardner, T. W. (2018) “Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter?,” *Diabetologia*, 61(9), pp. 1902–1912. doi: 10.1007/s00125-018-4692-1.
- Simon, G. M. and 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(8), p. 1411. doi: 10.1039/c000237b.
- Sim-Selley, L. J. (2003) “Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids,” *Critical reviews in neurobiology*, 15(2), pp. 91–119. doi: 10.1615/critrevneurobiol.v15.i2.10.
- Skeberdis, V. A. *et al.* (2006) “Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors,” *Nature neuroscience*, 9(4), pp. 501–510. doi: 10.1038/nn1664.
- Slosky, L. M., Caron, M. G. and Barak, L. S. (2021) “Biased allosteric modulators: New frontiers in GPCR drug discovery,” *Trends in pharmacological sciences*, 42(4), pp. 283–299. doi: 10.1016/j.tips.2020.12.005.
- Slusar, J. E. *et al.* (2013) “The fatty acid amide hydrolase inhibitor, URB597, promotes retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of optic nerve axotomy,” *Neuropharmacology*, 72, pp. 116–125. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.018.
- Sohn, E. H. *et al.* (2016) “Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), pp. E2655–64. doi: 10.1073/pnas.1522014113.
- Soliño, M. *et al.* (2022) “CB1 cannabinoid receptor is a target for neuroprotection in light induced retinal degeneration,” *Advances in drug and alcohol research*, 2. doi: 10.3389/adar.2022.10734.
- Solomon, S. D. *et al.* (2017) “Erratum. Diabetic retinopathy: A position statement by the American diabetes association. *Diabetes care* 2017;40:412–418,” *Diabetes care*, 40(9), pp. 1285–1285. doi: 10.2337/dc17-er09.
- Solomon, S. G. and Lennie, P. (2007) “The machinery of colour vision,” *Nature reviews. Neuroscience*, 8(4), pp. 276–286. doi: 10.1038/nrn2094.
- Soni, D., Sagar, P. and Takkar, B. (2021) “Diabetic retinal neurodegeneration as a form of diabetic retinopathy,” *International ophthalmology*, 41(9), pp. 3223–3248. doi: 10.1007/s10792-021-01864-4.
- Sorrentino, F. S. *et al.* (2016) “The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy,” *Life sciences*, 162, pp. 54–59. doi: 10.1016/j.lfs.2016.08.001.
- Soto, I. *et al.* (2008) “Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model,” *The Journal of neuroscience*:

the official journal of the Society for Neuroscience, 28(2), pp. 548–561. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3714-07.2008.

Spyridakos, D. *et al.* (2021) “Effect of acute and subchronic administration of (R)-WIN55,212-2 induced neuroprotection and anti inflammatory actions in rat retina: CB1 and CB2 receptor involvement,” *Neurochemistry international*, 142(104907), p. 104907. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104907.

Stark, A. K. *et al.* (2021). 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid ethanolamide endocannabinoid mitigates diabetes-induced retinal vascular inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(8), 2926-2926.

Steinberg, R. H. (1985) “Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina,” *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 60(4), pp. 327–346. doi: 10.1007/bf00158922.

Steinberg, R. H., Linsenmeier, R. A. and Griff, E. R. (1983) “Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium,” *Vision research*, 23(11), pp. 1315–1323. doi: 10.1016/0042-6989(83)90107-4.

Stella, N. (2004) “Cannabinoid signaling in glial cells,” *Glia*, 48(4), pp. 267–277. doi: 10.1002/glia.20084.

Stella, N. (2010) “Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas,” *Glia*, 58(9), pp. 1017–1030. doi: 10.1002/glia.20983.

Stow, L. R. *et al.* (2011) “Endothelin-1 gene regulation,” *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1), pp. 16–28. doi: 10.1096/fj.10-161612.

Straiker, A. *et al.* (1999) “Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), pp. 14565–14570. doi: 10.1073/pnas.96.25.14565.

Straiker, A. and Sullivan, J. M. (2003) “Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander,” *Journal of neurophysiology*, 89(5), pp. 2647–2654. doi: 10.1152/jn.00268.2002.

Strauss, O. (2005) “The retinal pigment epithelium in visual function,” *Physiological reviews*, 85(3), pp. 845–881. doi: 10.1152/physrev.00021.2004.

Stroebel, D., Casado, M. and Paoletti, P. (2018) “Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology,” *Current opinion in physiology*, 2, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.cophys.2017.12.004.

Sun, J. *et al.* (2010) “Intermittent high glucose enhances cell proliferation and VEGF expression in retinal endothelial cells: the role of mitochondrial reactive oxygen species,” *Molecular and cellular biochemistry*, 343(1–2), pp. 27–35. doi: 10.1007/s11010-010-0495-5.

- Sun, Y. *et al.* (2014) “Intrathecal injection of JWH015 attenuates remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia by inhibiting activation of spinal glia in a rat model,” *Anesthesia and analgesia*, 118(4), pp. 841–853. doi: 10.1213/ANE.0000000000000146.
- Szabó, R. *et al.* (2022) “Potential implications of rimonabant on age-related oxidative stress and inflammation,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(1), p. 162. doi: 10.3390/antiox11010162.
- Szczesniak, A.-M. *et al.* (2017) “Cannabinoid 2 receptor is a novel anti-inflammatory target in experimental proliferative vitreoretinopathy,” *Neuropharmacology*, 113(Pt B), pp. 627–638. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.030.
- Takahashi, H. and Shibuya, M. (2005) “The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions,” *Clinical science (London, England: 1979)*, 109(3), pp. 227–241. doi: 10.1042/CS20040370.
- Takahashi, K. *et al.* (1990) “Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus,” *Diabetologia*, 33(5), pp. 306–310. doi: 10.1007/bf00403325.
- Tam, J. *et al.* (2012) “Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing Leptin resistance,” *Cell metabolism*, 16(2), pp. 167–179. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.002.
- Tanaka, M. *et al.* (2017) “WWL70 attenuates PGE2 production derived from 2-arachidonoylglycerol in microglia by ABHD6-independent mechanism,” *Journal of neuroinflammation*, 14(1), p. 7. doi: 10.1186/s12974-016-0783-4.
- Tanaka, M., Sackett, S. and Zhang, Y. (2020) “Endocannabinoid modulation of microglial phenotypes in neuropathology,” *Frontiers in neurology*, 11, p. 87. doi: 10.3389/fneur.2020.00087.
- Tanda, G., Munzar, P. and Goldberg, S. R. (2000) “Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys,” *Nature neuroscience*, 3(11), pp. 1073–1074. doi: 10.1038/80577.
- Tang, J. and Kern, T. S. (2011) “Inflammation in diabetic retinopathy,” *Progress in retinal and eye research*, 30(5), pp. 343–358. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.002.
- Tang, Y. and Le, W. (2016) “Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases,” *Molecular neurobiology*, 53(2), pp. 1181–1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.
- Tao, Y. *et al.* (2016) “Cannabinoid receptor-2 stimulation suppresses neuroinflammation by regulating microglial M1/M2 polarization through the cAMP/PKA pathway in an experimental GMH rat model,” *Brain, behavior, and immunity*, 58, pp. 118–129. doi: 10.1016/j.bbi.2016.05.020.
- Tavares Ferreira, J. *et al.* (2016) “Retinal neurodegeneration in diabetic patients without diabetic retinopathy,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(14), pp. 6455–6460. doi: 10.1167/iovs.16-20215.
- Thomas, H. E. *et al.* (2009) “Beta cell apoptosis in diabetes,” *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14(12), pp. 1389–1404. doi: 10.1007/s10495-009-0339-5.

- Tian, M. *et al.* (2019) “Correlations of the severity of diabetic retinopathy with EPO, Caspase-3 expression and oxidative stress,” *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(22), pp. 9707–9713. doi: 10.26355/eurev_201911_19532.
- Tiyerili, V. *et al.* (2010) “CB1 receptor inhibition leads to decreased vascular AT1 receptor expression, inhibition of oxidative stress and improved endothelial function,” *Basic research in cardiology*, 105(4), pp. 465–477. doi: 10.1007/s00395-010-0090-7.
- Tomita, Y. *et al.* (2021) “Updates on the current treatments for diabetic retinopathy and possibility of future oral therapy,” *Journal of clinical medicine*, 10(20), p. 4666. doi: 10.3390/jcm10204666.
- Too, L. K. and Simunovic, M. P. (2021) “Retinal stem/progenitor cells derived from adult Müller Glia for the treatment of retinal degeneration,” *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, p. 749131. doi: 10.3389/fcell.2021.749131.
- Toprak, I. *et al.* (2020) “Early retinal neurodegeneration in preclinical diabetic retinopathy: a multifactorial investigation,” *Eye*, 34(6), pp. 1100–1107. doi: 10.1038/s41433-019-0646-1.
- Tu, Y. *et al.* (2020) “Melatonin inhibits Müller cell activation and pro-inflammatory cytokine production via upregulating the MEG3/miR-204/Sirt1 axis in experimental diabetic retinopathy,” *Journal of cellular physiology*, 235(11), pp. 8724–8735. doi: 10.1002/jcp.29716.
- Tu, Y. *et al.* (2021) “Melatonin attenuates oxidative stress and inflammation of Müller cells in diabetic retinopathy via activating the Sirt1 pathway,” *Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]*, 137(111274), p. 111274. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111274.
- Ulugol, A. *et al.* (2004) “The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats,” *Neuroscience letters*, 371(2–3), pp. 167–170. doi: 10.1016/j.neulet.2004.08.061.
- Vardi, N. *et al.* (2000) “Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina,” *The Journal of comparative neurology*, 423(3), pp. 402–412. doi: 10.1002/1096-9861(20000731)423:3<402::aid-cne4>3.0.co;2-e.
- Vasincu, A. *et al.* (2022) “Endocannabinoid modulation in neurodegenerative diseases: In pursuit of certainty,” *Biology*, 11(3), p. 440. doi: 10.3390/biology11030440.
- Villarroel, M. *et al.* (2010) “Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy,” *World journal of diabetes*, 1(2), pp. 57–64. doi: 10.4239/wjd.v1.i2.57.
- Vujosevic, S. *et al.* (2015) “Aqueous humor biomarkers of Müller cell activation in diabetic eyes,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(6), pp. 3913–3918. doi: 10.1167/iovs.15-16554.
- Vujosevic, S. *et al.* (2018) “Peripapillary microvascular and neural changes in diabetes mellitus: An OCT-angiography study,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(12), pp. 5074–5081. doi: 10.1167/iovs.18-24891.

- Vujosevic, S. and Midena, E. (2013) “Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and Müller cells alterations,” *Journal of diabetes research*, 2013, p. 905058. doi: 10.1155/2013/905058.
- Walter, L. *et al.* (2003) “Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), pp. 1398–1405. doi: 10.1523/jneurosci.23-04-01398.2003.
- Wang, J. *et al.* (2010) “Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage,” *Diabetes*, 59(9), pp. 2297–2305. doi: 10.2337/db09-1420.
- Wang, L.-L. *et al.* (2012) “Elevated histone acetylations in Müller cell contribute to inflammation: A novel inhibitory effect of minocycline,” *Glia*, 60(12), pp. 1896–1905. doi: 10.1002/glia.22405.
- Wang, M., Liu, M. and Ma, Z. (2023) “Cannabinoid type 2 receptor activation inhibits MPP⁺-induced M1 differentiation of microglia through activating PI3K/Akt/Nrf2 signal pathway,” *Molecular biology reports*, 50(5), pp. 4423–4433. doi: 10.1007/s11033-023-08395-4.
- Wang, Z. *et al.* (2010) “Attenuation of streptozotocin-induced microvascular changes in the mouse retina with the endothelin receptor A antagonist atrasentan,” *Experimental eye research*, 91(5), pp. 670–675. doi: 10.1016/j.exer.2010.08.008.
- Warrier, A. and Wilson, M. (2007) “Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells,” *Visual neuroscience*, 24(1), pp. 25–35. doi: 10.1017/S0952523807230160.
- Wässle, H. *et al.* (2009) “Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(1), pp. 106–117. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4442-08.2009.
- Weber, B. and 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(6), pp. 393–400. doi: 10.1046/j.1472-8206.2001.00056.x.
- Wei, Y. *et al.* (2013) “Cannabinoid receptor 1 blockade protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative injury,” *Molecular vision*, 19, pp. 357–366.
- Wei, Y., Wang, X. and Wang, L. (2009) “Presence and regulation of cannabinoid receptors in human retinal pigment epithelial cells,” *Molecular vision*, 15, pp. 1243–1251.
- Wen, J. *et al.* (2015) “Activation of CB2 receptor is required for the therapeutic effect of ABHD6 inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Neuropharmacology*, 99, pp. 196–209. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.010.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969) “Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording,” *Journal of neurophysiology*, 32(3), pp. 339–355. doi: 10.1152/jn.1969.32.3.339.

- West, E. R. and Cepko, C. L. (2022) “Development and diversification of bipolar interneurons in the mammalian retina,” *Developmental biology*, 481, pp. 30–42. doi: 10.1016/j.ydbio.2021.09.005.
- Wilson, R. I. and Nicoll, R. A. (2001) “Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses,” *Nature*, 410(6828), pp. 588–592. doi: 10.1038/35069076.
- Witkovsky, P., Thoreson, W. and Tranchina, D. (2001) “Chapter 9 Transmission at the photoreceptor synapse,” in *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 145–159.
- Witmer, A. N. *et al.* (2003) “Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease,” *Progress in retinal and eye research*, 22(1), pp. 1–29. doi: 10.1016/s1350-9462(02)00043-5.
- Wolter, J. R. (1961) “Diabetic retinopathy,” *American journal of ophthalmology*, 51(5), p. 1123/251-1141/269. doi: 10.1016/0002-9394(61)91802-5.
- Wu, S. M. and Maple, B. R. (1998) “Amino acid neurotransmitters in the retina: a functional overview,” *Vision research*, 38(10), pp. 1371–1384. doi: 10.1016/s0042-6989(97)00296-4.
- Xiao, C. *et al.* (2012) “Physiological effects of superoxide dismutase on altered visual function of retinal ganglion cells in db/db mice,” *PloS one*, 7(1), p. e30343. doi: 10.1371/journal.pone.0030343.
- Xu, H. *et al.* (2007) “Anti-inflammatory property of the cannabinoid receptor-2-selective agonist JWH-133 in a rodent model of autoimmune uveoretinitis,” *Journal of leukocyte biology*, 82(3), pp. 532–541. doi: 10.1189/jlb.0307159.
- Xu, Q., Qaum, T. and Adamis, A. P. (2001) “Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(3), pp. 789–794.
- Xue, Z. *et al.* (2023) “Wwl70-induced ABHD6 inhibition attenuates memory deficits and pathological phenotypes in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice,” *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 194(106864), p. 106864. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106864.
- Yamasaki, T. *et al.* (2021) “Neuroprotective effects of minocycline and KML29, a potent inhibitor of monoacylglycerol lipase, in an experimental stroke model: a small-animal positron emission tomography study,” *Theranostics*, 11(19), pp. 9492–9502. doi: 10.7150/thno.64320.
- Yanagisawa, M. *et al.* (1988) “A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells,” *Nature*, 332(6163), pp. 411–415. doi: 10.1038/332411a0.
- Yang, J. *et al.* (2019) “Loss of X-box binding protein 1 in Müller cells augments retinal inflammation in a mouse model of diabetes,” *Diabetologia*, 62(3), pp. 531–543. doi: 10.1007/s00125-018-4776-y.

- Yang, L.-P. *et al.* (2009) “Baicalein reduces inflammatory process in a rodent model of diabetic retinopathy,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(5), pp. 2319–2327. doi: 10.1167/iovs.08-2642.
- Yau, J. W. Y. *et al.* (2012) “Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy,” *Diabetes care*, 35(3), pp. 556–564. doi: 10.2337/dc11-1909.
- Yazulla, S. *et al.* (1999) “Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina,” *The Journal of comparative neurology*, 415(1), pp. 80–90. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19991206)415:1<80::aid-cne6>3.0.co;2-h.
- Yen, L. F. *et al.* (2013) “Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats,” *PloS one*, 8(7), p. e68595. doi: 10.1371/journal.pone.0068595.
- Yi, J. *et al.* (2016) “Optical detection of early damage in retinal ganglion cells in a mouse model of partial optic nerve crush injury,” *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(13), pp. 5665–5671. doi: 10.1167/iovs.16-19955.
- Yun, J.-H. (2021) “Interleukin-1 β induces pericyte apoptosis via the NF- κ B pathway in diabetic retinopathy,” *Biochemical and biophysical research communications*, 546, pp. 46–53. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.01.108.
- Zabouri, N., Bouchard, J.-F. and Casanova, C. (2011) “Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina,” *The Journal of comparative neurology*, 519(7), pp. 1258–1280. doi: 10.1002/cne.22534.
- Zahs, K. and Esguerra, M. (2006) “Glial cells in the developing retina,” in *Retinal Development*. Cambridge University Press, pp. 172–192.
- Zeng, H.-Y., Green, W. R. and Tso, M. O. M. (2008) “Microglial activation in human diabetic retinopathy,” *Archives of ophthalmology*, 126(2), pp. 227–232. doi: 10.1001/archophthalmol.2007.65.
- Zeng, K. *et al.* (2010) “Effects of taurine on glutamate uptake and degradation in Müller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism,” *Molecular and cellular neurosciences*, 45(2), pp. 192–199. doi: 10.1016/j.mcn.2010.06.010.
- Zeng, K. *et al.* (2016) “Resveratrol prevents retinal dysfunction by regulating glutamate transporters, glutamine synthetase expression and activity in diabetic retina,” *Neurochemical research*, 41(5), pp. 1050–1064. doi: 10.1007/s11064-015-1793-9.
- Zhang, C. *et al.* (2018) “Neuroprotective effect of He-Ying-Qing-Re formula on retinal ganglion cell in diabetic retinopathy,” *Journal of ethnopharmacology*, 214, pp. 179–189. doi: 10.1016/j.jep.2017.12.018.
- Zhang, D., Sucher, N. J. and Lipton, S. A. (1995) “Co-expression of AMPA/kainate receptor-operated channels with high and low Ca²⁺ permeability in single rat retinal ganglion cells,” *Neuroscience*, 67(1), pp. 177–188. doi: 10.1016/0306-4522(94)00627-h.
- Zhang, F., Challapalli, S. C. and Smith, P. J. W. (2009) “Cannabinoid CB1 receptor activation stimulates neurite outgrowth and inhibits capsaicin-induced Ca²⁺ influx in an *in vitro* model

of diabetic neuropathy,” *Neuropharmacology*, 57(2), pp. 88–96. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.04.017.

Zhang, L. *et al.* (2001) “Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control,” *Diabetes care*, 24(7), pp. 1275–1279. doi: 10.2337/diacare.24.7.1275.

Zhang, W. *et al.* (2011) “Inflammation and diabetic retinal microvascular complications,” *Journal of cardiovascular disease research*, 2(2), pp. 96–103. doi: 10.4103/0975-3583.83035.

Zhang, X. *et al.* (2016) “Cannabinoid 2 receptor agonist improves systemic sensitivity to insulin in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice,” *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(5), pp. 1175–1185. doi: 10.1159/000453171.

Zhu, D. *et al.* (2023) “Inhibition of 2-arachidonoylglycerol degradation enhances glial immunity by single-cell transcriptomic analysis,” *Journal of neuroinflammation*, 20(1), p. 17. doi: 10.1186/s12974-023-02701-4.

Zhu, S.-H. *et al.* (2017) “Paeoniflorin suppressed high glucose-induced retinal microglia MMP-9 expression and inflammatory response via inhibition of TLR4/NF- κ B pathway through upregulation of SOCS3 in diabetic retinopathy,” *Inflammation*, 40(5), pp. 1475–1486. doi: 10.1007/s10753-017-0571-z.

Zhu, X. *et al.* (2015) “Tetramethylpyrazine protects retinal capillary endothelial cells (TR-iBRB2) against IL-1 β -induced nitrative/oxidative stress,” *International journal of molecular sciences*, 16(9), pp. 21775–21790. doi: 10.3390/ijms160921775.

Zhuang, S.-Y. *et al.* (1998) “Effects of long-term exposure to Δ 9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions,” *Brain research. Molecular brain research*, 62(2), pp. 141–149. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00232-0.

Zimov, S. and 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(4), pp. 441–452. doi: 10.1023/B:NEUR.0000046574.72380.e8.

Zoja, C. *et al.* (2016) “Therapy with a selective cannabinoid receptor type 2 agonist limits albuminuria and renal injury in mice with type 2 diabetic nephropathy,” *Nephron*, 132(1), pp. 59–69. doi: 10.1159/000442679.

Zong, H. *et al.* (2010) “Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE),” *Diabetologia*, 53(12), pp. 2656–2666. doi: 10.1007/s00125-010-1900-z.

Παράρτημα Α: Βιογραφικό Σημείωμα

Curriculum Vitae

Personal Information

Name: Dimitris
Last Name: Spyridakos
Date of Birth: 15/07/1993
Address: Myronos 22, Heraklion, Crete, Greece, 71304
Phone: +30 6981680003
E-mail: medp2011897@med.uoc.gr

Education

2011-2016: B.Sc. in Psychology, University of Crete, School of Social Sciences, Department of Psychology (Grade: **8,02**)

Diploma thesis- Title: “Trans-generational effects of Δ^9 -THC in the locomotive and reward facilitating effects of Δ^9 -THC and amphetamine” (Grade: **10**)

2016-2018: M.Sc. in Neuroscience, University of Crete, School of Medicine (grade: **9,52**)

Master thesis- Title: “Study of the effect of sub-chronic intraperitoneal injection of the synthetic cannabinoid R-WIN55,212-2 on CB1 receptor expression in healthy rat retina and in the AMPA retinal excitotoxicity model” (Grade: **10**). (Mentor: Prof. Kyriaki Thermos, Professor of Pharmacology)

2019-present: Ph.D candidate in Pharmacology, University of Crete, School of Medicine, Department of Pharmacology (Mentor: Prof. Kyriaki Thermos, Professor of Pharmacology)

Title of Ph.D thesis: “The endocannabinoid system as a therapeutic target for the treatment of retinopathies”

Research Experience

October 2013- August 2015: Diploma thesis, Laboratory of Neuroscience and Behavior, Department of Psychology, School of Social Sciences, University of Crete (Supervisor: George Panagis, Professor of Biopsychology). **Title:** “Trans-generational effects of Δ^9 -THC in the locomotive and reward facilitating effects of Δ^9 -THC and amphetamine”. (Grade: **10**)

May 2015- August 2015: Practical exercise (200 hours), Laboratory of Neuroscience and Behavior, Department of Psychology, School of Social Sciences, University of Crete (Supervisor: George Panagis, Professor of Biopsychology).

March 2017- June 2017: Three month rotation in Pharmacology Lab, School of Medicine, University of Crete (Supervisor: Kyriaki Thermos, Professor of Pharmacology). **Title:** “Study of the expression of brain nitric oxide synthase in the amacrine cells of rat retina”. (Grade: **10**)

July 2017- September 2017: Three month rotation in Neurophysiology and Behavior Lab, Department of Biology, University of Crete (Supervisor: Kyriaki Sidiropoulou, Assistant

Professor of Neurophysiology). **Title:** “Study of the effect of prefrontal cortex in the working memory of adult mice”. (Grade: **10**)

October 2017- December 2017: Three month rotation in Pharmacology Lab, School of Medicine, University of Crete (Supervisor: Ioannis Charalampopoulos, Associate Professor of Pharmacology). **Title:** “Study of the effect of synthetic neurosteroids in the working memory of adult mice, in a genetic model of Alzheimer’s disease”. (Grade: **9,5**)

January 2018- October 2018: Master thesis, Pharmacology Lab, School of Medicine, University of Crete (Supervisor: Kyriaki Thermos, Professor of Pharmacology). **Title:** “Study of the effect of sub-chronic intraperitoneal injection of the synthetic cannabinoid R-WIN55,212-2 on CB1 receptor expression in healthy rat retina and in the AMPA retinal excitotoxicity model”. (Grade: **10**)

January 2018- March 2018 and March 2019- November 2019: Program ULTRACHIRAL- Ultrasensitive chiral detecting by signal-reversing activity polarimetry» (K.A:4704). Preparation of retina, brain and blood samples from rat for the detection of cannabinoid agents and the determination of their chirality. (Head of Medicine Team: Kyriaki Thermos, Professor of Pharmacology). HORIZON 2020, Principal Investigator (P. Rakitzis, Professor of Physics, University of Crete)

Scholarships/ Awards

2017: Christina Spyraiki Award for best performance in the first year of graduate studies (University of Crete, School of Medicine)

2018: Christina Spyraiki Award for best performance in graduate studies (2016-2018, University of Crete, School of Medicine)

2022-present: IKY Scholarship Program for PhD candidates in the Greek Universities (number: 2022-050-0502-52089)

2023: Maria Manasaki Award for excellence for PhD candidates (School of Medicine, University of Crete)

Publications

1. Pitsilis[#], G., **Spyridakos[#], D.**, Nomikos, G. G., & Panagis, G. (2017). Adolescent female cannabinoid exposure diminishes the reward-facilitating effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and d-amphetamine in the adult male offspring. *Frontiers in pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00225>. *IF=3.831(2017)* ,[#]**equal first author**
2. **Spyridakos, D.**, Papadogkonaki, S., Dionysopoulou, S., Mastrodinou, N., Polioudaki, H., & Thermos, K. (2021). Effect of acute and subchronic administration of (R)-WIN55, 212-2 induced neuroprotection and anti inflammatory actions in rat retina: CB1 and CB2

receptor involvement. *Neurochemistry International*, 142, 104907. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104907> . *IF* = 3.881(2019)

3. Kokona[#], D., **Spyridakos[#], D.**, Tzatzarakis, M., Papadogkonaki, S., Filidou, E., Arvanitidis, K. I., ... & Thermos, K. (2021). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and dual ABHD6/MAGL enzyme inhibitors display neuroprotective and anti-inflammatory actions in the *in vivo* retinal model of AMPA excitotoxicity. *Neuropharmacology*, 185,108450.<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108450> *IF* = 4.431 (2019), [#]equal first author
4. **Spyridakos, D.**, Mastrodimou, N., Vemuri, K., Ho, T. C., Nikas, S. P., Makriyannis, A., & Thermos, K. (2023). Blockade of CB1 or Activation of CB2 Cannabinoid Receptors Is Differentially Efficacious in the Treatment of the Early Pathological Events in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 240. <https://doi.org/10.3390/ijms24010240> *IF* =6.208 (2023)
5. Dionysopoulou S, Wikstrom P, Bucolo C, Romano GL, Micale V, Svensson R, **Spyridakos D**, Mastrodimou N, Georgakis S, Verginis P, Walum E, Thermos K. Topically administered NOX4 inhibitor, GLX7013114, is efficacious in treating the early pathological events of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2023 Feb 23;db220515. doi: 10.2337/db22-0515. *IF* = 9.332. (2023)

Abstracts and Posters

Pitsilis, G., **Spyridakos, D.** & Panagis, G. “*Transgenerational effects of adolescent cannabinoid exposure on the reward facilitating effects of Δ^9 - tetrahydrocannabinol and amphetamine*”. FENS FORUM, Copenhagen, July 2016.

Pitsilis G., **Spyridakos D.**, Nomikos G. & Panagis G. “*Adolescent cannabinoid exposure in female rats: Transgenerational effects on Δ^9 -tetrahydrocannabinol brain stimulation reward and locomotion in adult male offspring*”. European Behavioural Pharmacology Society, Hersonisos, August 2017.

Spyridakos D., Thermos K. “*Effect of sub chronic intraperitoneal administration of the synthetic CB1/CB2 cannabinoid, WIN55,212-2, on the expression of CB1 receptor in healthy retina and in the model of AMPA excitotoxicity*”. 28th Hellenic Society for Neuroscience Meeting, Heraklion, October 2019.

Spyridakos D. et al. “*The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and ABHD6/MAGL enzyme inhibitors display neuroprotective and anti-inflammatory actions in the in vivo retinal model of AMPA excitotoxicity*”. 28th Hellenic Society for Neuroscience Meeting, Heraklion, October 2019.

Participation in Schools/ Workshops

EURON workshop: “Psychopharmacology: From Laboratory to Clinic”, European Graduate School of Neuroscience (EURON), 7-11 October 2017, University of Crete, Heraklion, Crete, GR.

9th International Course - “Care and Use of Laboratory Animals (CULA): mice, rats and zebrafish” (May-June 2023), accredited by the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Teaching experience

2019 and 2021: Lectures to graduate students, “Neurobiology of the endocannabinoid system”, of the graduate program of “Neuroscience” (School of Medicine, University of Crete).

Basic Research Skills

- Stereotaxic surgery in rats and mice
- Intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular and intravenous injections in mice and rats
- Intravitreal injection in rats
- Perfusion and histology in mice and rats

Techniques

- Intracranial Self Stimulation (ICSS) in rats (for the study of the rewarding effects of drugs of abuse)
- Behavioral tests in mice and rats for memory, locomotion and anxiety (Elevated Plus Maze, Light-Dark Box Test)
- Use of vibratome (brain tissue) and cryotome (brain and retina)
- Histochemical staining (Golgi, Nissl, Eosin and Hematoxylin)
- Immunohistochemistry
- Fluorescent microscopy
- Western Blot
- ELISA
- Evans Blue assay for assessing vascular permeability

Data processing

- Microsoft Office
- Image J, Image Lab, Acrobat Photoshop, Ink Scape
- Statistical analysis (SPSS, GraphPad Prism)

Other interests

Saltwater fishing: a) Spearfishing and b) Shore fishing (techniques: Surfcasting, Spinning, Shore jigging)

Παράρτημα Β: Δημοσιεύσεις



The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and dual ABHD6/MAGL enzyme inhibitors display neuroprotective and anti-inflammatory actions in the *in vivo* retinal model of AMPA excitotoxicity

Despina Kokona^{a,1,2,**}, Dimitris Spyridakos^{a,1}, Manolis Tzatzarakis^b, Sofia Papadogkonaki^a, Eirini Filidou^c, Konstantinos I. Arvanitidis^c, George Kolios^c, Manjunath Lamani^d, Alexandros Makriyannis^d, Michael S. Malamas^d, Kyriaki Thermos^{a,*}

^a Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, 71003, Greece

^b Department of Toxicology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, 71003, Greece

^c Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, 68100, Greece

^d Center for Drug Discovery and Departments of Chemistry and Chemical Biology and Pharmaceutical Sciences, Northeastern University, Boston, MA, 02115, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

2-Arachidonoylglycerol
ABHD6
MAGL
CB1/CB2 cannabinoid receptors
PI3K/Akt
Retina
Neuroprotection
Neuroinflammation
Microglia

ABSTRACT

The endocannabinoid system has been shown to be a putative therapeutic target for retinal disease. Here, we aimed to investigate the ability of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and novel inhibitors of its metabolic enzymes, α/β -hydrolase domain-containing 6 (ABHD6) and monoacylglycerol lipase (MAGL), a) to protect the retina against excitotoxicity and b) the mechanisms involved in the neuroprotection. Sprague-Dawley rats, wild type and Akt2^{-/-} C57BL/6 mice were intravitreally administered with phosphate-buffered saline or (RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide (AMPA). 2-AG was intravitreally co-administered with AMPA in the absence and presence of AM251 or AM630 (cannabinoid 1 and 2 receptor antagonists, respectively) or Wortmannin [Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt inhibitor]. Inhibitors of ABHD6 and dual ABHD6/MAGL (AM12100 and AM11920, respectively) were co-administered with AMPA intravitreally in rats. Immunohistochemistry was performed using antibodies raised against retinal neuronal markers (bNOS), microglia (Iba1) and macroglia (GFAP). TUNEL assay and real-time PCR were also employed. The CB2 receptor was expressed in rat retina (approx. 62% of CB1 expression). 2-AG attenuated the AMPA-induced increase in TUNEL⁺ cells. 2-AG activation of both CB1 and CB2 receptors and the PI3K/Akt downstream signaling pathway, as substantiated by the use of Akt2^{-/-} mice, afforded neuroprotection against AMPA excitotoxicity. AM12100 and AM11920 attenuated the AMPA-induced glia activation and produced a dose-dependent partial neuroprotection, with the dual inhibitor AM11920 being more efficacious. These results show that 2-AG has the pharmacological profile of a putative therapeutic for retinal diseases characterized by neurodegeneration and neuroinflammation, when administered exogenously or by the inhibition of its metabolic enzymes.

1. Introduction

Retinal ischemia can lead to degeneration of retinal ganglion cells

(RGCs) and amacrine cells (Chidlow and Osborne, 2003; Gastinger et al., 2006) leading to loss of visual acuity and blindness (Osborne et al., 2004, 2016). It is implicated in several retinal diseases including glaucoma and diabetic retinopathy (Mozaffarieh et al., 2008; Toda and

* Corresponding author.

** Corresponding author. Department of Ophthalmology and Department for BioMedical Research, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, 3010 CH, Switzerland.

E-mail addresses: Despina.Kokona@insel.ch (D. Kokona), med2p1080145@med.uoc.gr (D. Spyridakos), tzatzarakis@uoc.gr (M. Tzatzarakis), spapadogkonaki@hotmail.gr (S. Papadogkonaki), efilidou@hotmail.com (E. Filidou), karvanit@med.duth.gr (K.I. Arvanitidis), gkolios@med.duth.gr (G. Kolios), manjubl123@gmail.com (M. Lamani), a.makriyannis@northeastern.edu (A. Makriyannis), m.malamas@northeastern.edu (M.S. Malamas), thermos@uoc.gr (K. Thermos).

¹ Equal first authors.

² Present address: Department of Ophthalmology and Department for BioMedical Research, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, 3010, CH.

Abbreviations

ABHD6	α/β -hydrolase domain-containing 6	IPL	inner plexiform layer
2-AG	2-arachidonoylglycerol	I/R	ischemia/reperfusion
AEA	anandamide N-arachidonylethanolamine	MGL	monoacylglycerol lipase
AMD	age-related macular degeneration	MEK	Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase
AMPA	(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide	meth-anandamide (methAEA)	
bNOS	Brain Nitric Oxide Synthetase	NMDA	N-methyl-D-aspartate
CB1/2	cannabinoid receptor 1/2	ONL	outer nuclear layer
CTRL	control	PBS	phosphate-buffered saline
ERK	extracellular-regulated kinase	PFA	paraformaldehyde
GCL	ganglion cell layer	PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
GFAP	glial fibrillary acidic protein	RGCs	retinal ganglion cells
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule 1	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
INL	inner nuclear layer	WT	wild type
		Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol

Nakanishi-Toda, 2007). Several rodent models of retinal ischemia have been employed for the investigation of retinal neurodegeneration and its underlying mechanisms.

A reduction in the thickness of the ganglion cell layer (GCL) and inner nuclear layer (INL) was reported in the ischemia reperfusion model (I/R). This was accompanied by an increase of apoptosis and glia activation, amacrine cell and RGCs loss, and decrease in alpha-wave and beta-wave amplitudes in ischemic rat retinas, 21 days after the ischemic insult (Schmid et al., 2014).

Glutamate excitotoxicity has been implicated in CNS disease in the early seventies (Olney et al., 1971) Excitatory amino acids, such as N-methyl-D-aspartate (NMDA) and AMPA, mimic the actions of glutamate due to their high affinity for the ionotropic glutamate receptors. Ischemia induced release of glutamate was shown to lead to retinal ganglion cell (RGC) death. This phenomenon was shown to be mediated by the activation of NMDA ionotropic receptors, which are located in RGCs, and the subsequent increase in calcium ion (Ca^{++}) levels that induce a cascade of events leading to cell death (NMDA excitotoxicity, Osborne et al., 2004).

The toxic effects of the excitatory amino acid AMPA in the retina were first reported in the 1990's (Ferreira et al., 1998). Some years later, Andres et al. (2003) showed that intraocular injections of AMPA in rats led to neuronal cell loss and activation of Müller and microglia cells in the retina. We have employed a murine model of AMPA-induced excitotoxicity and showed that a single intravitreal injection of the excitatory amino acid AMPA leads to a decrease of retinal amacrine and horizontal cell viability, reduced retinal thickness and increased apoptosis (Kiagiadaki and Thermos, 2008; Kokona et al., 2012). These findings suggested that this model may be useful in the study of the early events of retinal ischemia. In addition, we have reported previously that cannabinoids via activation of the CB1 receptor (CB1R) and subsequent downstream signaling pathways (PI3K/Akt and MEK/ERK) protected the retina from AMPA excitotoxicity (Kokona et al., 2015). Most recently, we showed that NADPH oxidases (NOX) are involved in the AMPA induced retinal neurodegeneration and the activation of microglia (Dionysopoulou et al., 2020). In addition, Spyridakos et al. (2021) showed that the synthetic CB1/CB2R agonist WIN55,212-2 reversed the AMPA induced increase in reactive microglia via its activation of the CB2R, localized in reactive microglia. Therefore, 2-AG also a CB1/CB2R agonist may afford neuroprotection via the mechanisms mentioned above.

2-Arachidonoylglycerol (2-AG) and N-arachidonylethanolamine (anandamide, AEA) are the two most well-studied cannabinoids of the endocannabinoid system (ECS). Both are synthesized in the retina on demand. 2-AG was initially identified in bovine retinal tissue (1.63 ± 0.31 nmol/g; Bisogno et al., 1999) and in rat retina (3 nmol/g of tissue;

Straiker et al., 1999). It is the most abundant endogenous cannabinoid (2-AG; nmol/g vs. anandamide; picomol/g) and a full agonist for both CB1 and CB2 receptors (Sugiura et al., 2006).

Endocannabinoid (2-AG and AEA) levels have been investigated in normal human eyes and ocular tissues from patients with glaucoma, diabetic retinopathy or age-related macular degeneration (AMD). The results from these studies revealed that endocannabinoids act differentially in different ocular diseases (Chen et al., 2005; Matias et al., 2006).

Endocannabinoid synthesis [2-AG; Diacyl glycerol lipase (DAGL, Bisogno et al., 2003) and AEA; N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine (NAPE; Devane et al., 1992)] and metabolic enzymes, monoacylglycerol lipase (MAGL), α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6), α/β -hydrolase domain containing 12 (ABHD12) and fatty acid amide hydrolase (FAAH), respectively, are also members of the ECS. Inhibitors of these enzymes increase the endocannabinoid levels and are believed to be important therapeutics in retinal disease.

The three serine hydrolase enzymes are responsible for the metabolism of 2-AG (Savinainen et al., 2012). MAGL is responsible for approximately 85% of the hydrolysis of 2-AG to glycerol and arachidonic acid (Blankman et al., 2007; Dihm et al., 2002), whereas ABHD6 and ABHD12 are responsible for approximately 15% of 2-AG hydrolysis (Blankman et al., 2007). Studies in brain have shown that inhibition of MAGL (Pan et al., 2009) and ABHD6 (Marrs et al., 2010) controls the accumulation of 2-AG and its physiological properties via the activation of the cannabinoid receptors. Recent reports have shown that the third metabolic enzyme ABHD12 has a functional role in the eye, but it is rather an undruggable target, since mutations of the ABHD12 gene cause degenerative side-effects (PHARC disease) marked by polyneuropathy, hearing loss, ataxia, retinitis pigmentosa, and cataract formation (Fischerstrand et al., 2010).

Immunohistochemical studies have detected MAGL immunoreactivity in mouse retina, with the most intense staining observed in IPL, while its presence was also confirmed in GCL and at photoreceptor terminals in OPL (Shu-Jung Hu et al., 2010). These data are in agreement with the study of Bouskila et al. (2016), in which it was shown that MAGL is also present in the nerve fiber layer (NFL). In rat retina, Cecyre et al. (2014) showed that MAGL expression is limited to Müller, amacrine and some types of bipolar cells. ABHD6 expression has only been examined in mouse retina, where it was shown to be present in IPL, INL and GCL, at the dendrites of ganglion or displaced amacrine cells (Shu-Jung Hu et al., 2010).

The neuroprotective properties of endocannabinoids have been well studied both in brain (Gowran et al., 2010) and in retinal neurodegenerative diseases (Rapino et al., 2018). A recent study showed that 2-AG via CB1 receptor activation protects against non-caspase-dependent apoptosis which is mediated by the apoptosis-inducing factor (AIF), in

mice hippocampal neurons following MCAO (Zhong et al., 2019). The use of inhibitors of endocannabinoid metabolic enzymes is a promising strategy for the development of new therapeutics for the treatment of neurodegeneration. A plethora of studies in brain have shown the neuroprotective properties of MAGL inhibitors, using animal models of Alzheimer's disease (Chen et al., 2012; Zhang and Chen, 2017), Parkinson's disease (Fernandez-Suarez et al., 2014), amyotrophic lateral sclerosis (Pasquarelli et al., 2017) and ischemia/excitotoxicity (Choi et al., 2018; Carloni et al., 2012). Inhibition of MAGL appears to mimic the anti-inflammatory actions of cannabinoids (Nomura et al., 2011; Rahmani et al., 2018; Kerr et al., 2013). However, chronic treatment with the MAGL inhibitor JZL184 led to behavioral (analgesia) tolerance, due to increased 2-AG levels and induction of CB1 receptor down-regulation (Schlosburg et al., 2010). Neuroprotective and anti-inflammatory actions have been reported for ABHD6 inhibitors, but no tolerance of the CB1 receptor was observed (Tchantchou and Zhang, 2013).

We have previously reported that exogenously applied AEA and synthetic cannabinoids protected retinal amacrine and horizontal cells against AMPA excitotoxicity via activation of the CB1 receptor and the downstream signaling pathways PI3K/Akt and MEK/ERK (Kokona and Thermos, 2015). These results are in agreement with previous studies that showed Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), meth-anandamide (methAEA)/R(+)-WIN55,212-2 and HU210 to afford retinal neuroprotection in models of NMDA excitotoxicity (El-Remessy et al., 2003), ischemia reperfusion (Nucci et al., 2007; Pinar-Sueiro et al., 2013) and retinitis pigmentosa (Lax et al., 2014), respectively. Δ^9 -THC has been shown to effectively reduce the intraocular pressure in humans (Hepler and Frank, 1971) and more recently 2-AG and MAGL blocker KML29 were described to have a similar action in mice (Miller et al., 2016).

In the present study, we investigated the ability of the endocannabinoid 2-AG to protect the retina against AMPA excitotoxicity when administered exogenously and the mechanisms involved in the neuroprotection. In addition, we examined the pharmacological effects of novel inhibitors of the metabolic enzyme ABHD6 (AM12100). To fully harness the 2-AG effect we targeted a dual ABHD6/MAGL inhibitor (AM11920) in the same model. Our findings show that 2-AG, as well as the dual ABHD6/MAGL inhibitor AM11920, afforded neuroprotection against AMPA-induced retinal cell death and reduced the activation of micro and macroglia via CB1 and CB2 receptor activation. ABHD6 inhibitor AM12100 was found to be less efficacious in this model.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

AMPA was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and 2-AG and AM251 from Cayman (Michigan, USA), wortmannin from Sigma-Aldrich (Tanfkirchen, Germany). AM12100 and AM11920 were designed and synthesized at the Center for Drug Discovery, Northeastern University (Boston, USA). AMPA was first dissolved in water for injection (w.f.i) and then in phosphate-buffer saline (PBS), 50 mM (K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.9% NaCl, pH 7.4). 2-AG was dissolved in 100% ethanol. AM12100 and AM11920 were dissolved in DMSO.

2.2. Biochemical evaluation of inhibitors AM12100 and AM11920

Both compounds were assessed in fluorescence-based assays using: (1) full-length hABHD6 with the fluorogenic substrate arachidonoyl, 7-hydroxy-6-methoxy-4-methylcoumarin ester (AHMMCE) (Shields et al., 2019); (2) recombinant human MAGL (hMAGL) and purified rat MAGL (rMGL) using the fluorogenic substrate arachidonoyl, 7-hydroxy-6-methoxy-4-methylcoumarin ester (AHMMCE), (Zvonok et al., 2008); (3) purified rat FAAH (rFAAH) (Patricelli et al., 1998), using the fluorogenic substrate arachidonoyl 7-amino-4-methylcoumarin amide (AAMCA), (Patricelli et al., 1998; Ramarao et al., 2005);

and (4) purified activated hNAAA (West et al., 2012a,b), with N-(4-methyl coumarin) palmitamide (PAMCA) as the substrate (West et al., 2012a).

AM12100 was found to be potent for hABHD6 with a half-maximal inhibitory concentration IC_{50} of 8 ± 0.6 nM, and AM11920 exhibited dual inhibition against $ABHD6$ and $MAGL$ with IC_{50} values of 6.0 ± 0.3 nM (hABHD6), 12.1 ± 2.2 nM (hMAGL) and 28.7 ± 2.7 nM (rMAGL). In selectivity counterscreen assays, AM1200 was found to be inactive against MAGL, while both inhibitors AM12100 and AM11910 were inactive against serine hydrolase fatty acid amide hydrolase (FAAH) and cysteine hydrolase N-acyl ethanolamine acid amidase (NAAA) (Table 1).

2.3. Animals

Ninety-four (94) adult male and female Sprague-Dawley rats (220–300g) and fifteen (15) adult WT and Akt2^{-/-} C57BL/6 mice (22–30 g) (Cho et al., 2001) were used in this study. The animal conditions were as in previous studies (Kiagiadaki and Thermos, 2008). Animal handling was conducted in accordance to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and in compliance with Greek national laws (Animal Act, P.D. 160/91) and the EU Directive for animal experiments (2010/63/EU). All procedures were carried out following reduction and refinement strategies. At the end of the experiment animals were euthanized with CO₂ inhalation.

2.4. Intravitreal injection of AMPA and cannabinoid agents

Intravitreal injections of AMPA (42 nmol per eye; diluted in phosphate-buffer saline, PBS, 50 mM K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.9% NaCl, pH 7.4), were performed according to Kiagiadaki and Thermos (2008). All animals received one injection of vehicle, AMPA and AMPA + treatment. A small oedema is frequently observed after injection. In a few cases, a hematoma is also observed, and in this case the animals are removed from the study. Vehicle (PBS) was injected in the control (CTRL) animals and the neuroprotection group received AMPA + 2-AG (CB1/CB2 agonist; 10^{-8} – 10^{-6} M), AMPA + AM12100 (ABHD6 inhibitor, 10^{-5} – 10^{-3} M) or AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor, 10^{-6} – 10^{-4} M). The CB1 receptor antagonist/inverse agonist AM251 (10^{-6} M) and the PI3K/Akt inhibitor wortmannin (10^{-6} M) were co-injected with AMPA + 2-AG (10^{-7} M). A total of 5 μ l solution was injected into each rat eye (1 μ l/min).

WT and Akt2^{-/-} C57BL/6 mice were intravitreally injected with PBS (50 mM, CTRL) or AMPA (21 nmoles per eye) or AMPA + 2-AG (10^{-7} M). A total of 2 μ l solution was injected into each mouse eye (1 μ l/min). All agent solutions were prepared as previously reported (Kokona and Thermos, 2015).

2.5. Immunohistochemical studies

Twenty-four hours after treatment, eyes from euthanized animals were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer (PFA/PB) for 45 min at 4 °C. The anterior segments of the eye were removed and the posterior part (eyecup) was isolated and fixed in 4% PFA/PB for 1.5 h at 4 °C. Cryoprotection and cryosectioning of the eyecups was performed as previously reported (Kiagiadaki and

Table 1
Biochemical evaluation of inhibitors AM 12110 and AM 11920.

Compound	hABHD6	hMAGL	rMAGL	rFAAH	hNAAA
	IC_{50} nM	IC_{50} nM	IC_{50} nM		
AM12100	8 ± 0.6	inactive ^a	nt ^b	inactive ^a	Inactive ^c
AM11920	6.0 ± 0.3	12.1 ± 2.2	28.7 ± 2.7	inactive ^a	Inactive ^c

^a Inactive at 1 μ M concentration.

^b nt = not tested.

^c Inactive at 10 μ M.

Thermos, 2008).

A polyclonal antibody against brain nitric oxide synthase (bNOS; 1:2000, Sigma-Aldrich (Tanfkirchen, Germany), which stains amacrine cells, was used to assess the neuroprotective properties of the examined cannabinoid agents. The anti-inflammatory actions of 2-AG and inhibitors of its metabolic enzymes ABHD6 and MAGL were also investigated immunohistochemically, by employing a polyclonal antibody against ionized calcium binding molecule 1 (Iba1; 1:2.500, WAKO Chemicals, Osaka), a marker of microglia. A monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a marker of macroglia, was also employed to examine the effect of the selective hydrolase inhibitors on macroglia activation. Cryostat sections were treated with the appropriate primary and secondary Alexa-Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H + L, 1:400; Molecular Probes), CF543 goat anti-rabbit IgG (H + L, 1:1000; Biotium) or CF488A goat anti-mouse IgG (H + L, Biotium, Fremont, CA) antibodies, as previously reported (Kiadaki and Thermos, 2008).

2.6. Investigation of retinal cell death - TUNEL assay

Wild type mouse retinas were used for the enzymatic *in situ* labeling of apoptosis-induced DNA strand breaks (TUNEL assay; Roche). Tissue sections obtained from CTRL, AMPA-treated or AMPA + 2-AG (10^{-7} M)-treated WT mice were used. TUNEL staining was performed according to the instructions of the manufacturer.

2.7. Microscopy

A fluorescence microscope (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany or Leica DMLB, Leica Microsystems, Germany) was used for the examination of stained retinas using a with Plan-Neofluar x40/0.75 lens or an HC PL Fluotar x20/0.50 lens, respectively. Adobe Photoshop (ver. 7.0, San Jose, CA) was used to adjust the light and contrast of the images and to finalize the figures.

2.8. Quantification studies

The quantification studies of the bNOS-expressing retinal cells and the TUNEL staining were performed according to Kokona and Thermos (2015). In order to quantify Iba1 positive cells, two photographs were taken from 3 slices (2 photographs/slice) of each retina near the optic nerve head. Iba1 positive cells were divided according to their morphology as reactive microglia/macrophages (amoeboid morphology) and resting microglia/macrophages (ramified morphology). The number of reactive microglial cells was manually counted in the inner retina for each photograph and normalized to the total counting area (expressed as μm^2), which was measured using ImageJ 1.44 software. The data of the 2-AG experiment were expressed as the percentage of the microglia/macrophage compared to the AMPA treated retinas (100%). The metabolic enzyme inhibitors data were expressed as the percentage of the microglia/macrophage compared to control (CTRL) retinas (100%). GFAP immunoreactivity (GFAP-IR) quantification: Images were cropped using Adobe Photoshop (ver. 7.0, San Jose, CA). The mean gray value of each photograph was estimated using ImageJ 1.44 software. Data were expressed as percent of CTRL.

2.9. Western blot analysis

Animals were euthanized, the retinas were removed and processed for western blot analysis (Kokona and Thermos, 2015). Rabbit monoclonal antibodies raised against phospho-Akt (Cell Signaling, 1:2000) and total-Akt (Cell Signaling, 1:1000) were employed. A rabbit polyclonal antibody raised against GAPDH (Cell Signaling, 1:1000) was used to normalize the protein content. Visualization and quantification of protein levels was performed according to Kokona and Thermos (2015).

2.10. Total RNA extraction, purification and cDNA synthesis

Rat retinas were homogenized and 1 ml of TRIzol and 200 μl of chloroform were added to each sample followed by centrifugation. RNA was precipitated with addition of isopropanol to the aqueous phase and total RNA was washed with 75% ethanol and-diluted in RNase free H_2O .

2.11. Real-time PCR

The KAPATaq™ PCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, Inc. Wilmington, MA, USA) was employed according to the manufacturer's instructions for detection of cannabinoid receptors mRNA levels with real-time PCR. GAPDH was used as an internal control to which the relative expression of CB1 and CB2 mRNA was normalized. The amplification profile included 10 min of denaturation at 95 °C, 20 min of annealing and extension at 60 °C and 30 min of data acquisition at 72 °C. The $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used for the analysis of the real-time PCR data. The sequences of the primers used are indicated in Table 2.

2.12. Statistical analysis

Immunohistochemical quantification and real-time PCR data were expressed as percentage of control (100%) or AMPA (100%). The data of western blot and TUNEL studies were expressed as absolute numbers. GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) software was used for the analysis of the data. One-way or two-way ANOVA followed by the Tukey posthoc analysis test was applied. Student's two tailed unpaired *t*-test was employed to assess differences between two groups. The data were plotted as the mean \pm S.E.M (Standard Error of the Mean) of all values in the different groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$, [$*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$].

2.13. Determination of 2-AG levels

Rat retinas (2 retinas per sample) were isolated in freshly prepared chloroform-methanol-Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) solution, 2:1:1, v/v, were vortex-mixed and sonicated for 15 min using a Branson 3510 ultrasonic bath. After extraction with chloroform, the samples were centrifuged at 4000 \times g for 1 min at room temperature, the organic phase was transferred into clean eppendorf tubes and the aqueous phase was extracted for two more times with addition of chloroform followed by centrifugation. The organic phases from the three extractions were pooled and centrifuged at 14000 rpm for 4 min at room temperature. The supernatant was transferred into clean glass tubes, the extracts were dried under a nitrogen stream and resolubilized in 50 μl of methanol.

A liquid chromatography-mass spectrometry system (LC/MS) was used for the analysis of 2-AG. The system consisted of a binary LC pump (Shimadzu Prominence LC), a vacuum degasser, an autosampler and a column oven. A solvent mixture of methanol-water-formic acid (85-15-0.2 v/v) was selected as the mobile phase with a flow rate of 0.5 mL/min. Methanol (LC/MS grade) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ultrapure water was obtained by a Direct-Q 3UV water purification system (Merck, Germany). Formic acid (98–100%) was purchased by Riedel-de Haen. Separation of the analyte was achieved on

Table 2
Primers employed for the real time PCR studies.

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
GapdH F	GGTCGGTGTGAACGGATTTG	Aravindan et al. (2006)
GapdH R	GTGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	
CB1 F	CATCATCATCCACACGTCAG	Porcella et al. (1998)
CB1 R	ATGCTGTTGTCTAGAGGCTG	
CB2 F	TTTCCCACTGATCCCTAACG	Porcella et al. (1998)
CB2 R	AGTTAACAGGCACAGCATG	

F: Forward, R: Reverse.

a Gracesmart (Grace) RP HPLC column (250 × 4.6 mm, 5 μm) held at 30°C. Under the described conditions 2-AG eluted at 11.11 min.

A mass spectrometer (LC/MS-2010 EV Shimadzu), coupled with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface and a single quadrupole mass filter, was used to detect and quantify 2-AG in the selected ion monitoring (SIM) mode, with ions m/z 379.35, 361.4. The interface, CDL and heat block temperatures were 400°C, 200°C and 200°C, respectively. The detector voltage was 1.5 kV, the nebulizing gas flow was 2.5 L/min and the drying gas was set at 0.02 MPa.

Stock solution of 2-AG, at a concentration of 10^{-6} M, was prepared in methanol. Further dilutions of the stock solutions were performed for the preparation of the working solutions at concentrations of 0, 10, 25, 50, 100, 250 and 500 ng/ml.

3. Results

3.1. Effect of 2-AG in the AMPA model of rat retinal excitotoxicity – involvement of CB1 receptor

Intravitreal injection of AMPA in the rat retina caused rapid attenuation of bNOS-immunoreactive amacrine cells in the INL and GCL [Fig. 1A, almost 75% reduction compared to CTRL], as previously reported (Kiagiadaki and Thermos, 2008). 2-AG, co-injected with AMPA, afforded restoration of bNOS immunoreactivity in a dose-dependent manner (Fig. 1A and B).

One-way ANOVA analysis revealed a statistically significant difference among the three experimental groups, namely CTRL, AMPA and AMPA+2-AG treated retinas [F(4,21) = 19.73; $p < 0.0001$] (Fig. 1B). A statistically significant decrease of bNOS-expressing amacrine cells in AMPA treated retinas was observed ($n = 9$, 19.7 ± 10.6 cells per retinal

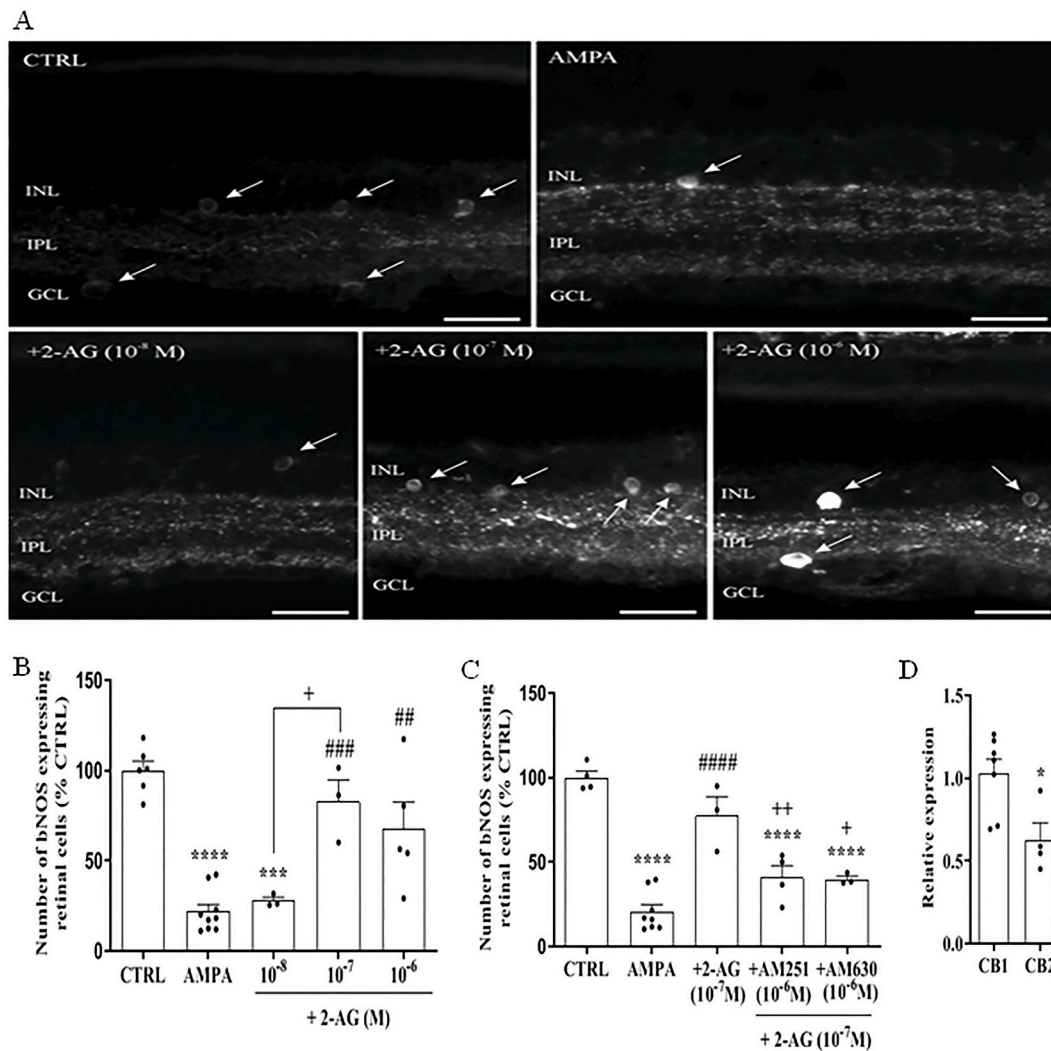


Fig. 1. Effect of 2-AG against AMPA excitotoxicity in rat retina: Involvement of CB1 receptor. **A.** bNOS immunoreactivity (IR) in PBS (CTRL), AMPA and AMPA+2-AG (10^{-8} M, 10^{-7} M, and 10^{-6} M) treated retinas. **B.** Quantification studies. AMPA ($n = 5$) attenuated the number of bNOS-expressing amacrine cells almost 75%, compared to CTRL ($n = 5$, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL), while 2-AG protected the retina from AMPA excitotoxicity in a dose dependent manner [(10^{-8} M: $n = 3$, $p = 0.9887$ compared to AMPA, *** $p = 0.0002$ compared to CTRL) (10^{-7} M: $n = 3$, ### $p = 0.0006$, compared to AMPA, $p = 0.6855$ compared to CTRL, + $p = 0.0125$ compared to 10^{-8} M) (10^{-6} M: $n = 5$, ## $p = 0.0021$, compared to AMPA, $p = 0.612$ compared to CTRL)]. **C.** Effect of CB1 and CB2 receptor antagonism on 2-AG-induced neuroprotection. Quantification studies of bNOS immunoreactive cells in rat retinas treated with PBS (CTRL, $n = 5$), AMPA ($n = 5$), AMPA+2-AG (10^{-7} M) ($n = 3$) or AMPA+2-AG (10^{-7} M)+AM251 (10^{-6} M) ($n = 3$) or AMPA+2-AG + AM630 (10^{-6} M) ($n = 3$). The CB1 antagonist/inverse agonist AM251 and the CB2 antagonist AM630 reduced the neuroprotective actions of 2-AG on bNOS immunoreactive cells in the rat retina [(AM251: ++ $p = 0.0086$ compared to AMPA+2-AG, $p = 0.0937$, compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL) (AM630: + $p = 0.0118$ compared to AMPA+2-AG, $p = 0.1826$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL)]. **D.** Real-time PCR mRNA levels of CB1 and CB2 receptors in retina. CB1 mRNA levels shown to be 1.6 fold higher than CB2 mRNA levels (* $p = 0.0203$ compared to CB1). INL, inner nuclear layer, IPL, inner plexiform layer, GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 20 μm.

section, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL). 2-AG co-injected with AMPA restored the number of bNOS-expressing amacrine cells at the doses of 10^{-7} M ($n = 3$, 75 ± 11 cells per retinal section, ### $p = 0.0006$ compared to AMPA, $p = 0.6855$ compared to CTRL) and 10^{-6} M ($n = 5$, 61 ± 13 cells per retinal section, ## $p = 0.0021$ compared to AMPA, $p = 0.0612$ compared to CTRL), reaching almost 77% and 60% of CTRL ($n = 5$, 90.2 ± 11.5 cells per retinal section), respectively. 2-AG (10^{-8} M) had no effect [$n = 3$, 25 ± 2 cells per retinal section, $p = 0.9887$ compared to AMPA, *** $p = 0.0002$ compared to CTRL, + $p = 0.0125$ compared to 10^{-7} M].

A statistically significant difference among retinas that were treated with CB1 or CB2 receptor antagonists compared to those treated with 2-AG was observed [$F(4,17) = 33.10$; $p < 0.0001$] (Fig. 1C). Co-injection of the CB1 antagonist/inverse agonist AM251 (10^{-6} M) and CB2 antagonist AM630 (10^{-6} M) with AMPA+2-AG (10^{-7} M) in rat retina led to an attenuation of bNOS immunoreactivity compared to the 2-AG treated retinas [Fig. 1C; AMPA+2-AG + AM251 ($n = 3$): 39.5 ± 13.5 cells per retinal section, ++ $p = 0.0086$ compared to AMPA+2-AG, $p = 0.0937$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL; AMPA+2-AG + AM630 ($n = 3$): 37.4 ± 3.1 cells per retinal section, + $p = 0.0118$ compared to AMPA+2-AG, $p = 0.1826$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL].

3.2. Real-time PCR

Real-time PCR studies showed that CB2 mRNA levels ($n=5$) correspond to approx. 62% (CB1, 1.126 ± 0.042 ; CB2, 0.699 ± 0.117 , relative expression normalized to GAPDH) of the total CB1 mRNA levels ($n = 5$). Two-tailed unpaired *t*-test showed a statistically significant difference between CB1 and CB2 receptor levels in rat retina [$t(9) = 2.811$, $p = 0.0203$] (Fig. 1D).

3.3. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the neuroprotective actions of 2-AG

To examine the involvement of the PI3K/Akt signaling pathway in the prosurvival and neuroprotective actions of cannabinoids in our model; initial experiments were designed to examine the effect of wortmannin on the neuroprotective actions of 2-AG. One-way ANOVA analysis showed a statistically significant effect between experimental groups [$F(3,11) = 106.9$; $p < 0.0001$] (Fig. 2A). Co-injection of wortmannin (10^{-6} M) with AMPA+2-AG (10^{-7} M) in the rat retina reversed the 2-AG actions [Fig. 2A; ++ $p = 0.0016$ compared to AMPA+2-AG, $p = 0.3355$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL; CTRL ($n = 4$): 83.62 ± 4 cells per retinal section; AMPA ($n = 3$): 18.13 ± 2.8 cells per retinal section; AMPA+2-AG ($n = 5$): 52.56 ± 7.5 cells per retinal section; AMPA+2-AG + Wortmannin ($n = 3$): 20 ± 0.5 cells per

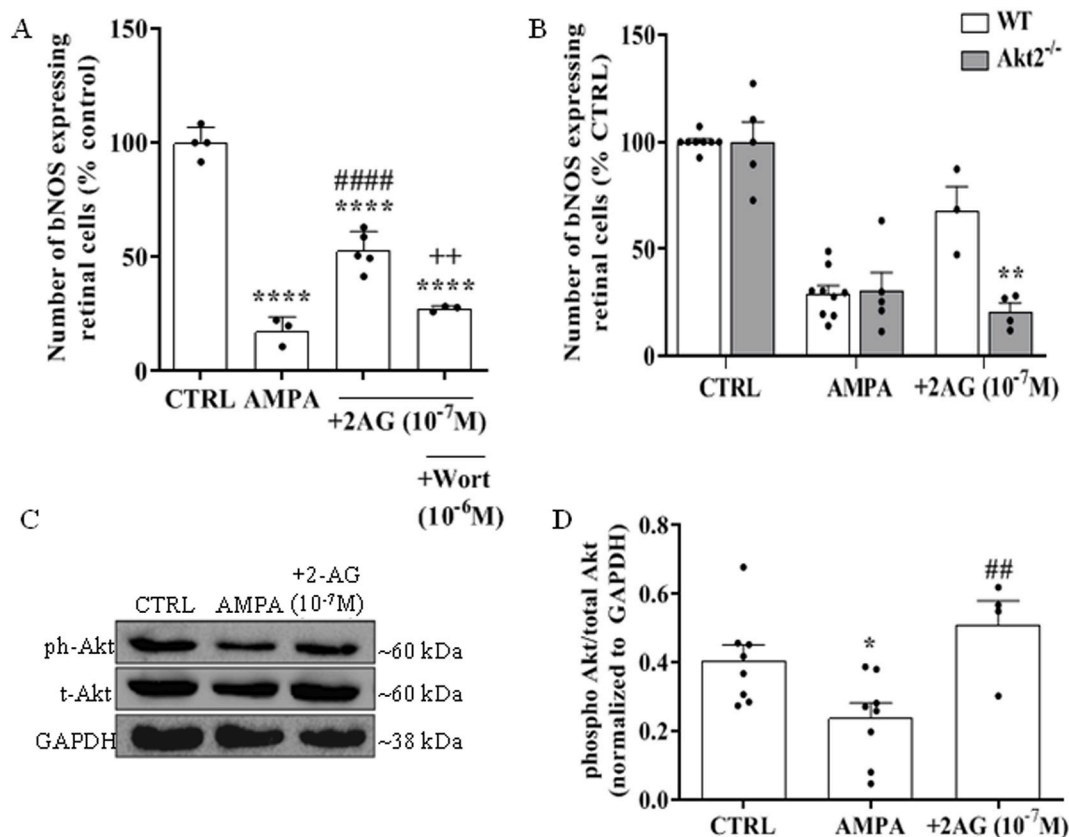


Fig. 2. Involvement of the PI3K/Akt pathway in the 2-AG-induced neuroprotection. **A.** Quantification studies of bNOS-IR in retinas injected with PBS (CTRL, $n = 4$), AMPA ($n = 3$, *** $p < 0.001$ compared to CTRL), AMPA + 2-AG (10^{-7} M, $n = 3$; **** $p < 0.0001$ compared to CTRL; #### $p < 0.0001$ compared to AMPA) or AMPA+2-AG (10^{-7} M) + the PI3K/Akt inhibitor Wortmannin (10^{-6} M, $n = 3$). Wortmannin reduced the neuroprotection afforded by 2-AG (++ $p = 0.0016$ compared to AMPA+2-AG, $p = 0.3355$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL). **B.** Effect of 2-AG (10^{-7} M) on AMPA excitotoxicity in retinas of WT and Akt2^{-/-} mice. No significant difference was observed in the number of bNOS-expressing retinal cells between CTRL WT and Akt2^{-/-} mice ($n = 6$ and 5 , respectively), or between AMPA treated WT and Akt2^{-/-} mice ($n = 6$ and 5 , respectively). 2-AG, co-injected with AMPA, afforded neuroprotection at the dose of 10^{-7} M in WT mice, while it had no effect in Akt2^{-/-} mice ($n = 4$ and 4 , respectively, ** $p = 0.0016$ compared to WT AMPA+2-AG). **C.** Comparison of Akt kinase activation between CTRL, AMPA and AMPA+2-AG (10^{-7} M) Representative western blot. **D.** Quantification of Western blot analysis. The ratio of phosphorylated/total Akt was statistically significant different between CTRL ($n = 8$) and AMPA treated ($n = 8$) tissues (* $p = 0.044$ compared to CTRL) and between AMPA- and AMPA+2-AG treated ($n = 4$) tissues (## $p = 0.0093$ compared to AMPA, $p = 0.4117$ compared to CTRL). GAPDH was used to normalize protein content.

retinal section].

Akt2^{-/-} mice were subsequently employed to further assess the involvement of the PI3/Akt signaling pathway in the neuroprotective actions of 2-AG. WT and Akt2^{-/-} mice were injected intravitreally with PBS, AMPA (21 nmol/eye) or AMPA+2-AG (10⁻⁷ M). One-way ANOVA revealed a significant difference among the different experimental groups [F(5,28) = 41.99; p < 0.0001] (Fig. 2B). Statistically significant differences were observed between WT and PBS treated Akt2^{-/-} mice [Fig. 2B; n = 6, 12.8 ± 1.7 cells per retinal section and n = 5, 15.9 ± 2.9 cells per retinal section, respectively] or AMPA treated retinas [n = 6, 3.3 ± 0.6 cells per retinal section and n = 5, 5.0 ± 1.0 cells per retinal section, respectively]. 2-AG did not protect the retinas of Akt2^{-/-} mice from the AMPA insult (Fig. 4B; n = 4, 4.6 ± 0.9 cells per retinal section; **p = 0.0016 compared to WT AMPA+2-AG).

Western blot analysis with antibodies targeting the phosphorylated and total Akt was also performed. One-way ANOVA revealed a significant difference among the three different experimental groups [F(2,17) = 6.561; p = 0.0077], while Tukey's posthoc analysis showed a reduced ratio of phosphorylated/total Akt in the AMPA group (n = 8) [Fig. 2C and D; *p = 0.044 compared to CTRL (n = 8)] and elevated ratio in the AMPA+2-AG-treated tissues (n = 4) (Fig. 2C and D; ##p = 0.0093 compared to AMPA, p = 0.4117 compared to CTRL).

3.4. Effect of 2-AG on AMPA-induced retinal cell death in WT mice - TUNEL staining

We have previously shown that cannabinoid receptor agonists HU-210 and AEA (10⁻⁷ M) reduced the TUNEL⁺ cells in the AMPA treated rat retina (Kokona and Thermos, 2015). Due to the above-mentioned

studies using Akt2^{-/-} mice, we examined the effect of 2-AG on TUNEL⁺ cells in WT mouse retina (Fig. 3A). TUNEL⁺ cells were detected in the inner and outer nuclear layer, as well as the ganglion cell layer. One-way ANOVA showed a statistically significant effect of the treatment in the number of TUNEL⁺ cells [F(2,7) = 30.94; p = 0.0003] (Fig. 3B). Increased TUNEL staining was observed in the AMPA-treated tissues compared to CTRL tissues, while 2-AG reduced the TUNEL⁺ cells. In the AMPA-treated tissues the TUNEL positive cell number (n = 3, 46.5 ± 1.9 cells per 100 μm; ***p = 0.0003 compared to CTRL) was approximately 23-times higher than in control tissues (Fig. 3B; n = 3, 2.0 ± 1.8 cells per 100 μm). 2-AG (n = 4, 28.6 ± 5.0 cells per 100 μm; #p = 0.0287 compared to AMPA, **p = 0.0039 compared to CTRL) attenuated retinal cell death to almost 60%. Quantification of the TUNEL staining in the three layers was also performed (Fig. 3C). Two-way ANOVA, followed by Tukey's posthoc analysis revealed a statistically significant difference among treatments [F(2,21) = 24.57; p < 0.0001] (Fig. 3C). The TUNEL⁺ cells were increased in a statistically significant manner in the ONL (0.83 ± 0.42 and 16.33 ± 4.35 cells per 100 μm for CTRL and AMPA, respectively; **p < 0.001 compared to CTRL) and the INL (0.58 ± 0.38 and 20.28 ± 2.56 cells per 100 μm for CTRL and AMPA, respectively; ****p < 0.0001 compared to CTRL), but not in the GCL (0.48 ± 0.33 and 9.35 ± 1.97 cells per 100 μm for CTRL and AMPA, respectively; p = 0.0687 compared to CTRL) of the AMPA-treated tissues. 2-AG provided neuroprotection as indicated by the reduced number of the TUNEL stained cells in the INL (12.03 ± 2.07 cells per 100 μm; #p = 0.0420 compared to AMPA, *p < 0.0102 compared to CTRL), but not the GCL (5.52 ± 1.16 cells per 100 μm; p = 0.5114 compared to AMPA) or ONL (10.55 ± 3.87 cells per 100 μm; p = 0.2324 compared to AMPA, *p = 0.0256 compared to CTRL).

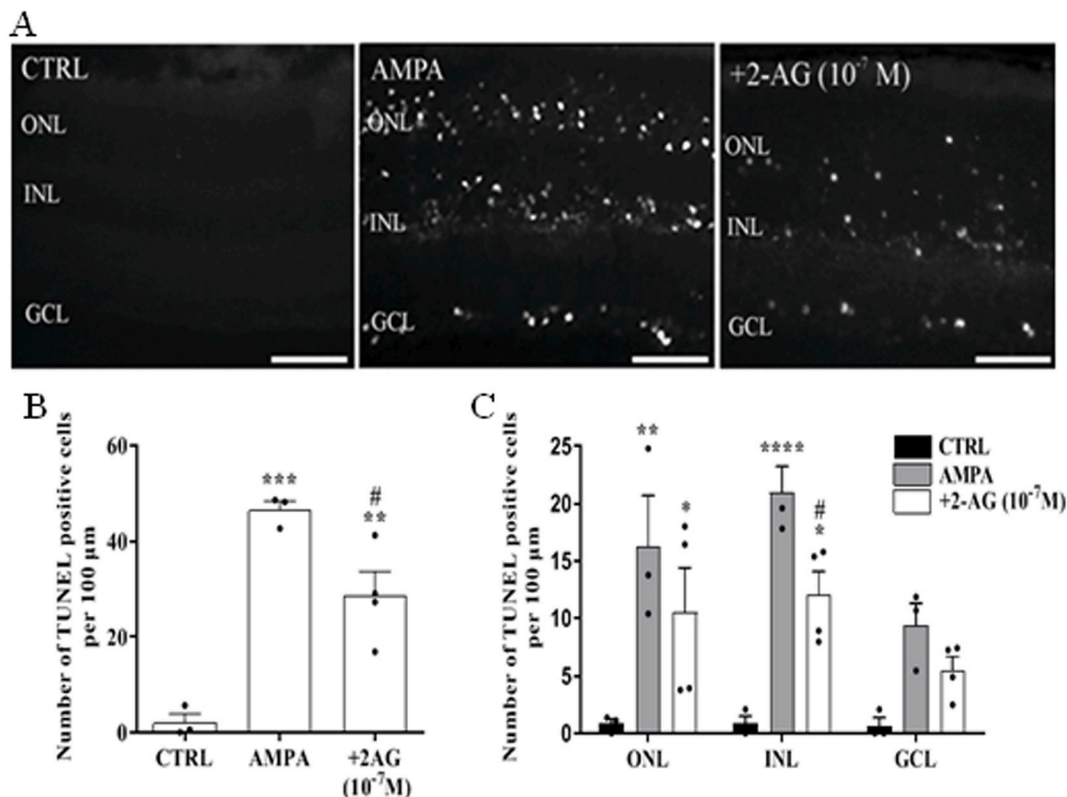


Fig. 3. Effect of 2-AG on AMPA-induced cell death. **A.** Photomicrographs of TUNEL-staining in WT mouse retina. Staining is observed in three retinal layers, outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL), and ganglion cell layer (GCL). Scale bar: 20 μm. **B.** Quantification studies in the whole retinal tissue. AMPA (n = 3) induced retinal cell death compared to CTRL (n = 3, ***p = 0.0003 compared to CTRL), whereas 2-AG 10⁻⁷ M (n = 4) afforded neuroprotection (*p = 0.0287 compared to AMPA, **p = 0.0039 compared to CTRL). **C.** Quantification studies in the different retinal layers. A statistically significant increase in TUNEL staining was observed in the ONL and INL of the AMPA treated retinas (**p = 0.001, ****p < 0.0001 compared to CTRL, respectively). 2-AG afforded neuroprotection by decreasing the TUNEL positive cells in the INL (#p = 0.0420 compared to AMPA, *p = 0.0102 compared to CTRL), while no significant difference was observed in the ONL or GCL TUNEL staining between AMPA and AMPA+2-AG –treated retinas.

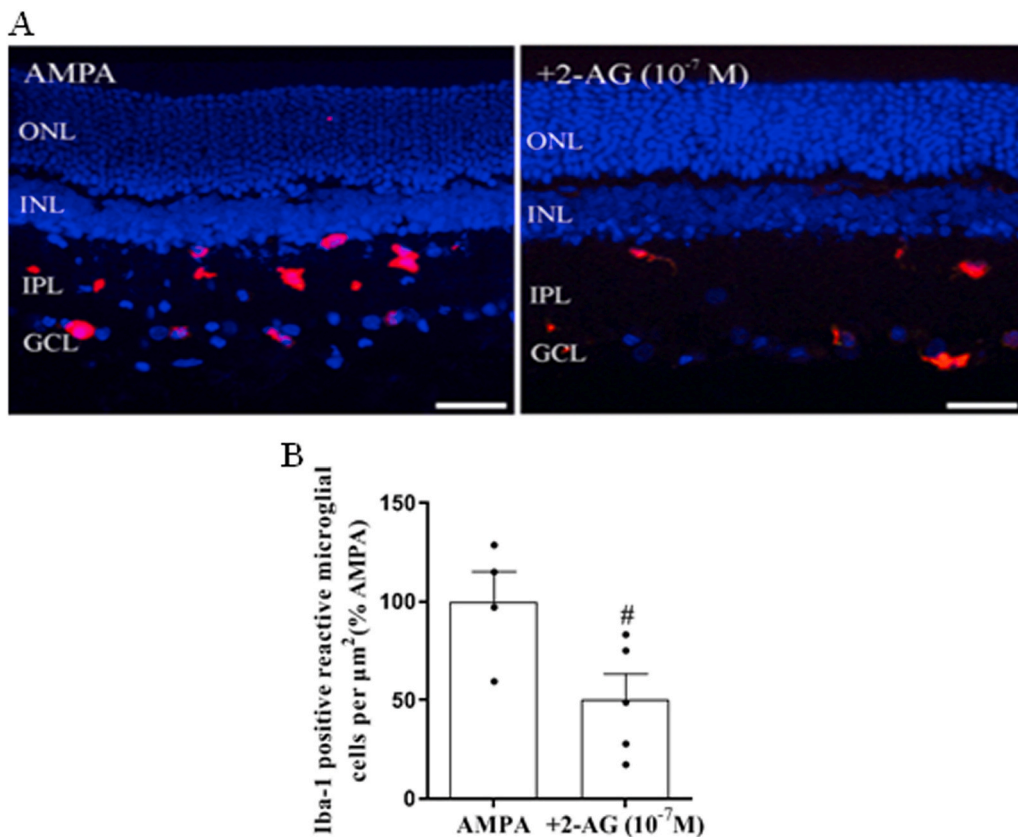


Fig. 4. Effect of AMPA in the presence or absence of 2-AG on microglia/macrophages activation in the rat retina. **A.** Representative photomicrographs of Iba1. Reactive Iba1 positive cells are found in both the AMPA and the AMPA+2-AG (10^{-7} M) treated groups. ONL, outer nuclear layer, INL, inner nuclear layer, IPL, inner plexiform layer, GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 50 μ m. **B.** Quantification of reactive Iba1 positive cells. 2-AG reduced the number of reactive Iba-1 positive cells in the rat retina ($n = 4$ and $n = 5$ for AMPA and AMPA+2-AG (10^{-7} M), respectively, $\#p = 0.0394$ compared to AMPA).

3.5. Activation of microglia/macrophage is reduced in the presence of 2-AG

The effect of 2-AG on microglia/macrophages activation was also examined. Retinas of AMPA and AMPA+2-AG (10^{-7} M) treated mice were stained with the microglia/macrophage marker Iba-1 (Fig. 4). In both AMPA ($n=4$) and AMPA+2-AG (10^{-7} M)-treated retinas ($n = 6$) Iba-1 positive cells had an amoebic/round cytosol and retracted processes, signs of cell activation (Fig. 4A). A two-tailed unpaired *t*-test confirmed a statistically significant difference between AMPA and AMPA+2-AG treated retinas [$t(7) = 2.528$, $p = 0.0394$] (Fig. 4B). 2-AG led to a reduction in the AMPA induced increase in the number of reactive Iba-1 positive cells (Fig. 4B; $\#p = 0.0394$ compared to AMPA).

3.6. Levels of 2-AG in rat retina: LC/MS

LC/MS analysis was performed in order to investigate the levels of 2-AG reaching the retina after intravitreal administration 5 μ l 2-AG (10^{-6} M). Endogenous levels of 2-AG in the naïve retina were 2.1 ± 0.68 ng/mg (5.6 nmol/g, $n = 5$), while the exogenously administered led to an approximately 4-fold increase of 2-AG levels (8.1 ± 1.56 ng/mg; $n = 4$; $**p = 0.006$ compared to drug naïve retina).

3.7. Effect of AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL/inhibitor) in the AMPA model of rat retinal excitotoxicity

In order to examine the possible neuroprotective actions of inhibitors of the 2-AG metabolic enzymes, AMPA was co-administered with either AM12100 (ABHD6 inhibitor, 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) or AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor, 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M). AMPA reduced the number of bNOS expressing amacrine cells in rat retina (about 72% compared to CTRL), while co-administration with AM12100 or AM11920 reversed the AMPA induced cell loss, in a dose-dependent

manner (Fig. 5A and B).

A statistically significant difference among CTRL, AMPA and AMPA + AM12100 [$F(4, 41) = 322.0$; $p < 0.0001$] was observed. Intravitreal injection of AMPA caused a statistically significant reduction in the number bNOS expressing amacrine cells ($n = 14$; 28.13 ± 1.377 cells per retinal section, $****p < 0.0001$ compared to CTRL) (Fig. 5B). Co-injection of AMPA with AM12100 (ABHD6 inhibitor) partially blocked the AMPA-induced loss of bNOS expressing amacrine cells, at the two biggest doses used, 10^{-3} M ($n = 5$; 41.78 ± 2.460 cells per retinal section, $####p < 0.0001$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL) and 10^{-4} M ($n = 6$; 52.37 ± 4.226 cells per retinal section, $####p < 0.0001$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL) (Fig. 5B). AM12100 (10^{-5} M) had no effect ($n = 6$; 30.57 ± 1.322 cells per retinal section, $p = 0.9122$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++++p < 0.0001$ compared to 10^{-4} M, $++p = 0.0027$ compared to 10^{-3} M) (Fig. 5B).

A statistically significant difference among the four groups, namely CTRL, AMPA and AMPA + AM11920 (10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) [$F(4,37) = 202.3$; $p < 0.0001$] was also observed. AM11920 was able to partially protect bNOS expressing amacrine cells at the dose of 10^{-4} M ($n = 5$; 69.31 ± 4.14 cells per retinal section, $####p < 0.0001$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++++p < 0.0001$ compared to AM11920 (10^{-5} and 10^{-6} M) and 10^{-5} M ($n = 5$; 42.96 ± 2.97 cells per retinal section, $\#p = 0.0102$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++++p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-4} M, $++p = 0.0060$ compared to AM11920 10^{-6} M) (Fig. 5C). The smallest dose of 10^{-6} M did not afford any protection of bNOS expressing amacrine cells ($n = 5$; 25.94 ± 3.780 cells per retinal section, $p = 0.8980$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++++p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-4} M, $++p = 0.0060$ compared to AM11920 10^{-5} M) (Fig. 5C).

A comparison between the effects of the two inhibitors, AM12100 and AM11920 was also examined. A statistically significant difference

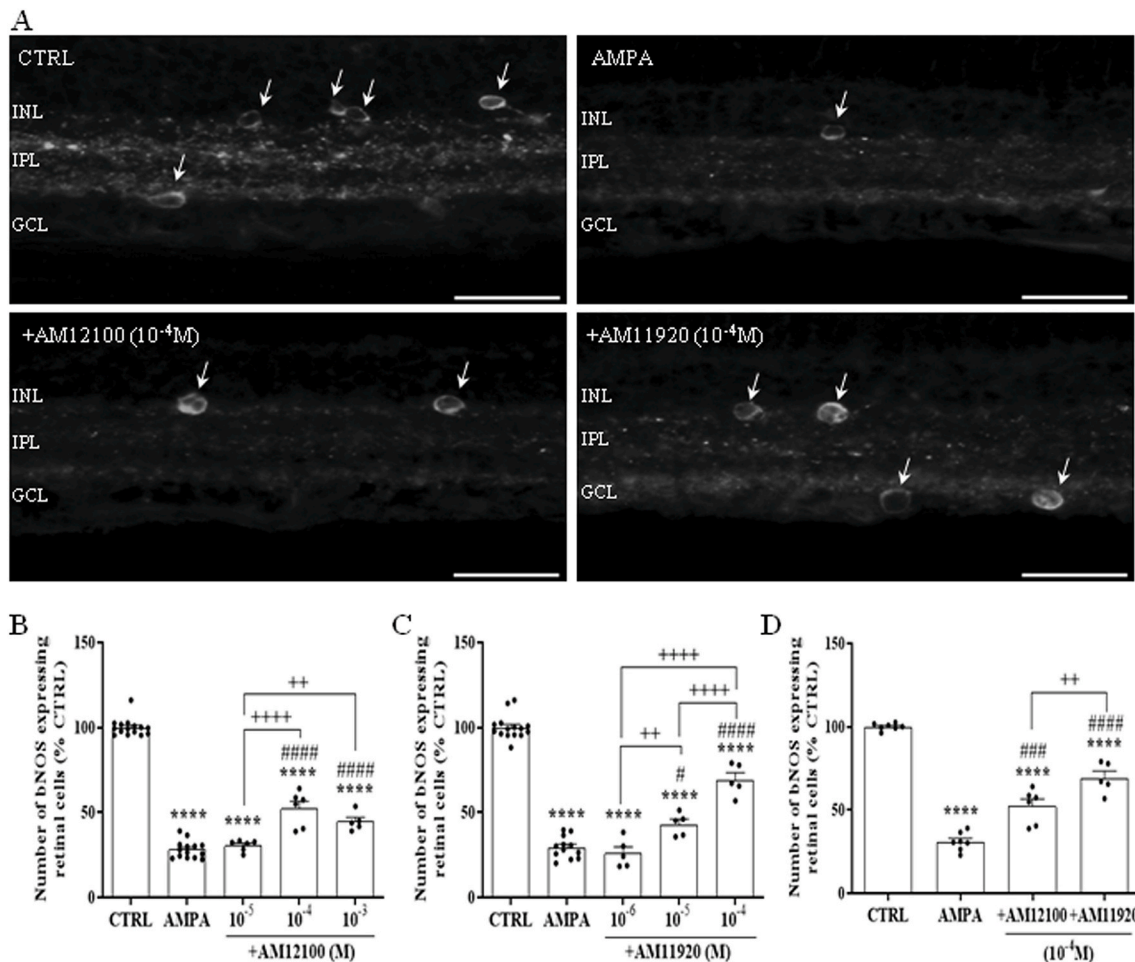


Fig. 5. Effect of AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor) against AMPA excitotoxic insult in the rat retina. **A.** Representative photomicrographs of bNOS immunoreactivity in CTRL, AMPA and AMPA + AM12100 (10^{-4} M) or AMPA + AM11920 (10^{-4} M) treated retinas. **B.** Quantification studies of bNOS immunoreactivity in CTRL, AMPA and AMPA + AM12100 (10^{-5} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M) treated retinas. AMPA ($n = 14$) induce a significant reduction in the number of bNOS-expressing amacrine cells, about 72% compared to CTRL ($n = 15$, **** $p < 0.0001$). Co-administration with the single ABHD6 inhibitor (AM12100) partially recovered the number of bNOS expressing amacrine cells, in a dose dependent manner (10^{-5} M, $n = 6$, $p = 0.912$ compared to AMPA and **** $p < 0.001$ compared to CTRL; 10^{-4} M, $n = 6$, ##### $p < 0.0001$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL, ++++ $p < 0.001$ compared to AM12100 10^{-5} M; 10^{-3} M, $n = 5$, ##### $p < 0.0001$ compared to AMPA, **** $p < 0.001$ compared to CTRL, ++ $p < 0.0027$ compared to AM12100 10^{-5} M). **C.** Quantification studies of bNOS immunoreactivity in CTRL, AMPA and AMPA + AM11920 (10^{-6} M, 10^{-5} M and 10^{-4} M) treated retinas. The dual ABHD6/MGL inhibitor (AM11920), also partially protected bNOS expressing amacrine cells dose dependently (10^{-6} M, $n = 5$, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL, ++ $p = 0.0060$ compared to AM11920 10^{-5} M, ++++ $p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-4} M; 10^{-5} M, $n = 5$, # $p = 0.0102$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL; 10^{-4} M, $n = 5$, ##### $p < 0.0001$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL, ++++ $p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-5} M, ++++ $p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-6} M). **D.** Comparison between AM12100 and AM11920 in the most efficacious dose of 10^{-4} M. AM11920 was more effective neuroprotectant than AM12100 (AM11920 10^{-4} M, $n = 5$, ++ $p = 0.0044$ compared to AM12100 10^{-4} M, $n = 6$).

was observed [$F(3,21) = 113.6$; $p < 0.0001$]. The dual ABHD6/MAGL inhibitor (AM11920, 10^{-4} M) was more efficacious than AM12100 (++ $p = 0.0044$ compared to AM1200 10^{-4} M, ##### $p < 0.0001$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL), reaching appr. 70% of CTRL levels, while AM12100 reached approx. 52% of CTRL levels (### $p = 0.0001$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL) (Fig. 5D).

3.8. Effect of AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor) on AMPA induced activation of microglia/macrophage

The effect of AM12100 and AM11920 on the AMPA induced increase in reactive microglia was examined. A statistically significant difference was observed in the number of Iba1 positive reactive microglial cells, among CTRL, AMPA, AMPA + AM12100 (10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) treated retinas [$F(4,27) = 16.55$; $p < 0.0001$], as shown in Fig. 6A and B.

Intravitreal administration of AMPA, induced a significant increase in the number of reactive microglial cells in rat retina ($n = 7$; **** $p < 0.0001$ compared to CTRL; $n = 8$). AM1200 had no effect on the number of reactive microglial cells, in any of the three doses examined [(10^{-3} M: $n = 4$; $p = 0.9737$ compared to AMPA, ** $p = 0.0038$ compared to CTRL, ++ $p = 0.0075$ compared to AM12100 10^{-5} M), (10^{-4} M: $n = 6$; $p = 0.7613$ compared to AMPA, *** $p = 0.0001$ compared to CTRL, + $p = 0.0157$ compared to AM12100 10^{-5} M) (10^{-5} M: $n = 6$; $p = 0.3973$ compared to AMPA, **** $p < 0.0001$ compared to CTRL, + $p = 0.0157$ compared to AM12100 10^{-4} M, ++ $p < 0.0075$ compared to AM12100 10^{-3} M)] (Fig. 6B).

A statistically significant difference was observed among the groups [$F(4,27) = 43.90$; $p < 0.0001$], attenuating the number of reactive microglia in a dose-dependent manner (Fig. 6C). AM11920 (10^{-4} M) reduced the number of AMPA induced reactive microglia to levels relative to that of CTRL ($n = 5$, ##### $p < 0.0001$ compared to AMPA, $p = 0.6572$ compared to CTRL, ++++ $p < 0.0001$ compared to AM11920

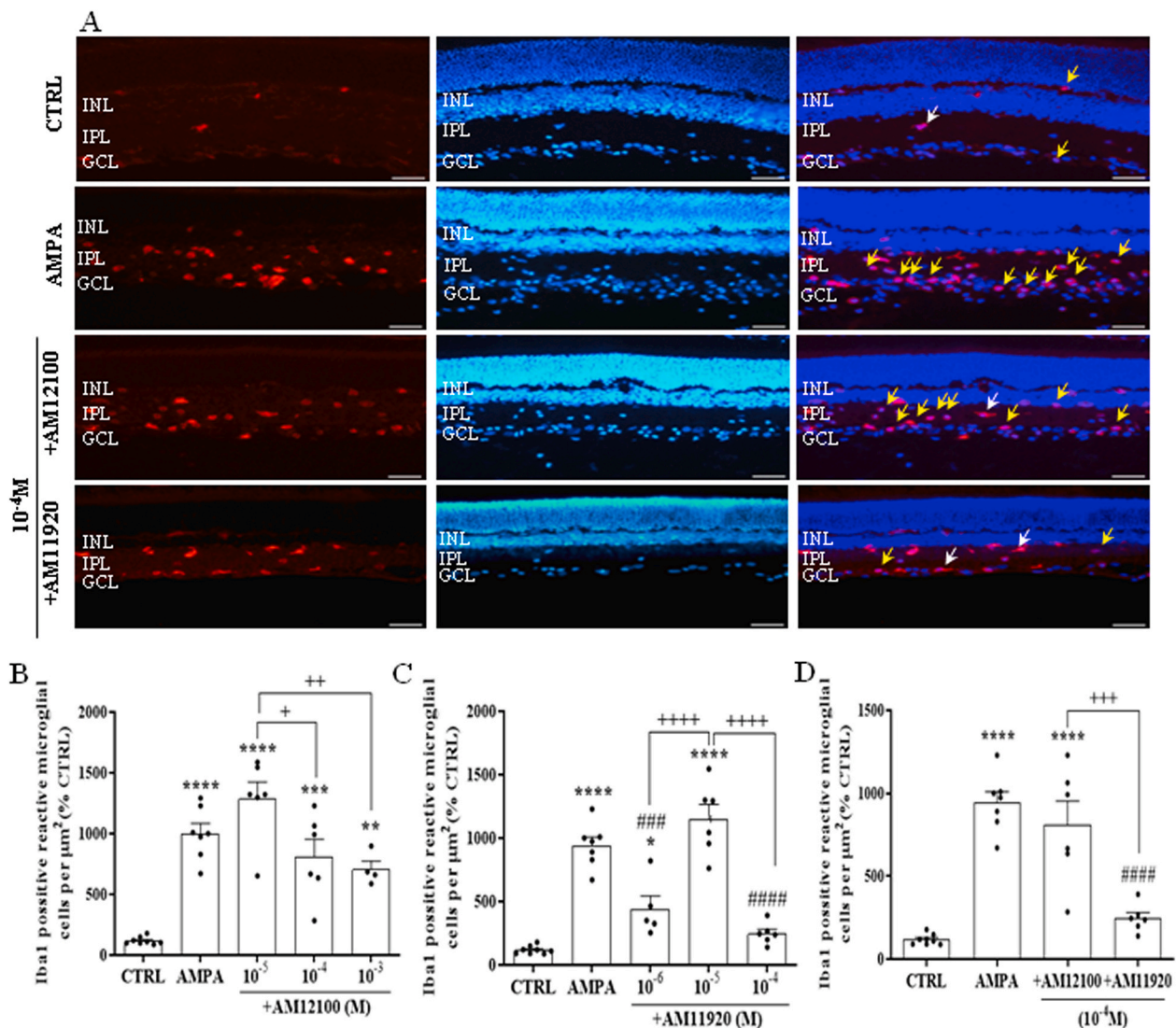


Fig. 6. Effect of AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor) on microglia/macrophages activation in the rat retina. **A.** Representative photomicrographs of Iba-1 immunoreactivity in CTRL, AMPA and AMPA + AM12100 (10^{-4} M) or AMPA + AM11920 (10^{-4} M) treated retinas. Reactive microglial cells are present in AMPA treated retinas. Scale bar: 50 μm . **B.** Quantification studies of Iba-1 immunoreactivity in CTRL, AMPA and AMPA + AM12100 (10^{-5} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M) treated retinas. AMPA (n = 7) increased the number of reactive microglia compared to CTRL (****p < 0.0001). AM12100, when cojected with AMPA had no effect on microglia activity at any of the three doses used (10^{-5} M, n = 6, ****p < 0.0001 compared to CTRL; 10^{-4} M, n = 5, **p = 0.0011 compared to CTRL; 10^{-3} M, n = 5, ***p = 0.0005 compared to CTRL). **C.** Quantification studies of Iba-1 immunoreactivity in CTRL, AMPA and AMPA + AM11920 (10^{-6} M, 10^{-5} M and 10^{-4} M) treated retinas. The presence of AM11920 at the dose of 10^{-4} M (n = 5) was able to fully reduce the number of reactive microglia to CTRL levels (####p < 0.0001 compared to AMPA, p = 0.6572 compared to CTRL, ++++p < 0.0001 compared to AM11920 10^{-5} M). AM11920 (10^{-5} M: n = 6) had no effect on the levels of microglia (p = 0.2345 compared to AMPA, ****p < 0.0001 compared to CTRL, ++++p < 0.0001 compared to AM11920 10^{-6} and 10^{-4} M), while at the smallest dose of 10^{-6} M (n = 6), AM11920 partially reduced reactive microglia numbers (###p = 0.0004 compared to AMPA, *p = 0.0227 compared to CTRL, ++++p < 0.0001 compared to AM11920 10^{-5} M). **D.** Comparison of efficacies of AM12100 and AM11920 in the most efficacious dose of 10^{-4} M. The dual ABHD6/MGL inhibitor, AM11920, was more efficacious in reducing AMPA induced activation of microglia than the single ABHD6 inhibitor, AM12100 (+++p = 0.0002 compared to AM12100 10^{-4} M).

10^{-5} M). AM11920 (10^{-5} M) had no effect (n = 6, p = 0.2345 compared to AMPA, ****p < 0.0001 compared to CTRL, ++++p < 0.0001 compared to AM11920 10^{-4} and 10^{-5} M). However, at the lower dose of 10^{-6} M, AM11920 partially reduced the number of reactive microglial cells (n = 5, ###p = 0.0004 compared to AMPA, *p = 0.0227 compared to CTRL, ++++p < 0.0001 compared to AM11920 10^{-5} M).

A statistically significant difference in reducing microglia reactivity was also observed, when comparing the effects of AM12100 and AM11920 [F(3,23) = 32.70; p < 0.0001]. Only, AM11920 (10^{-4} M) caused a significant reduction in the number of Iba-1 positive reactive microglial cells (n = 5, +++p = 0.0002 compared to AM12100 10^{-4} M, ####p < 0.0001 compared to AMPA, p = 0.5997 compared to CTRL)

(Fig. 6D).

3.9. Effect of AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL/inhibitor) on AMPA induced activation of macroglia

Activation of macroglia was also examined, using an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrocytes and Müller cells (Middeldorp and Hol, 2011). One-way ANOVA showed a statistically significant effect of treatment in the levels of GFAP immunoreactivity (GFAP-IR) in rat retina [F(5,25) = 22.62; p < 0.0001]. Reactive gliosis was significantly increased in AMPA treated retinas (n = 9; ****p < 0.0001 compared to CTRL; n = 10), as seen by the

increased intensity of GFAP-IR (Fig. 7A and B). Co-injection with AM12100 at the dose of 10^{-4} M, reduced GFAP-IR to CTRL levels ($n = 6$; $###p = 0.0005$ compared to AMPA, $p = 0.8372$ compared to CTRL), while at the smaller dose of 10^{-5} M, there was no effect ($n = 6$; $p = 0.999$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++p = 0.0016$ compared to AM12100 10^{-4} M). Similarly, AM11920 induced a reduction in GFAP-IR, only at the higher dose (10^{-4} M: $n = 6$; $####p < 0.0001$ compared to AMPA, $p = 0.8706$ compared to CTRL), but no effect was observed at the lower dose of (10^{-5} M: $n = 6$; $p = 0.9889$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++++p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-4} M) (Fig. 7B).

4. Discussion

In the present study, we provide new evidence regarding the neuroprotective role of the endocannabinoid 2-AG in the retinal model of AMPA excitotoxicity. This was substantiated by the reversal of the AMPA induced loss of amacrine cells and the increase in TUNEL⁺ cells. The neuroprotection was shown to be mediated by both CB1 and CB2

receptors in the retina, located on neurons, micro and macroglia and the activation of Akt downstream signaling pathway. In addition, we show that novel inhibitors of ABHD6 and MAGL, metabolic enzymes of 2-AG, attenuated retinal amacrine cell death and the activation of micro and macroglia induced by AMPA.

Cannabinoid actions in the eye were first reported in the late 70s, by means of corneal vasodilation and reduction of the intraocular pressure in individuals smoking marijuana (Adams et al., 1978; Green, 1979). Since then, many investigations aimed to ascertain the role of endocannabinoids in retinal circuitry and vision and the neuroprotective role of exogenously administered cannabinoids in retinal diseases such as glaucoma (Cairns et al., 2016). The endocannabinoid AEA and the synthetic cannabinoids methAEA and HU-210 were shown to protect bNOS and ChAT immunoreactive retinal amacrine cells against AMPA excitotoxicity *in vivo* in rats (Kokona and Thermos, 2015; Kokona et al., 2016). Moreover, these actions were shown to be dependent on CB1 receptor activation and its downstream signalling pathways PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 (Kokona and Thermos, 2015).

The findings from the present study suggest that the

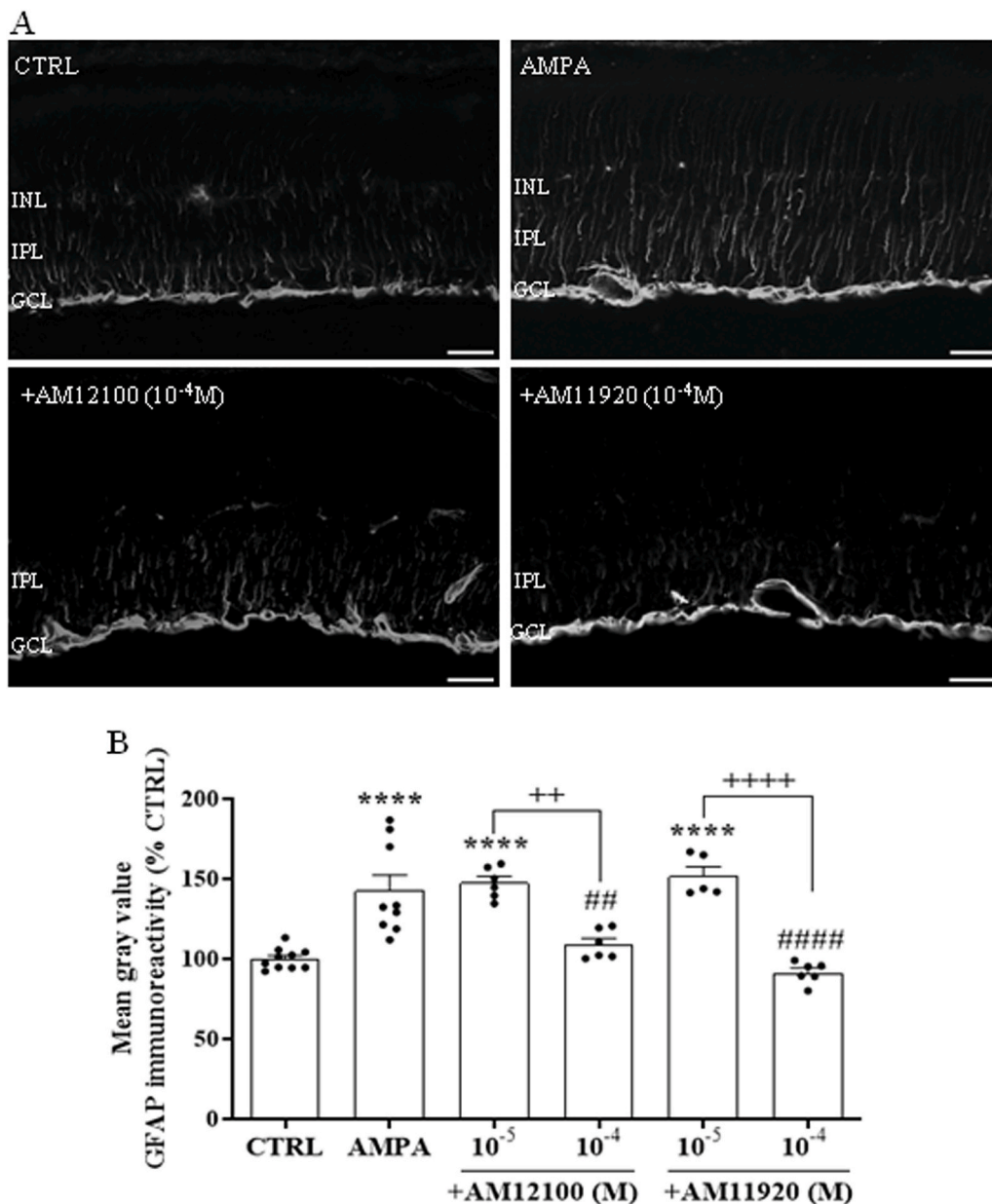


Fig. 7. Effect of AM12100 (ABHD6 inhibitor) and AM11920 (dual ABHD6/MAGL inhibitor) on macroglia activation in the rat retina. A. Representative photomicrographs of GFAP immunoreactivity (GFAP-IR) in CTRL ($n = 10$), AMPA ($n = 8$) and AMPA + AM12100 (10^{-5} M: $n = 6$ and 10^{-4} M: $n = 6$) or AMPA + AM11920 (10^{-5} M: $n = 5$ and 10^{-4} M: $n = 6$) treated retinas. Scale bar: 50 μ m. B. Quantification of GFAP-IR. Administration of AMPA increased GFAP-IR, compared to CTRL retinas ($n = 9$, $****p < 0.0001$). Co-injection of AMPA with AM12100 or AM11920 at the dose of 10^{-4} M, reversed GFAP-IR to CTRL levels (AM12100 10^{-4} M: $n = 6$, $###p = 0.0005$ compared to AMPA, $p = 0.8372$ compared to CTRL; AM11920 10^{-4} M: $n = 6$, $####p < 0.0001$ compared to AMPA, $p = 0.8706$ compared to CTRL). Both inhibitors (10^{-5} M) did not reduce the AMPA induced increase in GFAP-IR (AM12100 10^{-5} M: $n = 6$, $p = 0.999$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++p = 0.0016$ compared to AM12100 10^{-4} M; AM11920 10^{-5} M: $n = 6$, $p = 0.9889$ compared to AMPA, $****p < 0.0001$ compared to CTRL, $++++p < 0.0001$ compared to AM11920 10^{-4} M).

endocannabinoid 2-AG provides neuroprotection to bNOS-expressing retinal amacrine cells in a dose-dependent manner via the activation of both CB1R and CB2Rs, as depicted by the actions of CB1R and CB2R antagonists in the presence of 2-AG (Fig. 1C). The use of the bNOS antibody as a marker for retinal neurons was selected due to its stability (batch/lot problems) and reproducibility compared to other retinal markers (e.g. ChAT, calbindin), shown to be affected by AMPA. Despite the fact that CB2 receptor mRNA and protein have been previously reported in the adult rat retina (Lu et al., 2000; López et al., 2011), the presence of functional CB2 receptors remains controversial (Bouchard et al., 2016; Borowska-Fielding et al., 2018). In the present study, we employed real-time PCR analysis and show that the expression of CB2 receptor mRNA in retina is approximately 62% of the expression of the CB1 receptor. This percentage is higher than what we reported in our previous study (Kokona and Thermos, 2015), where RT-PCR methodology was employed. This difference in expression is most likely due to the better efficiency of the real-time PCR methodology. The CB2R mRNA data presented in this study are in agreement with the findings by Lu et al. (2000). In addition, reversal of the 2-AG-dependent neuroprotection by the CB2R antagonist also lends support for a functional CB2R in rat retina, in agreement with López et al. (2011), Maccarone et al. (2016) and Imamura et al. (2018).

Cannabinoid neuroprotective actions are mediated via the activation of several signalling pathways, the first studied being the inhibition of adenylyl cyclase and the subsequent reduction of cAMP. These actions are mediated by the activation of the CB1R and its coupling to Gi (Howlett et al., 1986, 2002). Prosurvival intracellular kinases, such as PI3K/Akt (Gomez del Pulgar et al., 2000; Ozaita et al., 2007) and ERK1/2 kinases (Bouaboula et al., 1995; Wartmann et al., 1995) are also regulated by the activation of the CB1 receptor.

The results of the present study indicate that the neuroprotective effects of 2-AG in the retina are also mediated by CB1 receptor-dependent activation of the PI3K/Akt pathway. The role of Akt kinases in retinal cell survival has been reported in several paradigms of retinal disease (Huang et al., 2008; Li et al., 2007). There are three isoforms of Akt kinases (Akt1, Akt2 and Akt3), all present in retinal tissue at the mRNA and protein level (Li et al., 2007; Reiter et al., 2003). However, Akt2 seems to be the one that exhibits greater sensitivity to cell death induced by stress (Li et al., 2007). The deletion of Akt2 kinase from mouse retina had no effect on the expression of Akt1 and Akt3 kinases (Li et al., 2007).

In conclusion, the information mentioned above and our data presented in Fig. 2 suggest that activation of CB1R promotes neuroprotection via the activation of downstream Akt2 signaling. However, it has been reported that deletion of the Akt2 isoform in photoreceptors increases their susceptibility to light-induced degeneration (Kanan et al., 2010). Further studies have to be performed in order to elucidate whether the Akt2 deletion increases the susceptibility to the AMPA induced degeneration, as suggested by (Kanan et al. (2010)) in their model.

The neuroprotective actions of 2-AG are further supported by the effects of the endocannabinoid on TUNEL⁺ cells in WT mouse retina (Fig. 3A,B,C). 2-AG (10^{-7} M) reversed the AMPA-induced increase of TUNEL⁺ cells in retinal tissue. Although TUNEL⁺ cells were detected mostly in the INL and ONL, 2-AG attenuated the AMPA induced increase in TUNEL⁺ cells in a statistically significant manner only in the INL. These results are in agreement with our previous published data showing that HU-210 and AEA (10^{-7} M) reduced the TUNEL⁺ cells in the AMPA treated rat retina (Kokona and Thermos, 2015).

The 2-AG-induced neuroprotection to amacrine cells may follow a direct or an indirect mechanism, something that will be addressed in future studies. CB1 receptor immunoreactivity was reported in a subtype of GABAergic amacrine cells in rat retina (Yazulla, 2008). All neuronal NOS-immunoreactive neurons have been reported to be GABA-immunoreactive in rat and rabbit retina (Oh et al., 1998). However, to our knowledge, there are no immunohistochemical data to

suggest the co-localization of the CB1 receptor and bNOS-immunoreactive amacrine cells in the retina. Therefore, a direct CB1 mechanism cannot be substantiated by the present findings. It is possible that the 2-AG activation of the CB1 receptor found in RGCs (Straiker et al., 1999) may activate downstream signals and provide indirect neuroprotection to neighboring retinal cells that may not express the CB1 receptor.

The present immunohistochemical findings also support an AMPA-induced increase in microglia activation in rat retina, as shown by the increase of Iba1 immunoreactivity. In the presence of 2-AG an attenuation of microglia activation was observed. Therefore, modulation of microglia activation could also be involved in the neuroprotective actions of 2-AG against AMPA excitotoxicity. 2-AG has been previously reported to increase the ramification of microglia in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice (EAE), leading to amelioration of the disease symptoms by promoting an anti-inflammatory microglia/macrophage phenotype (Lourbopoulos et al., 2011). In agreement, in the present study 2-AG decreased the AMPA-induced activation of microglia/macrophages. The colocalization of the CB2R with Iba1 in retina was observed in a recent study (Spyridakos et al., 2021), suggesting a role of CB2R in the function of retinal activated microglia. The role of CB2R in the regulation of immune responses has been established for some time (Cabral and Griffin-Thomas, 2009). Thus, 2-AG activation of CB2 receptors in retinal microglia cells may lead to its neuroprotective and anti-inflammatory actions.

The results presented above suggest that 2-AG at the low dose of 10^{-7} M is able to protect the retina, when administered exogenously (intravitreally) against AMPA excitotoxicity. The neuroprotection is mediated by both CB1 and CB2 cannabinoid receptors believed to be located on neurons, micro and macroglia. Our LC/MS analysis showed a 4-fold increase of 2-AG levels in the retina after intravitreal injection of $5 \mu\text{l } 10^{-6}$ M 2-AG, confirming the effectiveness of intravitreal injections to deliver 2-AG into the retina.

Endocannabinoid metabolic enzymes are key players in the control of the physiological actions of the endocannabinoids and are important targets of investigation for CNS neurodegenerative disease therapeutics. Treatment with enzyme inhibitors increases the endogenous cannabinoid levels, provides neuroprotection and possibly reduces the induction of a tolerance effect observed with exogenous administered endocannabinoids and synthetic cannabinoids in retina (Papadogkonaki et al., 2019).

In this work, we also focused on the study of the effect of novel inhibitors of the 2-AG metabolic enzymes ABHD6 and MAGL on retinal neurons, microglia and macroglia in the AMPA excitotoxicity model. The novel ABHD6 inhibitor (AM12100) and dual ABHD6/MAGL inhibitor (AM11920) reversed the AMPA-induced decrease in bNOS-expressing amacrine cells and increase in microglia reactivity in a dose-dependent manner. It is worth mentioning that AM11920 (10^{-6} M) reversed the AMPA induced increase in microglia (Fig. 6C), suggesting a biphasic modulation of microglia, but not neurons, by 2-AG. A similar biphasic effect of the synthetic cannabinoid WIN55212-2 (CB1/CB2 agonist) on voltage-dependent currents of retinal cones was also reported (Fan and Yazulla, 2003). We have also reported that the HU-210 (CB1/CB2 agonist) attenuated the release of the inhibitory neuropeptide somatostatin in a dose-dependent bimodal manner via the activation of the CB1 receptor (Kokona et al., 2016).

AM11920 was more efficacious than AM12100 on the neuroprotection [neurons (Fig. 5D) and microglia (Fig. 6D)] against AMPA excitotoxicity, whereas these inhibitors were equipotent in reversing the AMPA-induced effect on macroglia.

MAGL is expressed presynaptically in brain neurons, as are CB1 receptors (Gulyas et al., 2004), whereas ABHD6 was found in postsynaptic structures (e.g. cell soma and dendrites), and in a BV-2 microglia cell line (Marrs et al., 2010). The different location of the two enzymes and their rate of 2-AG hydrolysis may influence the efficacy of 2-AG for the CB1 and CB2 receptor and its subsequent neuroprotective and

anti-inflammatory actions. Chronic treatment with MAGL inhibitors leads to downregulation and development of tolerance of the CB1 receptor (Schlosburg et al., 2010; Chanda et al., 2010). However, it was shown that induction of tolerance may be dose-dependent. A high dose of JZL184 (MAGL inhibitor, ≥ 16 mg/kg; 40 mg/kg:repeated-dosing) resulted in a 11.4-fold increase in brain 2-AG levels which led to down regulation of CB1 receptors and the development of tolerance to anti-nociceptive and gastroprotective actions in mice. At low doses (≤ 8 mg/kg; 4 mg/kg: repeated-dosing) resulted in a 5.7-fold increase in brain 2-AG levels without any effect in CB1 expression nor development of tolerance (Kinsey et al., 2013). Studies of the effect of chronic treatment of ABHD6 inhibitors in brain models of neurodegenerative disease support that these inhibitors may not produce tolerance due to the fact that they account for only 4% of the 2-AG metabolism in contrast to the 85% of MAGL and thus a smaller increase in 2-AG levels is produced (Tchantchou and Zhang, 2013; Wen et al., 2015). Chronic treatment with the ABHD6 inhibitor WWL70 did not cause behavioral tolerance. In contrast, it caused an increased expression (upregulation) of CB1 and CB2 receptors, subsequent phosphorylation of the ERK1/2 and Akt kinases and neuroprotection. The involvement of the Akt kinase in the neuroprotection of 2-AG is in agreement with the data presented in this study. WWL70 treatment was also shown to change the morphology of microglia to an anti-inflammatory phenotype thus suggesting the regulation of neuroinflammation by 2-AG (Tchantchou and Zhang, 2013). In agreement with the above study, we report that both the single ABHD6 (GFAP-IR) and the dual ABHD6/MAGL (Iba-1-IR, GFAP-IR) inhibitors attenuated the AMPA induced increase in reactive microglia and macroglia, thus expressing anti-inflammatory properties. In the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model, WWL70 was shown to increase brain levels of 2-AG and attenuate the clinical signs of EAE. The authors suggested that inhibition of ABHD6, expressed in microglia/macrophage, led to the increase of 2-AG levels, subsequent activation of the CB2 receptor and reduction of microglia activation. In a recent study we showed that the CB2 receptor is colocalized with the microglial marker (Iba1) in the retina, and its activation leads to anti-inflammatory actions (Spyridakos et al., 2021).

In summary, the findings of the present study demonstrate for the first time that the endocannabinoid, 2-AG, administered either exogenously or by inhibition of its metabolic enzymes, ABHD6 and MAGL, provides neuroprotection to retinal neurons and attenuates the AMPA-induced increase in retinal microglia and macroglia reactivity. The better efficacy displayed by the dual ABHD6/MGL inhibitor suggests that dual inhibition may lead to higher levels of 2-AG and a better pharmacological profile. Therefore, agents such as AM11920 are promising therapeutic targets for retinal disease characterized by neurodegeneration and neuroinflammation.

CRedit authorship contribution statement

Despina Kokona: Investigation, Formal analysis, Validation, Writing - review & editing. **Dimitris Spyridakos:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Manolis Tzatzarakis:** Investigation, Validation. **Sofia Papadogkonaki:** Investigation. **Eirini Filidou:** Investigation. **Konstantinos I. Arvanitidis:** Investigation. **George Kolios:** Resources. **Manjunath Lamani:** Resources. **Alexandros Makriyannis:** Resources. **Michael S. Malamas:** Resources. **Kyriaki Thermos:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition, All authors have read the manuscript prior to its submission.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This work was supported by a grant to K.T. from the European Union (European Social Fund - ESF) and Greek National Funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF)-Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund (KA 3396). D.S was awarded the Christina Spyriaki Scholarship.

The funding sources had no involvement in the design of the study, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108450>.

References

- Adams, A.J., Brown, B., Haegerstrom-Portnoy, G., Flom, M.C., Jones, R.T., 1978. Marijuana, alcohol, and combined drug effects on the time course of glare recovery. *Psychopharmacology (Berlin)* 56, 81–86. <https://doi.org/10.1007/bf00571413>.
- Andrés, N., Malpesa, Y., Rodríguez, M.J., Mahy, N., 2003. Low sensitivity of retina to AMPA-induced calcification. *J. Neurosci. Res.* 72, 543–548. <https://doi.org/10.1002/jnr.10601>.
- Aravindan, N., Cata, J.P., Hoffman, L., Dougherty, P.M., Riedel, B.J., Price, K.J., Shaw, A. D., 2006. Effects of isoflurane, pentobarbital, and urethane on apoptosis and apoptotic signal transduction in rat kidney. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 50, 1229–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.01102.x>.
- Bisogno, T., Delton-Vandenbroucke, I., Milone, A., Lagarde, M., Di Marzo, V., 1999. Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 300–307. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1410>.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., Doherty, P., 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell. Biol.* 63, 463–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305129>.
- Blankman, J.L., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* 14, 1347–1356. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>.
- Borowska-Fielding, J., Murataeva, N., Smith, B., Szczesniak, A.-M., Leishman, E., Daily, L., Toguri, J.T., Hillard, C.J., Romero, J., Bradshaw, H., Kelly, M., Straiker, A., 2018. Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina. *Neuropharmacology* 141, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.007>.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, J., Casellas, P., 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* 312, 637–641. <https://doi.org/10.1042/bj3120637>.
- Bouchard, J.-F., Casanova, C., Cécyre, B., Redmond, W.J., 2016. Expression and function of the endocannabinoid system in the retina and the visual brain. *Neural Plast.* 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/9247057>.
- Bouskila, J., Javadi, P., Elkrief, L., Casanova, C., Bouchard, J.-F., Ptito, M., 2016. A comparative analysis of the endocannabinoid system in the retina of mice, tree shrews, and monkeys. *Neural Plast.* 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/3127658>.
- Cabral, G.A., Griffin-Thomas, L., 2009. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev. Mol. Med.* 11. <https://doi.org/10.1017/s1462399409000957>.
- Carloni, S., Alonso-Alconada, D., Girelli, S., Duranti, A., Tontini, A., Piomelli, D., Hilario, E., Alvarez, A., Balduino, W., 2012. Pretreatment with the monoacylglycerol lipase inhibitor URB602 protects from the long-term consequences of neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Pediatr. Res.* 72, 400–406. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.91>.
- Cairns, E.A., Baldrige, W.H., Kelly, M.E.M., 2016. The endocannabinoid system as a therapeutic target in glaucoma. *Neural Plast.* 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/9364091>.
- 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. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00150>.
- Chanda, P.K., Gao, Y., Mark, L., Btsh, J., Strassle, B.W., Lu, P., Piesla, M.J., Zhang, M.-Y., Bingham, B., Uveges, A., Kowal, D., Garbe, D., Kouranova, E.V., Ring, R.H., Bates, B., Pangalos, M.N., Kennedy, J.D., Whiteside, G.T., Samad, T.A., 2010. Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol. Pharmacol.* 78, 996–1003. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068304>.

- Chen, J., Matias, I., Dinh, T., Lu, T., Venezia, S., Nieves, A., Woodward, D.F., Di Marzo, V., 2005. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1062–1067. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.095>.
- Chen, R., Zhang, J., Wu, Y., Wang, D., Feng, G., Tang, Y.P., Teng, Z., Chen, C., 2012. Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2, 1329–1339. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.030>.
- Chidlow, G., Osborne, N.N., 2003. Rat retinal ganglion cell loss caused by kainate, NMDA and ischemia correlates with a reduction in mRNA and protein of Thy-1 and neurofilament light. *Brain Res.* 963, 298–306. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04052-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04052-0).
- Cho, H., 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKBbeta). *Science* 292, 1728–1731. <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>.
- Choi, S.-H., Arai, A.L., Mou, Y., Kang, B., Yen, C.C.-C., Hallenbeck, J., Silva, A.C., 2018. Neuroprotective effects of MAGL (monoacylglycerol lipase) inhibitors in experimental ischemic stroke. *Stroke* 49 (3), 718–726. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.117.019664>.
- Devane, W., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R., Stevenson, L., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., 2002. Brain monoacylglycerol lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Sci. Acad.* 99, 10819–10824. <https://doi.org/10.1073/pnas.152334899>.
- Dionysopoulou, S., Wikström, S., Walum, E., Themos, K., 2020. Effect of NADPH oxidase inhibitors in an experimental retinal model of excitotoxicity. *Exp. Eye Res.* 200, 108232. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108232>.
- El-Remessy, A.B., Khalil, I.E., Matragoon, S., Abou-Mohamed, G., Tsai, N.-J., Roon, P., Caldwell, R.B., Caldwell, R.W., Green, K., Liou, G.I., 2003. Neuroprotective effect of (–)-Δ⁹-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-Methyl-D-Aspartate-Induced retinal neurotoxicity. *Am. J. Pathol.* 163, 1997–2008. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63558-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63558-4).
- Fan, S.-F., Yazulla, S., 2003. Biphasic modulation of voltage dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis. Neurosci.* 20, 177–188.
- Fernández-Suárez, D., Celorrio, M., Riezu-Boj, J.I., Ugarte, A., Pacheco, R., González, H., Oyarzabal, J., Hillard, C.J., Franco, R., Aymerich, M.S., 2014. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model. *Neurobiol. Aging* 35, 2603–2616. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.021>.
- 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. <https://doi.org/10.1097/00001756-199810260-00025>.
- Fiskerstrand, T., H'mida-Ben Brahim, D., Johansson, S., M'zahem, A., Haukanes, B.I., Drouot, N., Zimmermann, J., Cole, A.J., Vedeler, C., Bredrup, C., Assoum, M., Tazir, M., Klockgether, T., Hamri, A., Steen, V.M., Boman, H., Bindoff, L.A., Koenig, M., Knappskog, P.M., 2010. Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: an inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.08.002>.
- Gastinger, M.J., Singh, R.S.J., Barber, A.J., 2006. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3143. <https://doi.org/10.1167/iov.05-1376>.
- Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzman, M., 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* 347, 369–373. <https://doi.org/10.1042/bj3470369>.
- Gowran, A., Noonan, J., Campbell, V.A., 2010. The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. *CNS Neurosci. Ther.* 17, 637–644. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00195.x>.
- Green, K., 1979. The ocular effects of cannabinoids. *Curr. Top. Eye Res.* 1, 175–215.
- Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boscia, F., Freund, T.F., 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 20, 441–458. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03428.x>.
- Hepler, R.S., 1971. Marijuana smoking and intraocular pressure. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 217, 1392. <https://doi.org/10.1001/jama.1971.03190100074024>.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. Int. Union Pharmacol. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>.
- Howlett, A.C., Qualy, J.M., Khachatrian, L.L., 1986. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.* 29, 307–313.
- Huang, Y., Cen, L.-P., Luo, J.-M., Wang, N., Zhang, M.-Z., van Rooijen, N., Pang, C.P., Cui, Q., 2008. Differential roles of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in retinal ganglion cell survival in rats with or without acute ocular hypertension. *Neuroscience* 153, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.007>.
- Imamura, T., Tsuruma, K., Inoue, Y., Otsuka, T., Ohno, Y., Ogami, S., Yamane, S., Shimazawa, M., Hara, H., 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. *Exp. Eye Res.* 167, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.11.003>.
- Kanan, Y., Matsumoto, H., Song, H., Sokolov, M., Anderson, R.E., Rajala, R.V., 2010. Serine/threonine kinase act activation regulates the activity of retinal serine/threonine phosphatases, PHLPP and PHLPL. *J. Neurochem.* 113, 477–488. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06609>.
- Kerr, D., Harhen, B., Okine, B., Egan, L., Finn, D., Roche, M., 2013. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 attenuates LPS-induced increases in cytokine expression in the rat frontal cortex and plasma: differential mechanisms of action. *Br. J. Pharmacol.* 169, 808–819. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02237.x>.
- Kiagiadaki, F., Themos, K., 2008. Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2Analog on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3080. <https://doi.org/10.1167/iov.07-1644>.
- Kinsey, S.G., Wise, L.E., Ramesh, D., Abdullah, R., Selley, D.E., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., 2013. Repeated low-dose administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 retains cannabinoid receptor type 1-mediated antinociceptive and gastroprotective effects. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 345, 492–501. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.201426>.
- Kokona, D., Charalampopoulos, I., Pediaditakis, I., Gravanis, A., Themos, K., 2012. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. *Neuropharmacology* 62, 2106–2117. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.006>.
- Kokona, D., Georgiou, P.-C., Kounenidakis, M., Kiagiadaki, F., Themos, K., 2016. Endogenous and synthetic cannabinoids as therapeutics in retinal disease. *Neural Plast.* 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/8373020>.
- Kokona, D., Themos, 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. *Exp. Eye Res.* 136, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.05.007>.
- Lax, P., Esquiva, G., Altavilla, C., Cuenca, N., 2014. Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* 120, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.019>.
- Li, G., Anderson, R.E., Tomita, H., Adler, R., Liu, X., Zack, D.J., Rajala, R.V.S., 2007. Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death. *J. Neurosci.* 27, 203–211. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0445-06.2007>.
- 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. <https://doi.org/10.1002/syn.20856>.
- Lourbopoulos, A., Grigoriadis, N., Lagoudaki, R., Touloumi, O., Polyzoidou, E., Mavromatis, I., Tascos, N., Breuer, A., Ovadia, H., Karussis, D., Shohami, E., Mechoulam, R., Simeonidou, C., 2011. Administration of 2-arachidonylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1390, 126–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.020>.
- Lu, Q., Straiker, A., Lu, Q., Maguire, G., 2000. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis. Neurosci.* 17, 91–95. <https://doi.org/10.1017/S0952523800171093>.
- Maccarrone, R., Rapino, C., Zerti, D., di Tommaso, M., Battista, N., Di Marco, S., Bisti, S., Maccarrone, M., 2016. Modulation of type-1 and type-2 cannabinoid receptors by saffron in a rat model of retinal neurodegeneration. *PLoS One* 11, e0166827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166827>.
- Marrs, W.R., Blankman, J.L., Horne, E.A., Thomezeau, A., Lin, Y.H., Coy, J., Bodor, A.L., Muccioli, G.G., Shu-Jung Hu, S., Woodruff, G., Fung, S., Lafourcade, M., Alexander, J.P., Long, J.Z., Li, W., Xu, C., Moller, T., Mackie, K., Manzoni, O.J., Cravatt, B.F., Stella, N., 2010. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat. Neurosci.* 13, 951–957. <https://doi.org/10.1038/nn.2601>.
- 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 Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.08.002>.
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>.
- Miller, S., Leishman, E., Hu, S.S., Elghouch, A., Daily, L., Murataeva, N., Bradshaw, H., Straiker, A., 2016. Harnessing the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol to lower intraocular pressure in a murine model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 3287. <https://doi.org/10.1167/iov.16-19356>.
- Mozaffarieh, M., Grieshaber, M.C., Örgül, S., Flammer, J., 2008. The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 53, 479–505. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2008.06.006>.
- Nomura, D.K., Morrison, B.E., Blankman, J.L., Long, J.Z., Kinsey, S.G., Marcondes, M.C.G., Ward, A.M., Hahn, Y.K., Lichtman, A.H., Conti, B., Cravatt, B.F., 2011. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science* 334, 809–813. <https://doi.org/10.1126/science.1209200>.
- Nucci, C., Gasperi, V., Tartaglione, R., Cerulli, A., Terrinoni, A., Bari, M., De Simone, D., Agro, A.F., Morrone, L.A., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Maccarrone, M., 2007. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2997. <https://doi.org/10.1167/iov.06-1355>.
- Oh, S.-J., Kim, I.-B., Lee, M.-Y., Chun, M.-H., Chung, J.-W., 1998. NOS-like immunoreactive neurons express GABA-like immunoreactivity in rabbit and rat retinae. *Exp. Brain Res.* 120, 109–113. <https://doi.org/10.1007/s002210050383>.
- Olney, J.W., Adamo, R., 1971. Monosodium glutamate effects. *Science* 172, 294. <https://doi.org/10.1126/science.172.3980.294>.
- 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. *Prog. Retin. Eye Res.* 23, 91–147. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.12.001>.
- Osborne, N.N., Núñez-Álvarez, C., Joglar, B., del Olmo-Aguado, S., 2016. Glaucoma: focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur. J. Pharmacol.* 787, 127–133.

- Ozaita, A., Puighermanal, E., Maldonado, R., 2007. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J. Neurochem.* 102, 1105–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04642.x>.
- Pan, B., Wang, W., Long, J.Z., Sun, D., Hillard, C.J., Cravatt, B.F., Liu, Q., 2009. Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(Dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) enhances retrograde endocannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 331, 591–597. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.158162>.
- Papadogkonaki, S., Theodorakis, K., Thermos, K., 2019. Endogenous and synthetic cannabinoids induce the downregulation of cannabinoid CB1 receptor in retina. *Exp. Eye Res.* 185, 107694. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107694>.
- Pasquarelli, N., Engelskirchen, M., Hanselmann, J., Endres, S., Porazik, C., Bayer, H., Buck, E., Karsak, M., Weydt, P., Ferger, B., Witting, A., 2017. Evaluation of monoacylglycerol lipase as a therapeutic target in a transgenic mouse model of ALS. *Neuropharmacology* 124, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.037>.
- Patricelli, M.P., Lashuel, H.A., Giang, D.K., Kelly, J.W., Cravatt, B.F., 1998. Comparative characterization of a wild type and transmembrane domain-deleted fatty acid amide hydrolase: identification of the transmembrane domain as a site for oligomerization. *Biochem. J.* 337, 15177–15187. <https://doi.org/10.1021/bi981733n>.
- Pinar-Sueiro, S., Zorrilla Hurtado, J.A., 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. *Exp. Eye Res.* 110, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.02.009>.
- Porcella, A., Casellas, P., Gessa, G.L., Pani, L., 1998. Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marijuana. *Mol. Brain Res.* 58, 240–245. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00105-3](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00105-3).
- Rahmani, M.-R., Shamsizadeh, A., Moghadam-Ahmadi, A., Bazmandegan, G., Allahavakoli, M., 2018. JZL184, as a monoacylglycerol lipase inhibitor, down-regulates inflammation in a cannabinoid pathway dependent manner. *Biomed. Pharmacother.* 103, 1720–1726. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.001>.
- Ramarao, M.K., Murphy, E.A., Shen, M.W., Wang, Y., Bushell, K.N., Huang, N., Pan, N., Williams, C., Clark, J.D., 2005. A fluorescence-based assay for fatty acid amide hydrolase compatible with high-throughput screening. *Anal. Biochem.* 343, 143–151.
- Rapino, C., Tortolani, D., Scipioni, L., Maccarrone, M., 2018. Neuroprotection by (endo) Cannabinoids in glaucoma and retinal neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 959–970. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170724104305>.
- Reiter, C.E.N., Sandirasegarane, L., Wolpert, E.B., Klinger, M., Simpson, I.A., Barber, A.J., Antonetti, D.A., Kester, M., Gardner, T.W., 2003. Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E763–E774. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00507.2002>.
- Savinainen, J.R., Saario, S.M., Laitinen, J.T., 2012. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol.* 204, 267–276. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02280.x>.
- Schlosburg, J.E., Blankman, J.L., Long, J.Z., Nomura, D.K., Pan, B., Kinsey, S.G., Nguyen, P.T., Ramesh, D., Booker, L., Burston, J.J., Thomas, E.A., Selley, D.A., Sim-Selley, L.J., Liu, Q.S., Lichtman, A.H., Cravatt, B.F., 2010. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* 13, 1113–1119. <https://doi.org/10.1038/nn.2616>.
- Schmid, H., Renner, M., Dick, H.B., Joachim, S.C., 2014. Loss of inner retinal neurons after retinal ischemia in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 2777. <https://doi.org/10.1167/iov.13-13372>.
- Shields, C.M., Zvonok, N., Zvonok, A., Makriyannis, A., 2019. Biochemical and proteomic characterization of recombinant human alpha/beta hydrolase domain 6. *Sci. Rep.* 9, 890. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36633-4>, 2019/01/31.
- Shu-Jung Hu, S., Arnold, A., Hutchens, J.M., Radicke, J., Cravatt, B.F., Wager-Miller, J., Mackie, K., Straiker, A., 2010. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 518, 3848–3866. <https://doi.org/10.1002/cne.22429>.
- Spyridakos, D., Papadogkonaki, S., Dionysopoulou, S., Mastrodimou, N., Polioudaki, H., Thermos, K., 2021. Effect of acute and subchronic administration of (R)-WIN55,212-2 induced neuroprotection and anti inflammatory actions in rat retina: CB1 and CB2 receptor involvement. *Neurochem. Int.* 142, 104907. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104907>.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 96, 14565–14570. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14565>.
- Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., Gokoh, M., 2006. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog. Lipid Res.* 45, 405–446. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.03.003>.
- Tchantchou, F., Zhang, Y., 2013. Selective inhibition of alpha/beta-hydrolase domain 6 attenuates neurodegeneration, alleviates blood brain barrier breakdown, and improves functional recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 30, 565–579. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2647>.
- Toda, N., Nakanishi-Toda, M., 2007. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 205–238. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.01.004>.
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S.H., Davis, R.J., 1995. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* 359, 133–136. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00027-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00027-7).
- Wen, J., Ribeiro, R., Tanaka, M., Zhang, Y., 2015. Activation of CB2 receptor is required for the therapeutic effect of ABHD6 inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropharmacology* 99, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.010>.
- West, J.M., Zvonok, N., Whitten, K.M., Vadivel, S.K., Bowman, A.L., Makriyannis, A., 2012a. Biochemical and mass spectrometric characterization of human N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition. *PLoS One* 7, 43877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043877>.
- West, J.M., Zvonok, N., Whitten, K.M., Wood, J.T., Makriyannis, A., 2012b. Mass spectrometric characterization of human N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase. *J. Proteome Res.* 11, 972–981. <https://doi.org/10.1021/pr200735a>.
- Yazulla, S., 2008. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog. Retin. Eye Res.* 27, 501–526. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.07.002>.
- Zhang, J., Chen, C., 2017. Alleviation of neuropathology by inhibition of monoacylglycerol lipase in APP transgenic mice lacking CB2 receptors. *Mol. Neurobiol.* 55, 4802–4810. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0689-x>.
- Zhong, H.-Y., Yang, Z., Qiu, Z., Lei, S.-Q., Xia, Z.-Y., 2019. The neuroprotective mechanism of 2-arachidonoylglycerol 2-AG against non-caspase-dependent apoptosis in mice hippocampal neurons following MCAO. *Neuropsychiatric Dis. Treat.* 15, 2417–2424. <https://doi.org/10.2147/ndt.s208094>.
- Zvonok, N., Pandarinathan, L., Williams, J., Johnston, M., Karageorgos, I., Janero, D.R., Krishnan, S.C., Makriyannis, A., 2008. Covalent inhibitors of human monoacylglycerol lipase: ligand-assisted characterization of the catalytic site by mass spectrometry and mutational analysis. *Chem. Biol.* 15, 854–862. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.06.008>.



Article

Blockade of CB1 or Activation of CB2 Cannabinoid Receptors Is Differentially Efficacious in the Treatment of the Early Pathological Events in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Dimitris Spyridakos ¹, Niki Mastrodimou ¹, Kiran Vemuri ², Thanh C. Ho ² , Spyros P. Nikas ² ,
Alexandros Makriyannis ² and Kyriaki Thermos ^{1,*}

¹ Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece

² Center for Drug Discovery, Departments of Chemistry and Chemical Biology and Pharmaceutical Sciences, Northeastern University, Boston, MA 02115, USA

* Correspondence: thermos@uoc.gr

Abstract: Oxidative stress, neurodegeneration, neuroinflammation, and vascular leakage are believed to play a key role in the early stage of diabetic retinopathy (ESDR). The aim of this study was to investigate the blockade of cannabinoid receptor 1 (CB1R) and activation of cannabinoid receptor 2 (CB2R) as putative therapeutics for the treatment of the early toxic events in DR. Diabetic rats [streptozotocin (STZ)-induced] were treated topically (20 μ L, 10 mg/mL), once daily for fourteen days (early stage DR model), with SR141716 (CB1R antagonist), AM1710 (CB2R agonist), and the dual treatment SR141716/AM1710. Immunohistochemical-histological, ELISA, and Evans-Blue analyses were performed to assess the neuroprotective and vasculoprotective properties of the pharmacological treatments on diabetes-induced retinal toxicity. Activation of CB2R or blockade of CB1R, as well as the dual treatment, attenuated the oxidative stress induced by diabetes. Both single treatments protected neural elements (e.g., RGC axons) and reduced vascular leakage. AM1710 alone reversed all toxic insults. These findings provide new knowledge regarding the differential efficacies of the cannabinoids, when administered topically, in the treatment of ESDR. Cannabinoid neuroprotection of the diabetic retina in ESDR may prove therapeutic in delaying the development of the advanced stage of the disease.

Keywords: early stage diabetic retinopathy; endocannabinoid system; cannabinoid receptors; neuroprotection; eye drops; oxidative stress; neuroinflammation; neurodegeneration; vascular leakage



Citation: Spyridakos, D.; Mastrodimou, N.; Vemuri, K.; Ho, T.C.; Nikas, S.P.; Makriyannis, A.; Thermos, K. Blockade of CB1 or Activation of CB2 Cannabinoid Receptors Is Differentially Efficacious in the Treatment of the Early Pathological Events in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 240. <https://doi.org/10.3390/ijms24010240>

Academic Editor: Stephanie C. Joachim

Received: 3 October 2022

Revised: 19 December 2022

Accepted: 20 December 2022

Published: 23 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The global prevalence of Diabetic Retinopathy (DR) constitutes an alarming health problem. Approximately 4.4 million people worldwide are estimated to be diagnosed with DR, of which one million are blind, and 3.3 million have some kind of vision impairment [1]. DR has recently been categorized into two stages, the early and advanced stages (ESDR and ASDR, respectively). Ophthalmoscopic findings, such as no abnormalities, mild non-proliferative DR (NPDR), and moderate NPDR, are evident in the ESDR, whereas severe NPDR, diabetic macular edema (DME) and proliferative diabetic retinopathy (PDR) in ASDR [2].

Diabetes disturbance of the neurovascular unit (NVU) homeostasis is the main cause of the development of ESDR. The term NVU describes the functional interaction and interdependence among neural, glial, and vascular cells in the retina [3]. Hyperglycemia-induced oxidative stress [4], inflammation [5], and downregulation of pro-survival neurotrophic factors [6] lead to retinal cell damage, such as the progressive degeneration of endothelial cells and pericytes, which are responsible for maintaining the blood–retina barrier (BRB) integrity [7]. Neurodegeneration of retinal neurons has been reported in the pathology of ESDR, with substantial evidence suggesting that neurodegeneration precedes vascular

abnormalities [8,9]. Therefore, oxidative stress [10], neuroinflammation [11], neurodegeneration [12], and vascular leakage [13] are all essential components in ESDR pathology.

The endocannabinoid system (ECS) is comprised of the endocannabinoids *N*-arachidonylethanolamine (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), the enzymes that metabolize and synthesize them, and the receptors, cannabinoid receptor 1 (CB1R) and 2 (CB2R). Both receptors belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily consisting of receptors coupled to pertussis toxin-sensitive inhibitory Gi/o proteins that control a variety of intracellular signaling pathways [14]. All members of the ECS are found in the retina [15]. CB1Rs display extensive expression in various neuronal cell populations, as well as in their synaptic connections [16,17]. CB2Rs can be found mainly in macroglia [18] and microglia [19,20], where they play a crucial role in regulating inflammatory responses [21].

Due to its pleiotropic properties, ECS has been studied as a target for the development of neuroprotective and anti-inflammatory strategies for brain and retinal neurodegenerative diseases [amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Parkinson's disease, multiple sclerosis, glaucoma] [22]. In the retina, numerous studies have shown that CB1R agonists mediate neuroprotective actions against ischemic [23] and excitotoxic insults [20,24–26].

However, CB1R activation has also been shown to induce oxidative damage, pro-inflammatory responses [27,28] and to enhance cell apoptosis [29] in various animal models of disease. Blockade of CB1R activation was shown to reduce cell death, oxidative stress, inflammation, and vascular damage in diseases arising from other diabetic complications, such as cardiopathy [30] and nephropathy [31,32]. In a rodent model of DR, it was shown that genetic or pharmacological blockade of CB1R reduced oxidative and nitrative stress and prevented retinal endothelial cell death, as determined by the co-localization of TUNEL-positive cells and the endothelial cell marker isolectin B4 [33]. This was also confirmed by *in vitro* studies, where CB1R antagonists (AM251, SR141716) attenuated oxidative damage and apoptosis in retinal pigment epithelial (RPE) cells exposed to high glucose [34,35]. In addition, SR141716 blocked photoreceptor and bipolar cell degeneration, decreased glial activation, and prevented the development of abnormal vascular complexes in the *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) model [36].

CB2R activation has been shown to attenuate inflammation, oxidative stress, and cell death [37,38]. In a mouse model of diabetic nephropathy (DN), AM1241 (CB2R agonist) prevented the development of various pathological aspects of the disease [39]. In the retina, HU-308 (CB2R agonist) decreased photoreceptor degeneration in a mouse model of age-related macular degeneration [40]. This is in agreement with previous findings from our laboratory, where we showed that the CB2R antagonist, AM630, diminished the neuroprotective and anti-inflammatory actions of the synthetic cannabinoid (*R*)-WIN55,212-2 (CB1R/CB2R agonist) in the *in vivo* retinal model of AMPA excitotoxicity [20].

The current treatments in clinical practice are efficacious in treating DME and neovascularization, thus focusing on the treatment of ASDR [2]. The discovery of new therapeutics for ESDR, agents that are neuroprotective, anti-inflammatory, and vasculoprotective against diabetic insults, is essential in order to curtail the development of DME/PDR, the eyesight-threatening pathologies.

In order to study the early pathological events of DR and their treatment, we employed the experimental rat model of STZ-induced DR because rats have (a) many similarities to humans (genetic, anatomical, and physiological), (b) very short reproduction cycle and (c) low cost of breeding.

The basic objective of the present study was to investigate the effects of the selective CB1R antagonist, SR141716, and CB2R agonist, AM1710, administered topically as eye drops to the diabetic retina, in preventing the development of nitrative stress, neuroinflammation, neurodegeneration and vascular damage during ESDR. We also examined whether the dual treatment of the above agents exhibited improved efficacy over single treatments. Our findings suggest that the three different cannabinoid treatments examined in our study protect, in a differential manner, the diabetic retina against the four pathologies of ESDR.

2. Results

2.1. Effect of STZ-Induced Diabetes on Glucose Levels and the Weight of Animals

Measurement of blood glucose levels was performed at three different time points, one day before, one day after, and fourteen days after STZ administration. No differences were observed in glucose levels in the five experimental groups of animals before STZ administration (Control: $n = 8$, 93 ± 7.05 ; diabetic untreated: $n = 8$, 93 ± 11.88 ; AM1710: $n = 8$, 92.25 ± 7.88 ; SR141716: $n = 8$, 91.75 ± 6.27 ; AM1710 + SR141716: 91.75 ± 6.05 , $p > 0.05$ compared to Control (Figure S1A). One day post initiation of diabetes by STZ, all diabetic animals (untreated and treated) displayed a marked increase in their blood glucose levels compared to Control (Control: $n = 8$, 92.5 ± 4.34) animals (diabetic untreated: $n = 8$, 497.87 ± 52.14 ; AM1710: $n = 8$, 494.37 ± 56.51 ; SR141716: $n = 8$, 496.5 ± 66.48 ; AM1710 + SR141716: $n = 8$, 495.87 ± 54.95 , **** $p < 0.0001$ compared to Control) (Figure S1A). The blood glucose levels of all diabetic animals remained elevated fourteen days after STZ administration, compared to Control (Control: $n = 8$, 92.62 ± 6.25) animals (diabetic untreated: $n = 8$, 595.62 ± 7.72 ; AM1710: $n = 8$, 599.12 ± 1.80 ; SR141716: $n = 8$, 594.5 ± 6.67 ; AM1710 + SR141716: $n = 8$, 586.37 ± 11.52 , **** $p < 0.0001$ compared to Control). There was no statistically significant ($p > 0.05$) difference between untreated and treated diabetic animals (Figure S1A).

The effect of STZ administration on the weight of the experimental animals was measured one day prior to STZ treatment and fourteen days after STZ. There was no significant variation ($p > 0.05$) in the weight of the five different groups of animals before STZ administration (Control: $n = 8$, 259.87 ± 9.47 ; diabetic untreated: $n = 8$, 257.46 ± 7.78 ; AM1710: $n = 8$, 261.18 ± 6.08 ; SR141716: $n = 8$, 258.47 ± 8.48 ; AM1710 + SR141716: $n = 8$, 257.42 ± 7.64) (Figure S1B). Fourteen days after STZ injection, the weight of all diabetic animals was significantly reduced compared to Control (Control: $n = 8$, 259.37 ± 9.10) animals (diabetic untreated: $n = 8$, 235.5 ± 10.67 , ** $p = 0.0067$ compared to Control; AM1710: $n = 8$, 236.52 ± 6.32 , ** $p = 0.0052$ compared to Control; SR141716: $n = 8$, 237.4 ± 5.93 , ** $p = 0.0023$ compared to Control; AM1710 + SR141716: $n = 8$, 235.25 ± 4.02 , ** $p = 0.0045$ compared to Control) (Figure S1B). No significant difference ($p > 0.05$) in weight was observed among all diabetic groups (Figure S1B).

2.2. CB2R Activation, CB1R Blockade or Their Combination Rescues Ganglion Cells Axons in the Diabetic Retina

The CB2R agonist, AM1710, and the CB1R antagonist, SR141716, administered either alone or in combination, rescued ganglions cell axons from diabetes-induced damage in the retina, as shown by neurofilament (immunoreactivity (NFL-IR) (Figure 1A,B). Quantification studies showed that diabetic untreated animals exhibited a reduction in the intensity of NFL-IR, about 38% compared to Control (Control: $n = 15$, 100.00 ± 11.46 ; diabetic untreated: $n = 11$, 62.96 ± 16.73 , **** $p < 0.0001$ compared to Control) (Figure 1B). A single treatment with AM1710 reversed NFL-IR in diabetic retinas (AM1710: $n = 7$, 83.66 ± 13.25 , # $p = 0.0403$ compared to diabetic untreated) with no statistical difference from the control; $p > 0.05$ compared to Control), whereas SR141716 restored fully NFL-IR (SR141716: $n = 6$, 94.99 ± 20.09 , #### $p = 0.0008$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 1B). There was no statistically significant difference in the efficacy of the two treatments (AM1710, $p > 0.05$ compared to SR141716) (Figure 1B). Combined treatment with both AM1710 and SR141716 also diminished diabetes-induced reduction in NFL-IR intensity (AM1710 + SR141716: $n = 8$, 101.10 ± 13.08 , ##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control), but a statistically significant difference was not observed between the combined and single treatments (AM1710 + SR141716: $p > 0.05$ compared to AM1710 or SR141716 alone) (Figure 1B).

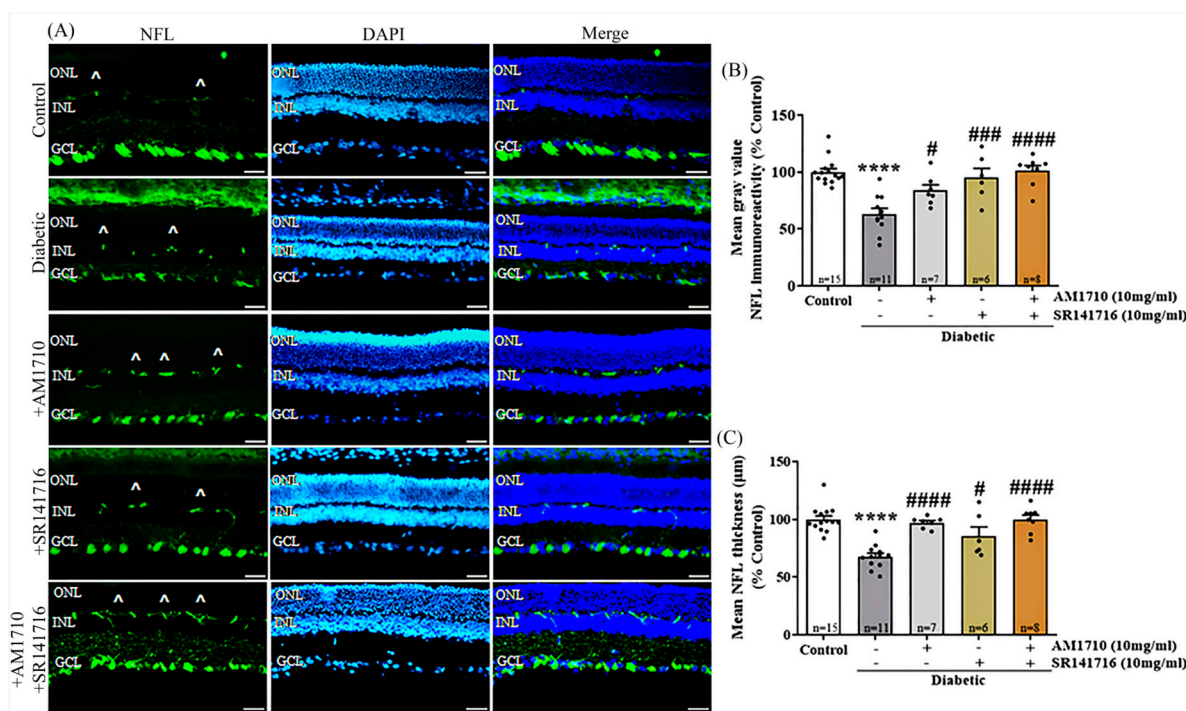


Figure 1. Effect of cannabinoid treatment on ganglion cell axons in the diabetic retina. **(A)** Representative photomicrographs of NFL immunoreactivity (NFL-IR). Artifacts are depicted by the marker (^). Magnification: 20 \times . Scalebar: 50 μ m. **(B)** Quantification studies of NFL-IR: Diabetes attenuated NFL-IR (**** $p < 0.0001$ compared to Control). Both AM1710 and SR141716 reversed the diabetes effect (AM1710; # $p = 0.0403$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, and SR141716; #### $p = 0.0008$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control). The dual treatment with AM1710 + SR141716 displayed a similar action by restoring NFL-IR (##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710 or SR141716). **(C)** Diabetes induced a significant decrease in NFL thickness (**** $p < 0.0001$ compared to Control). AM1710 and SR141716 reversed the diabetes effect (AM1710; ##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, and SR141716; # $p = 0.0183$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control). Dual treatment with AM1710 + SR141716 blocked the diabetes-induced reduction in NFL thickness (##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control $p > 0.05$ compared to AM1710 or SR141716). Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Similar results were also obtained by the analysis of NFL thickness (Control: 100.00 \pm 11.07; diabetic untreated: 67.71 \pm 10.36, **** $p < 0.0001$ compared to Control; AM1710: 97.06 \pm 4.88, ##### $p < 0.0001$ compared to Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control; SR141716: 85.73 \pm 18.81, # $p = 0.0183$ compared to Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710) (Figure 1C). The combination of AM1710 and SR141716 blocked the diabetes-induced reduction in NFL thickness with the same efficacy as the single cannabinoid treatments (AM1710 + SR141716: 99.80 \pm 11.00, ##### $p < 0.0001$ compared to Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710, $p > 0.05$ compared to SR141716) (Figure 1C). CF488A goat anti-mouse IgG (H + L) (1:400) stained the OPL and barely the GCL (Figure S2A). Therefore, the staining observed mainly in the OPL in Figure 1A is an artifact of the secondary antibody, as stated in the legend of Figure 1. No stain was observed with the Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG ((H + L) (1:1000) (Figure S2B) or with the CF543 goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:1000) (Figure S2C).

2.3. Single Cannabinoid Treatment Blocks in a Differential Manner the Diabetes-Induced Reduction in Retinal Thickness: Diabetes Had No Effect on Ganglion Cells

Cannabinoid treatment with either the CB2R agonist (AM1710) or the CB1R antagonist (SR141716) restored retinal thickness, as shown by the H&E analysis. (Figure 2A,B). Quantitative analysis of the micrographs revealed a significant diabetes-induced reduction of the total retinal thickness (Control: $n = 5$, 100.00 ± 7.90 ; diabetic untreated: $n = 4$, 80.11 ± 4.86 , **** $p < 0.0001$ compared to Control) (Figure 2B). Treatment with the CB2R agonist, AM1710, partially restored retinal thickness (AM1710: $n = 5$, 91.33 ± 3.07 , # $p = 0.0271$ compared to diabetic untreated, * $p = 0.0161$ compared to Control), while the CB1R antagonist, fully restored retinal thickness, in levels similar to the Control retinas (SR141716: $n = 5$, 96.06 ± 3.50 , ## $p = 0.0019$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control). Analysis of the three separate retinal nuclear layers, ONL, INL, and GCL (outer nuclear layer, inner nuclear layer, ganglion cell layer), revealed a statistically significant reduction only in the thickness of the INL (Control: $n = 5$, 100 ± 5.6 ; diabetic untreated: $n = 4$, 70.57 ± 2.10 , ** $p = 0.0034$ compared to Control), while both single cannabinoid treatments were able to fully restore this reduction (AM1710: $n = 5$, 97.50 ± 7.77 , # $p = 0.0244$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control; SR141716: $n = 5$, 95.42 ± 6.93 , # $p = 0.0383$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 2C). In the same sections, we also counted the number of ganglion cells in the GCL, but we did not observe any statistically significant reduction due to diabetes (Control: $n = 5$, 104.30 ± 17.17 ; diabetic untreated: $n = 4$, 106.10 ± 12.33 , $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 2D).

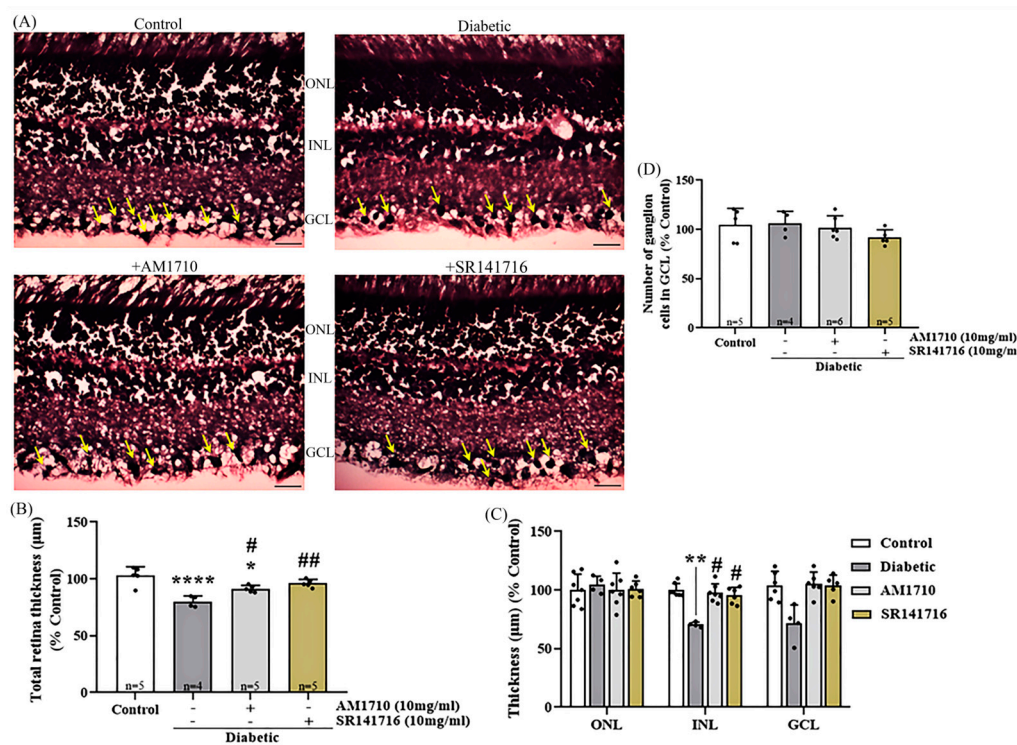


Figure 2. Effect of cannabinoid treatment in the thickness of retinal tissue. (A) Representative photomicrographs of H & E stained retinal tissue. Ganglion cells (black) are depicted with yellow arrows. Magnification $20\times$. Scalebar: $50\ \mu\text{m}$. (B) Quantification analysis of the whole retinal tissue thickness, measured from the retinal pigment epithelium (RPE) to the ganglion cell layer (GCL). Diabetes induced a significant reduction in the total thickness of the retina (**** $p < 0.0001$ compared to Control). Administration of AM1710 partially blocked the reduction in the thickness of the diabetic retina (* $p = 0.0161$ compared to Control, # $p = 0.0271$ compared to diabetic untreated). SR141716 displayed similar actions ($p > 0.05$ compared to Control, ## $p = 0.0019$ compared to diabetic untreated).

(C) Quantitative analysis of the thickness of three separate nuclear retinal layers, outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL), and GCL. Diabetes had no effect on the thickness of ONL ($p > 0.05$ compared to Control). INL: The thickness of INL in the diabetic retinas was significantly thinner compared to the retina of Control animals (** $p = 0.0034$ compared to Control). Treatment with either the CB2R agonist (AM1710; # $p = 0.0244$ compared to Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) or CB1R antagonist (SR141716; # $p = 0.0383$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control), reversed this reduction of thickness. GCL: The thickness of GCL remained unaffected by diabetes ($p > 0.05$ compared to Control). (D) Quantitative analysis of the ganglion cell population in GCL. The number of ganglion cells in GCL remains unaltered by diabetes ($p > 0.05$ compared to Control). Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of data on panels (B,D), followed by Tukey's multiple comparison test. Two-way ANOVA was employed for the analysis of separate layers' thickness on panel (C), followed by Sidak's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

2.4. Effect of Single Cannabinoid and Dual Treatment on bNOS Expressing Amacrine Cells in the Diabetic Retina: Differential Neuroprotection Effects

Administration via eyedrops of AM1710 reversed the diabetes-induced loss of bNOS expressing retinal amacrine cells, but SR141716 had no effect (Figure 3A,B). As depicted by the quantitative analysis, diabetes caused a reduction in the number of bNOS expressing retinal amacrine cells, about 27% compared to Control retinas (Control: $n = 12$, 100.00 ± 6.48 ; diabetic untreated: $n = 13$, 73.47 ± 10.80 , **** $p < 0.0001$ compared to Control) (Figure 3B). A single treatment with the CB2R agonist, AM1710, fully restored the number of bNOS expressing amacrine cells to levels similar to Control (AM1710: $n = 7$, 104.90 ± 12.26 , ##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 3B). In contrast, a single treatment with the CB1R antagonist, SR141716, did not display any protection (SR141716: $n = 5$, 60.51 ± 11.28 , $p > 0.05$ compared to diabetic untreated, **** $p < 0.0001$ compared to Control, +++++ $p < 0.0001$ compared to AM1710) (Figure 3B). The dual cannabinoid treatment (AM1710 + SR141716) displayed a similar neuroprotective action as that of the treatment with AM1710 (AM1710 + SR141716: $n = 8$, # $p = 0.0192$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, +++ $p = 0.0003$ compared to SR141716, + $p = 0.0388$ compared to AM1710) (Figure 3B).

2.5. CB2R Activation but Not CB1R Blockade Reverses Caspase 3-Dependent Apoptotic Cell Death in the Diabetic Retina

Single cannabinoid treatment with the CB2R agonist reduced diabetes-induced apoptotic cell death in the retina, as shown by cleaved caspase 3 immunoreactivity (cl.caspase 3-IR) (Figure 4A,B). Quantitative analysis of cl. caspase 3-IR revealed an increase in the number of cl. caspase 3 positive cells in the INL of diabetic rats compared to Control (Control: $n = 5$, 100.00 ± 33.71 ; diabetic untreated: $n = 5$, 217.40 ± 29.84 , *** $p = 0.0004$ compared to Control). Application of the CB2R agonist AM1710 via eye drops blocked this effect by keeping the number of cl. caspase 3 positive cells, in levels similar to those of Control retinas (AM1710: $n = 6$, 126.70 ± 42.53 , ## $p = 0.0038$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 4B). In contrast, when examining the effect of the CB1R antagonist, there was no effect in cl. caspase 3-IR (SR141716: $n = 7$, 166.60 ± 39.41 , $p > 0.05$ compared to diabetic untreated, * $p = 0.0308$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710) (Figure 4B).

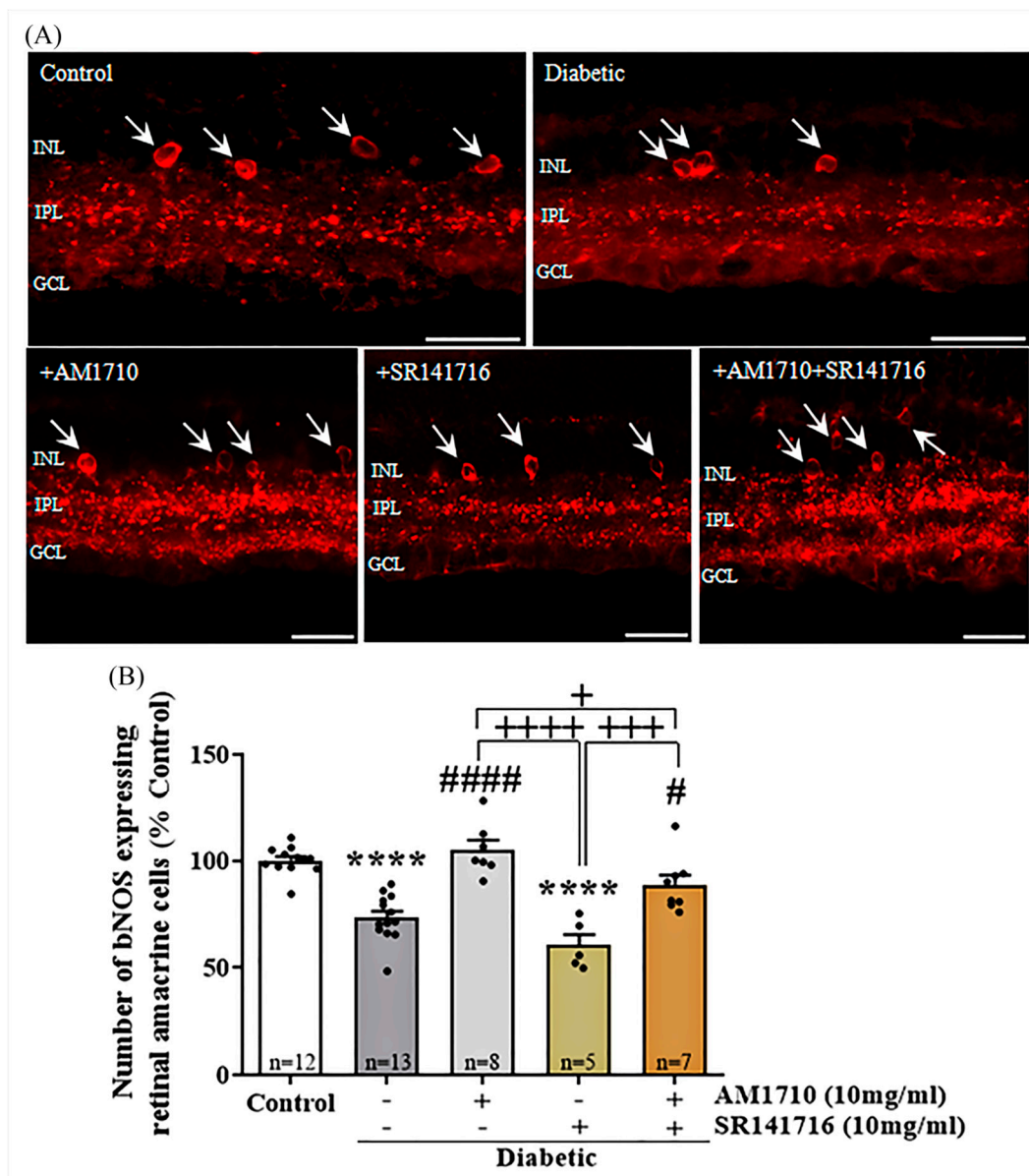


Figure 3. Effect of cannabinoid treatment on the nitric oxide synthetase (bNOS) expressing retinal amacrine cell viability in the diabetic retina. (A) Representative photomicrographs of bNOS immunoreactivity (bNOS-IR). White arrows indicate bNOS expressing retinal amacrine cells. Magnification: 40 \times . Scale bar: 50 μ m. (B) Quantification of bNOS-IR: Diabetes attenuated in a statistically significant manner the number of bNOS expressing retinal amacrine cells, compared to Control animals (**** $p < 0.0001$ compared to Control). AM1710 reversed the diabetes effect (##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control). SR141716 had no effect ($p > 0.05$ compared to diabetic untreated, **** $p < 0.0001$ compared to Control, +++++ $p < 0.0001$ compared to AM1710). The dual treatment, AM1710+ SR141716, blocked diabetes-induced loss of bNOS⁺ cells (# $p = 0.0192$ compared to diabetic untreated, + $p = 0.0388$ compared to AM1710, +++ $p = 0.0003$ compared to SR141716). Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

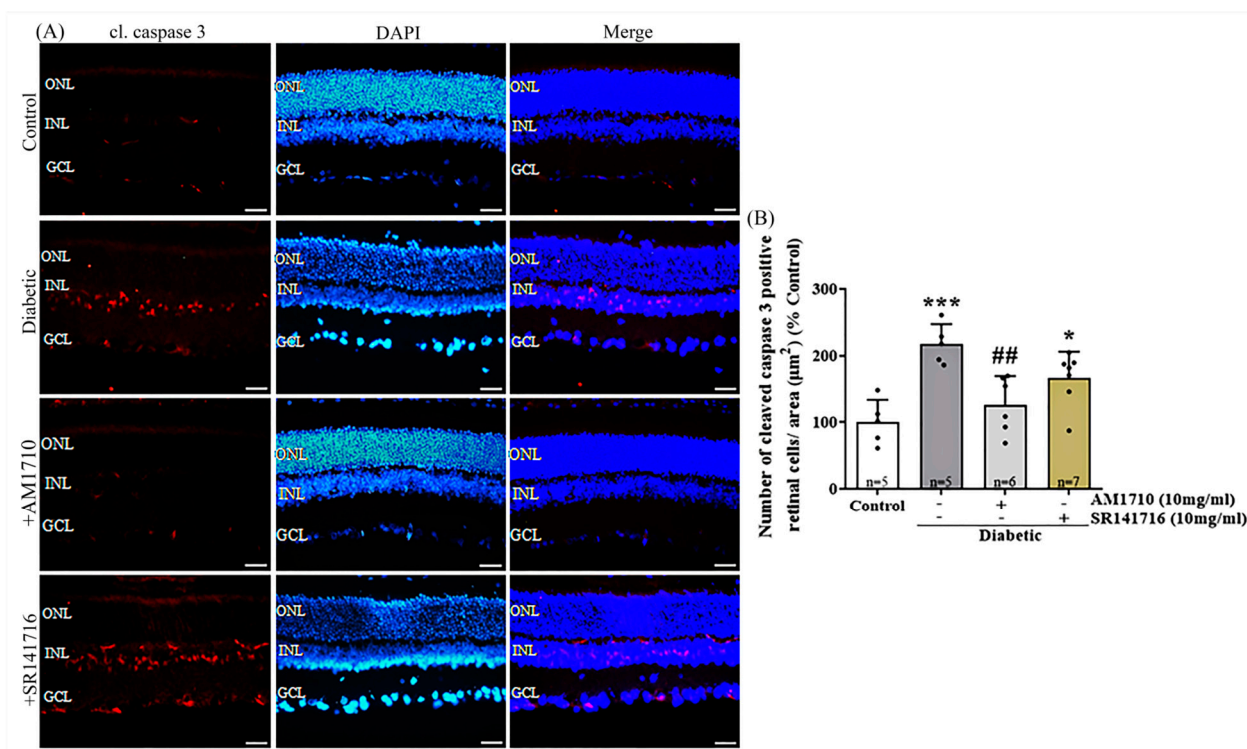


Figure 4. Effect of cannabinoid treatment on cl. caspase-3 dependent apoptosis in the diabetic retina. (A) Representative photomicrographs of cleaved caspase-3 immunoreactivity (cl. caspase 3-IR). Magnification: 20 \times . Scalebar: 50 μ m. (B) Quantification studies of cl. caspase 3-IR: Diabetes induced an increase in apoptotic caspase 3⁺ cells in the INL of diabetic rats (***p* = 0.0004 compared to Control). AM1710 reversed the diabetes effect (### *p* = 0.0038 compared to diabetic untreated, *p* > 0.05 compared to Control). SR141716 (had no effect (*p* > 0.05 compared to diabetic untreated, * *p* = 0.0308 compared to Control, *p* > 0.05 compared to AM1710). Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when *p* < 0.05.

2.6. CB2R Activation Reverses to Control Levels the Diabetes Induced Macroglia Activation

GFAP stains astrocytes and Müller cells. In this study, GFAP was employed as a marker of Müller cell activation. Activation of CB2Rs by AM1710 and blockade of CB1Rs by SR141716 reduced macroglia activation in the diabetic rat retina, as shown by GFAP IR analysis (Figure 5A,B). Quantification studies revealed a significant increase in GFAP staining in the retina of diabetic animals (Control: *n* = 9, 2.55 \pm 0.65; diabetic untreated: *n* = 9, 4.39 \pm 0.57, **** *p* < 0.0001 compared to Control) (Figure 6B). Only in the presence of AM1710, but not SR141716, the intensity of GFAP-IR was able to be fully restored to Control levels (AM1710: *n* = 5, 2.46 \pm 0.50, ##### *p* < 0.0001 compared to diabetic untreated, *p* > 0.05 compared to Control; SR141716: *n* = 6, 4.09 \pm 0.62, *p* > 0.05 compared to diabetic untreated, *p* = 0.0003 compared to Control, +++ *p* = 0.0008 compared to AM1710) (Figure 5B). The combined treatment, AM1710, and SR141716, was not effective in reducing GFAP expression in the diabetic retina (AM1710 + SR141716: *n* = 6, 4.61 \pm 0.41, *p* > 0.05 compared to diabetic untreated, **** *p* < 0.0001 compared to Control, +++++ *p* < 0.0001 compared to AM1710, *p* > 0.05 compared to SR141716) (Figure 5B).

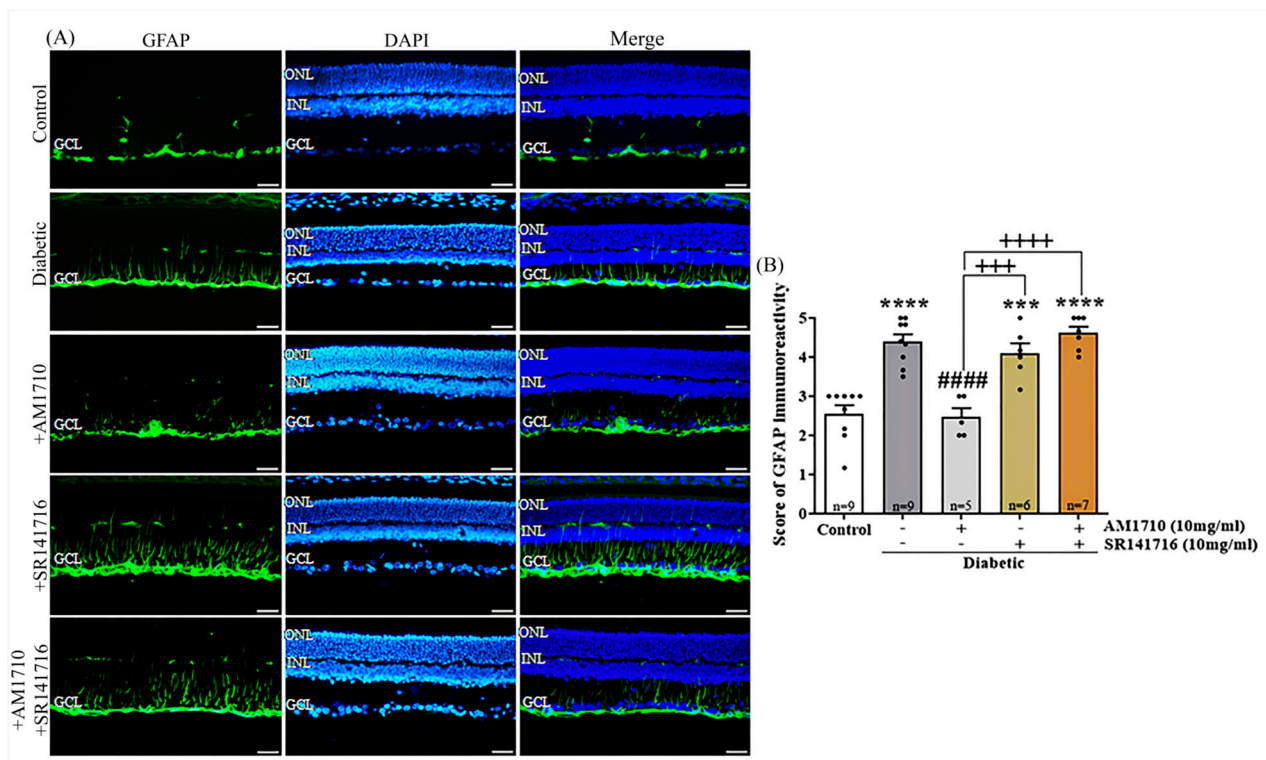


Figure 5. Effect of cannabinoid treatment on Müller cell activation in the diabetic retina. **(A)** Representative photomicrographs of GFAP immunoreactivity (GFAP-IR). Magnification: 20 \times . Scalebar: 50 μ m. **(B)** Quantification studies of GFAP IR. Diabetes increased reactive Müller cells (**** $p < 0.0001$ compared to Control). AM1710 restored GFAP-IR to Control levels (##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control). SR141716 did not affect the diabetes-induced upregulation in GFAP-IR ($p > 0.05$ compared to diabetic untreated, *** $p = 0.0003$ compared to Control, +++ $p = 0.0008$ compared to AM1710). Dual treatment with AM1710+ SR141716 failed to block the diabetes-induced increase in GFAP expression ($p > 0.05$ compared to diabetic untreated, **** $p < 0.0001$ compared to Control, ++++ $p < 0.0001$ compared to AM1710). Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

2.7. CB2R Activation Reduces the Diabetes-Induced Microglia Activation and TNF α Levels

An antibody against Iba1 [resident macrophage (microglia) marker] was employed in order to assess the effect of diabetes on microglia activation in the retina and the role of CB2R and CB1R in this process (Figure 6A,B). Quantification studies, based on the characteristic morphology of resident macrophages (see Spyridakos et al. [20]), revealed that diabetes led to an increase in the number of Iba1⁺ cells compared to Control animals (Control: $n = 9$, 100.00 ± 30.32 ; diabetic untreated: $n = 12$, 256.8 ± 101.1 , *** $p = 0.0004$ compared to Control) (Figure 6B). Single treatment, using the CB2R agonist AM1710, fully suppressed the activation of microglia, as seen by the reduced number of reactive microglial cells in the treated retina (AM1710: $n = 6$, 102.30 ± 51.44 , ## $p = 0.0010$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 6B). On the other hand, the single treatment with the CB1R antagonist, SR141716, was not able to reduce the number of reactive microglial cells in a statistically significant manner (SR141716: $n = 6$, 183.1 ± 60.25 , $p > 0.05$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710) (Figure 6B) nor did the dual AM1710/SR141716 treatment (AM1710 + SR141716: $n = 5$, 273.9 ± 101.2 , $p > 0.05$ compared to diabetic untreated, ** $p = 0.0047$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to SR141716, + $p = 0.0106$ compared to AM1710) (Figure 6B).

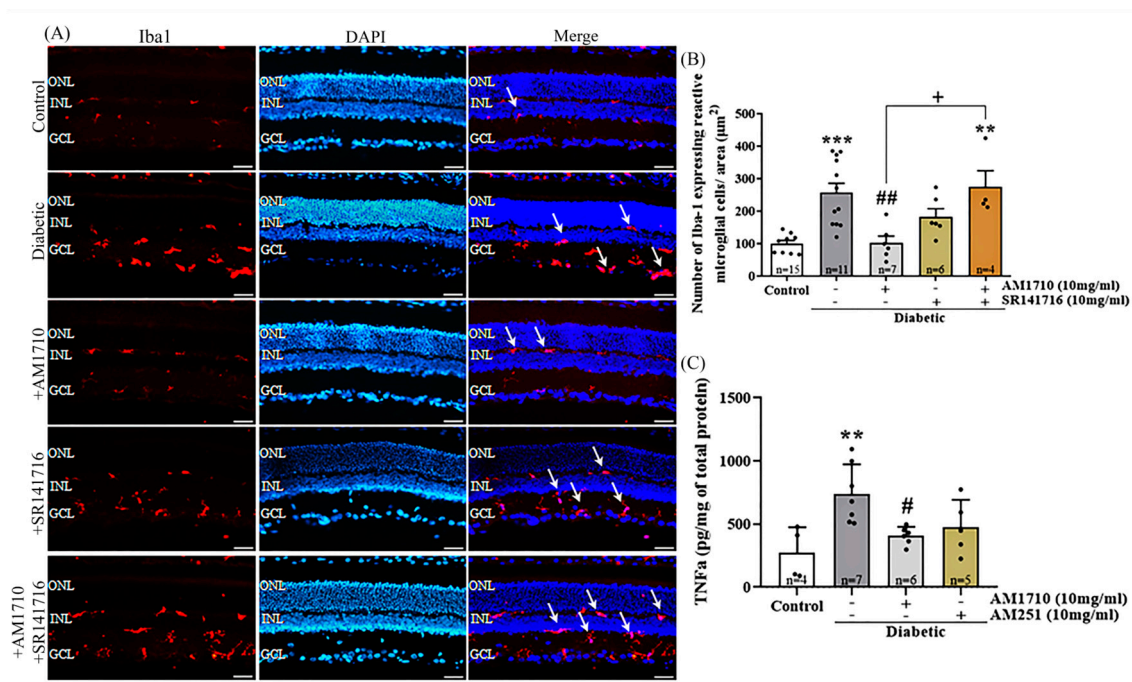


Figure 6. Effect of cannabinoid treatment on macrophage (microglia) activation and pro-inflammatory cytokine (TNF α) release in the diabetic retina. **(A)** Representative photomicrographs of Iba1 immunoreactivity (Iba1-IR). White arrows indicate reactive microglial cells. Magnification: 20 \times . Scale-bar: 50 μ m. **(B)** Quantification studies of Iba1-IR: Diabetes increased in a statistically significant manner the number of reactive Iba1⁺ cells (** p = 0.0004 compared to Control). AM1710 reduced Iba1⁺ activation (** p = 0.0010 compared to diabetic untreated, p > 0.05 compared to Control), while SR141716 had no statistically significant effect (p > 0.05 compared to diabetic untreated, p > 0.05 compared to Control, p > 0.05 compared to AM1710). Dual treatment with AM1710 + SR141716 had no effect on the number of reactive Iba1⁺ cells (p > 0.05 compared to diabetic untreated, ** p = 0.0047 compared to Control, $^+$ p = 0.0106 compared to AM1710, p > 0.05 compared to SR141716). **(C)** Quantitative analysis of TNF α levels Diabetes-induced upregulation in TNF α levels in the diabetic retinas (** p = 0.0055 compared to Control). AM1710 attenuated this diabetes effect ($^{\#}$ p = 0.0290 compared to diabetic untreated, p > 0.05 compared to Control). No statistically significant effect on TNF α levels was observed by the SR141716 (p > 0.05 compared to diabetic untreated, p > 0.05 compared to Control). Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when p < 0.05.

The levels of TNF α in the retina were statistically significantly increased in the diabetic retinas, compared to Control (Control: n = 4, 271.3 \pm 203.2; Diabetic untreated: n = 7, 739.3 \pm 235.2, ** p = 0.0055 compared to Control). AM1710, reduced the diabetes induced elevated levels of TNF α (AM1710: n = 6, 408.00 \pm 70.09, $^{\#}$ p = 0.0290 compared to Diabetic untreated). The CB1R antagonist AM251 had no effect on TNF α elevated levels (AM251: n = 5, 476.4 \pm 215.3, p > 0.05 compared to diabetic untreated, p > 0.05 compared to Control, p > 0.05 compared to AM1710) (Figure 6C).

2.8. CB2R Activation, CB1R Blockade or Their Combination Reduces Nitritative Damage in Diabetic Retina

Cannabinoid treatment, via eye drops, for two weeks was able to reduce nitritative stress in STZ-treated rats, as observed by NT-IR (Figure 7A,B). Quantitative analysis of the data showed that diabetes induced an increase in the number of NT⁺ cells in the retina of STZ-treated rats, compared to Control animals (Control: n = 6, 100.00 \pm 81.10; diabetic

untreated: $n = 7$, 726.70 ± 73.33 , **** $p < 0.0001$ compared to Control) (Figure 7B). Administration of AM1710 caused a significant reduction in the number of NT⁺ cells in the diabetic retina (AM1710: $n = 5$, 287.9 ± 110.5 , ##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated animals, * $p = 0.0360$ compared to Control) (Figure 7B). A similar result was observed when employing the CB1R antagonist (SR141716: $n = 5$, 435.9 ± 156.1 , ### $p = 0.0004$ compared to diabetic untreated, **** $p < 0.0001$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710) (Figure 7B). The combined treatment with both AM1710 + SR141716 was the most efficacious among the three treatments, managing to reduce NT⁺ cells in diabetic retinas at levels relative to those of Control retinas (AM1710 + SR141716: $n = 7$, 101.1 ± 87.17 , ##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, + $p = 0.0243$ compared to AM1710, +++++ $p < 0.0001$ compared to SR141716 treated animals) (Figure 7B).

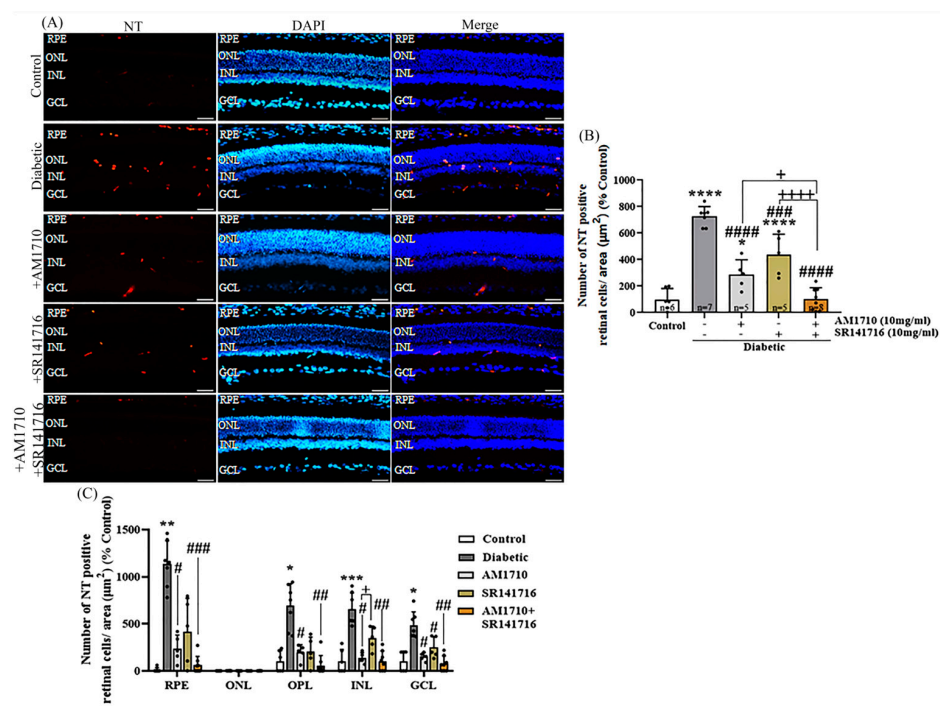


Figure 7. Effect of cannabinoid treatment on nitritative stress induced by diabetes in rat retina. (A) Representative photomicrographs of NT immunoreactivity (NT-IR). Magnification: 20 \times . Scalebar: 50 μm . (B) Quantification studies of NT-IR: Diabetes significantly increased the number of NT⁺ (**** $p < 0.0001$ compared to Control). eAM1710 reduced the number of NT⁺ cells in the diabetic retina (##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated animals, * $p = 0.0360$ compared to Control), and SR141716 had a similar effect (### $p = 0.0004$ compared to diabetic untreated, **** $p < 0.0001$ compared to Control, $p > 0.05$ compared to AM1710). The dual treatment AM1710 + SR141716 reversed to Control levels the diabetes-induced increase in nitritative stress (##### $p < 0.0001$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control, + $p = 0.0243$ compared to AM1710, +++++ $p = 0.0001$ compared to SR141716). (C) Quantification studies of NT-IR in separate retinal layers. Diabetes increased NT-IR in RPE (** $p < 0.0010$), OPL (* $p < 0.0161$), INL (***) $p < 0.0006$), and GCL (* $p < 0.0258$) compared to Control. AM1710 reduced NT-IR in RPE (# $p < 0.0177$), OPL (# $p < 0.0498$), INL (# $p < 0.0237$), and GCL (# $p < 0.0451$) compared to diabetic untreated. SR141716 displayed a statistically significant effect in reducing NT-IR in GCL (# $p < 0.0187$). The dual treatment fully reversed elevated NT-IR in RPE (#### $p < 0.0002$), OPL (## $p < 0.0013$), INL (## $p < 0.0033$), and GCL (## $p < 0.0037$), compared to diabetic untreated. Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of data on panel (B), followed by Tukey's multiple comparison test. Two-way ANOVA was employed for the analysis of separate layers' NT-IR on panel (C), followed by Sidak's multiple comparison test. Statistical significance, $p < 0.05$. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Quantitative analysis of the different retinal layers revealed that diabetes induced an increase in NT⁺ cells in RPE [1135.64 ± 245.12 , ** $p < 0.0010$ compared to Control (10 ± 24.49)], outer plexiform layer (OPL) [690.92 ± 234.68 , * $p < 0.0161$ compared to Control (100 ± 113.94)], INL [653.02 ± 173.59 , *** $p < 0.0006$ compared to Control (100 ± 126.07)], GCL [485.42 ± 141.33 , * $p < 0.0258$ compared to Control (100 ± 109.54)], but not in ONL ($p > 0.05$ compared to Control) (Figure 7C). AM1710 induced a statistically significant reduction in the number of NT⁺ cells in the previously mentioned layers (RPE: 0.85 ± 0.78 , # $p < 0.0177$; OPL: 196.70 ± 81.43 , # $p < 0.0498$; INL: 135.97 ± 56.89 , # $p < 0.0237$; GCL: 150.79 ± 42.26 , # $p < 0.0451$ compared to diabetic untreated) (Figure 7C). SR141716 reduced in a statistically significant manner only the number of NT⁺ cells in the GCL (RPE: 416.46 ± 353.76 , $p > 0.05$; OPL: 204.94 ± 153.05 , $p > 0.05$; INL: 351.74 ± 122.43 , $p > 0.05$; GCL: 248.87 ± 112.53 , # $p < 0.0187$ compared to Control) (Figure 7C). INL SR141716 also displayed a statistically significant difference with AM1710 (* $p < 0.0297$ compared to AM1710) (Figure 7C). AM1710 + SR141716 also reduced nitrate stress in retinal layers (RPE: 60.70 ± 93.19 , ### $p < 0.0002$; OPL: 58.30 ± 106.24 , ## $p < 0.0013$; INL: 103.72 ± 106.57 , ## $p < 0.0033$; GCL: 76.06 ± 81.55 , ## $p < 0.0037$ compared to diabetic untreated) (Figure 7C).

2.9. Cannabinoid Treatment Reduces the Diabetes-Induced Vascular Leakage

A colocalization study of CD-31, NT, and DAPI was performed in diabetic untreated animals in order to assess the effect of nitrate stress in endothelial cells in the diabetic retina. The study revealed that NT is co-localized with CD-31 positive vessels in GCL (Figure 8A), suggesting that endothelial cells in the diabetic retina are subjected to nitrate stress processes.

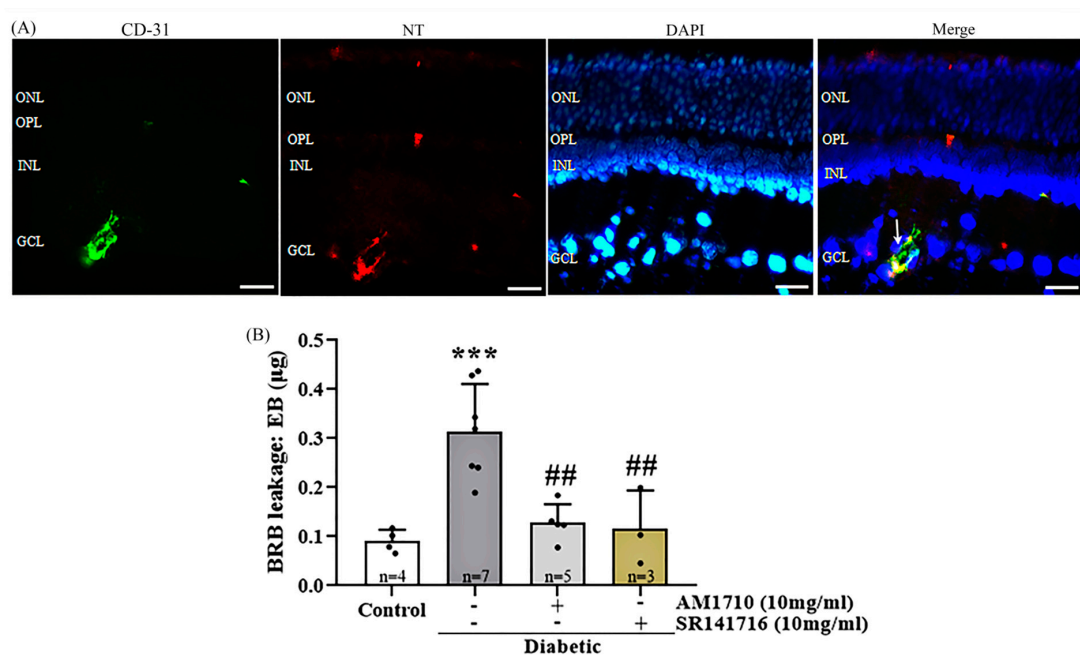


Figure 8. Effect of cannabinoid treatment on diabetes-induced blood–retinal barrier leakage. (A) Co-localization of CD-31, NT, and the nuclear marker DAPI. Representative photomicrograph of a diabetic untreated retina, showing that NT is colocalized with CD-31 in blood vessels in the GCL. White arrow marks the co-localization area. Magnification: 20×. Scalebar: 50 µm. (B) Quantitative analysis of EB data: Diabetes induced an increase in BRB leakage (** $p = 0.0007$ compared to Control). Treatment with either AM1710 (## $p = 0.0021$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) or SR141716 (## $p = 0.0048$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) blocked this effect. Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines a bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. One-way ANOVA was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey’s multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Evans-Blue (EB) levels were measured in the diabetic retinas of animals two weeks post-diabetes induction in order to assess the presence of vascular leakage in the early stage of DR. A marked increase in leakage was observed in the diabetic animals compared to Control animals (Control: $n = 4$, 0.09102 ± 0.01150 ; diabetic untreated; $n = 7$, 0.3146 ± 0.03621 , *** $p = 0.0007$ compared to Control) (Figure 8B). Topical administration of the CB2R agonist, AM1710, reduced vascular leakage in the diabetic retina to normal levels ($n = 5$, 0.1283 ± 0.01682 , ### $p = 0.0021$ compared to diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 8B). A similar reduction was also observed by the CB1R antagonist, SR141716 ($n = 3$, 0.1160 ± 0.04494 , ### $p = 0.0048$ compared to Diabetic untreated, $p > 0.05$ compared to Control) (Figure 8B).

3. Discussion

The findings presented in the current study provide new evidence suggesting that topical administration of AM1710 (CB2R agonist) and SR141716 (CB1R antagonist), alone and as dual treatment displayed, in a differential manner, antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, and vasculoprotective properties in the ESDR model. SR141716 (Rimonabant) is a widely used potent and selective CB1R antagonist [41], while AM1710 is a potent and selective CB2R agonist with very high functional selectivity for CB2R over CB1R [42]. SR141716 has been employed previously in a study investigating the role of CB1R on the development of vascular inflammation and cell death in a mouse model of DR and human retinal cell line [33]. This article was the first to show that CB1R activation plays an important role in the pathogenesis of DR and that CB1R antagonists may be beneficial in reducing diabetes-induced oxidative/nitrative stress and vasculopathy. To our knowledge, AM1710 has never been investigated in healthy or diseased retinas. Therefore, we chose to examine these two cannabinoids, and not others, in the ESDR model with the hope that the single and dual treatments of these compounds will result in novel findings regarding their beneficial use in the treatment of ESDR.

One of the major pathological components of DR is the progressive degeneration of neuronal cell types in the retina. Studies using various experimental models of DR have detected extensive loss of amacrine cells [43], photoreceptors [44], and retinal ganglion cells [45]. These findings have been substantiated by post-mortem data from diabetic human donors [8,46] or by measuring the thickness of retinal layers (OCT) in subjects [47] and in diabetic rats [8]. Numerous reports have shown the neuroprotective actions of CB2R agonists in the brain and their therapeutic potential in a plethora of neurological disorders [48]. In contrast, fewer studies have examined the role of CB2R activation in the retina.

In the present study, we report for the first time that CB2R activation by the selective agonist AM1710, administered topically as eye drops for two weeks, was able to block the diabetes-induced loss of a subpopulation of amacrine cells [nitric oxide synthetase (NOS) expressing].

Another key pathological feature of DR reported in this study was a marked decrease of NFL immunoreactivity, observed two weeks after diabetes induction, which was confirmed both by the quantification of the intensity and thickness of NFL stain. Similar alterations in the morphology of NFL were also reported in five-week [43] and three-month models [49] of STZ-induced DR. The reduction of NFL thickness has also been reported by OCT measurements in human DR patients [50,51]. AM1710 and SR141716, administered either alone or in combination, rescued ganglion cell axons from diabetes-induced damage in the retina [NFL-IR (thickness & intensity)]. To our knowledge, the current study is the first to indicate deficits in NFL as early as two weeks after the onset of diabetes. A number of human studies have reported a reduction in NFL thickness observed at the very early stage of DR, termed preclinical DR [52], or in diabetic patients with no DR [53]. Collectively, these data imply that changes in NFL thickness represent one of the earliest structural changes at the neuronal level of the diabetic retina, thus forewarning the future development of DR.

Despite the reduction in NFL thickness and intensity, as assessed by NFL IR, we did not observe a statistically significant reduction in the thickness of the GCL. Similarly, no difference was observed in the number of retinal ganglion cells (RGCs) between control and diabetic animals (H&E staining). Martin et al. [54] reported that the number of RGCs, as well as the relative thickness of GCL, remained unaffected two weeks post-STZ-induced diabetes in a murine model, in agreement with our findings. However, a statistically significant reduction was observed ten weeks post-diabetes initiation. These results suggest that NFL may be a useful marker to indirectly extract information about the fate of RGCs in optical neuropathies, including DR. Yi et al. [55] reported that axotomy of the optic nerve leads to progressive loss of ganglion cells (optic nerve crush model). The existence of a large number of RGCs, with no detectable retrograde Fluoro-Gold staining, was reported in a mouse model of glaucoma, suggesting that part of their axons was damaged, but RGCs remained functional and expressed various RGC genes [56]. The authors suggested that despite the degeneration of their distal part, the proximal portion of the axons remained unaffected one-month post-insult, thus contributing to RGCs' survival [56]. These studies support our data and suggest that treatment of diabetes-induced NFL deficits in the ESDR will affect the viability of ganglion cells in a positive manner.

An increased number of TUNEL⁺ cells in all three nuclear retinal layers (ONL, INL, GCL) was reported as early as two weeks after diabetes induction [57]. AM1710 also provided neuroprotection in the ESDR model as suggested by the reduction of the diabetes-induced increase in cleaved caspase-3⁺ cells in the INL, compared to the diabetic untreated animals, and the abolishment of diabetes-induced reduction in INL thickness. These findings are in agreement with previous studies from our laboratory, where it was shown that the neuroprotective properties of the endocannabinoid 2-AG [25] and the synthetic cannabinoid (*R*)-WIN55,212-2 [20] are in part mediated via CB2R activation in the animal model of AMPA induced retinal excitotoxicity. Further proof regarding the neuroprotective properties of CB2R activation was reported by Imamura et al. [40], who showed that HU-308 (CB2R agonist) reduced degeneration of photoreceptors, both in vivo and in vitro, in an animal model of light-induced age-related macular degeneration.

CB1R blockade was reported to be neuroprotective in retinal disease models, such as DR [33] and MNU-induced retinal degeneration [36]. However, CB1R blockade did not reverse the diabetes-induced loss of bNOS expressing amacrine cells nor reduce the number of cleaved caspase-3⁺ cells in the INL. The inability of the CB1R antagonist to influence the attenuation of bNOS amacrine cells and the increase in the number of cleaved caspase 3⁺ cells may be due to the low density of CB1R expressed in nitric oxide synthetase-expressing amacrine cells that are detected (stained) by the bNOS antibody. Furthermore, the CB1R is located mainly in the GCL and less in the INL, where the cell bodies of amacrine cells are located [58]. However, the density of the CB1R in the different amacrine cells has not been reported. Our data are in agreement with a recent study reporting that the CB1R antagonist AM251 aggravated neurodegeneration in a rat model of light-induced retinal degeneration by increasing mRNA levels of pro-apoptotic markers (Bad, Bax) and activated cleaved caspase 3, as well as mRNA levels of the anti-apoptotic marker, Bcl-2. [59]. In the present study, CB1R expression was also examined in three groups (Control, Diabetic, Diabetic + SR141716). No statistically significant difference in CB1R IR was observed, suggesting that neither diabetes nor the treatment affects the expression of CB1R in the retina.

Retinal inflammation is closely linked to persistent macroglia and resident macrophage activation, which are present at the ESDR [60]. In accordance with these findings, we show that diabetes increased the number of Iba1⁺ cells and GFAP expression in Müller cells in the two-week model of DR. AM1710 attenuated the diabetes-induced increase in the number of reactive Iba1⁺ cells as well as the levels of TNF α in diabetic retinas, in a statistically significant manner. While the anti-inflammatory actions of CB2R agonists have been well described, this is the first report of its kind using an in vivo model of DR. CB2R activation has been shown to shift the pro-inflammatory M1 phenotype to the anti-

inflammatory M2 by stimulating the release of anti-inflammatory cytokines [61]. We have also shown that CB2Rs are expressed in reactive macrophages in the retina, as assessed by their colocalization with Iba1. The synthetic cannabinoid (*R*)-WIN55,212-2 (CB1R/CB2R agonist) attenuated the AMPA-induced increase in the activation of these cells, acting via CB2Rs [20]. AM1710 also reduced macroglia activation in diabetic retinas, as shown by the reduction of GFAP IR. This result is consistent with data showing an up-regulation of CB2Rs in Müller cells [62], suggesting that CB2R plays a crucial role in the physiology of macroglia. Sun et al. [63] reported that the CB2R agonist JWH015 attenuated GFAP expression in astrocytes, an effect that was abolished with the pre-treatment of the animals with the CB2R antagonist AM630.

The mechanism via which CB2R agonists may mediate their anti-inflammatory actions has been reported in different studies. AM1710 activation of CB2R leads to adenylyl cyclase and protein kinase A (PKA) inhibition and attenuation of cAMP levels via Gi/o signaling, that suppress resident macrophage activation via the modulation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs) [64]. CB2R activation also leads to the attenuation of NO/nitrative stress and pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 via a process that is dependent on ERK1/2 and Akt [65]. CB1R blockade has been suggested to afford anti-inflammatory properties in models of retinopathy, including DR [33,66]. In our study, blockade of CB1R did not attenuate the number of activated macroglia (Figure 5B) and resident macrophage (Figure 6B) nor TNF α levels (Figure 6C) in diabetic retinas, in contrast to our original hypothesis. In a previous study, SR141716 was shown to block diabetes-induced activation of Müller cells (GFAP IR) and NF κ B, localized in the vascular layers of the retina, in a mouse STZ model of DR [33]. However, it has been reported that activation, and not a blockade, of CB1R by anandamide was able to attenuate microglia-mediated neuroinflammation in the brain [67]. Despite the ability of SR141716 to reduce nitrative stress and vascular leakage, it did not affect the inflammatory components. As mentioned earlier, this difference may be due to a lower density of CB1Rs located on glial cells.

In agreement with our observation, Solino et al. [59] reported that the application of the CB1R antagonist, AM251, in a rat model of light-induced retinal degeneration increased macroglia reactivity and the expression of TNF α . Another possible explanation for the inability of CB1R blockade to promote anti-inflammatory actions may be due to the existence of a sexual dimorphism effect. A recent study reported that the inflammatory response in the brain is dependent on CB1Rs on resident macrophage cells in male mice but independent of CB1R in female mice [68]. In our study, most of the animals employed were female.

In the model of ESDR, upon onset of diabetes, there was an increase in nitrotyrosine (NT) expression in the retina, a marker of nitrative stress. These findings are in agreement with Hernandez-Ramirez et al. [10], who reported increases in the expression of NO and 3-NT in an STZ-induced DR model seven days post-diabetes initiation. We report that blockade of CB1R and activation of CB2R by topical administration of SR141716 or AM1710, respectively, reduced nitrative stress, as indicated by the attenuation of the diabetes-induced increase in the number of NT+ cells. These findings are in agreement with studies showing CB1R blockade attenuated oxidative damage in various disease models [33,69].

Hyperglycemia-induced oxidative and nitrative stress contribute to microvascular complications of DR by promoting DNA fragmentation and apoptosis of endothelial cells [70]. The reduction of NT levels has been shown to protect retinal micro-vasculature from the nitrative insult [33,71]. In the present study, we observed an increase of NT expression in the diabetic retina (Figure 7A,B) that was reversed by all three treatments. We also showed that NT is localized in endothelial cells, as observed by its co-localization with CD-31 (endothelial cell marker, Figure 8A), suggesting that blood vessels undergo nitrative damage. This finding is confirmed by a previous study showing that NT expression is prominent in the retinal vasculature of diabetic animals [72]. The nitrative stress-induced endothelial cell impairment is a possible explanation for the increased vascular leakage that is also reported in the present study (Figure 8B). We observed an increase in retinal vascular

permeability two weeks post-STZ treatment. Studies in diabetic rats reported that increased vascular permeability in the retina was observed as early as six [73] or seven days [74] after STZ administration. AM1710 reduced vascular leakage in diabetic retinas (Figure 8B). In compliance with our results, CB2R activation was shown to reduce the expression of cell adhesion molecules in human retinal endothelial cell cultures and attenuate TNF- α induced retinal vascular permeability in vivo [75,76]. Similar to the actions of AM1710, SR141716 (CB1R antagonist) also blocked the diabetes-induced increase of vascular permeability, suggesting that the blockade of CB1R is efficacious in maintaining the integrity of BRB. Also, vascular protective actions were afforded by SR141716 in a mouse model of retinal degeneration induced by MNU (*N*-methyl-*N*-nitrosourea) [36] and a mouse model of DR [33].

The dual treatment (AM1710 and SR141716) was efficacious in attenuating nitrate stress (Figure 7B,C). However, its efficacy was not different from the single treatments on NFL (Figure 1B,C) or bNOS IR (Figure 3B). Also, it did not afford any statistically significant effect in reducing Müller cell nor resident macrophage activation (Figures 5B and 6B, respectively). Taking into account the anti-inflammatory actions of AM1710 and the inability of SR141716 to affect macroglia and resident macrophage activation, we hypothesized that the dual treatment would mimic single CB2R agonist treatment. Studies in the brain have shown that CB1R and CB2R can form functional heterodimers in neuronal [77], as well as in Iba1⁺ cells. Increased expression of CB1R/CB2R heterodimer has been observed as a response to an inflammatory stimulus [78]. The most interesting part, which seems relevant to our study, is that CB1R/CB2R heterodimers display cross-antagonism in which administration of CB1R antagonists was able to block the effects of CB2R agonists [77,78].

Members of the ECS, endocannabinoids, and CB1/CB2 receptors, found in peripheral organs, are involved in the regulation of energy homeostasis and play an important role in obesity and metabolic disorders [79]. Both CB1R antagonists and CB2R agonists modulate glucose metabolism. The synthetic cannabinoid SR141716 (Rimonabant), also employed in this study, was the first selective CB1R antagonist/inverse agonist to be investigated regarding its role in glucose metabolism in patients and animals [80]. Clinical trials [Rimonabant in Obesity (RIO) program] in overweight/obese non-diabetic and type-2 diabetes patients reported that Rimonabant reduced glucose tolerance and insulin resistance [81,82]. Similar results were reported in animal studies employing different CB1R antagonists and various models of obesity [80,83]. The efficacious effects of CB1R antagonists in energy metabolism were negatively affected by their CNS psychiatric adverse effects. In order to bypass this disadvantage, peripheral neutral CB1R antagonists have been developed and were shown to improve glycemic and insulin resistance [84,85]. 2-AG activation was reported to attenuate insulin secretion by pancreatic beta-cells of the mouse via CB2R activation [86] and to improve glucose homeostasis in the rat [87]. All in all, the peripheral endocannabinoid system plays an important role in glucose metabolism. The roles of CB1R antagonist and CB2 agonist in the retina (CNS) and periphery suggest that these members of ECS are prospective putative therapeutics for diabetes and diabetic retinopathy.

In closing, our findings suggest that topical administration of the three cannabinoid treatments, such as eye drops, provides protection to the diabetic retina in a differential manner against the four pathologies of ESDR. The actions of both CB2R activation and CB1R blockade in restoring ganglion cell axons (NFL-IR) in ESDR suggest that both agents may be effective in retarding RGC death. AM1710 is efficacious as an antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and vasculoprotective agent and, thus, a promising new therapeutic for ESDR. Further advancement of retinal imaging to screen and identify the early events in DR, such as neurodegeneration in diabetic patients, is crucial for selecting neuroprotective drugs and implementing personalized treatments. As our findings clearly implicate the endocannabinoid system, the therapeutic benefits of this class of compounds should also extend to patients with diabetic nephropathy and cardiopathy/stroke since DR has been associated with the development of these diseases [2].

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Adult (2 months old) male and female Sprague Dawley rats, weighing approximately 250–300 g, were used in this study. For the induction of diabetes, mainly female rats were chosen, and the use of male rats was limited when possible due to the high mortality of male subjects after STZ injection. Most studies employ male rats/mice for STZ-induced diabetes. However, taking into consideration the sex differences between males and females [88] in their response to STZ, more investigations using female rats/mice should be proposed. Animals were housed one per cage (Control animals: 2–3 per cage) at a fixed temperature of 22 ± 2 °C and in a stable 12 h light-dark cycle, while food and water were available ad libitum. Inhalation of ascending concentrations of CO₂ was chosen as the euthanization protocol after the end of the experiments. Animal handling was conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, in compliance with Greek national laws (Animal Act, P.D. 160/91) and the EU Directive for animal experiments (2010/63/EU). All procedures were carried out following reduction and refinement strategies.

4.2. Drugs

Streptozotocin (STZ) was obtained from Sigma-Aldrich (Tanfkirchen, Germany). AM1710 (1-Hydroxy-9-methoxy-3-(2-methyloctan-2-yl)-6H-benzo[c]chromen-6-one) and SR141716(5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-N-piperidin-1-ylpyrazole -3-carboxamide) were synthesized at the Center for Drug Discovery, Northeastern University (Boston, MA, USA). AM251 (CAS No: 183232-66-8) was purchased from Med Chem Express (MCE, New Jersey, NJ, USA).

4.3. Induction of Diabetes and Experimental Design

Prior to the start of all experiments, blood samples were obtained by pricking the lateral tail vein using a sterile needle, and the glucose levels of each animal were measured. Diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p) injection of STZ (70 mg/kg) dissolved in sodium citrate buffer (0.1 M, pH = 4.7), as previously reported [43]. Control animals received a single injection of sodium citrate buffer 0.1 M (vehicle). One day after STZ injections, blood glucose levels were measured to determine the onset of diabetes. Animals were considered diabetic when blood glucose levels were higher than 250 mg/dL. A two-week model of ESDR was employed, according to Hernandez et al. [12], who established the model. The effect of streptozotocin (STZ) on blood glucose levels and weight of animals were analyzed at three-time points (pre-STZ, 1d, and 14d post-STZ treatment) (Figure S1A,B).

Cannabinoid agents were administered as eye drops [20 µL, 10 mg/mL; vehicle: 20 µL DMSO) directly onto the superior corneal surface of each eye using a micropipette once daily for 14 days. Each eye/animal received a different treatment. The 20 µL volume/eye was administered in four different eye drops, ensuring each time that the drop was absorbed. Each animal was restrained by the experimenter with a towel in order to control the movement of the animal's paws towards the eyes", Animals were euthanized twenty-four hours after the last eye drop administration, and their tissues were processed. According to the treatment, animals were divided into five different groups, namely, 1. Control, 2. Diabetic, 3. Diabetic animals treated with AM1710 (10 mg/mL in DMSO, 20 µL), 4. Diabetic animals treated with SR141716 (10 mg/mL, in DMSO, 20 µL) and 5. Diabetic animals were treated with the combination of AM1710/SR141716 (10 mg/mL in DMSO, each individually). Animals in control and diabetic non-treated groups received 20 µL of vehicle (DMSO) in each eye as eye drops, as mentioned above, once daily for the same duration as the treatment of the diabetic-treated group.

The eye drop route of administration was chosen because it is more patient-friendly and reaches the retina via the trans-scleral route [89]. The problem with intravitreal injections in humans has to do with the frequency of injections and with the burden on

healthcare systems due to the specialized personnel that is needed and the higher cost. Using alternative topical drug delivery, eye drops, for treating the retina is a relevant alternative. However, more investigations are needed in order to determine its usefulness in the treatment of the human retina.

4.4. Tissue Preparation

After the verification of euthanization, the eyes were processed for immunohistochemical analysis. Eyes were removed and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) solution in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 45 min at 4 °C. The anterior segment of the eye (containing cornea, lens, aqueous and vitreous humor) was removed, and the eyecup (sclera and retina) was fixed for 1.5 h at 4 °C in addition. Subsequently, the eyecups were cryoprotected by incubation in 30% sucrose solution overnight at 4 °C. Eyecup tissues were frozen in isopentane at −55 to −45 °C, using optimal cutting temperature compound (O.C.T). Vertical sections near the optic nerve head (10 µm thick) were taken using a cryostat (Leica), and slides with tissue sections were stored at −20 °C. For ELISA and Evans Blue assay, after the removal of the eyes, retinas were rapidly isolated and stored at −80 °C until further analysis.

4.5. Histology

Cryostat sections were used for histological studies, namely staining with a Hematoxylin and Eosin (H & E) solution, in order to measure the retinal thickness. For this purpose, an H & E staining kit (Abcam, Cambridge, UK, ab245880) was employed, and the detailed protocol followed was the one recommended in the manual of the company.

4.6. Immunohistochemical Studies

For the assessment of the effect of the cannabinoid treatment on retinal neurons, a rabbit polyclonal antibody raised against brain nitric oxide synthase (bNOS; 1:2000, Sigma-Aldrich, Tanfkirchen, Germany, code no. N7280, lot no. 062M4839), a marker of retinal amacrine cells and a mouse monoclonal antibody, raised against neurofilament (NFL; 1:500, Millipore, Darmstadt, Germany, Code no. MAB1615, Lot no. 2736736) a marker of ganglion cell axons were employed. The neuroprotective effects of the cannabinoid treatment were also evaluated using a rabbit polyclonal antibody against nitrotyrosine (NT; 1:1000, Millipore, Darmstadt, Germany, Code no. 06-284, Lot 3199176), a marker of nitrative/oxidative stress, and a rabbit monoclonal antibody against cleaved caspase-3 (1:300, Cell Signaling, Danver, MA, USA, Code no., 9661S. Lot no 47), a marker of apoptotic cell death. In order to examine the effect of the cannabinoid treatments on the activation of a) Muller cells and astrocytes, a mouse monoclonal antibody raised against the glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Code no. AB5804, Lot no. 2424641) was employed and b) resident macrophage, a rabbit polyclonal antibody raised against ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1; 1:2500, WAKO Chemicals, Osaka, Japan, Code no. 019-19741). A marker for endothelial cells, cluster of differentiation 31/platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 (CD-31/PECAM-1; 1:100, Novus Biologicals, Cambridge, UK, Code no. NB100-64796) was also employed for the visualization of blood vessels. Tissue sections were also treated with the appropriate secondary antibodies. A secondary antibody CF543 goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:1000, Biotium, Fremont, CA, USA, code no. 20309, lot no. 12C0213) and a CF488A goat anti-mouse IgG (H + L) (1:400, Biotium, Fremont, CA, code no. 20010, lot no. 13C0619) were used against rabbit and mouse primary antibodies. The CD-31 and NT colocalization study employed the Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (1:1000, Invitrogen, Waltham, MA, USA, code no. A11029, lot no. 2306576). After completing the incubation of the secondary antibody, all sections were stained with DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for the visualization of cell nuclei. Tissue sections were also treated alone with the three secondary antibodies, namely CF488A goat anti-mouse IgG (H + L) (1:400), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (1:1000), and CF543 goat anti-rabbit IgG (H + L)

(1:1000), without the primary antibodies in order to examine their nonspecific staining in the retina.

4.7. ELISA Assay

A rat ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK, ab100785) was employed for the measurement of the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha (TNF α) on retinal samples of Control, diabetic untreated, and diabetic animals treated with either AM1710 or the CB1 inhibitor AM251. An ELISA reader (450 nm, BioRad, Hercules, CA, USA) was used to analyze the duplicates for each sample. TNF α concentration (pg) data were normalized to the total protein concentration (mg) [Nano Drop (2000) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)].

4.8. Evans-Blue Assay for Measuring Blood-Retinal Barrier Permeability

Evans-Blue (EB) dye was diluted in saline 0.9% at a concentration of 30 mg/mL. Twenty-four hours after the last eye-drop administration, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). EB solution was injected intravenously via the lateral tail vein at a dosage of 45 mg/kg. Two hours after the administration of EB, blood samples were collected by cardiac puncture, using 19 G needles, and animals were perfused with 0.9% saline at 37 °C in order to remove the excess of dye from the circulation. Additional anesthesia only with ketamine was provided when needed. After perfusion, retinas were isolated and weighed. Blood samples were subsequently centrifuged at 2100 g at 4 °C for 10 min. Plasma samples were diluted in formamide (1/1000) and were prepared for analysis. Retinas were incubated in formamide (300 μ L, 72 °C, 18 h), and the extract was centrifuged at 22,000 g (1 h, 4 °C). Retinal extracts and plasma samples were then analyzed as duplicates using a spectrophotometer at 620 nm (maximum absorbance of EB) and 740 nm (minimum absorbance of EB, as previously mentioned [73]). Blood retinal barrier (BRB) leakage was calculated in μ g of Evans Blue using the following equation:

$$\text{BRB leakage} = (\text{retina EB concentration} / \text{plasma EB concentration}) / \text{retina wet weight}$$

4.9. Microscopy and Quantification Studies

Images from retinal tissue sections were obtained by a fluorescent Leica DMLB microscope (HCX PL Fluotar, 40 \times /0.70 or 20 \times /0.50 lens; Leica Micro-systems, Wetzlar, Germany) using a Leica DC 300 F camera. For each immunohistochemical study, magnification was set to either 20 \times or 40 \times . All photomicrographs were taken at the center point of the retina, near the optic nerve. Exposure, brightness, contrast, etc., were kept stable until the completion of the quantification analysis. Adobe Photoshop ver. 7.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) was employed to merge images with their representative nuclear staining and crop images in their desirable dimensions. Quantification was performed in the uncropped images, which represent a part of the sagittal section near the optic nerve head (ONH) where the quantification is performed. For each retina ($n = 1$), we employ a total of 6 uncropped images taken from 3 different sections [2 photomicrographs \times 3 different sections = 6 images per retina]. The mean value of the 6 different uncropped photomicrographs (e.g., cells, thickness, gray value) taken per each sample represents $n = 1$.

For the bNOS-IR study, cells were manually counted across the whole length of tissue sections. For the analysis of NFL-IR, two different protocols were followed. Firstly the mean gray value of NFL-IR was calculated from six different photomicrographs for each sample (two photomicrographs per section, with a total of three sections measured for each sample). Secondly, the thickness of the NFL layer was measured by ImageJ 1.44 software. For each photomicrograph, the NFL thickness was measured at three different points of the photomicrograph width (100, 200, and 300 μ m), with the total width of the photomicrograph being 400 μ m. Quantification of GFAP-IR was performed according to Anderson et al. [90]. It relies on a scoring system (0–5) to estimate the area of the

GFAP positive processes in the tissue. Iba1⁺ reactive cells were identified based on their morphology [20]. The number of reactive Iba1⁺ cells was manually counted across the whole length of each photomicrograph and expressed as the ratio of their total number to the area measured (expressed in μm^2). Similarly, manually calculated quantitative analysis was performed for NT⁺ and cleaved caspase-3⁺ cells.

Quantification of the data of the H&E histological study was performed using two nonoverlapping photos from each section taken from the central retina near the optic nerve, with a total number of three sections for each sample. The total thickness of the retina, as well as the thickness of the separate retinal layers (ONL, INL, and GCL), was measured using ImageJ 1.44 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) by drawing straight lines in three different fixed points in each photomicrograph (100, 200, and 300 μm). The approximate width of each photomicrograph was 400 μm . The mean value of each sample was used for the quantitative analysis. The number of ganglion cells in the GCL was also manually counted, beginning 50 μm after the left side and ending 50 μm before the right side of each photomicrograph. The mean of a total of six values for each sample was used for the quantitative analysis.

One possible limitation of this study pertains to the fact that the quantification was performed only on the central part of the retina near the optic nerve head and not the full length of the retina.

4.10. Statistical Analysis

Graph Pad Prism 8.0.1 software (San Diego, CA, USA) was employed for the statistical analysis of the data presented in this study. Data are expressed as mean \pm S.D and presented in a form that combines bar diagram and scatter dot plot, with every dot representing a different value. Data from all experiments (except ELISA and Evans-Blue assay, where the original values were used) were normalized to the values of Control tissue and expressed as % of Control tissue. One-way analysis of variance (ANOVA) was employed for the statistical analysis of all data, followed by Tukey's multiple comparison test. A two-way analysis of variance (ANOVA) was employed, followed by Sidak's multiple comparison test, for the analysis of the different groups across the different retinal layers (ONL, INL, and GCL) in NT and H&E stain. Differences among groups were considered statistically significant when $p < 0.05$. In all statistics, the n value represents the number of retinas.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24010240/s1>.

Author Contributions: Investigation, Methodology, Data Curation, Formal Analysis, Writing-Review-Editing, D.S.; Data Curation, Formal Analysis, N.M.; Resources, Editing, K.V.; Methodology, T.C.H.; Resources, Editing, S.P.N.; Resources, A.M.; Conceptualization, Writing-Review and Editing, Supervision, Funding Acquisition, K.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Christina Spyraiki Award scholarship, University of Crete, the State Scholarship Foundation (IKY) to D.S (2022-050-0502-52089), the European Committee Horizon 2020 program (ULTRACHIRAL grant number 737071), the Graduate Program of Neurosciences, University of Crete to K.T and the National Institute of Health (grant number DA 009158) to A.M.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of University of Crete (protocol code: 207608, 18 September 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Sylvia Dionysopoulou for her valuable assistance in the last revision of the manuscript, Alexandros Tsimopolis for providing the Alexa fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody, Despina Kokona, Department of Ophthalmology, Insel-spital, Bern University Hospital/University of Bern, Pavlina Tsoka, Department of Ophthalmology, School of Medicine, University of Crete for their useful scientific opinion on the manuscript, and Ioanna Soukouli for her assistance with animal care.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Diabetic Retinopathy—Silently Blinding Millions of People World-Wide. IAPB Vision Atlas. Available online: <http://atlas.iapb.org/vision-trends/diabetic-retinopathy/> (accessed on 26 September 2002).
2. Simó, R.; Hernández, C. New Insights into Treating Early and Advanced Stage Diabetic Retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8513. [CrossRef] [PubMed]
3. Metea, M.R.; Newman, E.A. Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Exp. Physiol.* **2007**, *92*, 635–640. [CrossRef] [PubMed]
4. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1058–1070. [CrossRef] [PubMed]
5. Yu, Z.; Lu, B.; Sheng, Y.; Zhou, L.; Ji, L.; Wang, Z. Andrographolide ameliorates diabetic retinopathy by inhibiting retinal angiogenesis and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2015**, *1850*, 824–831. [CrossRef]
6. Ola, M.S.; Nawaz, M.I.; El-Asrar, A.A.; Abouammoh, M.; Alhomida, A.S. Reduced levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the serum of diabetic retinopathy patients and in the retina of diabetic rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2013**, *33*, 359–367. [CrossRef]
7. Hawkins, B.T.; Davis, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 173–185. [CrossRef]
8. Barber, A.J.; Lieth, E.; Khin, S.A.; Antonetti, D.A.; Buchanan, A.G.; Gardner, T.W. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes: Early onset and effect of insulin. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 783–791. [CrossRef]
9. Jonsson, K.B.; Frydkjaer-Olsen, U.; Grauslund, J. Vascular Changes and Neurodegeneration in the Early Stages of Diabetic Retinopathy: Which Comes First? *Ophthalmic Res.* **2016**, *56*, 1–9. [CrossRef]
10. Hernández-Ramírez, E.; Sánchez-Chávez, G.; Estrella-Salazar, L.A.; Salceda, R. Nitrosative stress in the rat retina at the onset of streptozotocin-induced diabetes. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 2353–2363. [CrossRef] [PubMed]
11. Xiao, A.; Zhong, H.; Xiong, L.; Yang, L.; Xu, Y.; Wen, S.; Shao, Y.; Zhou, Q. Sequential and Dynamic Variations of IL-6, CD18, ICAM, TNF- α , and Microstructure in the Early Stage of Diabetic Retinopathy. *Dis. Markers* **2022**, *2022*, 1946104. [CrossRef]
12. Hernández, C.; García-Ramírez, M.; Corraliza, L.; Fernández-Carneado, J.; Farrera-Sinfreu, J.; Ponsati, B.; Gonzalez-Rodriguez, A.; Valverde, A.M.; Simó, R. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes* **2013**, *62*, 2569–2578. [CrossRef] [PubMed]
13. Klaassen, I.; Van Noorden, C.J.; Schlingemann, R.O. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog. Retin. Eye Res.* **2013**, *34*, 19–48. [CrossRef]
14. Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A.; Felder, C.C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B.R.; et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161–202. [CrossRef] [PubMed]
15. Schwitzer, T.; Schwan, R.; Angioi-Duprez, K.; Giersch, A.; Laprevote, V. The endocannabinoid system in the retina: From physiology to practical and therapeutic applications. *Neural. Plast.* **2016**, *2016*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
16. Straiker, A.; Stella, N.; Piomelli, D.; Mackie, K.; Karten, H.J.; Maguire, G. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: Localization and function of an endogenous signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14565–14570. [CrossRef] [PubMed]
17. Yazulla, S.; Studholme, K.M.; McIntosh, H.H.; Deutsch, D.G. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amidehydrolase in rat retina. *J. Comp. Neurol.* **1999**, *415*, 80–90. [CrossRef]
18. Bouskila, J.; Javadi, P.; Casanova, C.; Ptito, M.; Bouchard, J.F. Müller cells express the cannabinoid CB2 receptor in the vervet monkey retina. *J. Comp. Neurol.* **2013**, *521*, 2399–2415. [CrossRef]
19. Borowska-Fielding, J.; Murataeva, N.; Smith, B.; Szczesniak, A.M.; Leishman, E.; Daily, L.; Toguri, T.; Hillard, C.J.; Romero, J.; Bradshaw, H.; et al. Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina. *Neuropharmacology* **2018**, *141*, 21–31. [CrossRef]
20. Spyridakos, D.; Papadogkonaki, S.; Dionysopoulou, S.; Mastrodimou, N.; Polioudaki, H.; Thermos, K. Effect of acute and subchronic administration of (R)-WIN55, 212–2 induced neuroprotection and anti-inflammatory actions in rat retina: CB1 and CB2 receptor involvement. *Neurochem. Int.* **2021**, *142*, 104907. [CrossRef]
21. Ashton, J.C.; Glass, M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **2007**, *5*, 73–80. [CrossRef]
22. Kogan, N.M.; Mechoulam, R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2007**, *9*, 413–430. [CrossRef] [PubMed]

23. Nucci, C.; Gasperi, V.; Tartaglione, R.; Cerulli, A.; Terrinoni, A.; Bari, M.; De Simone, C.; Agro, F.A.; Morrone, L.A.; Corasaniti, M.T.; et al. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 2997–3004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kokona, D.; Thermos, K. Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity in vivo, via activation of CB1 receptors: involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Exp. Eye Res.* **2015**, *136*, 45–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kokona, D.; Spyridakos, D.; Tzatzarakis, M.; Papadogkonaki, S.; Filidou, E.; Arvanitidis, K.I.; Kolios, G.; Lamani, M.; Makriyannis, A.; Malamas, M.; et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and dual ABHD6/MAGL enzyme inhibitors display neuroprotective and anti-inflammatory actions in the in vivo retinal model of AMPA excitotoxicity. *Neuropharmacology* **2021**, *185*, 108450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Maguire, G.; Eubanks, C.; Ayoub, G. Neuroprotection of retinal ganglion cells in vivo using the activation of the endogenous cannabinoid signaling system in mammalian eyes. *Neuronal Signal.* **2022**, *6*, NS20210038. [[CrossRef](#)]
27. Rajesh, M.; Batkai, S.; Kechrid, M.; Mukhopadhyay, P.; Lee, W.S.; Horvath, B.; Holovac, E.; Cinar, R.; Liaudet, L.; MacIie, K.; et al. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **2012**, *61*, 716–727. [[CrossRef](#)]
28. Zawatsky, C.N.; Abdalla, J.; Cinar, R. Synthetic cannabinoids induce acute lung inflammation via cannabinoid receptor 1 activation. *ERJ Open Res.* **2020**, *6*, 00121–02020. [[CrossRef](#)]
29. Jourdan, T.; Szanda, G.; Rosenberg, A.Z.; Kunos, G. Overactive cannabinoid 1 receptor in podocytes drives type 2 diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5420–5428. [[CrossRef](#)]
30. Aseer, K.R.; O’Connell, J.F.; Egan, J.M. 2044-P: Loss of CB1R Protects against Streptozotocin-Induced β -Cell Dysfunction in Mice. *Diabetes* **2020**, *69*, 2044-P. [[CrossRef](#)]
31. Barutta, F.; Corbelli, A.; Mastrocola, R.; Gambino, R.; Di Marzo, V.; Pinach, S.; Rastaldi, M.P.; Perin, P.C.; Gruden, G. Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* **2010**, *59*, 1046–1054. [[CrossRef](#)]
32. Barutta, F.; Bellini, S.; Mastrocola, R.; Gambino, R.; Piscitelli, F.; di Marzo, V.; Corbetta, B.; Vemuri, V.K.; Makriyannis, A.; Annaratone, L.; et al. Reversal of albuminuria by combined AM6545 and perindopril therapy in experimental diabetic nephropathy. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 4371–4385. [[CrossRef](#)]
33. El-Remessy, A.B.; Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Horvath, B.; Patel, V.; Al-Gayyar, M.M.H.; Pillai, B.A.; Pacher, P. 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* **2011**, *54*, 1567–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lim, S.K.; Park, M.J.; Lim, J.C.; Kim, J.C.; Han, H.J.; Kim, G.-Y.; Cravatt, B.F.; Woo, C.H.; Ma, S.J.; Yoon, K.C.; et al. Hyperglycemia induces apoptosis via CB₁ activation through the decrease of FAAH 1 in retinal pigment epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 569–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wei, Y.; Wang, X.; Zhao, F.; Zhao, P.Q.; Kang, X.L. Cannabinoid receptor 1 blockade protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative injury. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 357–366. [[PubMed](#)]
36. Chen, Y.; Luo, X.; Liu, S.; Shen, Y. Neuroprotective effect of cannabinoid receptor 1 antagonist in the MNU-induced retinal degeneration model. *Exp. Eye Res.* **2018**, *167*, 145–151. [[CrossRef](#)]
37. Horvath, B.; Magid, L.; Mukhopadhyay, P.; Batkai, S.; Rajesh, M.; Park, O.; Tanchian, G.; Gao, R.Y.; Goodfellow, C.E.; Glass, M.; et al. A new cannabinoid CB₂ receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 2462–2478. [[CrossRef](#)]
38. Kinsey, S.G.; Mahadevan, A.; Zhao, B.; Sun, H.; Naidu, P.S.; Razdan, R.K.; Selley, D.A.; Damaj, M.I.; Lichtman, A.H. The CB₂ cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 244–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Barutta, F.; Piscitelli, F.; Pinach, S.; Bruno, G.; Gambino, R.; Rastaldi, M.P.; Salvidio, G.; Di Marzo, V.; Perin, P.C.; Gruden, G. Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes* **2011**, *60*, 2386–2396. [[CrossRef](#)]
40. Imamura, T.; Tsuruma, K.; Inoue, Y.; Otsuka, T.; Ohno, Y.; Ogami, S.; Yamane, S.; Shimazawa, M.; Hara, H. Involvement of cannabinoid receptor type 2 in light-induced degeneration of cells from mouse retinal cell line in vitro and mouse photoreceptors in vivo. *Exp. Eye Res.* **2018**, *167*, 44–50. [[CrossRef](#)]
41. Iliopoulos-Tsoutsouvas, C.; Georgiadis, M.-O.; Ji, L.; Nikas, S.P.; Makriyannis, A. Chapter 3. Natural Compounds and Synthetic Drugs to Target Type-1 Cannabinoid (CB1) Receptor. In *New Tools to Interrogate Endocannabinoid Signalling*; Royal Society of Chemistry: London, UK, 2020; pp. 48–88. [[CrossRef](#)]
42. Alapafuja, S.O.; Nikas, S.P.; Ho, T.C.; Tong, F.; Benchama, O.; Makriyannis, A. Chain Substituted Cannabiolactones with Selectivity for the CB₂ Cannabinoid Receptor. *Molecules* **2019**, *24*, 3559. [[CrossRef](#)]
43. Iban-Arias, R.; Lisa, S.; Mastrodimou, N.; Kokona, D.; Koulakis, E.; Iordanidou, P.; Kouvarakis, A.; Fothiadaki, M.; Papadogkonaki, S.; Sotiriou, A.; et al. The synthetic microneurotrophin BNN27 affects retinal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **2018**, *67*, 321–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lv, J.; Bao, S.; Liu, T.; Wei, L.; Wang, D.; Ye, W.; Wang, N.; Song, S.; Li, J.; Chudhary, M.; et al. Sulforaphane delays diabetes-induced retinal photoreceptor cell degeneration. *Cell Tissue Res.* **2020**, *382*, 477–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kim, S.J.; Yoo, W.S.; Choi, M.; Chung, I.; Yoo, J.M.; Choi, W.S. Increased O-GlcNAcylation of NF- κ B Enhances Retinal Ganglion Cell Death in Streptozotocin-induced Diabetic Retinopathy. *Curr. Eye Res.* **2015**, *41*, 249–257. [[CrossRef](#)]

46. Ng, D.S.K.; Chiang, P.P.C.; Tan, G.; Cheung, C.M.G.; Cheng, C.Y.; Cheung, C.Y.; Wong, T.Y.; Lamoureux, E.L.; Ikram, M.K. Retinal ganglion cell neuronal damage in diabetes and diabetic retinopathy. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2016**, *44*, 243–250. [[CrossRef](#)]
47. Karti, O.; Nalbantoglu, O.; Abali, S.; Ayhan, Z.; Tunc, S.; Kusbeci, T.; Ozkan, B. Retinal ganglion cell loss in children with type 1 diabetes mellitus without diabetic retinopathy. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging* **2017**, *48*, 473–477. [[CrossRef](#)]
48. Gasperi, V.; Guzzo, T.; Topai, A.; Gambacorta, N.; Ciriaco, F.; Nicolotti, O.; Maccarrone, M. Recent Advances on Type-2 Cannabinoid (CB2) Receptor Agonists and Their Therapeutic Potential. *Curr. Med. Chem.* **2022**, *29*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Dong, Y.; Wan, G.; Yan, P.; Qian, C.; Li, F.; Peng, G. Fabrication of resveratrol coated gold nanoparticles and investigation of their effect on diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *195*, 51–57. [[CrossRef](#)]
50. Vujosevic, S.; Muraca, A.; Gatti, V.; Masoero, L.; Brambilla, M.; Cannillo, B.; Villani, E.; Nucci, P.; De Cillà, S. Peripapillary microvascular and neural changes in diabetes mellitus: An OCT-angiography study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 5074–5081. [[CrossRef](#)]
51. Sohn, E.H.; van Dijk, H.W.; Jiao, C.; Kok, P.H.; Jeong, W.; Demirkaya, N.; Garmager, A.; Wit, F.; Kucukevcilioglu, M.; van Velthoven, M.E.J.; et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 2655–2664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Peng, P.H.; Lin, H.S.; Lin, S. Nerve fibre layer thinning in patients with preclinical retinopathy. *Can. J. Ophthalmol.* **2009**, *44*, 417–422. [[CrossRef](#)]
53. Vujosevic, S.; Midena, E. Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and Müller cells alterations. *J. Diabetes Res.* **2013**, *2013*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Martin, P.M.; Roon, P.; Van Ells, T.K.; Ganapathy, V.; Smith, S.B. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45*, 3330–3336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yi, J.; Puyang, Z.; Feng, L.; Duan, L.; Liang, P.; Backman, V.; Liu, X.; Zhang, H.F. Optical detection of early damage in retinal ganglion cells in a mouse model of partial optic nerve crush injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 5665–5671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Soto, I.; Oglesby, E.; Buckingham, B.P.; Son, J.L.; Roberson, E.D.; Steele, M.R.; Inman, D.M.; Vetter, M.L.; Horner, P.J.; Marsh-Armstrong, N. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 548–561. [[CrossRef](#)]
57. Hernández, C.; Bogdanov, P.; Gómez-Guerrero, C.; Sampedro, J.; Solà-Adell, C.; Espejo, C.; García-Ramírez, M.; Prieto, I.; Egido, J.; Simó, R. SOCS1-Derived Peptide Administered by Eye Drops Prevents Retinal Neuroinflammation and Vascular Leakage in Experimental Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Papadogkonaki, S.; Theodorakis, K.; Thermos, K. Endogenous and synthetic cannabinoids induce the downregulation of cannabinoid CB1 receptor in retina. *Exp. Eye Res.* **2019**, *185*, 107694. [[CrossRef](#)]
59. Soliño, M.; Larrayoz, I.M.; López, E.M.; Rey-Funes, M.; Bareiro, M.; Loidl, C.F.; Giardi, E.; Caltana, L.; Brusco, A.; Martínez, A.; et al. CB1 Cannabinoid Receptor is a Target for Neuroprotection in Light Induced Retinal Degeneration. *Advan. Drug Alcohol. Res.* **2022**, *2*, 10734. [[CrossRef](#)]
60. Rungger-Brändle, E.; Dosso, A.A.; Leuenberger, P.M. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 1971–1980.
61. Correa, F.; Hernangómez, M.; Mestre, L.; Loría, F.; Spagnolo, A.; Docagne, F.; di Marzo, V.; Guaza, C. Anandamide Enhances IL-10 Production in Activated Microglia by Targeting CB2 Receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF- κ B. *Glia* **2010**, *58*, 135–147. [[CrossRef](#)]
62. Guley, N.M.; Del Mar, N.A.; Ragsdale, T.; Li, C.; Perry, A.M.; Moore, B.M.; Honing, M.G.; Reiner, A. Amelioration of visual deficits and visual system pathology after mild TBI with the cannabinoid type-2 receptor inverse agonist SMM-189. *Exp. Eye Res.* **2019**, *182*, 109–124. [[CrossRef](#)]
63. Sun, Y.E.; Zhang, W.; Liu, Y.; Liu, X.; Ma, Z.; Gu, X. Intrathecal injection of JWH015 attenuates remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia by inhibiting activation of spinal glia in a rat model. *Anesth. Analg.* **2014**, *118*, 841–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Waetzig, V.; Czeloth, K.; Hidding, U.; Mielke, K.; Kanzow, M.; Brecht, S.; Goetz, M.; Lucius, R.; Herdegen, T.; Hanisch, U.-K. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* **2005**, *50*, 235–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Merighi, S.; Gessi, S.; Varani, K.; Fazzi, D.; Mirandola, P.; Borea, P.A. Cannabinoid CB2 receptor attenuates morphine-induced inflammatory responses in activated microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 2371–2385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chang, E.; Kim, D.H.; Yang, H.; Lee, D.H.; Bae, S.H.; Park, C.Y. CB1 receptor blockade ameliorates hepatic fat infiltration and inflammation and increases Nrf2-AMPK pathway in a rat model of severely uncontrolled diabetes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Eljaschewitsch, E.; Witting, A.; Mawrin, C.; Lee, T.; Schmidt, P.M.; Wolf, S.; Hoertnagl, H.; Raine, C.S.; Schneider-Stock, R.; Nitsch, R.; et al. The Endocannabinoid Anandamide Protects Neurons during CNS Inflammation by Induction of MKP-1 in Microglial Cells. *Neuron* **2006**, *49*, 67–79. [[CrossRef](#)]
68. De Meij, J.; Alfaneq, Z.; Morel, L.; Decoeur, F.; Leyrolle, Q.; Picard, K.; Carrier, M.; Aubert, A.; Sere, A.; Lucas, C.; et al. Microglial Cannabinoid Type 1 Receptor Regulates Brain Inflammation in a Sex-Specific Manner. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2021**, *6*, 488–507. [[CrossRef](#)]
69. Szabó, R.; Szabó, Z.; Börzsei, D.; Hoffmann, A.; Lesi, Z.N.; Pálszabó, P.; Pálszabó, A.; Dvoráckó, S.; Gesztelyi, R.; Kupai, K.; et al. Potential Implications of Rimonabant on Age-Related Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* **2022**, *11*, 162. [[CrossRef](#)]

70. Mihm, M.J.; Jing, L.; Bauer, J.A. Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, *36*, 182–187. [[CrossRef](#)]
71. Wang, Q.; Pfister, F.; Dorn-Beineke, A.; vom Hagen, F.; Lin, J.; Feng, Y.; Hammes, H.P. Low-dose erythropoietin inhibits oxidative stress and early vascular changes in the experimental diabetic retina. *Diabetologia* **2010**, *53*, 1227–1238. [[CrossRef](#)]
72. Lamoke, F.; Shaw, S.; Yuan, J.; Ananth, S.; Duncan, M.; Martin, P.; Bartoli, M. Increased oxidative and nitrative stress accelerates aging of the retinal vasculature in the diabetic retina. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139664. [[CrossRef](#)]
73. Qaum, T.; Xu, Q.; Joussen, A.M.; Clemens, M.W.; Qin, W.; Miyamoto, K.; Hassessian, H.; Wiegand, S.J.; Rudge, J.; Yancopoulos, G.D.; et al. VEGF-initiated blood–retinal barrier breakdown in early diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 2408–2413.
74. Bucolo, C.; Ward, K.W.; Mazzon, E.; Cuzzocrea, S.; Drago, F. Protective effects of a coumarin derivative in diabetic rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 3846–3852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Stark, A.K.; Giblin, M.; Kim, M.J.; Yang, R.; McCollum, G.W.; Penn, J.S. 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid ethanolamide endocannabinoid mitigates diabetes-induced retinal vascular inflammation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2021**, *62*, 2926.
76. Ontko, C.; Kim, M.J.; Smith, T.E.; McCollum, G.W.; Yang, R.; Penn, J. Cannabinoid Receptor 2 Agonist HU-308 Demonstrates Therapeutic Potential in Inflammatory Diabetic Retinopathy Models. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2021**, *62*, 3012.
77. Callén, L.; Moreno, E.; Barroso-Chinea, P.; Moreno-Delgado, D.; Cortés, A.; Mallol, J.; Casado, V.; Lancigo, J.L.; Franco, R.; Lluís, C.; et al. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20851–20865. [[CrossRef](#)]
78. Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.; Angelats, E.; Etayo, Í.; Reyes-Resina, I.; Pulido-Salgado, M.; Rodríguez-Perez, A.I.; Canela, E.I.; Saura, J.; Lanciergo, J.L.; et al. Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer’s disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain Behav. Immun.* **2018**, *67*, 139–151. [[CrossRef](#)]
79. Matias, I.; Gonthier, M.-P.; Orlando, P.; Martiadis, V.; De Petrocellis, L.; Cervino, C.; Petrosino, S.; Hoareau, L.; Festy, F.; Pasquali, R.; et al. Regulation, Function, and Dysregulation of Endocannabinoids in Models of Adipose and β -Pancreatic Cells and in Obesity and Hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 3171–3180. [[CrossRef](#)]
80. Nogueiras, R.; Diaz-Arteaga, A.; Lockie, S.H.; Velásquez, D.A.; Tschöp, J.; López, M.; Cadwell, C.C.; Diéguez, C.; Tschöp, M.H. The endocannabinoid system: Role in glucose and energy metabolism. *Pharmacol. Res.* **2009**, *60*, 93–98. [[CrossRef](#)]
81. Van Gaal, L.F.; Rissanen, A.M.; Scheen, A.J.; Ziegler, O.; Rössner, S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *The Lancet* **2005**, *365*, 1389–1397. [[CrossRef](#)]
82. Scheen, A.J.; Finer, N.; Hollander, P.; Jensen, M.D.; Van Gaal, L.F. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: A randomised controlled study. *The Lancet* **2006**, *368*, 1660–1672. [[CrossRef](#)]
83. Irwin, N.; Hunter, K.; Frizzell, N.; Flatt, P.R. Antidiabetic effects of sub-chronic administration of the cannabinoid receptor (CB1) antagonist, AM251, in obese diabetic (ob/ob) mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *581*, 226–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Liu, J.; Godlewski, G.; Jourdan, T.; Liu, Z.; Cinar, R.; Xiong, K.; Kunos, G. Cannabinoid-1 Receptor Antagonism Improves Glycemic Control and Increases Energy Expenditure Through Sirtuin-1/Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2 and 5’ Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling. *Hepatology* **2019**, *69*, 1535–1548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Eid, B.G.; Neamatallah, T.; Hanafy, A.; El-Bassossy, H.M.; Aldawsari, H.M.; Vemuri, K.; Makriyannis, A. Effects of the CB1 Receptor Antagonists AM6545 and AM4113 on Insulin Resistance in a High-Fructose High-Salt Rat Model of Metabolic Syndrome. *Medicina* **2020**, *56*, 573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Juan-Picó, P.; Fuentes, E.; Javier Bermúdez-Silva, F.; Javier Díaz-Molina, F.; Ripoll, C.; Rodríguez de Fonseca, F.; Nadal, A. Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic β -cell. *Cell Calcium* **2006**, *39*, 155–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Bermudez-Silva, F.J.; Sanchez-Vera, I.; Suárez, J.; Serrano, A.; Fuentes, E.; Juan-Pico, P.; Nadal, A.; Rodríguez de Fonseca, F. Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *565*, 207–211. [[CrossRef](#)]
88. Zhang, R.; Thor, D.; Han, X.; Anderson, L.; Rahimian, R. Sex differences in mesenteric endothelial function of streptozotocin-induced diabetic rats: A shift in the relative importance of EDRFs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H1183–H1198. [[CrossRef](#)]
89. Ibán-Arias, R.; Lisa, S.; Poulaki, S.; Mastrodimitou, N.; Charalampopoulos, I.; Gravanis, A.; Thermos, K. Effect of topical administration of the microneurotrophin BNN27 in the diabetic rat retina. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2019**, *257*, 2429–2436. [[CrossRef](#)]
90. Anderson, P.J.; Watts, H.; Hille, C.; Philpott, K.; Clark, P.; Gentleman, M.C.; Jen, L.S. Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat. *Clin Ophthalmol.* **2008**, *2*, 801–816. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.