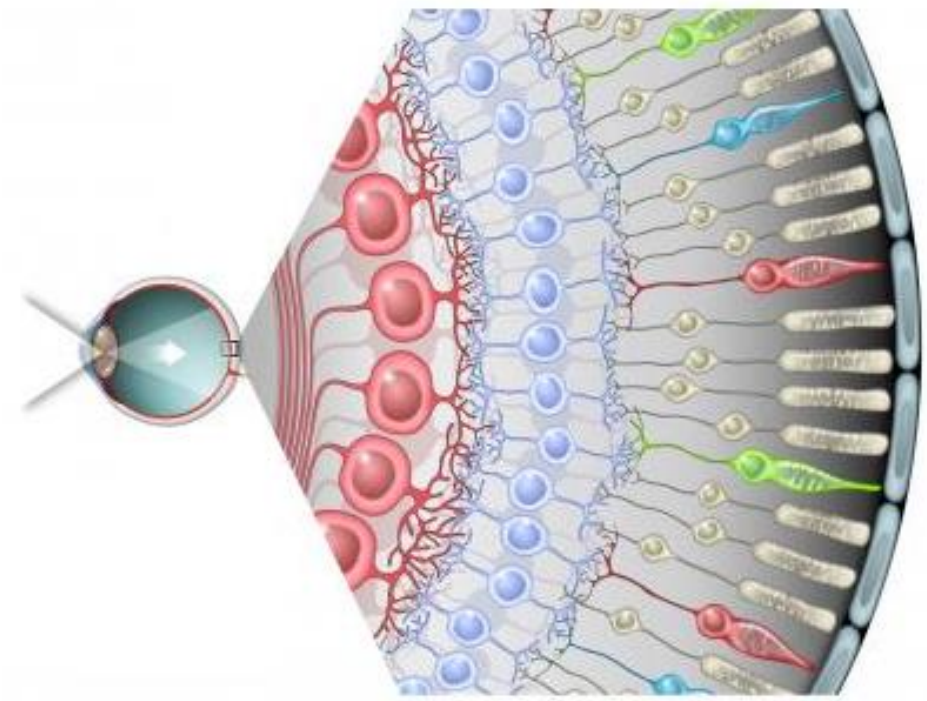
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του νευροστεροειδούς DHEA και των συνθετικών αναλόγων του, BNN27 και BNN20 σε αμφιβληστροειδή αρουραίου, στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας: Μηχανισμός δράσης»



ΤΡΟΥΛΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Θερμού Κυριακή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Υπεύθυνο Μέλος ΔΕΠ: Κατερινόπουλος Χαράλαμπος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας

Τοποθεσία εκπόνησης πτυχιακής: Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή, Τομέας Βασικών Επιστημών, Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Πρόλογος

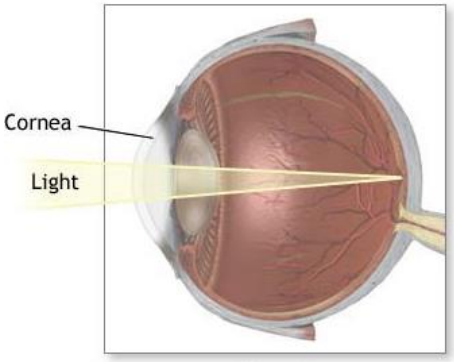
Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την καθηγήτρια φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κα Κυριακή Θερμού, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, τον χρόνο που μου αφιέρωσε, το ενδιαφέρον, αλλά και την κατανόηση που μου έδειξε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, ακόμη, στη Νίκη Μαστροδήμου, PhD, χωρίς τις κατευθύνσεις και την ανεκτίμητη βοήθεια της οποίας, δεν θα είχα ολοκληρώσει την παρούσα πτυχιακή εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τη Silvia Lisa, PhD, τη Ruth Iban-Arias, MSc, τη Σοφία Παπαδογκωνάκη, BSc και τη Μάρα Μπουμπούλη, BSc, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχαν, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής.

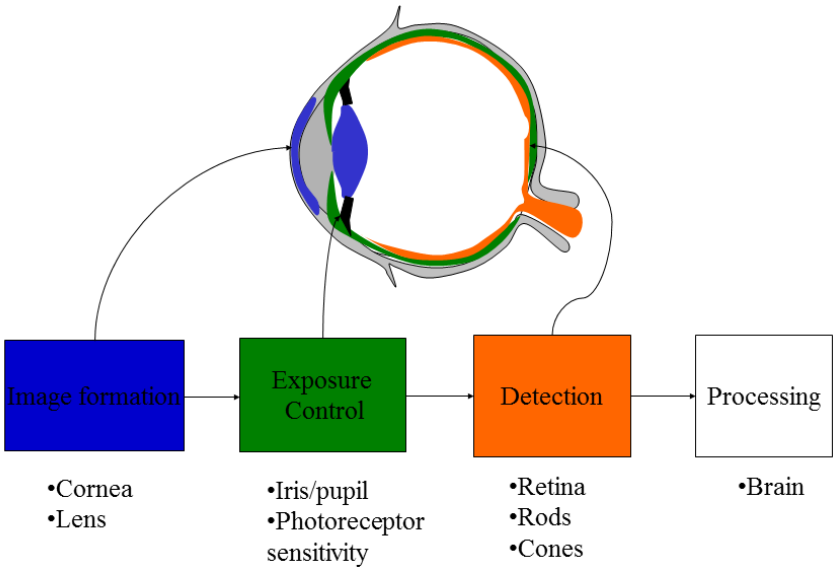
Εισαγωγή

Η όραση είναι το σημαντικότερο από τα πέντε κανάλια επικοινωνίας του ανθρώπινου σώματος με το περιβάλλον. Ο ανθρώπινος οργανισμός στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στις πληροφορίες που συλλέγουν τα μάτια, διαθέτοντας ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο και κριτικό σύστημα όρασης. Σε αυτό το σύστημα, το φως εισέρχεται μέσω της κόρης, εστιάζεται και αναστρέφεται από τον κερατοειδή χιτώνα και τον φακό, ενώ στη συνέχεια προβάλλεται στο πίσω μέρος του ματιού. Εκεί εντοπίζεται ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, στον οποίο το οπτικό ερέθισμα μετατρέπεται σε νευρικό και στη συνέχεια μεταβιβάζεται στον εγκέφαλο για περαιτέρω επεξεργασία, απαραίτητη για την οπτική αντίληψη (Kolb, 2003, http://www.brainfacts.org/Sensing-Thinking - Behaving / Senses-and-Perception / Articles/2012/Vision-It-all-Starts-with-Light).



Εικόνα 1: Εισαγωγή φωτός από την κόρη, εστίαση και αναστροφή από τον κερατοειδή και τον φακό, προβολή στον αμφιβληστροειδή (Tsilimbaris, 2014).

Γίνεται αντιληπτός, επομένως, ο καίριος ρόλος που διαδραματίζει ο αμφιβληστροειδής για την όραση. Τυχόν δυσλειτουργίες σε αυτόν, όπως ελαττωμένη παροχή οξυγόνου ή/και θρεπτικών υλικών, αλλά και ελλιπής απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού ενδέχεται να οδηγήσουν, σε πρώτο στάδιο, σε ισχαιμία ή/και νεοαγγείωση (Osborne et al., 2004). Σε επόμενα στάδια, μπορεί να επιφέρουν σοβαρές αμφιβληστροειδοπάθειες, οι οποίες να προκαλέσουν μείωση της οπτικής οξύτητας και σε πιο προχωρημένο επίπεδο, τύφλωση. Στις μέρες μας, οι εφαρμοζόμενες θεραπείες τέτοιου είδους αμφιβληστροειδοπαθειών επικεντρώνονται κυρίως στη νεοαγγείωση και όχι στον κυτταρικό θάνατο που έχει προκληθεί από την ισχαιμία. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η εύρεση νευροπροστατευτικών μορίων, που θα αποσκοπούν στην καταπολέμηση του κυτταρικού θανάτου, έτσι ώστε, σε συνδυασμό με τις ήδη υπάρχουσες θεραπείες, να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικότερα το θέμα των ισχαιμικών αμφιβληστροειδοπαθειών (Vasilaki and Thermos, 2009).



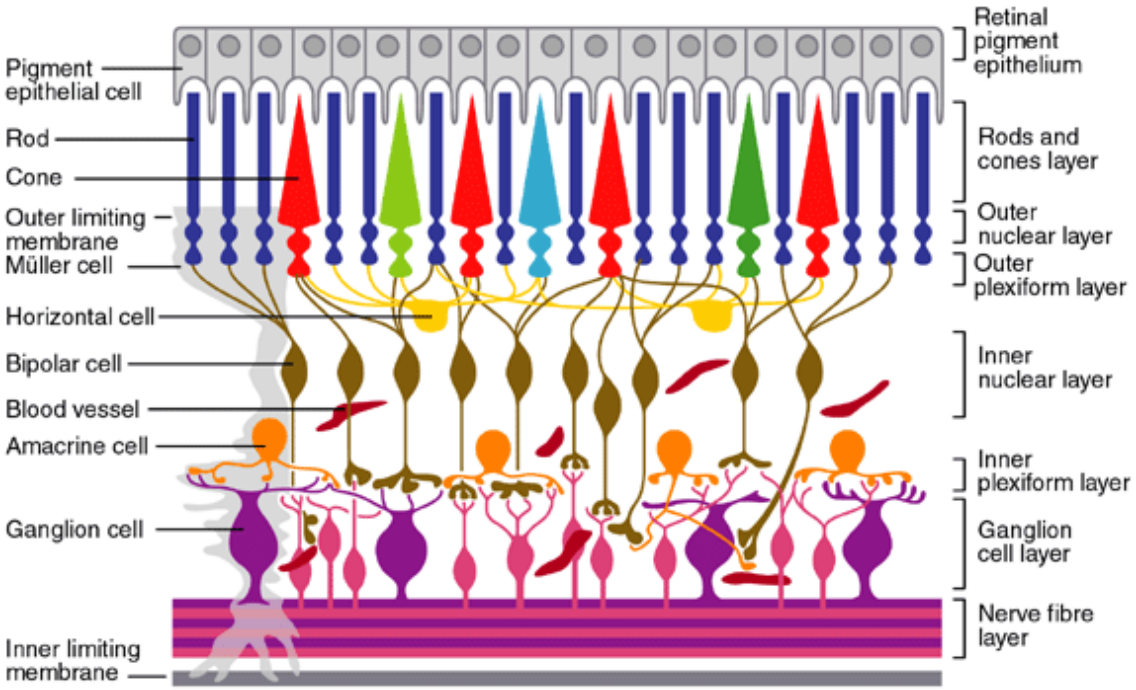
Εικόνα 2: Ο κερατοειδής και ο φακός είναι τα υπεύθυνα οπτικά στοιχεία για την εικόνα που θα σχηματιστεί στο πίσω μέρος του ματιού. Η ίριδα έχει την ικανότητα να διαστέλλεται και να συστέλλεται, ελέγχοντας, με αυτόν τον τρόπο, πόση ποσότητα φωτός θα εισέλθει στο μάτι. Ο αμφιβληστροειδής, μέσω φωτοϋποδεκτικών κυττάρων που διαθέτει, ανιχνεύει το εισερχόμενο φως και με μια σειρά αντιδράσεων το μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρικό αυτό σήμα, μέσω του οπτικού νεύρου, μεταφέρεται στον εγκέφαλο για περαιτέρω επεξεργασία, απαραίτητη για την οπτική αντίληψη (Tsilimbaris, 2014).

Αμφιβληστροειδής

Δομή:

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Η δομή του ωστόσο, είναι απλή, συγκριτικά με άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Περιλαμβάνει 5 κύριους τύπους νευρικών κυττάρων: από έξω, οι φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι είναι τα φωτοευαίσθητα κύτταρα του αμφιβληστροειδή, ενώ προς τα μέσα, τα δίπολα κύτταρα και τα γαγγλιακά κύτταρα, των οποίων οι φυγόκεντρες ίνες σχηματίζουν το οπτικό νεύρο. Μεταξύ των παραπάνω κυττάρων, εντοπίζονται άλλοι 2 τύποι νευρώνων, τα βραχύινα και τα οριζόντια κύτταρα. Τα νευρικά αυτά κύτταρα συνδέονται με έναν πολύπλοκο τρόπο και μαζί με τις συνάψεις τους, διαμορφώνουν 5 διακριτές στιβάδες. Τα κυτταρικά σώματα διατάσσονται σε 3 στιβάδες: την εξωτερική κοκκώδη στιβάδα, στην οποία εντοπίζονται τα εξωτερικά και εσωτερικά τμήματα των κυττάρων των φωτοϋποδοχέων (κωνία και ραβδία), την εσωτερική κοκκώδη στιβάδα, η οποία περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα και τους πυρήνες των οριζόντιων, των δίπολων και των βραχύινων κυττάρων και τη γαγγλιακή στιβάδα, όπου κείτονται τα κυτταρικά σώματα και οι πυρήνες των δεύτερων αισθητήριων κυττάρων του οπτικού μονοπατιού, των γαγγλιακών κυττάρων. Η τελευταία αυτή στιβάδα περιλαμβάνει επίσης και κάποια αμφιβληστροειδικά αιμοφόρα αγγεία. Οι συνάψεις των κυττάρων εντοπίζονται στις υπόλοιπες 2 στιβάδες. Η 1^{η} είναι η εξωτερική δικτυωτή στιβάδα και περιλαμβάνει τις συνάψεις των φωτοϋποδοχέων με τα δίπολα κύτταρα, καθώς και τους δενδρίτες των οριζοντίων κυττάρων, τα οποία

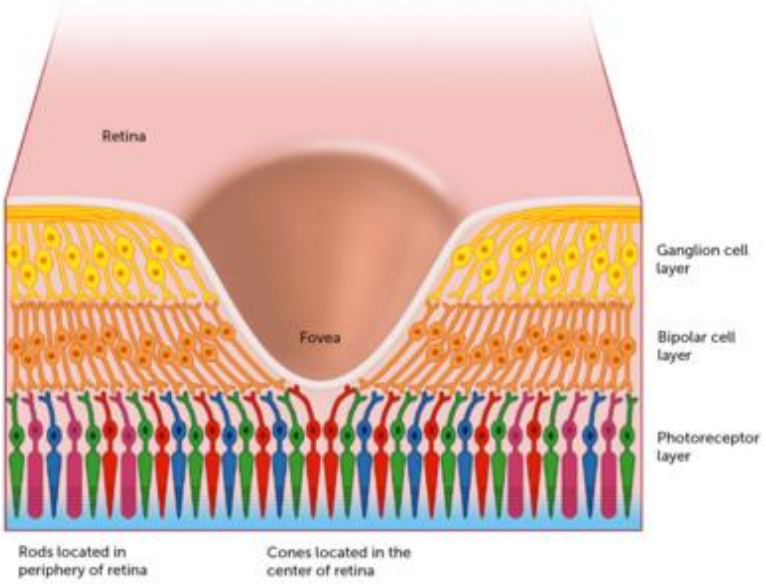
εκτείνονται παράλληλα με την επιφάνεια του αμφιβληστροειδή. Η 2η είναι η εσωτερική δικτυωτή στιβάδα και περιλαμβάνει, τις συνάψεις των γαγγλιακών κυττάρων με τα δίπολα και εκείνες των βραχύινων με τα γαγγλικά. Οι νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων είναι εκείνοι που σχηματίζουν το οπτικό νεύρο, μέσω του οποίου η πληροφορία μεταβιβάζεται σε ανώτερα κέντρα του ΚΝΣ, προκειμένου να επεξεργαστεί (Dowling, 1987, Kolb, 2003, Tsilimbaris, MD, σημειώσεις).



Εικόνα 3: Κυτταρική οργάνωση του αμφιβληστροειδή (http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_15/S1462399404008129sup005.pdf).

Ο αμφιβληστροειδής περιλαμβάνει τόσο τους φωτοευαίσθητους νευρώνες (φωτοϋποδοχείς), οι οποίοι ανταποκρίνονται στο φως, όσο και πολύπλοκα νευρωνικά κυκλώματα, τα οποία εφαρμόζουν τα πρώτα στάδια της απόκτησης της εικόνας. Με μια πρώτη σκέψη, θα περιμέναμε οι φωτοπϋποδοχείς να βρίσκονται στο μπροστινό τμήμα του αμφιβληστροειδή, το οποίο συναντάει το φως, μόλις διασχίσει το υαλώδες σώμα. Παρόλα αυτά, στην πραγματικότητα, εντοπίζονται στο πίσω τμήμα του βολβού και το φως πρέπει να διασχίσει όλον τον αμφιβληστροειδή για να φθάσει και να διεγείρει τα φωτοευαίσθητα αυτά κύτταρα. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι η ανάγκη των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων να βρίσκονται σε επαφή με τη στιβάδα του μελάγχρουν επιθηλίου. Αυτή η ανάγκη απορρέει από τους εξής λόγους: 1) το μελάγχρουν επιθήλιο περιέχει κοκκία μελανίνης, τα οποία απορροφούν το φως, το οποίο διαπερνά τη στιβάδα των φωτοϋποδοχέων, βελτιώνοντας την ποιότητα της όρασης, η οποία θα μειωνόταν από το διαχεόμενο φως, 2) διατηρεί στα κατάλληλα επίπεδα, τη συγκέντρωση ιόντων στο υγρό που περιβάλλει τους φωτοϋποδοχείς, 3) επεξεργάζεται και

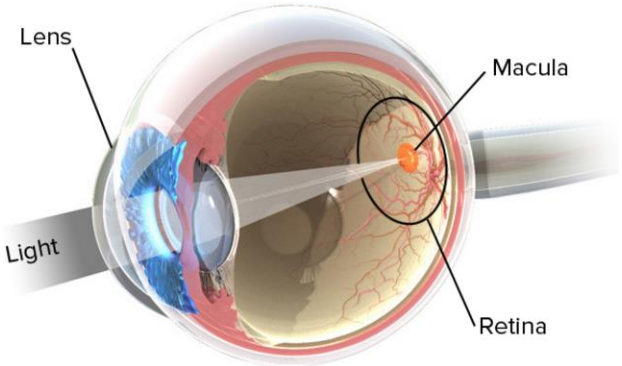
ανακυκλώνει τα παράγωγα της βιταμίνης Α, που χρησιμοποιούν οι φωτοϋποδοχείς για την ανίχνευση του φωτός, 4) συμβάλλει στη θρέψη τους, μεταφέροντας και φιλτράροντας τα θρεπτικά συστατικά των αιμοφόρων αγγείων και 5) τους φαγωκυτταρώνει, αντικαθιστώντας τις πρωτεϊνες και τα λιπίδια του έξω τμήματος που υφίστανται φωτοξείδωση (χημική καταστροφή λόγω έκθεσης σε φως και οξυγόνο) (Κριατσιώτης, 2004).



Εικόνα 4: Τα κυτταρικά σώματα μετατοπίζονται, ούτως ώστε το φως να φθάσει στους φωτοϋποδοχείς του κεντρικού βοθρίου (https://wine4soul.files.wordpress.com/2012/12/fovea-and-receptors.jpg).

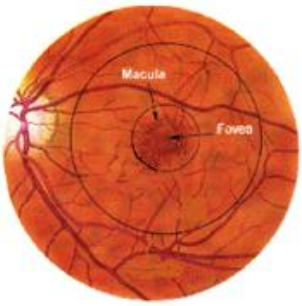
Τα σπονδυλωτα διαθέτουν 2 είδη φωτοϋποδεκτικών κυττάρων, τα οποία λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος της εξωτερικής αποφυάδας τους (σχήμα ραβδίου ή κωνίου), ονομάζονται ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα. Τα κωνιοφόρα κύτταρα λειτουργούν στο έντονο φως και είναι υπεύθυνα για την έγχρωμη όραση, ενώ τα ραβδιοφόρα λειτουργούν στο αμυδρό φως και δεν αντιλαμβάνονται τα χρώματα. Τα φωτοϋποδεκτικά μόρια, στα οποία έγινε αναφορά και παραπάνω, ονομάζονται συχνά οπτικές χρωστικές και καλύπτουν τα εξωτερικά τμήματα τόσο των ραβδιοφόρων, όσο και των κωνιοφόρων. Οι χρωστικές αυτές απορροφούν το φως και επιφέρουν έναν «καταρράκτη» διαδικασιών, οι οποίες οδηγούν σε υπερπόλωση των μεμβρανικών υποδιοχέων. Η οπτική πληροφορία μεταβιβάζεται, στη συνέχεια, στα γαγγλιακά κύτταρα, είτε μέσω του κάθετου μονοπατιού, δηλαδή από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα κύττρα και έπειτα στα γαγγλιακά, είτε μέσω του οριζόντιου μονοπατιού, δηλαδή μέσω των ενδιάμεσων νευρώνων (οριζόντια, δίπολα, βραχύινα) (Dowling, 1987, Kolb, 2003, Berg, 2013).

Τα πρωτεύοντα θηλαστικά διαθέτουν μια κεντρική περιοχή στον αμφιβληστροειδή, με διάμετρο περίπου 5 χιλιοστά του μέτρου, η οποία καλείται ωχρά κηλίδα. Η ωχρα κηλίδα είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των λεπτομερειών του σημείου, στο οποίο εστιάζουμε την προσοχή μας, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης κωνίων που περιέχει, με αποκορύφωμα το βοθρίο. Το βοθρίο εντοπίζεται στην κεντρική της περιοχή και είναι εξαιρετικά πλούσιο αποκλειστικά σε κωνιοφόρα κύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρουσιάζει μέγιστη δυνατότητα ευκρίνειας, στο έντονο φως (Batterbury et al., 2014).



Εικόνα 5: Η ωχρά κηλίδα είναι υπεύθυνη για την κεντρική όραση και μας επιτρέπει να βλέπουμε με μεγάλη ευκρίνεια έτσι ώστε να αντιλαμβανόμαστε τις λεπτομέρειες της εικόνας (http://www.scienceofamd.org/wp-content/uploads/2012/01/retina.png).

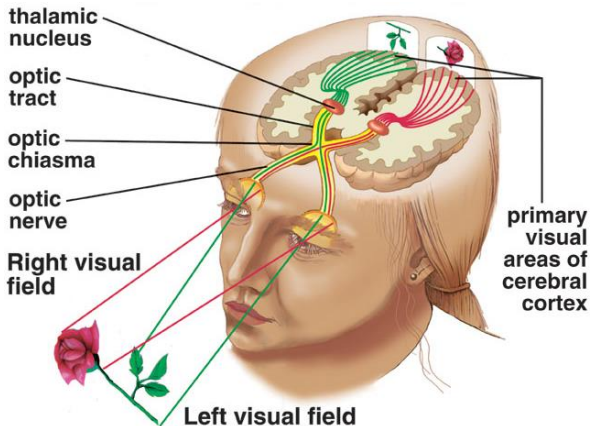
Μια 3η χαρακτηριστική περιοχή του αμφιβληστροειδή είναι ο οπτικός δίσκος ή αλλιώς οπτική θηλή. Αυτό αποτελεί το σημείο του οπτικού νεύρου, από όπου οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων εγκαταλείπουν τον αμφιβληστροειδή. Η περιοχή αυτή στερείται φωτοϋποδοχέων και γι αυτό δημιουργεί ένα τυφλό σημείο στο οπτικό πεδίο.



Εικόνα 6: Εικόνα του αμφιβληστροειδή από το μπροστινό μέρος του ματιού. Η ωχρά κηλίδα περιβάλλει το κεντρικό βοθρίο, ακριβώς πίσω από την κόρη, μέσω της οποίας το φως εισέρχεται στο μάτι. Ο οπτικός δίσκος βρίσκεται στα αριστερά, από όπου τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα εξέρχονται από το μάτι (Tsilimbaris, 2014).

Οι υπόλοιπες περιοχές του αμφιβληστροειδή αποτελούνται κυρίως από ραβία και εξυπηρετούν, εκτός από την νυχτερινή, την περιφερειακή όραση.

Μέσω του οπτικού νεύρου, η οπτική πληροφορία μεταφέρεται με τη μορφή ηλεκτρικών σημάτων στον εξω γονατώδη πυρήνα του θαλάμου και στη συνέχεια στον οπτικό (ή ραβδωτό) φλοιό για επεξεργασία.



Εικόνα 7: Και τα 2 μάτια βλέπουν ολόκληρο το οπτικό πεδίο. Εξαιτίας του οπτικού χιάσματος, δεδομένα από το δεξί μισό τμήμα του κάθε αμφιβληστροειδή, πηγαίνουν στις δεξιές οπτικές περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού και δεδομένα από το αριστερό μισό τμήμα κάθε αμφιβληστροειδή πηγαίνουν στις αριστερές οπτικές περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού. Τα δεδομένα αυτά, στη συνέχεια, συνδυάζονται για να μας επιτρέψουν να δούμε ολόκληρο το οπτικό πεδίο. Σημειώνεται πως το οπτικό αυτό μονοπάτι στον εγκέφαλο, περιλαμβάνει και τον θάλαμο, ο οποίος έχει την ικανότητα να φιλτράρει τα αισθητηριακά ερεθίσματα (Tsilimbaris, 2014).

Ο αμφιβληστροειδής, παρά τη λειτουργική του πολυπλοκότητα, διαθέτει απλή δομή. Το γεγονός αυτό τον καθιστά αξιοσημείωτο όργανο μελέτης για την κατανόηση άλλων, τόσο λειτουργικά, όσο και ανατομικά πολύπλοκων δομών του κεντρικού νευρικού συστήματος (Kandel et al., 2011).

Νευροδιαβίβαση και αμφιβληστροειδής:

Τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους ηλεκτρικά μέσω χασμοσυνδέσμων και χημικά μέσω νευροδιαβιβαστών. Η χημική συναπτική μετάδοση επιτρέπει την ανταλλαγή νευρικών σημάτων μεταξύ των κυττάρων, που είναι ηλεκτρικά απομονωμένα το ένα από το άλλο. Ο χημικός αγγελιοφόρος ή νευροδιαβιβαστής παρέχει έναν τρόπο μεταφοράς του σήματος κατά μήκος του εξωκυττάριου χώρου, από τον προσυναπτικό νευρώνα στο μετασυναπτικό κύτταρο. Το κενό ονομάζεται συναπτική σχισμή. Οι νευροδιαβιβαστές συντίθενται στο προσυναπτικό κύτταρο, και αποθηκεύονται σε κυστίδια σε προσυναπτικές διαδικασίες. Όταν ο προσυναπτικός νευρώνας διεγερθεί, τα κανάλια ασβεστίου ανοίγουν και το ασβέστιο που εισρέει στο κύτταρο, προκαλεί έναν καταρράκτη γεγονότων, που οδηγεί στην απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Μόλις απελευθερωθεί ο νευροδιαβιβαστής, διαχέεται κατά μήκος της συναπτικής σχισμής και προσδένεται σε υποδοχείς, στο μετασυναπτικό κύτταρο, επιτρέποντας στο σήμα να διαδοθεί. Τα

μόρια των νευροδιαβιβαστών μπορούν, επίσης, να προσδεθούν σε προσυναπτικούς αυτοϋποδοχείς και μεταφορείς, ρυθμίζοντας μεταγενέστερες απελευθερώσεις και απομακρύνοντας από τη συναπτική σχισμή υπερβολική ποσότητα νευροδιαβιβαστών(http://webvision.med.utah.edu/book/part-v-phototransduction-in-rods-and-cones/glutamate-and-glutamate-receptors-in-the-vertebrate-retina/).

Τεχνικές χρώσης έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη ηλεκτρικών συνδέσμων μεταξύ των κυττάρων του αμφιβληστροειδή, καθώς και την ταυτότητα και τη θέση νευροδιαβιβαστικών υποδοχέων και μεταφορέων. Οι 2 κυριότεροι νευροδιαβιβαστές του αμφιβληστροειδή είναι το γλουταμινικό οξύ (Glu), που δρα διεγερτικά και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), που δρα ανασταλτικά. Το Glu αποτελεί τον νευροδιαβιβαστή που διασχίζει τα κάθετα μονοπάτια του αμφιβληστροειδή, από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα και από εκεί στα γαγγλιακά κύτταρα, προκειμένου να μεταφέρει την οπτική πληροφορία (Kolb, 2003). Αντίθετα, το GABA, κυρίως μέσω των συνάψεων του, συντελεί στην οριζόντια μεταβίβαση της οπτικής πληροφορίας, μεταξύ οριζόντιων και βραχύινων κυττάρων (Yang, 2004). Άλλα παραδείγματα νευροδιαβιβαστών, που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος στον αμφιβληστροειδή, είναι η γλυκίνη, η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη, η σωματοστατίνη, η σεροτονίνη, το μονοξείδιο του Αζώτου (http://webvision.med.utah.edu/book/part-iv-neurotransmitters-in-the-retina-2/ part-iv-neurotransmitters-in-the-retina/).

Το γλουταμινικό:

Καμία εντύπωση δεν προκαλεί η ιδιότητα του Glu, ως ένας από τους κυριότερους νευροδιαβιβαστές του αμφιβληστροειδή, δεδομένου ότι ο τελευταίος αποτελεί μέρος του ΚΝΣ. Είναι γνωστό ότι το Glu αποτελεί τον κυριότερο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ των θηλαστικών και εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η μνήμη, η μάθηση, το άγχος, ο νευροτοξικός τραυματισμός, η επιληψία, η κατάθλιψη, η ψύχωση (Platt, 2007).

Οι μεταφορείς του Glu, EAATs (Excitatory Amino Acid Transporters) αποτελούν μεμβρανικές πρωτεΐνες και διαιρούνται σε 5 κατηγορίες: EAAT1-EAAT5 (Arizza et al., 1997).

Οι υποδοχείς του γλουταμινικού χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, στους ιονοτροπικούς (iGluRs) και τους μεταβολοτροπικούς (mGluRs) υποδοχείς, ανάλογα με τον μηχανισμό, με τον οποίο η ενεργοποίησή τους προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης του μετασυναπτικού νευρώνα (Ozawa et al., 1998). Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς αποτελούν μη εκλεκτικούς διαύλους ιόντων και κατηγοριοποιούνται στους NMDA και στους μη-NMDA, ανάλογα με τους αγωνιστές και τους ανταγωνιστές που τους ενεργοποιούν και τους αναστέλλουν αντίστοιχα. Οι μη NMDA χωρίζονται, με τη σειρά τους, στους AMPA και καϊνικού οξέος (KA) υποδοχείς

(Bleakman and Lodge, 1998). Αντίθετα με τους ιονοτροπικούς, οι οποίοι συνδέονται άμεσα με ένα ιοντικό κανάλι, οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς συνδέονται με το ιοντικό τους κανάλι, έμμεσα, μέσω του μονοπατιού ενός δεύτερου αγγελιοφορού. Η πρόσδεση του γλουταμινικού ενεργοποιεί μια G-πρωτεΐνη και ξεκινά μια ενδοκυττάρια σειρά διαδικασιών (Nestler and Duman, 1994). Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί 8 διαφορετικοί μεταβολοτροπικοί υποδοχείς, mGluR1-mGluR8, οι οποίοι κατηγοροποιούνται σε 3 ομάδες (I, II και III), βάσει της δομικής τους ομολογίας, της εκλεκτικότητας των αγωνιστών και του συστήματος των δεύτερων αγγελιοφόρων που χρησιμοποιούν (Nakanishi, 1994, Pin and Duvoisin, 1995, Pin and Bockaert, 1995). Οι υποδοχείς γλουταμινικού εντοπίζονται σε όλους τους τύπους νευρικών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (Brandstätter et al., 1998).

Εντούτοις, η υπερβολική ποσότητα γλουταμινικού είναι τοξική για τους νευρώνες και ενδέχεται είτε να οδηγήσει σε οξείες βλάβες του ΚΝΣ, είτε να αποτελέσει παράγοντα στην εκδήλωση χρόνιων νευροεκφυλιστικών παθήσεων (Choi., 1988). Το φαινόμενο αυτό καλείται διεγερτοτοξικότητα. Ο όρος "διεγερτοτοξικότητα" προέρχεται από την παρατήρηση ότι σ' αυτόν τον νευρωνικό θάνατο είναι σημαντική η συμμετοχή διεγερτικών νευροδιαβιβαστών, όπως είναι το γλουταμινικό οξύ, στην προκειμένη περίπτωση. Το αμινοξύ αυτό αντιδρά με τους υποδοχείς του και αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου. Αν το κύτταρο δεν καταφέρει να καταπολεμήσει τη μεγάλη και παρατεταμένη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+}, τότε ενεργοποιούνται κυτταρικοί καταβολικοί μηχανισμοί, με κίνδυνο την καταστροφή του (Lipton and Rosenberg, 1994). Η διεγερτοτοξικότητα εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών αμφιβληστροπαθειών, οι οποίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Αμφιβληστροειδοπάθειες

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί έναν λεπτό χιτώνα, με πάχος που φθάνει μόλις τα 0,5 χιλιοστά στο κέντρο, ο οποίος εκτός από το φως, παρουσιάζει ευαισθησία και σε πλήθος παθήσεων. Οι παθήσεις τους αμφιβληστροειδή (αμφιβληστροειδοπάθειες) μπορούν να οδηγήσουν από μείωση της οπτικής οξύτητας μέχρι και τύφλωση (Osborne et al, 2004). Αποτελέσματα ερευνών παγκοσμίως κατατάσσουν τις παθήσεις που προκαλούν τύφλωση κατά την εξής σειρά: 1ος ο καταρράκτης, 2ο το γλαύκωμα, 3η η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, 4η αδιαφάνεια του κερατοειδή, 5η η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Resnikoff et al., 2004). Παρατηρείται ότι ο καταρράκτης και η αδιαφάνεια του κερατοειδή κατέχουν υψηλές θέσεις σε αυτή την κατάταξη αν και δεν αποτελούν αμφιβληστροειδοπάθειες. Παρόλα αυτά το ποσοστό της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (4,8%) προσεγγίζει πολύ το ποσοσστό της αδιαφάνειας

του κερατοειδή (5,1%) (Resnikoff et al., 2004). Σημειώνεται ακόμη, πως ο καταρράκτης, που αποτελεί την 1η αιτία τύφλωσης παγκοσμίως, μπορεί να προκληθεί και από διαβήτη (διαβητικός καταρράκτης), όπως και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Klein et al., 1984).

Γλαύκωμα

Το γλαύκωμα αποτελεί μία χρόνια εξελικτική νευροπάθεια, κατά την οποία προκαλείται βλάβη των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδή, που σχηματίζουν το οπτικό νεύρο, συνήθως λόγω αύξησης της ενδοφθάλμιας πίεσης (πίεση εντός του οφθαλμού) (Casson et al., 2012).

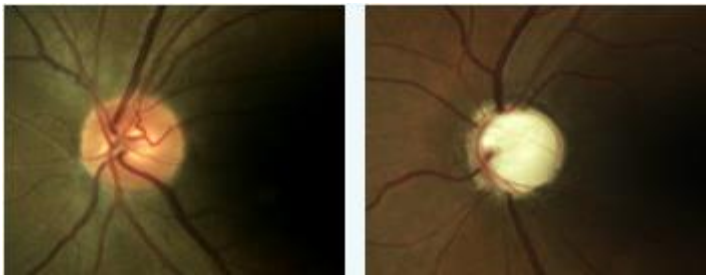
Η ενδοφθάλμια πίεση δημιουργείται από το υδατοειδές υγρό, το οποίο παράγεται από το ακτινωτό σώμα (περιοχή πίσω από την ίριδα) και βρίσκεται στο πρόσθιο τμήμα του ματιού. Το υγρό αυτό, εγκαταλείπει τον οφθαλμό από ένα ειδικό σύστημα σωληνίσκων-φίλτρο, που καλείται διηθητικός ηθμός και βρίσκεται στο σημείο που συμβάλλει η ίριδα και ο κερατοειδής, στη γωνία του οφθαλμού. Στα φυσιολογικά μάτια υπάρχει ισορροπία μεταξύ του παραγόμενου και του αποχετευόμενου υγρού (Batterbury et al., 2009). Διαταρραχή αυτής της ισορροπίας, συνήθως λόγω μείωσης της αποχέτευσης, οδηγεί σε αύξηση της πίεσης στο μάτι. Με την πάροδο του χρόνου, η πίεση που ασκείται στο οπτικό νεύρο, μπορεί να οδηγήσει σε προοδευτική και μη αναστρέψιμη βλάβη αυτού, με αποτέλεσμα μόνιμη απώλεια της όρασης (http://www.ophthalmica.gr/el/pathiseis/item/42-glaukoma.html).

Παρόλα αυτά η ενδοφθάλμια πίεση δεν είναι πάντα υπεύθυνη για την πρόκληση γλαυκώματος. Το 95% των ανθρώπων έχουν ενδοφθάλμια πίεση μεταξύ 12 και 21 mmHg (φυσιολογικά όρια). Όταν η ενδοφθάλμια πίεση γίνει ανώτερη των 21mmHg, τότε ο ασθενής παρουιάζει οφθαλμική υπερτονία, η οποία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση γλαυκώματος (Shiose, 1990). Η οφθαλμική υπερτονία όμως δεν είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη για την εμφάνιση γλαυκώματος, καθώς πρέπει να παρατηρείται ταυτόχρονα και βλάβη του οπτικού νεύρου (Noecker, 2006). Υπάρχει, για παράδειγμα, το «Γλαύκωμα Φυσιολογικής ή Χαμηλής Πίεσης», όπου παρατηρείται βλάβη του οπτικού νεύρου, χωρίς όμως αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Σ' αυτή τη μορφή γλαυκώματος σημαντικό ρόλο παίζει ο αγγειακός παράγοντας (http://www.ophthalmica.gr/el/pathiseis/item/42-glaukoma.html).

Παθολογία:

Το οπτικό νεύρο αποτελείται από περίπου 1,2 εκατομμύρια νευρικές ίνες, οι οποίες μεταφέρουν συνεχώς, με συγκεκριμένη τοπογραφική κατανομή, φωτεινά ερεθίσματα προς τον εγκέφαλο. Κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου

ένα ποσοστό των νευρικών ινών χάνεται φυσιολογικά και δεν αποκαθίσταται, χωρίς αυτή η φυσιολογική ηλικιακή απώλεια να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην όραση. Στο γλαύκωμα, η απώλεια νευρικών ινών είναι πολύ ταχύτερη, με αποτέλεσμα σε βάθος χρόνου, το οπτικό νεύρο να υφίσταται βλάβη και να σημειώνεται μείωση της όρασης.



Εικόνα 8: Φυσιολογικό οπτικό νεύρο δεξιά. Οπτικό νεύρο με προχωρημένες γλαυκωματικές αλλοιώσεις και απώλεια ιστού αριστερά (http://www.glaucoma.com.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=91&Itemid=142&lang=el).

Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι από τις πιο συχνές επιπλοκές των διαβητικά ασθενών και δυστυχώς σε πολλές περιπτώσεις, όταν ο ασθενής αντιλαμβάνεται τα συμπτώματα της πάθησης, είναι πολύ αργά για αποτελεσματική θεραπεία (Sivakumar et al., 2005). Αποτελεί μια εξελικτική πάθηση, η οποία αρχικά, προσβάλλει τα αγγεία του αμφιβληστροειδή (διαβητική μικροαγγειοπάθεια), ενώ στην πορεία, δημιουργεί εκτεταμένες αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή και ιδιαίτερα στην ωχρά κηλίδα, με αποτέλεσμα την ελάττωση της όρασης και την τύφλωση (Sivakumar et al., 2005, Kohner et al., 1998). Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια διακρίνεται σε μη παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) και σε παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (proliferative diabetic retinopathy, PDR) (Abdulrahman A. Alghadyan, 2011).

Η **μη παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια** εμφανίζεται συνήθως στα πρώτα στάδια της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Σε αυτή την κατάσταση, παρατηρείται διαρροή των κατεστραμμένων αιμοφόρων αγγείων του αμφιβληστροειδή, με συνεπακόλουθο την απελευθέρωση υγρών και μικρών ποσοτήτων αίματος στο μάτι. Συχνά λαμβάνει χώρα και εναπόθεση χοληστερόλης ή άλλων λιπιδίων στον αμφιβληστροειδή. Συγκεκριμένα, οι αλλαγές που προκαλούνται περιλαμβάνουν:

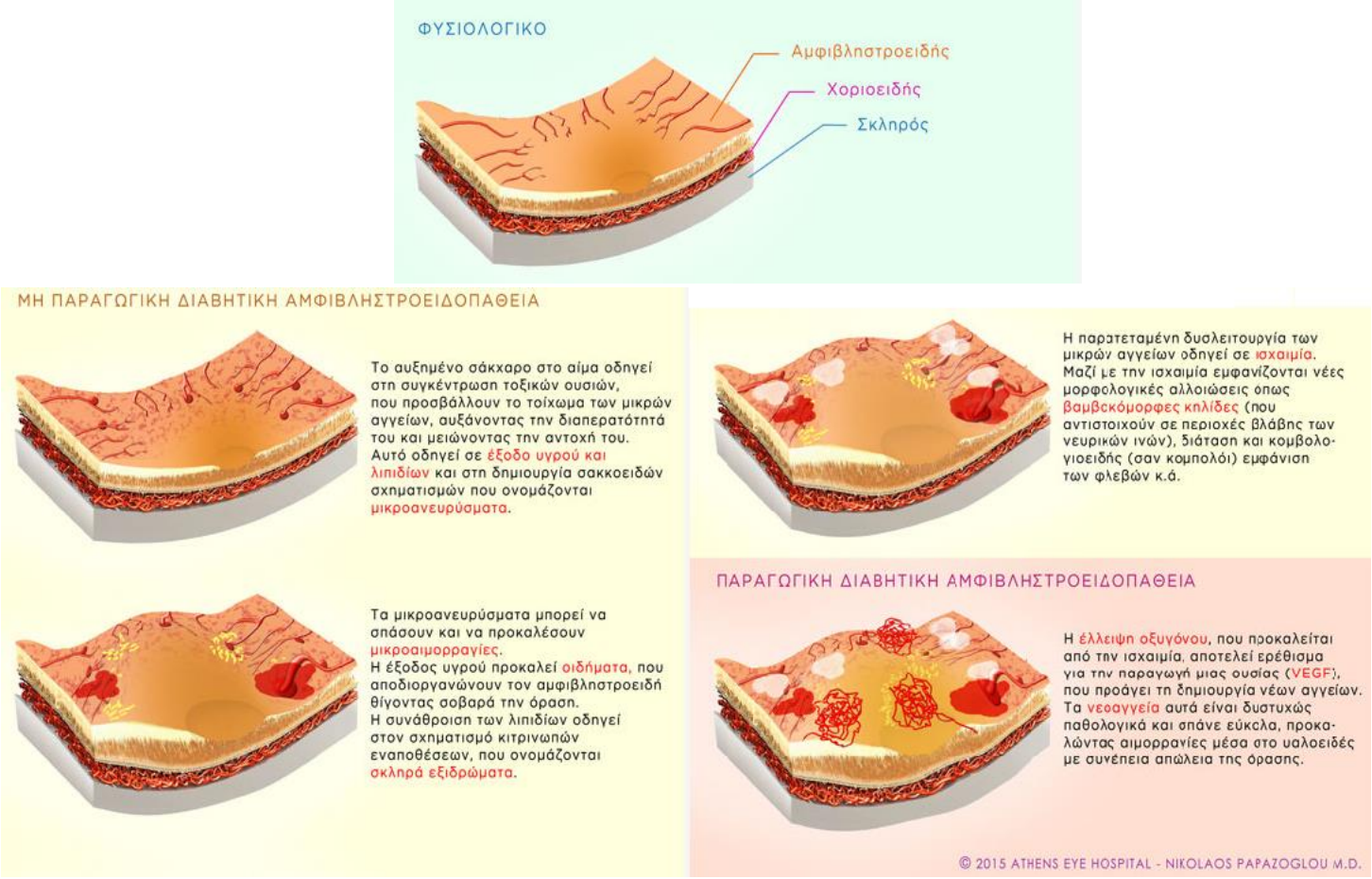
- Μικροανευρίσματα: μικρά εξογκώματα στα αιμοφόρα αγγεία του αμφιβληστροειδή, τα οποία συχνά διαρρέουν υγρό

- Αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες: μικρές κηλίδες αίματος στον αμφιβληστροειδή
- Εξιδρώματα: εναποθέσεις χοληστερόλης ή άλλων λιπιδίων στον αμφιβληστροειδή
- Οίδημα της ωχράς κηλίδας: πρήξιμο ή λέπτυνση της ωχράς, το οποίο προκαλείται από τη διαρροή υγρών των αμφιβληστροειδικών αιμοφόρων αγγείων. Το οίδημα δυσχεραίνει τη λειτουργία της ωχράς και αποτελεί την κυρίαρχη αιτία τύφλωσης στους διαβητικούς (Romero-Aroca., 2011).
- Ισχαιμία της ωχράς κηλίδας: κατάσταση υποξείας και υπογλυκαμιίας, που προκαλείται από το κλείσιμο των μικρών αιμοφόρων αγγείων. Η ωχρά κηλίδα αδυνατεί να λειτουργήσει σωστά, λόγω μη επαρκούς αιμάτωσης και αυτό συντελεί στη θόλωση της όρασης.

Παρόλα αυτά, πολλοί πάσχοντες εμφανίζουν ήπιας μορφής μη παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η όρασή τους δεν επηρεάζεται. Εάν η όραση επηρεαστεί, αυτό είναι αποτέλεσμα οιδήματος και ισχαιμίας της ωχράς.

Η **παραγωγική διαβητική αμφβληστροειδοπάθεια** κάνει την εμφάνισή της σε καταστάσεις, όπου η ροή αίματος στον αμφιβληστροειδή είναι περιορισμένη, λόγω απόφραξης πολλών αιμοφόρων αγγείων. Ο αμφιβληστροειδής, στην προσπάθειά του να τροφοδοτήσει με αίμα τις περιοχές εκείνες, αναπτύσσει νέα αιμοφόρα αγγεία, φαινόμενο που καλείται νεοαγγείωση (Neely and Gardner, 1998). Τα νέα όμως αυτά αγγεία είναι παθολογικά, καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα κ συχνά αιμορραγούν. Η παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια μπορεί να επηρεάσει τόσο την κεντρική, όσο και την περιφερειακή όραση, με τους εξής τρόπους:

- Αιμορραγία υαλοειδούς: Τα εύθραυστα αιμοφόρα αγγεία αιμορραγούν στο υαλοειδές υγρό, εμποδίζοντας τις ακτίνες του φωτός να φθάσουν τον αμφιβληστροειδή. Εντούτοις το αίμα μπορεί να απομακρυνθεί και η όραση να επανέλθει, εκτός αν έχει υποστεί ζημιά η ωχρά κηλίδα.
- Ελκτική αποκόλληση αμφιβληστροειδή: Η νεοαγγείωση συνοδεύεται από την εμφάνιση ουλώδους ιστού, ο οποίος συρρικνώνεται και μπορεί να «διπλώσει» τον αμφιβληστροειδή, ακόμη και να τον αποκολλήσει. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σοβαρό κίνδυνο τύφλωσης.
- Νεοαγγειακό γλαύκωμα: Σε περιπτώσεις σημαντικής ισχαιμίας, η νεοαγγείωση ενδέχεται να λάβει χώρα και στην ίριδα. Σε αυτή την περίπτωση τα νέα αιμοφόρα αγγεία μπορεί να εμποδίσουν τη φυσιολογική ροή του υδατοειδούς υγρού έξω από το μάτι, προκαλώντας γλαύκωμα (http://www.aao.org/eye-health/tips-prevention/what-is-diabetic-retinopathy).



Εικόνα 9: Απεικόνιση των μορφολογικών αλλαγών του αμφιβληστροειδή στη μη-παραγωγική και στην παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, συγκριτικά με το φυσιολογικό http://www.athenseyehospital.gr/gr/morfes-kai-pathogenesi-tis-diavitikis-amfivlistroeidopatheias-p60.html

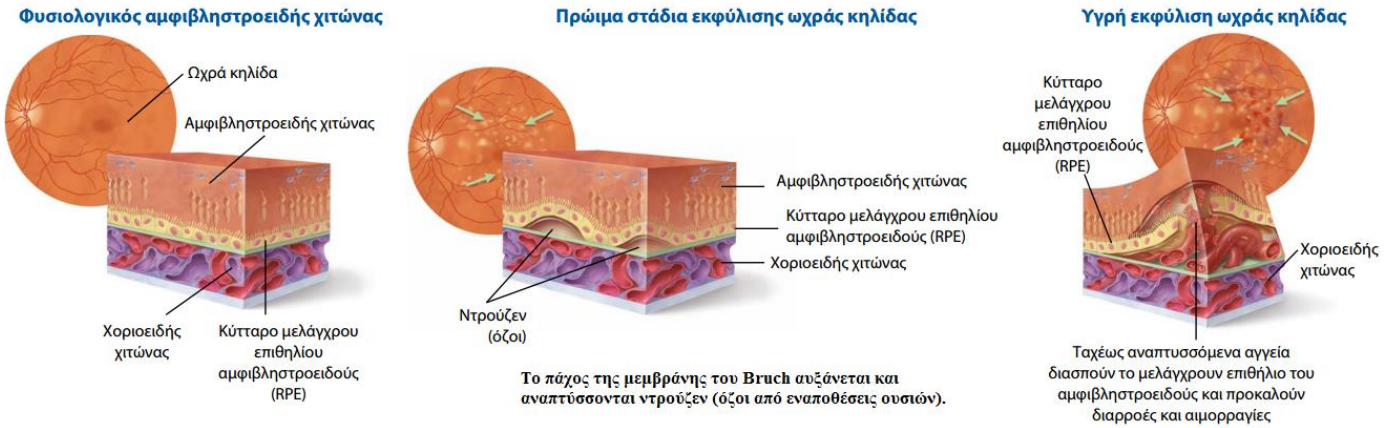
Ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας

Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Age-related Macular Degeneration, AMD) αποτελεί μια νευροεκφυλιστική αμφιβληστροειδική πάθηση, η οποία προκαλεί σταδιακή απώλεια της κεντρικής όρασης, σε άτομα άνω των 50 ετών (Birch and Liang., 2007). Η πάθηση χωρίζεται σε 2 μορφές, την ξηρή (ατροφική, μη εξιδρωματική) και την υγρή (νεοαγγειακή, εξιδρωματική), βάσει της απουσίας ή της παρουσίας, αντίστοιχα, αιμοφόρων αγγείων, τα οποία εχουν εισβάλει άτακτα στον αμφιβληστροειδή (Ambati and Fowler, 2012). Η ξηρή μορφή είναι πιο συχνά εμφανιζόμενη (90%) και εξελίσσεται με αργούς ρυθμούς. Αντίθετα, η υγρή μορφή είναι πιο σπάνια (10%), πιο επιθετική και μπορεί να εξελιχθεί ταχέως, επιφέροντας την πιο σοβαρή απώλεια όρασης (Bonilha, 2008, Birch and Liang., 2007).

Η νόσος είναι πολυπαραγοντική με κύρια χαρκατηρριστικά την εμφάνιση ντρούζεν (εναποθέσεις ουσιών) τόσο στην ωχρά, όσο και γενικότερα στο βυθό του ματιού, καθώς και αλλαγές στο στρώμα του μελάγχρου επιθηλίου (Birch and Liang., 2007). Το μελάγχρουν επιθήλιο εκτελεί υψηλά εξειδικευμένες μεταβολικές και

μεταφορικές λειτουργίες, απαραίτητες για την ομοιόσταση του αμφιβληστροειδή (Bok, 1993, Bonilha, 2008). Το επιθήλιο αυτό διαχωρίζεται από τα χοριοειδικά αιμοφόρα αγγεία, από ένα λεπτό στρώμα εξωκυττάριων πρωτεϊνών και πολυσακχαριδικών αλύσεων, που ονομάζεται μεμβράνη του Bruch. Η επάρκεια της λειτουργικότητας του μελάγχρου επιθηλίου, της μεμβράνης του Bruch και των χοριοτριχοειδών (τριχοειδή αγγεία του χοριοειδούς) αποτελεί βασική προϋπόθεση για την εξασφάλιση της θρέψης των φωτοϋποδοχέων. Στην ηλιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, όμως, όλοι οι προαναφερθέντες ιστοί πάσχουν και καθένας ξεχωριστά έχει ενοχοποιηθεί ως πρωτογενής αιτία της πάθησης (Κριατσιώτης, 2004).

Στα πρώιμα στάδια η πάθηση είναι δύσκολο να διαγνωσθεί. Η ξηρή μορφή μπορεί είτε να προχωρήσει αργά και να προκαλέσει απώλεια της όρασης, χωρίς να μετατραπεί στην υγρή, είτε να μετατραπεί απότομα στην υγρή, ακόμη και στα πρώτα στάδια. Στην υγρή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, νέα αγγεία αναπτύσσονται από τον χοριοειδή και μέσω της μεμβράνης του Bruch, εκτείνονται κάτω ή πάνω ή και κάτω και πάνω, από το μελάγχρουν επιθήλιο, πλησιάζοντας προς το κέντρο. Τα αγγεία αυτά είναι εύθραυστα, υφίστανται εύκολα διαρροές και αιμορραγούν (Birch and Liang., 2007). Σε αυτή την περίπτωση η όραση αλλάζει ξαφνικά και έντονα.



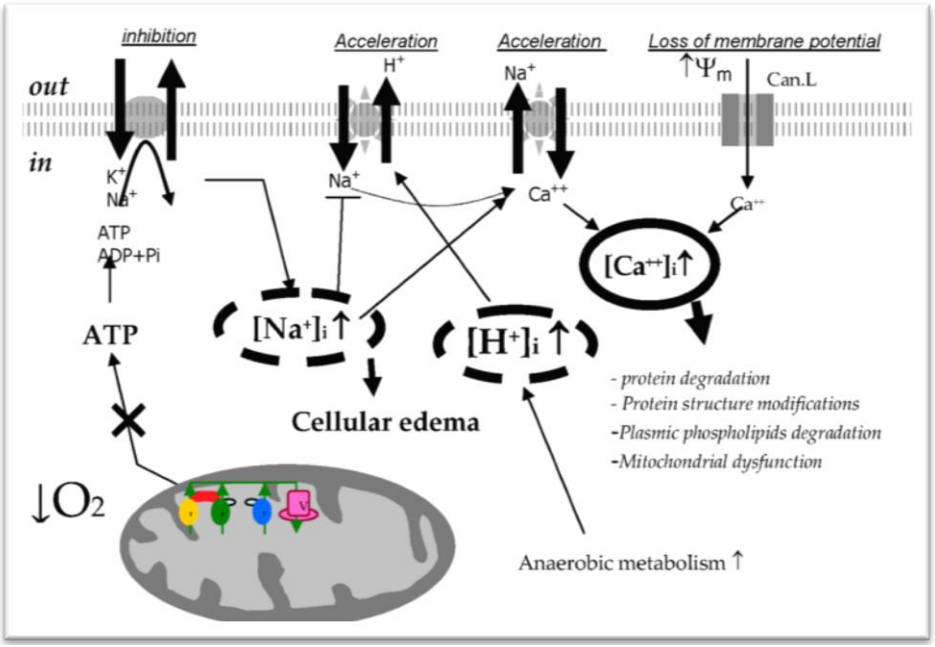
Εικόνα 10: Εικονική αναπαράσταση των σταδίων εκφύλισης της ωχράς κηλίδας στον αμφιβληστροειδή, συγκριτικά με το φυσιολογικό (http://www.mdfoundation.com.au/resources/1/factsheets/Greek_MDFA_MDBooklet_2014-03.pdf).

Αμφιβληστροειδική Ισχαιμία

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία είναι η υποβόσκουσα αιτία πολλών οφθαλμικών παθήσεων και μπορεί να οδηγήσει σε νευρωνικό θάνατο και τύφλωση (Mastrodimou et al., 2005). Ο όρος προέρχεται από το ελληνικό «**ίσχω**», που σημαίνει κρατώ πίσω, και **αίμα** και χρησιμοποείται για να περιγράψει έναν ιστό, ο οποίος στερείται της απαιτούμενης, για τις ανάγκες του, αιμάτωσης. Η παθολογική

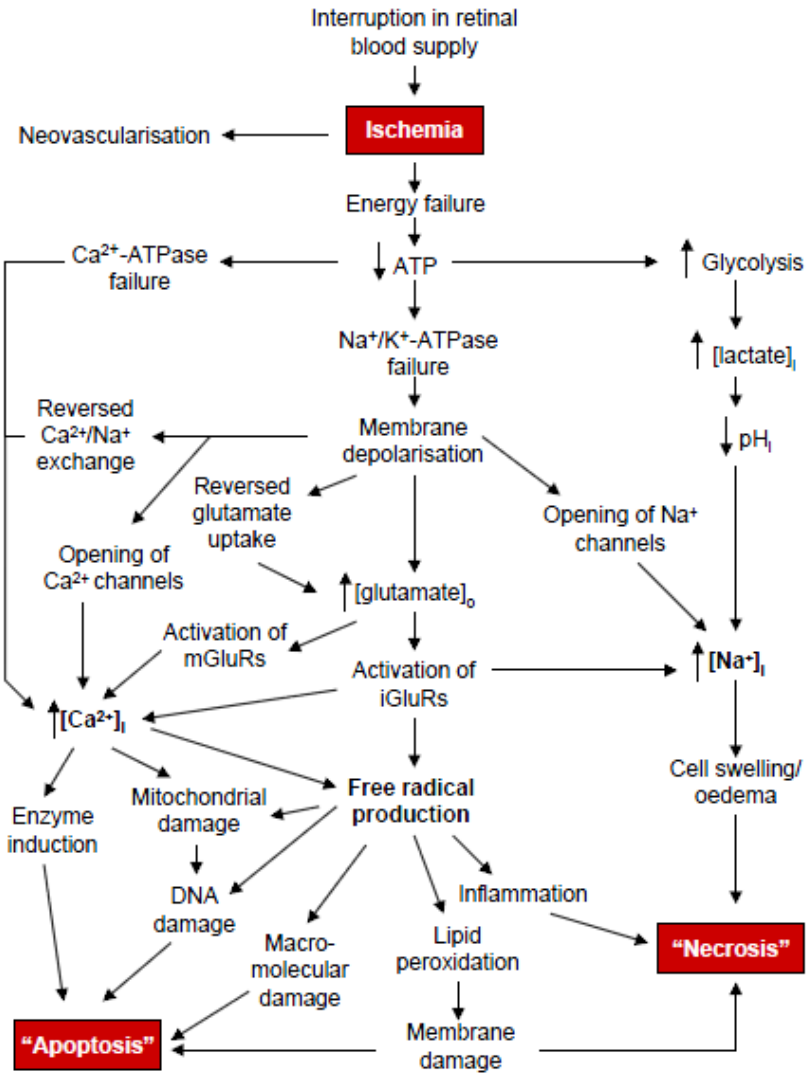
αυτή κατάσταση στερεί από τον ιστό 3 στοιχεία: το οξυγόνο, τα μεταβολικά υποστώματα και την απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων. Η απώλεια αυτών των στοιχείων, αρχικά θα μειώσει τις ομοιοστατικές αποκρίσεις, ενώ με την πάροδό του χρόνου θα τραυματίσει τον ιστό, με χειρότερη κατάληξη το θάνατό του (Osbborne et al., 2004).

Σε κυτταρικό επίπεδο, η έλλειψη ενέργειας σηματοδοτεί μια σειρά πολύπλοκων βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν δραστικές αλλαγές στη μετακινήση των ιόντων και στα επίπεδα των μεταβολιτών και των νευροδιαβιβαστών. Ο ισχαιμικός κυτταρικός θάνατος ξεκινά με μια σειρά αλλαγών, προκαλούμενων από την αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, οι οποίες περιλαμβάνουν: μείωση του pH, ελάττωση των επιπέδων της ATP, έναρξη παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα, αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων νατρίου, εκπόλωση της μεμβράνης εξαιτίας της αναστολής της δράσης της αντλίας Na^+/K^+ (Lipton and Rosenberg, 1994, Lipton, 1999, Lipton et al., 2001). Τα γεγονότα αυτά συντελούν στην εξωκυττάρια αύξηση του γλουταμινικού, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ιονοτροπικών του υποδοχέων. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στη συσώρευση Ca^{2+} στο κύτταρο. Η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου, επάγει την ενεργοποίηση ενζύμων που διαταρράσουν την ομοιόσταση και τη δομικη ακεραιότητα του κυττάρου και επιφέρουν το θάνατό του (Osborne et al., 2004).



Εικόνα 11: Ιοντικές αλλαγές σε ένα ισχαιμικό κύτταρο: Η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, προκαλεί μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων και αναστολή της δράσης της αντλίας Na^+/K^+. Ιόντα νατρίου ανταλλάσσονται με πρωτόνια, τα οποία εξέρχονται στην προσπάθεια του κυττάρου να διατηρήσει το pH του στα επίπεδα της ομοιόστασης. Η ισορροπία του μεμβρανικού δυναμικού διαταράσσεται και ιόντα ασβεστίου εισέρχονται άτακτα στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ παράλληλα ο ανταλλάκτης Na^+/Ca^{2+} αναστρέφεται και ακόμη περισσότερα ιόντα ασβεστίου εισρέουν στο κύτταρο. Η μεγάλη άνοδος της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου επιφέρει αποδόμηση πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων του πλάσματος, αλλαγές στην πρωτεϊνική δομή και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (Gourdin and Dubois, 2013).

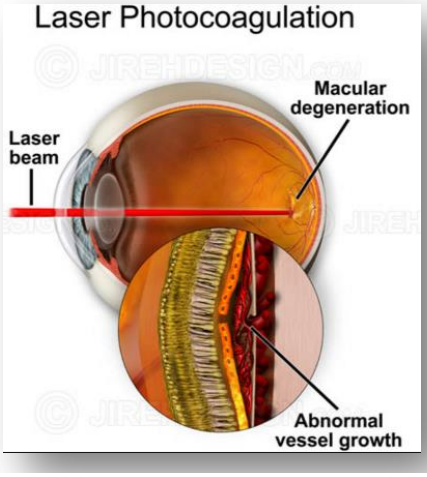
Η ισχαιμία θεωρείται κινητήρια δύναμη για τον σχηματισμό νέων παθολογικών αγγείων στον αμφιβληστροειδή. Το φαινόμενο αυτό καλείται νεοαγγείωση και έχει αναφερθεί στις αμφιβληστροειδοπάθειες που παρουσιάστηκαν παραπάνω (γλαύκωμα, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, ηλικιακή εκφύλιση της χωράς κηλίδας). Στην πραγματικότητα, η νεοαγγείωση που παρουσιάζουν οι παραπάνω παθήσεις, όπως και πολλές άλλες αμφιβληστροειδοπάθειες, είναι απόρροια της ισχαιμίας που έχουν υποστεί οι ιστοί (Vasilaki and Thermos, 2009, Osborne et al., 2004). Η πρόκληση αγγειογέννεσης σε κατάσταση ισχαιμίας έχει συνδεθεί με την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) (Pierce et al., 1995, Hofman et al.,2001). Η αγγειογένεση, σε φυσιολογικές ή παθοφυσιολογικές συνθήκες, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από αγγειοδιαστολή των υπαρχόντων αγγείων, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και αποδόμηση της περιβάλλουσας ενδοκυττάριας ουσίας, επιτρέποντας στα ενεργοποιημένα και πολλαπλασιαστικά ενδοθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν και να σχηματίσουν νέα αγγεία (Witmer et al., 2003).



Εικόνα 12: Ισχαιμικός καταρράκτης αντιδράσεων που σχετίζονται με την εμφάνιση αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας (Osborne et al., 2014).

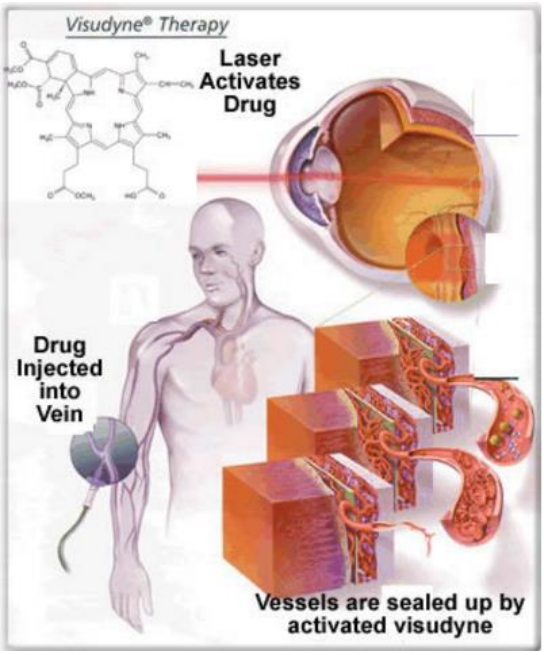
Θεραπείες αμφιβληστροειδοπαθειών

Με την πάροδο του χρόνου, οι θεραπείες για τις ισχαιμικές αγγειογενετικές αμφιβληστροειδοπάθειες έχουν επικεντρωθεί στη ρύθμιση του ανώμαλου πολλαπλασιασμού των αιμοφόρων αγγείων. Οι θεραπείες αυτές είναι μη ειδικές, περιλαμβάνουν τη χρήση laser και χωρίζονται στην εστιασμένη και στη σκεδασμένη φωτοθρόμβωση. Η εστιασμένη φωτοθρόμβωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή των αιμοφόρων αγγείων που παρουσιάζουν διαρροή, ενώ η σκεδασμένη για τον έλεγχο της ανάπτυξης παθολογικών αγγείων (Vasilaki and Thermos, 2009).



Εικόνα 13: Στη φωτοθρόμβωση με laser, μια ακτίνα laser χρησιμοποιείται για να σφραγίσει τα διαρρέοντα αιμοφόρα αγγεία και να επιβραδύνει την ανώμαλη ανάπτυξη καινούργιων (http://jirehdesign.com/suvr0010/).

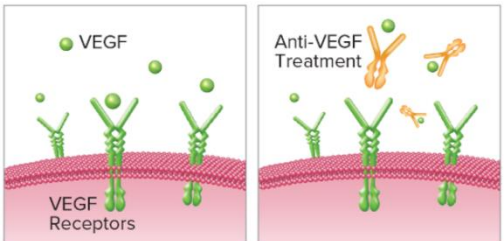
Η θεραπεία με laser φωτοθρόμβωσης εφαρμόζεται είτε μόνη της, είτε σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία, με χρήση της φωτοευαίσθητης προρφυρίνης, verteporfin (National Institute for Clinical Excellence, 2003). Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει 2 στάδια. Στο 1^{ο} στάδιο πραγματοποιείται ενδοφλέβια έγχυση του φωτοευαίσθητου φαρμάκου, ενώ στο 2^{ο} ενεργοποίησή του φαρμάκου από μη θερμικό φως, στο κατάλληλο μήκος κύματος που απορροφά ο χρησιμοποιούμενος φωτοευαισθητοποιητής, παρουσία οξυγόνου. Η ενεργοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό κυτταροτοξικών ειδών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών, τα οποία μπορούν να καταστρέψουν κυτταρικές δομές. Η προκαλούμενη αυτή καταστροφή μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και ακολούθως, στη θρόμβωση και στην έμφραξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης, στη θεράπουσα περιοχή. Το πλεονέκτημα της μεθόδου έγκειται στην πρόκληση εκλεκτικής θρόμβωσης των νεοαγγείων, αφήνοντας ανέπαφους τους υπόλοιπους ιστούς (Bressler and Bressler, 2000).



Εικόνα 14: Η φωτοευαίσθητη βερτεροπορφυρίνη (Visudyne) εισάγεται ενδοφλέβια στην κυκλοφορία του αίματος και συσσωρεύεται στα παθολογικά αιμοφόρα αγγεία του αμφιβληστροειδή. Η ενεργοποίησή της από το laser οδηγεί στο σφράγισμα των συγκεκριμένων αγγείων http://retinavitreous.com/treatments/laserstart.php).

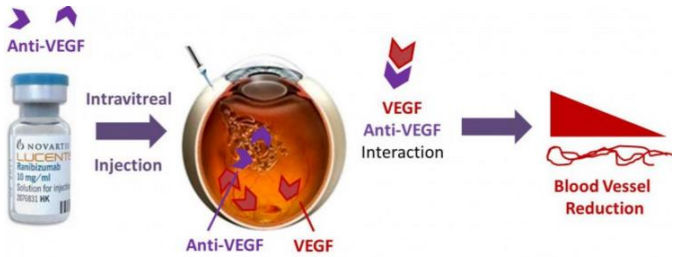
Παρόλα αυτά, οι 2 παραπάνω μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμούς. Το laser φωτοθρόμβωσης, για παράδειγμα δεν αποκαθιστά τη χαμένη όραση, αλλά οδηγεί σε άμεση μείωση της κεντρικής όρασης και σε 50% αβεβαιότητα ότι η διαρροή μπορεί να επανέλθει μέσα σε 2 χρόνια (Fine et al., 2000). Η φωτοδυναμική θεραπεία, από την άλλη, είναι μεν αποτελεσματική στη θεραπεία των ήδη υπαρχόντων παθολογικών αγγείων, αλλά δεν εμποδίζει τον σχηματισμό νέων (van Wijngaarden et al., 2005). Επιπλέον, δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις των φαρμάκων, ενώ υπερδοσολογία τόσο του φαρμάκου, όσο και του laser μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη, μη αναστρέψιμη, απώλεια της όρασης (Meads et al., 2001).

Η πιο πρόσφατη πρόταση στην αντιμετώπιση των αμφιβληστροειδοπαθειών είναι τα αντιαγγειογενετικά φάρμακα. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) αφενός μεν συμμετέχει ενεργά στην αγγειογένεση και αφετέρου αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων. Τα αντιαγγειογενετικά φάρμακα έχουν στόχο να αναστείλουν τη δράση του VEGF και επομένως να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη νεοαγγείων και να μειώσουν τη διαπερατότητα τους.

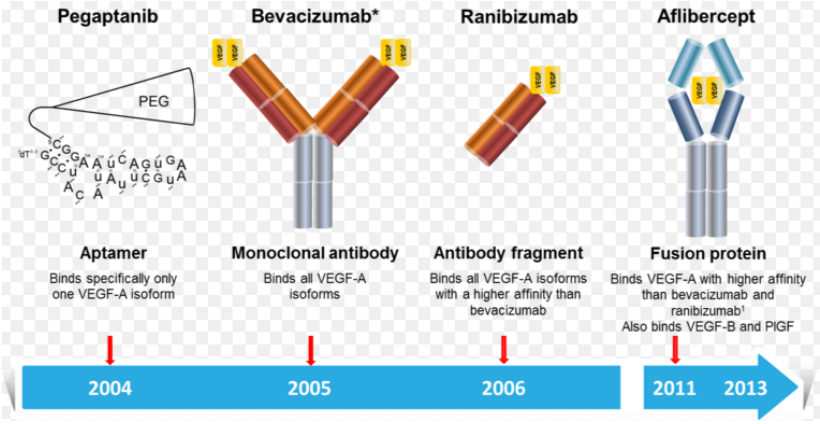


Εικόνα 15: Τα αντι-VEGF φάρμακα δρουν αναστέλλοντας τη διέγερση των υποδοχέων VEGF (http://www.scienceofdme.org/treat/).

Το πρώτο αντιαγγειογενετικό φάρμακο, το οποίο έλαβε την έγκριση του FDA, ήταν το pegaptanib (Macugen). Το φάρμακο αυτό αποτελεί ένα τροποποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο συνδέεται εκλεκτικά με μια ισομορφή του VEGF, την VEGF165, η οποία συμμετέχει στην οφθαλμική νεοαγγείωση. Το φάρμακο μπλοκάρει τις αγγειογενετικές δράσεις του VEGF165 και κατ' επέκταση την ανάπτυξη αγγείων. Το ranibizumab (Lucentis) είναι επίσης αντιαγγειογενετικό φάρμακο. Συγκεκριμένα, αποτελεί κομμάτι ανθρώπινου αντισώματος, το οποίο προσδένεται στον VEGF-A και αναστέλλει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων (Ferrara et al., 2006). Και τα 2 φάρμακα χορηγούνται ενδοφθάλμια (Colquitt et al., 2008, Vasilaki and Thermos 2009).



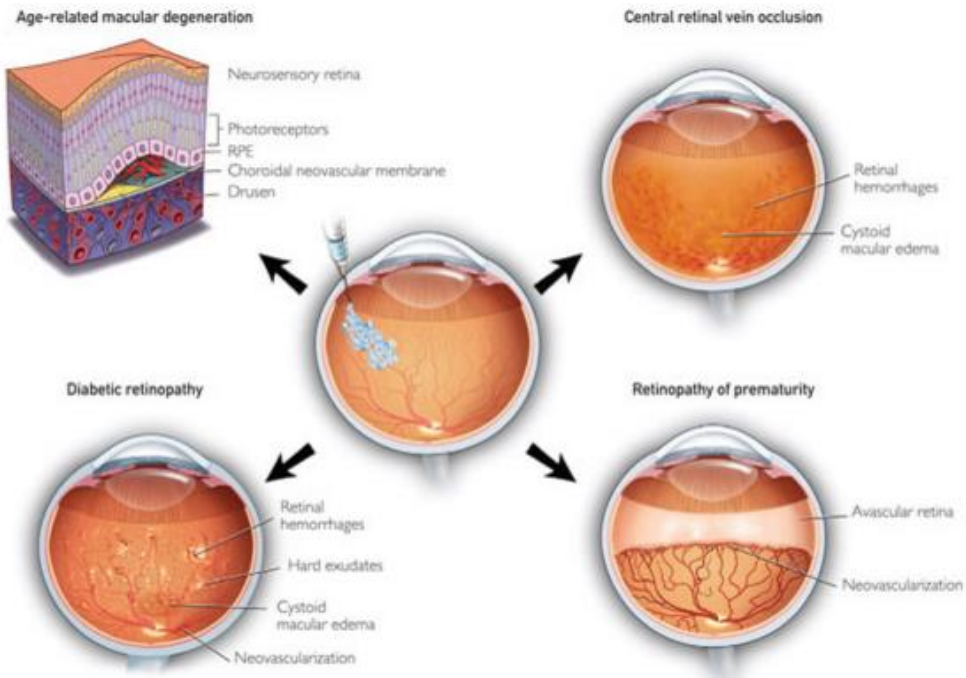
Εικόνα 16: Τα αντι-VEGF σκευάσματα εγχέονται ενδοβολβικά. Η αλληλεπίδραση των φαρμάκων αυτών με τον παράγοντα VEGF μειώνει την ανάπτυξη νέων παθολογικών αγγείων (http://galleryhip.com/anti-vegf-drugs.html).



Εικόνα 17: Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες, με τα χαρακτηριστικά τους και τις χρονολογίες αποδοχής τους από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (http://fovea.ir/the-best-of-retina/).

Παρόλο που τα αντιαγγειογενετικά φάρμακα δείχνουν ελπιδοφόρα για την καταπολέμηση σοβαρών παθήσεων του αμφιβληστροειδή, όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδα, ωστόσο ούτε αυτά στερούνται παρενεργειών. Τέτοιες μπορεί να είναι η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, η αιμορραγία του επιπεφυκότα, ο πόνος, η ενδοφθάλμια φλεγμονή, ενώ λιγότερο συχνά μπορεί να εμφανιστούν ενδοφθαλμίτιδα, τραυματικός καταρράκτης και αποκόλληση του αμφιβληστροειδή. Επιπλέον, υπάρχει κίνδυνος η νεοαγγείωση να επανέλθει με τη διακοπή της ενδοφθάλμιας χορήγησης των αντιαγγειογενετικών φαρμάκων (Vasilaki and Thermos, 2009).

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως οι θεραπευτικές προσεγγίσεις, μέχρι σήμερα, στοχεύουν στη νεοαγγείωση και όχι στον κυτταρικό θάνατο (Vasilaki and Thermos, 2009). Ωστόσο, τόσο η νεοαγγείωση, όσο και η νευροεκφύλιση είναι συνυπεύθυνες για τη μείωση της οπτικής οξύτητας. Επομένως, η εύρεση νευροπροστατευτικών ουσιών, οι οποίες θα έχουν ως θεραπευτικό στόχο τη νευροεκφύλιση κρίνεται αναγκαία.

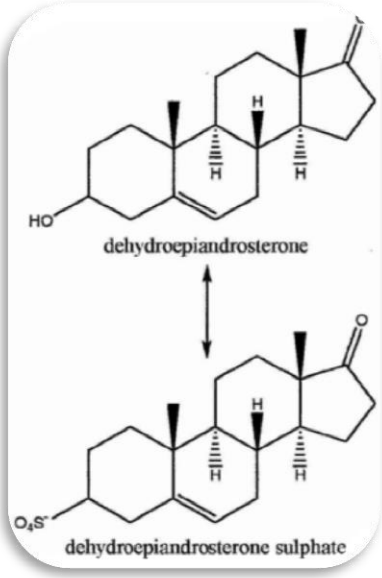


Εικόνα 18: Εφαρμογή των αντι-VEGF παραγόντων στη θεραπεία σοβαρών αμφιβληστροειδοπαθειών, όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η αμφιβληστροειδοπάθεια προωρότητας, απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή (http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/clinical-updates/ophthalmology/aflibercept-shows-promise-game-changer-patients-age-related-macular%20degeneration).

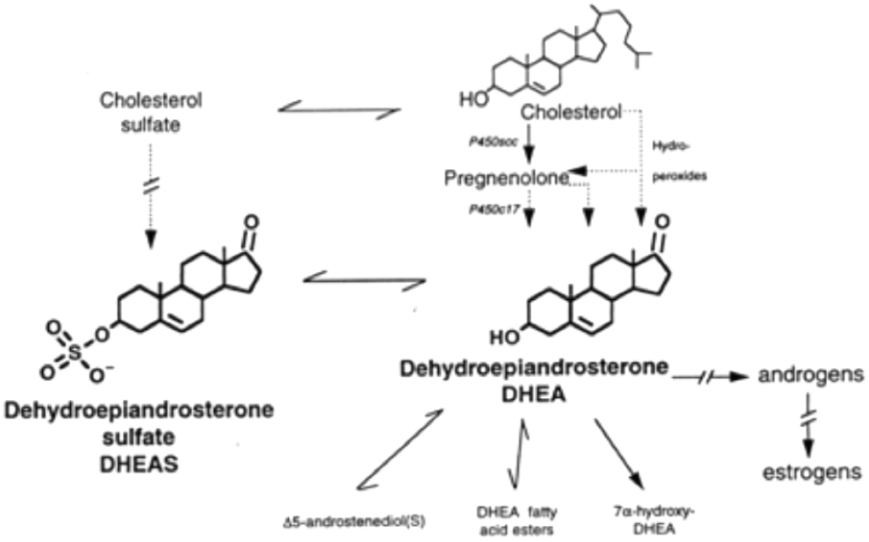
Νευροστεροειδή: DHEA - BNN27 - BNN20

Ο όρος νευροστεροειδή προτάθηκε το 1981, για να χαρακτηρίσει τα στεροειδή, τα οποία συσσωρεύονται στο νευρικό σύστημα, ανεξάρτητα της διαθεσιμότητά τους από τα επινεφρίδια και τα οποία μπορούν να συντίθενται de novo στο νευρικό σύστημα, από πρόδρομα στερολών (Baulieu and Robel, 1998). Ορισμένα νευροστεροειδή, έχει δειχθεί, ότι εκδηλώνουν νευροπροστατευτική δράση και ίσως να αποτελούν δυνητικά φάρμακα για τη θεραπεία ποικίλων παθήσεων του νευρικού συστήματος (Wojtal K., 2006).

Σε αυτή την κατηγορία νευροστεροειδών ανήκει τόσο η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), όσο και ο θειικός εστέρας της (DHEAS) (Baulieu and Robel, 1998). Τα 2 αυτά στεροειδή έχουν βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες στο ανθρώπινο αίμα. Μάλιστα μείωση της ποσότητάς τους, λόγω ηλικίας, άγχους ή ασθένειας (π.χ. κατάθλιψη), έχει συνδεθεί με πιθανή αύξηση της ευαισθησίας του εγκεφάλου σε νευροτοξικές διαδικασίες, όπως απελευθέρωση γλουταμινικού, ισχαιμία και διάφορες άλλες νευροεκφυλιστικές καταστάσεις (Lipton and Rosenberg, 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι η DHEA και ο DHEAS εμφανίζουν εντυπωσιακές βελτιωτικές επιδράσεις ενάντια στη διγερτοτοξικότητα, τόσο in vivo, όσο και in vitro. Για παράδειγμα, η DHEA μαζί με τον DHEAS προστάτευσαν νευρώνες ιπποκάμπου, τόσο ενάντια στη νευροτοξική δράση του αγωνιστή του γλουταμινικού υποδοχέα, NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid), όσο και κατά της διεγερτοτοξικότητας, που δημιουργήθηκε in vitro, από AMPA (α- άμινο-3-ύδροξυ-5-μέθυλο-4-ισοξαζολεπροπιονικό οξύ) και καϊνικό οξύ (Kimonides et al, 1998).



Εικόνα 19: Η DHEA και ο θειικός εστέρας της, DHEAS (http://www.benbest.com/nutrceut/DHEA.html).



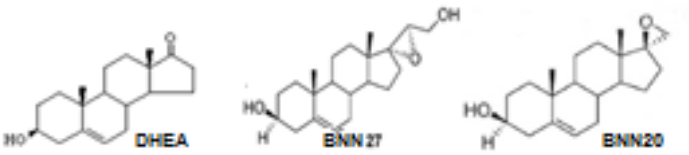
Εικόνα 20: Ο μεταβολισμός των DHEA και DHEAS στον εγκέφαλο. Η βιοσύνθεση της DHEA μπορεί να προχωρήσει από την χοληστερόλη, είτε μέσω του κλασικού μονοπατιού που περιλαμβάνει, διαδοχικά, τα κυτοχρώματα $P450_{scc}$ και $P450_{c17}$, είτε μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει το ενδιάμεσο της στερόλης (pregnenolone) και/ή τα στερεοειδικά υδροπεροξείδια. Η DHEA μετατρέπεται, αλλά αναστρέψιμα, στον θειικό της εστέρα και αποτελεί πρόδρομο της σύνθεσης ποικίλων μεταβολιτών (Baulieu and Robel, 1998).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα νευροστεροειδή ασκούν τη νευροπροστατευτική τους δράση είναι ακόμη υπό έρευνα. Ωστόσο οι υποδοχείς NMDA, σ_1 και $GABA_A$ δείχνουν να εμπλέκονται στους παραπάνω μηχανισμούς (Kurata et al., 2004, Bucolo and Drago, 2004).

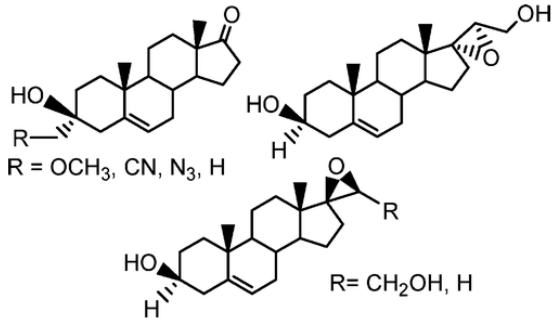
Η DHEA έχει, επίσης, δειχθεί να μιμείται την αντιαποπτωτική συμπεριφορά του νευροτροφίνης NGF (Nevre Growth Factor), αλληλεπιδρώντας τόσο με τους προεπιβιωτικούς TrkA, όσο και τους προαποπτωτικούς p75(NTR) υποδοχείς του. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση πολυάριθμων σηματοδοτικών μονοπατιών (Lazaridis et al., 2011).

Αποτελέσματα μελετών παρουσιάζουν τον αμφιβληστροειδή, όχι μόνο σαν άλλη μια δομή του ΚΝΣ στην οποία συγκεντρώνονται στεροειδή, αλλά ως πιθανή θέση παραγωγής νευροστεροειδών (Cascio et al., 2007). Τα πιο γνωστά νευροστεροειδή, που έχουν εντοπισθεί σε αμφιβληστροειδή αρουραίου είναι η προγεστερόνη (PROG), η προγνενολόνη (PREG), η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), καθώς και οι θειικοί εστέρες αυτών (Lanthier and Patwardhan, 1988, Guarneri et al., 1994). Πρόσφατα, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο παρών εργαστήριο, έδειξαν ότι ο NGF και η DHEA δρουν νευροπροστατευτικά στον αμφιβληστροειδή, σε ένα in vivo μοντέλο AMPA διεγερτοτοξικότητας. Συγκεκριμένα, ενδοφθάλμια χορήγηση DHEA ή NGF προστάτευσε τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση, με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, η χρήση αναστολέα για τον υποδοχέα TrkA, ανέστειλε την νευροπροστατευτική δράση της DHEA, επιβεβαιώνοντας ότι και στον αμφιβληστροειδή, η DHEA ασκεί τον νευροπροστατευτικό/αντιαποπτωτικό της ρόλο, μέσω αυτού του υποδοχέα της νευτροφίνης NGF (Kokona et al., 2012).

Παρά τις νευροπροστατικές ιδιότητές της όμως, η DHEA, όπως και όλα τα φυσικά νευροστεροειδή, μεταβολίζεται στον άνθρωπο σε οιστρογόνα, ανδρογόνα ή προγεστερόνες. Τα τελευταία είναι γνωστά για την πρόκληση σοβαρών ενδοκρινολογικών παρενεργειών, όπως ορμονοεξαρτώμενες νεοπλασίες, γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους. Συνεπώς, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει αρχίσει να στρέφεται στο σχεδιασμό συνθετικών αναλόγων των νευροστεροειδών, με στόχο την αποτροπή του μεταβολισμού τους και την ενίσχυση των νευροπροστατευτικών δυνατοτήτων τους. Η σύνθεση αναλόγων της DHEA πραγματοποιήθηκε από την ομάδα της *Θεοδώρας Καλογεροπούλου* και εμφανίζουν τροποποιήσεις στον άνθρακα 3 και στον άνθρακα 17, ώστε να μην είναι εφικτός ο μεταβολισμός σε οιστρογόνα και ανδρογόνα. Τα ανάλογα αυτά αξιολογήθηκαν για τη δυνατότητα χορήγησής τους σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Calogeropoulou et al.,2009). Τα ανάλογα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες τις παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν 2, το BNN27 και το BNN20 και εμφάνιζαν τροποποιήσεις μόνο στον άνθρακα 17.



Εικόνα 21: Η DHEA και τα συνθετικά της ανάλογα, BNN27 και BNN20, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη (τροποποιημένη από Calogeropoulou et al.)



Εικόνα 22: Τα συνθετικά ανάλογα της DHEA, με τροποποιήσεις στους άνθρακες 3 και 17, τα οποία συντέθηκαν από την ομάδα της Καλογεροπούλου (Calogeropoulou et al.,2009).

Το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας

Μέχρι και σήμερα, πλήθος in vivo και ex vivo πειραματικών μοντέλων σε θηλαστικά έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας. Εύλογα προκύπτει ότι η δυνατότητα προέκτασης δεδομένων από ένα μοντέλο ζώου, στην κλινική κατάσταση του ανθρώπου, απαιτεί ένα μοντέλο το οποίο να αναπαριστά, όσο πιο πιστά γίνεται, την αμφιβληστροειδική ισχαιμία στον άνθρωπο. Η εύρεση όμως ενός τέτοιου μοντέλου είναι δύσκολη, λόγω της ευρείας ποικιλομορφίας που παρουσιάζει το αμφιβληστροειδικό αγγειακό μοτίβο, στα διάφορα είδη. Επιπλέον, ενώ πρωτεύοντα θηλαστικά έχουν βρεθεί να διαθέτουν πανομοιότυπη αμφιβληστροειδική αγγειακή ανατομία με τον άνθρωπο, οικονομικοί, πρακτικοί και ηθικοί λόγοι εμποδίζουν τη χρήση τους. Συνεπώς,

χρησιμοποιούνται μικρά εργαστηριακά ζώα όπως ο αρουραίος, το κουνέλι, το ινδικό χοιρίδιο, τα οποία όμως διαθέτουν διαφορετική αγγειακή τροφοδοσία. Ωστόσο, η αγγειακή τροφοδοσία του αρουραίου είναι πιο κοντά σε εκείνη του ανθρώπου, γεγονός που οδήγησε στη χρήση αρουραίων για τη μελέτη της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας (Osborne et al.,2004).

Από τα πρώτα μοντέλα αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνο της υψηλής ενδοφθάλμιας πίεσης, το 1952, από τους Smith και Baird και ξανά το 1991, από τον Buchi και τους συνεργάτες του. Άλλα μοντέλα ήταν εκείνο της επίδεσης του οπτικού νεύρου από τον Steffanson και τους συνεργάτες του, το 1988, αλλά και το μοντέλο επίδεσης οφθαλμικών αγγείων από τις ομάδες των Otori και Vidal-Sanz, το 1997 και το 2001 αντίστοιχα. Τα 3 παραπάνω μοντέλα οδηγούσαν στην πρόκληση ολοκληρωτικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου (Osborne et al., 2004).

Η παρούσα πτυχιακή είχε ως στόχο να εξετάσει την πιθανή νευροπροστατευτική δράση της DHEA και των συνθετικών αναλόγων της, BNN27 και BNN20, καθώς και το ενδεχόμενο να ασκούν αυτή τους τη δράση μέσω του TrkA υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF, σε ένα μοντέλο «χημικής» ισχαιμίας.

Ο όρος «χημική» απορρέει από το γεγονός πως η ισχαιμία προερχόταν από 2 χημικά αντιδραστήρια, το ιωδοοξικό οξύ IAA (iodoacetic acid) και το κυανιούχο νάτριο, NaCN, σε αναλογία 5:25 mM. Οι ουσίες αυτές μιμούνται την υποξεία και την υπογλυκαιμία που παρατηρούνται σε καταστάσεις ισχαιμίας. Συγκεκριμένα, το κυανιούχο νάτριο αναστέλλει την οξειδάση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c, μπλοκάροντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ενώ το ιωδοοξικό οξύ αναστέλλει το γλυκολυτικό ένζυμο της 3-φωσφογλυκεραλδεϋδικής αφυδρογωνάσης, μπλοκάροντας τη γλυκόλυση. Το μοντέλο αυτό θεωρείται χρήσιμο στην κατανόηση των αρχικών σταδίων της παθοφυσιολογίας της ισχαιμίας (Mastrodimou et al., 2005). Το πρωτόκολλό του είχε αρχικά εφαρμοστεί για την πρόκληση ισχαιμίας σε φέτες ιππόκαμπου (Reiner et al., 1990) και αργότερα χρησιμοποιήθηκε από το παρών εργαστήριο προκειμένου να ερευνηθεί η νευροπροστατευτική δράση σωματοστατινεργικών αναλόγων (Mastrodimou et al.,2005).

Σκοπός

Το παρών εργαστήριο, τα τελευταία χρόνια, ασχολείται ενεργά με τη μελέτη τόσο της DHEA, όσο και 2 συνθετικών αναλόγων της, του BNN27 και του BNN20, μέσα από διάφορα μοντέλα αμφιβληστροειδοπαθειών και έχει καταφέρει να αναδείξει τη νευροπροστατευτική δράση και των 3 (Kokona et al., 2012, Lisa et al.,2015, Iban-Arias et al., 2015).

Έτσι, αρχικά η DHEA έδειξε να διαθέτει το φαρμακοδυναμικό και φαρμακοκινητικό προφίλ ενός, εν δυνάμει νευροπροστατευτικού μορίου, ενάντια στις αμφιβληστροπάθειες, στο μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας (Kokona et al., 2012). Παράλληλα, πρόσφατες μελέτες του εργαστήριου ανέδειξαν και τη νευροπροστατευτική δράση του BNN27 και του BNN20, μέσω ενεργοποίησης του TrkA υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF, σε in vivo μοντέλο στρεπτοζοτοκίνης της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Το BNN27 έδειξε να προσφέρει και αντιφλεγμονώδη δράση στον διαβητικό αμφιβληστροειδή (Iban-Arias et al., 2015, Lisa et al., 2015). Το BNN20 ωστόσο, εμφάνισε μικρότερη αποτελεσματικότητα από το BNN27 (Iban-Arias et al, 2015).

Στο ίδιο μήκος κύματος διαμορφώθηκε και ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Ο τελευταίος έγκειται στη διαλεύκανση της νευροπροστασίας ή μη της DHEA, του BNN27 και του BNN20, καθώς και της εμπλοκής ή μη του TrkA υποδοχέα της νευτροφίνης NGF σε αυτή, χρησιμοποιώντας το ex vivo μοντέλο της χημικής ισχαιμίας.

Μεθοδολογία

Πειραματόζωα

Για τη διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι, αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι Sprague-Dawley, βάρους 250-300gr. Τα ζώα διέμεναν 2-5 ανά κλουβί και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Στον χώρο φύλαξής τους, τηρήθηκε 12ωρος κύκλος ημέρας-νύχτας και σταθερή θερμοκρασία 22-25˚C.

Η θανάτωση των πειραματόζωων γινόταν με εισπνοή διαιθυλαιθέρα, κατά την παραμονή τους σε κλειστό θάλαμο, για 10-15 λεπτά περίπου.

Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματόζωων ήταν σύμφωνες με την ελληνική νομοθεσία (Π.Δ. 160/91).

Απομόνωση ιστού

Με τη θανάτωση των ζώων, τα μάτια αφαιρούνταν και τοποθετούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών οξέων, PBS (phosphate buffered saline) (PB: NaH_2PO_4 / K_2HPO_4), pH=7,4 και 0,1M. Ακολουθούσε καθαρισμός από μύες και αγγεία, ενώ στη συνέχεια, απομακρυνόταν ο εμπρόσθιος πόλος (κερατοειδής χιτώνας, κρυσταλλοειδής φακός και υαλοειδές σώμα), ώστε να απομονωθεί το πίσω τμήμα, γνωστό και ως eye cup, που περιείχε τον αμφιβληστροειδή, τον χοριοειδή και τον σκληρό χιτώνα.

Μοντέλο Χημικής Ισχαιμίας

Για την πρόκληση ισχαιμίας και την εξέταση της νευροπροστατευτικής δυνατότητας των φαρμάκων εφαρμόστηκε το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας. Όλη η διαδικασία διεξαγόταν σε συνθήκες: 37˚C, ατμόσφαιρας 5% CO_2/95% αέρα και υπό ήπια ανάδευση.

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, όλοι οι ιστοί, αμέσως μετά την απομόνωσή τους, ξεπλένονταν για 15 λεπτά, σε 0,1M PBS. Έπειτα από το ξέπλυμα, ο ιστός που προοριζόταν να υποστεί *μόνο* χημική ισχαιμία, χωρίς αγωγή, επωάζονταν για 2*30 λεπτά σε PBS (0,1M), το οποίο περιείχε ιωδο-οξικό οξύ και κυανιούχο νάτριο σε αναλογία 5:25mM. Επιπλέον, οι ιστοί που προορίζονταν για αγωγή, λάμβαναν το μίγμα της χημικής ισχαιμίας (5mM IAA - 25mM NaCN), με το PBS και το φάρμακο, διαλυμένο και αυτό σε PBS, στην κατάλληλη συγκέντρωση και επωάζονταν, παράλληλα με τον ιστό της χημικής ισχαιμίας, για 2*30 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθούσαν άλλες 2*30 λεπτά επωάσεις, κατά τις οποίες, ο ιστός της ισχαιμίας επωαζόταν μόνο σε PBS, ενώ οι ιστοί με ισχαιμία - αγωγή επωάζονταν σε PBS 0,1M, το οποίο περιείχε τα αντίστοιχα φάρμακα στις ζητούμενες συγκεντρώσεις.

Παρατίθεται ότι, η DHEA και το BNN20 εξετάστηκαν για τις συγκεντρώσεις 10^{-6} M, 10^{-8} M και 10^{-10} M, ενώ για το BNN27, εκτός από τις παραπάνω 3 συγκεντρώσεις, εξετάστηκε και η 10^{-7} M.

Ανταγωνιστής TrkA:

Στην περίπτωση του αναστολέα TrKA, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία με εκείνη των φαρμάκων. Συγκεκριμένα, ο αναστολέας, σε συγκέντρωση 10^{-6} M και για τα 3 φάρμακα, εισαγόταν στο μίγμα PBS - χημικής ισχαιμίας – φαρμάκου, για τα αρχικά 2*30 λεπτά. Εισαγωγή του αναστολέα γινόταν και στις μετέπειτα επωάσεις, για 2*30 λεπτά, του PBS με το φάρμακο (χωρίς το μίγμα της χημικής ισχαιμίας).

Ο αναστολέας εξετάστηκε σε τι βαθμό αναστέλλει το καλύτερο αποτέλεσμα του κάθε φαρμάκου, συνήθως δηλαδή το αποτέλεσμα που επέφερε η μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών.

Σημειώνεται ότι, σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνταν συνολικά μέχρι 3 ζώα, δηλαδή 6 eyecups, καθώς στο παρών μοντέλο, η πάροδος του χρόνου προκαλούσε θνησιμότητα του ιστού. Με αυτόν τον τρόπο:

- 1 eye cup επωαζόταν μόνο σε PBS, ως θετική ομάδα ελέγχου
- 1 eye cup επωαζόταν με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας, ως αρνητική ομάδα ελέγχου
- τα υπόλοιπα 4 eyecups λάμβαναν αγωγή με φάρμακα, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω
- στην περίπτωση του αναστολέα χρησιμοποιούνταν άλλη 1 ομάδα ελέγχου, 1 eye cup, στο οποίο εφαρμοζόταν κανονικά αγωγή με το φάρμακο, στη συγκέντρωση για την οποία εξεταζόταν η δράση του αναστολέα

Με το πέρας των 4*30 λεπτά επωάσεων, ακολουθούσε μια 15λεπτη επώαση σε PBS 0,1M, ούτως ώστε να ξεπλυθούν οι ιστοί.

Ο αναστολέας του TrkA υποδοχέα που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Calbiochem, με αριθμό 648450.

Προετοιμασία ιστού

Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου της χημικής ισχαιμίας, τα eye cups μονιμοποιούνταν σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (PFA) 4%, για 1 ώρα, στους 4˚C. Στη συνέχεια, επωάζονταν σε διάλυμα 30% σουκρόζης, σε 0,1M PB, overnight (16 - 18 ώρες), στους 4˚C, για κρυοπροστασία. Ακολουθούσε γέμισμα των eye cups με Optimal Cutting Temperature compound (OCT), ώστε να πάρουν το στρογγυλό σχήμα του οφθαλμού και έπειτα ταχεία ψύξη αυτών, με τοποθέτησή τους για 1

λεπτό, σε ισοπεντάνιο (σε ξηρό πάγο), στους -45˚C. Τέλος, οι ιστοί φυλάσσονταν στους -80˚C μέχρι την κοπή τους.

Τα παγωμένα eyecups κόβονταν κάθετα σε τομές, πάχους 10 mM, σε κρυοστάτη (Leica CM 1850) και σε θερμοκρασία -25˚C. Οι τομές λαμβάνονταν κοντά στο οπτικό νεύρο κάθε 100 μM και τοποθετούνταν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι τελευταίες αφήνονταν 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ούτως ώστε να στεγνώσουν και τέλος φυλάσσονταν στους -20˚C για μετέπειτα χρήση. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνταν 9 τομές.

Ανοσοϊστοχημεία

Για την ανοσοϊστοχημική σήμανση των τομών εφαρμόστηκε η μέθοδος του έμμεσου φθορισμού, κατά την οποία, οι τομές επωάζονται με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα και στη συνέχεια, με κατάλληλα φθορίζοντα δεύτερα αντισώματα.

Για τις ανάγκες της παρούσας πτυχιακής εργασίας, μελετήθηκαν τα κύτταρα που εκφράζουν την συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου στον εγκέφαλο (brain Nitric Oxide Synthase, bNOS), τα οποία, όπως διαπιστώθηκε από τον ανοσοϊστοχημικό δείκτη που χρησιμοποιήθηκε, αποτελούσαν βραχύινα κύτταρα του αμφιβληστροειδή.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

1^{ο} μέρος:

Αρχικά οι τομές, αφού πρωτύτερα είχαν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, ξεπλένονταν 2 φορές από 10 λεπτά/φορά, με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffered Saline) 0,1M και pH=7,4, ούτως ώστε να απομακρυνθεί το OCT. Στη συνέχεια, επωάζονταν για 30 λεπτά σε 3,3% φυσιολογικό ορό αίγας (normal goat serum, NGS). Η επώαση αυτή αποσκοπούσε στην κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του δευτεροταγούς αντισώματος. Έπειτα, ακολουθούσε ξέπλυμα των τομών 3 φορές, από 5 λεπτά/φορά, με TBS και στη συνέχεια επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το πολυκλωνικό αντίσωμα για τη σήμανση των bNOS-θετικών κύτταρων ήταν το ***Anti-Nitric Oxide Synthase, Brain (1409-1429), ανεπτυγμένο σε κουνέλι,*** της εταιρείας **Sigma Aldrich** και χρησιμοποιούνταν σε συγκέντρωση 1/2000. Η αραίωσή του πραγματοποιούνταν σε διάλυμα buffer, το οποίο αποτελούνταν από 0,1M TBS, 0,5%NGS και 0,3% Triton X-100 (απορρυπαντικό).

2° μέρος:

Με το πέρας της overnight επώασης, πραγματοποιούνταν 3 πλύσεις, από 5 λεπτά η καθεμία, με TBS και έπειτα επώαση, με το δευτεροταγές αντίσωμα για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα ήταν anti-rabbit, κατά των IgG (H+L) (Alexa Fluor 546 / CF543) και χρησιμοποιούταν με αραίωση 1/1000. Με την ολοκλήρωση και αυτής της επώασης γίνονταν άλλα 3 ξεπλύματα με TBS. Τέλος, οι ιστοί καλύπτονταν με υλικό κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium), καθώς και με καλυπτρίδα, ούτως ώστε να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Μικροσκόπιο φθορισμού

Το μικροσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου Leica DMLB, με φακό HC PL FLUOTAR 20X/0,50 ή HCX PL FLUOTAR 40X/0,75. Η λήψη φωτογραφιών γινόταν με κάμερα Leica DC300F, με τη βοήθεια του προγράμματος Leica IM50, ενώ η επεξεργασία τους, με χρήση του λογισμικού Abode Photoshop ver 7.0.

Ποσοτικοποίηση κυττάρων

Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα επιλέγονταν 3 τομές, απομακρυσμένες μεταξύ τους κ γινόταν καταμέτρηση όλων των ανοσοδραστικών κυττάρων του αμφιβληστροειδή. Σημειώνεται ότι, τα βραχύινα κύτταρα εντοπίζονταν κυρίως στην INL στιβάδα. Εντούτοις, υπήρχαν και κάποια, έκτοπα, σε άλλες στιβάδες, κυρίως στη γαγγλιακή.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιούταν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5.0, με χρήση του one-way ANOVA και ανάλυση Newman-Keuls posthoc.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

⌛ Διάλυμα Ζελατίνης

Αντιδραστήρια:

- ✓ 5gr ζελατίνης (G-9382, 300 bloom)
- ✓ 0,5gr Chrom Alum ($AlCrO_3$)

+ dH_2O

➔ $V_{τελκός}$ = 1lt

Διαδικασία: Το dH_2O θερμαινόταν στους 62°C και έπειτα γινόταν η προσθήκη της ζελατίνης. Μόλις το διάλυμα γινόταν διαυγές, πραγματοποιούνταν και η προσθήκη του $AlCrO_3$. Ακολουθούσε φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος 2 φορές.

⌛ TRIS Buffered Saline (TBS) 0,1M - pH = 7,4

Αντιδραστήρια:

- ✓ 6,055gr 0,1M TRIS/Trizma Base (MW = 121,14 g/mol)
- ✓ 4,5gr NaCl

+ dH_2O

➔ $V_{τελκός}$ = 500ml

Διαδικασία: Η TrismaBase και το NaCl διαλύονταν στο dH_2O, ενώ με τη βοήθεια πεχαμέτρου, το pH ρυθμιζόταν στο 7,4. Τέλος, γινόταν προσθήκη H_2O για να φτάσει το διάλυμα στον τελικό του όγκο.

⌛ Phosphate Buffer (PB) 0,2M

Αντιδραστήρια:

- ➢ 2,4gr NaH_2PO_4 (MW = 120), 100ml
- ➢ 17,42gr K_2HPO_4 (MW = 174,2), 500ml

➔ $V_{τελκός}$ = 600ml

Διαδικασία: Τα 2 διαλύματα παρασκευάζονταν χωριστά, σε αναλογία 1:5 και στη συνέχεια αναμιγνύονταν μεταξύ τους.

⌛ Phosphate Buffer Saline (PBS) 0,1M

Αντιδραστήρια:

- 0,9gr NaCl
- 50ml PB 0,2M
- 50ml dH_2O

➔ $V_{τελκός}$ = 100ml

Διαδικασία: Το NaCl αρχικά διαλυόταν σε dH_2O=40ml και στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό συμπληρωνόταν με H_2O μέχρι τα 50ml. Τέλος, γινόταν προσθήκη 50ml PB 0,2M.

⌛ 4% Paraformaldehyde Powder (PFA)

- 4gr PFA
- 50ml dH_2O
- 50ml PB 0,2M

➔ $V_{τελκός}$ = 100ml

Διαδικασία: Αφού dH_2O=40ml θερμαίνονταν σε θερμοκρασία 55°C, γινόταν η προσθήκη των 4gr της PFA. Για την πλήρη διαλυτοποίησή του διαλύματος αυτού, ακολουθούσε προσθήκη 4 σταγόνων NaOH 4% και έπειτα συμπλήρωση με dH_2O μέχρι τα 50ml. Στο διάλυμα αυτό, αναμιγνυόταν, στη συνέχεια, με 50ml PB 0,2M. Το τελικό διάλυμα φιλτραρόταν, χωριζόταν σε σωληνάρια των 15ml και των 2ml και αποθηκευόταν στους -20°C.

30% σουκρόζη

- 3gr σουκρόζη
- 10ml PB 0,1M

➔ $V_{τελκός}$ = 10ml

Αποτελέσματα

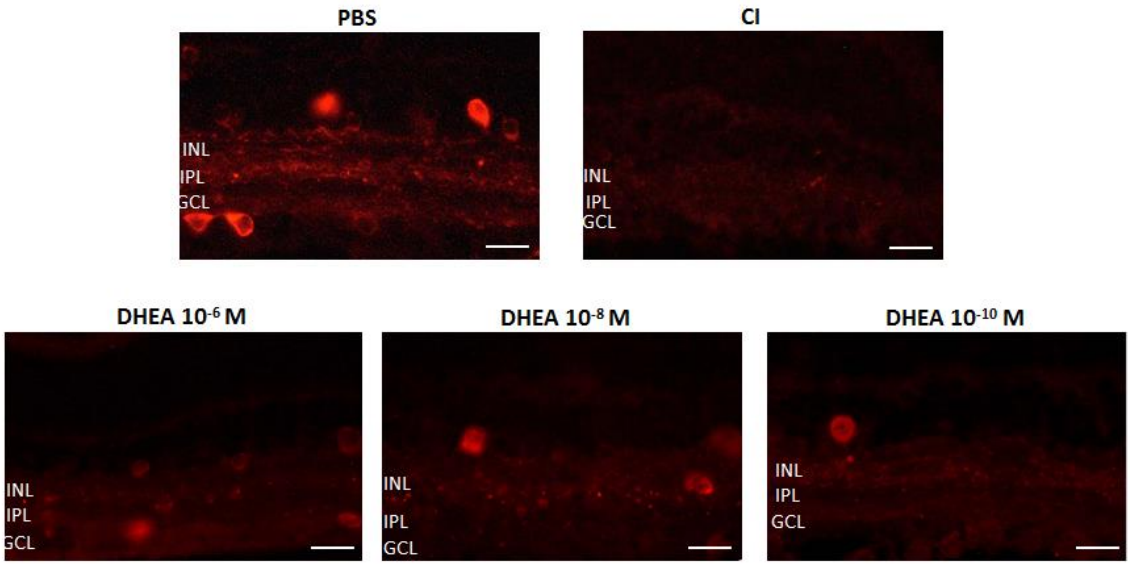
Για να εξεταστεί εάν το νευροστεροειδές δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), καθώς και τα ανάλογά του, BNN27 και BNN20, διαθέτουν νευροπροστευτική δράση, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω. Επειδή στην ισχύ ενός αποτελέσματος συμβάλλει και η επαναληψιμότητά του, ο αριθμός των ιστών (n), που έλαβαν αγωγή και εμφάνισαν νευροπροστασία ήταν το ελάχιστο 3.

Η bNOS ανοσοδραστικότητα εντοπίστηκε στα κυτταρικά σώματα των βραχύινων κυττάρων της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας (INL) και κάποιων έκτοπων κυττάρων κυρίως στη γαγγλιακή στιβάδα (GCL), καθώς και στις αποφύσεις αυτών στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL), στους ιστούς της ομάδας ελέγχου. Το μίγμα της χημικής ισχαιμίας προκαλούσε σημαντική μείωση στον αριθμό των βραχύινων αυτών κυττάρων, στις INL και GCL, ενώ φαινόταν να επηρεάζει, αλλά σε μικρότερο βαθμό, την ανοσοδραστικότητα των αποφύσεων στην IPL.

Η νευροπροστασία γινόταν αντιληπτή από τον αριθμό των κυττάρων που επιζούσαν από την πάθηση της ισχαιμίας (περισσότερα κύτταρα → μεγαλύτερη προστασία). Ο αριθμός αυτός προσδιοριζόταν με μικροσκοπική ανάλυση.

- **DHEA**

Η DHEA χορηγήθηκε σε ισχαιμικούς ιστούς σε 3 συγκεντρώσεις: 10^{-10}, 10^{-8} και 10^{-6}. Φωτογραφίες από την παρατήρηση των ιστών παρατίθενται παρακάτω:



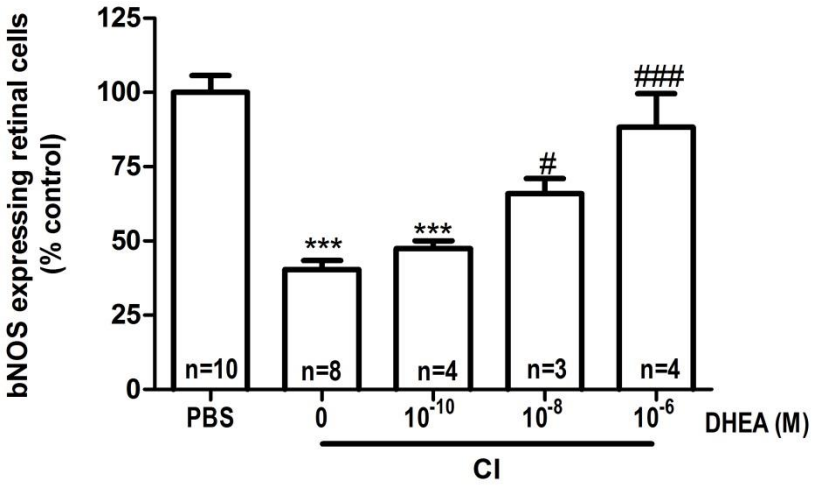
Δράση της DHEA κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός bNOS ανοσοδραστικότητας, σε ιστό που έχει επωαστεί

μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Ελάχιστη χρώση παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (CI). Η χρώση επανέρχεται σταδιακά στις συγκεντρώσεις 10^{-10}, 10^{-8} και 10^{-6}M, με την τελευταία συγκέντρωση (10^{-6} M), να εμφανίζει εντυπωσιακή αύξηση του αριθμού των κυττάρων στον ιστό. Κλίμακα: 20μm, INL: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, IPL: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, GCL: γαγγλιακή στιβάδα

Από τις παραπάνω εικόνες γίνεται φανερό ότι:

- Η εικόνα της συγκέντρωσης 10^{-10} της DHEA εμφανίζει ομοιότητα με την εικόνα της χημικής ισχαιμίας, καθώς και στις 2 εικόνες απεικονίζεται δραματική μείωση των βραχύινων bNOS θετικών κυττάρων, αλλά και μειωμένη ανοσοδραστικότητα των αποφύσεων, συγκριτικά με την αντίστοιχη εικόνα της ομάδας ελέγχου (PBS). Η συγκεκριμένη συγκέντρωση δηλαδή, δείχνει να μην προσφέρει προστασία στον ιστό.
- Η εικόνα της συγκέντρωσης 10^{-8} εμφανίζεται κάπου ανάμεσα στις εικόνες της χημικής ισχαιμίας και του control. Ο αριθμός των κυττάρων δείχνει να έχει αυξηθεί, αν και αποτυγχάνει να φθάσει τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Φαίνεται δηλαδή, πως η συγκέντρωση αυτή επαναφέρει ένα μέρος των κυττάρων.
- Η εικόνα της συγκέντρωσης 10^{-6} δείχνει να επαναφέρει τη χρώση σε πολύ μεγάλο βαθμό στον ιστό, καθώς το πλήθος των κυττάρων, φαινομενικά, μοιάζει να προσεγγίζει το αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου.

Για να υπολογιστεί και ποιοτικά όμως η ποιοτική αυτή εκτίμηση, έγινε καταμέτρηση των κυττάρων που εκφράζουν bNOS ανοσοδραστικότητα και τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στο ακόλουθο γράφημα:



Μελέτη ποσοτικοποίησης της δράσης της DHEA, κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Η DHEA

επανέφερε, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, την απώλεια των κυττάρων που είχε προκαλέσει το μίγμα της χημικής ισχαιμίας.

Από το παραπάνω διάγραμμα, αντιλαμβανόμαστε ότι:

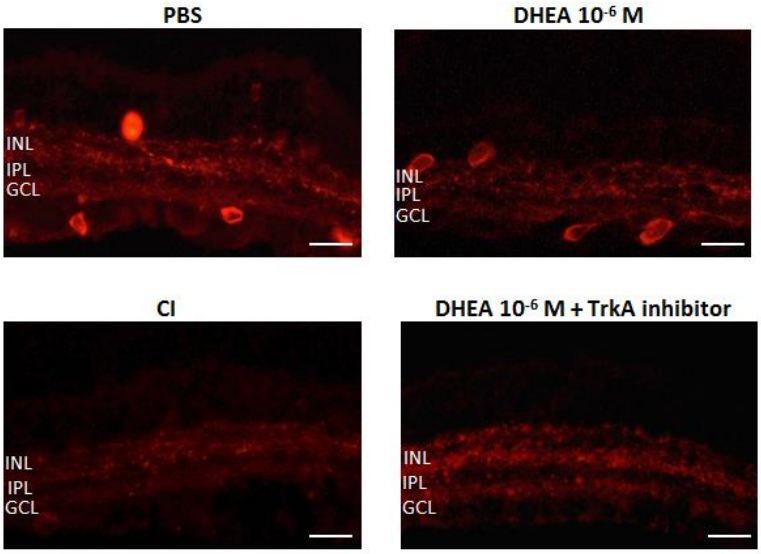
- Η επώαση των ιστών με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας προκάλεσε μείωση των bNOS θετικών κυττάρων στο περίπου 40%, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (***$p<0,001$).
- Η ταυτόχρονη χορήγηση του νευροστεροειδούς DHEA, σε συγκέντρωση 10^{-10} M, με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας, δεν φάνηκε να επαναφέρει τα κύτταρα. Το ποσοστό των bNOS θετικών κυττάρων υπολογίστηκε στο περίπου 47%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (***$p<0,001$, $p>0,05$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=4)
- Η νευροπροστατευτική δράση της DHEA φάνηκε να κάνει την εμφάνισή της, όταν η τελευταία χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 10^{-8} M. Στην περίπτωση αυτή, το ποσοστό των κυττάρων αυξήθηκε στο περίπου 66%, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($^{\#}p<0,05$ συγκριτικά με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=3).
- Ακόμη καλύτερη νευροπροστατευτική δράση επέφερε η χορήγησή της στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, 10^{-6}M. Στη συγκέντρωση αυτή, το ποσοστό των κυττάρων ανέβηκε στο περίπου 88% ($^{\#\#\#}p<0,001$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=4), δηλαδή 48% υψηλότερα από το ποσοστό της ισχαιμίας.

Συμπερασματικά, η DHEA δείχνει να προστατεύει τα bNOS θετικά κύτταρα από την ισχαιμία, σε ποσοστό 88% της ομάδας ελέγχου, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας της DHEA (10^{-6}M) και της ομάδας ελέγχου.

➢ DHEA + TrkA inhibitor

Βιβλιογραφικές αναφορές προτείνουν ότι η DHEA δρα μέσω του υποδοχέα TrkA στον αμφιβληστροειδή (Kokona et al, 2012). Προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο ο υποδοχέας αυτός εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA, στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρουσία του ανταγωνιστή του TrkA υποδοχέα.

Ο ανταγωνιστής του TrkA υποδοχέα και η DHEA χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10^{-6}M. Φωτογραφίες των ιστών από τα αντίστοιχα πειράματα παρουσιάζονται παρακάτω:

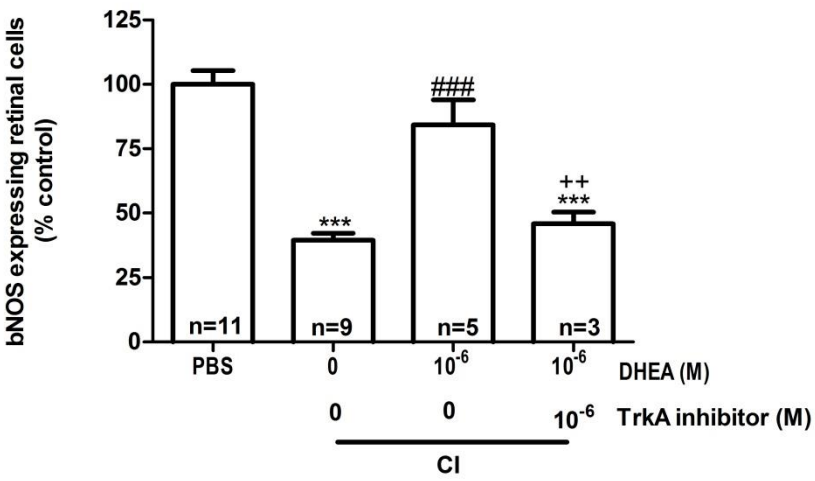


Επίδραση του ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA, στη δράση της DHEA 10^{-6} M, σε αμφιβληστροειδή αρουραίου, που έχει υποστεί χημική ισχαιμία. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός bNOS ανοσοδραστικότητας, σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Ελάχιστη χρώση παρατηρείται σε ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (CI). Η DHEA, σε συγκέντρωση 10^{-6} M, προστατεύει τον ιστό και δείχνει να επαναφέρει μεγάλο μέρος των κυττάρων. Ο ανταγωνιστής αναστέλλει τη νευροπροστασία που επέφερε η DHEA. Κλίμακα: 20μm, INL: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, IPL: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, GCL: γαγγλιακή στιβάδα

Από τις παραπάνω εικόνες, γίνεται αντιληπτό ότι:

- Η εικόνα του ιστού που έχει επωαστεί, εκτός από το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και με DHEA, 10^{-6} M, προσεγγίζει φαινομενικά την εικόνα της ομάδας ελέγχου.
- Αντίθετα, επώαση (εκτός από το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και DHEA 10^{-6} M) και με τον ανταγωνιστή του TrkA υποδοχέα, δείχνει να αναιρεί τη νευπροστασία της DHEA και να επαναφέρει τον ιστό σε κατάσταση χημικής ισχαιμίας, όπως υποδηλώνει η ομοιότητα των αντίστοιχων εικόνων (CI – DHEA 10^{-6} + TrkA inhibitor).

Υπάρχουν ενδείξεις, δηλαδή ότι η DHEA δρα μέσω του υποδοχέα TrkA. Για να ποσοτικοποιηθούν οι παραπάνω ενδείξεις, κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα:



Μελέτη ποσοτικοποίησης της δράσης του αναστολέα του υποδοχέα TrkA, στην επίδραση της DHEA 10^{-6} M, κατά της χημικής ισχαιμίας, αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ο αναστολέας αναιρεί τη νευροπροστασία της DHEA, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

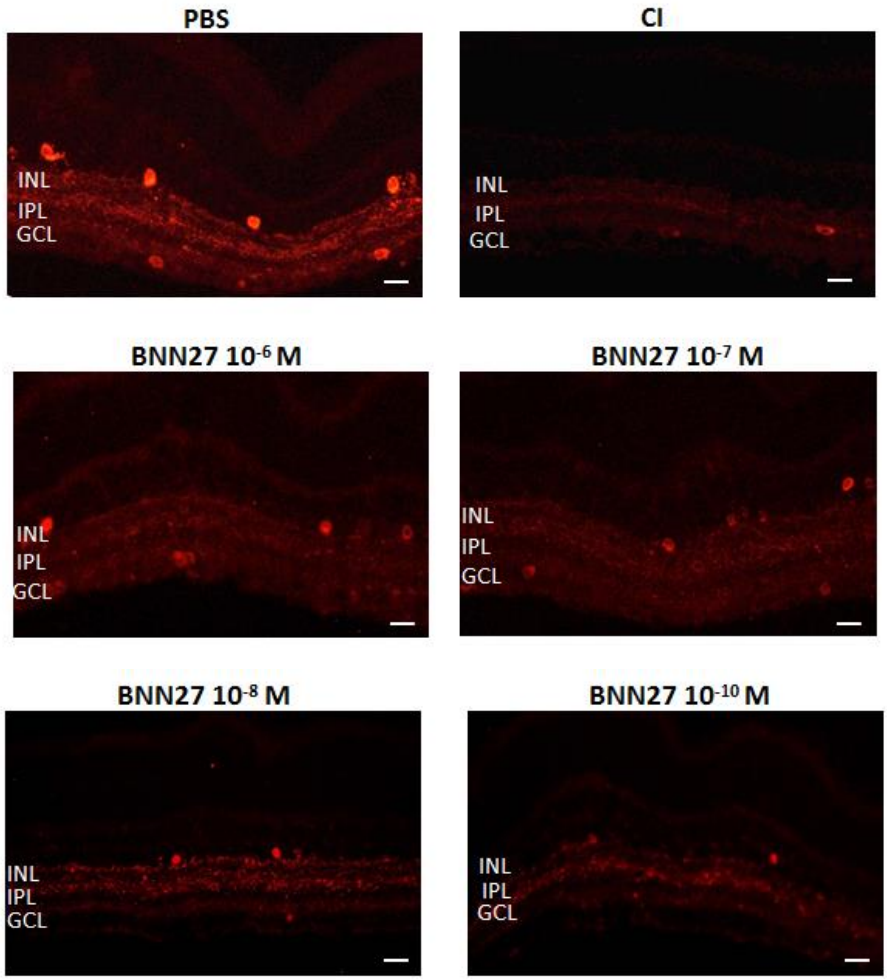
Στο παραπάνω διάγραμμα:

- Καταγράφεται μείωση των bNOS θετικών κυττάρων στο περίπου 39% (***p<0,001 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, n=9), λόγω χημικής ισχαιμίας.
- Η DHEA, συγκέντρωση 10^{-6} M, επαναφέρει το ποσοστό των κυττάρων στο περίπου 84% της ομάδας ελέγχου ($^{###}$p<0,001 συγκριτικά με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=5).
- Ο ανταγωνιστής του TrkA υποδοχέα αναιρεί τη νευροπροστασία της DHEA (10^{-6} M) και οδηγεί το ποσοστό στο περίπου 46% της ομάδας ελέγχου (***p<0,001, $^{++}$p<0,01 συγκριτικά με την ομάδα της DHEA (10^{-6}M), n=3).

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η DHEA διεκπεραιώνει τις νευροπροστατευτικές της δράσεις, έναντι της χημικής ισχαιμίας, στον αμφιβληστροειδή αρουραίου, μέσω του υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF, τον TrkA υποδοχέα.

- BNN27

Το BNN27 χρησιμοποιήθηκε σε 4 συγκεντρώσεις, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-7} και 10^{-6} M. Φωτογραφίες των ιστών των πειραμάτων αυτών παρατίθενται παρακάτω:



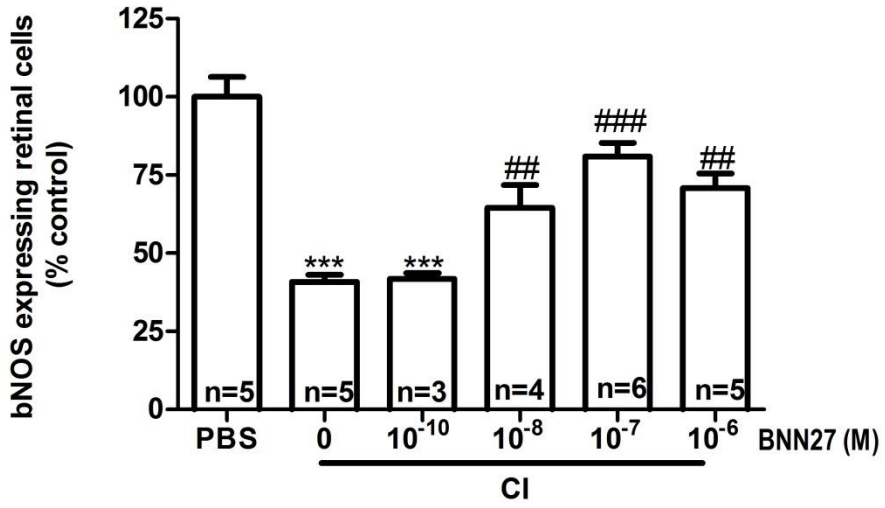
Δράση του αναλόγου BNN27, ενάντια στη χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός bNOS ανοσοδραστικότητας, σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Σχεδόν ανύπαρκτη είναι η χρώση στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (CI). Η χρώση επανέρχεται σταδιακά στις συγκεντρώσεις 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-7} και 10^{-6} M, με τις τελευταίες 2 συγκεντρώσεις (10^{-7} και 10^{-6} M), να εμφανίζουν εντυπωσιακή αύξηση του αριθμού των κυττάρων στον ιστό. Κλίμακα: 20μm, INL: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, IPL: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, GCL: γαγγλιακή στιβάδα

Οι παραπάνω εικόνες φανερώνουν ότι:

Οι εικόνες των ιστών που έχουν επωαστεί με τις συγκεντρώσεις 10^{-6} και 10^{-7} M BNN27, δείχνουν επαναφορά της χρώσης πολύ κοντά στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου.

- Η εικόνα του ιστού που έχει επωαστεί με 10^{-8} M BNN27, αντικατοπτρίζει ένα αποτέλεσμα ενδιάμεσο μεταξύ της ομάδας της ισχαιμίας και της ομάδας ελέγχου, δηλαδή η χρώση φαίνεται να έχει επανέλθει κατά ένα μέρος.
- Η εικόνα του ιστού για 10^{-10} M BNN27, απεικονίζει μια μικρή, φαινομενικά, αύξηση των κυττάρων, αλλά μοιάζει να είναι πιο κοντά στην εικόνα της χημικής ισχαιμίας, παρά σε εκείνη της ομάδας ελέγχου.

Η ποσοτικοποίηση των παραπάνω ποιοτικών παρατηρήσεων έγινε με τη βοήθεια διαγράμματος το οποίο παρουσιάζεται στη συνέχεια:



Μελέτη ποσοτικοποίησης της δράσης του BNN27, ενάντια στη χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το ανάλογο αυτό επανέφερε, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, την απώλεια των κυττάρων που είχε προκαλέσει το μίγμα της χημικής ισχαιμίας.

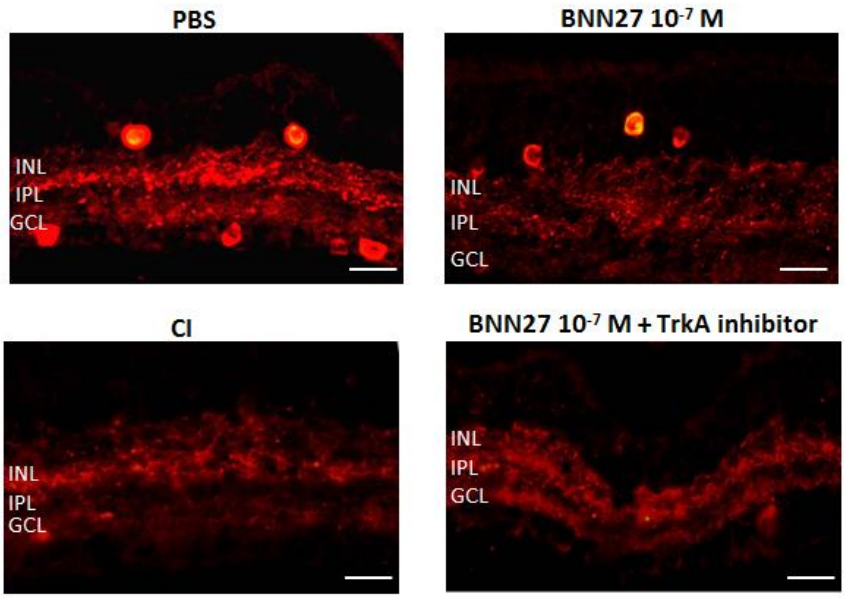
Το παραπάνω διάγραμμα επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις των φωτογραφιών που προηγήθηκαν ως εξής:

- Το μίγμα της χημικής ισχαιμίας ελάττωσε τον αριθμό των bNOS θετικών κυττάρων, φθάνοντας τον στο περίπου 41% της ομάδας ελέγχου (***$p<0,001$, n=5).
- Η συγκέντρωση 10^{-10} M, δεν προστάτευσε τον ιστό από την ισχαιμία, καθώς το ποσοστό των κυττάρων των ιστών αυτών, υπολογίστηκε στο περίπου 42% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (***$p<0,001$, $p>0,05$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=3).
- Η συγκέντρωση 10^{-8} M, προστάτευσε μερικώς τον ιστό και επανέφερε το ποσοστό των κυττάρων στο περίπου 64% της ομάδας ελέγχου ($^{\#\#}p<0,01$ σε σύγκριση με την ομάδα της ισχαιμίας, n=4).
- Η συγκέντρωση 10^{-7} M, επανέφερε το 40% των κυττάρων, οδηγώντας το ποσοστό στο περίπου 81% της ομάδας ελέγχου ($^{\#\#\#}p<0,001$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=6).
- Η συγκέντρωση 10^{-6} M, προστάτευσε τον ιστό και αύξησε το ποσοστό των κυττάρων στο περίπου 71% της ομάδας ελέγχου ($^{\#\#}p<0,01$ σε σύγκριση με την ομάδα της ισχαιμίας, n=5).

Συμπερασματικά, το BNN27 δείχνει να προστατεύει τα bNOS θετικά κύτταρα από το μίγμα της χημικής ισχαιμίας, σε ποσοστό 81% της ομάδας ελέγχου, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση.

➢ BNN27 + TrkA inhibitor

Και στην περίπτωση του BNN27, ο ανταγωνιστής του TrkA υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10^{-6} M, ενώ το BNN27 σε συγκέντρωση 10^{-7} M.

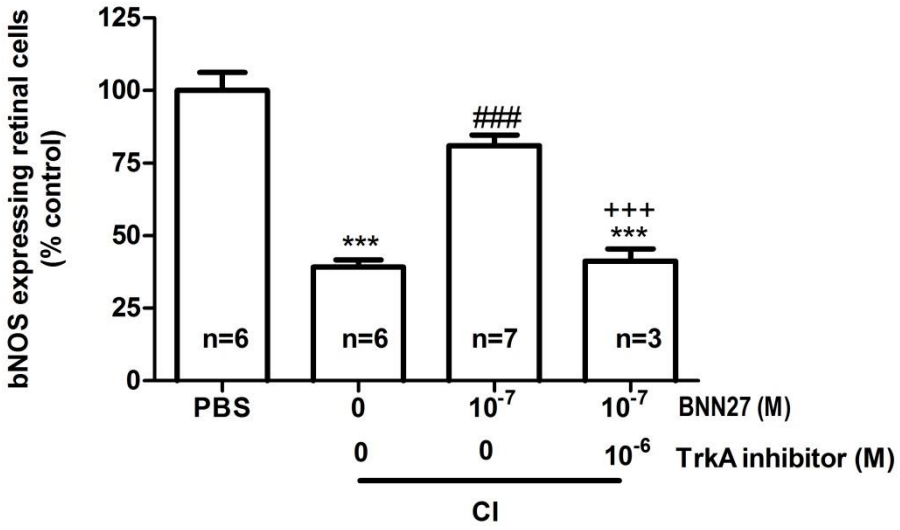


Επίδραση του ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA, στη δράση του BNN27 10^{-7} M, σε αμφιβληστροειδή αρουραίου, που έχει υποστεί χημική ισχαιμία. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός bNOS ανοσοδραστικότητας, σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Δραματική μείωση των κυττάρων σημειώνεται στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (CI). Το BNN27, σε συγκέντρωση 10^{-7} M, προστατεύει τον ιστό και δείχνει να επαναφέρει μεγάλο μέρος των κυττάρων. Ο ανταγωνιστής αναστέλλει τη νευροπροστασία που επέφερε το BNN27. Κλίμακα: 20μm, INL: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, IPL: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, GCL: γαγγλιακή στιβάδα

Οι παραπάνω φωτογραφίες δείχνουν τα εξής:

- Το BNN27, σε συγκέντρωση 10^{-7} M, δείχνει να επαναφέρει μεγάλο μέρος των κυττάρων και μοιάζει, οπτικά, με την εικόνα της ομάδας ελέγχου.
- Αντίθετα, η εικόνα του ιστού ο οποίος επωάστηκε με τον ανταγωνιστή, εμφανίζει ομοιότητα με την αντίστοιχη της χημικής ισχαιμίας, απεικονίζοντας δραματική μείωση κυττάρων.

Οι ποιοτικές αυτές παρατηρήσεις εκφράστηκαν και ποσοτικά, μέσω του ακόλουθου διαγράμματος:



Μελέτη ποσοτικοποίησης της δράσης του αναστολέα του υποδοχέα TrkA, στην επίδραση του αναλόγου BNN27, 10^{-7} M, κατά της χημικής ισχαιμίας αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ο αναστολέας αναιρεί τη νευροπροστασία του BNN27, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

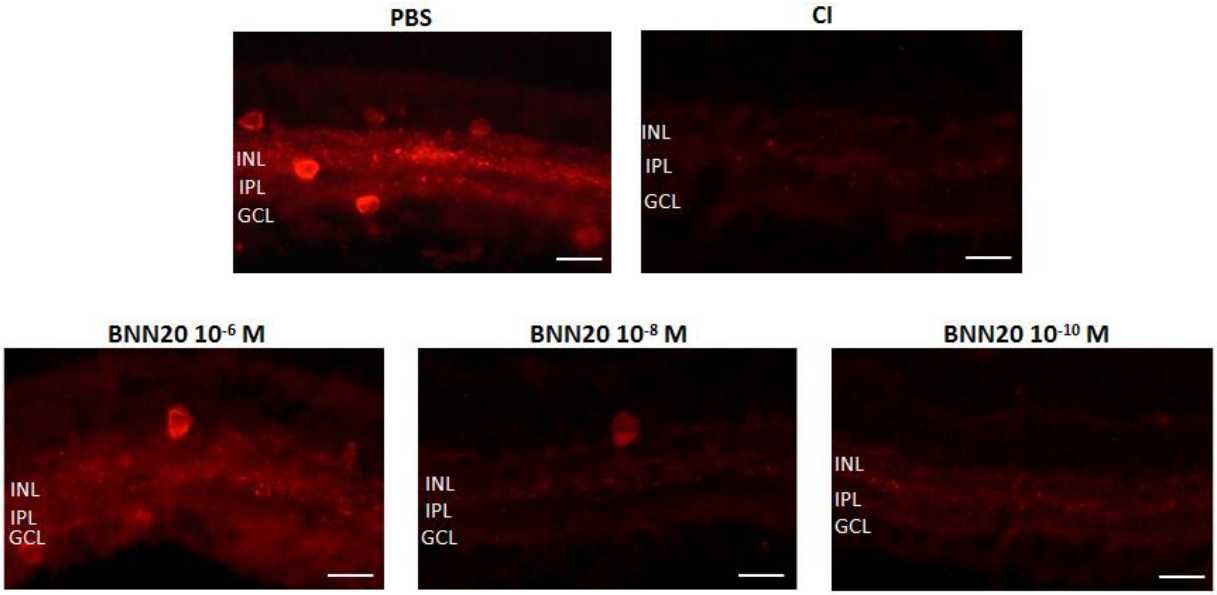
Από το διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι:

- Το μίγμα της χημικής ισχαιμίας προκάλεσε μείωση του ποσοστού των κυττάρων στο περίπου 39%, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (***$p<0,001$, $n=6$).
- Τη μείωση αυτή αναίρεσε, αν και όχι πλήρως, το BNN27 σε συγκέντρωση 10^{-7} M, ανεβάζοντας το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων στο 81% της ομάδας ελέγχου ($^{###}p<0,001$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, $n=7$).
- Επώαση όμως των ιστών με τον ανταγωνιστή του TrkA υποδοχέα ανέστειλε τη νευροπροστασία του BNN27 (10^{-7}M), μειώνοντας το ποσοστό των κυττάρων στο 41% (***$p<0,001$ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, $^{+++}p<0,001$ συγκριτικά με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, $n=3$).

Οδηγούμαστε λοιπόν, στο συμπέρασμα ότι το ανάλογο της DHEA, BNN27, δρα μέσω του TrkA υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF, για να επιφέρει τις νευροπροστατευτικές του δράσεις.

▪ BNN20

Το ανάλογο, BNN20, της DHEA, χρησιμοποιήθηκε στις συγκεντρώσεις 10^{-10}, 10^{-8} και 10^{-6} M. Φωτογραφίες των ιστών παρουσιάζονται παρακάτω:



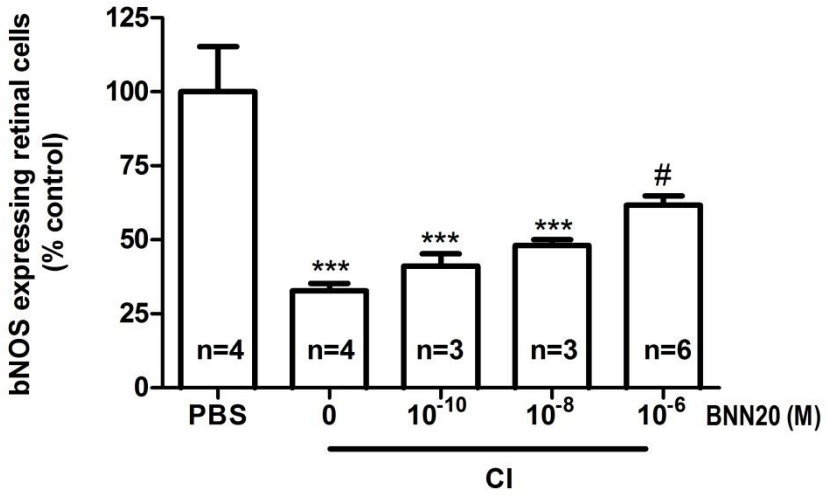
Δράση του αναλόγου BNN20, ενάντια στη χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός bNOS ανοσοδραστικότητας, σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Ανύπαρκτη είναι η χρώση στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (CI). Η χρώση δείχνει να επανέρχεται σε μικρό βαθμό στις συγκεντρώσεις 10^{-10} και 10^{-8} M. Αντίθετα, η 10^{-6} M παρουσιάζει σχετικά μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των κυττάρων στον ιστό, συγκριτικά με τις προηγούμενες 2, αν και δεν δείχνει να φτάνει

τα επίπεδα του control. Κλίμακα: 20μm, INL: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, IPL: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, GCL: γαγγλιακή στιβάδα

Παρατήρηση των παραπάνω εικόνων οδηγούν στα εξής συμπεράσματα:

- Ο ιστός της συγκέντρωσης 10^{-10} M είναι σχεδόν πανομοιότυπος με τον ιστό της χημικής ισχαιμίας. Φαίνεται να διαφέρουν λίγο στην πιο αυξημένη ανοσοδραστικότητα των αποφύσεων στο BNN20 (10^{-10} M).
- Σε ελαφρώς καλύτερη κατάσταση δείχνει να είναι ο ιστός του BNN20 10^{-8} M, καθώς φαίνεται πως σημειώνεται μικρή αύξηση στον αριθμό των κυττάρων.
- Σε ακόμη καλύτερη κατάσταση δείχνει να είναι ο ιστός του BNN20 10^{-6} M, καθώς δείχνει να πλησιάζει περισσότερο οπτικά στην εικόνα της ομάδας ελέγχου.

Τα ποιοτικά αυτά συμπεράσματα έγιναν και ποσοτικά μέσω της κατασκευής του ακόλουθου διαγράμματος:



Μελέτη ποσοτικοποίησης της δράσης του BNN20, ενάντια στη χημική ισχαιμία αμφιβληστροειδή αρουραίου. Το ανάλογο αυτό προστάτευσε τον ιστό μόνο στη συγκέντρωση 10^{-6} M.

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι:

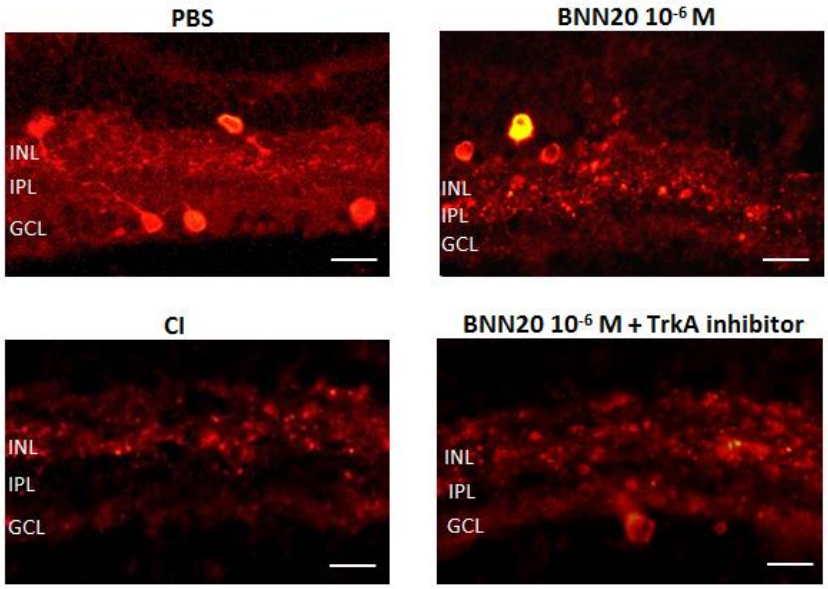
- Η χημική ισχαιμία επέφερε πτώση του ποσοστού των bNOS θετικών κυττάρων στο περίπου 33% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (***$p<0,001$, n=4).

- Η συγκέντρωση 10^{-10} του BNN20 δεν προστάτευσε τον ιστό, καθώς το ποσοστό των κυττάρων σημείωσε ελάχιστη άνοδο, μόλις στο 41% της ομάδας ελέγχου (***$p<0,001$, $p>0,05$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=3).
- Αντίστοιχο ήταν το αποτέλεσμα του BNN20 10^{-8} M, το οποίο αύξησε το ποσοστό των κυττάρων ακόμη 7% από τη 10^{-8} M, γύρω στο 48% δηλαδή της ομάδας ελέγχου (***$p<0,001$, $p>0,05$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας, n=3). Συνεπώς, ούτε σε αυτή τη συγκέντρωση το BNN20 παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση.
- Η συγκέντρωση 10^{-6} M του BNN20 φάνηκε να έχει ένα καλύτερο αποτέλεσμα, συγκριτικά με τις παραπάνω συγκεντρώσεις, προστατεύοντας τον ιστό με αύξηση του ποσοστού των κυττάρων γύρω στο 62% της ομάδας ελέγχου ($^{\#}p<0,05$ σε σύγκριση με την ομάδα της χημικής ισχαιμίας).

Συμπεραίνεται, δηλαδή, πως το BNN20, προσφέρει προστασία στο ιστό, μόνο στη συγκέντρωση 10^{-6}M, αν και τα επίπεδα της νευροπροστασίας αυτής κυμαίνονται γύρω στο 60%.

➢ BNN20 + TrkA inhibitor

Ο ανταγωνιστής, αλλά και το ανάλογο BNN20, χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10^{-6} M. Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες από τους ιστούς των αντίστοιχων πειραμάτων:



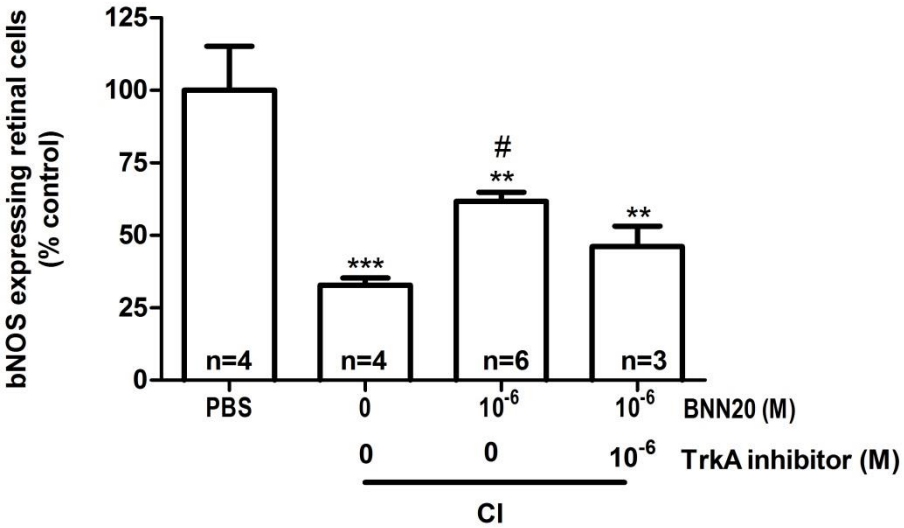
Επίδραση του ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA, στη δράση του BNN20 10^{-6} M, σε αμφιβληστροειδή αρουραίου, που έχει υποστεί χημική

ισχαιμία. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός bNOS ανοσοδραστικότητας, σε ιστό που έχει επωαστεί μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Μηδενικός δείχνει να είναι ο αριθμός των κυττάρων στον ιστό που έχει υποστεί χημική ισχαιμία (CI). Το BNN20, σε συγκέντρωση 10^{-6} M, προστατεύει τον ιστό και δείχνει να επαναφέρει ένα μέρος των χαμένων κυττάρων. Ο ανταγωνιστής αναστέλλει τη νευροπροστασία που επέφερε το BNN20. Κλίμακα: 20μm, INL: εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, IPL: εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, GCL: γαγγλιακή στιβάδα

Οι παραπάνω φωτογραφίες οδηγούν στις ακόλουθες παρατηρήσεις:

- Ο ιστός που έχει επωαστεί με BNN20 10^{-6} M, παρουσιάζει αύξηση των κυττάρων. Εντούτοις, η εικόνα βρίσκεται κάπου στη μέση χημικής ισχαιμίας και ομάδας ελέγχου, καθώς όπως είχε διαπιστωθεί και παραπάνω η νευροπροστασία του BNN20 είναι μικρού βαθμού.
- Όταν στην επώαση προστεθεί και ο ανταγωνιστής του TrkA υποδοχέα η εικόνα του ιστού αποκτά εμφάνιση χημικής ισχαιμίας, με φαινομενική μείωση των κυττάρων. Εντούτοις, η ανοσοδραστικότητα των αποφύσεων διαγράφεται έντονη στον ιστό του ανταγωνιστή.

Προχωρώντας σε ποσοτικοποίηση των οπτικών αυτών παρατηρήσεων προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα:



Μελέτη ποσοτικοποίησης της δράσης του αναστολέα του υποδοχέα TrkA, στην επίδραση του αναλόγου BNN20 10^{-6} M, κατά της χημικής

ισχαιμίας, αμφιβληστροειδή αρουραίου. Ο αναστολέας δείχνει να αναιρεί τη νευροπροστασία του BNN20.

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται φανερό ότι:

- Το μίγμα της χημικής ισχαιμίας προκάλεσε μείωση των bNOS θετικών κυττάρων σε περίπου 33% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (***$p<0,001$, $n=4$).
- Το BNN20 σε συγκέντρωση 10^{-6} M, προστάτευσε τον ιστό, αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων στο περίπου 62% της ομάδας ελέγχου ($^{\#}p<0,05$).
- Ο ανταγωνιστής του TrkA υποδοχέα ανέστειλε την προστασία που είχε προσφέρει το BNN20, μειώνοντας το ποσοστό των κυττάρων στο περίπου 46% της ομάδας ελέγχου [**$p<0,01$, $p>0,05$ σε σύγκριση με την ομάδα της (BNN20 10^{-6} M)].

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο TrKA ανταγωνιστής έχει μία τάση προς μείωση της δράσης της BNN20 αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πλήθος μελετών έχουν δείξει πως η αμφιβληστροειδική ισχαιμία εμπλέκεται σε σοβαρές οφθαλμικές παθήσεις και μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε τύφλωση (Osborne et al.,2004). Οι επιπτώσεις της ισχαιμίας στον προσβεβλημένο ιστό διακρίνονται σε 2 συνιστώσες: τη νεοαγγείωση (ανάπτυξη παθολογικών αγγείων) και την νευροεκφύλιση (κυτταρικός θάνατος). Εντούτοις, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις, μέχρι σήμερα, εκτείνονται μόνο στην 1^{η} συνιστώσα, εκείνη της νεοαγγείωσης και στην καλύτερη περίπτωση, επιφέρουν διατήρηση, όχι βελτίωση της όρασης. Κρίνεται, συνεπώς, επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νευροπροστατευτικών μορίων, τα οποία θα καταπολεμούν και τη 2^{η} συνιστώσα της ισχαιμίας, τον κυτταρικό θάνατο, ούτως ώστε, σε συνδυασμό με τις ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές τεχνικές, να παρέχεται μια αποτελεσματικότερη θεραπεία σε ασθενείς που ταλαιπωρούνται από αμφιβληστροειδοπάθειες (Vasilaki and Themos, 2009).

Σύμφωνα με τις παραπάνω ανάγκες, προέκυψε η αναζήτηση ουσιών, οι οποίες να αναστέλλουν τους ιονοτροπικούς υποδοχείς, να μειώνουν τα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος και του ενδοκυττάριου ασβεστίου, να αποτρέπουν την προκαλούμενη από την ισχαιμία απόπτωση. Έτσι, το 1998 ο Κιμωνίδης και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η DHEA προστάτευσε νευρώνες ιππόκαμπου από τη διεγερσιτοξικότητα των γλουταμινικών αγωνιστών: NMDA, in vivo και in vitro και AMPA και καϊνικού οξέος, in vitro (Kimonides et al.,1998). 1 χρόνο αργότερα άλλες 2 μελέτες αναδεικνύουν ξανά τις νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA σε νευρώνες ιππόκαμπου (Cardounel et al.,1999, Bastianetto et al.,1999). Επιπλέον, πειράματα που έγιναν σε αρουραίους 12 μηνών έδειξαν ανασταλτική δράση της DHEA στην απελευθέρωση γλουταμινικού, ενισχύοντας την άποψη για νευροπροστατευτικό της ρόλο ενάντια στη διεγερσιτοξικότητα που προκαλείται από υπερδιέγερση του γλουταμινεργικού συστήματος και γήρανση (Lhullier et al., 2003). Εκτός από τον εγκέφαλο όμως, η DHEA εμφάνισε νευπροστατευτική/ αντιαποπτωτική δράση και σε ιστούς από αμφιβληστροειδή αρουραίου, σε in vivo μοντέλο AMPA διεγερτοτοξικότητας (Kokona et al., 2012).

Ο μηχανισμός δράσης της DHEA δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Εντούτοις, υπάρχει η πεποίθηση ότι δρα σαν αλλοστερικός ρυθμιστής νευροδιαβιβαστικών υποδοχέων, όπως ο $GABA_A$, ο NMDA, ο νικοτινός, οι δ και οι sigma υποδοχείς, μεταβάλλοντας τη διεγερσιμότητα του ΚΝΣ (Baulieu and Robel,1998, Bergeron et al., 1996, Rupprecht and Holsboer,1999, Lambert et al., 1995, Haberny et al.,2002, Ueda et al., 2001). Σε μοριακό επίπεδο έχουν διαμορφωθεί 2 υποθέσεις, σύμφωνα με τις οποίες: 1) η DHEA και ο θειικός εστέρας της, DHEAS, μειώνουν την είσοδο του Ca^{2+} στα κύτταρα (ή αλλάζουν την ενδοκυτταρική ομοιόσταση του ελεύθερου Ca^{2+}), μετά

από έκθεση σε NMDA, στάδιο ιδιαίτερα σημαντικό για τον κυτταρικό θάνατο λόγω διεγερτοτοξικότητας (Garthwaite and Garthwaite, 1986) ή 2) δρουν σαν αγωνιστές των γλυκοκορτικοειδών (May et al, 1990). Η 1^{η} ερμηνεία δεν αποκλείει τη 2^{η} βέβαια, καθώς τα γλυκοκορτικοειδή έχουν δειχθεί να επιτείνουν την είσοδο του Ca^{2+} στους νευρώνες, μέσω τασεοελεγχόμενων καναλιών (Kerr et al., 1992). Η 2^{η} ερμηνεία στηρίζεται στην άποψη πως τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή ενισχύουν τη δράση γλουταμινεργικών τοξινών, όπως το NMDA (Armanini et al., 1990).

Έχει γνωστοποιηθεί ακόμη, ότι η DHEA δρα μέσω του υποδοχέα TrkA της νευτροτροφίνης NGF, ως αντιαποπτωτικό (Lazaridis et al, 2011).

Ωστόσο παρά τις αποδεδειγμένες νευροπροστατευτικές δυνατότητές της, η DHEA μεταβολίζεται σε οιστρογόνα και ανδρογόνα στον άνθρωπο, γεγονός που επιφέρει σοβαρές ενδοκρινολογικές παρενέργειες (νεοπλασίες) και περιορίζει τη χρήση της. Για την αποφυγή του μεταβολισμού αυτού, δημιουργήθηκαν συνθετικά ανάλογα αυτής, τα οποία παρουσιάζουν τροποποιήσεις στον άνθρακα 17 και στον άνθρακα 3 (Calogeropoulou et al., 2009). Μάλιστα, πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη του εργαστηρίου ανέδειξε τη νευροπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση ενός τέτοιου συνθετικού αναλόγου, του BNN27 (τροποποίηση στον άνθρακα 17), σε in vivo μοντέλο στρεπτοζοτοκίνης της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, μέσω ενεργοποίησης του TrkA υποδοχέα (Lisa et al, 2015). Επιπλέον, προστασία από την αμφιβληστροειδική νευροεκφύλιση και ενεργοποίηση του ίδιου υποδοχέα έδειξε, εκτός από το BNN27 και το ανάλογο BNN20 (τροποποίηση στον άνθρακα 17), στο ίδιο μοντέλο διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Iban-Arias et al, 2015). Ωστόσο, το BNN20 εμφάνισε μικρότερη νευροπροστατευτική δράση, συγκριτικά με το BNN27. Όλα τα παραπάνω συνάδουν στο συμπέρασμα πως η DHEA, το BNN27 και το BNN20, αν και λιγότερο αποτελεσματικό, δείχνουν να πληρούν τις προϋποθέσεις του αναζητούμενου φαρμάκου, γι αυτό και χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

Ο κύριος στόχος της παρούσας πτυχιακής ήταν η εξακρίβωση της νευροπροστατευτικής δράσης της DHEA, του BNN27 και του BNN20, καθώς και της συμμετοχής του TrkA υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF στη δράση αυτή, στο ex vivo μοντέλο της χημικής ισχαιμίας.

Το πρωτόκολλο του μοντέλου απαιτούσε επώαση του ιστού επί 1 ώρα στο μίγμα της χημικής ισχαιμίας (5mM IAA – 25mM NaCN), σε συνθήκες 37˚C, 5%CO_2/95% αέρα και ήπια ανάδευση, ούτως ώστε να προκληθεί ισχαιμία. Υπενθυμίζεται ότι το ιωδοοξικό οξύ αποτελεί αναστολέα της 3-φωσφογλυκεραλδεϋδικής αφυδρογονάσης (ένζυμο της γλυκόλυσης) και προκαλεί υπογλυκαιμία, ενώ το κυανιούχο νάτριο αποτελεί αναστολέα της οξειδάσης του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c, με αποτέλεσμα να σταματά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και να επιφέρει ανοξία (Mastrodimou et al, 2005). Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι η ισχαιμία επηρέαζε τα βραχύινα

κύτταρα, τα οποία εντοπίζονταν κυρίως στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα, εκτός από ορισμένα έκτοπα που εντοπίζονταν στη γαγγλιακή στιβάδα.

Το μοντέλο που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου για τη μελέτη του ρόλου των σωματοστατινεργικών αναλόγων στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία και αποσκοπούσε στην κατανόηση των πρώιμων σταδίων της παθοφυσιολογίας της πάθησης αυτής (Mastrodimou et al, 2005). Πλήθος όμως άλλων μελετών έχουν γίνει με παρόμοια μοντέλα χημικής ή μη ισχαιμίας. Αρχικά, το μοντέλο της χημικής ισχαιμίας εφαρμόστηκε σε τομές ιππόκαμπου (Reiner et al, 1990), ενώ λίγα χρόνια αργότερα, έγινε σε πρωτογενείς καλλιέργειες αμφβληστροειδικών κυττάρων κοτόπουλου (Ferreira et al,1997). Και στις 2 αυτές περιπτώσεις, η ισχαιμία προκαλούνταν με ιωδοξικό οξύ και κυανιούχο νάτριο. Ένα παραλλαγμένο ex vivo μοντέλο ισχαιμίας εφαρμόστηκε το 2003, στον αμφιβληστροειδή, από τους Izumi και συν. Η ισχαιμία προκαλούνταν με αφαίρεση της γλυκόζης και αντικατάσταση του οξυγόνου με άζωτο για 1 ώρα (Izumi et al, 2003). Πολλά πειράματα για την αμφιβληστροειδική ισχαιμία έχουν γίνει και σε in vivo μοντέλα, όπως μοντέλα υψηλής ενδοφθάλμιας πίεσης (Buchi and Suivaizdis, 1991), μοντέλα επίδεσης οφθαλμικών αγγείων (Otori et al.,1997), μοντέλα επίδεσης του οπτικού νεύρου (Stefansson, 1988). Σε όσα από τα παραπάνω έχει εξεταστεί η βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών, εμφανίζεται μείωση στα βραχύινα κύτταρα. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με το αποτέλεσμα της ισχαιμίας που προκαλείται από το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, οι 3 ουσίες παρουσίασαν νευροπροστασία με συγκεντρωσοεξαρτώμενο τρόπο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη των Kurata και συν., στην οποία η DHEA έδειξε σημαντική νευροπροσταστευτική δράση, με συγκεντρωσοεξαρτώμενο τρόπο, σε καλλιέργειες νευρώνων ιππόκαμπου αρουραίου, ενάντια στην τοξικότητα που είχε προκληθεί από το NMDA (Kurata et al, 2004). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται, επίσης, σε συμφωνία και με in vivo μελέτη του εργαστηρίου, όπου η DHEA προστάτευσε, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, τον αμφιβληστροειδή αρουραίου, από διγερτοτοξικότητα, προκαλούμενη από AMPA (Kokona et al, 2012).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, η DHEA εμφάνισε νευροπροστασία στις συγκεντρώσεις 10^{-8} M και 10^{-6} M, αλλά όχι στη συγκέντρωση 10^{-10} M. Ειδικότερα, στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή της (10^{-6}M), κατάφερε να επαναφέρει το 48% των κυττάρων, φθάνοντας το ποσοστό στο 88% της ομάδας ελέγχου. Στα ίδια περίπου επίπεδα κυμάνθηκε και η απόδοση του BNN27, το οποίο εμφάνισε νευροπροστασία στις συγκεντρώσεις 10^{-8} M, 10^{-7} M και 10^{-6} M, αλλά όχι στη 10^{-10} M. Το αποτέλεσμα των συγκεντρώσεων 10^{-7} M και 10^{-6} M ήταν περίπου το ίδιο, με τη 10^{-7} M συγκέντρωση να επαναφέρει το 40% του ποσοστού των κυττάρων, οδηγώντας το ποσοστό βιωσιμότητας στο 81% και τη 10^{-6} M να επαναφέρει το 30%,

ανεβάζοντάς το στο 71%. Αντίθετα με τη DHEA και το BNN27, το BNN20 προστάτευσε μόνο στη συγκέντρωση 10^{-6} M και με μικρότερη αποτελεσματικότητα. Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση αυτή επανέφερε το 29% των κυττάρων και αύξησε το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων στο 62% του control.

Όσον αφορά τον TrkA υποδοχέα της νευροτροφίνης NGF, χρήση του αναστολέα του βοήθησε στην επιβεβαίωση της εμπλοκής του στις δράσεις των DHEA και BNN27. Έτσι, όταν το BNN27 χορηγήθηκε μαζί με το μίγμα της ισχαιμίας και με τον ανταγωνιστή του TrkA, η νευροπροστασία του αναστάλθηκε και το ποσοστό των κυττάρων διατηρήθηκε στα επίπεδα της ισχαιμίας. Παρομοίως, συγχορήγηση της DHEA με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας και με τον ανταγωνιστή, ανέστειλε τη νευροπροστασία και οδήγησε το ποσοστό μόλις 7% πάνω από το επίπεδο της χημικής ισχαιμίας. Επομένως οι νευροπροστατευτικές δράσεις των δύο αυτών ουσιών διαμεσολαβούνται μέσω του TrkA υποδοχέα της NGF. Ωστόσο, η συγχορήγηση του BNN20 με το μίγμα και τον ανταγωνιστή, ανέστειλε τη νευροπροστασία σε ποσοστό 13% πάνω από το ποσοστό της χημικής ισχαιμίας, αλλά η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται στο ότι δεν επαρκεί η συγκέντρωση των 10^{-6} M του ανταγωνιστή του TrkA υποδοχέα. Χρήση του ανταγωνιστή αυτού σε συγκέντρωση 10^{-5} M, μια τάξη μεγέθους δηλαδή παραπάνω, ενδεχομένως να οδηγήσει σε στατιστικά σημαντική μείωση της νευροπροστασίας του BNN20 (10^{-6} M). Σε κάθε περίπτωση, χρήση περισσότερων πειραματόζωων στην ομάδα του ανταγωνιστή θα μπορούσε να διαλευκάνει εάν το BNN20 δρα μέσω του TrkA ή αλλων υποδοχέων μικρονευροτροφινών.

Μελέτες του εργαστηρίου στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και στο in vivo μοντέλο της AMPA διεγερτοτοξικότητας αναδεικνύουν την εμπλοκή του TrkA υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις των DHEA, BNN27 και BNN20. Επομένως, περισσότερα πειράματα θα πρέπει να γίνουν για τα διαλευκανθεί ο ρόλος του TrkA υποδοχέα στις νευροπροστατευτικές δράσεις του BNN20 στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας (Kokona et al., 2012, Lisa et al., 2015, Iban-Arias et al., 2015).

Συμπερασματικά, από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής, μπορούμε να συμπεράνουμε τη νευροπροστατευτική δράση του νευροστεροειδούς DHEA και των συνθετικών της αναλόγων, BNN27 και BNN20, ενάντια στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία αρουραίου, καθώς και τη συμμετοχή του TrkA υποδοχέα στην άσκηση των παραπάνω δράσεων της DHEA και του BNN27. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτη των ουσιών αυτών και ιδιαίτερα του μηχανισμού δράσης τους, με την ελπίδα ανάπτυξης φαρμάκων, ικανών να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές μελέτες αμφιβληστροειδοπαθειών.

Βιβλιογραφία

Abdulrahman A. Alghadyan, 2011. Diabetic retinopathy – An update, *Saudi Journal of Ophthalmology* 25 (2), 99–111

Ambati J., Fowler B., 2012. Mechanisms of Age-Related Macular Degeneration. *Neuron*. 75, 26–39

Armanini, M. P., Hutchins, C., Stein, B. A. Sapolsky, R. M., 1990. Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent. Brain Res. 532, 7–12.

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

Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J., Quirion R., 1999. Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induce damage. Mol. Brain. Res. 66, 35–41.

Batterbury M, Bowling B, Murphy C. Οφθαλμολογία - 3η έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., 2014.

Baulieu E., Robel P., 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4089–4091

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., 2013. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

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

Bergeron, R., Montigny, C., Debonnel, G., 1996. Potentiation of neural NMDA response induced by dehidroepiandrosterone and its supression by progesterone: Effects mediated via sigma receptors. J. N. Eurosci. 16, 1193–1202.

Birch D., Liang F., 2007. Age-related macular degeneration: a target for nanotechnology derived medicines. *Int J Nanomedicine*. 2(1), 65–77.

Bok D., 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci* 17, 189-95.

Bonilha V., 2008. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin Ophthalmol*. 2(2), 413–424

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

Bressler N., Bressler S., 2000. Photodynamic Therapy with Verteporfin (Visudyne): Impact on Ophthalmology and Visual Sciences. IOVS. 41, 624-628

Büchi ER, Suivaizdis I, Fu J., 1991. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. Ophthalmologica. 203(3), 138-47.

Bucolo C. and Drago F., 2004. Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: role of sigma1 recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.* 498, 111–114.

Calogeropoulou T., Avlonitis N., Minas V., Alexi X., Pantzou A., Charalampopoulos I., Zervou M., Vergou V, Katsanou E, Lazaridis I, Alexis M, Gravanis A., 2009. Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. Journal of medicinal chemistry, 52(21), 6569-87.

Cardounel A., Regelson W., Kalimi M., 1999. Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxininduced cell death: Mechanism of action. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 222, 145–149.

Cascio C., Russo D., Drago G., Galizzi G., Passantino R., Guarneri R., Guarneri P., 2007. 17beta-estradiol synthesis in the adult male rat retina. Exp. Eye Res. 85, 166e172

Casson RJ., Chidlow G., Wood JP., Crowston JG., Goldberg I., 2012. Definitionofglaucoma: clinical and experimental concepts. Clin Experiment Ophthalmol. 40(4), 341–349.

Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1(8), 623-34.

Colquitt, J. L., Jones, J., Tan, S. C., Takeda, A., Clegg, A. J., Price, A., 2008 Ranibizuamb and pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess 12(16), iii–iv, ix–201.

Dowling J.E., 1987. The Retina: An Approachable Part of the Brain. Cambridge, MA: Belknap.

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

Ferreira IL, Duarte CB, Carvalho AP, 1997. 'Chemical ischemia' in cultured retina cells: the role of excitatory amino acid receptors and of energy levels on cell death. Brain Res. 768(1-2), 157-66.

Fine S. I., Berger K. W., Maguire M. G., Ho A. C., 2000. Age-related macular degeneration. New Engl J Med. 342, 483−492.

Garthwaite, G., Garthwaite, J., 1986. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebral slices: Dependence on calcium concentration. Neurosci. Lett. 66, 193–198.

Gourdin M., Dubois P., 2013. Impact of Ischemia on Cellular Metabolism, *Artery Bypass*

Guarneri P., Guarneri R., Cascio C., Pavasant P., Piccoli F., Papadopoulos V., 1994. Neurosteroidogenesis in rat retinas. Journal of neurochemistry, 63(1), 86-96.

Haberny K. A., Paule M. G., Scallet A. C., Sistare F. D., Lester D. S., Hanig J. P., Slikker W. Jr., 2002. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibily to neurotoxicity. Toxicol. Sci. 68, 9–17.

Hofman P., van Blijswijk, B.C., Gaillard, P.J., Vrensen, G.F.,Schlingemann, R.O., 2001. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. Arch. Ophthalmol. 119, 861–866.

Ibán-Arias R., Lisa S., Kokona D., Mastrodimou N., Gravanis A., Charalampopoulos I., Thermos K. The novel microneurotrophins BNN27 and BNN20 prevent retinal neurodegeneration in the in vivo STZ-model of Diabetic Retinopathy through NGF TrkA receptor activation. ENCODS 2015, Sesimbra, Portugal, April 23-26, 2015.

Izumi Y, Hammerman SB, Kirby CO, Benz AM, Olney JW, Zorumski CF. 2003. Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. Vis Neurosci. 20(2), 97-107.

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., 2011, Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Kerr D., Campbell L., Thibault O., Landfield P., 1992. Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca2+ conductances: relevance to brain aging. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 8527–8531.

Kimonides V.G., khatibi N.H., Svendsen C.N., Sofroniew M.V., Herbert J, 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1852–1857

Klein R, Klein B, Moss S., 1984. Visual Impairment in Diabetes. Ophthalmology 91(1), 1–9.

Kohner E.M, Aldington S.J, Stratton I.M, et al. 1998. United Kingdom prospective diabetes study, 30: diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus and associated risk factors. Arch Ophthalmol. 116(3), 297–303.

Kokona D., Charalampopoulos I., Pediaditakis I., Gravanis A., Thermos, K., 2012. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. Neuropharmacology, 62(5-6), 2106-17

Kolb H., 2003., How the Retina Works. American Scientist. 91,28-35

Kurata K, Takebayashi M, Morinobu S., Yamawaki S., 2004. β-Estradiol, Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate Protect against N-Methyl-Daspartate-Induced Neurotoxicity in Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms. JPET. 311, 237–245, 200.

Lambert J. J., Beletti D., Hill-Venning C., Peters J. A., 1995. Neurosteroids and GABAA receptor function. Trends Pharmacol. Sci. 16, 295–303.

Lanthier A., Patwardhan V. V, 1988. In vitro steroid metabolism by rat retina. Brain Res. 463, 403-406

Lazaridis I., Charalampopoulos I., Alexaki V.I., Avlonitis N., Pediaditakis I., Efstathopoulos P., Calogeropoulou T., Castanas E., Gravanis A., 2011. Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. PLoS Biol. 9(4), e1001051

Lhullier F., Riera N., Nicolaidis R, Junqueira D, Dahm K, Cipriani F, Brusque A., Souza D., 2004. Effect of DHEA Glutamate Release from Synaptosomes of Rats at Different Ages. Neurochemical Research. 29(2), 335–339

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

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

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

Lisa S, Iban-Arias R, Mastrodimou N, Kokona D, Charampopoulos I, Gravanis A, Thermos K. Effects of novel synthetic microneurotrophins in diabetic retinopathy (oral presentation). ESN 2015, Tartu, Estonia, June 14-17, 2015

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

May M., Holmes E., Rogers W., Poth M., 1990. Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone. *Life Sci.* 46, 1627–1631.

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

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

National Institute for Clinical Excellence, 2003. Guidance on the use of photodynamic therapy for age-related macular degeneration.

Neely K., Gardner T., 1998. Ocular Neovascularization Clarifying Complex Interactions. *Am J Pathol*. 153(3), 665–670.

Nestler EJ., Duman RS., 1994. G proteins and cyclic nucleotides in the nervous system. *Basic neurochemistry*. 5, 429-448.

Noecker R., 2006. The management of glaucoma and intraocular hypertension: current approaches and recent advances. *Ther Clin Risk Manag* 2(2), 193–206.

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

Otori, Y., Shimada, S., Morimura, H., Ishimoto, I., Tohyama, M., Tano, Y., 1997. Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: an approach using ligation of the retinal central artery in the rat. *Surv. Ophthalmol*. 42 (1), S96–S104.

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

Pierce E., Avery R, Foley E., Aiello L., Smith L., 1995. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA*. 92, 905-909

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

Pin JP, Bockaert J., 1995. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol*. 5, 342–349.

Platt S., 2007. The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. *The Veterinary Journal.* 173, 278–286.

Reiner P., Laycock A., Doll C., 1990. A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice, *Neuroscience Letters.* 119 (2), 175-178

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

Romero-Aroca P., 2011. Managing diabetic macular edema: The leading cause of diabetes blindness. *World J Diabetes*. 2(6): 98–104

Rupprecht R., Holsboer F., 1999. Neuroactive steroids: Mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci*. 22, 410–416.

Shiose Y., 1990. Intraocular pressure: new perspectives. *Surv Ophthalmol*. 34(6), 413-35.

Sivakumar R., Ravindran G., Muthayya M., Lakshminarayanan S., Velmurughendran C.U., 2005. Diabetic Retinopathy Analysis. *J Biomed Biotechnol*. 1, 20–27.

Stefansson, E., Wilson, C.A., Schoen, T., Kuwabara, T., 1988. Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 29, 1050–1055.

Ueda H., Akira Y., Shogo T., Kinobu M., Junko M., Kiyoshi M., Mita S., 2001. Neurosteroids stimulate G protein-coupled sigma receptors in mouse brain synaptic membrane. *Neurosci. Res*. 41: 33–40

van Wijngaarden P., Coster D. J., Williams K. A., 2005. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA* 293, 1509−1513.

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

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

Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ., 2006. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep.* 58(3), 335-40

Yang, X.-L., 2004. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in neurobiology*. 73(2), 127-50.

Κριατσιώτης Γ., 2004. Εκφύλιση ωχράς κηλίδας. *Περισκόπιο της Επιστήμης*. 282

Τσιλιμπάρης Μ., 2014. Anatomy of the human eye. Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιστοσελίδες

http://www.mdfoundation.com.au/resources/1/factsheets/Greek_MDFA_MDBooklet_2014-03.pdf

http://www.glaucoma.org/gleams/high-eye-pressure-and-glaucoma.php

http://www.brainfacts.org/Sensing-Thinking-Behaving/Senses-and-Perception/Articles/2012/Vision-It-all-Starts-with-Light

http://retinavitreous.com/treatments/laserstart.php

http://www.scienceofdme.org/treat/

http://galleryhip.com/anti-vegf-drugs.html

http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/clinical-updates/ophthalmology/aflibercept-shows-promise-game-changer-patients-age-related-macular%20degeneration

http://www.athenseyehospital.gr/gr/morfes-kai-pathogenesi-tis-diavitikis-amfivlistroeidopatheias-p60.html

http://www.aao.org/eye-health/tips-prevention/what-is-diabetic-retinopathy

http://www.ophthalmica.gr/el/pathiseis/item/42-glaukoma.html

http://www.glaucoma.com.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=91&Itemid=142&lang=el

http://www.glaucoma.com.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=91&Itemid=142&lang=el

http://fovea.ir/the-best-of-retina/

http://www.benbest.com/nutrceut/DHEA.html