

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ ΣΤΗΝ  
ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΗ**



**Δέσποινα Αβραμίδου**

**Βιολόγος**

Τριμελής Επιτροπή

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΠΘ

Παναγιώτης Λιάκος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΠΘ

Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΠΘ

**Λάρισα 2012**

Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης: 10 Ιουλίου 2012

Οφείλω να ευχαριστήσω

– την κ. Άννα Βασιλάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας για την ανεκτίμητη βοήθειά της στην εργασία αυτή, σε κάθε βήμα από την αρχή ως το τέλος που χάρη στην επίβλεψη και στη σωστή καθοδήγησή της καταφέραμε να καταλήξουμε σε συμπεράσματα, και γιατί προσωπικά με μύησε στην πραγματική έννοια της πειραματικής δουλειάς και της λειτουργίας ενός εργαστηρίου.

– τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας για την ευγενή παραχώρηση του μετρητή β ακτινοβολίας, και τέλος

– όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας που ο καθένας με τον τρόπο του βοήθησαν στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε τα δύο αυτά χρόνια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Περίληψη .....	5
Summary .....	<u>76</u>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	<u>87</u>
Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας .....	<u>87</u>
Γενικά .....	<u>87</u>
Ανατομία.....	<u>87</u>
Αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς .....	<u>1244</u>
Ισχαιμία .....	<u>1443</u>
Εισαγωγή .....	<u>1443</u>
Νευροβιολογικοί Μηχανισμοί στην Ισχαιμία.....	<u>1544</u>
Απελευθέρωση Νευροδιαβιβαστών στην Ισχαιμία .....	<u>1746</u>
Ισχαιμία και Διεγερτοτοξικότητα.....	<u>2524</u>
Επιδεκτικότητα των νευρώνων κατά την ισχαιμική προσβολή .....	<u>3034</u>
Η ανθεκτικότητα του αμφιβληστροειδούς στην ισχαιμία .....	<u>3135</u>
Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια.....	<u>3337</u>
Σκοπός.....	<u>3640</u>
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	<u>3744</u>
Πειραματόζωα .....	<u>3744</u>
Πρόκληση διαβήτη τύπου I (μοντέλο στρεπτοζοτοκίνης).....	<u>3842</u>
Μελέτες Απελευθέρωσης Νευροδιαβιβαστών .....	<u>3842</u>
Προετοιμασία Ιστών .....	<u>3842</u>
Υπερδιάχυση και Συλλογή Δείγματων .....	<u>3842</u>
Μελέτες Επαναπρόσληψης.....	<u>3943</u>
Ανάλυση Αποτελεσμάτων Πειραμάτων Απελευθέρωσης και Επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών .....	<u>3943</u>
Ανοσοϊστοχημικές μελέτες.....	<u>4044</u>
Παρασκευή ιστών.....	<u>4044</u>

Μελέτες ανοσοφθορισμού .....	<a href="#">4044</a>
Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας και Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	<a href="#">4145</a>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	<a href="#">4347</a>
Διαφορική επίδραση ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα .....	<a href="#">4347</a>
Επίδραση του διαβήτη τύπου Ι στην απελευθέρωση [3H]D-Ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή αουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης .....	<a href="#">4650</a>
Επίδραση του διαβήτη τύπου Ι στην απελευθέρωση [ <sup>3</sup> H]GABA από τον αμφιβληστροειδή αουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης .....	<a href="#">4751</a>
Επίδραση του διαβήτη τύπου Ι στην επαναπρόσληψη [3H]D-Ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή αουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας.....	<a href="#">4852</a>
Επίδραση του διαβήτη τύπου Ι στην επαναπρόσληψη [3H]GABA από τον αμφιβληστροειδή αουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας.....	<a href="#">4953</a>
Συζήτηση .....	<a href="#">5054</a>
Βιβλιογραφία.....	<a href="#">5559</a>

## Περίληψη

Η ισχαιμία χαρακτηρίζεται από την έλλειψη οξυγόνου, την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων και τη συσσώρευση άχρηστων μεταβολικών προϊόντων. Σε κυτταρικό επίπεδο η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς προκαλεί έναν αυτόνεργοποιούμενο καταστροφικό καταρράκτη στον οποίο εμπλέκονται η νευρωνική εκπόλωση, η εισροή ασβεστίου και το οξειδωτικό στρες. Κατά τη διάρκεια της νευρωνικής ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση της εξωκύτωσης γλουταμικού οξέος (διεγερτοτοξικότητα), με αποτέλεσμα την υπερβολική διέγερση των μετασυναπτικών νευρώνων και την επαγωγή μονοπατιών που συχνά καταλήγουν στον κυτταρικό θάνατο. Ακόμα, κατά την ισχαιμική προσβολή παρατηρείται αύξηση της εξωκυτάριας συγκέντρωση και άλλων νευροδιαβιβαστών (π.χ. GABA, γλυκίνη, και ακετυλοχολίνη).

Με βάση τα παραπάνω σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της διαφορικής επίδρασης της ισχαιμίας, της υποξίας και της υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στις στιβάδες του αμφιβληστροειδή αρουραίου καθώς η μελέτη της επίδρασης του διαβήτη τύπου I στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση κατά τη διάρκεια ισχαιμικής προσβολής (απελευθέρωση- επαναπρόσληψη).

Από τις μελέτες μας διαπιστώθηκε πως η GABAεργική ανοσοδραστικότητα εμφανίζει σημαντική μείωση στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα του αμφιβληστροειδούς μια ώρα μετά την εφαρμογή ισχαιμίας και υποξίας. Ακόμα, διαπιστώσαμε ότι 3 μήνες μετά την πρόκληση διαβήτη τύπου I δεν επηρεάζεται η επαγόμενη από την ισχαιμία απελευθέρωση γλουταμικού, οξέος από τον αμφιβληστροειδή αλλά προκαλείται μια σημαντική χρονοκαθυστέρηση στην επαγόμενη από την ισχαιμία απελευθέρωση GABA. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος και του GABA επανέρχεται σε επίπεδα βασικής απελευθέρωσης σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την επαναφορά των ιστών σε φυσιολογικές συνθήκες, τόσο στον αμφιβληστροειδή των φυσιολογικών όσο και σε αυτόν των διαβητικών ζώων. Τέλος, η επαναπρόσληψη των δυο αυτών νευροδιαβιβαστών δεν μεταβάλλεται στα διαβητικά ζώα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, τόσο υπό φυσιολογικές, όσο και υπό ισχαιμικές συνθήκες.

Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των μελετών απελευθέρωσης γλουταμινικού οξέος και GABA υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης καθώς επίσης και με τα αποτελέσματα των μελετών διαφορική επίδραση ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα του αμφιβληστροειδούς υποδεικνύουν την πλαστικότητα που επιδεικνύει ο αμφιβληστροειδής στην αντιμετώπιση ισχαιμικών και υπεργλυκαιμικών (διαβήτη) προσβολών.

## Summary

Ischemia is characterized by lack of oxygen, nutrients and the accumulation of waste metabolic products. At the cellular level, ischemia causes a retinal self-activated destructive cascade involving neuronal depolarization, calcium influx and oxidative stress. During neuronal ischemia an increase of glutamic acid exocytosis (excitotoxicity) resulting in the excessive stimulation of postsynaptic neurons and the induction of signaling pathways which often end up in cell death. Moreover, increased concentration of other neurotransmitters (e.g. GABA, glycine, and acetylcholine) is observed during the ischemic insult.

Based on the above the aim of this work was to study the differential effect of ischemia, hypoxia and hypoglycemia in the GABAergic presynaptic immunoreactivity in rat retinal layers and to study the effect of type I diabetes in retinal neurotransmission during ischemic insults (release- uptake).

From our studies we concluded that the GABAergic presynaptic activity shows a significant decrease during ischemia and hypoxia in the inner plexiform layer of the retina. Furthermore, we observed that diabetes does not affect the glutamatergic retinal neurotransmission but significantly delays GABA release. Moreover, retinal reperfusion under normoxic and normoglycaemic conditions led to fast recovery of basal neurotransmitter release. Finally, we found that the uptake of neurotransmitters is not altered in diabetic animals compared to controls, both under normal as well as ischemic conditions.

Collectively, our results designate retinal neurotransmission plasticity under ischemic and diabetic conditions.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας

### Γενικά

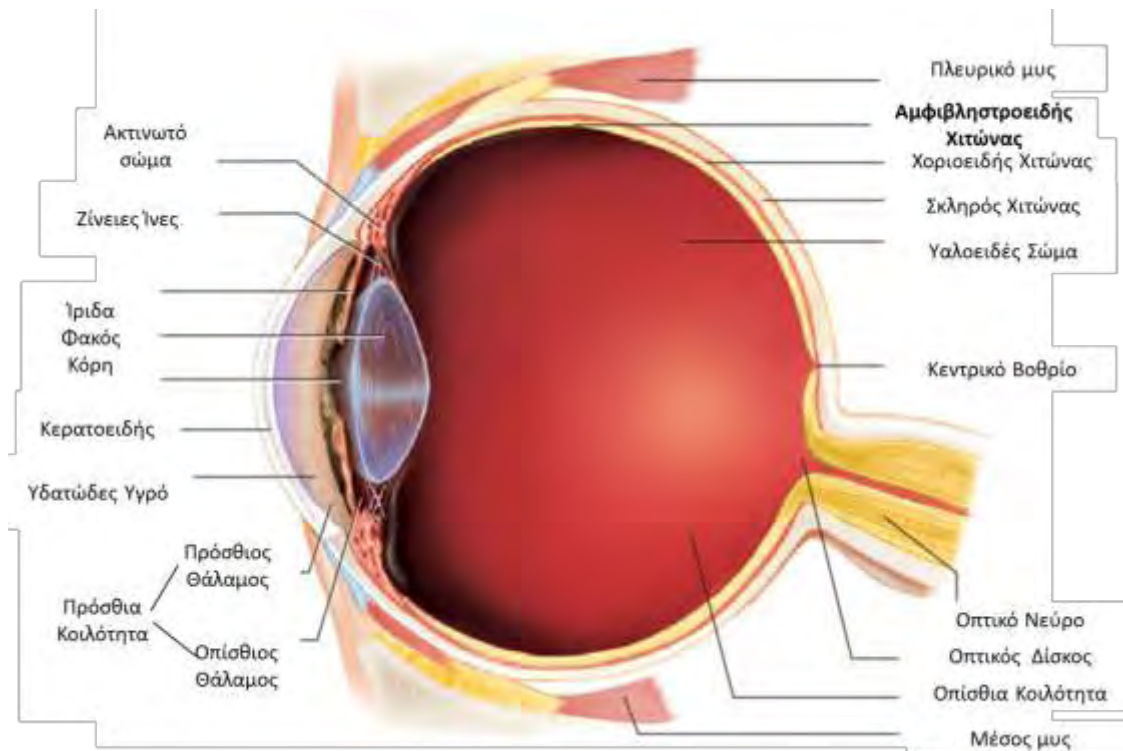
Ο αμφιβληστροειδής είναι ο σπουδαιότερος από τους τρεις χιτώνες του οφθαλμού. Μέσα σε αυτόν επιτυγχάνεται η πρώτη φάση της λειτουργίας της όρασης. Συγκεκριμένα, εδώ επιτελείται η λειτουργία της μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε φωτεινό ερέθισμα. Το φωτεινό ερέθισμα, κατόπιν, με την οπτική οδό, καταλήγει στην πληκτραία σχισμή του ινιακού λοβού, όπου με την κατάλληλη επεξεργασία έχουμε την αίσθηση του σχήματος, του χρώματος, του αντικειμένου και της κίνησης.

Οι υπόλοιποι χιτώνες του οφθαλμού είναι ο σκληρός και ο χοριοειδής ή ραγοειδής χιτώνας. Και οι δύο αυτοί χιτώνες είναι βοηθητικοί του αμφιβληστροειδούς. Ο σκληρός προστατεύει και διατηρεί το σχήμα του οφθαλμού και ο χοριοειδής αιματώνει τις εξωτερικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Όσον αφορά τα διαφανή και διαθλαστικά μέσα του οφθαλμού, δηλαδή τον κερατοειδή, το φακό και το υαλοειδές, αυτά έχουν σαν σκοπό να σχηματίσουν το είδωλο των αντικειμένων επάνω στον αμφιβληστροειδή.

### Ανατομία

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελεί το φωτοευαίσθητο τμήμα του οφθαλμού. Εδράζεται ανάμεσα στον χοριοειδή χιτώνα και το υαλοειδές σώμα, καλύπτοντας την κυκλική περιφέρεια της θηλής του οπτικού νεύρου μέχρι την πριονωτή περιφέρεια, όπου μεταπίπτει στις επιθηλιακές στιβάδες του ακτινωτού σώματος (Junqueira,2004).





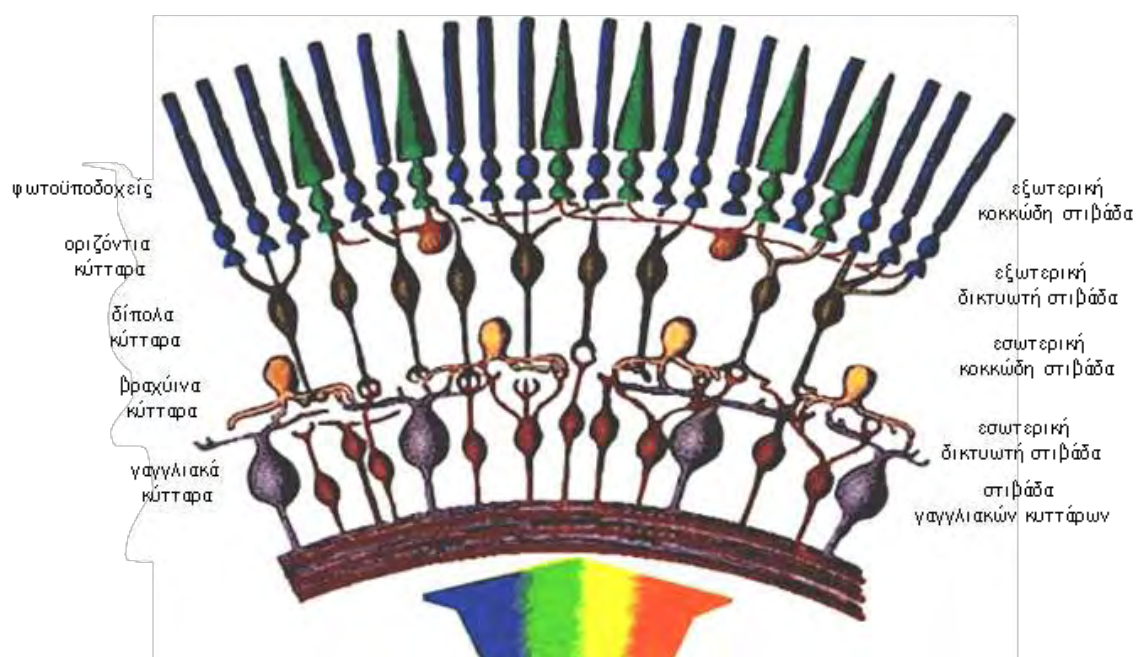
Εικόνα 14 Εγκάρσια τομή Οφθαλμού (Shrier και συν., 2010)

Πιο συγκεκριμένα, περιγράφεται ως ο λεπτός υμένας που εκτείνεται στο μεγαλύτερο τμήμα του εσωτερικού τοιχώματος του οφθαλμού (la Cour και Ehinger, 2006). Είναι νευροεκτοδερμικής προέλευσης και για το λόγο αυτό αποτελεί τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Ακόμα, εμφανίζει πολύπλοκη και ιδιαίτερα κυτταροβριθή οργάνωση (Junqueira, 2004). Σχηματίζεται τόσο από νευρικά κύτταρα, όσο και από κύτταρα της γλοίας, τα οποία στην πλειονότητά τους είναι κύτταρα του Müller.

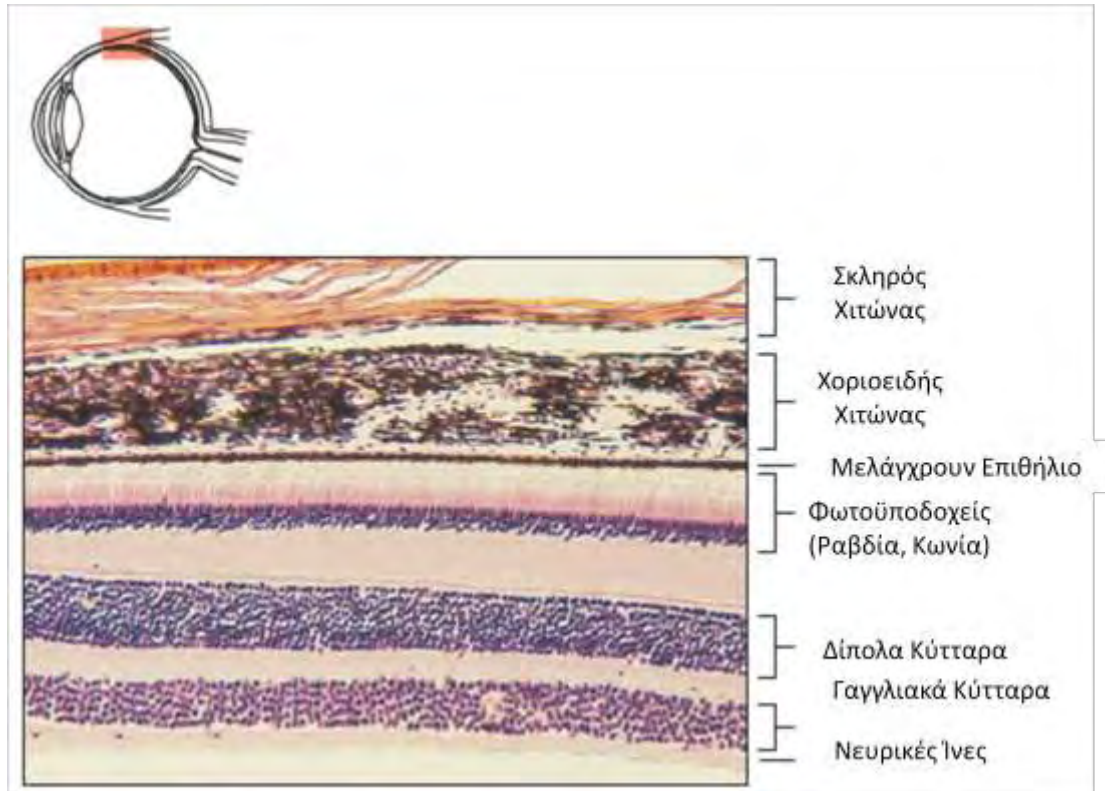
### **Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από διακριτές στιβάδες.**

Σήμερα γνωρίζουμε ότι στη βασική δομή του αμφιβληστροειδούς συμβάλουν πέντε κύριοι τύποι κυττάρων: τα φωτοϋποδοκτικά κύτταρα (ραβδιοφόρα και κωνιφόρα) στην εξωτερική κοκκώδη στιβάδα, οι διάμεσοι νευρώνες (οριζόντια, δίπολα και βραχύινα κύτταρα) στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα και τα γαγγλιακά κύτταρα στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Εικ. 2 και 3). Τα φωτοϋποδοκτικά, τα οριζόντια και τα δίπολα κύτταρα συνάπτονται στην **εξωτερική δικτυωτή στιβάδα**, ενώ τα δίπολα, τα βραχύινα και τα γαγγλιακά κύτταρα συνάπτονται στην **εσωτερική δικτυωτή στιβάδα**. Η σύνδεση των

δύο δικτυωτών στιβάδων γίνεται μέσω των δίπολων κυττάρων. Η οπτική πληροφορία μεταφέρεται κατακόρυφα από τους φωτούποδοχείς στα δίπολα και από εκεί στα γαγγλιακά κύτταρα - **κάθετο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος**, καθώς επίσης και, πλαγίως με τα οριζόντια κύτταρα στην **εξωτερική κοκκώδη στιβάδα** και με τα βραχύινα κύτταρα στην **εσωτερική κοκκώδη στιβάδα** - **οριζόντιο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος**. Οι συναπτικές σχέσεις των κυττάρων αυτών αποτελούν τη βάση για την λειτουργική οργάνωση του εξαιρετικά εξειδικευμένου αυτού οργάνου (Shrier και συν., 2010).

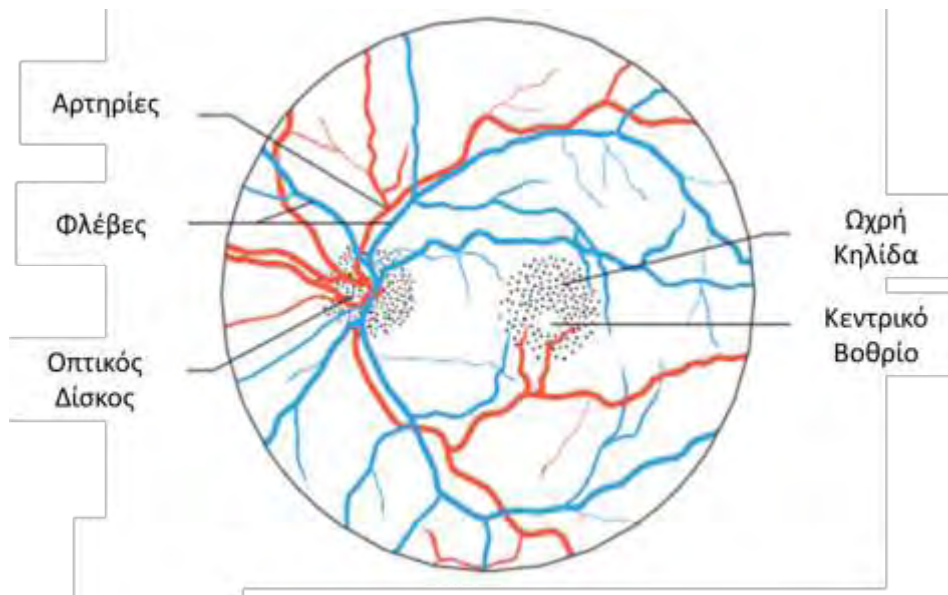


Εικόνα 2: Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από επάλληλες στιβάδες οι οποίες από έξω προς τα μέσα είναι οι: εξωτερική κοκκώδης στιβάδα, η εξωτερική δικτυωτή στιβάδα, η εσωτερική κοκκώδης στιβάδα, η εσωτερική δικτυωτή στιβάδα και η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων.



Εικόνα 3: Απεικόνιση από μικροσκόπιο (75x) των κυτταρικών στρωμάτων και των νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς (Shrier και συν., 2010)

Η κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα ονομάζεται ωχρή κηλίδα (macula lutea) και εκτείνεται σε μια περιοχή περίπου  $1\text{mm}^2$ . Η κεντρική περιοχή της ωχρής κηλίδας, ονομάζεται κεντρικό βοθρίο (fovea centralis) και αποτελεί την περιοχή όπου παράγεται η πιο οξεία όραση. Ακριβώς έξω του κεντρικού βοθρίου παρατηρείται μια περιοχή που ονομάζεται οπτικός δίσκος (optic disc, Εικ. 4). Στο σχηματισμό αυτό, οι νευρικές ίνες του αμφιβληστροειδούς εξέρχονται από τον οφθαλμό για να σχηματίσουν το οπτικό νεύρο. Τον οπτικό δίσκο διαπερνούν, επίσης, μια κεντρική αρτηρία και μια φλέβα. Τα δύο αυτά αγγεία αποτελούν συνέχεια του τριχοειδούς δικτύου του αμφιβληστροειδή και μαζί με τα αγγεία του χοριοειδούς χιτώνα, αιματώνουν τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα.



Εικόνα 4: Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας (α) Τα κύρια χαρακτηριστικά του αμφιβληστροειδούς (Shrier και συν., 2010).

Ο οπτικός δίσκος στερείται φωτοϋποδοχέων. Για το λόγο αυτό είναι ευρέως γνωστός ως το «**τυφλό σημείο του ματιού**». Ο χώρος ανάμεσα στο φακό, το ακτινωτό σώμα και τον αμφιβληστροειδή, συνιστά το μεγαλύτερο διαμέρισμα του οφθαλμού και ονομάζεται οπίσθια κοιλότητα (posterior cavity). Η κοιλότητα αυτή περιέχει ένα διάφανο, ζελατινώδες υγρό, το υαλοειδές σώμα (vitreous humor). Το υαλοειδές σώμα υποστηρίζει τις εσωτερικές δομές του οφθαλμού και βοηθά στη διατήρηση του σχήματός του (Shrier και συν., 2010).

### **Αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς**

Η αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς είναι διπλή. Η αγγείωση των εσωτερικών κυττάρων (γαγγλιακά-δίπολα κύτταρα) επιτελείται από την κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς, που είναι κλάδος της οφθαλμικής. Η οφθαλμική αρτηρία προέρχεται από την έσω καρωτίδα. Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδή αναδύεται από την οπτική θηλή. Δίνει τέσσερις κλάδους, τον άνω και κάτω κροταφικό και τον άνω και κάτω ρινικό. Η κεντρική αρτηρία κατά την πορεία της στην περιφέρεια μεταπίπτει σε μικρότερους κλάδους, δηλαδή στα αρτηρίδια και στα τριχοειδή. Οι εξωτερικές στιβάδες του αμφιβληστροειδή

που βρίσκονται προς τον χοριοειδή (μέσα στις οποίες περιλαμβάνεται η στιβάδα των ραβδίων και των κωνίων), τρέφονται από τα αγγεία του χοριοειδή (*Osborne και συν.*, 2004, [www.ivo.gr](http://www.ivo.gr)).

Το αίμα από τον αμφιβληστροειδή απάγεται με τους τέσσερις κλάδους της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή. Οι κλάδοι αυτοί ενώνονται πάνω στην οπτική θηλή και σχηματίζουν την κεντρική φλέβα, η οποία διαμέσου της οπτικής θηλής διοχετεύει το αίμα στην άνω φλέβα του κόγχου που καταλήγει στον σηραγγώδη κόλπο (*Osborne και συν.*, 2004, [www.ivo.gr](http://www.ivo.gr)).

Η κυκλοφορία του αμφιβληστροειδή είναι τελική. Δεν υπάρχουν αναστομώσεις μεταξύ των κλάδων της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδή. Απόφραξη της αρτηρίας πριν την είσοδο της στο βολβό οδηγεί σε παύση της ροής αίματος προς τον αμφιβληστροειδή και νέκρωση των έσω στιβάδων. Σε ορισμένες περιπτώσεις (αναλογία 25-50%), η περιοχή του αμφιβληστροειδή που βρίσκεται μεταξύ της ωχρής κηλίδας και της θηλής τροφοδοτείται από τη θηλο-αμφιβληστροειδική αρτηρία. Η αρτηρία αυτή προέρχεται από τη χοριοειδική κυκλοφορία (*Osborne και συν.*, 2004, [www.ivo.gr](http://www.ivo.gr))

## Ισχαιμία

### Εισαγωγή

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς αποτελεί κοινή αιτία τόσο μείωσης της όρασης, αλλά και τύφλωσης. Σε κυτταρικό επίπεδο, η ισχαιμική βλάβη του αμφιβληστροειδούς προκαλεί έναν αυτοενεργοποιούμενο καταστροφικό καταρράκτη. Ο καταρράκτης αυτός περιλαμβάνει νευρωνικές εκπολώσεις, είσοδο του ασβεστίου και εν τέλει οξειδωτικό στρες. Το έναυσμα για τις παραπάνω διαδικασίες δίνεται από την έκπτωση της ενέργειας και από αυξημένη διέγερση των νευρώνων από το γλουταμικό οξύ (διεγερτοτοξικότητα).

Έχει παρατηρηθεί διαφορετική απόκριση των κυττάρων στην ισχαιμική βλάβη, γεγονός που φαίνεται να οφείλεται στη διαταραχή του ισοζυγίου διεγερτικών και ανασταλτικών υποδοχέων που έχουν ως συνδότη κάποιο νευροδιαβιβαστή. Ένας μεγάλος αριθμός ζωικών μοντέλων και τεχνικών ανάλυσης έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για να μελετήσουν την ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς. Ως αποτέλεσμα έχει βρεθεί ένας σημαντικός αριθμός θεραπειών που φαίνεται πως αναστέλλουν τον «ισχαιμικό καταρράκτη» και διακόπτουν τα επιζήμια αποτελέσματα της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.

Ωστόσο, μέχρι στιγμής, τα εργαστηριακά αυτά ευρήματα δεν έχουν εφαρμοστεί και στην κλινική πράξη με επιτυχία. Δυσκολίες τόσο στην οδό χορήγησης, όσο και στη δοσολογία, καθώς και οι ανεπιθύμητες ενέργειες κατέστησαν απαγορευτική την περαιτέρω χρήση των σκευασμάτων αυτών σε κλινικό επίπεδο (Κεταμίνη, β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές κα). Ακόμα, θεραπείες βασισμένες στην επαγωγή της νευροπροστασίας για την αντιμετώπιση εγκεφαλικών επεισοδίων είναι μέχρι στιγμής απογοητευτικές.

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας επιδεικνύει μια αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στις βλάβες που προκαλούνται από ισχαιμία, σε σύγκριση με τον εγκέφαλο. Η ανθεκτικότητα αυτή πιθανόν να οφείλεται στον ιδιόρρυθμο μεταβολισμό του και στο μοναδικό μικροπεριβάλλον του. Δεδομένης της ολοένα και βαθύτερης κατανόησης των γεγονότων που συμμετέχουν στον «ισχαιμικό καταρράκτη», οι έρευνες στον τομέα αυτό συνεχίζονται και αναμένεται να αποδοθεί κάποια

αποτελεσματική θεραπεία για την ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς (*Osborne και συν.*, 2004).

Ο όρος ισχαιμία επινοήθηκε από τον Virchow, ο οποίος συνδύασε τις αρχαίες ελληνικές λέξεις *ίσχω* → συγκρατώ και *αίμα*. Έκτοτε η ισχαιμία αναφέρεται σε μια παθολογική κατάσταση ανεπαρκούς αιματικής ροής με αποτέλεσμα την αποτυχία πλήρωσης των ενεργειακών αναγκών του εκάστοτε κυττάρου/ ιστού. Η ισχαιμία θα πρέπει να διαχωρίζεται από την ανοξία και την υποξία. Οι έννοιες αυτές ενέχονται στην ισχαιμία, ωστόσο, η παρουσία τους δεν σημαίνει απαραίτητα και παρουσία ισχαιμίας (*Osborne και συν.*, 2004).

Η ισχαιμία στερεί από τον ιστό τρία απαραίτητα συστατικά/στοιχεία: οξυγόνο, μεταβολικά υποστρώματα και απομάκρυνση των τοξικών αποβλήτων, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται αρχικά η ομοιοστατική απόκριση του ιστού. Έπειτα επέρχεται βλάβη του και εάν το χρονικό διάστημα της ισχαιμίας είναι μεγάλο, ο ιστός νεκρώνεται (*Osborne και συν.*, 2004).

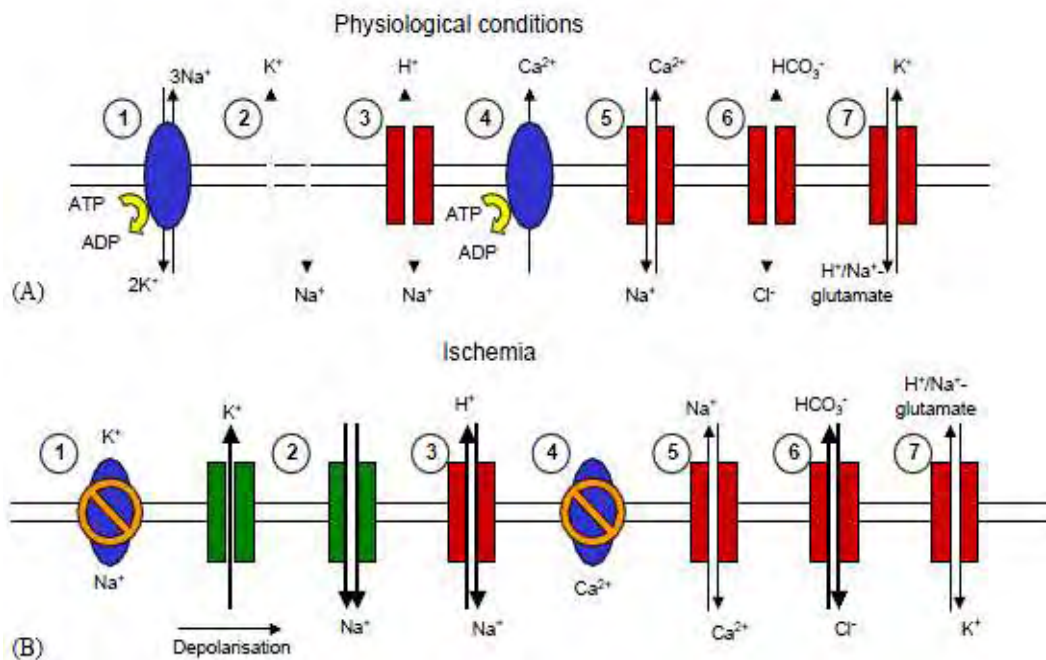
### **Νευροβιολογικοί Μηχανισμοί στην Ισχαιμία**

Η ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή προκαλεί μη αναστρέψιμες μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές, λόγω της εξάντλησης των ενεργειακών αποθεμάτων (ATP), η οποία με τη σειρά της προκύπτει από τη μείωση της γλυκόζης και του οξυγόνου. Ωστόσο, η παροδική απώλεια αυτών των υποστρωμάτων δεν προκαλεί άμεσα θάνατο (βλέπε προηγούμενη ενότητα). Ο κυτταρικός θάνατος είναι το αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων και προκαλείται όταν δεν υπάρχει πηγή ενέργειας στο κύτταρο (*Osborne και συν.*, 2004). Στο παρακάτω σχήμα (Εικ. 5) παρουσιάζονται οι μεταβολές στη λειτουργία των διαύλων στην μεμβράνη των νευρικών κυττάρων κατά την επίδραση της ισχαιμίας.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές αντλίες στις μεμβράνες, καθώς και διάλυοι ανταλλαγής ιόντων. Σε φυσιολογικές συνθήκες (Εικ. 5Α) η αντλία  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάση ανταλλάσει  $\text{Na}^+$  με  $\text{K}^+$ , τα οποία, ανάλογα με την ηλεκτροχημική τους βαθμίδωση, εκρέουν πίσω στο πλάσμα. Τα  $\text{Na}^+$  ανταλλάσσονται με χαμηλότερους ρυθμούς με πρωτόνια (p), με σκοπό να διατηρηθούν τα

επίπεδα του ενδοκυτταρικού pH σταθερά. Η  $\text{Ca}^{2+}$  αντλία χρησιμοποιεί το ATP για να μεταφέρει το  $\text{Ca}^{2+}$  αντίθετα από την ηλεκτροχημική του βαθμίδωση, ενώ ο διάυλος  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^{+}$  ανταλλάσει  $\text{Ca}^{2+}$  με  $\text{Na}^{+}$ . Ο διάυλος  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  ανταλλάσει με χαμηλούς ρυθμούς  $\text{HCO}_3^-$  και σε συντονισμό με τα  $\rho$  και τους μηχανισμούς επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών (μεταφοράς γλουταμικού) απομακρύνει τους νευροδιαβιβαστές από την σύναψη μετά τη διέγερση των προσυναπτικών υποδοχέων.

Μετά από ισχαιμική προσβολή του κυττάρου, η αντλία  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$  ATPάση (Εικ. 5β) και η αντλία  $\text{Ca}^{2+}$  σταματούν να λειτουργούν, λόγω έλλειψης του διαθέσιμου ATP. Αυτό προκαλεί διάνοιξη των διαύλων  $\text{Na}^{+}$  και  $\text{K}^{+}$ , αλλά και αντίστροφη ανταλλαγή  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{K}^{+}$ . Ακόμα γίνεται πρόσληψη νευροδιαβιβαστή. Τα  $\rho$  και τα  $\text{HCO}_3^-$  αποβάλλονται ραγδαία για να καταφέρει η μεμβράνη να διατηρήσει το αυξανόμενο ενδοκυτταρικό pH σε ομοιοστατικά επίπεδα. Αυτές οι διαδικασίες έχουν ως αποτέλεσμα την είσοδο περισσότερου  $\text{Na}^{+}$  και  $\text{Cl}^-$  υποχρεώνοντας μόρια νερού να ακολουθήσουν την οσμωτική βαθμίδωση και να εισέλθουν και αυτά στο κύτταρο. Έτσι, προκαλείται διόγκωση των κυττάρων και οίδημα (Osborne και συν., 2004).



Εικόνα 5: Μεταβολές στη λειτουργία των διαύλων της μεμβράνης των νευρικών κυττάρων λόγω της επίδρασης ισχαιμίας.



## Απελευθέρωση Νευροδιαβιβαστών στην Ισχαιμία

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών που απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο είναι πολύ χαμηλά. Αυτό οφείλεται αφενός στο ότι, οι νευρώνες δαπανούν την περισσότερη ενέργειά τους στη διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης τους και αφετέρου στο ότι τόσο τα νευρικά κύτταρα όσο και τα κύτταρα της γλοίας απομακρύνουν αποτελεσματικά τους νευροδιαβιβαστές από τη συναπτική σχισμή αμέσως μετά την απελευθέρωση τους. Όπως προαναφέραμε κατά τη διάρκεια της νευρωνικής ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση του εξωκυτταρίου γλουταμικού (*Louzada –Jounior και συν., 1992, Neal και συν., 1994*). Εκτός από το γλουταμικό οξύ, κατά την ισχαιμία απελευθερώνονται επίσης και άλλοι νευροδιαβιβαστές όπως το GABA, η γλυκίνη, η ντοπαμίνη, η ακετυλοχολίνη και η αδενοσίνη.

Κατά την επαναιμάτωση, τα αυξημένα επίπεδα νευροδιαβιβαστών του εξωκυτταρίου χώρου θα ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς τους και θα συμβάλλουν στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Οι ευαισθησία των νευρώνων που εδράζονται στα εσωτερικά στρώματα του αμφιβληστροειδούς, και συγκεκριμένα των γαγγλιακών κυττάρων, πιθανόν να οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητά τους σε ιοντοτροπικούς υποδοχείς γλουταμικού. Το γλουταμικό θα ενεργοποιήσει σε μεγάλο βαθμό αυτούς τους υποδοχείς προκαλώντας συνεχείς εκπολώσεις και τελικά κυτταρικό θάνατο (*Osborne και συν., 2004*)

Οι ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές, όπως το GABA, έχουν αντίθετη δράση, αφού θα έπρεπε να εκμηδενίσουν την δράση του γλουταμικού στους νευρώνες. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητά του να προκαλεί υπερπόλωση στις μεμβράνες, η οποία θα έπρεπε να εξουδετερώνει τις εκπολώσεις που προκαλεί το γλουταμικό (*Schwartz-Bloom και Sah, 2001*). Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών, θα έπρεπε να δρουν νευροπροστατευτικά στους νευρώνες που εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς (*Green και συν., 2000*). Αντίθετο αποτέλεσμα είχαν οι έρευνες σε αμφιβληστροειδή κότας, αφού η απενεργοποίηση και όχι η

ενεργοποίηση των υποδοχέων GABA/γλυκίνης επέφερε νευροπροστασία κατά την επιβολή της ισχαιμίας (*Chen και συν.*, 1999).

Το γενικό αποτέλεσμα της δράσης των διαφόρων νευροδιαβιβαστών κατά τη φάση της επαναιμάτωσης φαίνεται περίπλοκο και είναι πιθανό πως ο αριθμός και το είδος των διεγερτικών και των ανασταλτικών υποδοχέων να επηρεάζει την αντιμετώπιση της ισχαιμίας από το κύτταρο (βλέπε ενότητα «*επιδεκτικότητα των νευρώνων κατά την ισχαιμική προσβολή*»).

### **L-γλουταμικό Οξύ**

Το L-γλουταμινικό οξύ είναι υπεύθυνο για την κάθετη μεταφορά του οπτικού σήματος στον αμφιβληστροειδή. Η πρόσληψη, η απελευθέρωση και η δράση του γλουταμινικού οξέος και των αγωνιστών του πάνω στη δεύτερη τάξη νευρώνων του αμφιβληστροειδούς αποδεικνύουν ότι το γλουταμικό οξύ είναι ο νευροδιαβιβαστής που δρα στην πρώτη σύναψη του αμφιβληστροειδούς (*Nawy*, 1990, *Lasater*, 1984).

Οι δύο τύποι φωτούποδοχέων (ραβδία και κωνία), τα δίπολα κύτταρα και τα περισσότερα γαγγλιακά κύτταρα απελευθερώνουν γλουταμικό οξύ, το οποίο επάγει ή/και τροποποιεί τη δραστηριότητα των μετασυναπτικών νευρώνων είτε μεταβάλλοντας απευθείας την ιοντική διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, είτε ενεργοποιώντας ενδοκυττάρια συστήματα μέσω ιοντοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων γλουταμινικού (iGluRs και mGluRs). Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού διακρίνονται σε NMDA (N-methyl-d-aspartate) και μη-NMDA (AMPA και kainate). Οι NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί τόσο για το  $\text{Na}^+$  όσο και για το  $\text{Ca}^{2+}$  (*Yang*, 2004). Αντίθετα, οι μη-NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί στις περισσότερες περιπτώσεις από το  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ , αλλά όχι από το  $\text{Ca}^{2+}$ . Ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών σε φυσιολογικές συνθήκες αρνητικού δυναμικού μεμβράνης επιτρέπει στο  $\text{Na}^+$  να εισέλθει στο κύτταρο, προκαλώντας εκπόλωση (*Yang*, 2004).

### **Η επίδραση του γλουταμικού στο νευρικό ιστό**

Σε κυτταρικό επίπεδο, η ισχαιμική βλάβη του αμφιβληστροειδούς περιλαμβάνει εκπόλωση της μεμβράνης, εισροή ασβεστίου, διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης και οξειδωτικό στρες, τα οποία επάγονται από την ελάττωση της παροχής ενέργειας και την αύξηση της γλουταμινεργικής διέγερσης. Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή της παροχής οξυγόνου και γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή διαταράσσει αρχικά τον κυτταρικό μεταβολισμό. Καθώς τα επίπεδα της γλυκόλυσης και της φωσφορυλίωσης μειώνονται, μειώνονται και τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ATP, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης και την ομοιόσταση των ιόντων. Έτσι, ενεργοποιούνται τα μονοπάτια τα οποία τελικά προκαλούν κυτταρικό θάνατο (*Lipton, 1999*).

Μελέτες στον αμφιβληστροειδή κουνελιού έδειξαν πως η περισσότερη κατανάλωση οξυγόνου δαπανάται στις λειτουργικές διαδικασίες, με το 50% του ATP να χρησιμοποιείται για την μεταφορά του  $\text{Na}^+$  (*Quinones Hinojosa και συν., 1999*). Όταν μειώνεται το ενδοκυτταρικό ATP (ATPi), η δράση της  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPάσης είναι αυτή που επηρεάζεται περισσότερο (*Lipton, 1999*). Η αναστολή της δράσης της απορρυθμίζει το μεμβρανικό δυναμικό, τον κυτταρικό όγκο και την κλίση  $\text{Na}^+$  στο κύτταρο. Το κύριο αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η αναστολή της επαναπόλωσης των μεμβρανών των αξόνων. Ακολουθεί η διακοπή της τασεο-εξαρτώμενης  $\text{Mg}^{2+}$  αναστολής των NMDA υποδοχέων γλουταμικού, με αποτέλεσμα οι υποδοχείς αυτοί να ενεργοποιούνται ακόμα και όταν υπάρχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις γλουταμικού. Συνεπώς εντείνεται η εκπόλωση της μεμβράνης και η είσοδος  $\text{Ca}^{2+}$ . Ακόμα, ενεργοποιούνται οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού AMPA και οι καϊνικοί υποδοχείς γλουταμικού, προκαλώντας είσοροή  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}$  και νερού, το οποίο προκαλεί με τη σειρά του οίδημα και τελικά λύση του κυττάρου (*Lipton, 1999*).

Αξίζει να σημειωθεί πως όσο διαρκεί η ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή ενεργοποιούνται όλοι οι υποδοχείς λόγω των αυξημένων επιπέδων των αντίστοιχων συνδετών τους (π.χ. διεγερτικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης και ανασταλτικοί υποδοχείς GABA και γλυκίνης), γεγονός που οφείλεται στο

μόνιμο άνοιγμα των τασεοελεγχόμενων διαύλων  $Ca^{+2}$  (Lipton, 1999). Η αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$  αναστέλλει τον οξειδωτικό μεταβολισμό των μιτοχονδρίων ξεκινώντας ένα φαύλο κύκλο (De Flora και συν., 1998). Η σημασία της εκπόλωσης εξηγείται από το ότι οι υπερπολωμένοι νευρώνες είναι ανενεργοί κατά την ισχαιμία, αλλά δεν νεκρώνονται.. Μπορούν επίσης να ανακάμψουν γρήγορα κατά την επαναιμάτωση του ιστού (Vaegan και Millar, 1994).

### **Αίτια αυξημένης απελευθέρωσης- επαναπρόσληψης γλουταμικού**

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών στον εξωκυττάριο χώρο είναι πολύ χαμηλά. Αυτό προκύπτει επειδή τόσο οι νευρώνες όσο και τα νευρογλοιακά κύτταρα απομακρύνουν τους νευροδιαβιβαστές από τη συναπτική σχισμή όπου διαχέονται μετά από την απελευθέρωση τους (Osborne και συν., 2004). Αντίθετα, η ισχαιμία προκαλεί μαζική απελευθέρωση και αύξηση του εξωκυτταρίου γλουταμινικού, φαινόμενο το οποίο πιθανόν να ισχύει και κατά τη διάρκεια υπογλυκαιμίας (Burke, 1989).

Σύντομα μετά την έναρξη της ισχαιμίας η απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος γίνεται μέσω εξωκύττωσης. Η εξωκύττωση αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση των τάσεο-εξαρτώμενων διαύλων  $Ca^{2+}$ , η οποία με τη σειρά της προκύπτει από την εκπόλωση που προκαλεί η ισχαιμία. Ωστόσο, μετά από ένα χρονικό διάστημα τα ενεργειακά αποθέματα μειώνονται και το ενδοκυττάριο ATP είναι πάρα πολύ χαμηλό για να τροφοδοτήσει την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών μέσω εξωκύττωσης, οπότε η απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος γίνεται ανεξάρτητα από το ασβέστιο (Nishizawa, 2001).

Ο κύριος μηχανισμός για την  $Ca^{2+}$ -ανεξάρτητη απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος στον εξωκυττάριο χώρο θεωρείται πως είναι η ανάστροφη μεταφορά του γλουταμινικού οξέος. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από τους μεταφορείς του γλουταμινικού (glutamate transporters). Η απομάκρυνση του γλουταμινικού οξέος από τη συναπτική σχισμή και τον εξωκυττάριο χώρο

εξαρτάται από την επαναπρόσληψή του από τα κύτταρα, και έχει ως στόχο τη διατήρηση του εξωκυττάριου γλουταμινικού οξέος κάτω από τα νευροτοξικά επίπεδα. Η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού οξέος δεν απαιτεί ATP και εξαρτάται από τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  στην κυτταρική μεμβράνη καθώς και από τη μεταβολή του pH λόγω της εξόδου ανιόντων από το κύτταρο (*Billups, 1996*). Συγκεκριμένα, όταν η ισχαιμία μειώνει τον ανεφοδιασμό με ATP της αντλίας  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPάσης}$ , τα ιόντα  $\text{K}^+$  συσσωρεύονται στο εξωκυττάριο χώρο, εκπολώνοντας τα κύτταρα, και η διαφορά συγκέντρωσης του  $\text{Na}^+$  οδηγεί σε μείωση της επαναπρόσληψης του γλουταμινικού οξέος, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ο νευροδιαβιβαστής στον εξωκυττάριο χώρο (*Rossi, 2000*).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γλουταμινικό οξύ προσλαμβάνεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα, μεταβολίζεται από τη συνθετάση της γλουταμίνης (GS) και στη συνέχεια ανακυκλώνεται πίσω στο νευρωνικό σώμα (*Thoreson, 1999*). Η ισχαιμία ελαττώνει τα αποθέματα ATP των νευρογλοιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητα της GS και να παρεμποδίζεται η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού. Έχει βρεθεί ότι σε συνθήκες αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας, η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού από τα κύτταρα του Müller είναι σαφώς μειωμένη (*Napper, 1999, Barnett, 2001*). Καλά τεκμηριωμένες μελέτες έχουν, επίσης, αποδείξει ότι αυτή η ροή του γλουταμινικού προς τα νευρογλοιακά μπορεί να αναστραφεί λόγω αυξημένων επιπέδων ενδοκυττάριου γλουταμινικού ή  $\text{Na}^+$ , ή αυξημένων επιπέδων εξωκυττάριου  $\text{K}^+$ , συνηγορώντας για έναν πιθανό μηχανισμό μη κυστιδιακής απελευθέρωσης γλουταμινικού κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας (*Osborne και συν., 2004*).

Μια άλλη πιθανή πηγή γλουταμινικού οξέος στην ισχαιμία μπορεί να προέλθει άμεσα από τα αστροκύτταρα. Η είσοδος ασβέστιου στα αστροκύτταρα, όπως φαίνεται να συμβαίνει στην ισχαιμία (*Fern, 1998*) μπορεί να απελευθερώσει γλουταμινικό οξύ με ένα μηχανισμό διαμεσολαβούμενο από τις προσταγλαδίνες (*Bezzi, 1998*). Επιπλέον, η αύξηση του εξωκυττάριου  $\text{K}^+$  μέσω της ισχαιμίας προκαλεί οίδημα των αστροκυττάρων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος μέσω ενεργοποιηθέντων από το οίδημα ιοντικών διαύλων (*Kimelberg, 1995*).

## ***γ-Αμινοβουτυρικό Οξύ (GABA)***

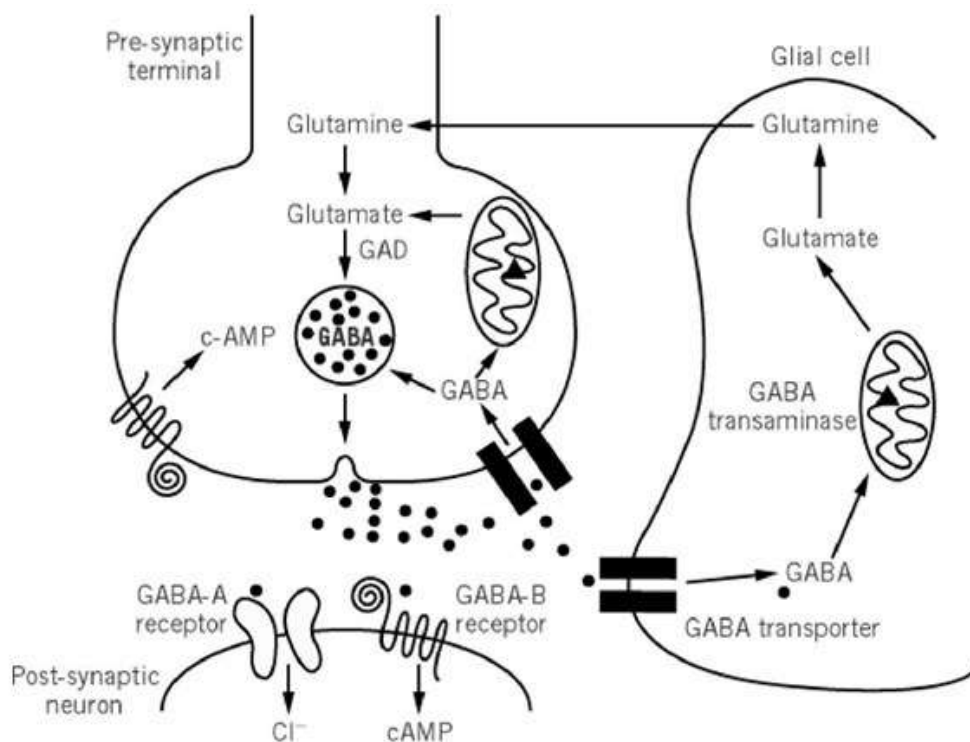
Το GABA είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες και κοκκιώδη κύτταρα του οσφρητικού βολβού). Απελευθερώνεται από τα βραχύινα κύτταρα, τα κύτταρα του Purkinje της παρεγκεφαλίδας και τα καλαθιοφόρα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας και του ιππόκαμπου (*Kandel και συν., 2000*). 20-50% των συνάψεων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) που χρησιμοποιούν το GABA ως νευροδιαβιβαστή, μεσολαβούν γρήγορες και αργές ανασταλτικές συναπτικές διαβιβάσεις (*Clarkson AN., 2011, Sieghart και συν., 1995*).

Το GABA συντίθεται από γλουταμικό οξύ με τη δραστηριότητα του ενζύμου δεκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD) και της βιταμίνης Β6, ως συνένζυμο. Η σύνθεσή του συνδέεται με τον κύκλο του Krebs. Με τον τρόπο αυτό, ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής δηλαδή το γλουταμικό οξύ μετατρέπεται στον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή του Κ.Ν.Σ. το GABA. Το GABA μεταβολίζεται από το ένζυμο GABA-τρανσαμινάση. Φάρμακα που δρουν ως αγωνιστές των GABA υποδοχέων ή αυξάνουν τη συγκέντρωσή του στο ΚΝΣ έχουν αγχολυτική, κατασταλτική και αντισπασμωδική δράση.

Το GABA ασκεί τη δράση του συνδεδεμένο με υποδοχείς που βρίσκονται είτε στην προσυναπτική είτε στη μετασυναπτική μεμβράνη (GABA<sub>A-C</sub>, Εικ. 6). Οι GABA<sub>A</sub> είναι οι περισσότερο συνήθεις και απαντώνται στο 40% των νευρώνων. Οι GABA<sub>A</sub> και οι GABA<sub>C</sub> είναι διάυλοι, ενώ οι GABA<sub>B</sub> είναι υποδοχείς συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G. Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς GABA<sub>A</sub> και οι GABA<sub>C</sub> με τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή επιτρέπουν τη μεταφορά φορτισμένων ιόντων μέσω του διαύλου που σχηματίζεται από το σύμπλεγμα του υποδοχέα. Εδώ οι υποδοχείς είναι διάυλοι ιόντων Cl<sup>-</sup> και με τη σύνδεση του GABA επιτρέπουν την είσοδο αρνητικά φορτισμένων ιόντων Cl<sup>-</sup> στο κύτταρο, οδηγώντας την κυτταρική μεμβράνη σε υπερπόλωση, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα δημιουργίας δυναμικού ενεργείας (*Kandel, 2000*). Οι βενζοδιαζεπίνες και τα περισσότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα ασκούν τη δράση τους στους υποδοχείς του GABA (*Page, 2000*).

Οι υποδοχείς GABA<sub>B</sub> ανήκουν στην κατηγορία των μεταβοτροπικών υποδοχέων. Με την μεσολάβηση G-πρωτεϊνών και συστημάτων δευτέρων αγγελιοφόρων ανοίγουν κανάλια K<sup>+</sup> από όπου θετικά φορτισμένα ιόντα καλίου εξέρχονται από το κύτταρο, οδηγώντας το δυναμικό της μεμβράνης πιο κοντά στο ισοδύναμο δυναμικό για το κάλιο, με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον οι GABA<sub>B</sub> υποδοχείς ελαττώνοντας την δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης, μειώνουν την αγωγιμότητα της κυτταρικής μεμβράνης στο ασβέστιο (Page, 2000).

Γενικά, έχει επικρατήσει η θεωρία ότι το γλουταμινικό είναι ο διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στην κάθετη οδό μεταφοράς του σήματος: φωτούποδοχείς → δίπολα κύτταρα → γαγγλιακά κύτταρα, ενώ οι νευρώνες της οριζόντιας οδού μετάδοσης του σήματος (οριζόντια και βραχύινα κύτταρα) απελευθερώνουν κυρίως GABA ή/και γλυκίνη.



Εικόνα 6: GABAεργική σύναψη

Όταν το GABA εισέρχεται στο κύτταρο, μετατρέπεται σε γλουταμινικό από την GABA-τρανσαμινάση. Λόγω της δράσης της GABA-τρανσαμινάσης, τα

κύτταρα του Müller περιέχουν πολύ χαμηλά επίπεδα (<100 nm) ενδοκυττάρου GABA που είναι μετά βίας ανιχνεύσιμο με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (Davanger, 1991). Η ανοσοδραστικότητα του GABA στα κύτταρα του Müller μπορεί να εντοπισθεί μόνο κάτω από παθολογικές καταστάσεις ή μετά από φαρμακολογική αναστολή της GABA-τρανσαμινάσης (Takeo-Goto, 2002). Η GABA-τρανσαμινάση εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Έχει βρεθεί ότι σε διαβητικούς και ισχαιμικούς αμφιβληστροειδείς αρουραίων, το GABA συσσωρεύεται γρήγορα στα κύτταρα του Müller (Napper, 2001) λόγω μείωσης της δραστικότητας της GABA-τρανσαμινάσης. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, τα επίπεδα ενέργειας στα κύτταρα του Müller επιτρέπουν την ενεργητική επαναπρόσληψη του GABA, αλλά δεν επαρκούν για να το μεταβολίσουν σε γλουταμίνη (Barnett 1995). Αυτή η ενδοκυτταρική συσσώρευση του GABA πιθανόν να επηρεάζει την επαναπρόσληψη του από τον εξωκυττάριο χώρο.



## Ισχαιμία και Διεγερτοτοξικότητα

Η διεγερτοτοξικότητα είναι μια παθολογική διαδικασία υπερβολικής διέγερσης των νευρώνων από διεγερτικούς νευροδιαβιβαστές, όπως το γλουταμικό. Αυτό συμβαίνει όταν υπερεκφράζονται οι υποδοχείς του γλουταμικού, όπως ο NMDA υποδοχέας του γλουταμικού και ο υποδοχέας AMPA. Σε αυτούς του υποδοχείς προσδένονται και άλλοι διεγερτικοί νευροδιαβιβαστές, όπως το NMDA και το καϊνικό οξύ. Η διεγερτοτοξικότητα επέρχεται με την είσοδο μεγάλης ποσότητας  $Ca^{2+}$  στο κύτταρο (*Manev και συν.*, 1989). Το  $Ca^{2+}$  λειτουργεί ως δεύτερος αγγελιοφόρος και ενεργοποιεί ένζυμα, όπως φωσφολιπάσες, ενδονουκλεάσες και πρωτεάσες, τα οποία είναι επιβλαβή για την ακεραιότητα του κυτταρικού περιεχομένου (κυτταροσκελετός, πλασματική μεμβράνη και DNA)

Η διεγερτοτοξικότητα μπορεί να επέλθει έπειτα από τον τραυματισμό του νωτιαίου μυελού, εγκεφαλικό, κρανιοεγκεφαλική κάκκωση, απώλεια της ακοής. Ακόμα, η διεγερτοτοξικότητα παρατηρείται και στις νευροεκφυλιστικές νόσους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Τέλος, η υπογλυκαιμία, η υποξία και η ισχαιμία μπορούν να προκαλέσουν εξεσημασμένη συνάθροιση του γλουταμινικού στους νευρώνες (*Kim και συν.*, 2002).

Τα διεγερτικά αμινοξέα φέρουν σημαντικό ρόλο στην ισχαιμική βλάβη του αμφιβληστροειδούς. Το γλουταμινικό, ο διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του αμφιβληστροειδούς, απελευθερώνεται από τους φωτοϋποδοχείς, τα γαγγλιακά και τα δίπολα κύτταρα, και μεσολαβεί στη μεταφορά του οπτικού ερεθίσματος από τον αμφιβληστροειδή στον εγκέφαλο (*Massej, 1990*). Ωστόσο, σε ισχαιμικά περιβάλλοντα, η αυξημένη απελευθέρωση του γλουταμινικού και η συσσώρευσή του στα εξωκυτταρικά διαμερίσματα έχει ως αποτέλεσμα τον νευρωνικό θάνατο. Η νευροτοξικότητα που προκαλείται από το γλουταμινικό, θεωρείται η ελλοχεύουσα αιτία για τις νευροπάθειες και τις νευροεκφυλιστικές νόσους του αμφιβληστροειδούς, όπως το γλαύκωμα (*Kaur και συν.*, 2008, *Dreyer, 1998*).

Το γλουταμινικό οξύ δρα του μέσω των ιοντοτροπικών (AMPA, NMDA, καϊνικό) υποδοχέων γλουταμινικού και των μεταβοτροπικών υποδοχέων (*Grönder και συν.*, 2001). Η νευροτοξική του δράση φαίνεται να ασκείται μέσω

των ιοντοτροπικών υποδοχέων (GluR, *Levy και συν.*, 1991). Οι NMDA υποδοχείς είναι σημαντικά διαπερατοί σε  $Ca^{+2}$ , επομένως, η ενεργοποίησή τους αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα  $Ca^{+2}$  (*Sucher και συν.*, 1997). Η περίσσεια του  $Ca^{+2}$  θεωρείται ο βασικός υπαίτιος για το θάνατο των νευρώνων κατά την ισχαιμία (*Sattler και Tyminiaski*, 2001). Πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση των ενζύμων απαιτούν ασβέστιο. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενζύμων βλαβερών για τα κυτταρικά συστατικά (πρωτεάσες, νουκλεάσες και λιπάσες), την παραγωγή ελεύθερων ριζών και την καταστροφή των μιτοχονδρίων. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων, οδηγεί στην εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων καθώς και την περαιτέρω παραγωγή ελεύθερων ριζών (*Dugan και συν.*, 1995). Η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων επιφέρει με τη σειρά της εκπόλωση των μεμβρανών των νευρώνων, με αποτέλεσμα την ολοένα και μεγαλύτερη είσοδο  $Ca^{+2}$  και συνεπώς την απελευθέρωση γλουταμικού (*Kaur και συν.*, 2008) και την περαιτέρω συσσώρευσή του (Εικ. 7).

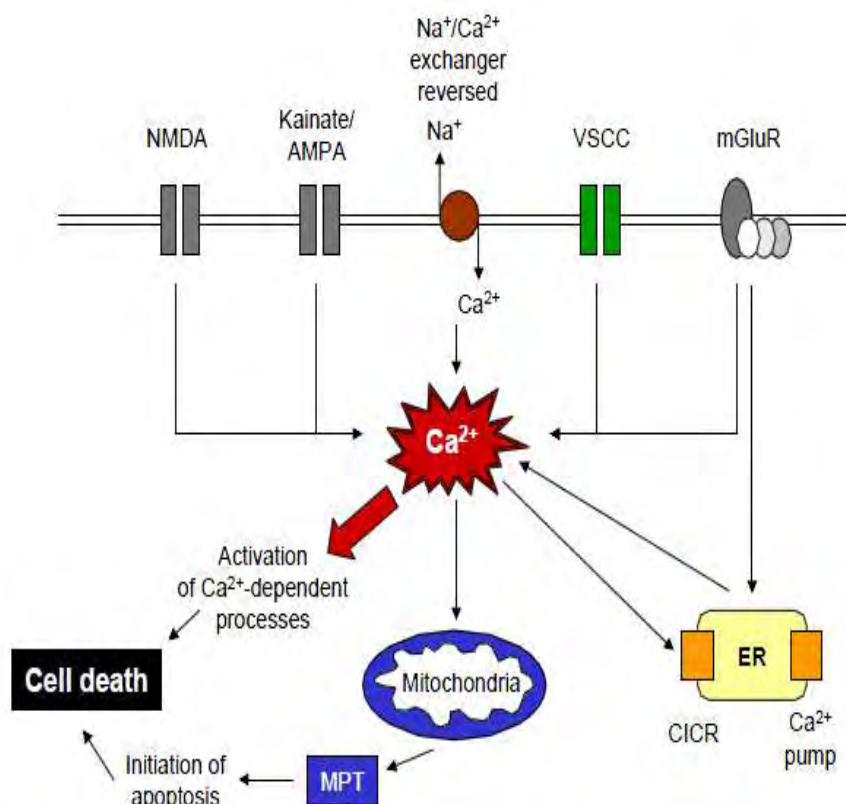
Η ενεργοποίηση των ιοντοτροπικών υποδοχέων γλουταμικού επάγει την είσοδο  $Na^{+}$  και  $Cl^{-}$ , προκαλώντας έτσι οσμωτικό οίδημα. Η δράση του γλουταμικού μέσω των NMDA υποδοχέων ενεργοποιεί την νευρωνική NOS (nNOS) και την παραγωγή NO (*Kiss και Vizi.*, 2001). Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού (GluR2/3 και NMDA) φαίνεται πως υπερεκφράζονται στα γαγγλιακά κύτταρα σε ισχαιμικές καταστάσεις (*Kaur και συν.*, 2006).

Το γλουταμικό επάγει τον κυτταρικό θάνατο ενεργοποιώντας την I ομάδα των mGluRs (*Allen και συν* 2001; *Hilton και συν* 2006). Η νευρωνική διέγερση και η διεγερτοτοξικότητα θεωρείται πως ενισχύεται από την ίδια ομάδα υποδοχέων πιθανότατα μέσω της αλληλεπίδρασης με τους NMDA υποδοχείς (*Kaur και συν.*, 2008).

Το γλουταμινικό συμμετέχει επίσης στην παραγωγή κυτοκινών φλεγμονής, όπως του TNF- $\alpha$  (*De και συν.*, 2005). Οι Noda και συν. το 2000 και οι Matute και συν. το 2001 έδειξαν πως η ενεργοποίηση των AMPA και των NMDA υποδοχέων αυξάνει σημαντικά την παραγωγή του TNF- $\alpha$  και της Ιντερλευκίνης-1 $\beta$ . Η συνεργασία των υποδοχέων του γλουταμικού και των

κυτοκινών πιθανόν να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην κυτταρική βλάβη (Kaur και συν., 2008).

Απόρροια της τοξικότητας του γλουταμικού είναι η μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης και το οξειδωτικό στρες. Όπως είναι γνωστό, η γλουταθειόνη αποτελεί βασικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό και προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες (Bobyh και συν., 2002).



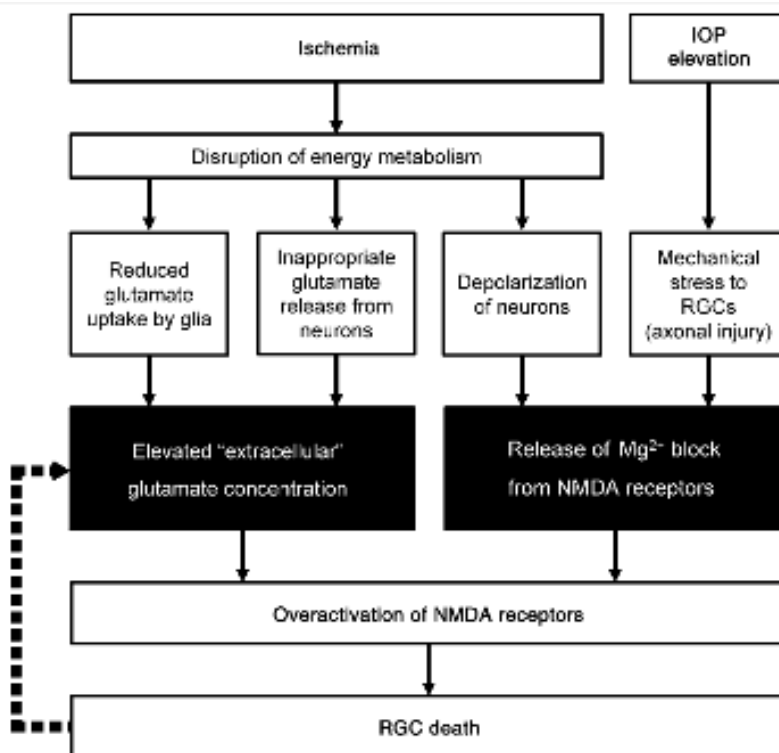
Εικόνα 7: Ο ρόλος του  $Ca^{2+}$  στο νευρωνικό θάνατο. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα  $Ca^{2+}$  αυξάνονται μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

1. νευροδιαβίβαση (π.χ. γλουταμικό),
2. κανάλια μετάδοσης σήματος (ιοντοτροπικοί υποδοχείς γλουταμικού τύπου NMDA ή AMPA/καϊνικό),
3. ανταλλαγή  $Ca^{2+}$ - $Na^{+}$ ,
4. δίαυλοι  $Ca^{2+}$  (τασεοελεγχόμενα κανάλια ασβεστίου, voltage sensitive calcium channels, VSCC)
5. διέγερση μεταβοτροπικών υποδοχέων (mGluRs), οι οποίοι απελευθερώνουν  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα

Τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα  $Ca^{2+}$  έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών ενζύμων που εξαρτώνται από το  $Ca^{2+}$  (πρωτεϊνική κινάση C, καλπαΐνες, συνθάση του NO). Τα ένζυμα προκαλούν αλλαγές που εμποδίζουν τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς και τη δομική ακεραιότητα των κυττάρων, επιφέροντας τελικά θάνατο. Ακόμα, όταν τα επίπεδα του  $Ca^{2+}$  είναι ανεβασμένα στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια προσπαθούν να το δεσμεύσουν. Ωστόσο, η ισχαιμία υπερισχύει έναντι αυτής της δράσης, προκαλώντας μεταβολές στη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων, την απελευθέρωση των παραγόντων θανάτου (π.χ. κυτόχρωμα c) και την έναρξη της απόπτωσης. (Osborne και συν., 2004)

Η διεγερτοτοξικότητα μπορεί να τερματιστεί εάν απομακρυνθεί η περίσσεια του γλουταμικού από τον εξωκυττάριο χώρο με ειδικούς μεταφορείς. Τέτοιοι μεταφορείς είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση του γλουταμινικού και στον αμφιβληστροειδή (*Danbolt.*, 2001). Έχει προταθεί πως η περίσσεια του γλουταμικού στον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να οφείλεται σε βλάβη στο σύστημα των μεταφορέων, όπως του μεταφορέα γλουταμινικού- ασπαρτικού (GLAST, GLummate ASpartate Transporter, *Harada και συν.*, 2007). Οι μεταφορείς αυτοί θεωρούνται απαραίτητοι για την αποτροπή της βλάβης που προκαλείται στον αμφιβληστροειδή από τη διεγερτοτοξικότητα αλλά και για τη σύνθεση της γλουταθειόνης. Η έλλειψή τους αναφέρεται από τον *Harada και συν* πως προκαλεί εκφυλισμό των γαγγλιακών κυττάρων (*Harada και συν.*, 2007).

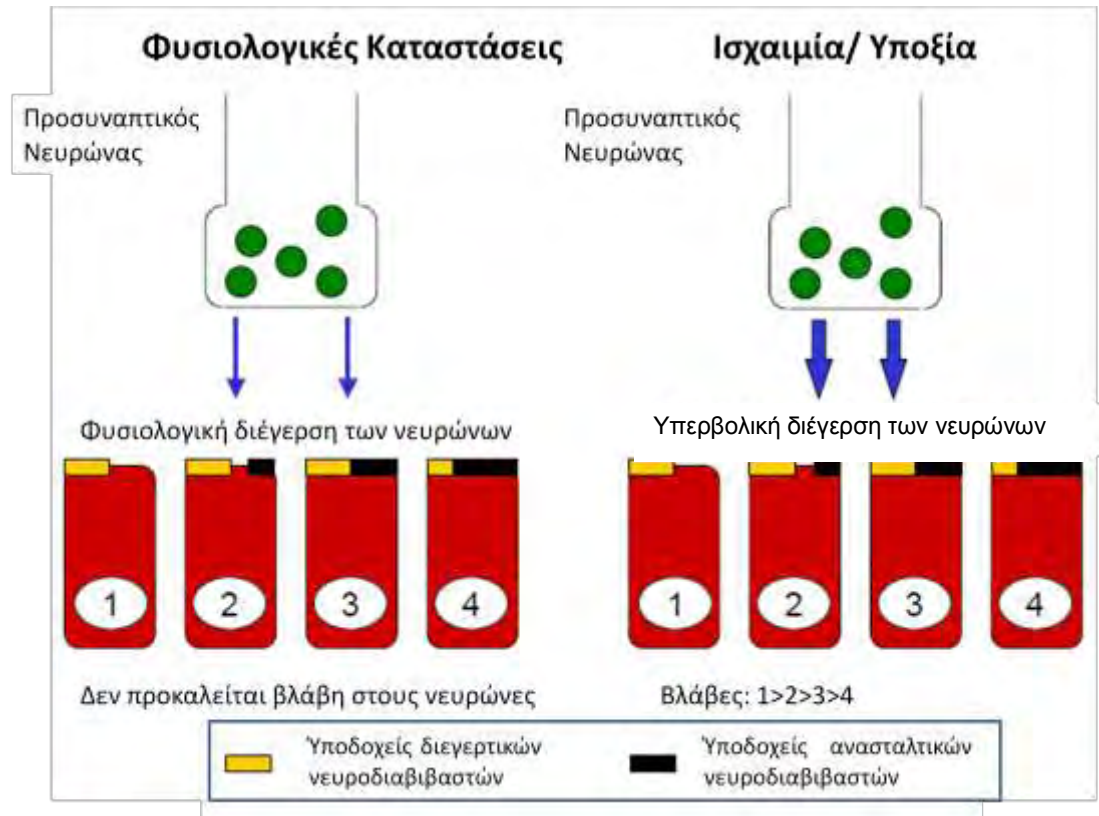
Είναι πλέον γνωστό, ότι η προκαλούμενη από την ισχαιμία νευροεκφύλιση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς αποτελεί κοινό τόπο στην ανάπτυξη αμφιβληστροειδοπαθειών όπως το γλαύκωμα, (ανασκοπήσεις: *Bautista*, 1999, *Kuehn και συν.*, 2005, *Lebrun-Julien και Di Polo* 2008, *Russo και συν.*, 2009), η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ, ανασκοπήσεις: *Barber*, 2003, *Imai και συν.*, 2009) και η Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχρής Κηλίδας (ΗΕΩ, ανασκόπηση: *Feigl*, 2007). Οι τρέχουσες θεραπείες για την αντιμετώπιση της ΔΑ και της ΗΕΩ αφορούν κυρίως στη θεραπεία των αγγειακών επιπλοκών. Επομένως, η καταπολέμηση της νευρωνικής απόπτωσης αποτελεί ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο και η εύρεση ουσιών που θα παρέχουν νευροπροστασία στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς θα συμβάλει στην προστασία της υψηλής οπτικής οξύτητας και της όρασης των ασθενών με ισχαιμικές αμφιβληστροειδοπάθειες.



Εικόνα 8: Θεωρία διεγερτοτοξικότητας στο γλαύκωμα (Seki 2008). Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για την παθογένεια του γλαυκώματος (αγγειακή και μηχανική θεωρία), οι οποίες πιθανόν να συνδυάζονται με διεγερτοτοξικότητα μέσω των NMDA υποδοχέων. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η ελάττωση των αποθεμάτων ενέργειας οδηγεί σε αναστολή της επαναπρόσληψης του γλουταμινικού από τα κύτταρα της γλοίας και σε υπέρμετρη απελευθέρωσή του. Λόγω της χαμηλής παροχής ενέργειας, οι νευρώνες χάνουν την ικανότητα της ιοντικής ομοιόστασης και εκπολώνονται. Αυτή η μεταβολή στο δυναμικό απομακρύνει το  $Mg^{2+}$  που υπό φυσιολογικές συνθήκες «μπλοκάρει» διαύλους σχετιζόμενους με NMDA υποδοχείς. Επίσης, η συμπίεση των νευραξόνων των γαγγλιακών κυττάρων στο σκληραίο πέταλο μπορεί να διακόψει το «μπλοκ» του  $Mg^{2+}$ , και η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση μπορεί να προκαλέσει παθολογικά αυξημένη ενεργοποίηση διαύλων σχετιζόμενων με NMDA υποδοχείς. Είναι σημαντικό, ότι είτε η αυξημένη εξωκυττάρια συγκέντρωση γλουταμινικού είτε η διακοπή του «μπλοκ»  $Mg^{2+}$  σε φυσιολογικά επίπεδα γλουταμινικού μπορούν να προκαλέσουν την υπέρμετρη ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA. Με άλλα λόγια, η διεγερτοτοξικότητα μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στο γλαύκωμα ακόμη και ελλείψει της αυξημένης συγκέντρωσης εξωκυττάρου γλουταμινικού εφόσον το «μπλοκ»  $Mg^{2+}$  των διαύλων που σχετίζονται με NMDA υποδοχείς έχει διακοπεί. Το γλουταμινικό που διαρρέει από σοβαρά προσβεβλημένα ή νεκρά γαγγλιακά και νευρογλοιακά κύτταρα πιθανόν να συμβάλει στο δευτερογενή θάνατο των γειτονικών γαγγλιακών κυττάρων μέσω υπέρμετρης ενεργοποίησης των υποδοχέων NMDA (διάστικτο βέλος).

## Επιδεκτικότητα των νευρώνων κατά την ισχαιμική προσβολή

Το εάν και το πότε θα αρχίσει η βλάβη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας εξαρτάται από το ισοζύγιο των διεγερτικών και των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών που απελευθερώνονται προσυναπτικά.



Εικ. 12: Η σπουδαιότητα της ισορροπίας ανάμεσα στους υποδοχείς διεγερτικών και ανασταλτικών υποδοχέων στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς. Σε φυσιολογικές συνθήκες η ισορροπία αυτή δεν έχει σημασία, αφού η κυτταρική λειτουργία δεν επηρεάζεται. Όταν, όμως, ο νευρώνας βρίσκεται σε ισχαιμικό ή υποξικό περιβάλλον, η επιβίωσή του θα εξαρτηθεί από το συνολική αναλογία ανασταλτικών/ διεγερτικών υποδοχέων στις συναπτικές απολήξεις. Στην εικόνα, η επιδεκτικότητα των νευρώνων στην ισχαιμική προσβολή ακολουθεί τη σειρά 1>2>3>4, αφού η σχετική αναλογία των ανασταλτικών υποδοχέων αυξάνεται κατ'αυτή τη σειρά.

Η ποσότητα και το είδος των νευροδιαβιβαστών που προσλαμβάνονται από κάθε κύτταρο είναι σημαντικός, αφού μεγάλη ποσότητα γλουταμινικού θα καταστήσει το νευρώνα πιο επιρρεπή στη διεγερτοτοξικότητα και συνεπώς στην ισχαιμία. Ωστόσο, το πόσο θα επηρεαστεί κάθε νευρώνας εξαρτάται από το αν η παρατήρηση γίνεται *in vivo* και *in vitro*. Αυτό συμβαίνει, επειδή στην ισχαιμία (με ή χωρίς επαναιμάτωση) τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών στον διακυτταρικό χώρο (γλουταμικό και GABA στην περίπτωση του αμφιβληστροειδούς) είναι αυξημένα και τα κύτταρα που επηρεάζονται

περισσότερο από αυτούς θα είναι και πιο επιρρεπή στην ισχαιμία (*Kalloniatis, 1995; Osborne και συν., 1999d*). Ο βαθμός της εκπόλωσης εξαρτάται από την ποιότητα και το συνδυασμό των διεγερτικών (και ιδιαίτερα του γλουταμικού) και των ανασταλτικών (ιδιαίτερα του GABA) υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών που εισέρχονται στο κύτταρο (Εικ. 12). Άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν στην αντιμετώπιση των νευρώνων κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας είναι η ικανότητα των νευροδιαβιβαστών να ρυθμίζουν το ενδοκυτταρικό  $Ca^{2+}$ , το εξωκυτταρικό pH και η ικανότητα του κυττάρου να αποβάλλει τις ελεύθερες ρίζες (*Chun και συν., 1999*).

### **Η ανθεκτικότητα του αμφιβληστροειδούς στην ισχαιμία**

Ο αμφιβληστροειδής προέρχεται από μια προεκβολή του διεγκέφαλου και συνεπώς έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τον εγκέφαλο. Η σημαντική τους διαφορά ωστόσο, είναι η μεγάλη ανθεκτικότητα που επιδεικνύει ο αμφιβληστροειδής στην ισχαιμία σε σύγκριση με τον υπόλοιπο εγκέφαλο, αφού επιβιώνει για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Για παράδειγμα, σε περίπτωση απόφραξης της κεντρικής αρτηρίας, ο αμφιβληστροειδής μπορεί να επιβιώσει για 100 λεπτά, χωρίς καμιά μόνιμη βλάβη. Αντίθετα, κάποια λεπτά εγκεφαλικής ισχαιμίας προκαλούν εκτεταμένη βλάβη και μπορούν να καταλήξουν σε θάνατο (*Hayreh και Weingerist, 1980*).

Αξιοσημείωτη είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένες περιοχές του αμφιβληστροειδή. Οι εξωτερικές περιοχές είναι λιγότερο επιρρεπείς σε βλάβες, σε αντίθεση με τις εσωτερικές, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης της νευρογλοβίνης. Η νευρογλοβίνη είναι αναπνευστική πρωτεΐνη που εντοπίζεται συγκεκριμένα στους νευρώνες και έχει μικρή συγγένεια με την αιμοσφαιρίνη και τη μυοσφαιρίνη. Ο ρόλος της είναι η δέσμευσή το οξυγόνου και η απόδοσή του σε ισχαιμικούς και υποξικούς ιστούς., Συνεπώς, οι φωτοϋποδοχείς, που φέρουν 100 φορές περισσότερη νευρογλοβίνη από τον εγκέφαλο, είναι οι περισσότερο ανθεκτικοί, σε σύγκριση και με τον υπόλοιπο εγκέφαλο, αλλά και με τις υπόλοιπες περιοχές του αμφιβληστροειδούς (*Schmidt και συν., 2003; Osborne και Larsen., 1996*). Μια άλλη πιθανή αιτία για το φαινόμενο αυτό είναι η υψηλή πυκνότητα του εσωτερικού στρώματος

των μιτοχονδρίων των φωτοϋποδοχέων. Όπως είναι γνωστό, το στρώμα αυτό διατηρείται σε χαμηλό  $pO_2$ . Επομένως, μπορεί να διατηρηθεί η ακεραιότητα των μιτοχονδρίων σε υποξικές-ισχαιμικές καταστάσεις και άρα να συνεχιστεί η παροχή ενέργειας προς το κύτταρο (*Osborne και συν.*, 2004).

Τέλος, η μεγάλη ανθεκτικότητα των φωτοϋποδοχέων στην ισχαιμία επηρεάζεται από την ικανότητα προσαρμογής τους στο φως. Συνεπώς, οι φωτοϋποδοχείς που είναι προσαρμοσμένοι στο φως είναι λιγότερο ευαίσθητοι και επανέρχονται ταχύτερα από αυτούς που έχουν προσαρμοστεί σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού, αφού τόσο η κατανάλωση οξυγόνου, όσο και οι μεταβολικές ανάγκες των πρώτων, είναι πολύ μικρότερες. Τα ραβδία, επομένως, είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ισχαιμία από ότι τα κωνία, επειδή τα κωνία είναι πιο αποτελεσματικά στη ρύθμιση των αλλαγών του  $Ca^{+2}$ , ωστόσο, από τη στιγμή που θα επηρεαστούν τα κωνία δεν μπορούν να επανέλθουν με την ίδια ταχύτητα στην αρχική τους κατάσταση σε σχέση με τα ραβδία (*Osborne και συν.*, 2004).

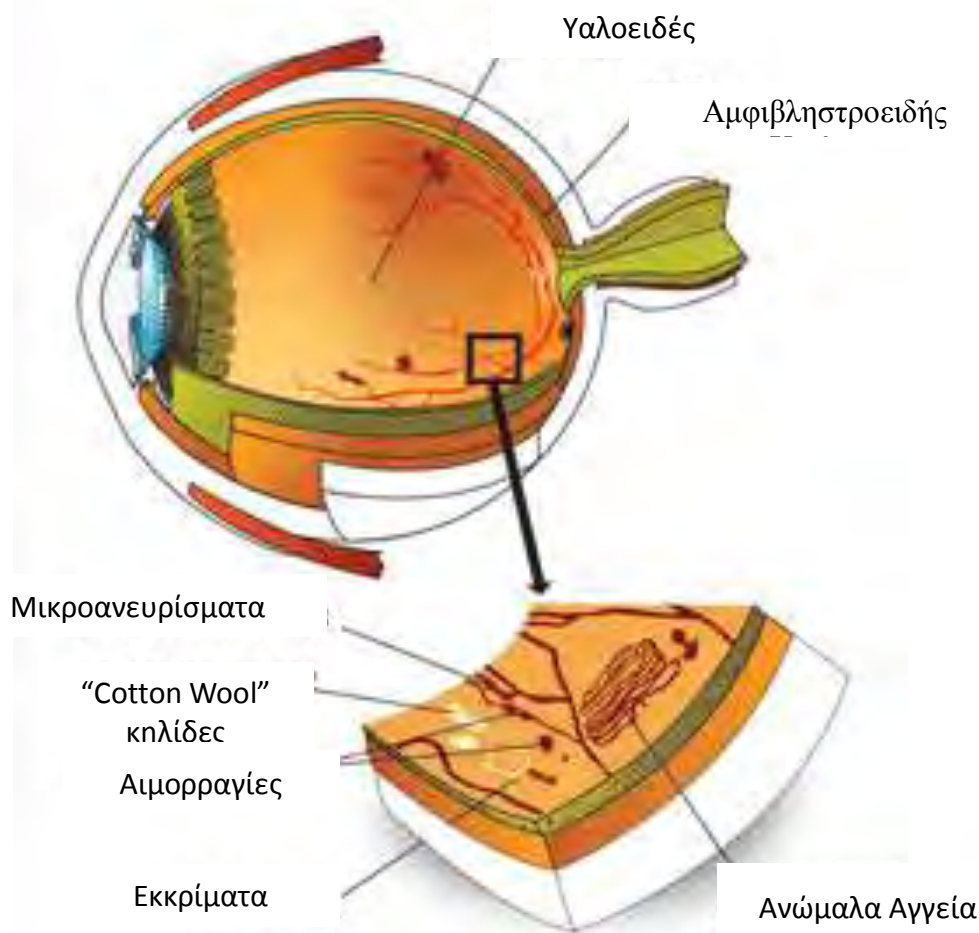
Τόσο τα γαγγλιακά, όσο και τα βραχύινα κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα στην ισχαιμία. Τα γαγγλιακά κύτταρα συγκεκριμένα, δεν επιβιώνουν ενώ τα βραχύινα εμφανίζουν σημαντική ευαισθησία τόσο στην ισχαιμία, όσο και στη διεγερτοτοξικότητα που επάγεται από το γλουταμικό οξύ (*Akayama και συν.*, 2002, *Goto και συν.*, 2002, *Fletcher και Kalloniatis*, 1997). Μορφολογικά, βιοχημικά και ανοσοϊστοχημικά στοιχεία δείχνουν ότι δεν είναι όλα τα βραχύινα κύτταρα εξίσου ευαίσθητα στην ισχαιμία ή στη διεγερτοτοξικότητα, και πιο συγκεκριμένα δεν είναι όλα τα GABAεργικά βραχύινα κύτταρα εξίσου ευαίσθητα στην ισχαιμία (*Osborne και Herrera*, 1994).



## Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ), είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη επιπλοκή της νόσου του διαβήτη (diabetes mellitus). Η ΔΑ επηρεάζει τα αγγεία του αμφιβληστροειδούς και αποτελεί σημαντική αιτία τύφλωσης στην παραγωγική ηλικία στις βιομηχανοποιημένες χώρες. Η ΔΑ εμφανίζεται στο 90% των ατόμων με διαβήτη τύπου I (ινσουλινο-εξαρτώμενος) και στο 65% των ατόμων με διαβήτη τύπου II (μη εξαρτώμενος από ινσουλίνη). Διαβητικοί ασθενείς με διάρκεια νόσου πάνω από 10 χρόνια έχουν πιθανότητα να αναπτύξουν ΔΑ σε αναλογία 75%. Η συχνότητα εμφάνιση της ΔΑ αναμένεται να αυξηθεί παράλληλα με την παγκόσμια αύξηση του διαβήτη τύπου II και υπολογίζεται ότι θα φτάσει από τα 150 εκατομμύρια άτομα το 2000 στα 300 εκατομμύρια άτομα ως το 2025 (*Zimmet και συν., 2001*).

Η ΔΑ μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια: τη μη παραγωγική (ή μη πολλαπλασιαστική) ΔΑ και την παραγωγική (ή πολλαπλασιαστική) ΔΑ. Η μη πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από μικροανευρύσματα και μικρές αιμορραγίες, που αν δεν εμφανιστούν στην περιοχή της ωχρής κηλίδας δεν προκαλούν βλάβες στην όραση. Η πολλαπλασιαστική μορφή της νόσου, από την άλλη, είναι αποτέλεσμα μιας πιο εκτεταμένης ισχαιμικής κατάστασης και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων στην επιφάνεια του ιστού ή του οπτικού δίσκου και αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες. Τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία μπορεί να διαρρηχθούν και να εμφανιστεί αιμορραγία στο υαλώδες σώμα η οποία συνοδεύεται από ίωση (σχηματισμός ινώδους συνδετικού ιστού σε περίσσεια) και αποκόλληση του αμφιβληστροειδή. Το διαβητικό οίδημα της ωχρής κηλίδας (diabetic macular edema, DME) είναι, ένα ακόμα από τα επακόλουθα σύμπτωμα του διαβήτη και χαρακτηρίζεται από αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και εναπόθεση σκληρών υπολειμμάτων στο κέντρο του αμφιβληστροειδή (*Bringmann και συν., 2004*). Το DME είναι κύρια αιτία απώλειας της όρασης στους ασθενείς με διαβήτη τύπου II (*Cuilla και συν., 2003, Porta και Allione, 2004, Pemp και Schmetterer, 2008, Aiello, 2008*).



Εικόνα 13: Οι χαρακτηριστικές αλλαγές που συμβαίνουν στον αμφιβληστροειδή χιτώνα κατά την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (<http://www.uspharmacist.com/content/c/27875/>).

Πέρα από τις παρατηρούμενες αγγειακές αλλαγές στην περίπτωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι πρόκειται για μια νευροεκφυλιστική νόσο του οφθαλμού (για ανασκόπηση βλ. Barber, 2003), η οποία οδηγεί σε λειτουργικές αλλαγές στην όραση πριν και ανεξάρτητα από τον ανώμαλο σχηματισμό νέων αγγείων (Lieth και συν., 2000). Αυτές οι αλλαγές έχουν άμεσες συνέπειες στους νευρώνες του αμφιβληστροειδή και καταλήγουν σε απόπτωση. Η ομάδα του Barber το 1998 χρησιμοποιώντας το μοντέλο της στρεπτοζοτοκίνης για επαγωγή διαβήτη τύπου I σε αρουραίους παρατήρησε αύξηση στα αποπτωτικά νευρικά και/ή γλοιακά κύτταρα, αλλά όχι και αλλαγές

σε επίπεδο αγγειακών κυττάρων (*Barber και συν.*, 1998). Επίσης, στην ίδια μελέτη σε αμφιβληστροειδείς διαβητικών ασθενών παρατήρησαν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα δεν περιορίζονταν μόνο στις περιοχές με αγγειακές βλάβες. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα αυτά έδειξαν ότι η αμφιβληστροειδική απόπτωση είναι μια γενικευμένη απόκριση των νευρώνων του ιστού στην περίπτωση του διαβήτη.

## Σκοπός

Το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν:

α) η *ex vivo* μελέτη της διαφορικής επίδρασης της ισχαιμίας, της υποξίας και της υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στις στιβάδες του αμφιβληστροειδή αρουραίου.

β) η μελέτη της επίδρασης του διαβήτη τύπου I στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση (απελευθέρωση-επαναπρόσληψη) κατά την πρώτη ώρα μετά την έναρξη της ισχαιμικής προσβολής και μετά από την επαναδιάχυσή τους.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## Πειραματόζωα



Οι μελέτες διεξήχθησαν σε αμφιβληστροειδείς που απομονώθηκαν από αρσενικούς αρουραίους Wistar. Οι αρουραίοι διατηρούνται σε φυσιολογικές συνθήκες φωτός (12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι) με ελεύθερη συνεχή προσφορά τροφής και νερού. Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματοζώων ήταν σύμφωνες με τον Ελληνικό νόμο (Π.Δ.160/91) και την αρχή της ARVO σχετικά με τη χρησιμοποίηση ζώων στην έρευνα της Οφθαλμολογίας. Για τα πειράματα μελέτης της επίδρασης ισχαιμίας ανοξίας και υπογλυκαιμίας (βλ. παρακάτω) στην έκφραση GABA στον αμφιβληστροειδή επιλέχθηκαν ζώα ηλικίας 4-6 εβδομάδων ενώ για τα πειράματα μελέτης της επίδρασης του διαβήτη στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση χρησιμοποιήθηκαν ζώα στα οποία είχε προκληθεί διαβήτης με τη χρήση στρεπτοζοτοκίνης και ίδιας ηλικίας ζώα ελέγχου. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και στη συνέχεια αποκεφαλίστηκαν. Μετά την εξόρυξή τους, οι οφθαλμοί διατηρούνται σε συνεχώς οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (arti-CSF) στον πάγο. Στη συνέχεια από τους βολβούς απομακρύνονται προσεκτικά -παρουσία φωτός- ο κερατοειδής χιτώνας, ο φακός, το υαλώδες σώμα και ο σκληρός χιτώνας, ενώ ο αμφιβληστροειδής χωρίζεται σε δύο ίσα -κατά το δυνατό- μέρη.

### **Πρόκληση διαβήτη τύπου I (μοντέλο στρεπτοζοτοκίνης)**

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει δύο ομάδες πειραματόζων (διαβητικά ζώα και ζώα ελέγχου αντίστοιχης ηλικίας). Μετά από νηστεία 4-6 ωρών, στην πρώτη ομάδα πειραματοζών χορηγήθηκε εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή ένεση στρεπτοζοτοκίνης (45mg/kg διαλυμένης σε κιτρικό οξύ, ενώ στη δεύτερη ομάδα (ομάδα μάρτυρας) χορηγήθηκε κιτρικό οξύ. Τα ζώα θεωρούνται διαβητικά εφόσον 48ώρες μετά τη χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης είχαν επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα > μεγαλύτερα από 250mg/dl. Τα ζώα θανατώθηκαν 3 μήνες μετά την πρόκληση διαβήτη.

### **Μελέτες Απελευθέρωσης Νευροδιαβιβαστών**

#### **Προετοιμασία Ιστών**

Οι απομονωθέντες ιστοί επωάζονται σε διαρκώς οξυγονωμένο (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) διάλυμα arti-CSF που περιέχει 200nM [<sup>3</sup>H] D-Ασπαρτικού οξέος ή [<sup>3</sup>H]GABA για 45min στους 37°C. Το [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικό οξύ αποτελεί έναν κατάλληλο αντικαταστάτη του γλουταμινικού οξέος στις μελέτες απελευθέρωσης γλουταμινικού, διότι: α) μπορεί να προσληφθεί από τις νευρωνικές απολήξεις των κυττάρων μέσω των μεταφορέων γλουταμινικού (glutamate transporters), και β) δεν υπόκειται σε μεταβολισμό (Pocock & Nicholls, 1998).

Το διάλυμα arti-CSF αποτελείται από τα παρακάτω: 118mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11mM γλυκόζης, 1.3mM CaCl<sub>2</sub>, pH =7.4.

#### **Υπερδιάχυση και Συλλογή Δειγμάτων**

Μετά από την επώαση των 45min, οι αμφιβληστροειδείς (από διαβητικά ζώα και ζώα ελέγχου) ξεπλένονται με arti-CSF και τοποθετούνται στα δοχεία του συστήματος υπερδιάχυσης. Αρχικά, οι ιστοί διαχέονται για μία ώρα (ροή arti-CSF: 1.2 ml/min θερμοκρασία 37°C) υπό οξυγόνωση (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Μετά το πέρας της 1 ώρας συλλέγουμε δείγματα ανά 2min. Η επίδραση της ισχαιμίας (arti-CSF 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> με αντικατάσταση της γλυκόζης από

σουκρόζη) ξεκινά 26min μετά την έναρξη συλλογής δειγμάτων (t=0) και διαρκεί συνολικά 72min. Στη συνέχεια οι ιστοί διαχύθηκαν με φυσιολογικό arti-CSF (arti-CSF 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>/γλυκόζης) για 42min ακόμη.

### **Μελέτες Επαναπρόσληψης**

Για τις μελέτες επαναπρόσληψης, οι απομονωθέντες ιστοί επωάστηκαν σε διαρκώς οξυγονωμένο (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) διάλυμα arti-CSF που περιέχει 40nM [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος ή [<sup>3</sup>H]GABA για 45min στους 37°C υπό φυσιολογικές συνθήκες, ή συνθήκες ισχαιμίας. Κατόπιν οι ιστοί ξεπλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα arti-CSF και διαλύονται σε Soluene-350.

### **Ανάλυση Αποτελεσμάτων Πειραμάτων Απελευθέρωσης και Επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών**

Στο τέλος των πειραμάτων υπερδιάχυσης και επαναπρόσληψης οι ιστοί διαλύθηκαν σε 0.5ml Soluene-350. Στη συνέχεια μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε τρίτιο τόσο των ιστών όσο και των δειγμάτων υπερδιάχυσης με τη προσθήκη 2ml διαλύματος Ultima Gold/δείγμα και τη βοήθεια μετρητή β-ακτινοβολίας. Η εκροή τριτίου ανά δείγμα υπερδιάχυσης υπολογίστηκε με βάση την ποσότητα που υπήρχε στον ιστό πριν από τη συλλογή του δείγματος (fractional rate; min<sup>-1</sup>). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπερδιάχυσης εκφράστηκαν ως ποσοστό εκροής σε σχέση με τα δείγματα πριν την έναρξη της ισχαιμίας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επαναπρόσληψης εκφράστηκαν σε fmol ραδιενεργού ανά mg πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα και των δύο τύπων πειραμάτων αναλύθηκαν στατιστικά με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Έγινε ανάλυση διακύμανσης μονής και διπλής κατεύθυνσης (One-way και Two-way ANOVA) και διόρθωση κατά Bonferroni, ώστε να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στην απελευθέρωση και επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών μεταξύ των ιστών ελέγχου και των ιστών από τα διαβητικά ζώα (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001).

## Ανοσοϊστοχημικές μελέτες

### Παρασκευή ιστών

Οι οφθαλμοί αρουραίων αμέσως μετά την εξόρυξή τους εμβυθίστηκαν σε συνεχώς οξυγονωμένο anti-CSF στον πάγο. Στη συνέχεια ο οπίσθιος πόλος των οφθαλμών. Οι απομονωμένοι ιστοί στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα δοχεία του συστήματος υπερδιάχυσης (ροή anti-CSF: 0.5 ml/min θερμοκρασία 37°C). Αρχικά, όλοι οι ιστοί διαχύθηκαν για μία ώρα υπό οξυγόνωση (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) ενώ για την επόμενη μία ώρα προκλήθηκε μεταβολική προσβολή ((i) ισχαιμία: anti-CSF 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> με αντικατάσταση της γλυκόζης από σουκρόζη), (ii) υποξία: anti-CSF 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> και (iii) υπογλυκαιμία: anti-CSF 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> με αντικατάσταση της γλυκόζης από σουκρόζη).

Στη συνέχεια οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν στους 4°C για μια ώρα σε διάλυμα, 1M PB, 4% παραφολμαδεύδης. Μετά την μονιμοποίησή τους οι ιστοί επώαστηκαν για 16-18 ώρες σε διάλυμα 0.1 M PB, 30% σουκρόζης στους 4°C για την επίτευξη κρυοπροστασίας ενώ στη συνέχεια, έγινε ταχεία ψύξη των ιστών με εμβύθισή τους για ένα λεπτό σε ισοπεντάνιο στους -45°C. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, κόπηκαν κάθετες τομές πάχους 10μm σε κρουτόμο και τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες που διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

### Μελέτες ανοσοφθορισμού

Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις οι ιστοί ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (0.1M Tris-HCl, και 0.9% NaCl, pH 7.4) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε διάλυμα 0.1M TBS το οποίο περιείχε 3.3% φυσιολογικό ορό αίγας (NGS) για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμησης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, οι ιστοί ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επώαστηκαν, για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με το πρώτο αντίσωμα (αντίσωμα κουνελιού έναντι του GABA) το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα 0.1M TBS το οποίο περιείχε 0.5% NGS και 0.3% Triton X-100. Μετά από αυτό, οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές με



0.1M TBS και επωάσθησαν για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη [αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού, σε συγκέντρωση 1:150]. Οι τομές αφού ξεπλύθηκαν με TBS, καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού (fluorescent mounting medium) και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

### **Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας και Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων**

Η παρατήρηση των ιστών έγινε σε συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75; Oberkochen, Germany]. Η επεξεργασία των φωτογραφιών (RGB εικόνες) έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα MacBiotronics Image J (Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2004) κατά πανομοιότυπο τρόπο.

Συγκριμένα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση πιθανών πειραματικών διαφοροποιήσεων, το φόντο (BG, background, περιοχή της φωτογραφίας γύρω από τον ιστό) κάθε εικόνας αφαιρέθηκε από την περιοχή που μας ενδιέφερε (ROI, region of interest) δηλαδή τον ίδιο τον ιστό. Το BG επιλέχθηκε με το εργαλείο επιλογής ελεύθερης σχεδίασης (freehand selection tool) και αφαιρέθηκε από την ROI μέσω της εντολής “Plugins/ROI/BG Subtraction from ROI”. Στη συνέχεια, καταγράφηκε η μέση ένταση σήματος κάθε εμβρύου με την εκτέλεση της εντολής “Analyze/Histogram”. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές της έντασης του σήματος αποτελούν ακέραιους αριθμούς μιας κλίμακας με τιμές από 0 έως 255. Το 0 αντιστοιχεί στην ελάχιστη, ενώ το 255 στη μέγιστη, φωτεινότητα που μπορεί να έχει η ένταση του σήματος.

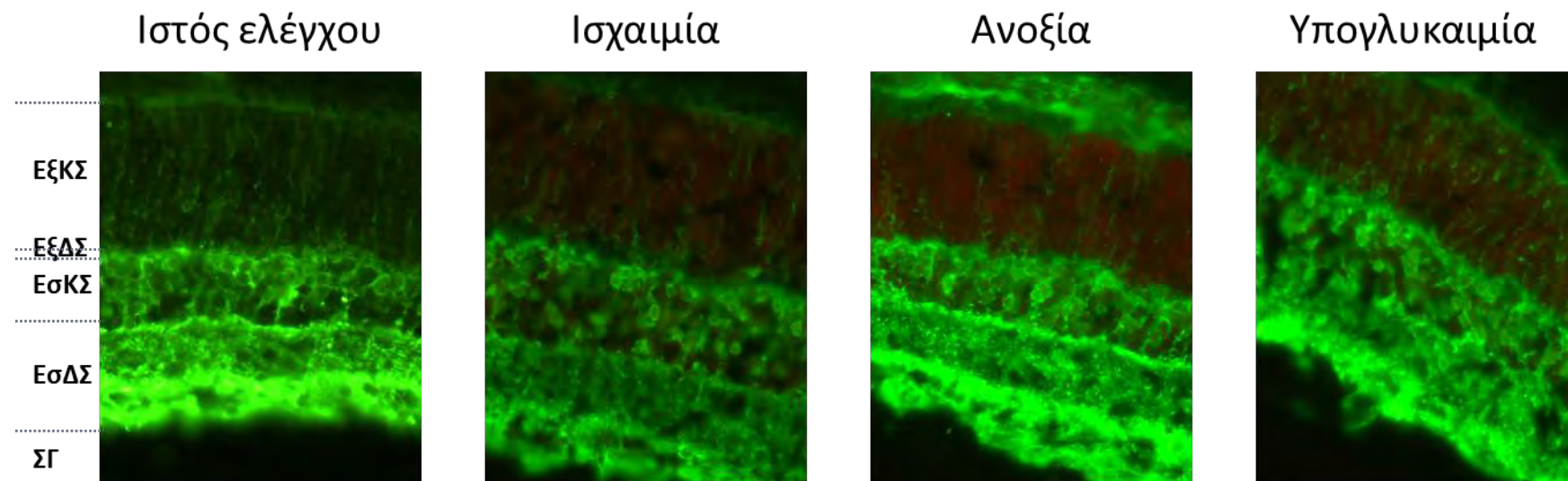
Όλα τα πειραματικά δεδομένα εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα [mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean)]. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism έκδοση 4.00 για Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Έγινε ανάλυση διακύμανσης μονής και διπλής κατεύθυνσης ώστε να διαπιστωθεί αν οι διαφορές που παρατηρήσαμε στα πειράματά μας οφείλονται στο χρόνο έκθεσης των ιστών εκάστοτε μεταβολικό στρες, σε διαφοροποιήσεις μεταξύ ιστών ελέγχουν και ιστών που είχαν υποβληθεί σε κάποια μεταβολική προσβολή (ή ζώων ελέγχουν και διαβητικών ζώων) ή και στα δύο. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

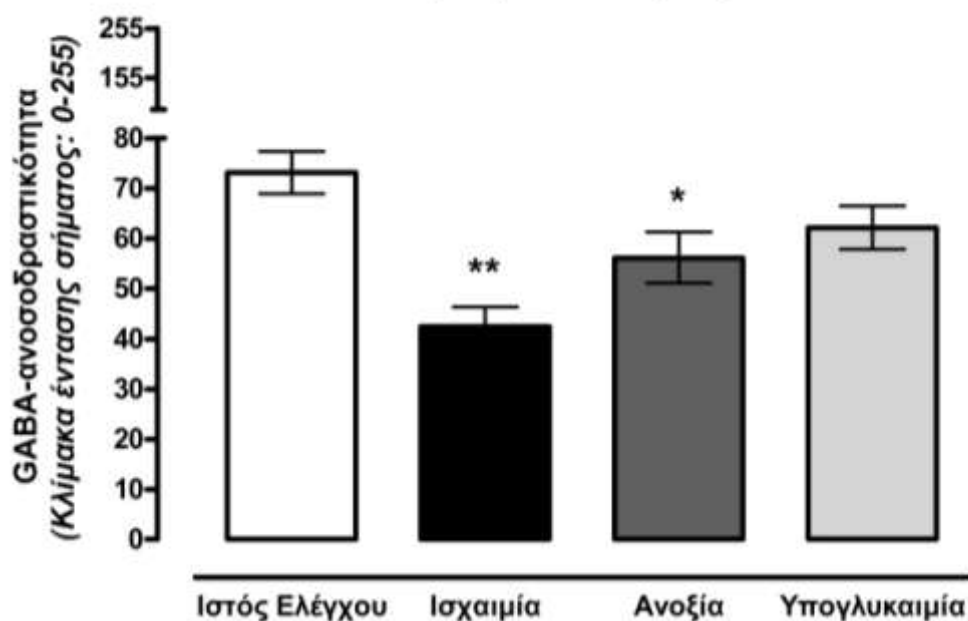
### **Διαφορική επίδραση ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η ισχαιμία και σε μικρότερο βαθμό η ανοξία προκαλεί μείωση της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα του αμφιβληστροειδούς αρουραίου (Εικ. 14, 15). Η έκφραση του GABA στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα του αμφιβληστροειδή δεν επηρεάζεται από τις μεταβολικές αυτές προσβολές (Εικόνα 16). Η υπογλυκαιμία δεν έχει καμία επίδραση στην ανοσοδραστικότητα του GABA στον ιστό (Εικ. 14-16).



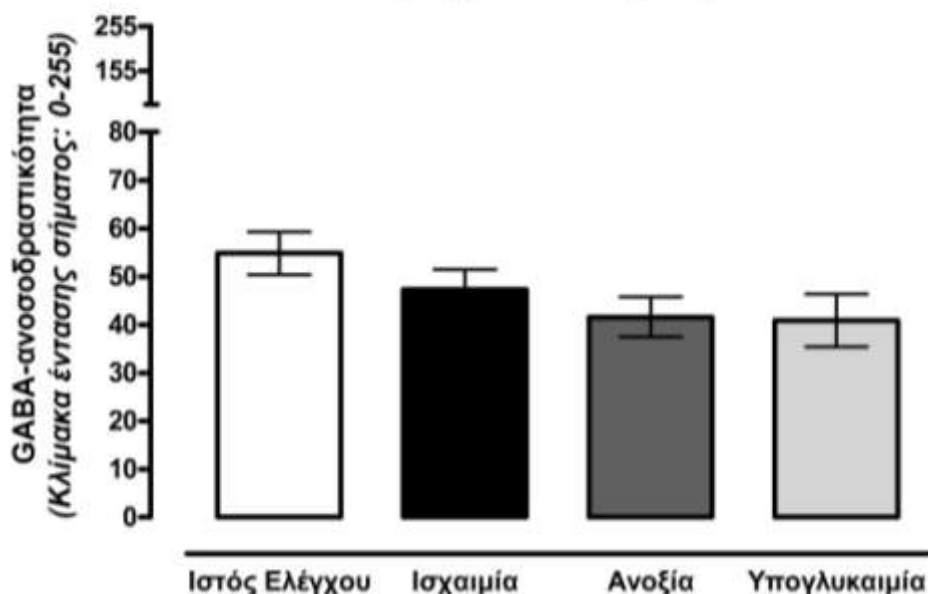
Εικόνα 14: Διαφορική επίδραση ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα του αμφιβληστροειδή αρουραίου

### Εσωτερική Δικτυωτή Σπβάδα



Εικόνα 15: Διαφορική επίδραση ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στην εσωτερική δικτυωτή σπβάδα του αμφιβληστροειδή αρουραίου

### Εσωτερική Κοκκώδης Σπβάδα

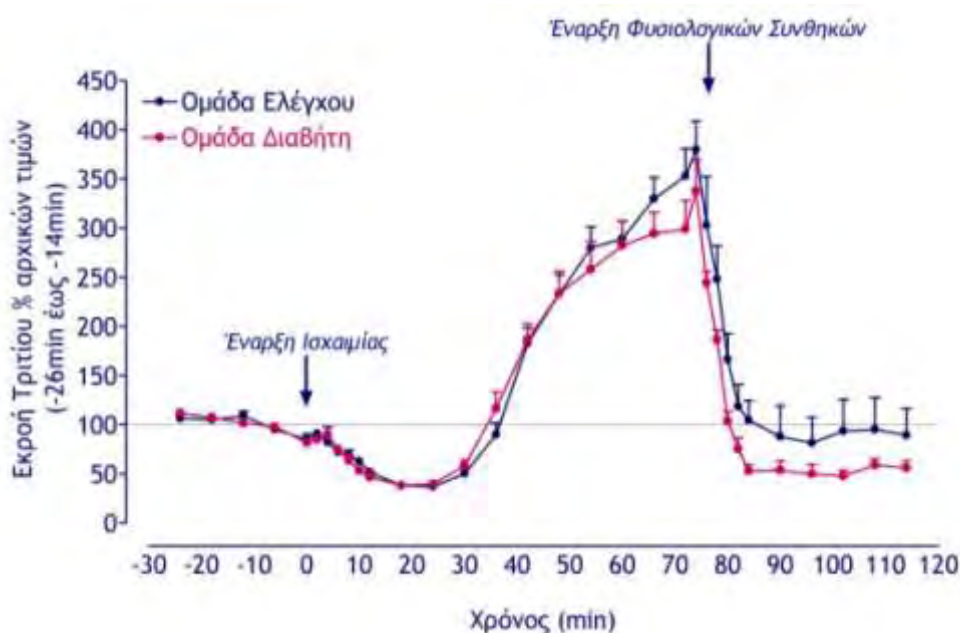


Εικόνα 16: Διαφορική επίδραση ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στην GABAεργική ανοσοδραστικότητα στην εσωτερική κοκκώδη σπβάδα του αμφιβληστροειδή αρουραίου

## Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην απελευθέρωση [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης

Βρέθηκε ότι στον αμφιβληστροειδή τόσο των διαβητικών όσο και των αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών ζώων η ισχαιμία προκαλεί αρχική μείωση της απελευθέρωσης του [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος η οποία φτάνει ως και  $-36.99 \pm 3.77\%$  (ομάδα ελέγχου) και  $39.61 \pm 1.63\%$  (διαβητικά ζώα) της βασικής. Η μείωση αυτή ακολουθείται από αύξηση της απελευθέρωσης του ραδιενεργού 30min μετά την εφαρμογή της, η οποία φτάνει 74 λεπτά αργότερα στο  $379.42 \pm 29.48\%$  (ομάδα ελέγχου) και  $337.59 \pm 31.77\%$  (διαβητικά ζώα) της βασικής (Εικόνα 17).

Επιστροφή στις φυσιολογικές συνθήκες (επαναδιάχυση με arti-CSF με 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> και 11mM γλυκόζη) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της απελευθέρωσης [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος η οποία επιστρέφει μέσα σε 10 λεπτά στα αρχικά βασικά επίπεδα απελευθέρωσης (Εικόνα 17).

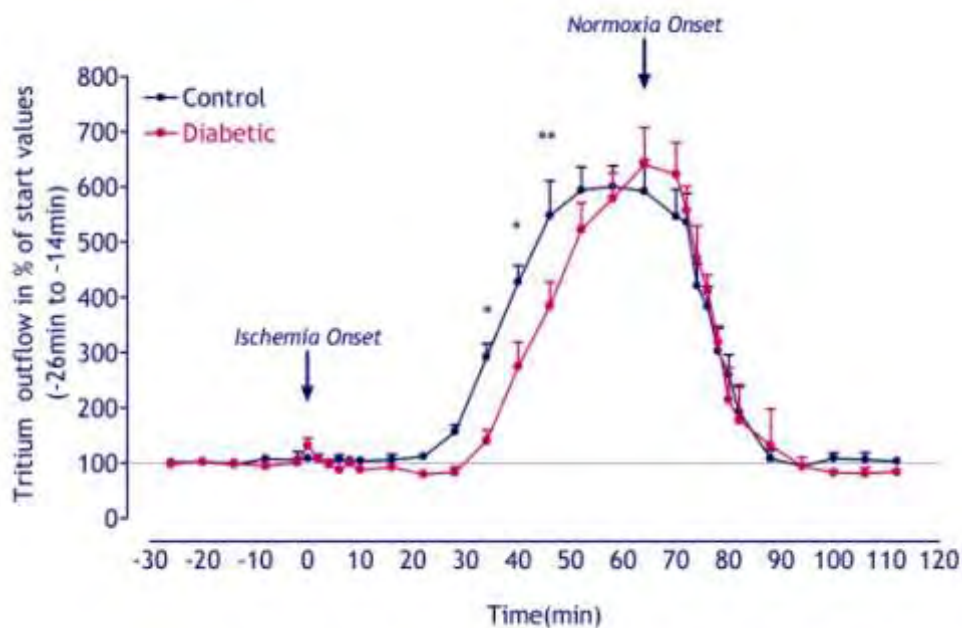


Εικόνα 17: Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην απελευθέρωση [<sup>3</sup>H]D-ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης

## Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην απελευθέρωση [<sup>3</sup>H]GABA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης

Βρέθηκε ότι στον αμφιβληστροειδή τόσο των διαβητικών όσο και των αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών ζώων η ισχαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης [<sup>3</sup>H]GABA η οποία φτάνει 66 λεπτά αργότερα στο  $591.93 \pm 57.06\%$  (ομάδα ελέγχου) και  $639.90 \pm 67.73\%$  (διαβητικά ζώα) της βασικής. Διαπιστώνεται ωστόσο ότι η αύξηση αυτή της απελευθέρωσης του ραδιενεργού εμφανίζεται με στατιστικώς σημαντική χρονοκαθυστέρηση στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών έναντι αυτού των αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών ζώων (Εικόνα 18).

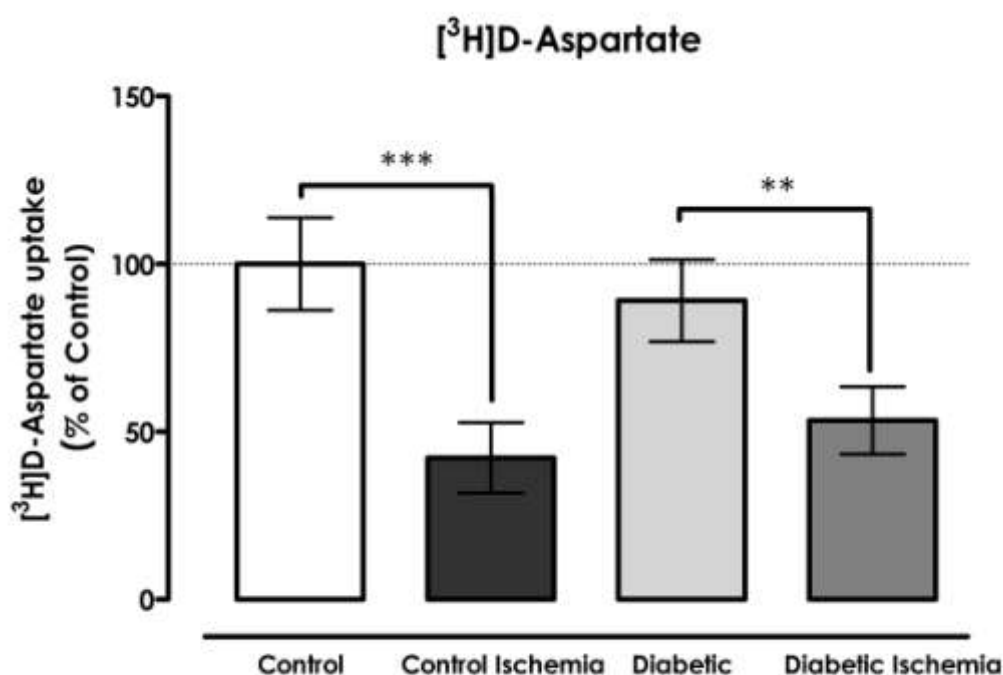
Όπως και στην περίπτωση της απελευθέρωσης του [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος επιστροφή στις φυσιολογικές συνθήκες είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της απελευθέρωσης [<sup>3</sup>H]GABA η οποία επιστρέφει μέσα σε 14 λεπτά στα αρχικά βασικά επίπεδα απελευθέρωσης (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην απελευθέρωση [<sup>3</sup>H]GABA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας/επαναδιάχυσης

## Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην επαναπρόσληψη [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας

Βρέθηκε ότι στον αμφιβληστροειδή τόσο των διαβητικών όσο και των αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών ζώων η ισχαιμία προκαλεί στατιστικώς σημαντική μείωση της πρόσληψης του [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος. Δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ διαβητικών και φυσιολογικών ζώων τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες πρόσληψης του ραδιενεργού όσο και υπό συνθήκες ισχαιμίας (Εικόνα 19).

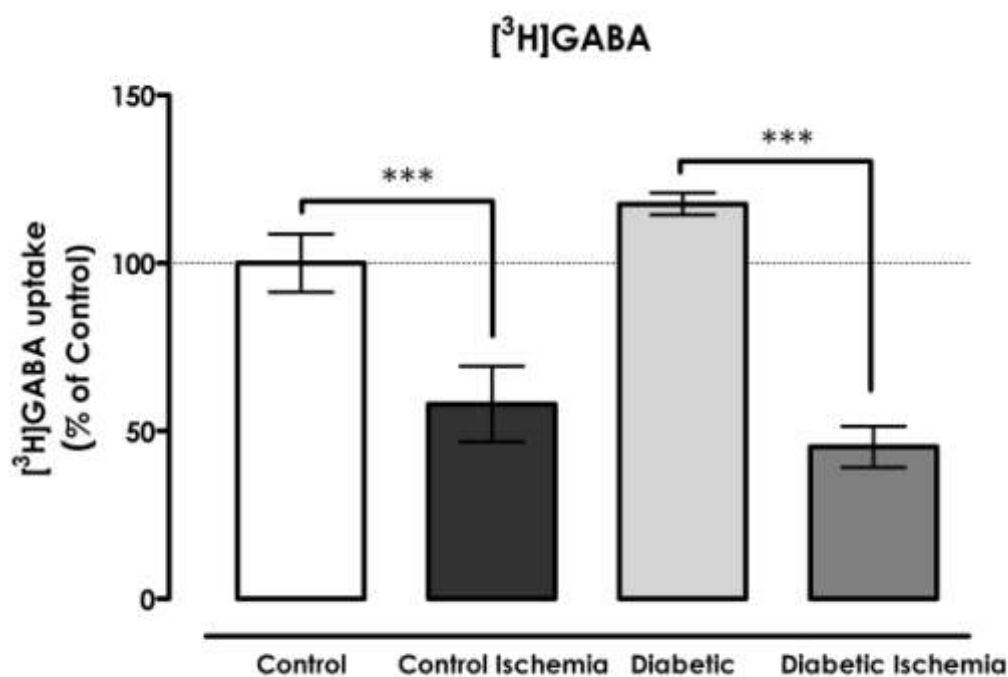


Εικόνα 19: Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην επαναπρόσληψη [<sup>3</sup>H]D-Ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας



## Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην επαναπρόσληψη [<sup>3</sup>H]GABA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας

Βρέθηκε ότι στον αμφιβληστροειδή τόσο των διαβητικών όσο και των αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών ζώων η ισχαιμία προκαλεί στατιστικώς σημαντική μείωση της πρόσληψης του [<sup>3</sup>H]GABA. Δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ διαβητικών και φυσιολογικών ζώων τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες πρόσληψης του ραδιενεργού όσο και υπό συνθήκες ισχαιμίας (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Επίδραση του διαβήτη τύπου I στην επαναπρόσληψη [<sup>3</sup>H]GABA από τον αμφιβληστροειδή αρουραίου υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες ισχαιμίας

## Συζήτηση

Στην ισχαιμία παρατηρείται ανισορροπία μεταξύ των ενεργειακών απαιτήσεων ενός ιστού και της παροχής ενεργειακών υποστρωμάτων σε αυτόν, εξαιτίας της μερικής ή της ολικής απώλειας της αιματικής ροής. Σε κυτταρικό επίπεδο η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς προκαλεί έναν αυτόνευροτοξικό καταστροφικό καταρράκτη στον οποίο εμπλέκονται η νευρωνική εκπόλωση, η εισροή ασβεστίου και το οξειδωτικό στρες. Κατά τη διάρκεια της νευρωνικής ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση της εξωκύττωσης γλουταμικού οξέος (διεγερτοτοξικότητα), με αποτέλεσμα την υπερβολική διέγερση των μετασυναπτικών νευρώνων και την επαγωγή μονοπατιών που συχνά καταλήγουν στον κυτταρικό θάνατο. Ακόμα, κατά την ισχαιμική προσβολή παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση και άλλων νευροδιαβιβαστών (π.χ. GABA, γλυκίνη, και ακετυλοχολίνη).

Η ισχαιμία αποτελεί κοινό τόπο των παθήσεων του ΚΝΣ, μεταξύ των οποίων και παθήσεων του αμφιβληστροειδούς, όπως το γλαύκωμα και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια αποτελεί σημαντική αιτία τύφλωσης στον εκβιομηχανοποιημένο κόσμο και θεωρείται η πιο σημαντική επιπλοκή της νόσου του διαβήτη, αφού θα εμφανιστεί στην πλειοψηφία των διαβητικών ασθενών. Όταν ενυπάρχει στην πολλαπλασιαστική της μορφή χαρακτηρίζεται μια εκτεταμένη ισχαιμική κατάσταση η οποία μπορεί να προκαλέσει ακόμα και την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων στην επιφάνεια του ιστού. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη διαφορετική επίδραση μεταβολικών προσβολών στο μοντέλο της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.

Όπως προαναφέρθηκε, τα GABAεργικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς είναι αυτά που συμμετέχουν στο οριζόντιο μονοπάτι μεταβίβασης της οπτικής πληροφορίας, τα βραχύινα, δηλαδή, και τα οριζόντια. Τα κύτταρα αυτά επιδεικνύουν και τη μεγαλύτερη ευαισθησία κατά την ισχαιμική προσβολή, μια και έχει διαπιστωθεί πως είναι τα πρώτα κύτταρα που νεκρώνονται (Osborne και συν., 2004). Έχοντας υπ' όψιν πως το GABA αποτελεί σημαντικό ισχαιμικό δείκτη, θελήσαμε να μετρήσουμε τη μεταβολή της

ανοσοδραστικότητας αυτού του νευροδιαβιβαστή στις εκάστοτε στιβάδες του αμφιβληστροειδούς μετά από ισχαιμική, ανοξική και υπογλυκαιμική προσβολή. Αρχικά παρατηρήσαμε μια πτώση του σήματος στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα κατά την ισχαιμία. Για να επιβεβαιώσουμε τα ευρήματά μας κάναμε ανάλυση εικόνας και διαπιστώσαμε πως η ανοσοδραστικότητα του GABA μειώνεται σημαντικά έπειτα από ισχαιμική, αλλά και έπειτα από ανοξική προσβολή. Ακόμα, παρατηρήσαμε πως η ανοσοδραστικότητα του GABA δεν μεταβάλλεται στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα σε καμία μεταβολική προσβολή, η οποία αποτελεί τη στιβάδα των βραχύνων κυττάρων. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως στο χρόνο που διήρκησε το πείραμά μας (1 ώρα), δεν παρατηρήθηκε ανακίνηση και πλήρες άδειασμα των αποθηκών GABA.

Σε ότι αφορά την πιθανή επίδραση του διαβήτη στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είναι γνωστό ότι επιβολή βραχυχρόνιας *in vitro* υπεργλυκαιμίας προκαλεί μικρή μείωση της γλουταμινικής και GABAεργικής νευροδιαβίβασης στον αμφιβληστροειδή (μείωση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών). Επίσης, είναι γνωστό ότι πέρα από τις αγγειακές αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, κατά την εξέλιξη της ασθένειας αυτής εμφανίζονται και λειτουργικές αλλαγές στην όραση οι οποίες (1) έχουν άμεσες συνέπειες στους νευρώνες του αμφιβληστροειδή (απόπτωση) και (2) εμφανίζονται πριν και ανεξάρτητα από τον ανώμαλο σχηματισμό νέων αγγείων στον ιστό (Lieth και συν., 2000).

Έτσι, σε μια προσπάθεια να διερευνήσουμε τις πιθανές συνέπειες της μακροχρόνιας υπεργλυκαιμίας (επιβολή διαβήτη για 3 μήνες) στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση (απελευθέρωση και επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών) μελετήσαμε σε διαβητικά και αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικά ζώα (1) την επίδραση της ισχαιμίας/επαναδιαχυσης (επαναιμάτωσης) στην απελευθέρωση [<sup>3</sup>H]D-ασπαρτικού οξέος και [<sup>3</sup>H]GABA καθώς επίσης και (2) την επίδραση της ισχαιμίας στην πρόσληψη (επαναπρόσληψη) αυτών των νευροδιαβιβαστών.

Με βάση τα αποτελέσματα μας, στα φυσιολογικά ζώα η ισχαιμία προκαλεί εξεσημασμένη αύξηση της απελευθέρωσης [<sup>3</sup>H]D-ασπαρτικού οξέος και [<sup>3</sup>H]GABA καθώς και μείωση της πρόσληψης αυτών των νευροδιαβιβαστών ενώ η επαναδιάχυση των ιστών με φυσιολογικό διάλυμα μειώνει τα επίπεδα απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών επαναφέροντας τα στα βασικά επίπεδα. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαμε και στα διαβητικά ζώα σε ότι αφορά την πρόσληψη και απελευθέρωση [<sup>3</sup>H]D-ασπαρτικού οξέος καθώς επίσης και την πρόσληψη [<sup>3</sup>H]GABA. Διαπιστώθηκε ωστόσο ότι, η αύξηση της απελευθέρωσης του [<sup>3</sup>H]GABA ως απάντηση στην ισχαιμία εμφανίζει μια στατιστικώς σημαντική χρονοκαυστέρηση στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών έναντι αυτής των αντίστοιχης ηλικίας φυσιολογικών ζώων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο διαβήτης επηρεάζει την αμφιβληστροειδική GABAεργική νευροδιαβίβαση.

Ο ρόλος του GABA (σημαντικότερος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του Κ.Ν.Σ) στην παθογένεια της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές όπως το GABA, πιθανά ακυρώνουν τη νευροτοξική δράση του γλουταμινικού οξέος (διεγερτοτοξικότητα) η οποία προκαλείται από την ισχαιμία μια και προκαλούν υπερπόλωση των νευρώνων η οποία αναιρεί την εκπολωτική δράση του γλουταμινικού (Schwartz-Bloom και Sah, 2001). Η καθυστερημένη απελευθέρωση GABA που διαπιστώσαμε κατά την επιβολή ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών έναντι των φυσιολογικών ζώων ίσως αποτελεί ένδειξη των λειτουργικών αλλαγών που παρατηρούνται στην όραση των διαβητικών και οι οποίες όπως προαναφέραμε (1) έχουν άμεσες συνέπειες στους νευρώνες του αμφιβληστροειδή (απόπτωση) και (2) εμφανίζονται πριν και ανεξάρτητα από τον ανώμαλο σχηματισμό νέων αγγείων στον ιστό (Lieth και συν., 2000).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, τα αποτελέσματα μας σχετικά με την απελευθέρωση γλουταμινικού και GABA σε διαβητικά ζώα έρχονται σε συμφωνία με αυτά του Baptista και των συνεργατών του (2011). Συγκεκριμένα, οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι η K<sup>+</sup>-εξαρτώμενη απελευθέρωση των δύο αυτών νευροδιαβιβαστών από τον αμφιβληστροειδή διαβητικών ζώων 8 εβδομάδων δεν διαφοροποιείται στην περίπτωση του

γλουταμινικού ενώ είναι χαμηλότερη στην περίπτωση του GABA σε σχέση με ζώα ελέγχου.

Αντίθετα, οι Santiago και συν. (2006), διαπίστωσαν ότι η πρόκληση διαβήτη σε επιμύες μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης, οδηγεί σε αύξηση της  $K^+$ -εξαρτώμενης απελευθέρωσης [ $^3H$ ]D-ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή διαβητικών ζώων 4 εβδομάδων σε σχέση με ζώα ελέγχου. Θα μπορούσαμε ίσως να προτείνουμε, παρά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα πως η μακροχρόνια έκθεση του αμφιβληστροειδούς σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν επηρεάζει σημαντικά τη νευροδιαβίβαση. Απαιτούνται, ωστόσο, περαιτέρω πειράματα για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση.

Με την επαναφορά των ιστών σε φυσιολογικές συνθήκες παροχής οξυγόνου και θρεπτικών, μελετήσαμε την ικανότητα του ιστού να επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση, όσο αφορά την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Διαπιστώσαμε ότι η διαδικασία αυτή γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την επαναφορά των ιστών σε φυσιολογικές συνθήκες γεγονός που επιβεβαιώνει την πλαστικότητα που επιδεικνύει ο αμφιβληστροειδής στην αντιμετώπιση ισχαιμικών προσβολών (Osborne και συν, 2004).

Όπως αναφέραμε, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η πρόκληση διαβήτη σε επιμύες μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης δεν φάνηκε να επηρεάζει την επαναπρόσληψη [ $^3H$ ]D-ασπαρτικού οξέος και [ $^3H$ ]GABA ούτε του GABA. Η σημαντική μείωση που παρατηρήθηκε κατά την επιβολή της ισχαιμίας συνάδει με προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου μας καθώς και με τα ευρήματα των Napper και συν. (1999). Η ομάδα αυτή βρήκε πως η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού και του GABA από τα κύτταρα του Müller σε απομονωθέντες αμφιβληστροειδείς αρουραίων συνεχίζεται σε συνθήκες ισχαιμίας και υψηλού εξωκυττάριου  $K^+$ . Ωστόσο, παρουσία υψηλών επιπέδων εξωκυττάριου  $K^+$ , όπως συμβαίνει στην ισχαιμία, η επαναπρόσληψη από τα κύτταρα της γλοίας παρουσιάζει κορεσμό σε χαμηλότερα επίπεδα εξωγενούς γλουταμινικού (Napper, 1999). Ένας άλλος λόγος, ο οποίος ίσως ευθύνεται για την ελαττωμένη επαναπρόσληψη του γλουταμινικού στην ισχαιμία είναι η

δυσλειτουργία της αντλίας επαναπρόσληψης στα κύτταρα του Müller (Li 2002).

Αντίθετα με εμάς, οι Santiago και συν (2006) διαπίστωσαν μείωση στην επαναπρόσληψη [<sup>3</sup>H]D-ασπαρτικού οξέος από τον αμφιβληστροειδή διαβητικών ζώων σε σχέση με ζώα ελέγχου 4 εβδομάδες μετά την πρόκληση διαβήτη με στρεπτοζοτοκίνη. Δεδομένου ότι εμείς μελετήσαμε την επαναπρόσληψη του νευροδιαβιβαστή 12 εβδομάδες μετά την πρόκληση διαβήτη θα μπορούσαμε υποθέσουμε ότι υπάρχει κάποιος αντισταθμιστικός μηχανισμός στο ιστό.

## Βιβλιογραφία

Akayama, H, Nakazawa, T., Shimura, m., Tomita, H., Tamai, M. (2002). Presence of mitogen activated protein kinase in retinal Müller cells and its neuroprotective ischemia-reperfusion injury. *Neuroreport* 13:2103-2107.

Allen JW, Vicini S, Faden AI. (2001). Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release. *Exp Neurol*, 169:449–60.

Baptista FI, Gaspar JM, Cristóvão A, Santos F, Köfalvi A, Ambrósio AF. (2011). Diabetes induces early transient changes in the content of vesicular transporters and no major effects in neurotransmitter release in hippocampus and retina. *Brain Research* 1383 (257 – 269)

Barnett, N.L., Pow, D.V., Bull, N.D., (2001). Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem. Int.* 39, 291–299.

Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A., (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285.

Billups, B., Attwell, D., (1996). Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* 379, 171–174.

Bobyn PJ, Franklin JL, Wall CM, και συν. (2002). The effects of dietary sulfur amino acid deficiency on rat brain glutathione concentration and neural damage in global hemispheric hypoxia-ischemia. *Nutr Neurosci*, 5:407–16.

Bolanos JP, Almeida A. (1999). Roles of nitric oxide in brain hypoxiaischemia. *Biochim Biophys Acta*, 1411:415–36.

Burke, S.P., Nadler, J.V., (1989). Effects of glucose deficiency on glutamate/aspartate release and excitatory synaptic responses in the hippocampal CA1 area in vitro. *Brain Res.* 500, 333–342

Chen, Q.X., Perkins, K.L., Choi, D.W., Wong, R.K., (1997). Secondary activation of a cation conductance is responsible for NMDA toxicity in acutely isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 17, 4032–4036

Clarkson AN., (2011). *Perisynaptic GABA Receptors: The Overzealous Protector*. Hindawi Publishing Corporation *Advances in Pharmacological Sciences*.

Chun, M.H., Kim, I.B., Ju, W.K., Kim, K.Y., Lee, M.Y., Joo, C.K., Chung, J.W., (1999). Horizontal cells of the rat retina are resistant to degenerative processes induced by ischemia-reperfusion. *Neurosci. Lett.* 260, 125–128.

Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65:1–105.

De A, Krueger JM, Simasko SM. (2005). Glutamate induces the expression and release of tumor necrosis factor-alpha in cultured hypothalamic cells. *Brain Res*, 1053:54–61.

De Flora, A., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., (1998). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular  $Ca^{2+}$ -mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem. Biophys.* 28, 45–62.

Dreyer EB. (1998). A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma*, 7:62–7.

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, και συν. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-d-aspartate. *J Neurosci*, 15:6377–88.

Fern, R., 1998. Intracellular calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 18, 7232–7243.

Fletcher, E.L., Kalloniatis, M., (1997). Localisation of amino acid neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 380, 449–471.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, και συν. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor induced



angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:2604–9.

Green, A.R., Hainsworth, A.H., Jackson, D.M., (2000). GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology* 39, 1483–1494.

Goto, W., Ota, T., Morikawa, N., Otori, Y., Hara, H., Kawazu, K., Miyawaki, N., Tano, Y., (2002). Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. *Brain Res.* 958, 10–19.

Grónder T, Kohler K, Guenthe E. (2001). Alterations in NMDA receptor expression during retinal degeneration in the RCS rat, *Vis Neurosci*, 18:781–7.

Harada T, Harada C, Nakamura K, και συν. (2007). The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest*, 117:1763–70.

Hayreh, SS Weingeist, T.A, (1980) Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: retinal tolerance time to acute ischaemia. *Br. J.Ophthalmol.* 64: 818-825.

Hilton GD, Nunez JL, Bambrick L, και συν. (2006). Glutamate-mediated excitotoxicity in neonatal hippocampal neurons is mediated by mGluR induced release of Ca<sup>++</sup> from intracellular stores and is prevented by estradiol. *Eur J Neurosci*, 24:3008–16.

Hu Y, Benedict MA, Wu D, και συν. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 9:4386–91.

Iadecola C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*, 20:132–9.

Kalloniatis, M., (1995). Amino acids in neurotransmission and disease. *J. Am. Optom. Assoc.* 66, 750–757.

Kandel R. Eric, Schwartz H. James, Jessell M. Thomas. (1999) Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο.

Kashiwagi K, Iizuka Y, Mochizuki S, και συν. 2003. Differences in nitric oxide production: a comparison of retinal ganglion cells and retinal glial cells cultured under hypoxic conditions. *Brain Res Mol Brain Res*, 112:126–34.

Kaur C, Foulds W., Ling EA. (2008). Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*. Dec;2(4):879-89.

Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. (2006). Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47:1126–41.

Kim AH, Kerchner GA, and Choi DW. (2002). Blocking Excitotoxicity. Chapter 1 in *CNS Neuroprotection*. Marcoux FW and Choi DW, editors. Springer, New York. Pages 3-36

Kimelberg, H.K., Rutledge, E., Goderie, S., Charniga, C., (1995). Astrocytic swelling due to hypotonic or high K<sup>+</sup> medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 15, 409–416.

Kiss JP, Vizi ES. 2001. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci*, 24:211–5.

Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, και συν. (2000). Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol*, 44:235–44.

Lasater, E.M., Dowling, J.E., Ripps, H. (1984) Pharmacological properties of isolated horizontal and bipolar cells from the skate retina. *J Neurosci* 4:1966–1975.

Levy AP, Levy NS, Wegner S, και συν. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*, 270:13333–40.

Lieven CJ, Schlieve CR, Hoegger MJ, και συν. (2006). Retinal ganglion cell axotomy induces an increase in intracellular superoxide anion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47:1477–85.

Lieven CJ, Vrabec JP, Levin LA. (2003). The effects of oxidative stress on mitochondrial transmembrane potential in retinal ganglion cells. *Antioxid Redox Signal*, 5:641–6.

Lipton, P., (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*79, 1431–1568

Louzada-Junior, P., Dias, J.J., Santos, W.F., Lachat, J.J., Bradford, H.F., Coutinho-Netto, J., (1992). Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. *J. Neurochem.* 59, 358–363.

Manev H, Favaron M, Guidotti A, and Costa E. (1989) Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Molecular Pharmacology*. Jul;36(1):106-112. Retrieved on January 31, 2007.

Massey, S.C., (1990). Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In: Osborne, N.N., Chader, G.J. (Eds.), *Progress in Retinal Research*. Pergamon Press, Oxford, pp. 399–425.

Matute C, Alberdi E, Domercq M, και συν. (2001). The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci*, 24:224–30.

Mishra OP, Ashraf QM, Delivoria-Papadopoulos M. (2002). Phosphorylation of cAMP response element binding (CREB) protein during hypoxia in cerebral cortex of newborn piglets and the effect of nitric oxide synthase inhibition. *Neuroscience*, 115:985–91.

Mishra OP, Zubrow AB, Ashraf QM, και συν. (2006). Nuclear Ca(++)-influx, Ca (++)/calmodulin-dependent protein kinase IV activity and CREB protein phosphorylation during post-hypoxic reoxygenation in neuronal nuclei of newborn piglets: the role of nitric oxide. *Neurochem Res*,31:1463–71.

Mishra OP, Zubrow AB, Ashraf QM. (2004). Nitric oxide-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK) during hypoxia in cerebral cortical nuclei of newborn piglets. *Neuroscience*, 123:179–86.

Nawy, S., Jahr, C.E. (1990) Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* 346:269–271.

Neal, M.J., Cunningham, J.R., Hutson, P.H., Hogg, J., (1994). Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J. Neurochem.* 62, 1025–1033.

Nishizawa, Y., (2001). Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 69, 369–381.

Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, και συν. (2000). AMPA–kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J Neurosci*, 20:251–8.

Osborne NN, Casson R, Wood JPM, Chidlow J, Graham M, Melena J. (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in retinal and eye research* 23:91-147.

Osborne, N.N., 1999. Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia. *Vis. Neurosci.* 16, 45–52.

Osborne, N.N., Larsen, A.K., (1996). Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem. Int.* 29, 263–270

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

Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. (2000) *Φαρμακολογία. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.*

Rossi, D.J., Oshima, T., Attwell, D., 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321.

- Sattler R, Tymianski M, (2001). Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol*, 24(1–3):107–29.
- Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U.,Burmester, T., (2003). How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina.*J Biol Chem* 278, 1932–1935.
- Schwartz-Bloom, R.D., Sah, R., (2001).  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> neurotransmission and cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 77, 353–371.
- Seki, M., Lipton, S. A. (2008) Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. *Prog Brain Res* 173:495-510.
- Sieghart W., (1995). Structure and pharmacology of  $\gamma$ -aminobutyric acid (A) receptor subtypes,” *Pharmacological Reviews*, vol. 47, no. 2, pp. 181–234.
- Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. (1997). Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res*, 37:3483–93.
- Tezel G, Yang X. (2004). Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:4049–59.
- Thoreson, W.B., Witkovsky, P., (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 765–810
- Toda N, Nakanishi-Toda M, 2007. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 26:205–38.
- Vaegan, Millar, T.J., (1994). Effect of kainic acid and NMDA on the pattern electroretinogram, the scotopic threshold response, the oscillatory potentials and the electroretinogram in the urethane anaesthetized cat. *Vision Res.* 34, 1111–1125.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*, 184:53–68.
- Yang, X.L. (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* 73:127-150.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

[www.ivo.gr](http://www.ivo.gr)

[www.uspharmacist.com/content/c/27875/](http://www.uspharmacist.com/content/c/27875/)