

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

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΡΟΣΒΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΙΚΗ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΗ

Συγκριτική μελέτη της δράσης της ισχαιμίας, υποξίας, υπογλυκαιμίας και υπεργλυκαιμίας στη διεγερτική και ανασταλτική νευροδιαβίβαση του αμφιβληστροειδούς αρουραίου



Παπαγεωργίου Ελένη
Οφθαλμίατρος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Άννα Βασιλάκη
Επικ. Καθ. Φαρμακολογίας

Λάρισα 2011

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.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3 -
Αμφιβληστροειδής.....	3 -
Δομή του αμφιβληστροειδούς	4 -
Νευροδιαβιβαστές Στον Αμφιβληστροειδή.....	5 -
Διεγερτικοί Νευροδιαβιβαστές	6 -
L-ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟ ΟΞΥ	6 -
Ανασταλτικοί Νευροδιαβιβαστές.....	6 -
Γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ.....	6 -
Διεγερτοτοξικότητα και ΚΝΣ.....	8 -
Διεγερτοτοξικότητα και Αμφιβληστροειδής.....	9 -
Αίτια Αυξημένης Απελευθέρωσης Γλουταμινικού Οξέος κατά την Ισχαιμία	11 -
Επίδραση του Γλουταμινικού Οξέος στο Νευρικό Ιστό	14 -
Επίδραση Του γ-Αμινοβουτυρικού οξέος στο Νευρικό Ιστό	16 -
Ο Ρόλος του Ca^{+2}	18 -
Αντικρουόμενες Απόψεις σχετικά με τη Νευροδιαβίβαση	20 -
Σκοπός.....	22 -
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24 -
Πειραματόζωα	24 -
Μελέτες Απελευθέρωσης Νευροδιαβιβαστών	24 -
Προετοιμασία Ιστών	24 -
Υπερδιαχύση και Συλλογή Δείγματος.....	25 -
Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	25 -
Μελέτες Επαναπρόσληψης	26 -
Φάρμακα και Χημικές Ουσίες	26 -
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27 -
Ισχαιμία.....	27 -
Επίδραση της Ισχαιμίας στην Απελευθέρωση [3H] D-Ασπαρτικού Οξέος.....	27 -
Επίδραση της Ισχαιμίας στην Ca^{++} -Εξαρτώμενη Απελευθέρωση [3H] D-Ασπαρτικού Οξέος.....	28 -
Επίδραση της Ισχαιμίας στην Απελευθέρωση [3H] GABA	29 -
Επίδραση της Ισχαιμίας στην Ca^{++} -Εξαρτώμενη Απελευθέρωση [3H] GABA.....	30 -

Υποξία	- 31 -
<i>Επίδραση της Υποξίας στην Απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος</i>	<i>- 31 -</i>
<i>Επίδραση της Υποξίας στην Ca⁺⁺-Εξαρτώμενη Απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος</i>	<i>- 32 -</i>
<i>Επίδραση της Υποξίας στην Απελευθέρωση [³H] GABA.....</i>	<i>- 33 -</i>
<i>Επίδραση της Υποξίας στην Ca⁺⁺-Εξαρτώμενη Απελευθέρωση [³H] GABA</i>	<i>- 34 -</i>
Υπογλυκαιμία.....	- 35 -
<i>Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην Απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος.....</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην Ca⁺⁺-Εξαρτώμενη Απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος.....</i>	<i>- 36 -</i>
<i>Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην Απελευθέρωση [³H] GABA</i>	<i>- 37 -</i>
<i>Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην Ca⁺⁺-Εξαρτώμενη Απελευθέρωση [³H] GABA.....</i>	<i>- 38 -</i>
Υπεργλυκαιμία	- 39 -
<i>Επίδραση της Υπεργλυκαιμίας στην Απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος</i>	<i>- 39 -</i>
<i>Επίδραση της Υπεργλυκαιμίας στην Απελευθέρωση [³H] GABA</i>	<i>- 40 -</i>
Μελέτες Επαναπρόσληψης	- 41 -
<i>Επαναπρόσληψη του [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος σε Συνθήκες Ισχαιμίας, Υποξίας, Υπογλυκαιμίας και Υπεργλυκαιμίας</i>	<i>- 41 -</i>
<i>Επαναπρόσληψη του [³H] GABA σε Συνθήκες Ισχαιμίας, Υποξίας, Υπογλυκαιμίας και Υπεργλυκαιμίας</i>	<i>- 42 -</i>
Συγκριτικά Αποτελέσματα	- 43 -
<i>Σύγκριση μεταξύ της Απελευθέρωσης του [³H]GABA και του [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος σε Συνθήκες Ισχαιμίας.....</i>	<i>- 43 -</i>
<i>Σύγκριση της Απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος μεταξύ Ισχαιμίας, Υποξίας και Υπογλυκαιμίας.....</i>	<i>- 44 -</i>
<i>Σύγκριση της Απελευθέρωσης του [³H] GABA μεταξύ Ισχαιμίας, Υποξίας και Υπογλυκαιμίας.....</i>	<i>- 45 -</i>
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 47 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 54 -
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	- 60 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 61 -

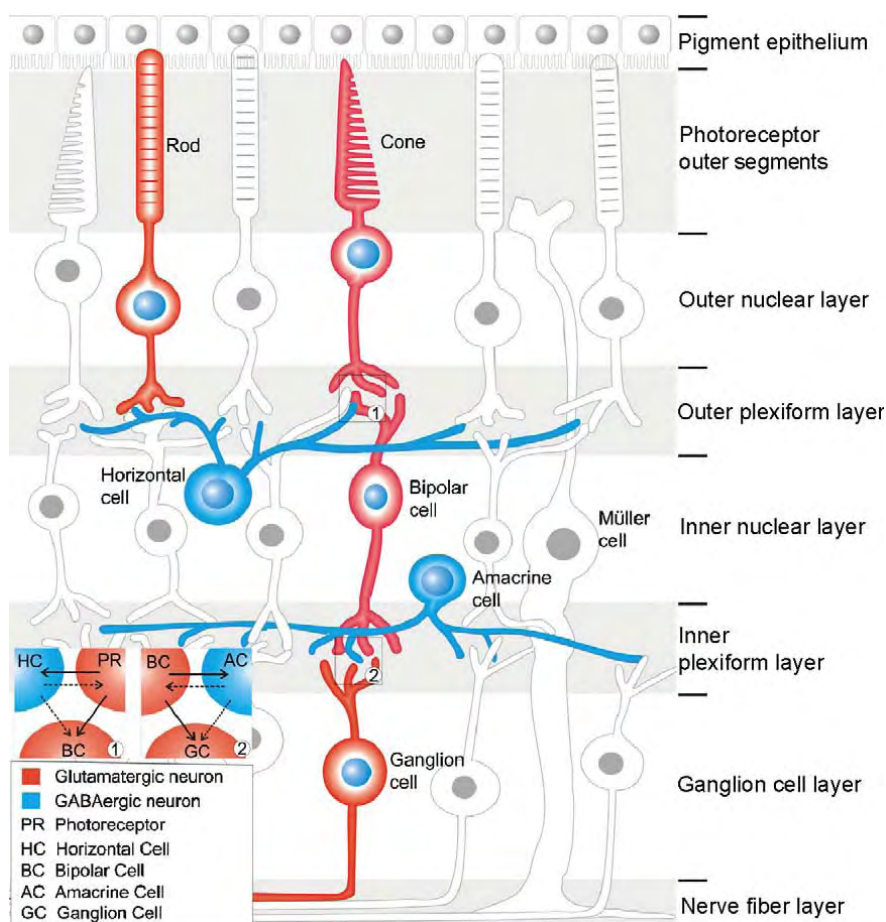
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

Ο αμφιβληστροειδής των σπονδυλωτών, όπως και άλλες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), προέρχεται εμβρυολογικά από το νευρικό εξώδερμα, και ως εκ τούτου αποτελεί δομή του εγκεφάλου. Λόγω της προσβασιμότητάς του, ο αμφιβληστροειδής προσφέρει ένα εξαιρετικό μοντέλο για λεπτομερή ανάλυση των θεμελιωδών νευρικών μηχανισμών που διέπουν την επεξεργασία πληροφοριών στον εγκεφαλο. Πρώτον, ο αμφιβληστροειδής, μετά τον αποχωρισμό του από το μελάγχρουν επιθήλιο, συντηρείται σχετικά εύκολα με τη βοήθεια φυσιολογικού αλατούχου διαλύματος. Δεύτερον, φωτεινά ερεθίσματα που διεγείρουν τον αμφιβληστροειδή μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά και ποιοτικά, ώστε να συσχετιστούν με ακρίβεια με τις απαντήσεις των αμφιβληστροειδικών νευρώνων. Τρίτον, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές απομόνωσης κυττάρων, μέθοδοι καλλιέργειας, ιστολογικών τομών και χρώσεων του αμφιβληστροειδούς, που εφαρμόζονται με μεγάλη επιτυχία σε πολυάριθμα ερευνητικά πρωτόκολλα. Τέλος, το σημαντικότερο είναι ότι ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από μερικούς μόνο τύπους νευρικών κυττάρων, οι οποίοι συνδέονται κατά ένα περίπλοκο τρόπο, αλλά με μια συστηματική στιβαδωτή ανατομική διάταξη, παρέχοντας ένα μεγάλο πλεονέκτημα για την κατανόηση των διασυνδέσεων και λειτουργικών χαρακτηριστικών των νευρώνων, και τη διερεύνηση των μηχανισμών που ευθύνονται για τη μεταφορά του σήματος και την αλληλεπίδρασή των νευρωνικών κυκλωμάτων του αμφιβληστροειδούς. Η κυτταρική επικοινωνία ανάμεσα στους νευρώνες του αμφιβληστροειδούς αποτελεί τη βάση για τη σωστή όραση, ενώ ο εκφυλισμός και οι μεταβολικές αλλαγές οι οποίες αλλοιώνουν αυτή την επικοινωνία μπορούν να οδηγήσουν σε οπτική εξασθένηση ή ακόμα και τύφλωση (Brecha 1983, Dowling 1987).

ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

Η εικόνα 1 (Yang 2004) δείχνει την κυτταρική οργάνωση του αμφιβληστροειδούς και την ομαλή διάταξη των νευρικών κυττάρων σε ευδιάκριτες στιβάδες (Dowling 1987). Υπάρχουν πέντε βασικοί τύποι νευρώνων στον αμφιβληστροειδή: φωτοϋποδοχείς, δίπολα κύτταρα, οριζόντια κύτταρα, βραχύινα κύτταρα και γαγγλιακά κύτταρα. Παράλληλα, υπάρχουν 3 τύποι νευρογλοιακών κυττάρων που παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό, την υποστήριξη και τη διαμόρφωση του νευρικού ιστού του αμφιβληστροειδούς: τα κύτταρα Müller, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα. Η σημαντικότερη οδός μεταβίβασης πληροφοριών είναι από τους φωτοϋποδοχείς στα γαγγλιακά κύτταρα μέσω των διπολικών κυττάρων (κάθετο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρικής διαστρωμάτωσης και οργάνωσης του αμφιβληστροειδούς των σπονδυλωτών. Τα σήματα που παράγονται στους φωτοϋποδοχείς (ραβδία και κωνία) μεταφέρονται μέσω των δίπολων κυττάρων στα γαγγλιακά κύτταρα, και από κει μέσω του οπτικού νεύρου στα οπτικά κέντρα του εγκεφάλου (Yang 2004). Αυτή η άμεση ροή των πληροφοριών τροποποιείται από οριζόντια κύτταρα της έξω δικτυωτής στιβάδας (OPL) και από βραχύινα κύτταρα της έσω δικτυωτής στιβάδας (IPL). Το γλουταμινικό οξύ και το GABA είναι οι κύριοι διεγερτικοί και ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές στον αμφιβληστροειδή, αντίστοιχα. Γλουταμινεργικοί νευρώνες (φωτοϋποδοχείς, δίπολα κύτταρα και γαγγλιακά κύτταρα) απεικονίζονται με κόκκινο, ενώ GABAεργικοί νευρώνες με μπλε χρώμα. Στην έξω δικτυωτή στιβάδα (OPL), οριζόντια κύτταρα δέχονται σήματα από τους φωτοϋποδοχείς και με τη σειρά τους παρέχουν αρνητική ανάδραση στα κωνία. Τα δίπολα κύτταρα λαμβάνουν σήματα και από τα δύο είδη φωτοϋποδοχέων και από τα οριζόντια κύτταρα. Στην έσω δικτυωτή στιβάδα (IPL), τα δίπολα και τα βραχύινα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω αμφίδρομων συνάψεων και παρέχουν σήματα στα γαγγλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα του Müller είναι η κύρια κατηγορία νευρογλοιακών κυττάρων, που εκτείνονται σε όλο τον αμφιβληστροειδή.

Στις έξω και έσω δικτυωτές στιβάδες, όπου εντοπίζονται οι συνάψεις, οριζόντια και βραχύινα κύτταρα μεταβιβάζουν την οπτική πληροφορία πλαγίως και σχετίζονται με πλευρικές αλληλεπιδράσεις (οριζόντιο μονοπάτι μεταβίβασης σήματος). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι αυτές οι πλευρικές αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση του σήματος της κάθετης μετάδοσης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η επεξεργασία της οπτικής πληροφορίας και η ανάλυσή της στο χώρο (εξωτερική δικτυωτή στιβάδα) και στο χρόνο (εσωτερική δικτυωτή στιβάδα), καθώς και η ανάλυση των χρωμάτων (Dowling 1987).

ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΕΣ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ

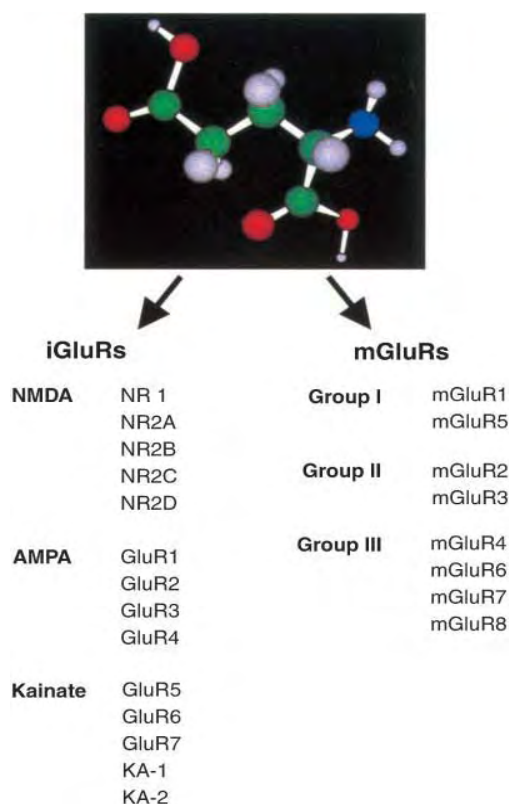
Παρόλο που υπάρχουν αρκετές ηλεκτρικές συνδέσεις μεταξύ των αμφιβληστροειδικών νευρώνων μέσω χασματοσυνδέσεων (Miyachi 1999), οι χημικές συνάψεις με τη μεσολάβηση νευροδιαβιβαστών σαφώς υπερτερούν στα νευρωνικά κυκλώματα του αμφιβληστροειδούς. Περισσότερες από 15 νευροδραστικές ουσίες έχει διαπιστωθεί ότι απελευθερώνονται στις συνάψεις του αμφιβληστροειδούς. Μερικές από αυτές τις ουσίες όπως το L-γλουταμινικό οξύ, το

γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η γλυκίνη και η ακετυλοχολίνη, δρουν ως κλασικοί νευροδιαβιβαστές, ενώ μόρια όπως η ντοπαμίνη φαίνεται να δρουν ως νευροτροποποιητές. Ο ρόλος άλλων νευροδραστικών ουσιών συμπεριλαμβανομένων τουλάχιστον οκτώ νευροπεπτιδίων, δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Οι ουσίες αυτές πιθανόν δρουν ως νευροδιαβιβαστές ή/και νευροτροποποιητές (Dowling 1987). Το L-γλουταμινικό οξύ είναι ο κύριος διεγερτικός, ενώ το GABA είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του αμφιβληστροειδούς.

ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΕΣ

L-ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

Το L-γλουταμινικό οξύ είναι υπεύθυνο για την κάθετη μεταφορά του οπτικού σήματος στον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 2). Η πρόσληψη, η απελευθέρωση και η δράση του γλουταμινικού οξέος και των αγωνιστών του πάνω στη δεύτερη τάξη νευρώνων του αμφιβληστροειδούς αποδεικνύουν ότι το γλουταμινικό οξύ είναι ο νευροδιαβιβαστής που δρα στην πρώτη σύναψη του αμφιβληστροειδούς (Nawy 1990, Lasater 1984).



Εικόνα 2: L-Γλουταμινικό οξύ και οι κύριοι υποδοχείς του (*iGluRs* ιοντοτροπικοί υποδοχείς, *mGluRs* μεταβολοτροπικοί υποδοχείς).

Οι δύο τύποι φωτοϋποδοχέων (ραβδία και κωνία), τα δίπολα κύτταρα και τα περισσότερα γαγγλιακά κύτταρα απελευθερώνουν γλουταμινικό 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, Εικόνα 2). Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού διακρίνονται σε NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) και non-NMDA (AMPA και kainate). Οι NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί τόσο για το Na^+ όσο και για το Ca^{2+} (Yang). Αντίθετα, οι non-NMDA υποδοχείς είναι διαπερατοί από το Na^+ και K^+ , αλλά όχι από το Ca^{2+} στις περισσότερες περιπτώσεις. Ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών σε φυσιολογικές συνθήκες αρνητικού δυναμικού μεμβράνης επιτρέπει στο Na^+ να εισέλθει στο κύτταρο, προκαλώντας εκπόλωση (Yang 2004).

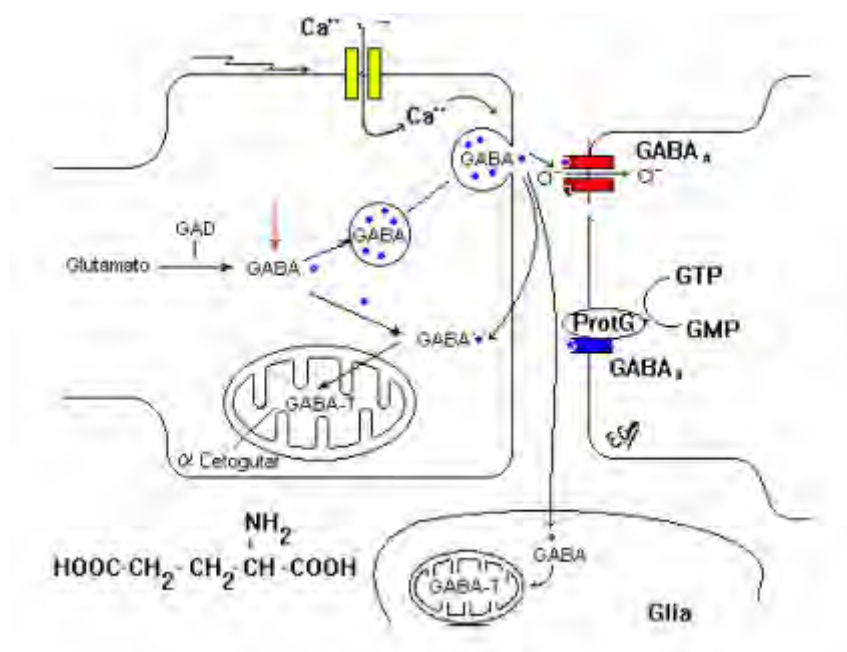
ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΕΣ

γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ

Το GABA χρησιμοποιείται από πολυάριθμα οριζόντια και βραχύινα κύτταρα κατά την πλάγια μεταφορά της οπτικής πληροφορίας, και ρυθμίζει τη διαβίβαση τόσο στις συνάψεις της έξω όσο και της έσω δικτυωτής στιβάδας (Yang 2004). Στην έξω δικτυωτή στιβάδα, τα οριζόντια κύτταρα δέχονται ερεθίσματα από τους φωτοϋποδοχείς και με τη σειρά τους παρέχουν αρνητική ανάδραση στα κωνία. Τα δίπολα κύτταρα δέχονται ερεθίσματα τόσο από τους φωτοϋποδοχείς όσο και από τα οριζόντια κύτταρα. Στην έσω δικτυωτή στιβάδα δίπολα και βραχύινα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω αμφίδρομων συνάψεων και οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων στέλνουν ερεθίσματα στα γαγγλιακά κύτταρα. Τα βραχύινα κύτταρα στην έσω δικτυωτή στιβάδα πιθανόν να εμπλέκονται στην ανάλυση των οπτικών σημάτων στο χώρο και στο χρόνο (Yang 2004).

Το GABA συντίθεται από γλουταμικό οξύ με τη δραστηριότητα του ενζύμου δεκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD, Εικόνα 3). Η σύνθεσή του συνδέεται με τον κύκλο του Krebs και απαιτείται η παρουσία ως συνενζύμου της βιταμίνης B6.

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 (Yang 2004).



Εικόνα 3: GABAεργική σύναψη.

Το GABA ασκεί τη δράση του συνδεόμενο με υποδοχείς που βρίσκονται είτε στην προσυναπτική είτε στη μετασυναπτική μεμβράνη ($GABA_{A-C}$, Εικόνα 3). Οι $GABA_A$ είναι οι περισσότερο συνήθεις και απαντώνται στο 40% των νευρώνων. Οι $GABA_A$ και οι $GABA_C$ είναι δίαυλοι ενώ οι $GABA_B$ είναι υποδοχείς συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G. Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς $GABA_A$ και οι $GABA_C$ με τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή επιτρέπουν τη μεταφορά φορτισμένων ιόντων δια μέσω διαύλου που σχηματίζεται από το σύμπλεγμα του υποδοχέα. Εδώ οι υποδοχείς είναι δίαυλοι ιόντων Cl^- και με τη σύνδεση του GABA επιτρέπουν την είσοδο αρνητικά φορτισμένων ιόντων Cl^- 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_B ανήκουν στην κατηγορία των μεταβοτροπικών υποδοχέων. Με την μεσολάβηση G-πρωτεϊνών και συστημάτων δεύτερων αγγελιοφόρων ανοίγουν κανάλια καλίου απ'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_B υποδοχείς ελαττώνοντας την δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης, μειώνουν την αγωγιμότητα της κυτταρικής μεμβράνης στο ασβέστιο.

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

ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΝΣ

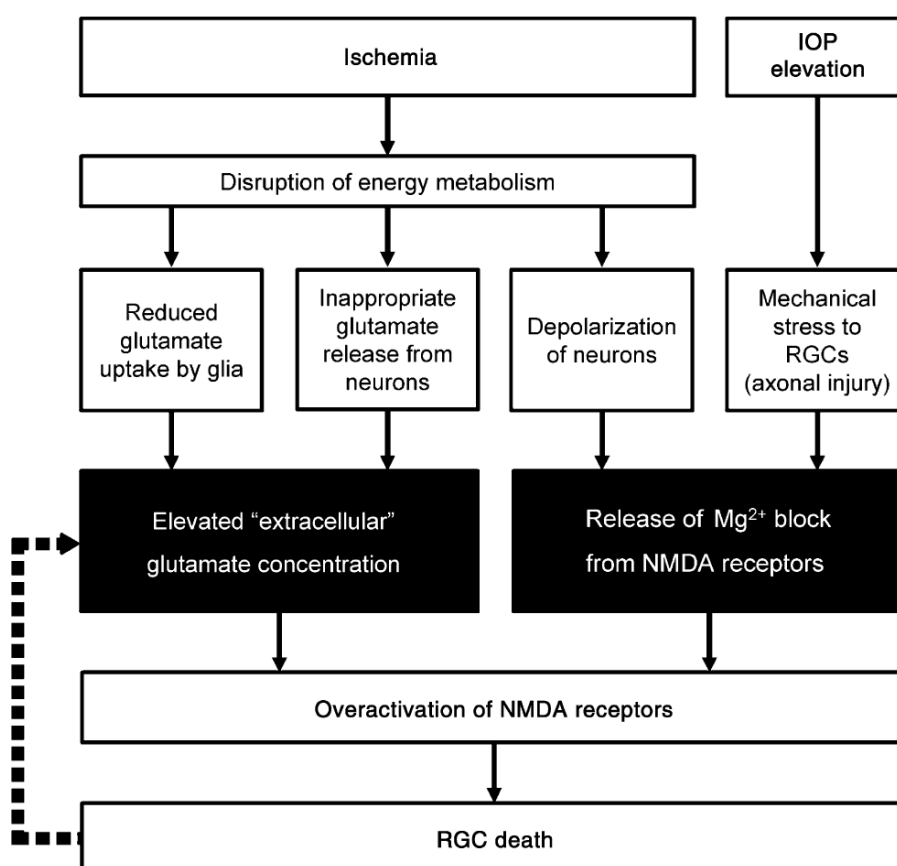
Για να διατηρηθεί η σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος απαιτείται συνεχής παροχή οξυγόνου και γλυκόζης καθώς και απομάκρυνση των τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού. Ως διεγερτοτοξικότητα ορίζεται ο θάνατος των νευρικών κυττάρων που προκαλείται από την υπέρμετρη ενεργοποίηση των ιοντοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος (Olney 1978, Bruno 2001, Lipton 1994, Mosinger 1991, Schuettauf 2000). Λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων και της τοξικότητας του γλουταμινικού, και άλλων παρόμοιων διεγερτικών αμινοξέων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), θεωρήθηκε ότι ο μηχανισμός της διεγερτοτοξικότητας πιθανόν να εμπλέκεται σε ποικίλες νευρολογικές, ψυχιατρικές και αμφιβληστροειδικές ασθένειες (Olney 1988, Choi 1988, Choi 1990, Lipton 1994, Dawson 1995, Blandini 1996, Bonne 1996). Είναι πλέον γνωστό ότι η παθολογική ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμινικού σχετίζεται με νευρο-εκφυλιστικές ασθένειες, όπως οξέα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, εγκεφαλικό τραύμα, ν. Huntington, ν. Parkinson, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, AIDS και ν. Alzheimer. Ίσως η πιο καλά μελετημένη παθολογική

διαδικασία είναι η διεγερτοτοξικότητα που σχετίζεται με την ισχαιμία. Ήδη το 1984 ο Rothman παρατήρησε ότι ο θάνατος των νευρώνων σε καλλιέργεια υπό την επίδραση ισχαιμίας οφείλεται σε υπέρμετρη ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος (Rothman 1984). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η ελαττωμένη παροχή ενέργειας λόγω της ισχαιμίας προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης γλουταμινικού (Benveniste 1984, Meldrum 1993) καθώς και αυξημένη μετασυναπτική ευαισθησία σ' αυτό (Henneberry 1989).

ΔΙΕΓΕΡΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

Η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς είναι μια σοβαρή κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο νευρώνων και την τύφλωση, παρόλο που ο αμφιβληστροειδής είναι πιο ανθεκτικός σε σχέση με τον εγκέφαλο. Η ισχαιμία σχετίζεται με στέρηση οξυγόνου και γλυκόζης καθώς και συσσώρευση προϊόντων μεταβολισμού. Οξεία αμφιβληστροειδική ισχαιμία παρατηρείται σε ασθενείς με απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς που μπορεί να είναι εμβολικής (καρωτιδικής ή καρδιακής προέλευσης) ή θρομβωτικής αιτιολογίας. Χρόνια αμφιβληστροειδική ισχαιμία παρατηρείται σε περίπου 20% των ασθενών με σημαντική καρωτιδική στένωση και επίσης σχετίζεται με τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες τύφλωσης στον δυτικό κόσμο. Προς το παρόν δεν υπάρχει ικανοποιητική θεραπεία και η παρατηρούμενη απώλεια όρασης σχετίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις με την αμφιβληστροειδική ισχαιμία. Παρόμοιοι μηχανισμοί παρατηρούνται σε ασθενείς με απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς ή σε συστηματικές αγγειίτιδες, όπως η γιγαντοκυτταρική αρτηρίτιδα και η νόσος Moya-Moya. Προς το παρόν δεν υφίσταται δυστυχώς ικανοποιητική θεραπεία για την οξεία αμφιβληστροειδική ισχαιμία. Μια άλλη νόσος που πιθανόν να σχετίζεται με διεγερτοτοξικότητα είναι το γλαύκωμα. Συγκεκριμένα στο γλαύκωμα, φαίνεται ότι η αιτία της παρατηρούμενης οπτικής νευροπάθειας είναι πολυπαραγοντική, ωστόσο τα αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού στο υαλώδες

γλαυκωματικών ασθενών συνηγορούν προς αυτήν την πιθανότητα (Quigley 1993, Dreyer 1996, Εικόνα 4).



Εικόνα 4: 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 εξωκυττάρια 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).

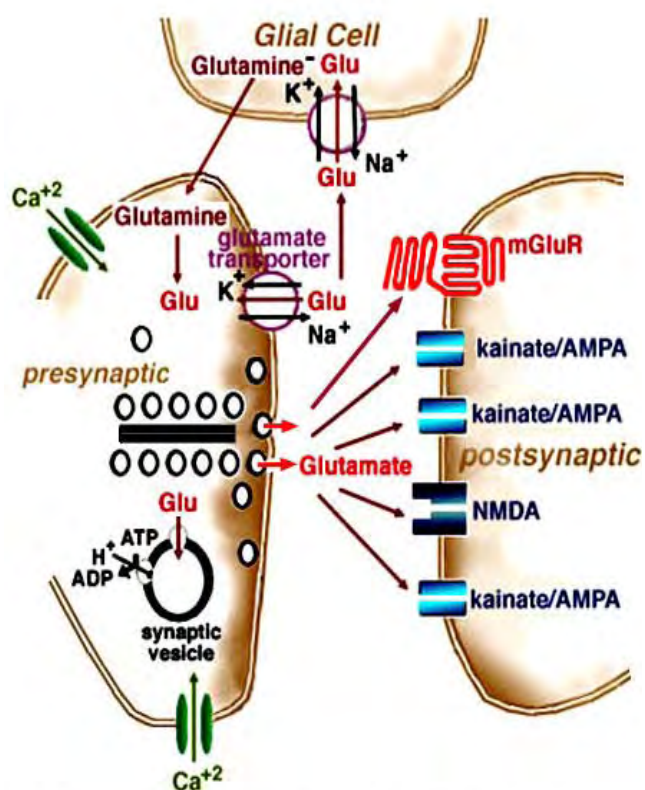
ΑΙΤΙΑ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών στον εξωκυττάριο χώρο είναι πολύ χαμηλά. Αυτό είναι συνέπεια του γεγονότος ότι τόσο οι νευρώνες όσο και τα νευρογλοιακά κύτταρα απομακρύνουν τους νευροδιαβιβαστές από τη συναπτική σχισμή όπου διαχέονται μετά από την απελευθέρωση τους. Αντίθετα, η ισχαιμία προκαλεί μαζική απελευθέρωση και αύξηση του εξωκυτταρίου γλουταμινικού (Benveniste 1984, Drejer 1985), το οποίο φαίνεται επίσης να ισχύει και κατά τη διάρκεια υπογλυκαιμίας (Burke 1989). Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι στον αμφιβληστροειδή αρουραίων τα επίπεδα του γλουταμινικού υπερδιπλασιάζονται μετά από 30min χημικής ισχαιμίας και αυξάνονται κατά 15 φορές μετά από 90min (Neal 1994).

Έτσι για παράδειγμα, σε εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία σε αρουραίους, έχει αναφερθεί αύξηση του γλουταμινικού οξέος στον εξωκυττάριο χώρο κατά τρόπο διφασικό (Wahl 1994), με μια σύντομη, Ca^{2+} -εξαρτώμενη αύξηση, ακολουθούμενη από μια μεγαλύτερη και πιο μακρόχρονη Ca^{2+} -ανεξάρτητη αύξηση. Φαίνεται επομένως ότι σε μια πρώιμη περίοδο μετά την έναρξη της ισχαιμίας η απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος γίνεται μέσω εξωκύττωσης που οφείλεται στην ενεργοποίηση των τάση-εξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , λόγω της προκληθείσας από την ισχαιμία εκπόλωσης της μεμβράνης. 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 που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας πιστεύεται ότι είναι η ανάστροφη μεταφορά του γλουταμινικού οξέος μέσω των

μεταφορέων του γλουταμινικού οξέος (glutamate transporters). Η απομάκρυνση του γλουταμινικού οξέος από τη συναπτική σχισμή και τον εξωκυττάριο χώρο εξαρτάται από την επαναπρόσληψή του στα κύτταρα (Barbour και συν., 1988), διατηρώντας το εξωκυττάριο γλουταμινικό οξύ κάτω από νευροτοξικά επίπεδα. Η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού οξέος δεν απαιτεί ATP και εξαρτάται από τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων Na^+ και K^+ στη μεμβράνη των κυττάρων καθώς και από τη μεταβολή του pH μέσω της εξόδου ανιόντων από το κύτταρο (Barbour 1988, Billups 1996, Εικόνα 5). Συγκεκριμένα, όταν η ισχαιμία μειώνει τον ανεφοδιασμό με ATP της αντλίας Na^+/K^+ -ATPase, τα ιόντα K^+ συσσωρεύονται στο εξωκυττάριο χώρο, εκπολώνοντας τα κύτταρα, και η διαφορά συγκέντρωσης του Na^+ οδηγεί σε μείωση της επαναπρόσληψης του γλουταμινικού οξέος, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ο νευροδιαβιβαστής στον εξωκυττάριο χώρο (Attwell 1993, Madl 1993, Rossi 2000).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος, της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς του και του μεταβολισμού του από τα νευρογλοιακά κύτταρα.

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, Εικόνα 5). Η ισχαιμία ελαττώνει τα αποθέματα ATP των νευρογλοιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητα της GS και να παρεμποδίζεται η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού (Oliver 1990). 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 ενδοκυττάρου γλουταμινικού ή Na^+ , ή αυξημένων επιπέδων εξωκυττάρου K^+ , συνηγορώντας για έναν πιθανό μηχανισμό μη κυστιδιακής απελευθέρωσης γλουταμινικού κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας (Barbour 1991, Attwell 1993).

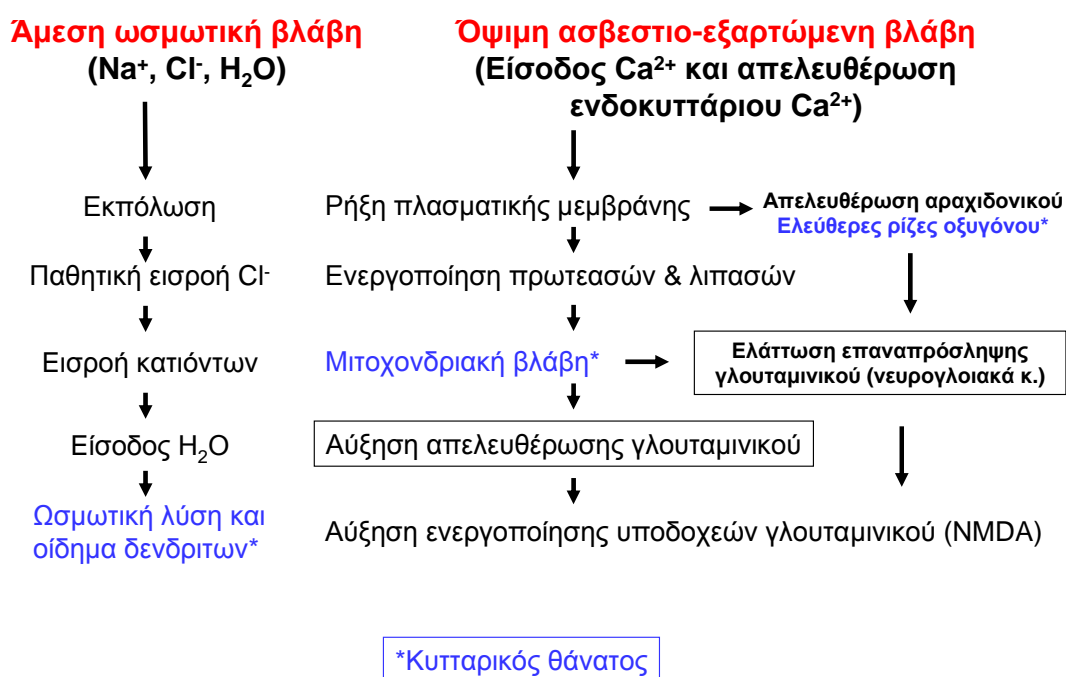
Μια άλλη πιθανή πηγή γλουταμινικού οξέος στην ισχαιμία μπορεί να προέλθει άμεσα από τα αστροκύτταρα. Σε καλλιέργειες κυττάρων ιπποκάμπου η ισχαιμία έχει βρεθεί να προκαλεί την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος από τα αστροκύτταρα (Ogata 1995). Η είσοδος ασβεστίου στα αστροκύτταρα, όπως φαίνεται να συμβαίνει στην ισχαιμία (Fern 1998) μπορεί να απελευθερώσει γλουταμινικό οξύ με ένα μηχανισμό διαμεσολαβούμενο από τις προσταγλαδίνες (Bezzi 1998). Επιπλέον, η αύξηση του εξωκυττάρου K^+ μέσω της ισχαιμίας προκαλεί οίδημα των αστροκυττάρων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος μέσω ενεργοποιηθέντων από το οίδημα ιοντικών διαύλων (Bednar 1992, Kimelberg 1995).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΙΣΤΟ

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. Ο βαθμός της εκπόλωσης κάθε κυττάρου και κατά συνέπεια η αντοχή του στην ισχαιμία, εξαρτάται από την ποσότητα και το είδος των υποδοχέων για διεγερτικούς (κυρίως γλουταμινικού) έναντι ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών (κυρίως GABA). Άλλοι

παράγοντες που παίζουν ρόλο στο πόσο επιρρεπής είναι ένας νευρώνας στην ισχαιμία, είναι η ικανότητα ρύθμισης των επιπέδων του ενδοκυττάριου Ca^{2+} , το εξωκυττάριο pH και η ικανότητα απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών.

Η μείωση του ενδοκυττάριου ATP διαταράσσει πρωτίστως τη λειτουργία της αντλίας Na^+/K^+ ATPase με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η επαναπόλωση των νευραξόνων καθώς και να διακόπτεται η τασεο-εξαρτώμενη Mg^{2+} αναστολή των NMDA υποδοχέων γλουταμινικού. Αυτό, με τη σειρά του, προκαλεί ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων από τα υψηλά επίπεδα του γλουταμινικού, αυξάνοντας την εισροή Ca^{2+} και Na^+ και την εκπόλωση. Πράγματι, στον πλήρως αναπτυγμένο εγκέφαλο, οι πιο ευαίσθητοι νευρώνες στην ισχαιμία είναι εκείνοι με την υψηλότερη πυκνότητα υποδοχέων NMDA (Mori 1995). Οι AMPA/kainate υποδοχείς γλουταμινικού επίσης ενεργοποιούνται, οδηγώντας σε περαιτέρω εισροή Na^+ , Cl^- και συμμεταφερόμενου ύδατος, που μπορεί να προκαλέσει οίδημα των ιστών και λύση κυττάρων (Lipton 1999). Η παρατηρούμενη συνεχής εκπόλωση της μεμβράνης ενισχύει επίσης το άνοιγμα των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} (Lipton 1999), με αποτέλεσμα να εντείνει την αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου Ca^{2+} και να αναστέλλει περαιτέρω τον μιτοχονδριακό οξειδωτικό μεταβολισμό, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο (Verkhratsky 1996, De Flora 1998).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών διεγερτοτοξικότητας του γλουταμινικού οξέος (Robin & Kalloniatis, 1992)

Το γλουταμινικό οξύ μπορεί να έχει επίσης άμεση επίπτωση και στα νευρογλοιακά κύτταρα, μιας και η υπερβολική αύξηση του εξωκυττάριου γλουταμινικού οξέος προκαλεί μεγάλη εισροή ιόντων Na^+ μέσω των μεταφορέων του γλουταμινικού οξέος (glutamate transporters). Επιπλέον, το γλουταμινικό μπορεί να δεσμευθεί σε υποδοχείς του που εντοπίζονται στα νευρογλοιακά κύτταρα προκαλώντας αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} στα κύτταρα αυτά.

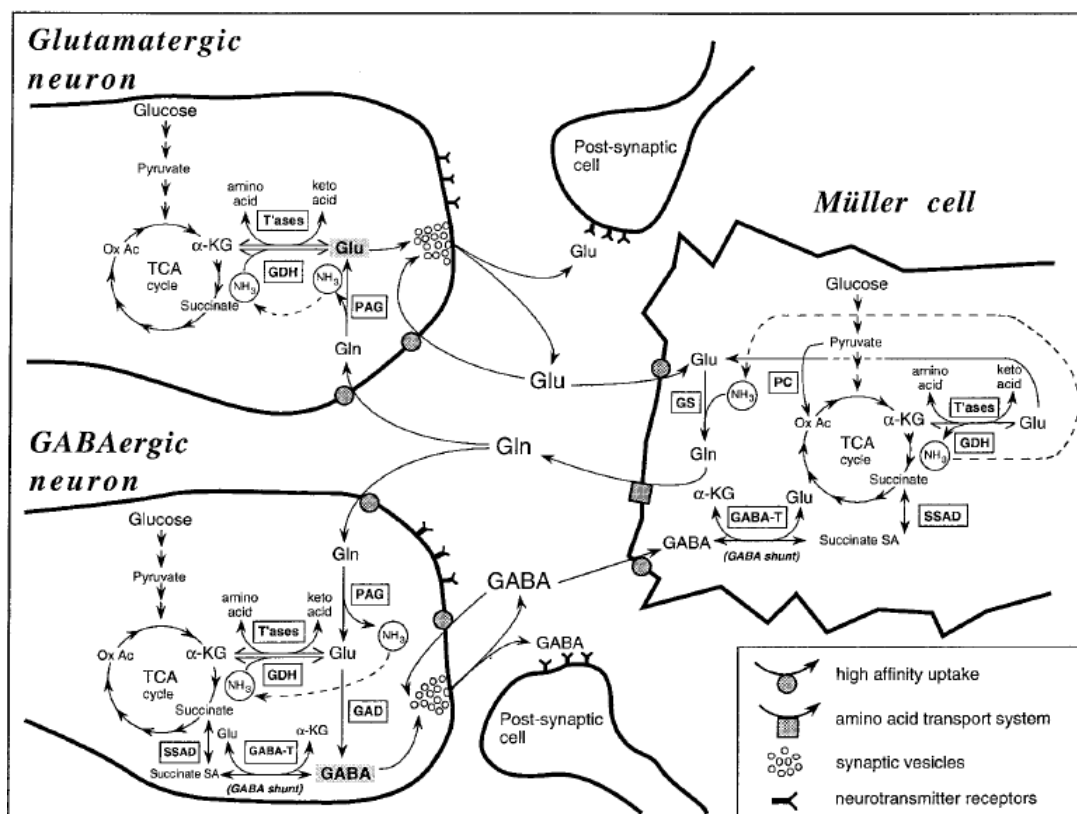
Η διεγέρτοτοξικότητα του γλουταμινικού οξέος στην ισχαιμία μπορεί να χωριστεί, επομένως, σε δύο μορφές, οξεία και καθυστερημένη (Lipton 1999, Εικόνα 6). Η οξεία διεγέρτοτοξικότητα οφείλεται πρώτιστα στην εισροή ιόντων Na^+ , Cl^- και ύδατος ως αποτέλεσμα της υπερβολικής εκπόλωσης και εμπλέκει όλους τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς. Η καθυστερημένη διεγέρτοτοξικότητα παρατηρείται απουσία των ιόντων Na^+ και Cl^- (Lipton 1994), εξαρτάται από τα ιόντα Ca^{2+} και σχετίζεται κυρίως με διέγερση των υποδοχέων NMDA καθώς και τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} .

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ Γ-ΑМИΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΙΣΤΟ

Κατά τη διάρκεια μιας ισχαιμικής προσβολής, είναι αναμενόμενο ότι και οι υπόλοιποι υποδοχείς νευροδιαβιβαστών θα είναι ενεργοποιημένοι λόγω των αυξημένων εξωκυττάριων επιπέδων των συνδετών τους (π.χ. ανασταλτικοί GABA και υποδοχείς γλυκίνης). Ωστόσο, σε αντίθεση με την διεγέρτοτοξική δράση του γλουταμινικού σε συνθήκες ισχαιμίας, ο ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής GABA, φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση, καθώς προκαλεί υπέρπόλωση της μεμβράνης εξουδετερώνοντας την εκπόλωση που προκαλεί το γλουταμινικό (Saransaari 2008). Ωστόσο, οι απόψεις διίστανται, καθώς οι Chen και συν. (1999) έδειξαν ότι σε καλλιέργειες αμφιβληστροειδούς σε κοτόπουλα, η αναστολή – και όχι η ενεργοποίηση – των υποδοχέων GABA/γλυκίνης διευκόλυνε την προστασία από την ισχαιμική προσβολή.

Ο τερματισμός της συναπτικής δράσης του GABA επιτυγχάνεται με την επαναπρόσληψή του στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις και τα περιβάλλοντα

νευρογλοιακά κύτταρα (Sarthy 1982, Osborne 1995, Εικόνα 7). Η επαναπρόσληψη του GABA γίνεται κυρίως μέσω υψηλής συγγένειας αντλιών GABA που συμμεταφέρουν δύο ιόντα νατρίου και ένα ιόν χλωρίου ανά μόριο GABA (Qian 1993). Απουσία νατρίου ή χλωρίου από τον εξωκυττάριο χώρο αναστέλλει πλήρως την πρόσληψη του GABA. Δεδομένου ότι το GABA είναι ηλεκτρικά ουδέτερο σε φυσιολογικό pH, η μεταφορά αυτή αυξάνει το θετικό φορτίο του ενδοκυττάριου χώρου και εκπολώνει την πλασματική μεμβράνη.



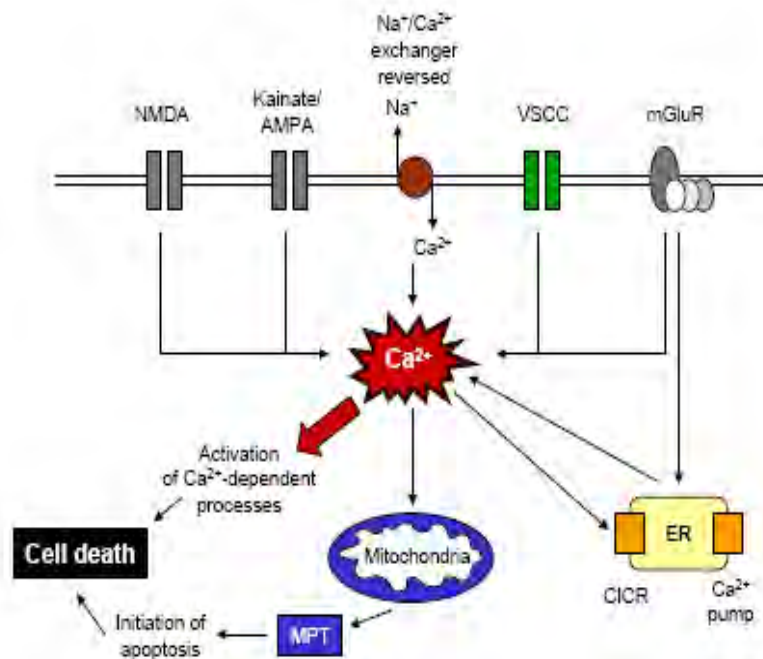
Εικόνα 7: Αλληλεπίδραση μεταξύ νευρώνων και νευρογλοιακών κυττάρων: Παραγωγή, επαναπρόσληψη και ανακύκλωση του γλουταμινικού οξέος και του GABA στον αμφιβληστροειδή των θηλαστικών. Απεικονίζονται επίσης οι γλυκολυτικές οδοί και οι αλληλεπιδράσεις με την παραγωγή των νευροδιαβιβαστών.

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 mM) ενδοκυττάριου 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 (Barnett 1995, Yazulla 1997, Takeo-Goto 2002). Η GABA-τρανσαμινάση εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Schousboe 1977). Έχει βρεθεί ότι σε διαβητικούς και ισχαιμικούς αμφιβληστροειδείς αρουραίων, το GABA συσσωρεύεται γρήγορα στα κύτταρα του Müller (Napper 2001) λόγω μείωσης της δραστηριότητας της GABA-τρανσαμινάσης (Barnett 1995). 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.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ Ca^{+2}

Είναι κοινή πεποίθηση ότι το Ca^{2+} κατέχει κεντρική θέση στο θάνατο των νευρικών κυττάρων σε ισχαιμία, που όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από διεγερτοτοξικότητα λόγω της μαζικής απελευθέρωσης γλουταμινικού (Εικόνα 8). Εφόσον η ισχαιμία ενεργοποιεί μια πληθώρα ανεπιθύμητων μηχανισμών, μερικές από τις οποίες δεν έχουν άμεση σχέση με το Ca^{2+} , ο ειδικός ρόλος της αύξησης του ενδοκυττάρου Ca^{2+} στην πρόκληση νευροτοξικότητας αποτελεί συχνό αντικείμενο μελέτης. Η ισχαιμία και άλλες καταστάσεις που οδηγούν στη μειωμένη παροχή ενέργειας συνοδεύονται από διαταραχή της ομοιόστασης, η οποία οδηγεί σε ταχεία μείωση του εξωκυττάρου Ca^{2+} (Nicholson 1977, Siemkowicz 1981), ενώ το ενδοκυττάριο Ca^{2+} αυξάνεται υπέρμετρα (Silver 1990). Σε ορισμένα κύτταρα, όπως οι CA1 πυραμιδικοί νευρώνες, η πρώιμη εισροή Ca^{2+} φαίνεται να πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο μέσω διαύλων που σχετίζονται με NMDA υποδοχείς (Lobner 1993). Εντούτοις, αυτοί οι υποδοχείς σύντομα αδρανοποιούνται και η μετέπειτα εισροή Ca^{2+} γίνεται μέσω τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} (25%), αντιμεταφορά $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (35%) και μέσω μιας άγνωστης οδού (Lobner 1993).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της διεγερτοτοξικότητας εκ γλουταμινικού οξέος στο νευρικό κύτταρο που οδηγεί στο θάνατο αυτού μέσω αύξησης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} .

Ο ρόλος της αύξησης του Ca^{2+} στην ισχαιμική βλάβη των κυττάρων αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας, παρόλο που γνωρίζουμε ότι το Ca^{2+} συσσωρεύεται στον ισχαιμικό ιστό και ότι η διαταραχή της ενδοκυττάριας ομοιόστασης του Ca^{2+} συχνά συνδέεται με πρόωμη βλάβη των κυττάρων (Nicotera 1998). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει μια σειρά αντιφατικών μελετών που υποστηρίζουν ότι η αύξηση του Ca^{2+} στον ισχαιμικό θάνατο των κυττάρων είναι ένα απλό επιφανόμενο (Cheung 1986). Για παράδειγμα, απουσία του Ca^{2+} από το μέσο επώασης απέτυχε να αναστείλει τη νευροεκφύλιση του αμφιβληστροειδούς σε κοτόπουλα μετά την έκθεση σε διεγερτοτοξικές ουσίες (Price 1985). Υπάρχουν επίσης στοιχεία από μελέτες κυτταροκαλλιιεργειών, που δείχνουν σαφώς ότι μια μικρή αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά έναντι της ισχαιμίας (Franklin 1992, Wang 2002). Ωστόσο, έχει πλέον αποδειχθεί ότι η παρατεταμένη αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} εμπλέκεται σε ποικίλες αντιδράσεις που συμμετέχουν στη νευροεκφύλιση. Ανάμεσα σ' αυτές είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών και μονοξειδίου του αζώτου (NO), η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 , η διάσπαση του DNA, η ενεργοποίηση των πρωτεασών και η

επακόλουθη βλάβη του κυτταροσκελετού (Lipton 1999, Nicotera 1999, Sattler 2001).

ΑΝΤΙΚΡΟΥΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟΨΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΗ

Από όσα έχουν αναφερθεί, γίνεται αντιληπτό ότι οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι η υπερβολική απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την ισχαιμία συμβάλλει στη βλάβη των νευρώνων. Μάλιστα, πολλοί μελετητές υποστηρίζουν ότι η απελευθέρωση του γλουταμινικού αυξάνεται όχι μόνο κατά την ισχαιμία, αλλά και κατά την υπογλυκαιμία και την υποξία (Madl 1999), συνθήκες που αποτελούν κατά κάποιο τρόπο επιμέρους «συνιστώσες» της ισχαιμίας. Ωστόσο, συχνά οι όροι «ισχαιμία» και «υποξία» χρησιμοποιούνται ως ταυτόσημοι. Επιπλέον, η υπογλυκαιμία και η ισχαιμία μπορεί να προκαλέσουν εκλεκτικές βλάβες σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, επομένως είναι πιθανόν να υπάρχουν διαφορές στην επίδραση αυτών των μεταβολικών προσβολών (Madl 1999). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι παράμετροι της ισχαιμίας (υπογλυκαιμία, υποξία, διαταραχή της λειτουργίας των μεταφορέων γλουταμινικού) προκαλούν διαφορετικές μορφές νευρωνικής βλάβης στον αμφιβληστροειδή *in vitro*. Η υπογλυκαιμία οδηγεί σε απώλεια φωτοϋποδοχέων, δίπολων, βραχύνων και γαγγλιακών κυττάρων (Luo 2001), ενώ η υποξία μόνο σε ελάττωση του αριθμού των γαγγλιακών κυττάρων σε σχέση με τις καλλιέργειες υπό νορμοξικές συνθήκες. Γι' αυτό, είναι αναγκαίο να μελετηθεί η διεγερτοτοξικότητα χωριστά για το κάθε είδος «μεταβολικής προσβολής» (ισχαιμία, υπογλυκαιμία, υποξία), ώστε να διευκρινιστεί η επίδραση των επιμέρους συνιστωσών στη διεγερτοτοξική βλάβη.

Ενώ πολλές μελέτες εστιάζονται στην επίδραση της ισχαιμίας και της υπογλυκαιμίας στο νευρικό κύτταρο, ελάχιστες και αντικρουόμενες αναφορές υπάρχουν σχετικά με την επίδραση της υπεργλυκαιμίας στο νευρικό ιστό, παρόλο που γνωρίζουμε ότι αποτελεί το πρώτο και συνήθως μακροχρόνιο στάδιο του σακχαρώδους διαβήτη. Είναι ενδιαφέρον ότι, σε αντίθεση με τον εγκέφαλο, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή πιθανόν να παρέχουν προστασία έναντι της ισχαιμικής βλάβης. Το φαινόμενο αναφέρθηκε για πρώτη

φορά από τον Buchi (1991) και επιβεβαιώθηκε από τον Romano (1993). Βρέθηκε ότι η ενδοφθάλμια παροχή γλυκόζης πριν ή κατά τη διάρκεια της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας ελάττωσε τη βαρύτητα των ισχαιμικών ιστολογικών μεταβολών. Πρόσφατες εργασίες επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα (Casson 2004). Παρατηρήθηκε, ότι προϋπάρχουσα υπεργλυκαιμία, παρέχει ουσιαστική λειτουργική και δομική προστασία στον ισχαιμούντα αμφιβληστροειδή. Η πιο πιθανή εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι ότι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο υαλοειδές σώμα των υπεργλυκαιμικών αρουραίων προκαλούν σχετική διατήρηση των επιπέδων του ATP μέσω αναερόβιας γλυκόλυσης κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τις θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ του ενεργειακού μεταβολισμού του αμφιβληστροειδούς και του εγκεφάλου. Σε σύγκριση με τον εγκέφαλο, η σχετική ανεξαρτησία του αμφιβληστροειδούς από τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό μπορεί να αξιοποιηθεί υπό αναερόβιες συνθήκες *in vivo* αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης στον υποξικό αμφιβληστροειδή. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη (Costa 2009) διαπιστώθηκε ότι η έκθεση κυττάρων αμφιβληστροειδούς αρουραίων σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, αυξάνουν την εξωκυττάρια συγκέντρωση του ATP, με ταυτόχρονη εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης και αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{+2} , γεγονότα που πιθανόν να ενεργοποιούν τη φλεγμονώδη αντίδραση που εμπλέκεται στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη.

Σχετικά με την απελευθέρωση του GABA, είναι γνωστό ότι κατά την ισχαιμία η απελευθέρωση των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών είναι ενισχυμένη σε μεγάλο βαθμό, οδηγώντας πολλούς ερευνητές στην άποψη ότι το GABA μπορεί ως ένα βαθμό να αντισταθμίσει τη γλουταμινεργική νευροτοξικότητα (Saransaari 2008). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν αναφέρουν προστατευτική επίδραση GABA αγωνιστών στον αμφιβληστροειδή αρουραίων σε μοντέλα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Traustason 2009) και έχει επίσης υποστηριχθεί ότι αυτή η δυσλειτουργία της GABAεργικής νευροδιαβίβασης κατά την ισχαιμία μπορεί να συμβάλει στον νευρωνικό θάνατο. Την άποψη αυτή στήριξαν πειραματικά δεδομένα από απομονωθέντα κύτταρα αμφιβληστροειδούς σε έμβρυα από κοτόπουλα. Βρέθηκε ότι μέρος του Cl^- που εισέρχεται στο κύτταρο με αποτέλεσμα το νευρωνικό θάνατο, μεταφέρεται μέσω των υποδοχέων GABA και γλυκίνης. Έτσι, ο αποκλεισμός των

υποδοχέων αυτών απέτρεψε το θάνατο των αμφιβληστροειδικών κυττάρων μετά από 1 ώρα ισχαιμίας (Chen 1999). Λόγω των αντικρουόμενων απόψεων, είναι σαφής η ανάγκη διεξαγωγής μελετών σχετικά με την απελευθέρωση και επαναπρόσληψη του GABA υπό ποικίλες μεταβολικές συνθήκες.

Τέλος, ενώ υπάρχει σχετική συμφωνία των διάφορων ερευνητών ως προς τις βλάβες που σχετίζονται με διεγερτοτοξικότητα σε βάθος χρόνου (π.χ. ανοσοϊστοχημικές μελέτες μετά από επίδραση μεταβολικών προσβολών διάρκειας > ημερών, μελέτες σε αμφιβληστροειδείς διαβητικών αρουραίων μετά από 12-14 εβδομάδες από την ένεση στρεπτοζοτοκίνης), δεν υπάρχουν σαφείς αναφορές σχετικά με την άμεση επίδραση των διάφορων μεταβολικών προσβολών κατά την πρώτη ώρα από την έναρξή τους. Το σύστημα *ex vivo* υπερδιάχυσης των ιστών που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας, παρέχει τη δυνατότητα συνεχούς παρακολούθησης της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών ($[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος και $[^3\text{H}]$ GABA) σε σχέση με το χρόνο, καθώς τα δείγματα συλλέγονται ανά 2 λεπτά και της μετέπειτα συγκριτικής ανάλυσης. Επίσης, το σύστημα αυτό επιτρέπει τη μελέτη χωριστά των επιμέρους μεταβολικών συνθήκες (νορμοξία, ισχαιμία, υπογλυκαιμία, υπεργλυκαιμία), και επομένως τη διερεύνηση τυχόν διαφορών στο μηχανισμό της διεγερτοτοξικότητας που αυτές προκαλούν. Δεδομένου ότι το παρόν σύστημα υπερδιάχυσης και συλλογής δειγμάτων επιτρέπει την απομάκρυνση των άχρηστων μεταβολικών προϊόντων, από τους ιστούς στην περίπτωση της ισχαιμίας επιτρέπει τη μελέτη δύο συνιστωσών της: τη στέρηση γλυκόζης και οξυγόνου.

Σκοπος

Το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν:

α) η *ex vivo* μελέτη της επίδρασης της ισχαιμίας, υποξίας, υπογλυκαιμίας και υπεργλυκαιμίας στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση (απελευθέρωση και επαναπρόσληψη) κατά την πρώτη ώρα μετά την έναρξη της εκάστοτε μεταβολικής προσβολής, και

β) Η μελέτη της δράσης του Ca^{2+} στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση (απελευθέρωση) κατά την πρώτη ώρα μετά την έναρξη της εκάστοτε μεταβολικής προσβολής.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

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 επιλέχθηκαν ζώα ηλικίας 4-6 εβδομάδων τα οποία αναισθητοποιούνται με αιθέρα και στη συνέχεια αποκεφαλίζονται. 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.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ

Οι απομονωθέντες ιστοί επωάζονται σε διαρκώς οξυγονωμένο (95%O₂/5%CO₂) διάλυμα arti-CSF που περιέχει 200nM [³H] D-Ασπαρτικού οξέος για 45min στους 37°C. Το [³H]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 MgSO₄, 25mM NaHCO₃, 1.2mM KH₂PO₄, 11mM glucose, 1.3mM CaCl₂, pH =7.4.

ΥΠΕΡΔΙΑΧΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μετά από την επώαση των 45min, οι ιστοί ξεπλένονται με arti-CSF και τοποθετούνται στα δοχεία του συστήματος υπερδιάχυσης. Αρχικά, όλοι οι ιστοί διαχέονται για μία ώρα (ροή arti-CSF: 1.2 ml/min θερμοκρασία 37°C) υπό οξυγόνωση (95%O₂/5%CO₂). Μετά το πέρας της 1 ώρας συλλέγουμε δείγματα ανά 2min. Η επίδραση των μεταβολικών προσβολών (metabolic insults) ξεκινά 26min μετά την έναρξη συλλογής δειγμάτων (t=0) και διαρκεί συνολικά 64min. Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (διάχυση με διάλυμα arti-CSF 95%O₂/5%CO₂), μελετήσαμε τη δράση (i) της ισχαιμίας (arti-CSF 95%N₂/5%CO₂ με αντικατάσταση της γλυκόζης από σουκρόζη), (ii) της υποξίας (arti-CSF 95%N₂/5%CO₂), (iii) της υπογλυκαιμίας (arti-CSF 95%O₂/5%CO₂ με αντικατάσταση της γλυκόζης από σουκρόζη) και (iv) της υπεργλυκαιμίας (διάλυμα arti-CSF 95%O₂/5%CO₂ με 30mM γλυκόζης) στην απελευθέρωση του [³H]D-Ασπαρτικού οξέος (ως αντικαταστάτη του γλουταμινικού οξέος) και του [³H]GABA.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στο τέλος κάθε πειράματος οι ιστοί διαλύθηκαν σε 0.5ml Soluene-350. Στη συνέχεια μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε τρίτιο τόσο των ιστών όσο και αυτή των δειγμάτων με τη προσθήκη 2ml διαλύματος Ultima Gold/δείγμα και τη βοήθεια μετρητή β-ακτινοβολίας. Η εκροή τριτίου ανά δείγμα υπολογίστηκε με βάση την ποσότητα που υπήρχε στον ιστό πριν από τη συλλογή του δείγματος (fractional rate; min⁻¹). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό εκροής σε σχέση με τα αρχικά δείγματα των -26 και -14min πριν την έναρξη των μεταβολικών προσβολών.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Έγιναν two-way ANOVA και one-way ANOVA ανάλυση με post-hoc tests και διόρθωση κατά Bonferroni, ώστε να διαπιστωθούν τυχόν

διαφορές στην απελευθέρωση και επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών μεταξύ των ιστών-μαρτύρων και των ιστών υπό την επίδραση των ποικίλων μεταβολικών προσβολών (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ

Για τις μελέτες επαναπρόσληψης, οι απομονωθέντες ιστοί επωάζονται σε διαρκώς οξυγονωμένο ($95\%O_2/5\%CO_2$) διάλυμα arti-CSF που περιέχει 40nM [3H] D-Ασπαρτικού οξέος ή [3H] GABA για 45min στους $37^\circ C$ υπό φυσιολογικές συνθήκες, συνθήκες ισχαιμίας, υποξίας, υπογλυκαιμίας και υπεργλυκαιμίας (βλ. παραπάνω). Κατόπιν οι ιστοί ξεπλένονται με παγωμένο διάλυμα arti-CSF και διαλύονται σε Soluene-100. Στο τέλος κάθε πειράματος μετρήθηκε η περιεκτικότητα των ιστών σε τρίτιο με τη βοήθεια μετρητή β-ακτινοβολίας και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε fmol/mg πρωτεΐνης.

ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

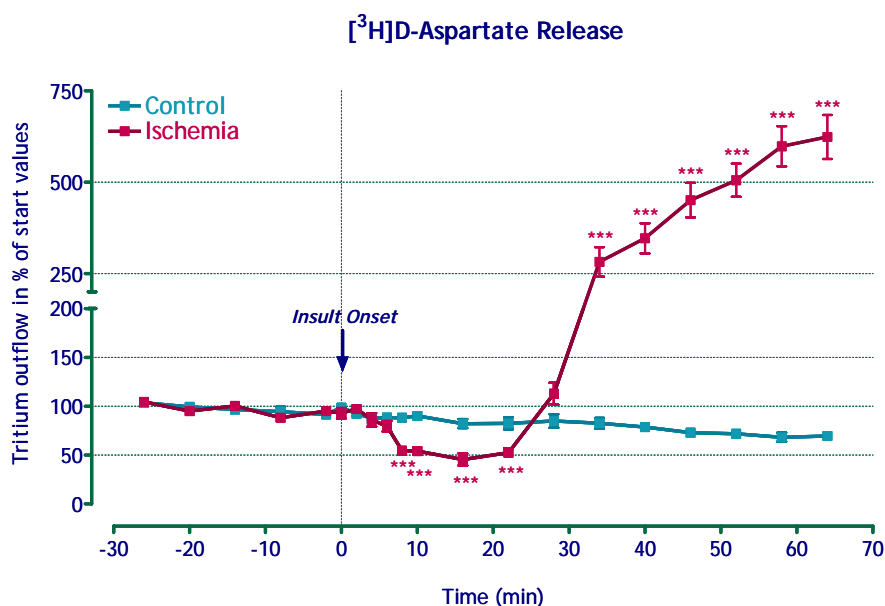
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χημικές ουσίες: [3H]D-ασπαρτικό οξύ (GE Healthcare LTD-H.B.), [3H]GABA (GE Healthcare LTD-H.B.), Soluene-350 (PerkinElmer-H.Π.Α.) και Ultima Gold (PerkinElmer-H.Π.Α.). Οι υπόλοιπες ουσίες προέρχονται από την εταιρεία Sigma (Γερμανία).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΙΣΧΑΙΜΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Βρέθηκε ότι στον αμφιβληστροειδή η ισχαιμία σχετίζεται με διφασική πορεία της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος, προκαλώντας αρχικά μείωση η οποία φτάνει μέχρι και -50% ($p < 0.001$) της βασικής απελευθέρωσης, ενώ η αύξηση της απελευθέρωσης του ραδιενεργού λόγω της ισχαιμίας ξεκινά 30min μετά την εφαρμογή της (Εικόνα 9).

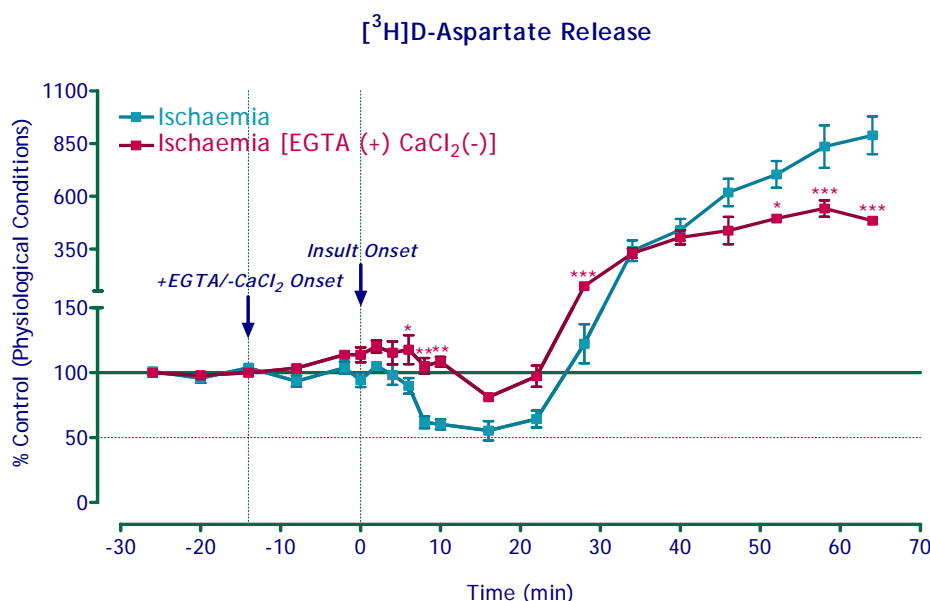


Εικόνα 9: Επίδραση της Ισχαιμίας στην απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή.

Αντίθετα, σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση ισχαιμίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε μόνο μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του ασπαρτικού στο χρόνο (Εικόνα 9).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ Ca^{++} -ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ $[^3\text{H}]$ D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Προκειμένου να μελετήσουμε, αν η απελευθέρωση του $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος σε συνθήκες ισχαιμίας είναι ασβεστιο-εξαρτώμενη, στο διάλυμα υπερδιάχυσης προσθέσαμε τον χηλικό παράγοντα EGTA, ο οποίος δεσμεύει τα ελεύθερα ιόντα Ca^{+2} , ενώ παραλείψαμε το CaCl_2 -14min πριν την έναρξη της ισχαιμίας. Πράγματι, βρέθηκε ότι αρχικά δεν παρατηρείται η μείωση της απελευθέρωσης του $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος. Επίσης, η αύξηση της απελευθέρωσης του ραδιενεργού απουσία Ca^{+2} είναι μεγαλύτερη αρχικά (~25min μετά την εφαρμογή της ισχαιμίας, $p < 0.001$), αλλά τελικά φτάνει σε χαμηλότερα επίπεδα της τάξεως του +500% ($p < 0.001$) σε σύγκριση με εκείνα που παρατηρούνται παρουσία Ca^{+2} (Εικόνα 10).

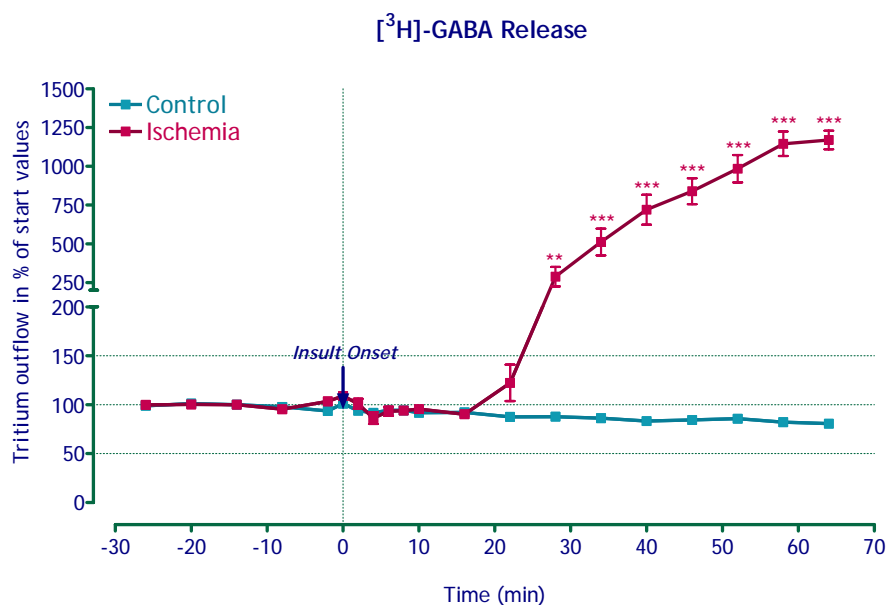


Εικόνα 10: Επίδραση της Ισχαιμίας στην απελευθέρωση $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή απουσία Ca^{+2} .

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [^3H] GABA

Τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε [^3H]GABA πραγματοποιήθηκαν παρουσία 0.2mM αμινο-οξικού οξέος (aminooxyacetic acid, AOAA, αναστολέας της απαμίνωσης του GABA) με συνέπεια να παρεμποδίζεται η αποικοδόμηση του [^3H]GABA κατά τη διάρκεια του πειράματος.

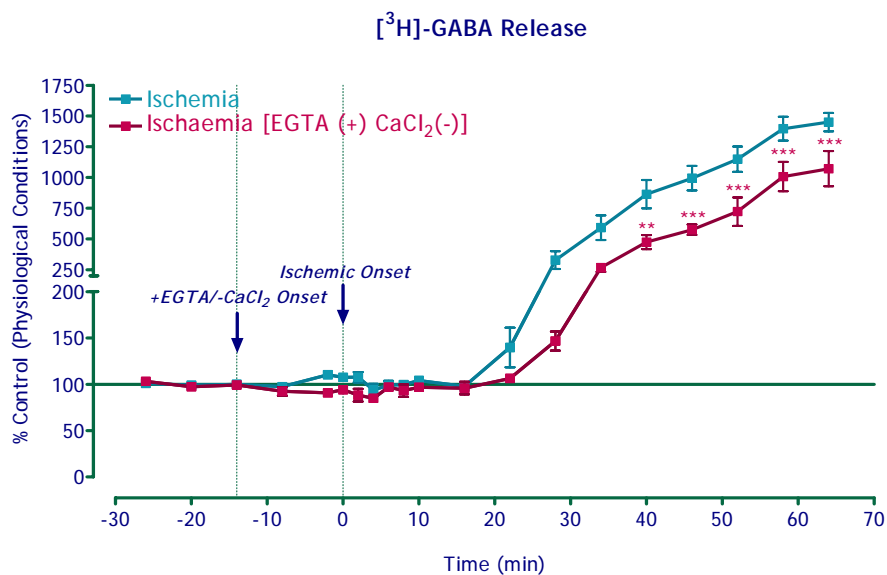
Παρατηρήθηκε ότι η ισχαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του [^3H]GABA η οποία ξεκινά 30min μετά την εφαρμογή της (Εικόνα 11). Αντίθετα, σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση ισχαιμίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε μόνο μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του [^3H]GABA στο χρόνο (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Επίδραση της Ισχαιμίας στην απελευθέρωση [^3H]GABA από τον αμφιβληστροειδή.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ Ca^{++} -ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ $[^3\text{H}]$ GABA

Σε συνθήκες ισχαιμίας απουσία Ca^{+2} , η παρατηρούμενη αύξηση της απελευθέρωσης του $[^3\text{H}]$ GABA διατηρείται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με την απελευθέρωση του $[^3\text{H}]$ GABA παρουσία Ca^{+2} ($p < 0.001$) (40 ως 64min μετά την εφαρμογή της ισχαιμίας, Εικόνα 12).



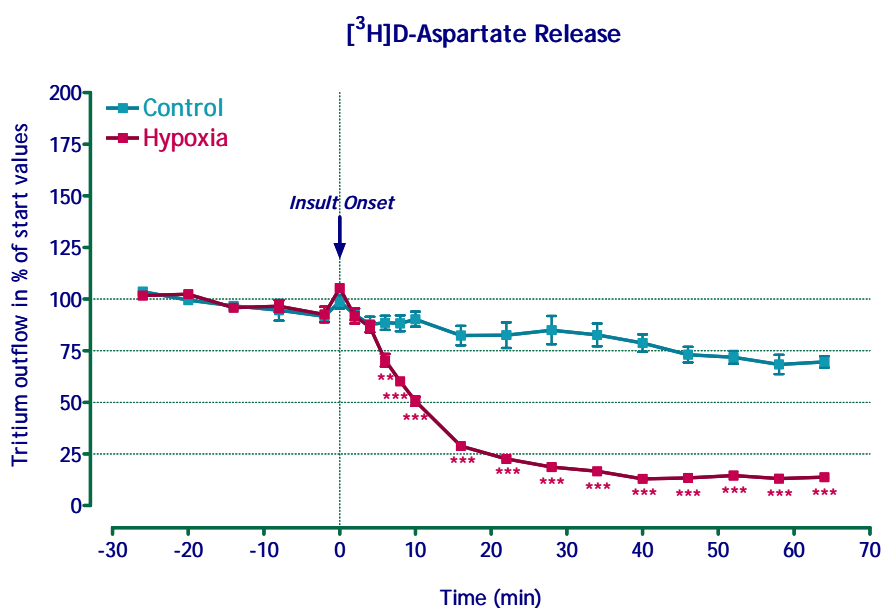
Εικόνα 12: Επίδραση της Ισχαιμίας στην απελευθέρωση $[^3\text{H}]$ GABA από τον αμφιβληστροειδή απουσία Ca^{+2} .

ΥΠΟΞΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Βρέθηκε ότι η υποξία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος καθ' όλη τη διάρκεια επίδρασης, η οποία ξεκινά περίπου 6min μετά την έναρξη της υποξίας και φτάνει μέχρι 15.8±1.4% (p<0.001) της βασικής απελευθέρωσης 64min μετά (Εικόνα 13).

Σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση υποξίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε, όπως έχει αναφερθεί, μόνο μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του ασπαρτικού στο χρόνο (Εικόνα 13).

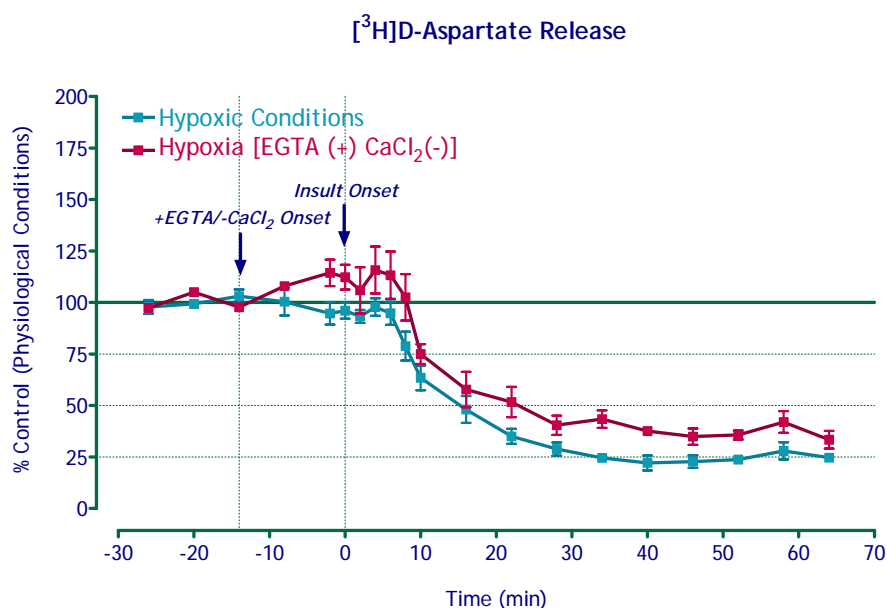


Εικόνα 13: Επίδραση της Υποξίας στην απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή.

Σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση υποξίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε, όπως έχει αναφερθεί, μόνο μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του ασπαρτικού στο χρόνο (Εικόνα 13).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ Ca^{++} -ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ $[^3\text{H}]$ D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

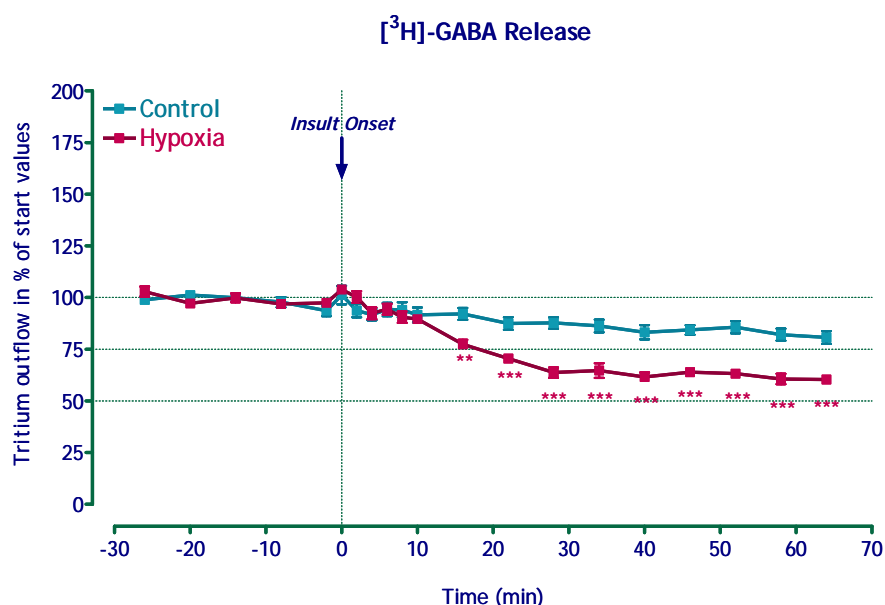
Απουσία Ca^{+2} κατά την υποξία, η απελευθέρωση του $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος είναι επίσης μειωμένη, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την απελευθέρωση παρουσία Ca^{+2} ($p < 0.001$, Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Επίδραση της Υποξίας στην απελευθέρωση $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή απουσία Ca^{+2} .

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] GABA

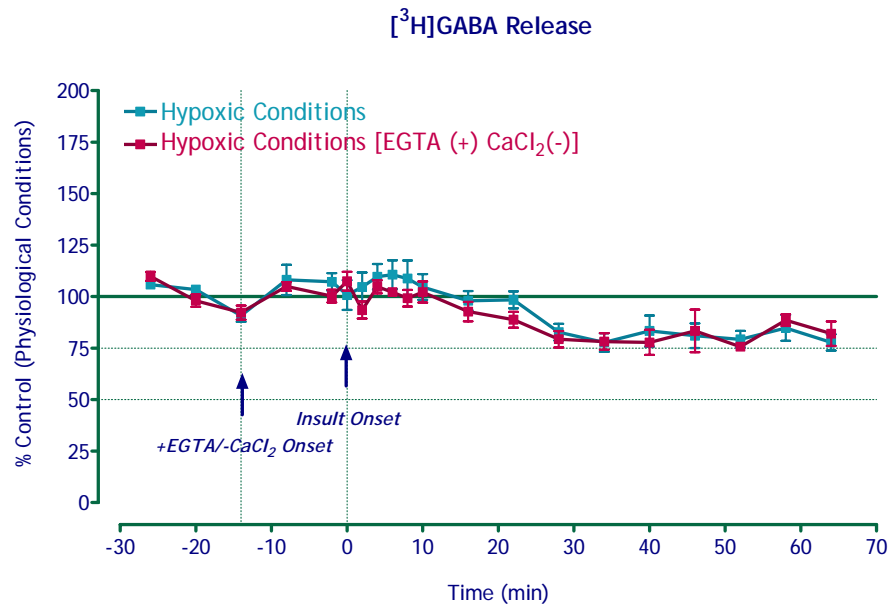
Βρέθηκε ότι η υποξία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του [³H]GABA η οποία ξεκινά 16min μετά την εφαρμογή της και φτάνει μέχρι 77.7±3.0% (p<0.001)) της βασικής απελευθέρωσης 54min μετά. (Εικόνα 15). Σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση ισχαιμίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε μόνο μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του [³H]GABA στο χρόνο (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Επίδραση της Υποξίας στην απελευθέρωση [³H]GABA από τον αμφιβληστροειδή.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ Ca^{++} -ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ $[^3\text{H}]$ GABA

Η απελευθέρωση του $[^3\text{H}]$ GABA φαίνεται να μην επηρεάζεται από την απουσία Ca^{+2} κατά την υποξία (Εικόνα 16).

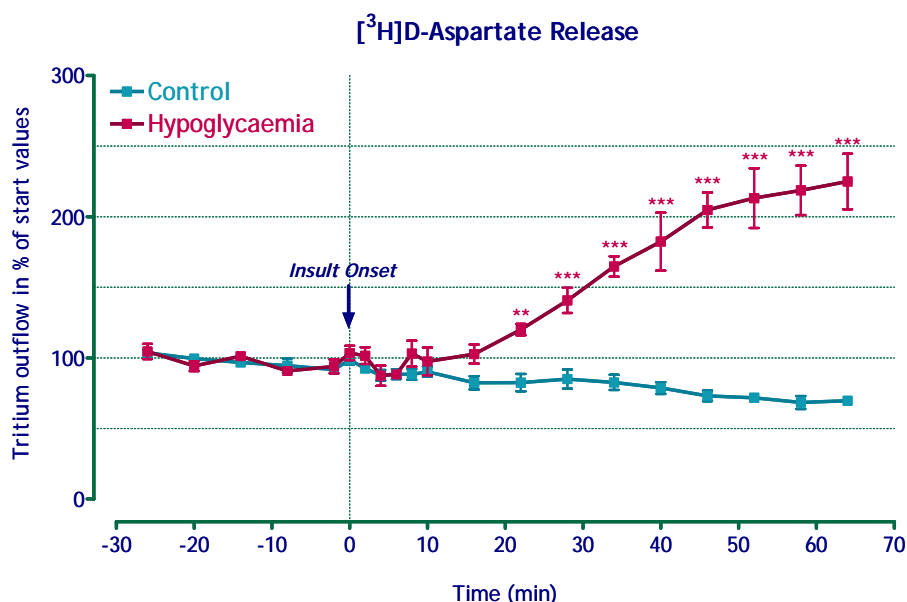


Εικόνα 16: Επίδραση της Υποξίας στην απελευθέρωση $[^3\text{H}]$ GABA από τον αμφιβληστροειδή απουσία Ca^{+2} .

ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

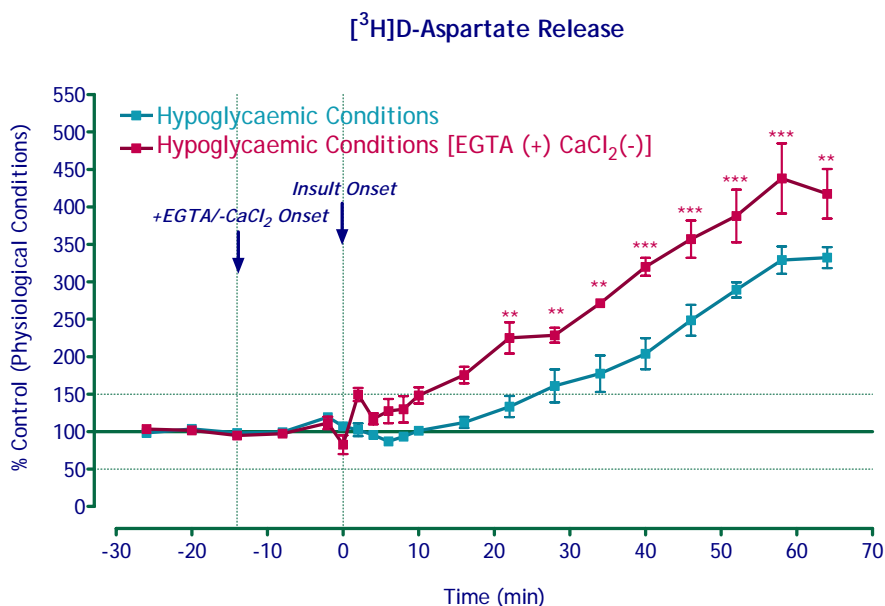
Παρατηρήθηκε ότι η υπογλυκαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος καθ' όλη τη διάρκεια της επίδρασης, η οποία ξεκινά περίπου 22min μετά την έναρξη της υπογλυκαιμίας και φτάνει μέχρι και 314.1±29.1% (p<0.001) της βασικής απελευθέρωσης 52min μετά (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ Ca^{++} -ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ $[^3\text{H}]$ D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

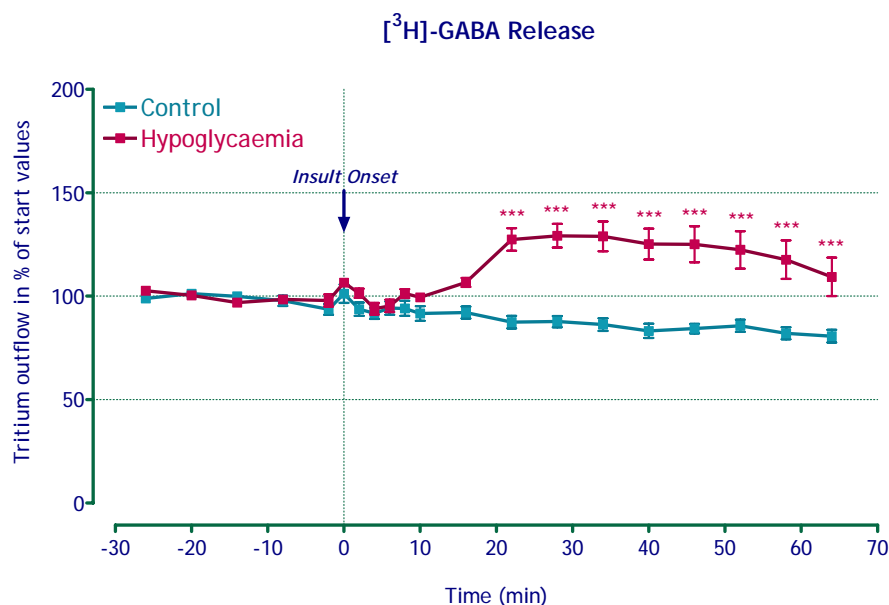
Παρατηρήθηκε ότι η υπογλυκαιμία απουσία Ca^{+2} προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος ($p < 0.001-0.01$, Εικόνα 18)



Εικόνα 18: Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην απελευθέρωση $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή απουσία Ca^{+2} .

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] GABA

Παρατηρήθηκε ότι η υπογλυκαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του [³H]GABA η οποία ξεκινά 16min μετά την εφαρμογή της και φτάνει μέχρι και 141.1±4.6% της βασικής απελευθέρωσης 22min μετά (p<0.001, Εικόνα 19).

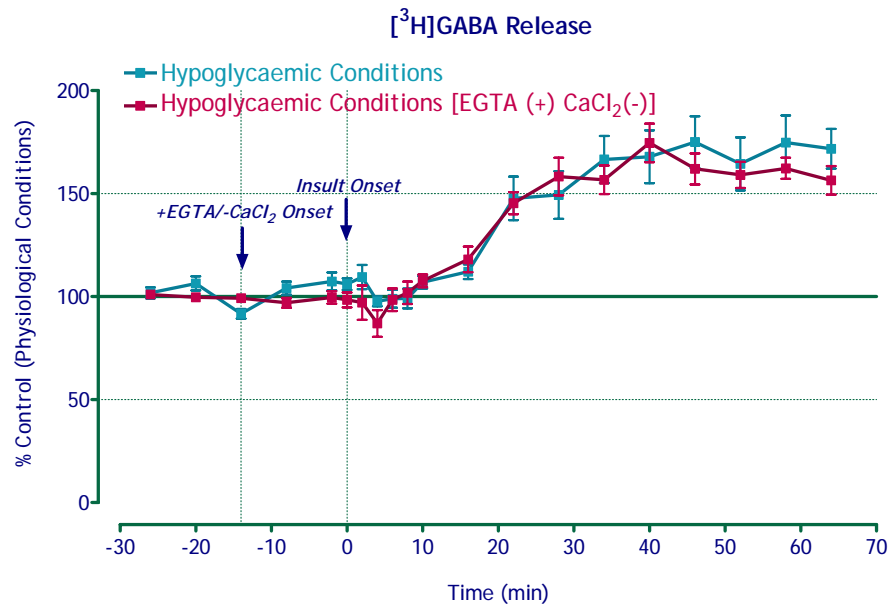


Εικόνα 19: Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην απελευθέρωση [³H]GABA από τον αμφιβληστροειδή.

Αντίθετα, σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση ισχαιμίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του [³H]GABA στο χρόνο (Εικόνα 19).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ Ca^{++} -ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ $[^3\text{H}]$ GABA

Η απελευθέρωση του $[^3\text{H}]$ GABA φαίνεται να μην επηρεάζεται από την απουσία Ca^{+2} κατά την υπογλυκαιμία (Εικόνα 20).

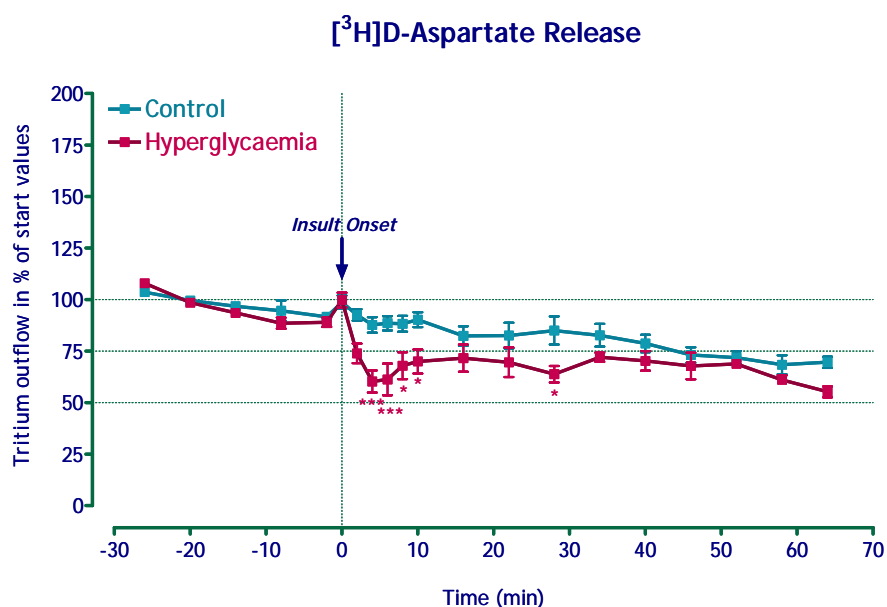


Εικόνα 20: Επίδραση της Υπογλυκαιμίας στην απελευθέρωση $[^3\text{H}]$ GABA από τον αμφιβληστροειδή απουσία Ca^{+2} .

ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

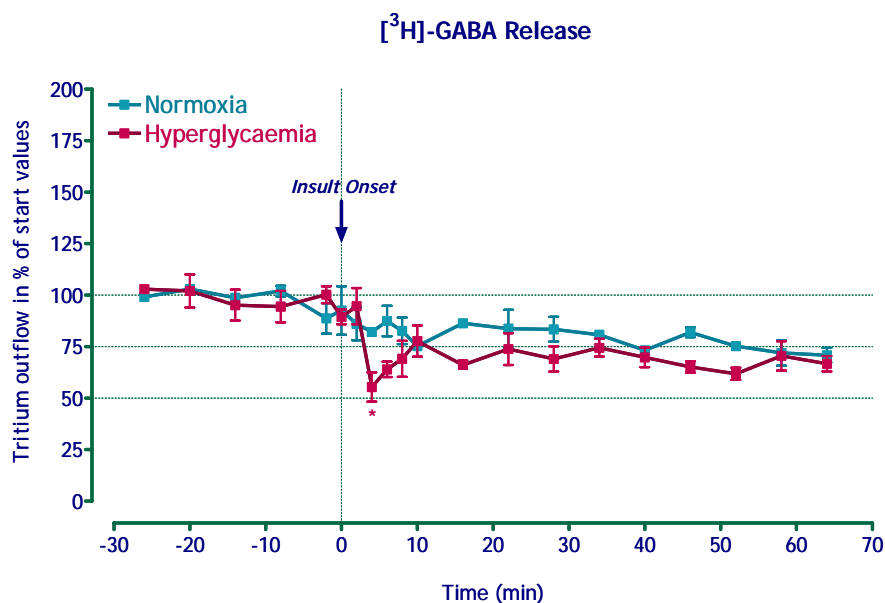
Διαπιστώθηκε ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος, η οποία φτάνει μέχρι και $66.3 \pm 5.9\%$ της βασικής απελευθέρωσης 4 min μετά την έναρξη της επίδρασης ($p < 0.001$). Στη συνέχεια, η απελευθέρωση του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος αυξάνεται ελάχιστα και διατηρείται σε χαμηλότερο -στατιστικώς μη σημαντικό- επίπεδο σε σχέση με την βασική απελευθέρωση (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Επίδραση της Υπεργλυκαιμίας στην απελευθέρωση [³H] D-Ασπαρτικού Οξέος από τον αμφιβληστροειδή.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ [³H] GABA

Διαπιστώθηκε ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του [³H]GABA η οποία ξεκινά 4min μετά την εφαρμογή της και φτάνει μέχρι $60.3 \pm 7.7\%$ της βασικής απελευθέρωσης ($p < 0.001$, Εικόνα 22). Στη συνέχεια, η απελευθέρωση του [³H]GABA διατηρείται σε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα -μη στατιστικώς σημαντικά- σε σχέση με τη βασική απελευθέρωση. Σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την επίδραση ισχαιμίας καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπήρξε μια μικρή μείωση στην απελευθέρωση του [³H]GABA στο χρόνο (Εικόνα 22).

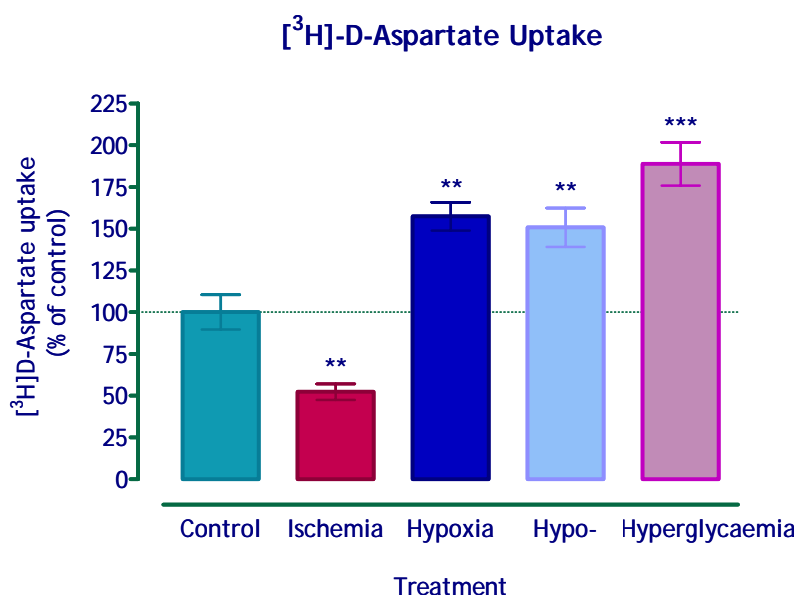


Εικόνα 22: Επίδραση της Υπεργλυκαιμίας στην απελευθέρωση [³H]GABA από τον αμφιβληστροειδή.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗΣ

ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΟΥ [^3H] D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ, ΥΠΟΞΙΑΣ, ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ

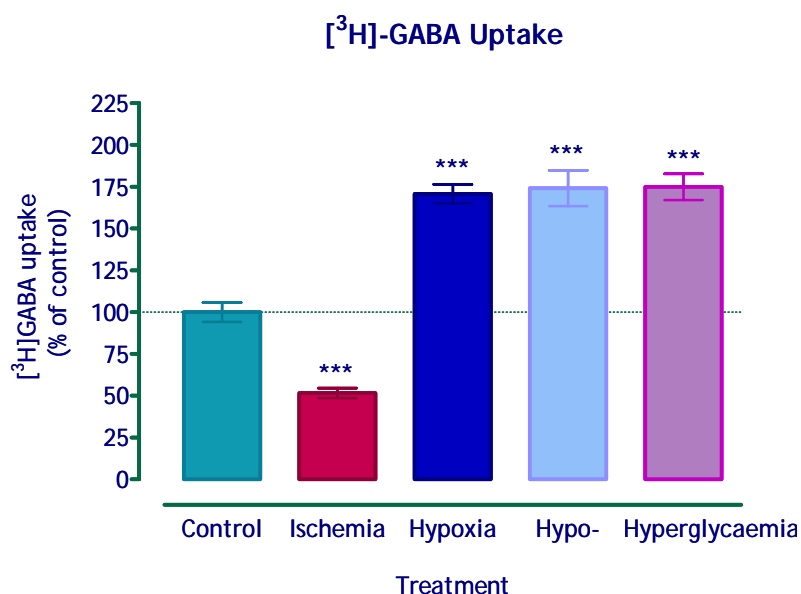
Παρατηρήθηκε ότι η ισχαιμία μείωσε την επαναπρόσληψη του [^3H] D-Ασπαρτικού οξέος στο $52.3 \pm 4.7\%$ ($p < 0.01$) σε σχέση με την επαναπρόσληψη σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ η υποξία, η υπογλυκαιμία και η υπεργλυκαιμία αύξησαν την επαναπρόσληψη του [^3H] D-Ασπαρτικού οξέος στα $157.4 \pm 8.5\%$ ($p < 0.001$), $150.7 \pm 11.7\%$ ($p < 0.001$) και $188.8 \pm 12.9\%$ ($p < 0.001$), αντίστοιχα (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Επίδραση μεταβολικών προσβολών στην επαναπρόσληψη του [^3H] D-Ασπαρτικού οξέος.

ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΟΥ [³H] GABA ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ, ΥΠΟΞΙΑΣ, ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ

Παρατηρήθηκε ότι η ισχαιμία μείωσε την επαναπρόσληψη του [³H]GABA στο $51.6 \pm 2.9\%$ ($p < 0.001$) σε σχέση με την επαναπρόσληψη σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ η Υποξία, η Υπογλυκαιμία και η Υπεργλυκαιμία αύξησαν την επαναπρόσληψη του [³H]GABA στα $170.7 \pm 5.7\%$ ($p < 0.001$), $174.1 \pm 10.7\%$ ($p < 0.001$) και $174.8 \pm 7.9\%$ ($p < 0.001$), αντίστοιχα (Εικόνα 24).



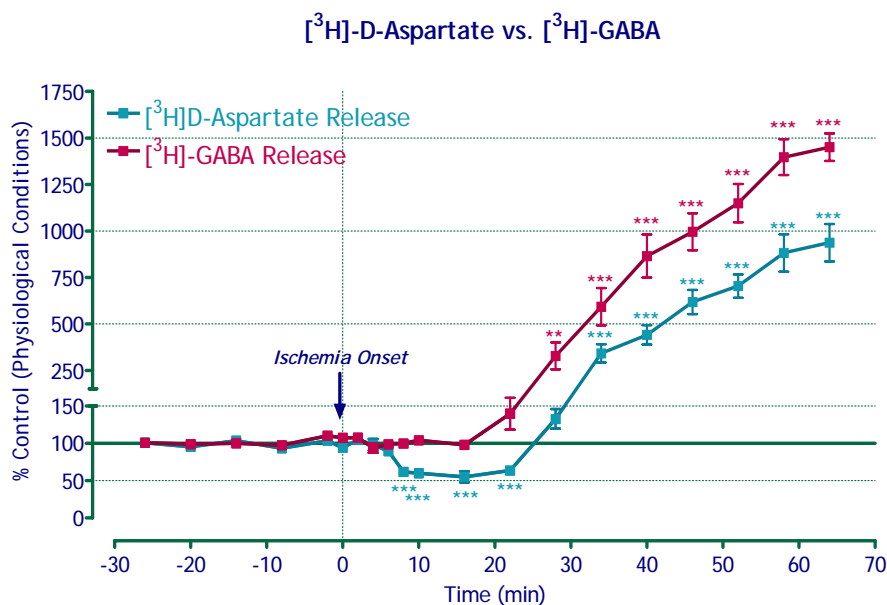
Εικόνα 24: Επίδραση μεταβολικών προσβολών στην επαναπρόσληψη του [³H]GABA.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΤΟΥ $[^3\text{H}]\text{GABA}$ ΚΑΙ ΤΟΥ $[^3\text{H}]$ D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ

ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ

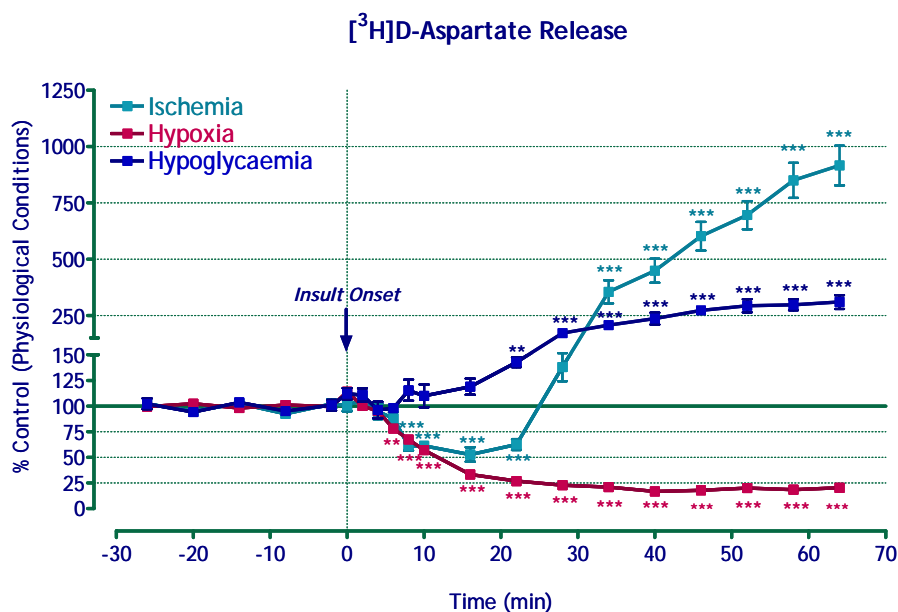
Σε συνθήκες ισχαιμίας, η απελευθέρωση του $[^3\text{H}]\text{GABA}$ ήταν υψηλότερη από εκείνη του $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος, φτάνοντας στο $1450.6 \pm 74.2\%$ και στο $957.5 \pm 103.1\%$ αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα της απελευθέρωσης σε δείγματα που διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Σύγκριση μεταξύ της απελευθέρωσης του $[^3\text{H}]\text{GABA}$ και του $[^3\text{H}]$ D-Ασπαρτικού οξέος σε συνθήκες Ισχαιμίας.

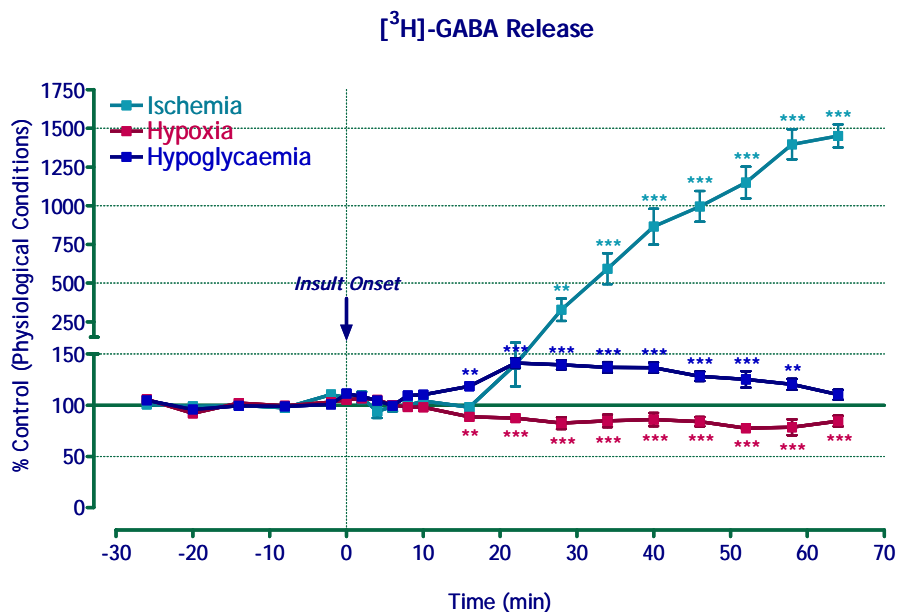
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΤΟΥ [³H] D-ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ, ΥΠΟΞΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ

Σύμφωνα με τη μελέτη μας, η ισχαιμία προκαλεί αρχικά μείωση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος η οποία ακολουθείται από αύξηση της απελευθέρωσής του 30min μετά την εφαρμογή της (Εικόνα 26). Η υποξία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος καθ' όλη τη διάρκεια επίδρασης, η οποία ξεκινά 6min μετά την έναρξη της υποξίας (Εικόνα 26). Τέλος, η υπογλυκαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος, η οποία ξεκινά 22min μετά την εφαρμογή της (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Απελευθέρωση του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος σε συνθήκες Ισχαιμίας, Υποξίας και Υπογλυκαιμίας.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΤΟΥ [³H] GABA ΜΕΤΑΞΥ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ, ΥΠΟΞΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ



Εικόνα 27: Απελευθέρωση του [³H] GABA σε συνθήκες Ισχαιμίας, Υποξίας και Υπογλυκαιμίας.

Σχετικά με την απελευθέρωση του [³H] GABA, η ισχαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του [³H] GABA, η οποία ξεκινά 30min μετά την εφαρμογή της (ταυτόχρονα με την αύξηση της απελευθέρωσης του [³H] D-Ασπαρτικού οξέος, Εικόνα 27). Η υποξία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του [³H] GABA η οποία ξεκινά 16min μετά την έναρξη της (Εικόνα 27). Τέλος, η υπογλυκαιμία προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης του [³H]GABA η οποία ξεκινά 16min μετά την εφαρμογή της (Εικόνα 27).

Τα αποτελέσματα των μελετών απελευθέρωσης και επαναπρόσληψης [³H] D-Ασπαρτικού οξέος και [³H] GABA φαίνονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα .

[³H]- Νευροδιαβιβαστής	Προσβολή	Απελευθέρωση	Απελευθέρωση απουσία Ca⁺⁺	Επαναπρόσληψη
[³H]D-Aspartate	<i>Ισχαιμία</i>	Διφασική (↓↓ ακολουθούμενη από ↑↑↑)	Διφασική (↓ ακολουθούμενη από ↑↑)	↓
	<i>Υποξία</i>	↓↓↓	↓↓	↑
	<i>Υπογλυκαιμία</i>	↑↑	↑↑↑	↑
	<i>ΥΠΕΡγλυκαιμία</i>	Αρχικά ↓	Δ.Μ.	↑
[³H]GABA	<i>Ισχαιμία</i>	↑↑↑↑	↑↑↑	↓
	<i>Υποξία</i>	↓	↓	↑
	<i>Υπογλυκαιμία</i>	↑	↑	↑
	<i>ΥΠΕΡγλυκαιμία</i>	Αρχικά ↓	Δ.Μ.	↑

Δ.Μ.: Δε μελετήθηκε

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις μελέτες μας, οδηγηθήκαμε στα εξής συμπεράσματα:

Η ισχαιμία και σε μικρότερο βαθμό η υπογλυκαιμία προάγουν την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος, δηλαδή προκαλούν διεγερτοτοξικότητα. Αντίθετα, η υποξία προκαλεί μείωση της απελευθέρωσης του νευροδιαβιβαστή. Ανάλογη επίδραση έχουν αυτές οι μεταβολικές προσβολές και στην απελευθέρωση του GABA. Οι δράσεις των δύο συνιστωσών της ισχαιμίας στην απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος διαχωρίζονται χρονικά: (i) μείωση (υποξία), η οποία ακολουθείται από (ii) αύξηση (υπογλυκαιμία) της απελευθέρωσης του νευροδιαβιβαστή. Το φαινόμενο αυτό ίσως οφείλεται στην αντοχή του αμφιβληστροειδούς μέσω των αποθεμάτων γλυκόζης που διαθέτει. Η αρχική μείωση που παρατηρείται ανάλογα με την υποξία, πιθανόν να αντικατοπτρίζει μια αναστολή στη νευροδιαβίβαση προκειμένου το κύτταρο να εξοικονομήσει ενέργεια για να αντιμετωπίσει το επικείμενο μεταβολικό σοκ. Αυτό επιτυγχάνεται εξυπηρετώντας μόνο τις βασικές μεταβολικές του ανάγκες μέσω των αποθεμάτων γλυκόζης που διαθέτει. Η περαιτέρω αύξηση αντίστοιχα προς την υπογλυκαιμία πιθανόν να οφείλεται στην εξάντληση της γλυκόζης που έχει ως αποτέλεσμα τη διεγερτοτοξικότητα. Επιπλέον, βρήκαμε ότι η υπογλυκαιμία προάγει σε μικρότερο βαθμό την απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος και GABA από ότι η ισχαιμία. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν παρατηρείται εξαιτίας της εύρυθμης λειτουργίας των αντλιών επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών κατά την υπογλυκαιμία.

Αντίθετα, η υποξία και σε μικρότερο βαθμό η υπεργλυκαιμία μειώνουν την αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση, (i) ελαττώνοντας την απελευθέρωση, και (ii) αυξάνοντας την επαναπρόσληψη του γλουταμινικού και του GABA. Αν συγκρίνουμε τα επίπεδα γλουταμινικού οξέος και GABA, η αύξηση της απελευθέρωσης του GABA κατά την ισχαιμία υπερτερεί εκείνης του γλουταμινικού οξέος και προηγείται χρονικά. Επιπλέον, η ισχαιμία μειώνει την επαναπρόσληψη του GABA. Εντούτοις, τα αυξημένα επίπεδα GABA δεν φαίνεται να είναι ικανά να αναστείλουν πλήρως την απελευθέρωση γλουταμινικού πιθανόν λόγω μειωμένης επαναπρόσληψης του γλουταμινικού.

Σχετικά με την επίδραση του Ca^{+2} , βρήκαμε ότι η απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την ισχαιμία είναι εν μέρει Ca^{+2} -εξαρτώμενη. Το γεγονός αυτό ίσως σχετίζεται με την αναστολή της κυστιδιακής απελευθέρωσης του γλουταμινικού, εφόσον προς το τέλος του πειράματος παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα γλουταμινικού απουσία Ca^{+2} . Ρόλο στην περίπτωση αυτή πιθανόν επίσης να παίζει και η αναστροφή της αντλίας $\text{Ca}^{+2}\text{-Na}^+$, πιο συγκεκριμένα στα αρχικά στάδια, όπου βρήκαμε υψηλότερα επίπεδα γλουταμινικού απουσία Ca^{+2} . Η έλλειψη Ca^{+2} με το οποίο μπορεί το ενδοκυττάριο Na^+ να ανταλλάγει για να βγει από το κύτταρο, προκαλεί αναστροφή της αντλίας $\text{Ca}^{+2}\text{-Na}^+$ και ενεργοποίηση της αντλίας που βγάζει H^+/Na^+ και γλουταμινικό από το κύτταρο. Η απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την υποξία και την υπογλυκαιμία είναι επίσης εν μέρει Ca^{+2} -εξαρτώμενη. Ρόλο στην περίπτωση αυτή πιθανόν παίζει η αναστροφή της αντλίας $\text{Ca}^{+2}\text{-Na}^+$, εφόσον απουσία Ca^{+2} η απελευθέρωση του γλουταμινικού αυξάνεται. Τέλος, και η απελευθέρωση του GABA κατά την ισχαιμία είναι εν μέρει Ca^{+2} -εξαρτώμενη. Το γεγονός αυτό πιθανά σχετίζεται με την αναστολή της κυστιδιακής απελευθέρωσης του GABA, εφόσον απουσία Ca^{+2} παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή. Η απελευθέρωση του GABA κατά την υποξία και την υπογλυκαιμία δε φαίνεται να εξαρτώνται από το Ca^{+2} . Κατά συνέπεια, υπό αυτές τις συνθήκες δε φαίνεται να επηρεάζεται η κυστιδιακή απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Λάμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η υποξία και η υπογλυκαιμία δε φαίνεται να επηρεάζουν την κυστιδιακή απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος και του GABA σε αντίθεση με τον συνδυασμό τους (ισχαιμία).

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με εκείνα των Torp και συν. (1993), που μελέτησαν την επίδραση της ισχαιμίας στην εξω- και ενδοκυττάρια κατανομή του γλουταμινικού, του ασπαρτικού και του GABA στον ιππόκαμπο αρουραίου. Οι συγγραφείς βρήκαν ότι οι εξωκυττάρια συγκεντρώσεις των παραπάνω νευροδιαβιβαστών αυξήθηκαν υπέρμετρα υπό ισχαιμικές συνθήκες, ενώ η ανοσοδραστικότητα για γλουταμινικό και ασπαρτικό στα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων ελαττώθηκε. Συγχρόνως, η αναλογία γλουταμινικού/γλουταμίνης στα κύτταρα της γλοίας παρουσίασε αύξηση. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η εξωκυττάρια αύξηση διεγερτικών νευροδιαβιβαστών κατά την ισχαιμία εξαρτάται

επομένως τόσο από την αυξημένη απελευθέρωση, όσο και από την αναστολή της επαναπρόσληψης και του μεταβολισμού τους από τα κύτταρα της γλοίας (Torp 1993). Σχετικά με την έναρξη αύξησης της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών μετά την πρόκληση της ισχαιμίας, το εύρημά μας ότι η αύξηση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών ξεκινά 30 λεπτά μετά, συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Neal και συν. (1994). Οι συγγραφείς ομοίως βρήκαν ότι η αύξηση στην απελευθέρωση του γλουταμινικού, ασπαρτικού και GABA αρχίζει 20 λεπτά μετά την έναρξη της ισχαιμίας (Neal 1994). Αυτή η καθυστέρηση στην αύξηση πιθανόν να οφείλεται, όπως αναφέρθηκε, στις αποθήκες γλυκόζης και γλυκογόνου που κάνουν τον αμφιβληστροειδή πιο ανθεκτικό σε σχέση με τον εγκέφαλο (Weiss 1972). Μάλιστα, οι Neal και συν. πρότειναν ότι τα αποθέματα γλυκόζης ίσως ευθύνονται και για το γεγονός ότι η υπογλυκαιμία δεν προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών στα πρώτα 30 λεπτά. Πράγματι, κι εμείς βρήκαμε ότι η αύξηση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών στην υπογλυκαιμία ξεκινά 20 λεπτά μετά. Επειδή όμως, σε αντίθεση με τους Neal και συν. (1994) που περιορίστηκαν στα πρώτα 30 λεπτά, εμείς μελετήσαμε συνολικά 64 λεπτά, βρήκαμε τελικά αύξηση στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών. Τέλος, άλλο ένα κοινό αποτέλεσμα με τη μελέτη των Neal και συν. (1994) είναι ότι στην υποξία παρατηρήθηκε μείωση της απελευθέρωσης του ασπαρτικού και του GABA. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη των Kulik και συν., (2000) οι συγγραφείς πρότειναν ότι η αναερόβια γλυκόλυση παρεμποδίζει την απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την ανοξία (Kulik και συν., 2000). Σύμφωνα με τους Neal και συν., (1994) η ελάττωση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών ίσως να σχετίζεται με την ελάττωση της εισροής του Ca^{+2} στους προσυναπτικούς νευρώνες που παρατηρήθηκε στην υποξία σε τομές ιππόκαμπου. Δεν υπάρχει κάποια ικανοποιητική εξήγηση, αλλά πιθανόν η εξάντληση του ATP που συμβαίνει στην υποξία να οδηγεί στην μείωση της εισροής του Ca^{+2} στις νευρικές απολήξεις και επομένως στην αναστολή της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών (Young 1992). Καθώς στα πειράματά μας δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα του ATP, δεν μπορούμε να κάνουμε κάποια υπόθεση σχετικά μ' αυτό το φαινόμενο. Ωστόσο, η συνεχής μέτρηση ανά 2 λεπτά της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών έδειξε τη διφασική πορεία της απελευθέρωσης του γλουταμινικού στην ισχαιμία (αρχική μείωση και μετέπειτα αύξηση), που φαίνεται

να συμφωνεί με την υπόθεση των Neal και συν. (1994) σχετικά με τα αποθέματα γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή. Σε παρόμοια συμπεράσματα οδηγήθηκαν και οι Casson και συν. (2004), που βρήκαν ότι τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης επιδεινώνουν σημαντικά τις ισχαιμικές βλάβες σε καλλιέργειες κυττάρων αμφιβληστροειδούς αρουραίου, σε σύγκριση μ' εκείνες που παρατηρούνται σε υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης (Casson 2004). Μάλιστα, πρότειναν ότι, εφόσον η γλυκόζη αποτελεί βασικό ενεργειακό υπόστρωμα για τον ισχαιμούντα αμφιβληστροειδή, η υπογλυκαιμία μειώνει σοβαρά την ικανότητά του να συνεχίζει τον μεταβολισμό όταν δεν υπάρχει διαθεσιμότητα σε οξυγόνο. Αυτή η βλαπτική επίδραση της υπογλυκαιμίας στον ισχαιμικό αμφιβληστροειδή ίσως να εξηγεί και την επιδείνωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας που παρατηρείται στα αρχικά στάδια ρύθμισης του διαβήτη με ινσουλίνη.

Επίσης, τα συμπεράσματά μας συμβαδίζουν σε γενικές γραμμές με τη μελέτη των Madl και συν. (1993), που μελέτησαν την επίδραση της έλλειψης ATP (μέσω πρόκλησης υποξίας και χρήσης αναστολέων μεταβολισμού) σε τομές ιππόκαμπου επίμυος. Οι συγγραφείς βρήκαν ότι μέτρια στέρση ATP αυξάνει τα εξωκυττάρια επίπεδα των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών μειώνοντας την επαναπρόσληψη, χωρίς ιδιαίτερη επίδραση στην απελευθέρωση. Πιο έντονη στέρση ATP προκάλεσε περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών αναστρέφοντας την επαναπρόσληψη αλλά και αυξάνοντας την απελευθέρωση. Αν και οι συγγραφείς αναφέρονται στην έλλειψη ATP, στην πράξη η υποξία σε συνδυασμό με την χρήση αναστολέων μεταβολισμού, προκαλούν ισχαιμικές συνθήκες. Στο ίδιο συμπέρασμα (μειωμένη επαναπρόσληψη και αυξημένη απελευθέρωση γλουταμινικού στην ισχαιμία) καταλήξαμε και εμείς, παρόλο που ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο αμφιβληστροειδής και μελετήθηκε το ασπαρτικό οξύ, ως αντικαταστάτης του γλουταμινικού οξέος και ως αντιπροσωπευτικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής.

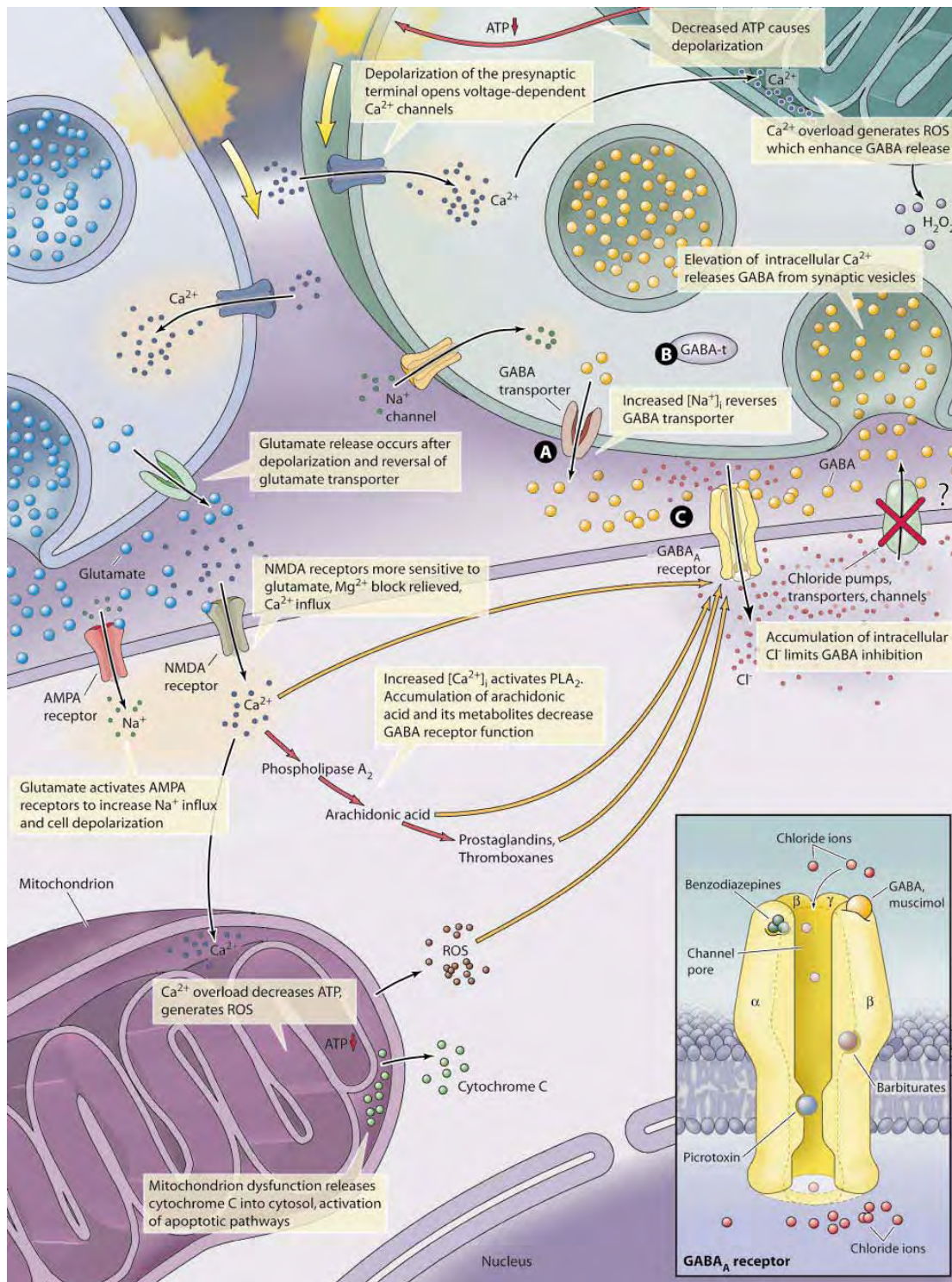
Όσον αφορά στην επαναπρόσληψη, το εύρημά μας ότι στην ισχαιμία ελαττώνεται η επαναπρόσληψη τόσο του γλουταμινικού όσο και του GABA, συμφωνεί με την μελέτη των Napper και συν. (1999). Οι συγγραφείς βρήκαν ότι η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού και του GABA από τα κύτταρα του Müller σε απομονωθέντες αμφιβληστροειδείς 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). Παρόλο που στην εργασία μας δεν διαφοροποιήσαμε την επαναπρόσληψη μεταξύ των κυττάρων της γλοίας και των προσυναπτικών νευρώνων, αλλά τη μελετήσαμε ως σύνολο, οδηγηθήκαμε σε ανάλογα αποτελέσματα. 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). Βρέθηκε ότι σε διαβητικούς αρουραίους η λειτουργικότητα αυτής της αντλίας 13 εβδομάδες μετά από την πρόκληση διαβήτη με στρεπτοζοτοκίνη ελεττώθηκε κατά 67% (Li 2002). Ελάττωση της επαναπρόσληψης του ασπαρτικού σε αμφιβληστροειδείς διαβητικών αρουραίων μετά από 4 εβδομάδες από την πρόκληση διαβήτη με στρεπτοζοτοκίνη παρατήρησαν επίσης οι Santiago και συν. (2006).

Οι ίδιοι συγγραφείς σε μια μεταγενέστερη μελέτη κατανομής των νευροδιαβιβαστών στον αμφιβληστροειδή αρουραίου (Napper 2001), βρήκαν ότι υπό ισχαιμικές συνθήκες το γλουταμινικό και το GABA συσσωρεύονται ταχέως μέσα στα κύτταρα της γλοίας. Αντίθετα, η παροχή γλυκόζης στον ισχαιμικό ιστό έδειξε να καθυστερεί τη συσσώρευση των νευροδιαβιβαστών και την επικείμενη κυτταρική δυσλειτουργία. Η υπόθεση των συγγραφέων ήταν ότι η συσσώρευση των νευροδιαβιβαστών στην ισχαιμία οφείλεται στην αναστολή των ενδοκυττάριων μεταβολικών μονοπατιών τους, τα οποία ωστόσο παρουσία γλυκόζης συνεχίζουν να λειτουργούν. Αν ισχύει κάτι τέτοιο, πιθανόν αυτή η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των νευροδιαβιβαστών λόγω αδυναμίας μεταβολισμού τους, να σχετίζεται με τη μειωμένη επαναπρόσληψη που παρατηρήσαμε κι εμείς στην ισχαιμία. Δηλαδή δυσχεραίνεται η λειτουργία της αντλίας επαναπρόσληψης του γλουταμινικού λόγω ελάττωσης της διαφοράς στη συγκέντρωση του μεταξύ ενδο- και εξωκυττάριου χώρου. Επίσης, σύμφωνα με την υπόθεση των Napper και συν. (2001), το εύρημά μας ότι στην υπεργλυκαιμία έχουμε αυξημένη επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών, θα μπορούσε να εξηγηθεί λόγω της απρόσκοπτης λειτουργίας των ενδοκυττάριων μονοπατιών μεταβολισμού τους. Σε παρόμοιο συμπέρασμα, ότι σε αντίθεση με τον εγκέφαλο, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στον

αμφιβληστροειδή πιθανόν να παρέχουν προστασία έναντι της ισχαιμικής βλάβης, κατέληξαν και οι Romano και συν. (1993). Βρήκαν ότι η ενδοφθάλμια παροχή γλυκόζης πριν ή κατά τη διάρκεια της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας ελάττωσε τη βαρύτητα των ισχαιμικών ιστολογικών μεταβολών, διότι ο αμφιβληστροειδής κάλυψε τις ανάγκες του σε ATP μέσω της αναερόβιας μετατροπής της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ. Στη μελέτη μας, η επαναπρόσληψη του γλουταμινικού και του GABA σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας ήταν αυξημένη, ενώ δεν παρατηρήσαμε αύξηση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών, σε συμφωνία με την παραπάνω μελέτη.

Συμπερασματικά λοιπόν, η μελέτη μας ενισχύει την άποψη ότι λόγω της αλληλεπίδρασης των μηχανισμών απελευθέρωσης και επαναπρόσληψης διεγερτικών και ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών (Εικόνα 28), κρίνεται αναγκαίο να διαχωριστούν οι επιμέρους μεταβολικές προσβολές (ισχαιμία, υποξία, υπογλυκαιμία, υπεργλυκαιμία). Μια τέτοια προσέγγιση θα διευκολύνει όχι μόνο τη μελέτη των νευροδιαβιβαστών καθεαυτών, αλλά και την κατανόηση των μηχανισμών δράσης φαρμακευτικών ουσιών με πιθανή νευροπροστατευτική δράση.



Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της ισχαιμίας στη νευροδιαβίβαση (Schwartz-Bloom 2001).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Attwell, D., Barbour, B., Szatkowski, M. (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401–407.
- Barbour, B., Brew, H., Attwell, D. (1988) Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335:433–435.
- Barnett, N.L., Osborne, N.N. (1995) Redistribution of GABA immunoreactivity following central retinal artery occlusion. *Brain Res* 677:337–40.
- 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.
- Bednar, M.M., Kohut, J.J., Kimelberg, H.K., Gross, J.J., Gross, C.E. (1992). In vitro evidence supporting two mechanisms of action of the anion transport inhibitor L-644,711 in cerebral ischemia. *Neurol Res* 14:53–56.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N. M. (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369–1374.
- 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.
- Blandini, F., Porter, R.H.P., Greenamyre, J. T. (1996) Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 12:73–94.
- Bonne, C., Muller, A. and Villain, M. (1996) The excitotoxicity theory of glaucomatous neuropathy-general review. *J Franc Ophtalmol* 19:69–74.
- Brecha, N. (1983) Retinal neurotransmitters: histochemical and biochemical studies. In: Emson PC (ed) *Chemical neuroanatomy*. Raven, New York, pp 85–129.
- Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., D'Onofrio, M., Di Iorio, P., De Blasi, A., Melchiorri, D., Flor, P.J., Nicoletti, F. (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1013–1033.
- Buchi, E.R., Suivaizdis, I., Fu, J. (1991) Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica* 203:138–147.
- 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.
- Casson, R.J., Chidlow, G., Wood, J.P., Osborne, N.N. (2004) The effect of hyperglycemia on experimental retinal ischemia. *Arch Ophthalmol* 122:361–366.

- Casson, R.J., Wood, J.P., Osborne, N.N. (2004) Hypoglycaemia exacerbates ischaemic retinal injury in rats. *Br J Ophthalmol* 88:816-820.
- Chen, Q., Moulder, K., Tenkova, T., Hardy, K., Olney, J.W., Romano, C. (1999) Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation. *Exp Neurol* 160:215-25.
- Cheung, J.Y., Bonventre, J.V., Malis, C.D., Leaf, A. (1986) Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 314:1670–1676.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Choi, D.W., Rothman, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Costa, G., Pereira, T., Neto, A.M., Cristóvão, A.J., Ambrósio, A.F., Santos, P.F. (2009) High glucose changes extracellular adenosine triphosphate levels in rat retinal cultures. *J Neurosci Res* 87:1375-1380.
- Davanger, S., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1991) Glutamate, GABA, and glycine in the human retina: an immunocytochemical investigation. *J Comp Neurol* 311:483-94.
- Dawson, R., Jr, Beal, M.F., Bondy, S.C., Di Monte, D.A., Isom, G.E. (1995) Excitotoxins, aging, and environmental neurotoxins: implications for understanding human neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 134:1-17.
- De Flora, A., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E. (1998). Ectocellular CD38 catalyzed synthesis and intracellular Ca²⁺-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem Biophys* 28:45–62.
- Dowling, J.E. (1987) The retina: an approachable part of the brain. The Belknap Press, Cambridge MA.
- Drejer, J., Benveniste, H., Diemer, N.H., Schousboe, A. (1985) Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem* 45:145–151.
- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M. and Lipton, S. A. (1996) Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 114:299-305.
- Fern, R., 1998. Intracellular calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes in situ. *J Neurosci* 18:7232–7243.
- Franklin, J.L., Johnson Jr., E.M. (1992) Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci* 15:501–508.
- Henneberry, R. C., Novelli, A., Cox, J. A. and Lysko, P. G. (1989) Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. An hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann NY Acad Sci* 568:225-233.
- Kandel, R.E., Schwartz, H.J., Jessell, M.Ts. (1999) Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο.
- Kimelberg, H.K., Rutledge, E., Goderie, S., Charniga, C. (1995) Astrocytic swelling due to hypotonic or high K⁺ medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:409–416.

- Kulik, A., Trapp, S., Ballanyi, K. (2000) Ischemia but not anoxia evokes vesicular and Ca(2+)-independent glutamate release in the dorsal vagal complex in vitro. *J Neurophysiol* 83:2905-2915.
- 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.
- Li, Q., Puro, D.G. (2002) Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3109-3116.
- Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431–1568.
- Lipton, P. (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. *New Engl J Med* 330:613-622.
- 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.
- Lobner, D., Lipton, P. (1993) Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage. *J Neurosci* 13:4861–4871.
- Luo, X., Lambrou, G.N., Sahel, J.A., Hicks, D. (2001) Hypoglycemia induces general neuronal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2695-2705.
- Madl, J.E., Burgesser, K. (1993) Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429–4444.
- Madl, J.E., Royer, S.M. (1999) Glutamate in synaptic terminals is reduced by lack of glucose but not hypoxia in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 94:417-430.
- Meldrum, B. S., Milan, M. H. and Obrenovitch, T. P. (1993) Injury induced excitatory amino acid release. In: *The role of neurotransmitters in brain injury* (eds M. Y. T. Globus and W. D. Dietrich), pp. 1-7. Plenum, New York.
- Miyachi, E., Hidaka S., Murakami, M. (1999) Electrical couplings of retinal neurons. In: Toyoda, J., και ουβ. (Eds.), *The Retinal Basis of Vision*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 171–184.
- Mori, H., Mishina, M. (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219–1237.
- Mosinger, J.L., Price, M.T., Bai, H.Y., Xiao, H., Wozniak, D.F., Olney, J.W. (1991) Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp Neurol* 113:10–17.
- Napper, G.A., Pianta, M.J., Kalloniatis, M. (1999) Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Vis Neurosci* 16:149–158.
- Napper, G.A., Pianta, M.J., Kalloniatis, M. (2001) Localization of amino acid neurotransmitters following in vitro ischemia and anoxia in the rat retina. *Vis Neurosci* 18:413-27.
- 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.
- Nicholson, C., Bruggencate, G.T., Steinberg, R., Stockle, H. (1977) Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1287–1290.
- Nicotera, P., Orrenius, S. (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23:173–180.
- Nishizawa, Y. (2001) Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 69:369–381.
- Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T., Kataoka, K. (1995) A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 20:737–743.
- Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M., Floyd, R.A. (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5144–5147.
- Olney, J.W. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer, E., Olney, J.W., McGeer, P. (Eds.), *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Raven, New York.
- Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P., Chidlow, G., Graham, M., Melena, J. (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91-147.
- Osborne, N.N., McCord, R.J., Wood, J. (1995) The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina in vivo. *Neurochem Res* 20:635-41.
- Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. (2000) *Φαρμακολογία. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης*.
- Price, M.T., Olney, J.W., Samson, L., Labruyere, J. (1985) Calcium influx accompanies but does not cause excitotoxin-induced neuronal necrosis in retina. *Brain Res Bull* 14:369–376.
- Qian, H., Malchow, R.P., Ripps, H. (1993) The effects of lowered extracellular sodium on gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of Muller (glial) cells of the skate retina. *Cell Mol Neurobiol* 13:147-58.
- Quigley, H. A. (1993) Open angle glaucoma. *New Engl J Med* 328:1097-1106.
- Robin, L.N., Kalloniatis, M. (1992) Interrelationship between retinal ischaemic damage and turnover and metabolism of putative amino acid neurotransmitters, glutamate and GABA. *Doc Ophthalmol* 80:273-300.
- Romano, C., Chen, Q., Olney, J.W. (1998) The intact isolated (ex vivo) retina as a model system for the study of excitotoxicity. *Prog Retin Eye Res* 17:465-483.
- Romano, C., Price, M., Bai, H.Y., Olney, J.W. (1993) Neuroprotectants in Honghua: glucose attenuates retinal ischemic damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:72–80.
- Rossi, D.J., Oshima, T., Attwell, D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316–321.
- Rothman, S. M. (1984) Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 4:1884-1891.

- Santiago, A.R., Pereira, T.S., Garrido, M.J., Cristóvão, A.J., Santos, P.F., Ambrósio, A.F. (2006) High glucose and diabetes increase the release of [3H]-D-aspartate in retinal cell cultures and in rat retinas. *Neurochem Int* 48:453-458.
- Saransaari, P., Oja, S.S. (2008) GABA release under normal and ischemic conditions. *Neurochem Res* 33:962-9.
- Sattler, R., Tymianski, M. (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24:107-129.
- Schousboe, I., Bro, B., Schousboe, A. (1977) Intramitochondrial localization of the 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase from ox brain. *Biochem J* 162:303-7.
- Schuettauf, F., Naskar, R., Vorwerk, C.K., Zurakowski, D., Dreyer, E.B. (2000) Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:4313-4316.
- Schwartz-Bloom, R.D., Sah, R. (2001) gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem* 77:353-71.
- Seki, M., Lipton, S. A. (2008) Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. *Prog Brain Res* 173:495-510.
- Siemkowicz, E., Hansen, A.J. (1981) Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. *Stroke* 12:236-240.
- Silver, I.A., Erecinska, M. (1990) Intracellular and extracellular changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol* 95:837-866.
- Takeo-Goto, S., Doi, M., Ma, N., Goto, R., Semba, R., Uji, Y. (2002) Immunohistochemical localization of amino acids in the diabetic retina of Goto-Kakizaki rats. *Ophthalmic Res* 34:139-45.
- Thoreson, W.B., Witkovsky, P., 1999. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 765-810.
- Torp, R., Arvin, B., Le Peillet, E., Chapman, A.G., Ottersen, O.P., Meldrum, B.S. (1993) Effect of ischaemia and reperfusion on the extra- and intracellular distribution of glutamate, glutamine, aspartate and GABA in the rat hippocampus, with a note on the effect of the sodium channel blocker BW1003C87. *Exp Brain Res* 96:365-376.
- Traustason, S., Eysteinnsson, T., Agnarsson, B.A., Stefánsson, E. (2009) GABA agonists fail to protect the retina from ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res* 88:361-366.
- Verkhatsky, A., Shmigol, A. (1996) Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium* 19:1-14.
- Wahl, F., Obrenovitch, T.P., Hardy, A.M., Plotkine, M., Boulou, R., Symon, L. (1994) Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency. *J Neurochem* 63:1003-1011.
- Wang, C., Nguyen, H.N., Maguire, J.L., Perry, D.C. (2002a) Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:206-214.

- Weiss, H. (1972) The carbohydrate reserve in the vitreous body and retina of the rabbit's eye during and after pressure ischaemia and insulin hypoglycaemia. *Ophthalmol Res* 1:360-371.
- Yang, X.L. (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* 73:127-150.
- Yazulla, S., Studholme, K.M., Pinto, L.H. (1997) Differences in the retinal GABA system among control, spastic mutant and retinal degeneration mutant mice. *Vision Res* 37:3471-82.
- Young, G. N., Somjen, G. G. (1992) Suppression of presynaptic calcium currents by hypoxia in hippocampal tissue slices. *Brain Res* 573:70-76.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης ανακοινώθηκαν στα παρακάτω συνέδρια:

1. Vasilaki A, Grivas V, Sourlas V, Papageorgiou E. Differential effect of ischemia, hypoxia, hyperglycaemia and hypoglycaemia on the rat retinal neurotransmission. EVER 2010. Crete
2. Papageorgiou E, Grivas V, Sourlas V, Vasilaki A. Differential effects of ischemia, hypoxia, hypoglycaemia and hyperglycaemia on rat retinal excitatory and inhibitory neurotransmission. Neuroscience days of the Hellenic society for neuroscience 10.10. Athens

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ισχαιμία οδηγεί στο θάνατο των νευρικών κυττάρων λόγω στέρησης γλυκόζης και οξυγόνου καθώς και συσσώρευσης τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού. Συνέπεια της ισχαιμίας αποτελεί η διεγερτοτοξικότητα, που ορίζεται ως ο θάνατος των νευρικών κυττάρων που προκαλείται από την υπέρμετρη ενεργοποίηση των ιοντοτροπικών και μεταβολοτροπικών υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος. Νόσοι του αμφιβληστροειδούς που σχετίζονται με ισχαιμία και διεγερτοτοξικότητα είναι η απόφραξη της κεντρικής αρτηρίας του αμφιβληστροειδούς, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και το γλαύκωμα. Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι η υπερβολική απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την ισχαιμία συμβάλλει στη βλάβη των νευρώνων, δεν υπάρχουν σαφείς αναφορές σχετικά με την επίδραση των επιμέρους μεταβολικών συνθηκών (υπογλυκαιμίας, υποξίας, υπεργλυκαιμίας) στη νευροδιαβίβαση (διεγερτική και ανασταλτική) ειδικά όσον αφορά στην πρώτη ώρα από την έναρξή τους. Γι' αυτό, σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν α) η *ex vivo* μελέτη της επίδρασης της ισχαιμίας, υποξίας, υπογλυκαιμίας και υπεργλυκαιμίας στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση (απελευθέρωση και επαναπρόσληψη) κατά την πρώτη ώρα μετά την έναρξη της εκάστοτε μεταβολικής προσβολής, και β) Η μελέτη της δράσης του Ca^{2+} στην αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση (απελευθέρωση) κατά την πρώτη ώρα μετά την έναρξη της εκάστοτε μεταβολικής προσβολής από αμφιβληστροειδή επίμυος με το σύστημα *in vitro* υπερδιάχυσης..

Η ισχαιμία και σε μικρότερο βαθμό η υπογλυκαιμία προήγαγαν την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος, δηλαδή προκάλεσαν διεγερτοτοξικότητα. Αντίθετα, η υποξία προκάλεσε μείωση της απελευθέρωσης του νευροδιαβιβαστή. Ανάλογη επίδραση είχαν αυτές οι μεταβολικές προσβολές και στην απελευθέρωση του GABA. Οι δράσεις των δύο συνιστωσών της ισχαιμίας στην απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος διαχωρίστηκαν χρονικά ίσως λόγω της αντοχής του αμφιβληστροειδούς μέσω των αποθεμάτων γλυκόζης που διαθέτει.: (i) μείωση (υποξία), η οποία ακολουθήθηκε από (ii) αύξηση (υπογλυκαιμία) της απελευθέρωσης του νευροδιαβιβαστή. Επιπλέον, η υπογλυκαιμία προήγαγε σε

μικρότερο βαθμό την απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος και GABA από ότι η ισχαιμία, πιθανόν λόγω της εύρυθμης λειτουργίας των αντλιών επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών κατά την υπογλυκαιμία. Αντίθετα, η υποξία και σε μικρότερο βαθμό η υπεργλυκαιμία μείωσαν την αμφιβληστροειδική νευροδιαβίβαση, (i) ελαττώνοντας την απελευθέρωση, και (ii) αυξάνοντας την επαναπρόσληψη του γλουταμινικού και του GABA.

Σχετικά με την επίδραση του Ca^{+2} , η απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την ισχαιμία ήταν εν μέρει Ca^{+2} -εξαρτώμενη, ίσως λόγω αναστολής της κυστιδιακής απελευθέρωσης του γλουταμινικού, αλλά και αναστροφής της αντλίας $\text{Ca}^{+2}\text{-Na}^{+}$ και ενεργοποίησης της αντλίας που βγάζει $\text{H}^{+}/\text{Na}^{+}$ και γλουταμινικό από το κύτταρο. Η απελευθέρωση του γλουταμινικού κατά την υποξία και την υπογλυκαιμία ήταν επίσης εν μέρει Ca^{+2} -εξαρτώμενη, πιθανόν λόγω αναστροφής της αντλίας $\text{Ca}^{+2}\text{-Na}^{+}$. Τέλος, και η απελευθέρωση του GABA κατά την ισχαιμία ήταν εν μέρει Ca^{+2} -εξαρτώμενη, ίσως λόγω αναστολής της κυστιδιακής απελευθέρωσης του GABA. Η απελευθέρωση του GABA κατά την υποξία και την υπογλυκαιμία δε φάνηκε να εξαρτάται από το Ca^{+2} . Κατά συνέπεια, υπό αυτές τις συνθήκες δε φάνηκε να επηρεάζεται η κυστιδιακή απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Λάμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η υποξία και η υπογλυκαιμία δε φαίνεται να επηρεάζουν την κυστιδιακή απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος και του GABA σε αντίθεση με τον συνδυασμό τους (ισχαιμία).

Η μελέτη μας ενισχύει την άποψη ότι λόγω της αλληλεπίδρασης των μηχανισμών απελευθέρωσης και επαναπρόσληψης διεγερτικών και ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών, κρίνεται αναγκαίο να διαχωριστούν οι επιμέρους μεταβολικές προσβολές (ισχαιμία, υποξία, υπογλυκαιμία, υπεργλυκαιμία), ώστε να μελετηθεί η επίδραση της καθεμιάς χωριστά. Μια τέτοια προσέγγιση θα διευκολύνει όχι μόνο την άμεση μελέτη των νευροδιαβιβαστών καθεαυτών, αλλά και την κατανόηση των μηχανισμών δράσης φαρμακευτικών ουσιών με πιθανή νευροπροστατευτική δράση.