



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Biologia

Corso di laurea in Biologia Applicata alla Biomedicina

Tesi di Laurea

*“Interazioni neuro-vascolari nella retinopatia diabetica:  
neuroprotezione come strategia terapeutica”*

**Candidata:**

Martina Biagioni

**Relatore:**

Prof. Giovanni Casini

*Anno Accademico 2013/2014*

# *Indice*

## **1. Introduzione**

### **1.1. Retina e visione**

- 1.1.1. Il sistema visivo: cenni di struttura e funzione
- 1.1.2. La retina: sviluppo e anatomia
- 1.1.3. Funzione della retina
- 1.1.4. Patologie della retina: le retinopatie

### **1.2. La retinopatia diabetica**

- 1.2.1. Storia e ruolo della disfunzione vascolare
- 1.2.2. Patogenesi della retinopatia diabetica
- 1.2.3. Cura e prevenzione: trattamenti in uso e nuove prospettive
- 1.2.4. La retinopatia diabetica come malattia neurodegenerativa: la nuova visione
- 1.2.5. La neuroprotezione come nuova strategia terapeutica

### **1.3. Modelli sperimentali per lo studio della retinopatia diabetica**

- 1.3.1. Modelli *in vitro* e *in vivo*: vantaggi e limiti
- 1.3.2. La coltura organotipica *ex vivo*: un nuovo approccio sperimentale

## **2. Scopo della tesi**

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1. Animali e preparazione degli espianti**

### **3.2. Colture organotipiche *ex vivo***

- 3.2.1. Coltura su vetrini polilisinati
- 3.2.2. Coltura su inserti Millicell-CM

### **3.3. Trattamenti farmacologici**

### **3.4. Preparazione delle sezioni retiniche**

### **3.5. Colorazione con DAPI**

- 3.6. Colorazione con ioduro di propidio**
- 3.7. Immunoistochimica**
- 3.8. Analisi dell'immagine**
- 3.9. Real Time RT-PCR**
- 3.10. Western blot**
- 3.11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**
- 3.12. Statistica**
- 3.13. Preparazione delle figure**

## **4. Risultati**

### **4.1. Definizione e validazione di un modello *ex vivo* di DR**

- 4.1.1. Espianti su vetrini poli-lisinati in alto glucosio
  - 4.1.1.1. Analisi morfologica di sezioni colorate con DAPI
  - 4.1.1.2. Analisi della morte cellulare tramite staining vita/morte con PI
- 4.1.2. Espianti su inserti Millicell-CM
  - 4.1.2.1. Coltura in terreno contenente HIHS
  - 4.1.2.2. Coltura in terreno senza HIHS

### **4.2. Morte cellulare e produzione/rilascio di VEGF**

- 4.2.1. Modello “alto glucosio”
- 4.2.2. Modello “stress ossidativo”

### **4.3. Effetti della neuroprotezione**

- 4.3.1. Modello “alto glucosio”
- 4.3.2. Modello “stress ossidativo”

## **5. Discussione**

### **5.1. Definizione e validazione del modello sperimentale *ex vivo***

## **5.2. Relazione tra morte cellulare ed espressione/ rilascio di VEGF**

- 5.2.1. L'alto glucosio e lo stress ossidativo promuovono l'apoptosi negli espianti retinici *ex vivo*
- 5.2.2. L'alto glucosio e lo stress ossidativo alterano il metabolismo del VEGF negli espianti retinici *ex vivo*
- 5.2.3. L'apoptosi e i livelli di VEGF indotti da alto glucosio e stress ossidativo mostrano correlazione positiva

## **5.3. Effetto della neuroprotezione**

- 5.3.1. La neuroprotezione promossa da OCT è efficace nel ridurre sia l'apoptosi sia l'espressione del VEGF indotta dall'alto glucosio
- 5.3.2. Il blocco del VEGF causa un aumento dell'apoptosi indotta dallo stress ossidativo, ipotesi del suo ruolo come neuroprotettore

## **6. Conclusioni**

## **7. Bibliografia**

## ***Riassunto***

La retinopatia diabetica (DR) è una delle più comuni conseguenze del diabete, spesso associata a deterioramento delle facoltà visive di vario grado fino alla cecità. Essa è stata per lungo tempo considerata essenzialmente un disordine del microcircolo poiché i primi segni clinici evidenziati in pazienti affetti erano a carico dei vasi, quali microaneurismi, edema e neoangiogenesi. Ad oggi, i trattamenti terapeutici più in uso sono diretti, per la maggior parte, verso la patologia vascolare.

Tuttavia non ci sono evidenze che la causa primaria della DR sia un difetto del microcircolo. Infatti, è stato mostrato come la neurodegenerazione, nelle sue due componenti di morte neuronale e attivazione gliale, preceda la disfunzione vascolare. La perdita dell'integrità dell'unità neuro-vascolare, ovvero dell'insieme di interazioni fisiche e biochimiche tra neuroni, glia e vasi volte a supportare l'attività dei neuroni con un adeguato sostegno metabolico, sarebbe dovuta, in prima istanza, alla disfunzione neuronale che assumerebbe un ruolo causale nelle manifestazioni microangiopatiche e nel danno alla barriera emato-retinica.

Posto il ruolo primario della componente nervosa della retina nella patogenesi della DR, è possibile ipotizzare l'efficacia di nuove strategie terapeutiche che mirino alla neuroprotezione. Tra le sostanze con azione neuroprotettiva, grande attenzione è stata recentemente rivolta ai peptidi neuroprotettivi fisiologicamente espressi.

Nel lavoro svolto è stato utilizzato un modello *ex vivo* di retina che mimi la situazione iniziale tipica della DR; espianti organotipici di retina sono stati coltivati in presenza di alto glucosio, di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o in condizioni di controllo. Infatti, l'iperglicemia si configura come il fattore causale scatenante le conseguenze del diabete nella retina mentre il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è accettato come sistema sperimentale per riprodurre condizioni di stress ossidativo, che costituisce uno dei principali collegamenti tra alto glucosio e DR. Questo secondo approccio, quindi, offrirebbe la possibilità di indagare direttamente il ruolo di questo componente specifico della patogenesi della DR.

È stato visto che sia l'alto glucosio che lo stress ossidativo determinano una risposta nella retina che si esplica sottoforma di aumento della morte cellulare per apoptosi e dei livelli di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), uno dei principali fattori proangiogenici, rispetto ai controlli. La dimostrazione della correlazione positiva tra apoptosi ed espressione/rilascio di

VEGF conferma lo stretto collegamento tra queste due manifestazioni e permette di ipotizzare una relazione causale tra di esse.

In questo contesto è stata valutata l'efficacia del trattamento con sostanze neuroprotettive. Tra le molecole candidate, l'attenzione è stata rivolta all'indagine dell'effetto benefico di octreotide, analogo sintetico del neuropeptide somatostatina, nell'attenuare i danni ai neuroni, riducendo l'apoptosi, e nel saggiare se e come questo risultato si ripercuote sull'aumento dell'espressione/rilascio di VEGF. Il contemporaneo miglioramento rilevato su entrambi i fronti va a supporto della teoria di una relazione causale tra danno alla neuroretina e sviluppo di risposte inerenti la componente vascolare; questo permette di sostenere l'ipotesi dell'utilizzo di neuroprotettori, nello specifico neuropeptidi, come trattamento della DR nelle sue fasi precoci, impedendo il successivo decorso deleterio.

In conclusione, i risultati finora ottenuti supportano l'ipotesi, esposta inizialmente, di un coinvolgimento primario della disfunzione neuronale come evento precoce nella DR e sostengono la validità e l'efficacia di trattamenti neuroprotettivi come strategia terapeutica mirata. Inoltre, le prove effettuate mostrano come un modello *ex vivo* adeguato sia un utile strumento, tra l'altro, per mettere in luce con maggior chiarezza singoli aspetti di un fenomeno complesso quale la patogenesi di malattie come la DR.

## *Abbreviazioni*

Ad	Adrenalina
AGE	Prodotti avanzati di glicazione
BDNF	Fattore neurotrofico cerebrale
BRB	Barriera emato-retinica
CA	Anidrasi carbonica
DAG	Diacilglicerolo
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindole
DME	Edema maculare diabetico
DO	Densità ottica
DR	Retinopatia diabetica
ERG	Elettroretinogramma
ET-1	Endotelina 1
FGF	Fattore di crescita dei fibroblasti
GCL	Strato delle cellule ganglionari
GLUT-1	Trasportatore per il glucosio 1
GFAP	Proteina gliale fibrillare acida
GS	Glutammina sintetasi
GSH	Glutazione
HIF-1 $\alpha$	Fattore inducibile dall'ipossia 1 $\alpha$
IGF-1	Fattore di crescita insulina-simile 1
IRS-2	Substrato del recettore dell'insulina 2
INL	Strato nucleare interno
IPL	Strato plessiforme interno
LDH	Lattato deidrogenasi
NAd	Noradrenalina
NGF	Fattore di crescita nervoso
NPY	Neuropeptide Y
NO	Ossido nitrico
NPDR	Retinopatia diabetica non proliferativa

OCT	Octreotide
OD	Densità ottica
OIR	Retinopatia indotta dall'ossigeno
ONL	Strato nucleare esterno
OPL	Strato plessiforme esterno
PACAP	Peptide attivatore dell'adenilato ciclasi della ghiandola pituitaria
PB	Tampone fosfato
PBS	Tampone fosfato salino
PDGR	Fattore di crescita derivato dalle piastrine
PDR	Retinopatia diabetica proliferativa
PK	Piruvato chinasi
PKC	Proteina chinasi C
PI	Ioduro di propidio
PND	Giorno di vita post-natale
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterone
RGC	Cellule ganglionari della retina
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
RPE	Epitelio pigmentato della retina
RT-PCT	Reverse transcription–polymerase chain reaction
SEM	Errore standard della media
SNC	Sistema nervoso centrale
SST	Somatostatina
STZ	Streptozotocina
TNF $\alpha$	Fattore di necrosi tumorale $\alpha$
VEGF	Fattore di crescita endoteliale vascolare
VEGFR1-2	Recettore del VEGF di tipo 1 o 2

# 1. Introduzione

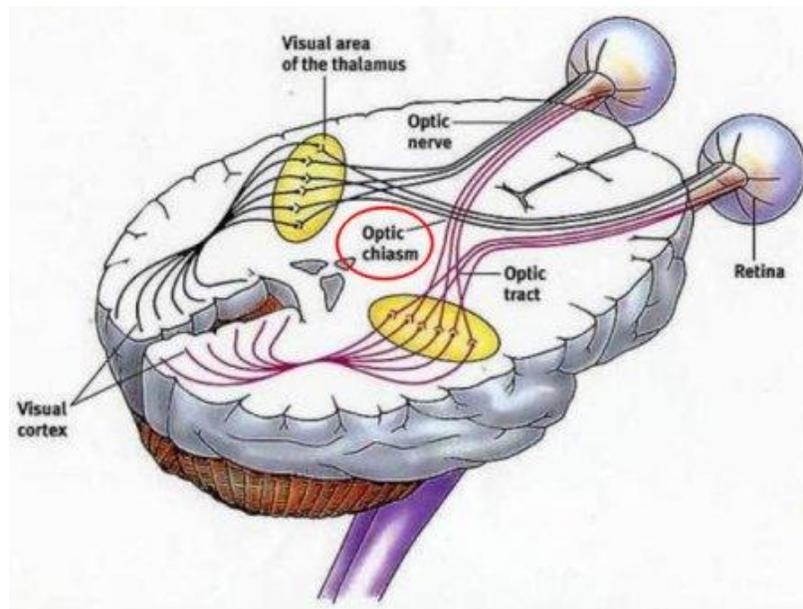
## 1.1. Retina e visione

### 1.1.1. Il sistema visivo: cenni di struttura e funzione

Il mondo visivo è la più importante fonte di informazioni circa l'ambiente di cui l'uomo dispone. Nessuno degli altri segnali sensoriali raggiunge il cervello in una varietà comparabile ed è processato da tante aree corticali quante nel caso delle informazioni visive (Gabriel, 2013). Del resto, la vista è il più fondamentale dei nostri sensi ed è forse la tragedia più grande quando la cecità ci priva di questa modalità.

Il sistema visivo è la parte del sistema nervoso centrale (SNC) che fornisce agli organismi l'abilità di processare i dettagli visivi, così come di generare diverse risposte non direttamente inerenti alla formazione di immagini. Esso presenta un alto grado di complessità e svolge un gran numero di compiti di primaria importanza. In primo luogo il sistema visivo è deputato alla ricezione e trasduzione del segnale, sotto forma di luce visibile, necessario per la creazione di una rappresentazione dell'ambiente circostante. La visione è un fenomeno complesso e la percezione degli oggetti e di un'immagine visiva nell'insieme si realizza solo quando il segnale è integrato dalle stazioni cerebrali superiori del sistema visivo (Carlson, 2014). Inoltre esso è implicato in fenomeni, ulteriori alla percezione visiva, che includono la generazione del riflesso pupillare e il controllo del ritmo circadiano. Dal punto di vista anatomico, il sistema visivo comprende gli occhi, il chiasma ottico, le vie di collegamento fino al nucleo genicolato laterale del talamo, la corteccia visiva primaria e secondaria ed altre regioni del cervello (Fig. 1).

L'occhio è un organo di senso, la cui complessità varia in funzione dei bisogni degli organismi; esso si configura come la prima stazione nel processamento del segnale luminoso, che condurrà alla visione.

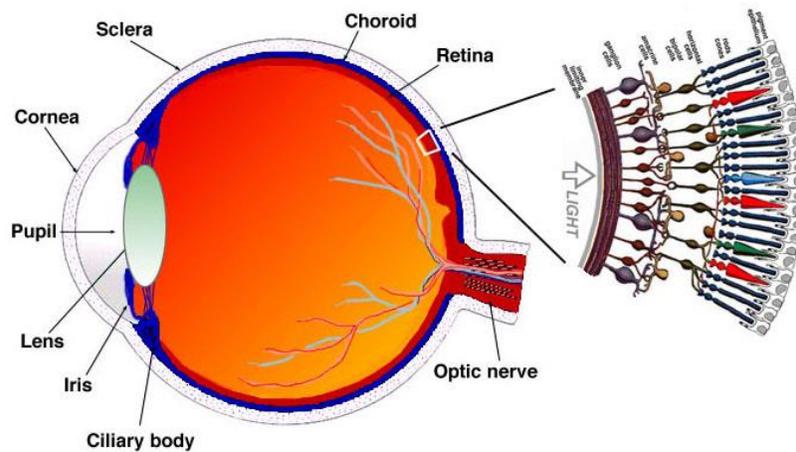


**Figura 1** Organizzazione anatomica del sistema visivo. Tratta dal sito <http://medicalxpress.com>

L'occhio umano è una delle strutture più complicate, richiedendo molte componenti diverse per permettere le nostre avanzate capacità visive. Secondo una classificazione anatomica basilare, nell'occhio si distinguono tre strati principali, rappresentati da tuniche di diversa natura; dall'esterno, rispettivamente: una tunica fibrosa costituita dalla cornea anteriormente e dalla sclera posteriormente, segue uno strato vascolarizzato che comprende la corioide, il corpo ciliare e l'iride, e infine la retina, la vera e propria componente sensoriale (Gray, 1918, Davson, 2012). Sebbene tutte le parti dell'occhio siano importanti per una buona percezione visiva, la struttura vitale per la visione è la retina.

### 1.1.2. La retina: sviluppo e anatomia

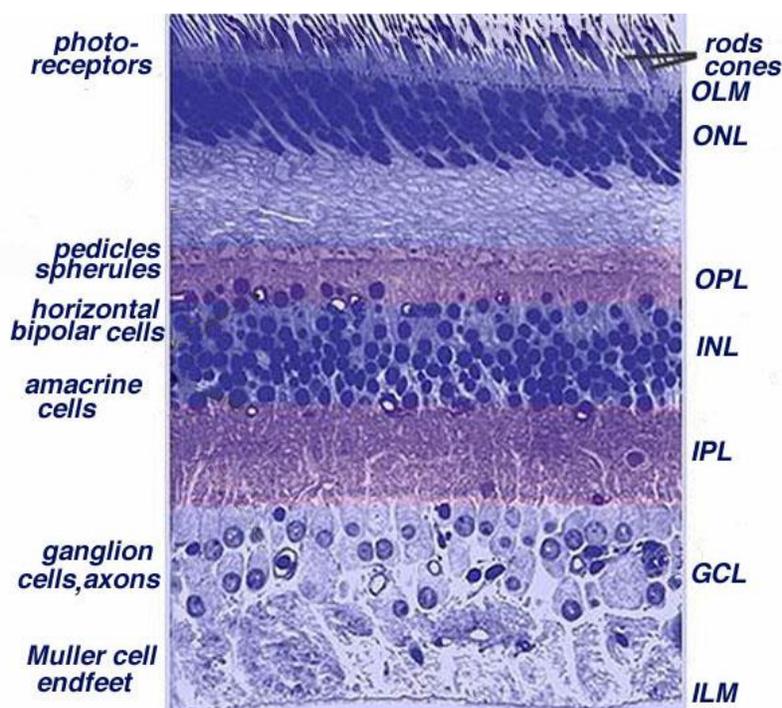
La retina è un sottile strato di tessuto nervoso, spesso in media 0,25 mm (Alamouti and Funk, 2003), sensibile alla luce, che riveste la superficie interna del polo posteriore dell'occhio (Fig. 2); è compresa tra l'epitelio pigmentato della retina (RPE) all'esterno, e il corpo vitreo, all'interno.



**Figura 2** Disegno di una sezione di occhio umano con ingrandimento schematico della retina. Tratta dal sito <http://webvision.med.utah.edu/>

Essa è parte del SNC e si configura come una regione del cervello dei vertebrati ideale per il suo studio; la retina, infatti, deriva dal tubo neurale, come le restanti parti del SNC, ma è anatomicamente separata da queste e offre il vantaggio di un più agevole approccio sperimentale (Yang, 2004). La retina si forma, durante lo sviluppo embrionale, dalle vescicole ottiche, estroflessioni ai due lati della porzione anteriore del tubo neurale in via di sviluppo. Ciascuna vescicola ottica primordiale si ripiega su se stessa per formare la coppa ottica, con l'interno della coppa che diventa la retina e la parte esterna che rimane come un singolo strato di cellule epiteliali, l'RPE (Gilbert, 2000). Come molte altre porzioni del cervello, anche la retina è caratterizzata da struttura stratificata, con “foglietti” sovrapposti di neuroni interconnessi, che mantiene la stessa organizzazione e un ordine preciso per tutta l'estensione dell'organo.

La retina di tutti i vertebrati è composta da tre strati cellulari e due strati di sinapsi (Cuenca et al., 2014) (Fig. 3). I cinque diversi tipi neuronali presenti concorrono a formare i tre strati; lo strato nucleare esterno (Outer Nuclear Layer, ONL) è costituito dai corpi cellulari dei fotorecettori (di due tipi: coni e bastoncelli); è lo strato più esterno, prossimo al RPE, in cui sono immersi i segmenti esterni delle cellule recettoriali.



**Figura 3** Immagine al microscopio ottico di una sezione verticale di retina centrale umana. Tratta dal sito <http://webvision.med.utah.edu/>

I soma dei neuroni di secondo ordine, cellule bipolari e cellule orizzontali per la precisione, insieme a quelli delle cellule amacrine e delle cellule di Müller, principale componente gliale della retina, formano lo strato nucleare interno (Inner Nuclear Layer, INL), lo strato cellulare intermedio. Infine lo strato cellulare più interno, a contatto con l'umor vitreo, contiene i corpi cellulari delle cellule ganglionari (RGC) e delle cellule amacrine spiazzate e prende il nome di strato delle cellule ganglionari (Ganglion Cell Layer, GCL) (Gabriel, 2013). A completare la struttura, sono interposti due strati di fibre a livello dei quali si trovano le sinapsi. Lo strato plessiforme esterno (Outer Plexiform Layer, OPL) separa ONL e INL e contiene gli assoni provenienti dal primo e i dendriti del secondo, mentre lo strato plessiforme interno (Inner Plexiform Layer, IPL), si interpone tra INL e GCL ed è costituito dalle fibre efferenti dell'INL e quelle afferenti del GCL. È stato mostrato come l'IPL sia a sua volta suddiviso in sotto-stratificazioni, definite laminae, generate dalla disposizione peculiare delle fibre provenienti dalle diverse tipologie cellulari presenti nell'INL, in primo luogo dalle varie classi di bipolari

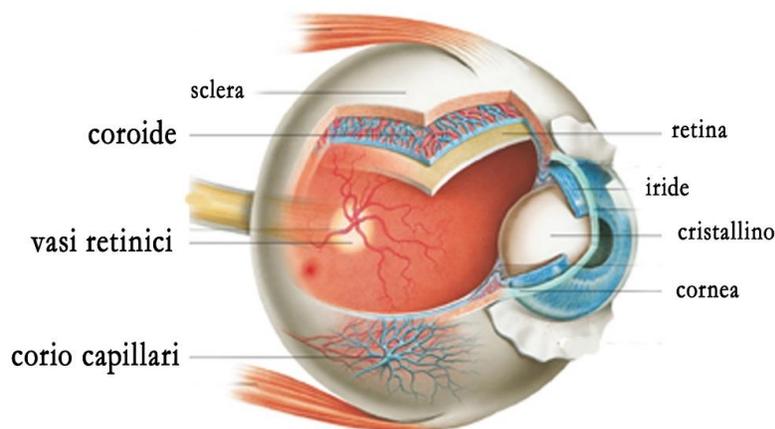
(Haverkamp et al., 2003, Hoon et al., 2014). Gli assoni delle RGC convergono a formare le fibre del nervo ottico, il quale fuoriesce dalla struttura oculare a livello del disco ottico, andando a terminare nelle stazioni visive primarie del cervello. Le RGC rappresentano l'unica popolazione neuronale retinica attraverso cui le informazioni visive si dipartono dalla retina verso i centri nervosi superiori.

Oltre alle suddette classi neuronali, il tessuto nervoso retinico consta di una componente gliale, rappresentata, in larga maggioranza, da cellule caratteristiche, note come cellule di Müller, e da una popolazione di astrociti, confinati al rivestimento degli assoni che si apprestano a originare il nervo ottico e dei vasi che entrano nella retina in stretta prossimità con esso, nel disco ottico.

Gli astrociti, durante lo sviluppo, migrano nella retina lungo il nervo ottico e formano un monostrato a livello della membrana limitante interna (Stone and Dreher, 1987, Ling et al., 1989). Le cellule di Müller presentano una localizzazione peculiare, con i corpi cellulari a livello dell'INL ed i prolungamenti che percorrono trasversalmente l'intero spessore della retina e terminano nel GCL in estremità slargate, le quali contribuiscono alla formazione della barriera emato-retinica (BRB). I ruoli svolti dalle cellule gliali nella retina sono molteplici e di primario rilievo. Alla funzione di sostegno meccanico, nota da tempo, si aggiungono il coinvolgimento delle cellule di Müller nella formazione e mantenimento della BRB, nell'approvvigionamento di substrati metabolici ai neuroni e nella regolazione dell'ambiente extracellulare, compreso delle concentrazioni di neurotrasmettitore in esso (Bringmann et al., 2005). Inoltre sta emergendo in maniera prorompente l'ipotesi per cui la comunicazione bidirezionale tra cellule gliali e neuroni, responsabile della risposta finale dell'organo nell'insieme, è cruciale per la garanzia del mantenimento di una condizione omeostatica (Nakahara et al., 2013, Kern, 2014).

A completare l'anatomia, il tessuto nervoso della retina è supportato da una rete vascolare, con un ruolo importante non solo in condizioni fisiologiche ma anche in diverse situazioni patologiche (Osborne et al., 2004) (Fig. 4). La retina di mammifero è percorsa da una doppia rete vascolare; proprio in funzione dell'apporto di sangue che riceve, essa può essere divisa in due porzioni, definite retina esterna e retina interna. La retina esterna include l'ONL e lo strato dei segmenti esterni dei fotorecettori, posto distalmente ad esso; questa porzione della retina è avascolare e i fotorecettori ottengono ossigeno e nutrienti dal plesso di capillari fenestrati presenti nell'adiacente coroide (corio capillari), separata dalla retina dal RPE e dalla membrana di Bruch. La retina interna è formata da OPL, INL, IPL e GCL; essa riceve l'apporto sanguigno dai vasi retinici che entrano a livello del disco ottico, si estendono sullo strato superficiale e formano

ramificazioni che si approfondano e arborizzano creando un letto capillare intermedio ed uno profondo (Fruttiger, 2002, Stahl et al., 2010).



**Figura 4** Struttura dell'occhio e del suo sistema vascolare. *Tratta da medicalanatomy.net*

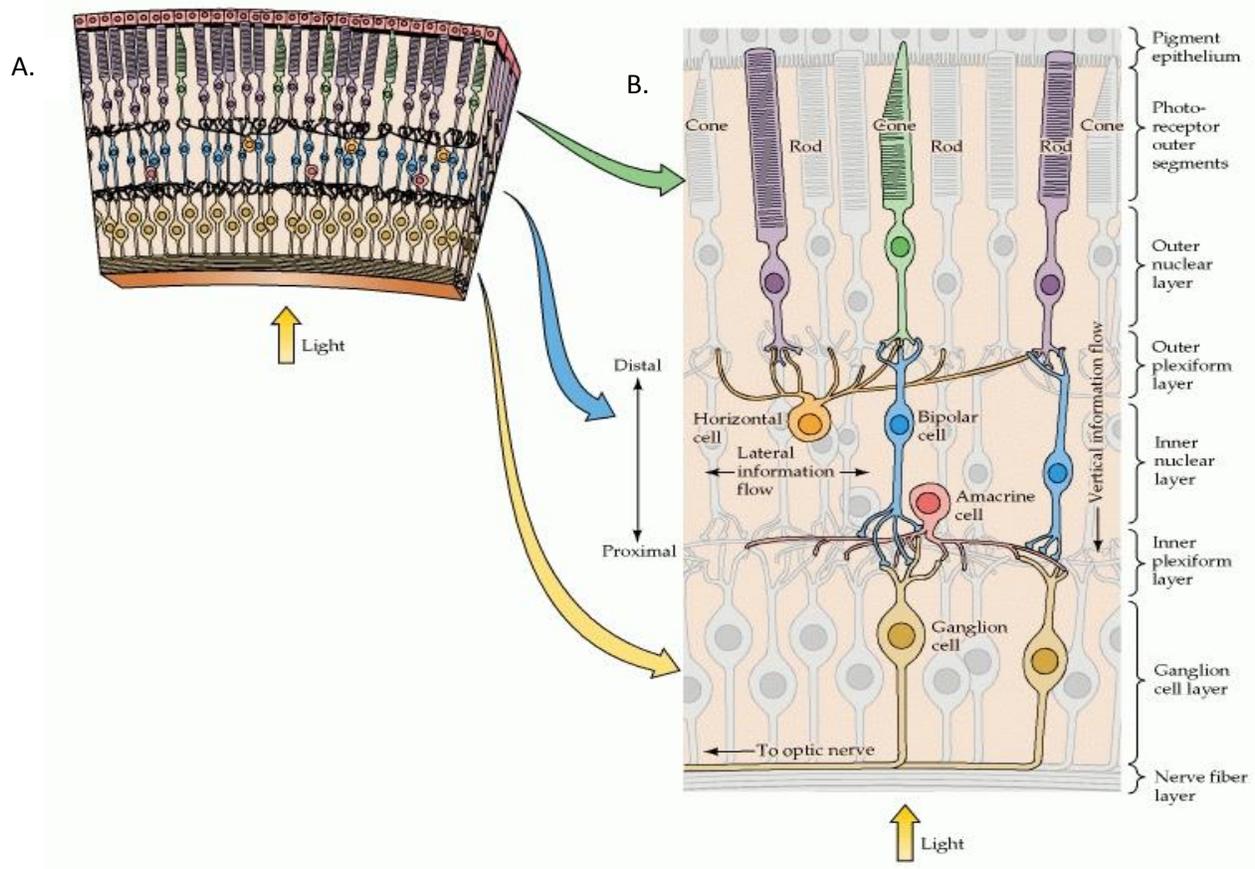
Nella retina interna, così come nel cervello, l'accoppiamento neurovascolare regola il flusso ematico per adeguare l'apporto di ossigeno e nutrienti alle richieste sostenute dall'attività elettrica e metabolica, mentre le barriere tra sangue e parenchima (barriera emato-encefalica e BRB) controllano il flusso di acqua e ioni, proteggono dall'influsso di proteine plasmatiche e regolano l'infiammazione (Abcouwer and Gardner, 2014). La stretta comunicazione tra neuroretina e vasi è l'elemento chiave nel mantenimento dell'omeostasi dell'organo; molte delle condizioni in cui tale equilibrio viene alterato, sfociando in stati patologici, sono causate proprio da perturbazioni nelle interazioni neurovascolari.

### 1.1.3. Funzione della retina

La retina costituisce la porzione sensoriale del sistema visivo.

La funzione fondamentale della retina è rappresentata dal compimento della fototrasduzione che costituisce la prima fase del processo che conduce alla percezione visiva. La fototrasduzione avviene a livello dei fotorecettori e consiste nel catturare fotoni e convertire l'energia fotochimica

(luminosa) in segnali nervosi. Questi saranno poi integrati e trasmessi a stazioni nervose intermedie ed infine raggiungeranno le aree corticali dove verranno decifrate e interpretate a generare immagini (Antonetti et al., 2006). La circuiteria retinica principale è rappresentata da una “via verticale”, in cui le informazioni visive si muovono dai fotorecettori alle cellule bipolari e da queste alle RGC (Fig. 5).



**Figura 5** Struttura della retina. (A) Sezione della retina che mostra l’organizzazione generale degli strati retinici. (B) Diagramma della circuiteria di base della retina. Tratta da Purves et al., 2001.

In queste trasmissioni di segnali il principale neurotrasmettitore coinvolto è il glutammato. Alla via verticale si affiancano due “vie orizzontali”, rappresentate dalle cellule orizzontali ed amacrine, che modulano il flusso di informazioni (Purves et al., 2001).

I fotorecettori, situati nell'ONL, sono il tipo cellulare sensibile ai raggi luminosi, focalizzati sulla retina tramite un sistema di lenti generato dalla cornea e dal cristallino; il segnale nervoso che si genera a livello dei fotorecettori viene integrato dai neuroni degli strati retinici fino alle RGC. Zone diverse della retina sono responsabili di funzioni specializzate; la regione centrale, la macula, in cui è concentrato il più alto numero di fotorecettori, è associata alla migliore visione e permette di distinguere i dettagli più fini degli oggetti. L'anello più esterno è invece responsabile della visione periferica, in quanto consente di vedere tutto ciò che si trova intorno al soggetto su cui è focalizzato l'occhio. Il punto chiave della retina, per la messa a fuoco delle immagini, è la fovea, parte centrale della macula, una regione associata alla più alta risoluzione dei minimi dettagli di un'immagine e alla visione a colori grazie ad un'alta concentrazione di coni (Cuenca et al., 2014).

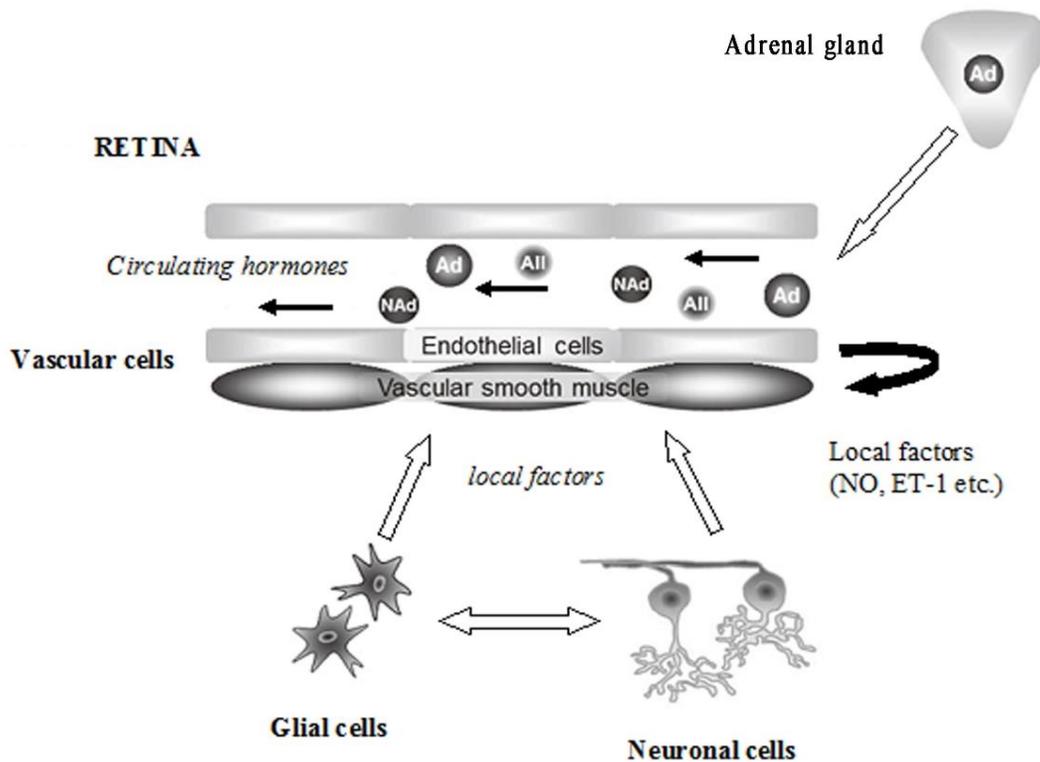
#### 1.1.4. Patologie della retina: le retinopatie

Sebbene tutte le parti dell'occhio, e del sistema visivo nel complesso, siano importanti per una buona percezione delle immagini, la retina ha un ruolo imprescindibile nella funzione visiva. Non c'è nessuna altra fonte di segnali visivi che possano essere processati nel cervello se non quella proveniente dalla retina, nella forma di treni di potenziali d'azione che percorrono gli assoni delle RGC (Purves et al., 2001).

Ne deriva che, ad ogni situazione che risulti in un danno retinico consegue un deterioramento delle facoltà visive di vario grado, fino alla cecità (Gabriel, 2013). La retina è affetta da un elevato numero di malattie che, in generale, prendono il nome di retinopatie. L'esatto meccanismo che conduce alla perdita della funzionalità retinica può essere vario ma spesso si basa su alcuni presupposti comuni a molte delle condizioni patologiche.

La retina è uno degli organi con le più alte esigenze metaboliche di tutto l'organismo ed è, di conseguenza, estremamente vulnerabile. A tutte le situazioni in cui non è più garantito un adeguato sostegno metabolico al tessuto, consegue un danno alla retina. L'omeostasi e il rispetto delle condizioni fisiologiche sono, di base, il risultato dell'azione coordinata delle varie componenti che costituiscono l'organo. In condizioni normali, neuroni, cellule gliali ed elementi vascolari agiscono insieme in maniera coordinata. Le cellule sono costantemente immerse in un ambiente ricco di ormoni, ioni, proteine e mediatori chimici provenienti dalle cellule e dai tessuti

circostanti; questi segnali coordinano un'interrelazione locale tra metabolismo, densità capillare e flusso sanguigno. Questa integrazione funzionale tra vasi sanguigni e retina neurosensoriale è, appunto, clinicamente evidente durante l'autoregolazione, nella quale le arteriole e le venule retiniche si restringono in risposta all'iperossia e si dilatano in condizioni di ipercapnia (Gardner et al., 2011). Cambiamenti nell'attività neuronale inducono variazioni nel flusso sanguigno e nella densità dei capillari che irrorano una determinata regione della retina (Kern, 2014). Lo stretto dialogo tra i vari tipi cellulari retinici, basato su queste segnalazioni, garantisce una loro pronta risposta integrata alle variazioni dell'ambiente chimico, ormonale e metabolico in cui il tessuto è immerso (Fig. 6).



**Figura 6** Componenti cellulari dell'unità neurovascolare della retina e rappresentazione schematica delle loro interazioni. Gli ormoni circolanti e i fattori locali rilasciati dalle cellule endoteliali e dal tessuto retinico circostante (neuroni e cellule gliali) possono svolgere un ruolo importante nella regolazione del flusso sanguigno. Ad, adrenalina; A II, angiotensina II; ET-1, endotelina-1; NAd, noradrenalina; NO, ossido nitrico. Tratta da Nakahara et al., 2013.

Su questo principio si basa il concetto di unità neuro-vascolare, intesa come insieme di relazioni fisiche e biochimiche tra queste componenti (neuroni, glia e vasi) volte a garantire ai neuroni un adeguato supporto metabolico in funzione della loro attività. Il mantenimento dell'integrità dell'unità neuro-vascolare è cruciale per il benessere della retina, così come di tutte le altre porzioni del sistema nervoso, in cui sussiste lo stesso tipo di organizzazione (Kern et al., 2014).

Diversi tipi di insulti nocivi, ad origine ed eziologia varia, interagiscono negativamente in questa comunicazione e, inducendo danni al sistema in una delle sue componenti, conducono a disfunzione dell'organo che si manifesta sotto forma di retinopatia. La moltitudine dei segnali che possono danneggiare la retina, e la conseguente varietà di manifestazioni della disfunzione indotta, rende difficile fare una classificazione univoca di queste patologie. Tuttavia, un tratto che accomuna alcune delle maggiori retinopatie è lo sviluppo di uno stato di ischemia (Osborne et al., 2004).

L'ischemia è una condizione di totale o parziale assenza di flusso sanguigno ai tessuti, cosicché le cellule che lo costituiscono vanno incontro ad una condizione di mancanza di ossigeno completa (anossia) o parziale (ipossia) subendo, inoltre, un insufficiente apporto di substrati metabolici ed un'inadeguata rimozione dei prodotti di rifiuto. In questo modo il tessuto subisce un danno poiché le cellule non riescono a soddisfare le proprie necessità energetiche ed incorrono, quindi, in una perdita delle proprietà omeostatiche (Osborne et al., 2004). Nonostante sia basato su un quadro biochimico costante, il danno ischemico alla retina si sviluppa in maniera peculiare in ciascuna diversa retinopatia; in generale, l'ischemia suscita risposte cellulari che riguardano sia i vasi che le cellule nervose. È stato dimostrato che a causa dell'ipossia e della deprivazione di substrati metabolici che il tessuto subisce durante il periodo d'ischemia, i neuroni retinici degenerano per apoptosi (Levin and Louhab, 1996, Osborne et al., 1999, Campochiaro, 2000, Barber, 2003).

Dall'altro lato, l'ischemia stimola una risposta neoangiogenica, volta a ripristinare un flusso sanguigno ideale. Infatti, la neovascolarizzazione nella retina avviene quando i vasi retinici residenti rispondono ad ipossia locale con proliferazione delle cellule endoteliali, nel tentativo di riperfondere le aree ischemiche con lo sviluppo di nuovi vasi (Afzal et al., 2007).

L'angiogenesi è un fenomeno complesso, caratterizzato da vasodilatazione e aumento della permeabilità dei vasi esistenti e dalla degradazione della matrice extracellulare che consente alle cellule endoteliali attivate e proliferanti di migrare e formare nuovi "tronchi" vascolari (Witmer et al., 2003). Infatti, le cellule endoteliali dei vasi, nell'adulto, sono quiescenti ma mantengono

una capacità residua di ripristinare il loro potere proliferativo in situazioni particolari, quali riparazione di ferite, e in associazione con specifici segnali proangiogenici. La stimolazione delle cellule endoteliali, responsabile della neoangiogenesi, è frutto della perdita dell'equilibrio tra segnali pro-angiogenici e anti-angiogenici, a favore dei primi. Cambiamenti patologici nel tessuto, come nell'ischemia della retina, sono in grado di perturbare questo equilibrio, innescando una neovascolarizzazione non fisiologica. La via di segnalazione implicata in questa attivazione delle cellule endoteliali è stata indagata nel dettaglio. È emerso che il fattore inducibile dall'ipossia  $1\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor  $1\alpha$ , HIF- $1\alpha$ ) sarebbe probabilmente l'elemento chiave nella regolazione dell'angiogenesi in risposta all'ipossia; "l'attivazione" di HIF- $1\alpha$ , infatti, stimola la produzione di numerosi fattori associati alla neovascolarizzazione (Semenza, 2000, Maxwell and Ratcliffe, 2002). Tra questi, il fattore di crescita endoteliale vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) viene indicato come il principale segnale pro-angiogenico ed il suo contributo è stato ampiamente analizzato (Hofman et al., 2001, De Almodovar et al., 2009). È noto che i livelli di VEGF sono incrementati in condizioni di ischemia della retina e che questi correlano con l'evoluzione dei fenomeni neoangiogenici (Osborne et al., 2004). Tuttavia è stato dimostrato il coinvolgimento, oltre al VEGF, di altri fattori di crescita nella risposta neoangiogenica innescata dall'ischemia, tra cui fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor, FGF), eritropoietina, fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGR) e angiopoietina I. Questo suggerisce che, sebbene il VEGF abbia un ruolo cruciale, i passaggi chiave che conducono alla neovascolarizzazione sono il risultato dell'azione cumulativa e sinergica di diversi elementi (Castellon et al., 2002).

Retinopatia diabetica (Diabetic Rethinopathy, DR), glaucoma, occlusione dell'arteria/vena retinica centrale/periferica e, possibilmente, degenerazione maculare dipendente dall'età, sono condizioni associate ad ischemia retinica. Tutte queste malattie possono, quindi, sviluppare le severe conseguenze indicate sopra; questo rende cruciale il trattamento dell'ischemia retinica (Chen et al., 2012).

Tra le retinopatie sopra elencate, la DR merita una menzione di riguardo, vista la rapida tendenza del diabete a diventare un'epidemia globale e l'alta prevalenza della DR tra i diabetici. È stato ipotizzato che lo sviluppo della DR sia, in parte, in funzione dello stato ipossico che si genera (Arden and Sivaprasad, 2012). La combinazione tra un'ingente richiesta metabolica ed una perfusione vascolare minima limitano le capacità della retina interna di adattarsi allo stress metabolico indotto dal diabete (Nyengaard et al., 2004, Antonetti et al., 2006).

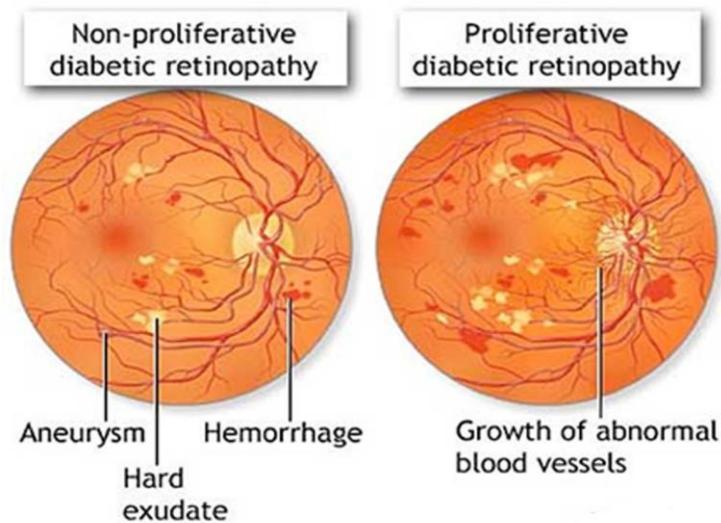
## 1.2. La retinopatia diabetica

### 1.2.1. Storia e ruolo della disfunzione vascolare

La DR è la più comune complicazione del diabete mellito, che rappresenta ad oggi un'emergenza sanitaria mondiale per l'elevata prevalenza (8,3% della popolazione adulta) e il tasso di morbilità associato (Cheung et al., 2010). Il diabete, in tutte le sue varianti, è una malattia metabolica cronica, che provoca elevati livelli di zuccheri nel sangue a digiuno, dovuti all'incapacità di produrre insulina a sufficienza o ad uno stato di resistenza all'insulina stessa (Kato et al., 2013). Il segno clinico tipico è l'iperglicemia, con livelli di glucosio ematici che si mantengono persistentemente molto elevati rispetto alla situazione di controllo. L'iperglicemia risulta essere tossica per molte cellule e gli effetti nocivi si manifestano a livello di vari organi: la funzione cardiaca, così come quella renale sono affette in maniera particolare, con un'alta prevalenza di disfunzione in soggetti diabetici.

Tuttavia, la conseguenza più comune del diabete è la DR. Essa si sviluppa nel 75% dei pazienti con diabete di tipo 1 e nel 50% dei pazienti con diabete di tipo 2 e costituisce la maggiore causa di cecità nei soggetti di età superiore a 50 anni (Kempner et al., 2004, Gabriel, 2013, Luty, 2013, Szabadfi et al., 2014a). Dal punto di vista clinico, si possono distinguere chiaramente due forme di DR: una forma iniziale, definita "non proliferativa" (NPDR), in cui non si rileva neovascolarizzazione nella macula, ed una "proliferativa" (PDR), dove la formazione di nuovi vasi nella macula è evidente (Gabriel, 2013, Tarr et al., 2013) (Fig.7).

Il fatto che, per lungo tempo, i primi sintomi clinicamente evidenziati in pazienti affetti da DR riguardassero il comparto vascolare ha condotto alla teoria secondo cui la DR è primariamente un disordine del microcircolo, i cui effetti degradanti sono dovuti alle conseguenze della disfunzione dei vasi, a cui seguono ischemia e successivo aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Fulton et al., 2009).

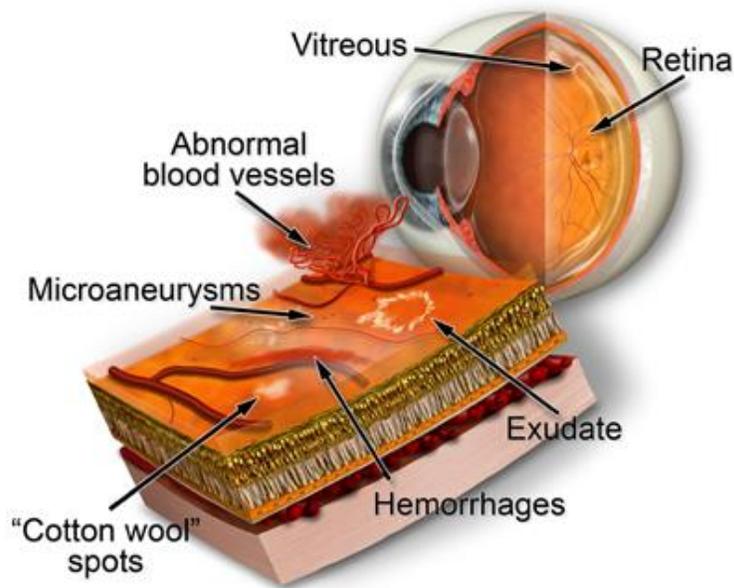


**Figura 7** Differenze tra retina affetta da NPDR o PDR. Tratta dal sito [maxivisioneyehospital.wordpress.com](http://maxivisioneyehospital.wordpress.com)

Tuttavia, è stato anche descritto come il danno neuronale possa precedere ogni cambiamento del microcircolo. Sebbene, quindi, il ruolo causale primario della disfunzione vascolare risulta ad oggi ancora dubbio, come discusso nei paragrafi seguenti, il peso delle variazioni patologiche a carico dei vasi nella sintomatologia clinica e nel danno connesso, quantomeno nella fase avanzata della malattia, è indiscutibile. I cambiamenti anatomici, riguardanti i vasi, che avvengono durante la progressione della DR sono stati ben caratterizzati e includono la perdita di periciti e di cellule endoteliali, la formazione di capillari acellulari, un precoce ispessimento della membrana basale, la comparsa di microaneurismi e, infine, proliferazione fibrovascolare e neovascolarizzazione pre-retinica, che conducono a perdita delle abilità visive a causa di emorragie, dai nuovi vasi, che interessano il vitreo, e distacco della retina conseguente alla trazione esercitata dal tessuto fibrotico (Cheung et al., 2010, Durham and Herman, 2011) (Fig 8).

Nella NPDR i disturbi visivi sono principalmente dovuti alla formazione di edema, frutto dell'aumentata permeabilità vasale. L'incremento della permeabilità riguarda molti vasi contemporaneamente, interessando prima i grandi vasi superficiali, poi i capillari della retina esterna, coinvolti, in molti casi, entro due mesi dall'insorgenza del diabete (Kern and Engerman, 1994, Cheung et al., 2010, Durham and Herman, 2011)

La crescente permeabilità vasale è la conseguenza di cambiamenti regolatori nelle proteine che formano le giunzioni strette su un gran numero di cellule endoteliali, associato alla morte per apoptosi di un piccolo numero ancora di cellule endoteliali.



**Figura 8** Illustrazione delle alterazioni anatomiche a carico dei vasi retinici che si evidenziano nel corso della DR. Tratta dal sito [www.southwesterneyecare.com.au](http://www.southwesterneyecare.com.au)

Con la progressione della malattia si assiste alla comparsa di micro-aneurismi, la cui formazione viene imputata ad una perdita del contributo regolatore svolto dai periciti nell'omeostasi della struttura dei vasi. I periciti, o cellule murali, hanno il soma immerso nella membrana basale e, con le loro terminazioni espanse, avvolgono i capillari retinici; tramite interazione diretta o segnalazione paracrina stabilizzano e monitorano la maturazione delle cellule endoteliali. La più alta densità di periciti nel SNC, e in particolare nella retina, rispetto ad ogni altro distretto corporeo sostiene l'idea per cui essi hanno una funzione importante nel SNC, dove il controllo del flusso sanguigno è fondamentale (Frank et al., 1987, Shepro and Morel, 1993). La retina di soggetti diabetici spesso presenta diminuzione o assenza di periciti e l'apoptosi o la migrazione di questo tipo cellulare rappresenta uno dei cambiamenti precoci nella patogenesi della malattia

(Kern and Engerman, 1994). La comunicazione tra periciti e cellule endoteliali è fondamentale per regolare il comportamento di quest'ultimo tipo cellulare; alla perdita dei periciti consegue iperplasia endoteliale e alterazioni nelle giunzioni (Armulik et al., 2005). Questo può spiegare la formazione di microaneurismi in seguito alla perdita dei periciti.

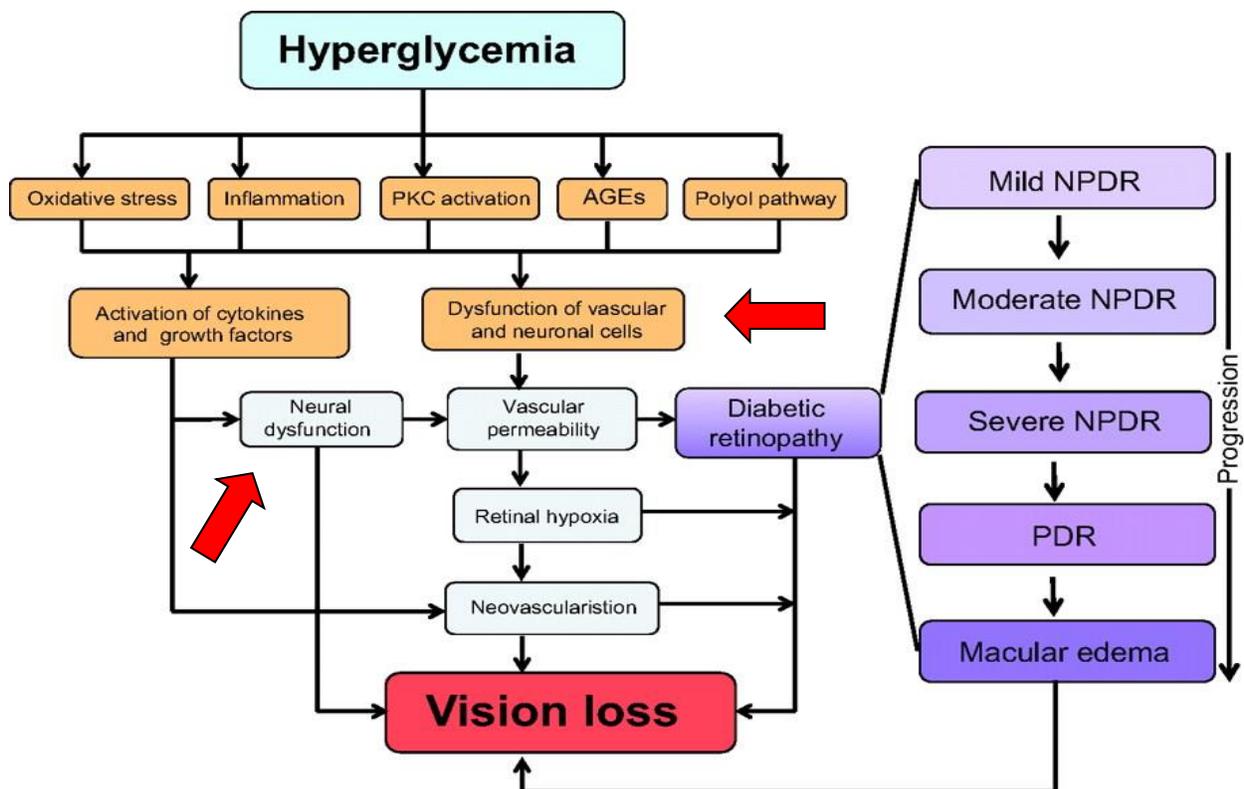
La PDR, lo stadio più grave della malattia, è indicato dall'insorgenza di fenomeni neoangiogenici. Come detto in precedenza, l'angiogenesi gioca un ruolo importante nelle patologie neovascolari (proliferative) retiniche, nelle quali il danno alla retina è causato da una condizione ischemica che, da una parte promuove il rilascio di fattori proangiogenici con conseguente formazione di nuovi vasi aberranti che conducono a emorragie e/o distacco retinici, e, dall'altra, stimola l'apoptosi neuronale. Numerosi studi dimostrano che i livelli di VEGF nel liquido vitreale di soggetti affetti da DR sono più alti rispetto ai controlli e correlano con la gravità della malattia (Aiello et al., 1994, Abcouwer and Gardner, 2014). Anche l'espressione di altri fattori dal potenziale angiogenico, inclusi il fattore di crescita insulina-simile 1 (Insulin-like Growth Factor, IGF-1), FGF, il fattore di crescita della placenta e il PDGR, è incrementata (Robbins et al., 1994, Hueber et al., 1996, Paques et al., 1997, Khaliq et al., 1998, Spirin et al., 1999). L'abilità del VEGF di promuovere sia la permeabilità vascolare, sia la neoangiogenesi, lo rende un agente causale importante nella disfunzione vasale osservata nella DR. Il legame del VEGF al suo recettore, VEGFR-2, sulla membrana plasmatica delle cellule endoteliali, causa il disassemblaggio delle giunzioni tra le cellule che costituiscono l'endotelio ed agisce come potente segnale mitogeno (Abcouwer and Gardner, 2014). La neoangiogenesi che caratterizza la PDR conduce alla formazione di vasi aberranti, caratterizzati da tortuosità, grovigli (detti ciuffi o "tufts") e con una parete non consona. Nei casi più gravi, questi vasi si sviluppano fino alla superficie del tessuto retinico e, aderendo all'umor vitreo, esercitano trazione su di esso e conducono al distacco della retina. Nella DR avanzata, la disfunzione dei vasi retinici esistenti (occlusione, aneurismi, etc), non più in grado di sostenere una corretta perfusione tissutale, unita alla neoangiogenesi aberrante, sostengono il protrarsi dello stato di ischemia retinica, con effetti deleteri su numerose popolazioni cellulari.

### 1.2.2. Patogenesi della retinopatia diabetica

Seppure non vi sia, a tutt'oggi, chiarezza assoluta sull'argomento, l'iperglicemia sembra essere il fattore iniziale scatenante la catena di eventi che costituiscono la patogenesi della DR (Matthews et al., 2004). L'associazione tra alto glucosio e DR è confermata da studi epidemiologici, che mostrano una correlazione positiva tra severità dell'iperglicemia e grado di DR (Doft et al., 1984, Rosenstock et al., 1986).

L'iperglicemia è tossica per moltissimi dei tipi cellulari presenti nell'organismo; tuttavia alcuni organi risultano essere maggiormente afflitti dal diabete, tra cui i reni e il sistema nervoso, retina inclusa. Questo si spiega considerando che, mentre la maggior parte delle cellule richiede l'azione dell'insulina per permettere l'entrata del glucosio nel citoplasma, le cellule del rene e del tessuto nervoso sono insulina-indipendenti, per cui il glucosio si muove "liberamente" attraverso la membrana plasmatica indipendentemente dall'insulina. Il trasportatore per il glucosio, GLUT-1, presente sulle cellule endoteliali dei vasi, su neuroni e cellule di Müller retinici, è soggetto a saturazione; tuttavia, diversi fattori associati alla DR, come ipossia, VEGF e IGF-1, aumentano l'espressione di GLUT-1 (Kumagai, 1999, Ruberte et al., 2004), incentivando il trasporto del glucosio attraverso la BRB; ciò risulta in un accumulo intracellulare di glucosio qualora le cellule siano esposte cronicamente ad un ambiente iperglicemico (Busik et al., 2002).

L'iperglicemia agisce tramite attivazione o disregolazione di diverse vie biochimiche e metaboliche, che includono, tra le principali: la via della sorbitolo-aldoso reductasi (nota come "via dei polioli"), la via diacilglicerolo (DAG) - proteina chinasi C (PKC), l'aumento dell'espressione di fattori di crescita (VEGF, IGF-1), cambiamenti emodinamici, l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), infiammazione e leucostasi, ma soprattutto, aumento della produzione di prodotti avanzati di glicazione (Advanced Glycation End-product, AGE) e stress ossidativo. L'insieme di questi meccanismi può condurre ad una cascata di eventi, quali la promozione di apoptosi, infiammazione e neoangiogenesi che, nel complesso, rappresentano la forma in cui si manifesta il danno alla retina (Ahsan, 2015) (Fig. 9).



**Figura 9** Illustrazione schematica del meccanismo attraverso cui l'iperglicemia causa perdita della vista. Le vie biochimiche indicate concorrono, in modi diversi, a determinare l'insorgenza di disfunzione e apoptosi in cellule sia neuronali che vascolari (freccie rosse). Tratta da Robinson et al., 2012.

#### *Via della sorbitolo – aldoso deidrogenasi*

Nel diabete, la via metabolica dei polioli metabolizza il glucosio in eccesso; l'enzima aldoso-reduttasi, presente nella retina, riduce il glucosio a sorbitolo usando NADPH come cofattore. La sorbitolo-deidrogenasi converte il sorbitolo in fruttosio. La formazione di sorbitolo ha molti effetti nocivi sulle cellule retiniche (Gabbay et al., 1973): 1) la membrana plasmatica è impermeabile a questa molecola che si accumula all'interno generando stress osmotico, 2) la produzione di fruttosio-3-fosfato e la sua degradazione creano intermedi reattivi, forti agenti glicanti e coinvolti nella generazione di AGE, 3) l'uso di NADPH ne riduce la disponibilità per ripristinare il potere riducente della glutazione reduttasi, con conseguente diminuzione del

glutazione ridotto, quindi del potere antiossidante della cellula, 4) lo spostamento del rapporto NADH/NAD<sup>+</sup> innesca la NADH-ossidasi, responsabile della produzione di ROS (Barnett et al., 1986, Tarr et al., 2013). Questa via, quindi, oltre a creare danno direttamente, concorre alla produzione di fattori nocivi cruciali nella patogenesi, ovvero AGE e stress ossidativo.

#### *Via DAG – PKC*

La PKC è una serina/treonina chinasi implicata in vie di trasduzione del segnale, in risposta a specifici stimoli ormonali, neuronali e fattori di crescita. L'iperglicemia porta ad aumento dell'entrata del glucosio nella glicolisi, che, a sua volta, potenzia la sintesi de novo di DAG, attivatore chiave della PKC, come dimostrato da studi sperimentali e clinici (Koya and King, 1998). Nel diabete, questa attivazione dell'isoforma PKC $\beta$ 1/2, indotta dal glucosio tramite produzione di DAG, determina cambiamenti nella permeabilità endoteliale, nella sintesi di proteine della matrice cellulare, nell'emodinamica del flusso sanguigno retinico e nella produzione e segnalazione intracellulare del VEGF. L'attivazione della PKC $\beta$ 1/2 sembra contribuire anche alla perdita di periciti (Caldwell et al., 2003). In aggiunta, i livelli di PKC $\delta$ , un'altra isoforma di PKC, espressa nei periciti della retina, è aumentata da alte concentrazioni di glucosio o dall'induzione di diabete in animali sperimentali (Geraldès et al., 2009, Hamilton et al., 2010).

#### *Sistema RAAS*

Anche il sistema RAAS, che regola, fisiologicamente, la pressione sanguigna e l'equilibrio dei fluidi, è stato dimostrato essere alterato nei pazienti diabetici (Giacchetti et al., 2005). L'espressione dei recettori e delle molecole segnale del sistema RAAS, ovvero renina, enzima convertitore dell'angiotensina I e II e recettori dell'angiotensina, sono incrementati nella retina, durante la DR (Funatsu et al., 2002, Wilkinson-Berka, 2006). Questo cambiamento è indipendente dalla pressione sistemica, sebbene l'esatto meccanismo attraverso il quale il sistema RAAS contribuisce alla DR non è ben chiaro. È stato ipotizzato che l'angiotensina II sia implicata nell'attivazione della PKC e nella segnalazione del VEGF (Otani et al., 1998).

### *Infiammazione e leucostasi*

Il ruolo dell'infiammazione nella storia naturale della DR è un argomento di indagine molto seguito negli ultimi anni. L'infiammazione cronica è caratterizzata dall'aumento della permeabilità vascolare, da edema, infiltrazione di cellule infiammatorie, espressione di chemochine e citochine, distruzione tissutale, tentativo di riparo e neovascolarizzazione; la DR presenta la maggiorparte di questi aspetti (Antonetti et al., 2006). La catena innescata dai segnali proflogistici può essere strettamente legata ad alcuni dei risvolti connessi alla DR. L'incremento delle concentrazioni sieriche di citochine pro-infiammatorie, di molecole di adesione, e l'attivazione di cellule immunitarie contribuiscono a incentivare la risposta infiammatoria. Nella sistema vascolare retinico, questo risulta in importanti alterazioni, tipiche della DR, come la leucostasi, che porta ad occlusione capillare, e l'aumento della permeabilità dei vasi, mediato dal VEGF (Chibber et al., 2007). Inoltre, l'attivazione della microglia nella retina diabetica può condurre all'aumento della produzione, oltre che di citochine proinfiammatorie, anche di ROS, fattori di crescita, metalloproteasi della matrice e NO, tutti coinvolti nell'induzione della DR (Langmann, 2007).

### *Effetti degli AGE*

Tra i meccanismi patogenetici che concorrono nella DR particolare attenzione viene oggi rivolta al ruolo degli AGE. La formazione e l'accumulo di AGE sono associati alla DR (Stitt et al., 2002). I livelli di AGE in soggetti diabetici correlano positivamente con la severità della malattia (Zong et al., 2011). Gli AGE sono un gruppo eterogeneo di molecole originate dalla reazione non-enzimatica tra zuccheri ridotti e gruppi amminici liberi di proteine, lipidi ed acidi nucleici. La modifica della struttura terziaria delle proteine, conseguente a questa reazione, influisce negativamente sulla loro attività enzimatica, nel riconoscimento dei recettori e nel turnover fisiologico (Zong et al., 2011). È noto che l'accelerato accumulo di AGE, nel diabete, può favorire la formazione di legami crociati tra le proteine a lunga emivita, producendo rigidità e disfunzione vascolare.

In generale, nel contesto della DR, gli AGE possono danneggiare le cellule retiniche tramite vie dipendenti e/o indipendenti da recettore. Nel primo caso gli AGE sierici circolanti interagiscono con specifici recettori espressi sulle cellule retiniche, avviando segnalazioni intracellulari, mentre, nel secondo, gli AGE intracellulari causano danno alla cellula tramite stimolazione della

produzione di superossido mitocondriale e attivazione di vie di segnalazione, quale quella della PKC. Tra i recettori degli AGE quello meglio caratterizzato è il recettore RAGE; esso è presente su quasi tutte le cellule della retina sebbene la più alta espressione sia rilevata a livello delle cellule di Müller. Il legame degli AGE a RAGE innesca una segnalazione intracellulare che sfocia in stress ossidativo e produzione di citochine pro-infiammatorie (Yamagishi et al., 2006). Di conseguenza, questo asse AGE-RAGE gioca un ruolo centrale nell'infiammazione, nella neurodegenerazione e nella disfunzione microvascolare della DR (Zong et al., 2011). In colture di periciti tale segnalazione promuove la generazione di ROS e conduce a morte cellulare per apoptosi (Yamagishi et al., 2006). Anche i neuroni degenerano per apoptosi in seguito a questa interazione (Nitti et al., 2007). Inoltre, l'attivazione del recettore RAGE sulle cellule di Müller induce la produzione di VEGF da parte di questo tipo cellulare (Hammes et al., 1999). Uno studio sperimentale ha dimostrato che l'iniezione intravitreale di AGE induce un aumento di 5 volte dei livelli di mRNA del VEGF nella retina neurosensoriale (GCL, INL e ONL prossimale) di ratto. Tale incremento è inibito dal trattamento con antiossidanti, suggerendo il coinvolgimento delle ROS come mediatori di questa risposta (Lu et al., 1998).

#### *Induzione ed effetti dello stress ossidativo*

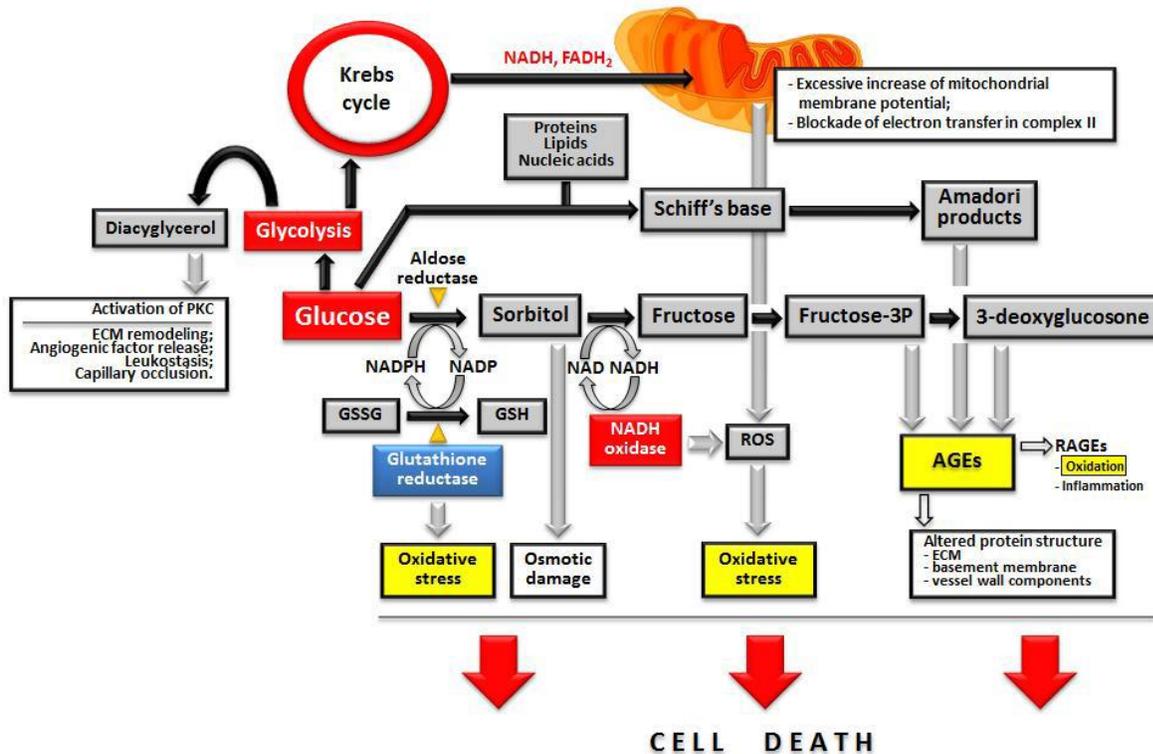
Il ruolo dello stress ossidativo è forse l'aspetto più indagato nell'ambito della patofisiologia della DR. Pazienti affetti hanno livelli più alti di markers associati al danno ossidativo, rispetto a soggetti non affetti. La retina consuma una grande quantità di acidi grassi polinsaturi ed ha i più elevati tassi assorbimento di ossigeno e ossidazione di glucosio relativa, rispetto ad ogni altro tessuto; essa, quindi, è tra i tessuti più suscettibili allo stress ossidativo (Kassab and Piwovar, 2012). L'incremento dello stress ossidativo può essere frutto dell'aumento della sintesi di precursori di ROS e/o della diminuita efficienza, o inibizione, dei sistemi addetti alla loro neutralizzazione (Baynes et al., 1991). Le ROS sono una famiglia di molecole che include radicali liberi dell'ossigeno altamente reattivi (quali l'anione superossido,  $O_2^{\cdot-}$ , e il radicale ossidrilico,  $OH^{\cdot}$ ) e specie ossidanti non radicaliche (quali il perossido di idrogeno,  $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  e superossido sono le due molecole più indagate negli anni recenti, negli studi circa il ruolo dello stress ossidativo nella DR; dato che il radicale superossido, nella cellula, viene rapidamente convertito ad acqua ossigenata, essa viene considerata il principale membro dei ROS implicato nella questione (Gough and Cotter, 2011).

Le fonti di stress ossidativo nel diabete sono molteplici; diverse delle vie metaboliche erroneamente attivate, citate sopra, convergono sulla produzione di molecole ossidanti, le quali inducono apoptosi e risposta infiammatoria, che promuove l'angiogenesi (Ola et al., 2012). Inoltre, come detto sopra, le cellule dei capillari retinici, così come le cellule dei glomeruli renali e i neuroni, sono incapaci di diminuire la velocità di trasporto di glucosio (Kassab and Piwovar, 2012). Di conseguenza, l'aumento della disponibilità di substrati metabolici incentiva il ciclo dell'acido citrico e l'ossidazione del piruvato; ciò conduce all'accumulo di intermedi che entrano nella catena di trasporto degli elettroni, come NADH e FADH<sub>2</sub>. È stato ipotizzato che il potenziamento del flusso nella via della fosforilazione ossidativa innalzi il potenziale di membrana mitocondriale oltre una certa soglia, bloccando il trasporto degli elettroni a livello del complesso III. Questi elettroni, quindi, fuoriescono dalla catena e, riducendo molecole di O<sub>2</sub>, formano anione superossido (Du et al., 2003). I livelli di superossido sono elevati nella retina di ratti diabetici e in cellule retiniche incubate in un mezzo contenente alto glucosio o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il cui contenuto è anch'esso aumentato nella retina di ratti diabetici. Queste specie, dotate di elevata reattività, hanno come bersaglio le principali macromolecole cellulari, causandone modificazioni chimiche, con conseguente danno alla cellula e alla funzione tissutale, che conducono alla patologia (Plaine, 1955, Al-Shabrawey and Smith, 2010, Eshaq et al., 2014); la perossidazione dei lipidi della membrana e il danno ossidativo al DNA sono incrementati nella retina in presenza di diabete (Kowluru, 2001).

Nell'insieme, le conseguenze dello stress ossidativo sulle cellule retiniche possono condurre fino all'attivazione delle vie di morte cellulare per apoptosi. Evidenze crescenti suggeriscono che la correlazione tra iperglicemia e stress ossidativo rappresenta l'evento chiave nella patogenesi della DR (Hartnett et al., 2000, Kowluru and Chan, 2007, Eshaq et al., 2014) (Fig. 10). È stato ipotizzato che sia lo sviluppo che la progressione della malattia siano primariamente il risultato dell'aumento delle specie ossidanti, prodotto finale di varie vie. Lo stress ossidativo è stato proposto come "meccanismo unificante", che collega tutte le vie biochimiche che conducono al danno indotto dall'iperglicemia nella DR (Brownlee, 2005).

I meccanismi elencati definiscono le basi biochimiche/fisiologiche degli effetti nocivi causati dal diabete nella DR. Il raggiungimento di completa chiarezza a riguardo si pone come presupposto cruciale per avanzare proposte terapeutiche volte al trattamento della malattia. Sebbene ci siano ancora diversi aspetti da chiarire, le vie che conducono alla generazione di AGE e allo stress

ossidativo, essendo crocevia di molte delle fonti di danno, si configurano tra i campi di indagine più seguiti e promettenti.



**Figura 10** Illustrazione delle vie biochimiche alterate all'alto glucosio. Si nota come diverse di queste hanno come effetto ultimo l'aumento della produzione di AGE o l'incremento dello stress ossidativo (in giallo). Il colore rosso indica aumento, il blu diminuzione.

### 1.2.3. Cura e prevenzione: trattamenti in uso e nuove prospettive

L'iperglicemia è riconosciuta come il fattore causale primario nel diabete e nella DR; il controllo sistemico della glicemia, unito ad una pressione arteriosa e a livelli di lipidi normali, continua ad essere una pietra angolare per il trattamento di pazienti con diabete oculare e complicazioni sistemiche (Cheung et al., 2010).

Tuttavia è stato dimostrato che, in molti casi, questo non è sufficiente a fermare la progressione della DR, né a far regredire i segni clinici già manifestati (White et al., 2008). In alcuni pazienti,

le complicazioni microvascolari del diabete sembrano progredire anche quando il meccanismo principale di danno, ovvero l'alto glucosio, viene bloccato, tramite controllo continuo della glicemia; questo fenomeno è chiamato "memoria metabolica", secondo cui l'iperglicemia causa modifiche epigenetiche al genoma tali che le cellule continuano a mostrare caratteri patogenici anche quando non sono più esposte allo stress diabetico (Villeneuve et al., 2011). Ad esempio, è stato visto che l'esposizione di alcune cellule all'iperglicemia può promuovere modifiche istoniche irreversibili e associate a fenotipo patologico della cellula (Wegner et al., 2014). Posta questa evenienza, qualsiasi sia la causa, si rende necessario un trattamento ulteriore dei pazienti affetti.

Le strategie terapeutiche ad oggi più in uso sono frutto della visione dominante della DR, per cui sono rivolte, per la maggior parte, alla patologia vascolare. Esse si distinguono in fotocoagulazione, veri e propri interventi chirurgici oftalmologici, e trattamenti farmacologici. L'impiego di ciascuno di questi è stabilito in funzione del grado di progressione della malattia e delle sue manifestazioni caratteristiche, in ciascun paziente.

La prima possibilità di trattamento è costituita dalla fotocoagulazione, nella quale flash laser sono utilizzati per "bruciare" le aree di retina che contengono vasi compromessi e soggetti a perdite (L'Esperance, 1968). I due tipi di terapia con laser, per la DR, sono: la fotocoagulazione estesa a tutta la retina (pan-retinica) per la PDR, e la fotocoagulazione ristretta alla macula (locale o a griglia) per il DME. Questa procedura rimane il perno nella terapia oftalmica delle forme di DR che costituiscono un'impellente minaccia per la vista. Tuttavia, malgrado l'efficacia nel prevenire danni alla visione, la natura distruttiva del laser è associata ad effetti collaterali significativi a livello oculare.

La seconda opzione è rappresentata da interventi di chirurgia oftalmica, riservati alle fasi più gravi della malattia. La vitrectomia è il principale trattamento chirurgico per le due complicazioni, tipiche della retinopatia avanzata, che conducono a cecità, ovvero emorragia persistente nel vitreo e distacco trazionale della retina, condizioni in cui trattamenti ulteriori non sono efficaci (Stefansson, 2009, Giuliari, 2012).

A queste, che rappresentano le strategie di intervento utilizzate nella pratica clinica per la DR, si affiancano alcuni trattamenti farmacologici mirati a bloccare, tramite strategie varie, l'azione del VEGF, responsabile di molti degli aspetti della disfunzione vascolare. Questa opzione terapeutica è comunemente utilizzata nella cura di malattie proliferative della retina. La scoperta dell'aumento dei livelli di VEGF nel liquido vitreale di pazienti affetti da DR, rispetto ai

controlli, unita alla nozione delle abilità di questo fattore di crescita di incrementare la permeabilità vascolare, che conduce all'edema maculare (Diabetic Macular Edema, DME) e stimolare la neovascolarizzazione, causa della PDR, ha condotto al concetto per cui, impedendo la segnalazione del VEGF, era possibile migliorare l'evoluzione dell'edema maculare e contrastare la progressione della PDR (Patel et al., 2006). Questa ipotesi è stata testata clinicamente tramite l'applicazione, con iniezioni intravitreali, ad esempio, di anticorpi contro VEGF-165 (Bevacizumab, Genentech), porzioni Fc di anticorpi (Ranibizumab, Genentech), proteine di fusione del recettore per il VEGF (Aflibercept; Regeneron) e VEGF-trap (Elman et al., 2010). I risultati mostrano un incremento dell'acuità visiva in una buona porzione dei soggetti trattati, anche se il successo non totale conferma l'ipotesi del coinvolgimento di altri fattori permeabilizzanti e neoangiogenici nella patogenesi della DR, quali angiopoietina-2, PDGR ed eritropoietina. Dall'altra parte, il blocco del VEGF-A, che sembra essere sicuro ed efficace per il trattamento di molte malattie proliferative dell'occhio, è associato, in molti casi, a ricorrenza di fenomeni proliferativi qualora la terapia venga interrotta. In tale situazione, è necessario un trattamento coadiuvante, con fotocoagulazione selettiva, confinata alle aree ischemiche della retina, per condurre alla stabilizzazione della malattia retinica e ad una riduzione del bisogno di trattamenti ulteriori (Cheung et al., 2010). Quindi, la necessità di continuità nell'applicazione del trattamento, in assenza della quale si assiste, in alcuni casi, alla regressione dei benefici ottenuti, costituisce un limite ulteriore. Ne consegue che, sebbene le terapie anti-VEGF abbiano applicazioni cliniche promettenti, la loro sicurezza a lungo termine nei pazienti diabetici è ancora da stabilire (Wiostko, 2007). Infatti, si riscontrano effetti avversi locali della somministrazione intravitreale ripetuta, i quali includono formazione della cataratta, distacco della retina, emorragie nel vitreo, infezioni e perdita di cellule nervose della retina (Cheung et al., 2010). Infine, un ultimo aspetto da considerare riguarda la varietà di azioni esplicate dal fattore di crescita. L'inibizione del VEGF comporta il rischio di complicazioni, poiché esso, oltre ad indurre angiogenesi patologica e iperpermeabilità, agisce come molecola trofica per i neuroni e le cellule endoteliali, in condizioni normali (Saint-Geniez et al., 2008, Kurihara et al., 2012).

La ricerca di base si è volta ad indagare l'esistenza anche di opzioni alternative. Negli anni recenti, alle molecole anti-VEGF si stanno affiancando nuove classi di sostanze con azione farmacologica, il cui potenziale di utilizzo si basa sull'incremento delle conoscenze circa la patogenesi della malattia. Trattamenti emergenti, indirizzati all'inibizione dei meccanismi biochimici che collegano l'iperglicemia alla DR, sono stati proposti; i farmaci testati includono

inibitori dell'aldoso reduttasi, inibitori della PKC $\beta$ 1/2, bloccanti del recettore dell'angiotensina e antinfiammatori (Chistiakov, 2011). Nonostante diversi risultati incoraggianti, ottenuti in animali e/o pazienti clinici, gli effetti del loro utilizzo e un possibile impiego su larga scala sono ancora in fase di studio.

Più assodato è il ruolo dello stress ossidativo e, di conseguenza, l'introduzione di molecole con proprietà antiossidanti tra i possibili farmaci di successo. La somministrazione, a topi diabetici, di luteina, noto antiossidante, tramite il cibo, riduce la generazione di ROS nella retina, risultando in una diminuita attivazione della caspasi-3, prevenzione della perdita di RGC e miglioramento nelle risposte nell'ERG (Sasaki et al., 2010). Tuttavia, fino ad ora, solo un piccolo numero di studi ha incluso la valutazione dell'effetto di antiossidanti nella DR, e gli esiti ottenuti sono controversi (Chistiakov et al., 2011).

Anche l'infiammazione gioca un ruolo importante nella patogenesi della DR e prospetta l'utilizzo di antinfiammatori come opzione terapeutica. Come per gli agenti anti-VEGF, la somministrazione intraoculare di corticosteroidi è utilizzata nella cura del DME (Aiello et al., 1994, Yilmaz et al., 2009). Essa ha tuttavia gli stessi limiti, dati dai possibili effetti collaterali delle iniezioni intravitreali.

In conclusione, emerge che molte delle comuni metodologie di intervento nel trattamento della DR sono invasive o causano pesanti effetti collaterali, e nessuna è univocamente associata a mantenimento o recupero delle abilità visive. Ciò spinge verso la ricerca di nuove strategie terapeutiche che, idealmente, siano in grado di prevenire, prima ancora di curare, l'insorgenza e la progressione della DR. A tal proposito, un contributo importante a queste indagini deve venire dall'ampliamento delle conoscenze sulla malattia. La nuova visione della DR come malattia neurodegenerativa offre una vasta prospettiva di studio.

#### 1.2.4. La retinopatia diabetica come malattia neurodegenerativa: la nuova visione

La DR viene diagnosticata clinicamente con la manifestazione di segni oftalmoscopici, quali microaneurismi ed emorragie, ma i difetti funzionali della retina molto spesso precedono questi cambiamenti (Lieth et al., 2000, Antonetti et al., 2006, Barber et al., 2011, Ola and Alhomida, 2014, Verbraak, 2014).

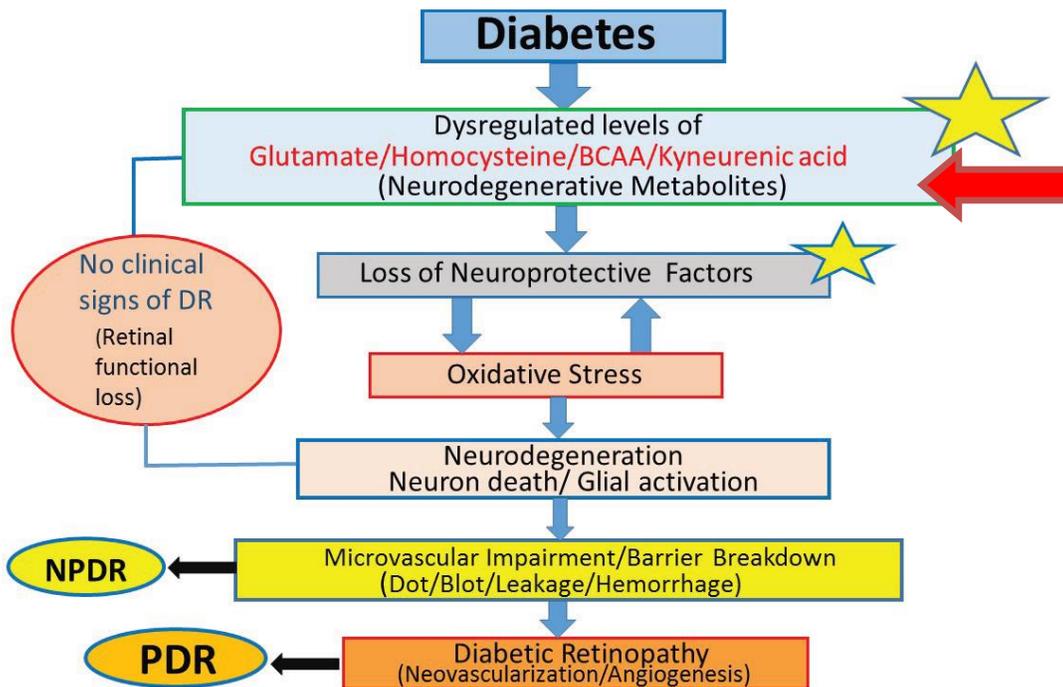
### *Alterazioni precoci della funzionalità retinica*

Il principale strumento impiegato per indagare la funzionalità retinica è l'elettroretinogramma (ERG). L'ERG è una misura dell'attività elettrofisiologica nella retina, registrata mediante l'utilizzo di elettrodi esterni che misurano i cambiamenti nei potenziali di campo generati dall'intera popolazione dei neuroni retinici. L'ERG ha diverse componenti, molte delle quali risultano alterate sia nell'uomo che in animali diabetici (Barber, 2003). Il deterioramento del tempo intrinseco e del potenziale oscillatorio nell'ERG è un evento precoce e in molti casi si osserva entro due giorni dall'induzione del diabete in modelli sperimentali animali (Li et al., 2002). L'origine delle anomalie nell'ERG, che indicano un difetto funzionale, non è nota con precisione, ma la sorgente dei potenziali oscillatori potrebbe essere l'attività sinaptica tra cellule amacrine e cellule bipolari o RGC. Questo deficit potrebbe essere spiegato dall'alterazione della trasmissione sinaptica, o da una perdita combinata di cellule amacrine e RGC (Wachtmeister, 1998). È stato visto, inoltre, che le onde b, che si presume riflettano l'attività elettrica delle cellule bipolari centro-ON, sono affette in maniera più significativa rispetto alle onde-a, originate invece dall'attivazione dei fotorecettori. Quest'ultimo tipo neuronale sembrerebbe essere più resistente all'insulto glicemico (Li et al., 2002). Il danno alla neuroretina, che si instaura precocemente, produce, inoltre, perdita della discriminazione cromatica e della sensibilità al contrasto (Verbraak et al., 2014). Anche queste alterazioni possono essere rilevate, in soggetti diabetici, prima che si manifestino le problematiche al microcircolo (Hernandez and Simo, 2012). La visione dipende, in ultima istanza, dall'attività dei neuroni, per cui alterazioni delle abilità visive, quali quelle sopra indicate, implicano probabilmente l'esistenza di un certo grado di disfunzione a carico della componente nervosa della retina (Antonetti et al., 2006).

### *Ipotesi "neurodegeneration-first"*

Nonostante la visione della DR, accettata per lungo tempo, sostenga il ruolo primario della disfunzione vascolare, tale evenienza viene oggi messa in forte dubbio da queste nuove scoperte. Il diabete danneggia anche cellule non-vascolari della retina ed induce profondi cambiamenti della componente nervosa, che si palesano, in particolar modo, nella forma di apoptosi dei neuroni e attivazione gliale, ovvero i due aspetti che contraddistinguono la neurodegenerazione (Hammes et al., 1995, Barber et al., 1998, Zeng et al., 2000, Park et al., 2003, Martin et al., 2004). Tali modifiche a carico della neuroretina sono antecedenti allo sviluppo delle maggiori

complicazioni vascolari, suggerendo che esse sono dovute agli effetti del diabete direttamente sulla componente nervosa, piuttosto che alle conseguenze della rottura della BRB e alle alterazioni nel microcircolo retinico (Lieth et al., 2000) (Fig. 11).



*Figura 11* Schema delle fasi e dei fattori che influenzano la progressione della DR. La disfunzione vascolare associata agli stadi NPDR e PDR è secondaria e conseguente alla neurodegenerazione (freccia rossa). Tratto da Ola et al., 2014.

Queste osservazioni permettono di sostenere una nuova visione della DR, nota anche come “*neurodegeneration-first*” (Villarreal et al., 2010), per cui il ruolo causale primario, nella storia patogenetica della malattia, sarebbe assolto dalle cellule nervose, bersaglio iniziale del danno prodotto dall’iperglicemia. Prima ancora che un disordine del microcircolo, la DR si configura quindi come una malattia neurodegenerativa (Villarreal et al., 2010). La neurodegenerazione è stata studiata intensamente, negli anni recenti, in animali diabetici e nelle retine umane diabetiche post-mortem. Alterazioni precoci nell’assoglia, alla porzione distale del nervo ottico, sono riportate come il primo cambiamento strutturale nelle vie visive in ratti con diabete indotto da

streptozotocina (STZ) (Fernandez et al., 2012). Nelle fasi successive del processo neurodegenerativo subentrano apoptosi neuronale, reazione gliale, alterazione del metabolismo del glutammato e attivazione della microglia (Whitmire et al., 2011, Valverde et al., 2013).

### *Apoptosi neuronale*

L'induzione di apoptosi è uno dei principali risvolti del danno causato dal diabete. La tossicità dell'iperglicemia cronica si ripercuote primariamente sui neuroni causando una significativa apoptosi neurale come evento precoce rispetto all'apoptosi vascolare (Li et al., 2002, Barile et al., 2005, Kern, 2007). Infatti, dato che i neuroni hanno perso il potenziale proliferativo, la morte di queste cellule risulterà in una deplezione progressiva che conduce alla degenerazione retinica (Barber et al., 2011). Aumenti, di diverse volte, nel numero di neuroni apoptotici e nell'espressione di Bax, importante fattore pro-apoptotico, sono stati rilevati nelle retine di ratti trattati con STZ, dopo tre settimane dall'induzione del diabete, e in retine umane diabetiche, suggerendo che una via dipendente da Bax sia attivata nella morte neuronale indotta dall'iperglicemia (Barber et al., 1998, Oshitari and Roy, 2005). Altri dati disponibili mostrano che lo spessore dell'IPL è ridotto del 10% e del 22% dopo 1 o 8 mesi dall'induzione del diabete, rispettivamente, in ratti diabetici. Inoltre, una riduzione del 23% del numero di cellule del GCL è riportata in topi Ins2Akita di 22 settimane, un modello sperimentale di topo diabetico caratterizzato da insulino-deficienza (Kern and Barber, 2008).

Tra i tipi neuronali della retina, le RGC sembrano essere le più suscettibili alla stimolazione iperglicemica (Kern and Barber, 2008). Le RGC sono altamente sensibili al danno cellulare e agli insulti neurotossici, come indicato anche da studi immunocitochimici, i quali dimostrano un aumento nell'espressione di Bax, caspasi-3 e caspasi-9 nelle RGC di pazienti diabetici, suggerendo che, almeno alcune RGC, muoiono per apoptosi (Oshitari et al., 2008). La morte, per apoptosi, di RGC e i cambiamenti morfologici nelle RGC rimanenti, sono in grado di giustificare molte delle anomalie funzionali osservate in concomitanza del diabete (Kern and Barber, 2008). L'apoptosi nella neuroretina coinvolge però anche altri tipi neuronali oltre le RGC; in modelli animali di DR, cellule amacrine, sia colinergiche che dopaminergiche, muoiono negli stadi iniziali della degenerazione e questa perdita è stata associata a deficit visivi (Gastinger et al., 2006).

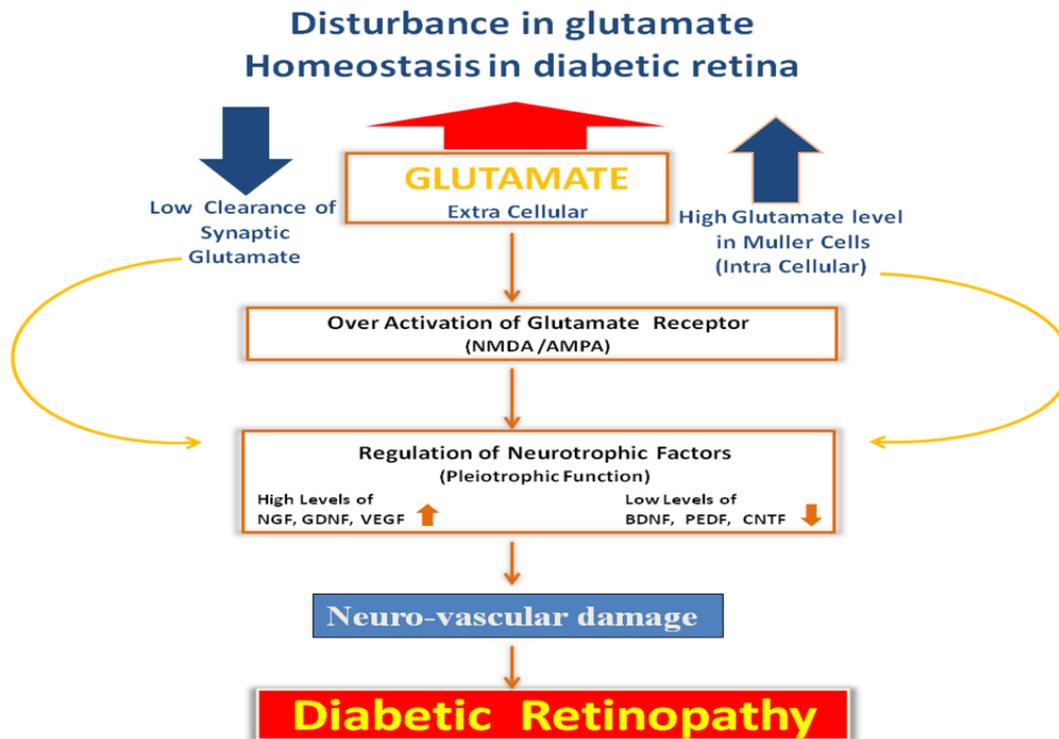
Non è ancora del tutto chiaro quale sia l'esatto meccanismo biochimico-cellulare che collega lo stress prodotto dal diabete alla morte cellulare neuronale. Le ricerche che esaminano tale processo hanno suggerito vari potenziali meccanismi implicati; questi sarebbero rappresentati dalle vie biochimiche, citate sopra (DAG-PKC, sorbitolo-aldoso reduttasi, AGE, stress ossidativo etc), la cui attivazione è deregolata dall'iperglicemia, con particolare coinvolgimento della produzione di AGE e dell'incremento dello stress ossidativo. Nella morte dei neuroni a queste vie si affiancherebbero effetti nocivi dovuti all'alterazione del metabolismo del glutammato e alla perdita del supporto trofico fornito da diversi fattori, in primo luogo dall'insulina (Whitmire et al., 2011).

È stato visto che lo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia è strettamente associato all'apoptosi di una varietà di tipi cellulari neuronali retinici (Abu El-Asrar et al., 2007) e che sostanze in grado di combattere la formazione di ROS hanno un effetto neuroprotettivo sia *in vivo* che *in vitro* (Maher and Hanneken, 2005a, b). L'impiego del trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in esperimenti *in vitro*, è stato utilizzato spesso per riprodurre le condizioni ossidanti in cui le cellule, i neuroni nel caso specifico, si vengono a trovare in alcune condizioni, tra cui la DR. Colture di cellule corticali, RGC e colture neuronali primarie, incubate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confermano un aumento della morte cellulare neuronale in presenza di specie ossidanti (Whittemore et al., 1994).

Per quanto riguarda gli AGE, diversi studi confermano un'azione pro-apoptotica di queste molecole sulle cellule neuronali, frutto perlopiù dell'interazione con il recettore RAGE espresso sui neuroni retinici; il legame AGE-RAGE attiva l'ossido nitrico – sintasi e conduce a morte cellulare per apoptosi (Nitti et al., 2007). Inoltre, la presenza di RAGE e la sua sovraespressione nelle RGC le rende suscettibili alla segnalazione proinfiammatoria indotta dagli AGE, che contribuisce, anch'essa, alla neurodegenerazione durante la DR (Wang et al., 2008).

Come accennato sopra, il diabete può disturbare il recupero ed il metabolismo del glutammato risultando in un accumulo di glutammato extracellulare, che causa eccitotossicità, nella quale l'eccessiva stimolazione operata dal neurotrasmettitore genera una risposta incontrollata, mediata dal calcio, nei neuroni post-sinaptici (Laabich and Cooper, 2000). Questo avviene primariamente nelle RGC, le quali possiedono un numero elevato di recettori NMDA (Thoreson and Witkovsky, 1999). Studi sperimentali confermano che il contenuto totale di glutammato nella retina e nel vitreo è elevato dal diabete (Lieth et al., 1998). Il diabete può anche alterare la regolazione dell'espressione dello stesso recettore per il glutammato, influenzando la produzione e la distribuzione cellulare delle diverse subunità che concorrono a formare i recettori, sia AMPA sia

NMDA (Santiago et al., 2006, Semkova et al., 2010). I cambiamenti nel sistema di segnalazione del glutammato possono, in definitiva, incrementare l'apoptosi nonostante i meccanismi compensatori deputati a proteggere i neuroni; il conseguente squilibrio nella neurotrasmissione può condurre alla disfunzione nel processamento del segnale visivo nella retina (Barber et al., 2011) (Fig. 12).



**Figura 12** Diagramma che indica gli effetti della perdita dell'omeostasi dei livelli di glutammato nella retina diabetica. Tratto da Ola et al., 2013.

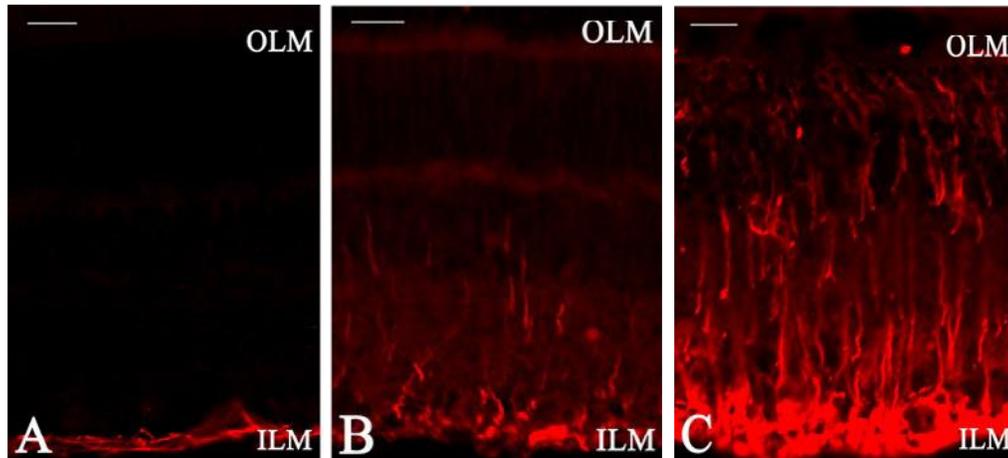
Un'altra via coinvolta sembra essere quella della segnalazione attraverso il recettore dell'insulina, la cui attivazione è collegata ad aumento della sopravvivenza dei neuroni retinici; la compromissione della neuroretina, che si sviluppa precocemente nel corso della DR, prima della comparsa dei cambiamenti microvascolari (Curtis et al., 2009), è stata collegata alla teoria secondo cui il diabete riduce la segnalazione attraverso il recettore dell'insulina nella retina. In questo tessuto, l'insulina stimola la fosforilazione del substrato del recettore dell'insulina (IRS-

2); la quantità di IRS-2 è ridotta in ratti diabetici e, questo decremento conduce alla degenerazione di neuroni della retina interna e fotorecettori (Reiter et al., 2003). Quindi, è ragionevole ipotizzare che la diminuzione dello stimolo pro-sopravvivenza portato dall'insulina contribuisca alla morte delle cellule retiniche nel diabete tramite, almeno in parte, la perdita dell'effetto della via di sopravvivenza che coinvolge PI-3chinasi (PI3K) /Akt. Del resto, la segnalazione dell'insulina, costitutiva, sembra esercitare un ruolo neurotrofico nella retina e, le retinopatie possono risultare anche dalla deficienza di neurotrofine di sostegno (Brussee et al., 2004). La somministrazione sistemica o topica, a livello oculare, di insulina, ripristina la segnalazione compromessa, attraverso il recettore dell'insulina stesso, e riduce l'apoptosi (Reiter et al., 2006).

### *Attivazione gliale*

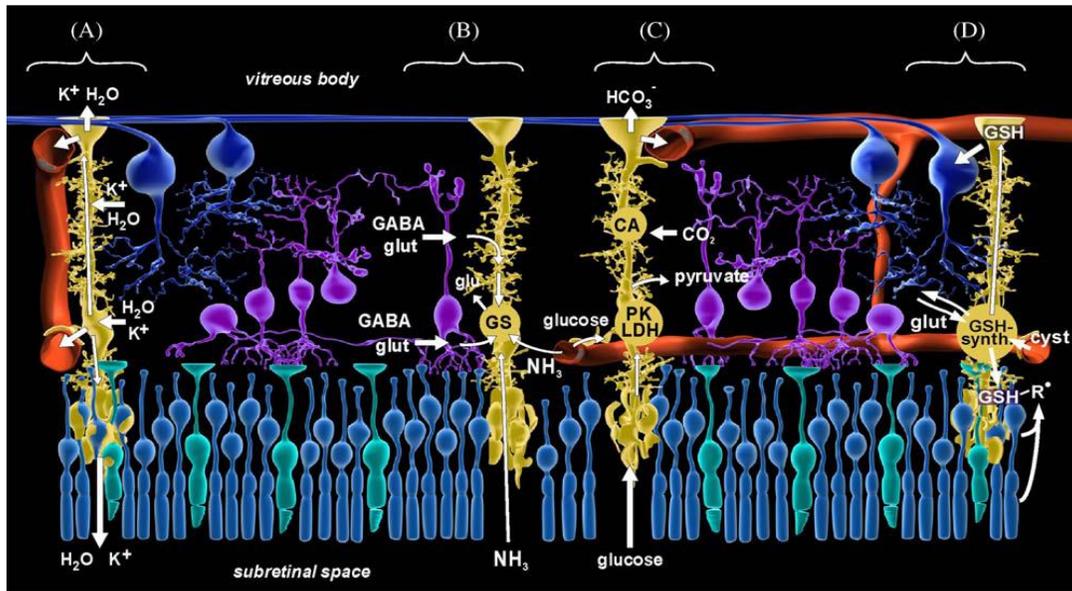
La neurodegenerazione è caratterizzata dal realizzarsi di due processi concomitanti: la morte neuronale, di cui si è fin qui discusso, e l'attivazione gliale (Barber et al., 2011). La componente gliale della retina è il terzo elemento che, insieme a neuroni e vasi, concorre a formare l'unità neurovascolare, dalla cui integrità dipende l'omeostasi dell'organo. Il diabete altera l'accoppiamento neurovascolare nella retina, attraverso la compromissione della funzionalità di una delle parti del sistema (Kern, 2014). Le cellule gliali della retina, nello specifico cellule di Müller ed astrociti, come i neuroni e le cellule dei vasi, subiscono gli effetti nocivi causati dall'iperglicemia. Per attivazione gliale si intende l'insieme dei cambiamenti cellulari, specifici e non, riscontrati nelle cellule di Müller e negli astrociti, quindi la risposta di queste cellule ai fattori di danno (Bringmann et al., 2006). Tra questi, la variazione nell'espressione della proteina gliale fibrillare acida (GFAP), una costituente dei filamenti intermedi, si verifica in molte malattie neurodegenerative ed è considerata un indicatore sensibile, non specifico, di danno al SNC (O'Callaghan et al., 1991). La GFAP, normalmente presente a livello basale, aumenta, nelle cellule di Müller, in risposta a lesioni retiniche ed ischemia, in maniera simile a quanto accade negli astrociti nel cervello (Osborne and Larsen, 1996). Il diabete induce incremento della GFAP nella retina umana e di ratto (Lieth et al., 1998, Szabadfi et al., 2014a) (Fig. 13). È stato mostrato che tale incremento è contrastato da inibitori dell'aldoso reduttasi e dalla melatonina, suggerendo che lo stress ossidativo ed un'iperattivazione della via dei polioli contribuiscono alla gliosi delle cellule di Müller (Carrasco et al., 2007). L'aumento di espressione della GFAP sembra riguardare

solo le cellule di Müller, ed è preceduto dalla sua riduzione negli astrociti, dimostrando che i due sottotipi di macroglia rispondono diversamente allo stress diabetico (Barber et al., 2000). Spesso l'incremento di GFAP è accompagnato da iperplasia.



**Figura 13** Confronto dei livelli di espressione di GFAP in sezioni di retina di ratto. In condizioni normali, solo le terminazioni gliali espanse, a livello dell'ILM, esprimono GFAP (A). Il diabete è in grado di indurre un aumento dell'espressione di GFAP. Nell'iperglicemia indotta con STZ si osserva sovraespressione della GFAP che si accentua con l'aumentare della durata del diabete. Marcatura della GFAP dopo 3 settimane (B) e dopo 4 settimane (C) dall'induzione dell'iperglicemia. Scala di calibrazione: 20 $\mu$ m. ILM, Inner Limiting Membrane; OLM, Outer Limiting Membrane. Tratta da (Szabadfi et al., 2014a).

Il ruolo delle cellule di Müller nella disfunzione retinica causata dal diabete non è di certo secondario; in risposta allo stress diabetico e alle segnalazioni provenienti dai neuroni in sofferenza aumentano la produzione e il rilascio di VEGF (Eichler et al., 2000), altre citochine angiogeniche, quali FGF e fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), e stimolano il rilascio di metalloproteasi della matrice da parte delle cellule endoteliali (Mignatti et al., 1989, Unemori et al., 1992, Lamoreaux et al., 1998, Behzadian et al., 2003). Le cellule gliali attivate contribuiscono al danno retinico anche indirettamente, tramite riduzione della funzione di supporto ai neuroni. Questo tipo cellulare, infatti, è strettamente associato alla componente neuronale, non solo fisicamente ma, soprattutto, funzionalmente (Fig., 14).



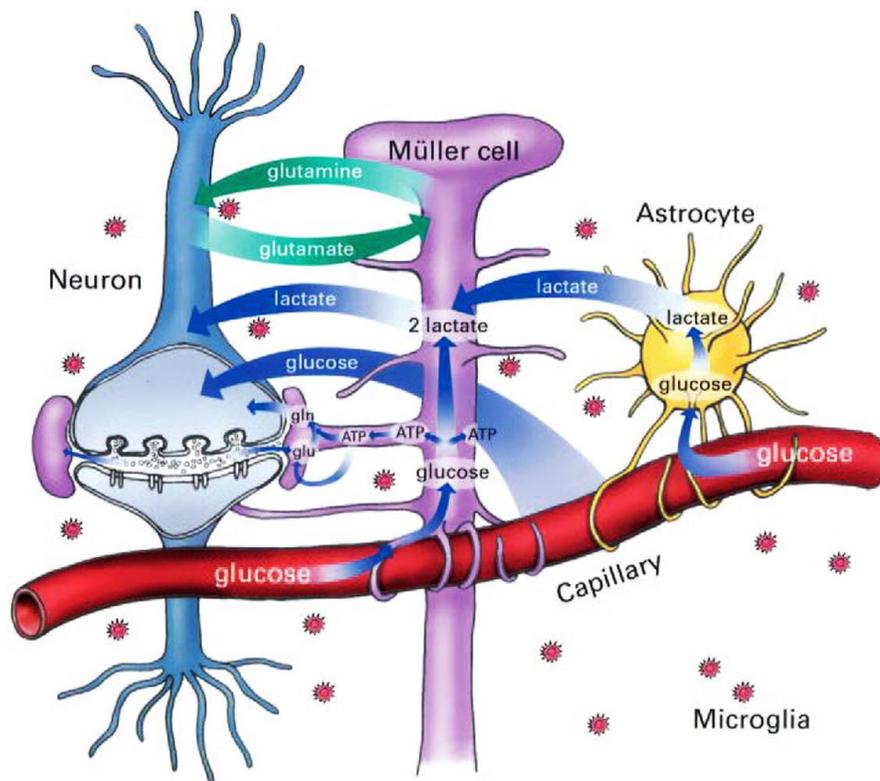
**Figura 14** Interazioni tra neuroni e cellule di Müller nella retina normale adulta. (A) controllo delle concentrazioni ioniche e di H<sub>2</sub>O. (B) recupero e riciclaggio dei neurotrasmettitori. (C) “simbiosi metabolica”, approvvigionamento di intermedi energetici. (D) neutralizzazione dei radicali liberi e metabolismo del glutatione. CA, anidraasi carbonica; GS, glutammina sintetasi; GSH, glutatione; LDH, lattato deidrogenasi, PK, piruvato chinasi, R\*, radicali liberi. Tratto da Bringmann et al., 2006.

La morte neuronale può dipendere dalla tossicità diretta dell'iperglicemia o dalla disfunzione delle cellule di Müller, le quali diventano incapaci di mantenere un equilibrio osmotico adeguato tra spazio intra- ed extra-cellulare, favorendo la neurodegenerazione (Vujosevic and Miden, 2013). Anche l'aumento dei livelli di glutammato nell'ambiente extracellulare può essere il frutto di una disregolazione delle cellule di Müller, le quali sono appunto implicate nel metabolismo del glutammato. Infatti, esse, tra i vari ruoli, devono provvedere alla rimozione dei neurotrasmettitori in eccesso a livello degli spazi sinaptici. Nella DR questa operazione è fortemente compromessa; la causa è da ricercarsi nelle alterazioni delle vie biochimiche intracellulari, ad opera dell'iperglicemia. Evidenze sperimentali mostrano come l'alto glucosio e lo stress ossidativo riducono, nelle cellule di Müller, l'attività di trasporto del glutammato, che si concentra all'esterno (Li et al., 2002, Mysona et al., 2009). Inoltre il diabete sembra ridurre, nelle cellule di Müller, la conversione del glutammato a glutammina, a causa, probabilmente, delle diminuite espressione ed attività dell'enzima specifico, la glutammina sintetasi (Lieth et al., 2000). Il blocco del suo metabolismo determina la ritenzione del glutammato nel liquido intracellulare e concorre

all'inibizione del suo passaggio all'interno, dal liquido extracellulare. Infine, un aspetto interessante ma ancora poco chiaro è suggerito da alcuni studi che indicano come la DR sia una delle rare condizioni patologiche in cui non tutte le cellule di Müller sopravvivono; nella retina diabetica esse mostrano alcuni segni di apoptosi. A conferma, è stato visto che l'iperglicemia induce apoptosi in cellule di Müller, *in vitro*, tramite inattivazione della via di sopravvivenza di Akt (Xi et al., 2005).

### *Interazioni tra neurodegenerazione e disfunzione vascolare*

Come detto sopra, sebbene la disfunzione neuronale sembri assumere un ruolo primario nella storia naturale della DR, le alterazioni al microcircolo, ad essa successive, sono pesanti ed hanno un'importanza considerevole nella sintomatologia e nei difetti visivi provocati dalla DR. Inoltre, le lesioni riportate dai due comparti, nervoso e vascolare, sono strettamente associate e non possono, quindi, essere considerate solo separatamente. L'elevata specializzazione anatomica e segregazione di funzioni tra gli elementi della retina è alla base della loro interdipendenza.



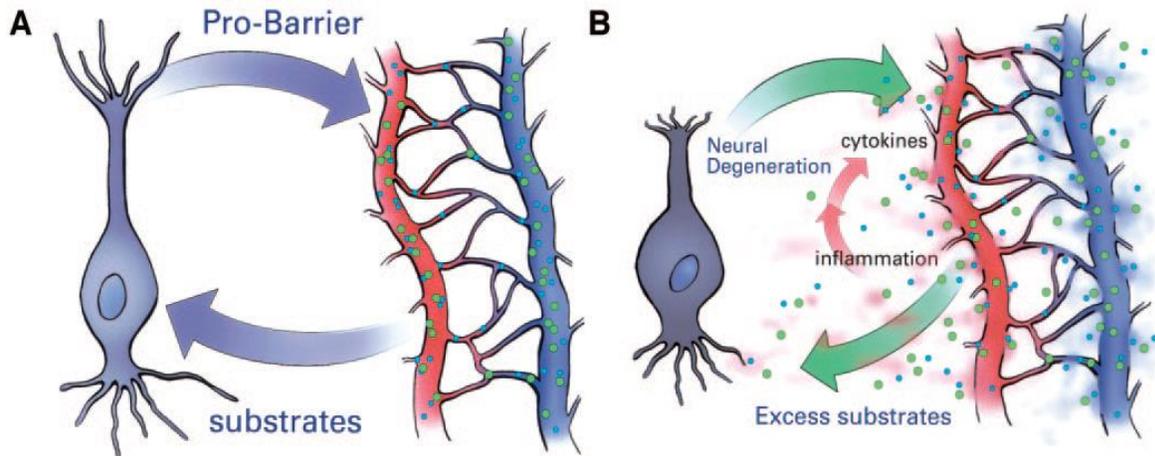
**Figura 15** Rappresentazione delle interrelazioni tra gli elementi che compongono l'unità neurovascolare. Tratta da Antonetti et al., 2006.

I neuroni assolvono direttamente alla trasduzione sensoriale visiva ma non possono prescindere, per il sostegno metabolico e strutturale, dalla componente vascolare, che perfonde la retina e dalle cellule gliali che, tra gli altri hanno il compito specifico di prelevare glucosio e altri substrati energetici dal circolo e fornirli ai neuroni, sotto forma anche di intermedi metabolici come il lattato e piruvato (Antonetti et al., 2006) (Fig. 15).

Questa specializzazione predispone la retina al danno indotto dal diabete, in grado di interrompere le comunicazioni cellulari e di condurre alla destrutturazione dell'unità neurovascolare. Da ciò ne deriva l'importanza di delucidare l'esatta relazione tra i fenomeni che costituiscono il processo patologico nel suo complesso, definendo le relazioni di causalità, e, nello specifico, di determinare il meccanismo attraverso il quale i neuroni contribuiscono alla patologia vascolare (Nakahara et al., 2013). Evidenze cliniche disponibili indicano con forza che gli stadi tardivi, clinicamente significativi e caratterizzati dai cambiamenti vascolari, della retinopatia, sono una diretta conseguenza dei cambiamenti precoci, a carico dei neuroni (Kern and Barber, 2008). È noto che la funzione neuronale è un importante regolatore della funzione vascolare e disturbi all'interazione fra le due componenti hanno effetti avversi sulla struttura e sulla funzionalità retinica. È stato evidenziato un modesto ma significativo aumento nel numero di cellule apoptotiche nei capillari di retine umane di soggetti diabetici post-mortem, rispetto a retine normali. Un simile risultato si ottiene dal confronto tra retine di controllo e retine di topi dopo 31 settimane dall'induzione sperimentale di diabete, tramite STZ (Engerman and Kern, 1995). La regressione delle cellule dei vasi può essere interpretata come una risposta alle ridotte domande metaboliche dalla retina neurosensoriale circostante; è, quindi, plausibile che l'apoptosi dei vasi rappresenti una risposta finale alla morte cellulare localizzata nel tessuto neurale che li circonda (Barber et al., 2011) (Fig. 16).

Un altro collegamento tra i cambiamenti nei neuroni, nelle cellule gliali e quelli nei vasi riguarda la produzione e la segnalazione del VEGF. Questo fattore di crescita, sebbene sia stato implicato primariamente nella stimolazione mitogena che opera nelle cellule endoteliali, è noto essere prodotto da numerosi tipi cellulari della retina, tra cui cellule del RPE, RGC e cellule di Müller. Come detto, i livelli di VEGF sono aumentati nel diabete. Le cellule di Müller, avvertendo la concentrazione di glucosio elevata, attivano il macchinario preposto alla regolazione del loro volume e rilasciano VEGF e sostanze proinfiammatorie, quali prostaglandine,  $TNF\alpha$  e interleuchine che sono coinvolte, tra l'altro, anche nella perdita della funzione della BRB (Barber et al., 2000, Behl et al., 2008, Amadio et al., 2010). È noto, inoltre, che il VEGF è prodotto dai

neuroni e dalle cellule gliali della retina in risposta all'ipossia, ma non è chiaro se questo sia il segnale che sostiene la sua espressione nel diabete; (Murata et al., 1996, Amin et al., 1997, Neufeld et al., 1999).

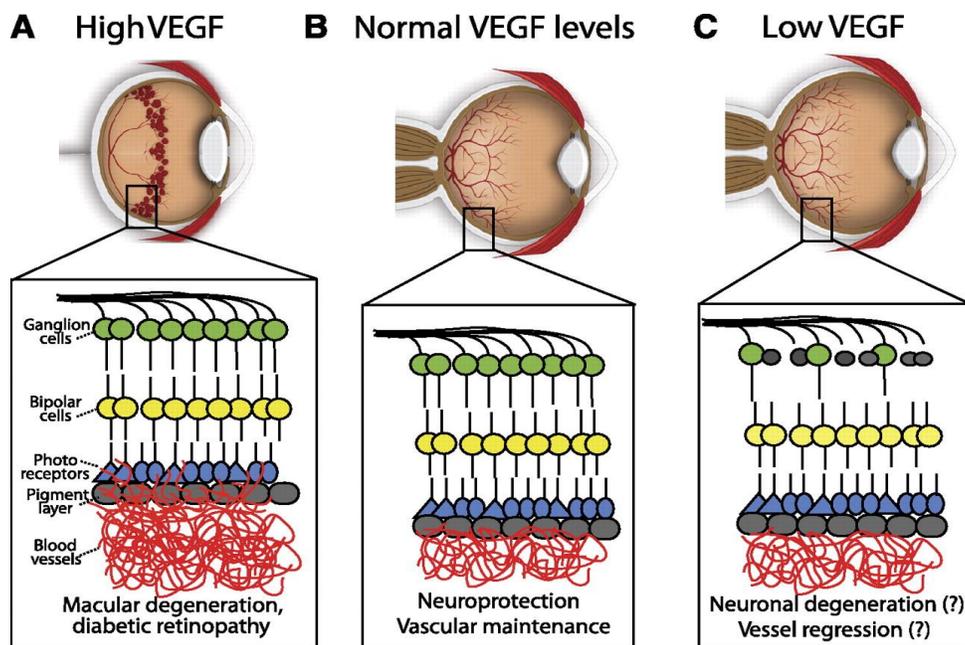


**Figura 16** Interazione tra danno neuronale e disfunzione vascolare. (A) In condizioni normali, i vasi forniscono nutrienti ai neuroni che, a loro volta, producono fattori necessari per il mantenimento della BRB, quindi dell'omeostasi retinica. (B) Nel diabete, questa segnalazione neuronale può essere compromessa; la rottura della BRB consente l'accesso al tessuto nervoso da parte di fattori di derivazione ematica, con innesco di una risposta infiammatoria cronica che danneggia i neuroni. La neurodegenerazione stimola la produzione di fattori di crescita (VEGF) che contribuiscono ad incentivare le lesioni vascolari. Questa catena ciclica di danno ai due comparti conduce alla perdita della vista. Tratto da Antonetti et al., 2006.

### *VEGF come neuroprotettore*

È noto da tempo che il VEGF gioca un ruolo cruciale fin dalle fasi iniziali della DR e per tutto il decorso della malattia. Dati sperimentali suggeriscono un'ipotesi nuova, per cui la secrezione di VEGF da parte della retina neurale assolve due ruoli: da una parte esso agisce come fattore di crescita e segnale di sopravvivenza per i neuroni, riducendone l'apoptosi, mentre, dall'altra stimola la neoangiogenesi nelle regioni ipossiche del tessuto (Barber, 2003, Gomes et al., 2007). La possibilità che il VEGF abbia compiti diversi in momenti successivi della patogenesi della DR, come neuroprotettore prima e come fattore pro-angiogenico in seguito, potrebbe essere un aspetto interessante da indagare per delucidare la storia naturale della malattia. La funzione

protettiva sui neuroni del VEGF è stata un argomento molto dibattuto negli ultimi anni e su di essa sono state raccolte numerose evidenze. Recentemente, VEGF-A è stato riconosciuto come importante neuroprotettore nel SNC; esso difende le cellule dalla morte indotta da una grande varietà di stimoli nocivi, compresi ipossia ed eccitotossicità (Jin et al., 2000, Gomes et al., 2007, De Almodovar et al., 2009). Nella retina, l'esposizione a questo fattore comporta una riduzione dose-dipendente dell'apoptosi dei neuroni retinici, in un modello di ischemia-riperfusione (Nishijima et al., 2007). È stato dimostrato che il recettore VEGFR-2 è espresso nella retina neurale (GCL e INL) e che il VEGF agisce anche promuovendo la sopravvivenza della cellule di Müller per mezzo di una segnalazione autocrina (Saint-Geniez et al., 2008). Inoltre, l'inibizione cronica della funzione di VEGF-A nell'animale normale adulto conduce ad una significativa perdita di RGC nella retina, senza che si osservino effetti su vari parametri vascolari (De Almodovar et al., 2009, Al-Shabrawey and Smith, 2010) (Fig. 15).



**Figura 17** Effetti dell'espressione del VEGF nella retina. (A) Iniezioni intravitreali di VEGF causano anomalie vascolari, incluse emorragie e microaneurismi, fino al distacco della retina. (B) Al contrario, livelli di VEGF normali o moderatamente aumentati per effetto della sovraespressione del VEGF nei neuroni, sotto il controllo di un promotore neuronale, protegge le RGC dalla morte in un modello di assotomia. (C) Inibizione cronica del VEGF nella retina di topo adulto può condurre a perdita di RGC, neurodegenerazione e regressione dei vasi. Tratta da Ruiz De Almodovar et al., 2009.

Anche VEGF-B, altro membro della famiglia, è stato indagato per il suo potenziale neuroprotettivo; il trattamento con VEGF-B protegge le RGC in vari modelli di neurotossicità. Tale effetto è stato attribuito all'inibizione di fattori pro-apoptotici, inclusi p53 e alcuni membri della famiglia delle Caspasi, attraverso l'interazione con VEGFR-1 (Li et al., 2003, Li et al., 2008). È quindi plausibile ipotizzare che il VEGF possa esercitare tale funzione neuroprotettiva anche nella DR, almeno nella fase iniziale, in concomitanza con l'istaurarsi di uno stato di sofferenza dei neuroni. In seguito, infatti, la transizione dal ruolo neuroprotettivo a quello pro-angiogenico sarebbe associata ad un ulteriore aumento delle concentrazioni del fattore di crescita nell'ambiente retinico unito ad interazioni negative nella via di sopravvivenza da esso stimolata. Inoltre, è stato riportato che le RGC mostrano proprietà pro-angiogeniche, suggerendo un collegamento cruciale tra i cambiamenti nei vasi e il danno neuronale (Sapieha et al., 2008). La funzione angiogenica delle RGC sarebbe basata su una specifica proteina trans membrana, il recettore accoppiato a proteine G, GPR91. L'espressione dell'mRNA del VEGF nella linea cellulare di RGC-5 è fortemente aumentata dall'incubazione delle cellule con concentrazioni crescenti di glucosio. L'abolizione degli incrementi del VEGF, ottenuta tramite silenziamento di GPR91, riduce la sopravvivenza delle cellule nervose (Hu et al., 2013).

In sintesi, pur rimanendo da chiarire quale sia l'esatto meccanismo che conduce alla neurodegenerazione, i dati indicano, in maniera concorde, che il diabete causa una progressiva perdita delle strutture nervose nella retina interna, alla base dell'alterazione della funzione visiva (Kern et al., 2008).

Date queste evenienze, la DR potrebbe configurarsi primariamente come una malattia neurodegenerativa.

### 1.2.5. La neuroprotezione come nuova strategia terapeutica

L'ipotesi descritta sopra, che vede la DR primariamente una malattia neurodegenerativa, sostiene che l'evento scatenante, responsabile della dissoluzione delle segnalazioni che identificano l'accoppiamento neurovascolare, sia una disfunzione delle cellule neuronali, a cui conseguono alterazioni anche alle altre componenti del sistema (Carrasco et al., 2007). Infatti, la degenerazione della neuroretina sembra essere un indicatore molto sensibile per il successivo

sviluppo della vasculopatia, soprattutto edema e neovascolarizzazione, su cui avrebbe un ruolo permissivo o causale. In questa ottica, l'impiego di trattamenti mirati a prevenire il danno ai neuroni, attraverso la neuroprotezione diventa una strategia interessante e promettente per combattere tutti gli aspetti della retinopatia (Barber et al., 2011, Hernandez and Simo, 2012, Simo and Hernandez, 2012, Zhang et al., 2013, Hernandez et al., 2014, Kern, 2014). Inoltre, l'introduzione della neuroprotezione a scopo terapeutico è sostenuta da considerazioni importanti; come descritto sopra, molti dei trattamenti diretti contro la patologia vascolare sono invasivi e anche potenzialmente distruttivi. Questo è una conseguenza inevitabile del fatto che mirano a far regredire cambiamenti ingenti, frutto di un avanzato stadio di sviluppo della malattia. La neurodegenerazione, invece, sviluppandosi molto precocemente, quando ancora non sono rilevabili modifiche al comparto vascolare, non richiede l'impiego di fotocoagulazione, vitrectomia o altre misure simili. L'obiettivo a lungo termine, per ottenere la prognosi migliore nei pazienti affetti da DR, dovrebbe essere proprio quello di sviluppare metodi per la diagnosi ed il trattamento precoce della malattia (Jackson and Barber, 2010). Infatti, l'intervallo compreso tra l'inizio dei deficit funzionali e l'insorgenza delle manifestazioni vascolari rappresenta la migliore finestra di opportunità di trattamento, mentre le funzioni visive rimangono intatte (Antonetti et al., 2006). Questo obiettivo pone il problema di stabilire un sistema univoco, semplice e riproducibile, di rilevazione delle anomalie funzionali e delle alterazioni alla neuroretina descritte precedentemente, quindi di individuare quei soggetti che, pur non essendo ancora esplicitamente affetti da DR, sono destinati a svilupparne i segni clinici. La difficoltà è costituita dai cambiamenti estremamente fini nella struttura e nella funzione della retina in pazienti diabetici e nella grande variabilità di risultati nei saggi che possono essere usati (Verbraak, 2014). Alcuni test clinici sono già adoperati per saggiare la funzionalità di strati o di tipi cellulari specifici della retina. Per esempio, la sensibilità al contrasto, il campo visivo e la tecnologia di raddoppio della frequenza, valutano la funzione della retina interna, mentre l'adattamento al buio misura l'integrità dei fotorecettori e dell'RPE (Reiter et al., 2006). Un perfezionamento di queste metodologie ed un aumento della loro sensibilità e specificità è comunque richiesto per rendere possibile l'introduzione della neuroprotezione come approccio terapeutico primario. Molte molecole sono state indagate per la loro azione neuroprotettiva e per il potenziale impiego nella DR.

## *Neurotrofine*

I fattori neurotrofici giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento delle connessioni neurali. Da tempo è indagata la possibilità di una loro induzione nei tessuti e di una loro applicazione esogena nelle malattie degenerative, tra cui la DR è compresa (Semkova and Krieglstein, 1999).

Nel diabete, i livelli di fattore neurotrofico cerebrale (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF) sono diminuiti sia nel cervello che nella retina; si è visto che l'iniezione intravitreale di BDNF riduce la perdita di cellule amacrine dopaminergiche, soggette alla degenerazione indotta dall'iperglicemia, suggerendo l'importanza di questo fattore di crescita per la sopravvivenza dei neuroni nella retina interna (Seki et al., 2004). Anche i livelli di fattore di crescita nervoso (Nerve Growth Factor, NGF) e quelli del suo recettore TrkA, diminuiscono significativamente nella retina di ratti diabetici, rispetto ai controlli. In modelli diabetici sperimentali, è stato visto che il trattamento con NGF previene sia la morte cellulare indotta dal diabete nella neuroretina, sia le conseguenze patologiche nei vasi (Hammes et al., 1995, Colafrancesco et al., 2011). La somministrazione topica di NGF può impedire gli effetti deleteri che conducono alla progressiva perdita di RGC nella retina diabetica. L'azione protettiva dimostrata di NGF suggerisce che una terapia basata su questo fattore neurotrofico possa apportare benefici in malattie oculari, quali la DR (Colafrancesco et al., 2011).

## *Neuropeptidi con azione neuroprotettiva*

Oltre ai fattori di crescita, negli ultimi anni grande interesse è stato rivolto anche ad alcuni neurotrasmettitori peptidici, che sono espressi ed agiscono nel SNC. In generale, un punto a favore del loro possibile utilizzo come agenti terapeutici è costituito dal fatto che questi peptidi possiedono una grande specificità per i loro recettori, che sono attivati da una piccola quantità di ligando; inoltre, a differenza di altre molecole terapeutiche, non si accumulano nei tessuti e sono efficientemente metabolizzati dagli enzimi endogeni (Cervia and Casini, 2013).

Tra quelli che sono stati indagati per il loro potenziale neuroprotettivo sono inclusi il fattore di rilascio della corticotropina, la sostanza P e alcuni membri della famiglia dei peptidi oppioidi (Cervia and Casini, 2013, Szabadfi et al., 2014b).

Tuttavia, il maggiore interesse è stato indirizzato agli studi su neuropeptide Y (NPY) ma soprattutto somatostatina (SST) e peptide attivatore dell'adenilato ciclasi della ghiandola pituitaria (PACAP).

L'azione neuroprotettiva del NPY è ben conosciuta sia in diverse regioni cerebrali, sia nella retina (Silva et al., 2005, Alvaro et al., 2008, Smialowska et al., 2009). NPY esercita un'azione protettiva, sui neuroni, contro la tossicità (necrosi ed apoptosi) indotta dalla 3,4-metilendiossimetanfetamina in colture di cellule retiniche di ratto (neuroni, astrociti, cellule di Müller) (Alvaro et al., 2008). Di recente è stato mostrato, in modelli animali e in vitro, che NPY ha un ruolo protettivo verso la tossicità indotta da glutammato in cellule di retina di ratto (Santos-Carvalho et al., 2013). Tuttavia, il meccanismo sottostante questo contributo neuroprotettivo svolto da NPY non è chiaro.

#### ○ *Somatostatina*

La SST è un neuropeptide ampiamente distribuito nel SNC e periferico (Blake et al., 2004), dove esplica una varietà di ruoli biologici, tramite l'interazione con 5 diversi recettori (sst1-sst5), associati a vie di trasduzione varie (Olias et al., 2004). Tra questi, il recettore maggiormente espresso nella retina è quello di tipo 2 (sst2) (Casini et al., 2005). L'azione neuroprotettiva della SST ed il meccanismo con cui si realizza sono stati ampiamente indagati. In particolare diverse evidenze hanno chiarito il ruolo di questo neuropeptide nella protezione neuronale dall'ischemia retinica che, come detto in precedenza, è un aspetto chiave di malattie degenerative della retina, quali glaucoma e DR (Casini et al., 2005).

L'impiego di SST, o suoi analoghi sintetici, promuove la riduzione dell'apoptosi neuronale, come conseguenza del danno ischemico, tramite interazione del peptide con il recettore sst2 (Mastrodinou et al., 2005, Cervia et al., 2008a, Hernandez et al., 2014). Inoltre, l'attivazione di sst2 determina protezione dei neuroni dall'eccitotossicità indotta da glutammato (Dal Monte et al., 2003, Catalani et al., 2007, Cervia and Casini, 2013). A tal proposito, tra gli analoghi di SST testati è stata dimostrata la massima efficacia dell'octreotide (OCT), agonista selettivo del recettore sst2, nell'esercitare un'azione neuroprotettiva (Croxen et al., 2004). Nel dettaglio, è stato visto che il trattamento con OCT ha un effetto anti-apoptotico nella condizione di ischemia della retina *ex vivo* (Celiker et al., 2002, Bigiani et al., 2004, Mastrodinou et al., 2005, Cervia et al., 2008b). La dimostrazione dell'analogia tra l'effetto benefico di OCT e quello del peptide endogeno è correlata ad un ulteriore aspetto interessante a favore della prima; infatti, il potenziale

di SST, nel trattamento delle ripercussioni del danno ischemico e non, è limitato dalla sua scarsa emivita mentre OCT, come altri analoghi sintetici, essendo rimossa più lentamente dall'ambiente retinico consente una maggiore durata dell'azione protettiva (Mastrodimou et al., 2005).

In generale, l'insieme di queste considerazioni permette di sostenere l'ipotesi per cui SST, o ancor meglio OCT, possa rappresentare un agente terapeutico valido per le patologie contraddistinte dall'instaurarsi di una condizione ischemica (Catalani et al., 2007).

Tra queste, e nell'ambito dell'oggetto specifico di questa tesi, il sistema somatostatinergico è stato già associato alla patogenesi e alla progressione della DR; si è visto che la SST è ridotta nel vitreo di soggetti diabetici (Carrasco et al., 2007, Szabdfi et al., 2014b). Essa eserciterebbe un effetto benefico sulla vitalità dei neuroni impedendo l'accumulo di glutammato nella retina, quindi scongiurando il danno eccitotossico, collegato all'apoptosi neuronale nella DR; tale risultato sarebbe ottenuto tramite inibizione della riduzione, indotta dal diabete, dei trasportatori per il glutammato sulla membrana delle cellule (Hernandez et al., 2014). Anche nel caso specifico della DR è stato dimostrato che molecole analoghe alla SST possono avere un potere terapeutico nel trattamento della malattia (Boehm, 2007, Krassas et al., 2007, Pali et al., 2007) e che OCT è la più efficace nel contrastare la perdita di neuroni (Szabdfi et al., 2012). Inoltre, nella DR, SST o OCT, oltre a contrastare la morte neuronale, ridurrebbero anche la neoangiogenesi; è stato visto che il trattamento con OCT inibisce, contemporaneamente all'apoptosi, anche il l'aumento del rilascio di VEGF da parte dei neuroni in condizioni di ischemia retinica (Casini et al., 2005, Dal Monte et al., 2007, Dal Monte et al., 2009, Cervia et al., 2012).

A conferma di queste evidenze, trattamenti a base di SST hanno fornito alcuni risultati preliminari incoraggianti, in sperimentazioni sia *in vitro* che *in vivo*. Il trattamento topico con SST previene le anomalie nell'ERG, l'attivazione gliale e l'apoptosi in ratti con diabete indotto da STZ. SST ha quindi un potente effetto nel prevenire la neurodegenerazione indotta dal diabete (Vasilaki et al., 2002, Hernandez et al., 2014). Anche i sintomi vascolari, compresa la neoangiogenesi, possono essere scongiurati o ritardati mediante l'applicazione di SST (Davis et al., 2001, Grant and Caballero, 2002).

#### ○ **PACAP**

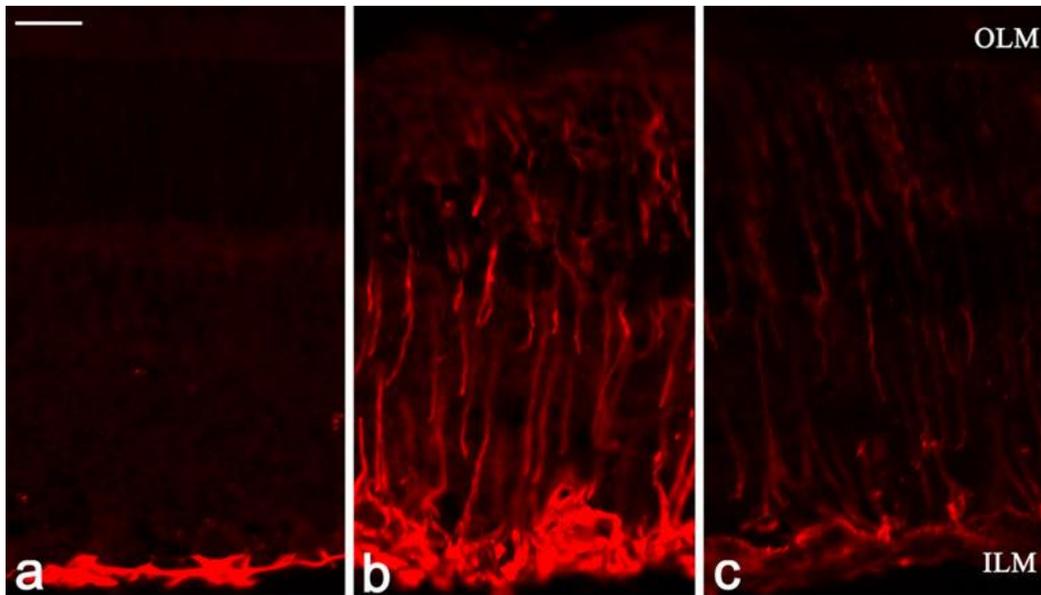
Tra i neuropeptidi dal risaputo potenziale neuroprotettivo, è compreso anche PACAP. PACAP ed i suoi recettori (PAC1, VPAC1 e VPAC2) sono espressi nella retina (Atlasz et al., 2010) ed è

stato dimostrato che questo peptide esplica un'azione protettiva in diverse patologie retiniche (Nakamachi et al., 2012, Szabo et al., 2012); esso attenua il danno associato a degenerazione retinica indotta da ischemia o raggi UV (Atlasz et al., 2010). Tale effetto sembra essere frutto dell'interazione di PACAP con PAC1 e attivazione di segnalazioni che potenziano i meccanismi anti-apoptotici nei neuroni (Ohtaki et al., 2008, Szabadfi et al., 2012)

Diversi studi hanno indagato il ruolo di PACAP nella retina affetta da DR. È emerso che questo peptide effettivamente riduce i sintomi indotti dal diabete, sostenendo la sovraespressione del suo stesso recettore, PAC1, e proteggendo vari tipi cellulari neuronali, incluse cellule amacrine, RGC e cellule bipolari (Szabadfi et al., 2012, Szabadfi et al., 2014b). Tra le classi di cellule amacrine, ben caratterizzato è l'effetto di PACAP nel miglioramento della degenerazione delle cellule dopaminergiche (Szabadfi et al., 2014a, Szabadfi et al., 2014b). In un modello di ratto diabetico trattato con STZ è stato dimostrato che PACAP attenua la perdita di cellule nel GCL, indotta dal diabete; inoltre esso previene le alterazioni morfologiche nei coni, che si sono dimostrate essere associate a difetti funzionali di questo tipo neuronale (Szabadfi et al., 2012). Il coinvolgimento di PAC1 nella stimolazione anti-apoptotica promossa da PACAP è stato confermato anche nella DR; come detto, tale tipo recettoriale risulta up-regolato nella retina diabetica, e attiva diverse vie che contrastano la morte neuronale, tra cui: a) la riduzione dei precursori della forma attiva della caspasi 8, caspasi 3 e caspasi 12, b) il potenziamento dell'espressione di Bcl-2, c) l'incremento dei livelli della proteina Akt, implicata in un'importante via di sopravvivenza cellulare (Szabadfi et al., 2014b). Alcuni studi hanno indagato anche il ruolo di PACAP nei confronti della gliosi associata alla DR; il trattamento con PACAP di topi STZ comporta una riduzione dell'attivazione gliale, indicata dall'espressione della GFAP, rispetto al corrispettivo diabetico non trattato (Szabadfi et al., 2012) (Fig. 18).

Dall'altro lato, PACAP agisce anche sui danni a carico dei vasi, osservati nella DR. È stato visto che questo neuropeptide è in grado di contrastare il cedimento della BRB, dovuto alla riduzione dell'espressione delle proteine giunzionali, claudina-1 e ZO-1, causata dall'iperglicemia (Scuderi et al., 2013).

L'abilità descritta di PACAP nel prevenire o attenuare diverse delle lesioni indotte dall'iperglicemia nella retina, principalmente a livello della componente nervosa, in aggiunta alla sua nota azione retino-protettrice generale, suggerisce il possibile potenziale terapeutico di questo neuropeptide nel trattamento della DR (Szabadfi et al., 2014b).



**Figura 18** Riduzione dell'espressione di GFAP indotta da PACAP in un modello di ratto diabetico trattato con STZ. (a) Nel controllo, la marcatura della GFAP è ristretta alle terminazioni espanse delle cellule di Müller a livello del GCL; (b) Il diabete induce l'aumento della GFAP, che è rilevata per tutta l'estensione dei processi delle cellule gliali. (c) Il trattamento con PACAP determina una riduzione dell'espressione, anche se non ripristina i livelli di controllo. ILM, membrana limitante interna; OLM, membrana limitante esterna. Scala di calibrazione: 20  $\mu$ m. Tratta da Szabadfi et al., 2012.

### 1.3. Modelli sperimentali per lo studio della Retinopatia Diabetica

#### 1.3.1. Modelli *in vitro* e *in vivo*: vantaggi e limiti

Lo studio di un determinato processo e, nello specifico, degli aspetti coinvolti nella patogenesi della DR può essere effettuato a livelli diversi; a tal proposito le modalità sperimentali adoperate sono di natura varia. Nell'ambito dello studio della DR, l'analisi *in vitro* delle risposte cellulari indotte dall'alto glucosio costituisce la riproduzione sperimentale più basilare delle condizioni connesse al diabete. Possono essere utilizzate numerose linee cellulari diverse e i trattamenti impostati possono essere molto variabili, in funzione di tempi e modalità di incubazione delle

cellule; la possibilità di realizzare colture condizionate o co-culture permette di analizzare, a livello basale, le interazioni biochimiche tra tipi cellulari. Questo approccio sperimentale offre, quindi, il vantaggio di una grande versatilità, oltre a quello di una agevole manipolazione e controllo, rispetto a modelli *ex vivo* o *in vivo*, e permette di focalizzare l'attenzione su aspetti singoli, costituendo, di fatto un sistema molto semplificato.

Gli studi *in vitro* svolti in passato e quelli odierni hanno fornito risultati basilari interessanti nella comprensione dell'effetto del diabete sulla retina. Tra le principali linee cellulari utilizzate ci sono le RGC-5, una linea di RGC trasformate di ratto; per indagare l'effetto dell'alto glucosio le cellule sono state incubate in un mezzo contenente 11 mM glucosio, come controllo, o 28 mM / 45 mM glucosio, per i trattamenti; è stato visto che l'esposizione ad un ambiente con eccesso di glucosio induce un incremento della produzione di VEGF (Hu et al., 2013). Le RGC sono state utilizzate anche per indagare l'apoptosi indotta dall'iperglicemia in questo tipo cellulare, fenomeno che è noto realizzarsi in vivo (Ola et al., 2014). Studi sull'apoptosi neuronale sono stati condotti anche su colture primarie di neuroni retinici esposti per 7 giorni ad alto glucosio (Santiago et al., 2007). Anche le cellule di Müller vengono spesso utilizzate in studi *in vitro*; linee cellulari rappresentate da cellule di ratto (rMC-1) o umane isolate sono incubate in presenza di glucosio a concentrazioni di controllo (5/7,8 mM) o che mimano le condizioni iperglicemiche (25 mM). I cambiamenti evidenziati, indotti dall'alto glucosio, riguardano l'aumento dei livelli di espressione dell'mRNA del VEGF, dopo 3 giorni di coltura, e l'induzione di apoptosi. Quest'ultima è stata associata all'aumento dei livelli di superossido, ipotizzato essere l'iniziatore del processo di morte (Du et al., 2003, Szabadfi et al., 2010). Linee cellulari di cellule del RPE (ARPE-19), di cellule endoteliali retiniche (HRMEC) e di periciti, coltivate in condizioni che mimano quelle a cui sono sottoposte nel diabete, hanno fornito risultati preliminari sulla risposta anche di questi tipi cellulari allo stress iperglicemico (Szabadfi et al., 2014a).

Queste indicate, e altre linee cellulari sviluppate, sono state ampiamente adoperate anche per altri tipi di esperimenti, sempre nell'ambito della ricerca sulla DR; di grande importanza sono gli studi preliminari volti ad indagare le potenzialità di determinate sostanze nel prevenire o contrastare i danni provocati dall'alto glucosio (Alvaro et al., 2008, Gaspar et al., 2013). Questo primo screening *in vitro* serve a limitare l'utilizzo, fin dal principio della ricerca, di animali sperimentali.

Tuttavia, modelli sperimentali di questo tipo non consentono di indagare la risposta della retina nel complesso né di capire l'integrità funzionale del tessuto (Szabadfi et al., 2014a). Infatti, negli

esperimenti *in vitro* la risposta delle varie popolazioni cellulari retiniche viene analizzata isolatamente; la perdita degli effetti dovuti alle interazioni con altre componenti, da una parte, permette di fare maggiore chiarezza sul ruolo di ogni elemento del sistema neurovascolare retinico, ma, dall'altra, esclude dall'analisi fattori molto importanti; infatti, la struttura e l'omeostasi della retina, come detto sopra, sono il risultato proprio delle stesse interazioni complesse tra questi elementi singoli. Se quindi gli esperimenti *in vitro* sono certamente utili per l'approccio iniziale allo studio di un fenomeno complesso e per definirne le basi, nel prosieguo delle indagini pongono vincoli limitanti.

Un modello *in vivo*, invece, è costituito da un soggetto sperimentale in cui l'oggetto di studio viene analizzato. Esso si pone agli antipodi rispetto al modello *in vitro*; introduce tutta la complessità derivata dalle interazioni presenti in condizioni fisiologiche nel singolo tessuto/organo studiato ma anche aspetti che si estendono alle dinamiche dell'organismo nell'insieme. L'analisi di un fenomeno, quale la patogenesi della DR, in un modello *in vivo*, garantisce la maggiore completezza del quadro ma è limitata dalla scarsa manipolabilità e controllo delle innumerevoli variabili presenti nell'organismo vivente; ciò risulta problematico, soprattutto nelle fasi iniziali di ricerca.

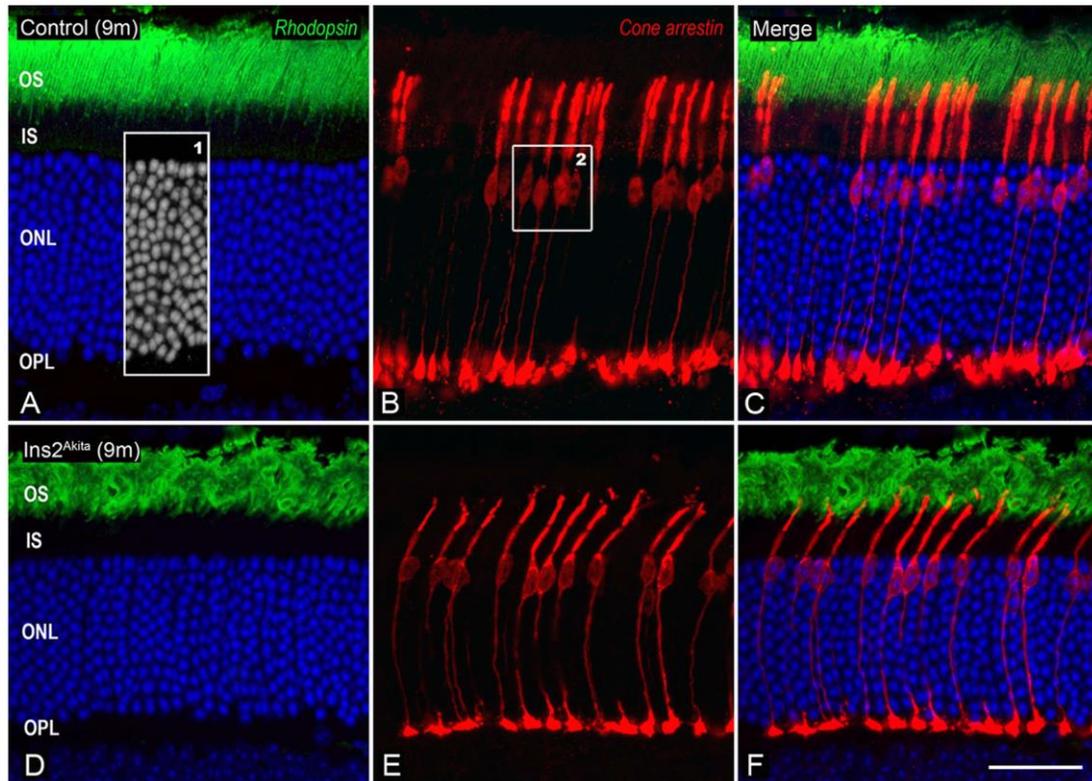
Diversi modelli animali sono stati sviluppati e usati con successo per studi sulla DR. Ciò è motivato dal fatto che i processi fisiologici e biochimici, sottostanti alla malattia, nell'uomo, sono identici o molto simili a quelli degli animali sperimentali di maggior utilizzo (Robinson et al., 2012). Mentre gli animali sono vivi, le alterazioni vascolari e non-vascolari della DR possono essere monitorati nello stesso animale nel corso del tempo, usando varie tecniche che includono test elettrofisiologici, fotografia del fondo, angiografia del fondo con fluoresceina e tomografia a coerenza ottica (Robinson et al., 2012). I modelli di DR sviluppati in roditori sono tra quelli più frequentemente adoperati (Jo et al., 2013), variano a seconda della specie considerata (principalmente ratto o topo), del ceppo, del metodo di induzione e della durata del diabete. I vantaggi offerti includono il fatto che sono semplici da manipolare, relativamente poco costosi, hanno cicli riproduttivi brevi e un background genetico simile all'uomo, prospettando la possibilità di estrapolare i risultati sperimentali. Inoltre, la messa appunto, nel topo, di tecniche avanzate di manipolazione genetica, come l'espressione transgenica, transgenesi tessuto specifica e il knockout genico mirato, hanno incrementato l'importanza di modelli sviluppati in questo animale. I roditori, quindi, forniscono una piattaforma notevole per investigare la patogenesi della DR, almeno per gli stadi iniziali della malattia.

Tuttavia, nonostante gli aspetti favorevoli e incoraggianti, il limite maggiore nell'uso di roditori è rappresentato dal fatto che essi non riproducono perfettamente la situazione riscontrabile nell'uomo, soprattutto per quel che riguarda il grado di estensione della malattia. I modelli di roditori presentano la maggior parte degli aspetti delle fasi precoci della DR, ma non è stata riscontrata, eccetto pochissimi casi, riproducibilità nello sviluppare l'ultimo stadio, neovascolare, della malattia; questo è probabilmente dovuto alla limitata lunghezza della vita degli animali e, di conseguenza, alla minore durata del diabete rispetto all'uomo. Nel dettaglio, negli animali il diabete viene generalmente indotto con diversi metodi, dalla pancreatectomia chirurgica alla somministrazione di farmaci tipo STZ, o tramite incrocio selettivo o manipolazione genetica (Robinson et al., 2012).

Le sostanze chimiche usate più spesso sono la STZ o l'alloxano, i quali distruggono le cellule  $\beta$  del pancreas, inducendo diabete di tipo 1. Questo approccio riproduce i sintomi iniziali della DR, come la perdita di periciti e di capillari retinici, l'ispessimento della membrana basale dei vasi, occlusione vascolare e aumento della permeabilità vasale, che cominciano ad apparire tra 1 e 2 mesi dall'inizio dallo stabilirsi dell'iperglicemia (Kern et al., 2009, Zheng and Kern, 2009, Kern et al., 2010). Le variazioni indotte dal diabete, non a carico dei vasi ma riguardanti neuroni e glia, sono riscontrate prima dello sviluppo delle alterazioni alle cellule vascolari e si ipotizza possano contribuire alla patologia della malattia vascolare, in questo modello (Barber et al., 1998, Zeng et al., 2000, Kohzaki et al., 2008). Dopo il trattamento con STZ i ratti mostrano perdita di RGC e un significativo assottigliamento degli strati nucleari interno ed esterno della retina (Martin et al., 2004, Barber et al., 2005). Il modello di ratto, o topo, diabetico, trattato con STZ rappresenta quello più frequentemente adoperato per lo studio della neurodegenerazione e della neuroprotezione nella DR.

I modelli diabetici *in vivo* di roditori, includono, oltre a quelli con diabete indotto da molecole chimiche, quelli in cui la malattia si sviluppa spontaneamente a causa di particolari mutazioni presenti nel genoma. Tra questi, i più noti sono gli Zucker diabetic fatty rats, gli Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, i Goto-Kakizaki rats e gli Spontaneously diabetic Torii rat, per i modelli di ratto, mentre nel topo sono i Non-obese diabetic mice, i db/db mice e gli Ins2Akita mice (Jo et al., 2013). I topi db/db e gli Ins2Akita sono quelli impiegati più frequentemente; nei primi lo sviluppo del diabete è dovuto alla mutazione nel recettore della leptina, ormone implicato nella regolazione del bilancio energetico. Gli animali con questa mutazione sviluppano sindrome metabolica, che, tra le manifestazioni più rilevanti, include il diabete (Bogdanov et al.,

2014). Negli Ins2Akita, invece, il diabete è causato dalla mutazione puntiforme nel gene che codifica per l'insulina. In entrambi si riscontrano i cambiamenti associati alle fasi iniziali della DR (Fig. 19).



**Figura 19** Degenerazione dei coni in un modello di topo  $Ins2^{Akita}$ . Micrografie di sezioni retiniche marcate con Rodopsina (verde) o Arrestina dei coni (rosso) in topi di controllo (A-C) o  $Ins2^{Akita}$ ; dalla marcatura con DAPI emerge che non ci sono differenze nella densità totale dei fotorecettori tra trattati e controlli mentre le marcature specifiche indicano una riduzione del numero dei coni nel modello diabetico  $Ins2^{Akita}$ . IS, segmenti interni; OS, segmenti esterni, INL, strato nucleare interno; ONL, strato nucleare esterno. Scala di calibrazione: 30  $\mu$ m. Tratta da Hombrebueno et al., 2014.

Come detto sopra, malgrado gli svariati tentativi di stabilire modelli ideali, che riflettano accuratamente gli aspetti connessi alla fase avanzata della DR nell'uomo, solo pochissimi animali sviluppano una retinopatia severa, con aree estese non perfuse e neovascolarizzazione. Per questo motivo, i ricercatori hanno optato spesso per animali non diabetici per lo studio della PDR. Tra i

modelli di roditore di questo tipo, di più ampio utilizzo per lo studio della neovascolarizzazione, ci sono quelli in cui il VEGF è sovraespresso, nei fotorecettori, come i topi Kimba, in cui l'espressione del VEGF è guidata dal promotore della rodopsina (Okamoto et al., 1997, Tee et al., 2008). Questi inducono possibile neovascolarizzazione e distacco della retina in assenza di diabete.

Di recente è stato proposto un modello transgenico di DR, nominato "Akimba", frutto dell'incrocio tra topi Kimba e Akita (Rakoczy et al., 2010). Questi mostrano gli aspetti chiave esibiti da entrambi i ceppi parentali: sovraespressione di VEGF (come nei Kimba) e diabete spontaneo (come negli Akita). L'interesse riscontrato da tale modello deriva dal fatto che si evidenziano anche lesioni retiniche avanzate, che rispecchiano la PDR. Va comunque sottolineato che i cambiamenti neovascolari osservati nei topi Akimba non sono il risultato dell'iperglicemia protratta per lungo tempo, bensì sono causati dalla presenza del transgene del VEGF, quindi dalla sua sovraespressione. Di conseguenza, questo modello si rivela inadatto all'analisi dell'eziologia della DR o dei fattori associati allo sviluppo della neovascolarizzazione pre-retinica. Esso potrà, invece, rivelarsi uno strumento utile per incrementare la comprensione dei processi complessi che concorrono alla progressione delle fasi avanzate della DR (Robinson et al., 2012).

Tra i sistemi *in vivo*, anche se non diabetici, utilizzati per lo studio della neovascolarizzazione merita una menzione particolare il modello di retinopatia indotta dall'ossigeno (OIR) (Scott and Fruttiger, 2010). Questo rappresenta il sistema più diffuso per indagare il fenomeno della neovascolarizzazione patologica come risposta all'instaurarsi di una condizione di ipossia/ischemia nella retina. Infatti, sebbene la patogenesi del danno vascolare vari considerevolmente tra le diverse retinopatie proliferative associate ad ischemia, lo sviluppo dell'ultima fase neovascolare avviene in maniera molto simile in tutte queste. Il principio su cui si basa il modello OIR per riprodurre la risposta neoangiogenica è quello per cui l'esposizione dell'animale neonato (PND 7), in cui il sistema vascolare retinico è ancora in via di sviluppo, ad iperossia inibisce la formazione dei vasi; in seguito al ritorno alla pressione di ossigeno atmosferica la retina diventa ipossica e attiva una risposta vascolare "riparatoria" che si sviluppa però in maniera non consona conducendo a neovascolarizzazione aberrante, quale quella che caratterizza le retinopatie proliferative, compresa la DR (Smith et al., 1994).

### 1.3.2. La coltura organotipica *ex vivo*: un nuovo approccio sperimentale

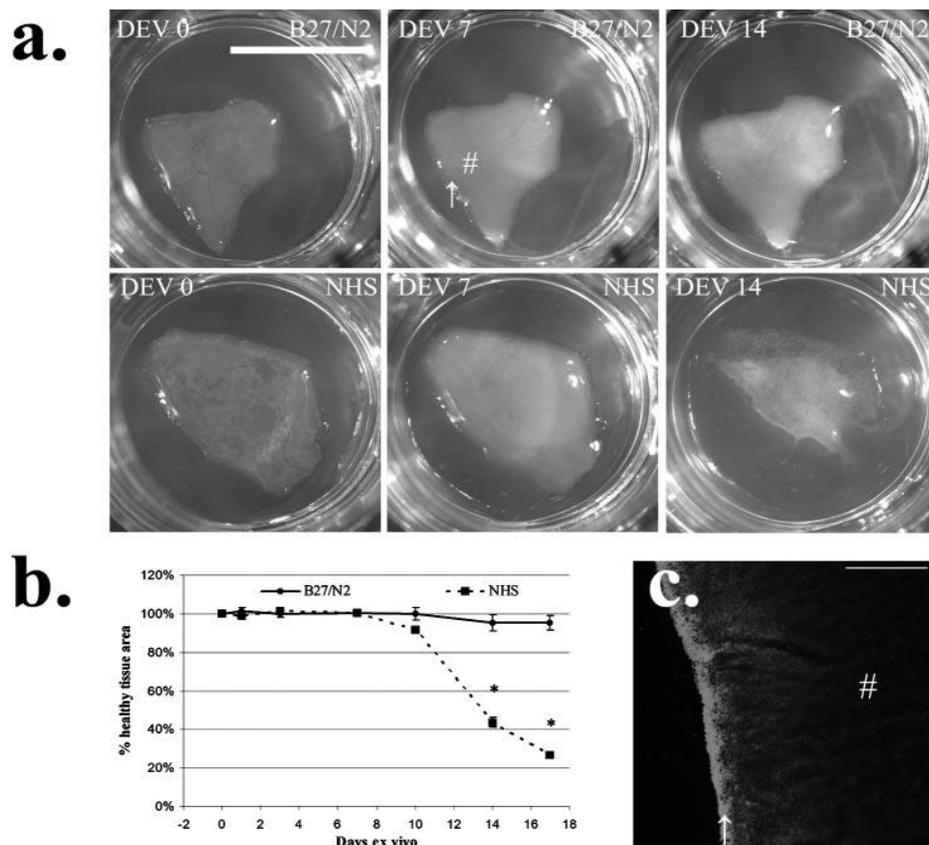
Esiste un terzo tipo di approccio sperimentale, attraverso cui è possibile indagare la patogenesi e l'evoluzione della DR, rappresentato dai modelli *ex vivo*.

In generale, un sistema *ex vivo* è costituito da un tessuto vivente coltivato all'esterno dell'organismo ed utilizzato come modello per lo studio e per la sperimentazione. La coltura organotipica *ex vivo* si pone a metà strada tra i modelli *in vitro* ed *in vivo*; la capacità di offrire un quadro sperimentale in cui l'organo è mantenuto nella sua integrità, più completo rispetto a singoli elementi cellulari isolati, e allo stesso tempo una maggiore accessibilità e semplicità di gestione rispetto a un sistema *in vivo* configurano i modelli *ex vivo* come un anello di congiunzione ideale ed uno strumento utile in vari ambiti di ricerca.

Le potenzialità di questo sistema possono essere sfruttate anche per gli studi che hanno come oggetto la retina. Di base, questo approccio sperimentale è validato dal fatto che l'analisi morfologica e molecolare del tessuto dimostrano che, mentre la retina è coltivata, la maggior parte delle caratteristiche istologiche e neurochimiche si sviluppano, grossolanamente, come avviene nella organo all'interno dell'organismo vivente (Caffè et al., 2001) (Fig. 20).

Posto ciò, perché un modello *ex vivo* risulti efficiente è fondamentale ottenere un sistema di coltura d'organo, di retina in questo caso, in cui il tessuto corrisponda alla sua controparte in situ, in modo tale che gli espianti possano essere accettati come un substrato eccellente per indagare i fenomeni retinici (Caffè et al., 2001).

Il principale vantaggio è che un sistema organotipico così fatto permette di aggiungere metodi per un'analisi più precisa e dettagliata che non è possibile in varie situazioni *in vivo*, le quali rimangono difficili da interpretare (Caffè et al., 2001). Infatti, le tecniche di studio *ex-vivo*, se da una parte perdono la completezza di un modello *in vivo*, dall'altra, permettono di superarne alcuni punti sfavorevoli legati, in particolar modo, alla struttura complessa del sistema, costituito dall'organismo in toto, che impedisce di tenere facilmente sotto controllo tutte le variabili che possono influire sul processo in esame. Un esperimento *ex-vivo* ha una durata massima limitata dalla sopravvivenza della retina espiantata ma in questo intervallo rappresenta un modello più semplice, ideale, ad esempio, per mettere in luce con maggior chiarezza singoli aspetti relativi ad un fenomeno esteso, quale possono essere la patogenesi e il decorso di una malattia.



**Figura 20** Morfologia grossolana e vitalità tissutale di espiantri retinici coltivati in terreno contenente siero (NHS) o meno (B27/N2); fotografie dell'intero espiantri (a) e dell'assorbimento di Ioduro di propidio (PI) (c) dimostrano che la degenerazione del tessuto è limitata unicamente ai bordi degli espiantri. (b) La quantificazione dell'area di tessuto sano confermano una perdita di tessuto minima negli espiantri coltivati in B27/N2 mentre l'aggiunta di siero al terreno di coltura è associata a diminuzione della vitalità. Scala di calibrazione: (a) 6 mm, (c) 400  $\mu$ m. Tratta da Johnson and Martin, 2008.

Da ciò deriva lo sforzo nel cercare di mettere a punto un modello *ex vivo* di DR. Lo studio in un sistema così fatto risulterà di certo una semplificazione del reale quadro pato-fisiologico tipico della malattia, ma permetterà di concentrarsi su alcuni punti importanti isolatamente. Diversi campi di indagine, infatti, potrebbero beneficiare dello sviluppo di un modello *ex vivo* di DR ideale; tra queste, lo studio delle variabili connesse alla patogenesi, quali l'effetto dell'alto

glucosio sul tessuto retinico nell'insieme, la risposta allo stress ossidativo e agli AGE, agenti chiave nell'evoluzione delle disfunzioni indotte dall'iperglicemia, ma anche il saggio di molecole con potenziale azione farmacologica, con particolare attenzione a sostanze ad azione neuroprotettiva. Ad oggi, prima dell'avvio di trials clinici, le molecole farmacologiche candidate al trattamento della DR vengono scrutinate principalmente tramite saggi *in vitro* ed impiego in modelli animali *in vivo*. Questa considerazione enfatizza la grande necessità di sviluppare un sistema intermedio, che mimi la malattia, per minimizzare l'utilizzo di animali da laboratorio (Jo et al., 2013).

Tuttavia, non sono molti i modelli proposti. Il primo aspetto rilevante nell'evoluzione di un sistema di coltura organotipica che riproduca le condizioni iniziali tipiche della DR è dato dal fatto che il punto di partenza nell'evoluzione della malattia, così come di tutte le altre conseguenze del diabete, è l'iperglicemia. L'esposizione ad un'alta concentrazione di glucosio scatena una serie di risposte che possono condurre ad alterazione della funzionalità e, nella prospettiva peggiore, alla morte delle cellule. Vista la causalità dell'iperglicemia nelle risposte cellulari e tissutali, un modello *ex-vivo* in cui espianti retinici sono esposti a concentrazioni crescenti di glucosio, tali da mimare la condizione a cui l'organo è sottoposto nella DR, potrebbe rappresentare una valida "riproduzione", semplificata, del quadro che *in vivo* è associato alla malattia.

Sistemi basati su questo principio sono stati utilizzati in alcuni studi. Ad esempio, è stata analizzata la formazione di nuovi vasi ("sprouting") in espianti retinici incubati in condizioni di alto glucosio (25 mM) o di controllo per un periodo di 2-3 settimane (Aranda et al., 2012). Inoltre, in retine *ex vivo*, è stato valutato l'effetto dell'iperglicemia sull'espressione di molecole impiegate dalle cellule, in particolar modo neuroni, per combattere lo stress ossidativo (He et al., 2013). Infine, retine coltivate in presenza di alto glucosio sono state adoperate per analizzare la risposta allo stress iperglicemico, in termini di crescita dei neuriti (Takano et al., 1999), e per saggiare l'efficacia di alcune neurotrofine (BDNF e neurotrofina-4) nel ridurre l'apoptosi associata allo stress indotto dall'alto glucosio (Oshitari et al., 2010).

I dati raccolti in queste prove confermano la validità dell'approccio sperimentale *ex vivo* per la ricerca sulla DR e spingono ad ulteriori avanzamenti nelle metodologie proposte e nelle applicazioni ad aspetti diversi della patogenesi della malattia.

## **2. Scopo della tesi**

Lo scopo del lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto e validare un modello *ex vivo* che riproduca le condizioni associate alla DR rappresentato dalla coltura organotipica di espianti di retina, per tempi diversi, in presenza di concentrazioni di glucosio iperglicemiche e di controllo, o in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Vista la causalità dell'iperglicemia nelle risposte cellulari e tissutali indotte dal diabete, un modello sperimentale *ex-vivo* in cui espianti retinici sono esposti a concentrazioni di glucosio, tali da mimare la condizione a cui l'organo è sottoposto nella DR, potrebbe rappresentare un valido strumento di studio per indagare, a livello basale, tali risposte. Il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, invece, è accettato come sistema sperimentale per riprodurre condizioni di stress ossidativo, che costituisce uno dei principali collegamenti tra alto glucosio e DR. Questo secondo approccio, quindi, offrirebbe la possibilità di indagare direttamente il ruolo di questo componente specifico della patogenesi della DR. L'obiettivo finale è quello di sviluppare un sistema valido per testare l'efficacia di sostanze neuroprotettive nel trattamento della malattia, posto il ruolo della neurodegenerazione come motore iniziale nell'evoluzione della stessa. Tra le molecole candidate, particolare attenzione è stata rivolta all'indagine dell'effetto benefico di OCT nell'attenuare i danni ai neuroni, riducendo l'apoptosi, e nel saggiare se e come questo risultato si ripercuote sull'aumento dell'espressione/rilascio di VEGF. Infatti, il contemporaneo miglioramento su entrambi i fronti va a supporto della teoria di una relazione causale tra danno alla neuroretina e sviluppo di risposte inerenti la componente vascolare; questo permette di sostenere l'ipotesi dell'utilizzo di neuroprotettori, nello specifico neuropeptidi, come trattamento della DR nelle sue fasi precoci, impedendo il successivo decorso deleterio.

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1. Animali e preparazione degli espianti**

Sono stati utilizzati topi di 3/5 settimane di età, appartenenti al ceppo C57BL/6, di entrambi i sessi, allevati in ambiente con atmosfera controllata (23±1°C, 50±5% di umidità) e con cicli

buio/luce di 12h. In tutti gli esperimenti i topi sono stati anestetizzati con etere e sacrificati per dislocazione cervicale. Le retine sono state rapidamente dissezionate in soluzione salina sterile (PBS); con una forbice da chirurgia oftalmica è stato effettuato un taglio verticale anteriormente lungo l'*ora serrata*; l'interruzione della continuità della cornea permette l'uscita dell'umor acqueo. Facendo presa con pinzette sui due lembi liberi, così generati, e tirando delicatamente in direzioni opposte, si ha la separazione della retina dalla parte esterna dell'occhio, costituita dalla sclera e dal pigmentato. Sono stati rimossi il cristallino e l'umor vitreo ed è stato reciso con un taglio il nervo ottico. La retina isolata è stata disposta con la concavità rivolta verso l'alto e sono state effettuate 4 incisioni simmetriche radialmente. Prolungando i tagli fino a convergenza sono stati ottenuti 4 frammenti della forma di spicchi circa delle stesse dimensioni. In tutti gli esperimenti effettuati, gli espianti incubati *ex vivo* sono stati rappresentati da frammenti così realizzati.

## **3.2. Colture organotipiche *ex vivo***

In prove successive sono stati impiegati due sistemi di coltura differenti in funzione del supporto tissutale utilizzato e del terreno di coltura.

### **3.2.1. Coltura su vetrini poli-lisinati**

Il terreno utilizzato ha la seguente formula: PBS (ottenuto dal PB 0,1 M pH 7,4 con l'aggiunta di 0,09% NaCl), Amfotericina B 1 µg/ml, Penicillina 25 U/ml, Streptomina 25 mg/ml e contiene 6 mM D-glucosio, per il controllo, o concentrazioni di D-glucosio pari a 25 mM, 45 mM o 57 mM per i trattamenti iperglicemici.

Dopo la poli-lisinazione, ogni vetrino coprioggetto è stato adagiato in un pozzetto di 6-well, dove è avvenuta la coltura. Gli espianti sono stati posizionati sul vetrino tramite l'ausilio di una pasteur, con la quale è stato raccolto il frammento isolato all'interno di un piccolo volume di liquido, in modo da evitare danni meccanici. Rilasciando quanto aspirato sul vetrino, nella posizione voluta, il frammento si è trovato in una goccia di liquido che ha permesso di orientarlo adeguatamente mediante l'utilizzo di pinzette. La successiva rimozione della soluzione in eccesso ha consentito la distensione del frammento. Sono stati aggiunti 150 µl di terreno di coltura; il risultato finale è stato rappresentato dalla formazione di un sottile film che bagna gli espianti

senza sommergerli. Operando in questo modo, tutti gli espianti sono rimasti adesi al substrato di coltura. Le piastre coi vetrini sono state mantenute nell'incubatore a 37°C e con 5% CO<sub>2</sub> fino al termine delle colture. Per i trattamenti con durata dell'incubazione superiore a un giorno si è provveduto a cambiare il terreno giornalmente.

Questo procedimento è stato adottato in 2 prove differenti in funzione della durata della coltura, dell'orientamento degli espianti rispetto al substrato e della concentrazione di glucosio presente nel terreno. Nel primo esperimento, 4 espianti sono stati posizionati su ciascun vetrino, due disposti con il GCL rivolto verso l'alto e due con l'orientamento opposto, e sono stati incubati per 1 gg, 2 gg o 5gg. Nella seconda prova, gli espianti posti su ciascun vetrino sono stati orientati tutti con GCL verso l'alto e sono stati introdotti i trattamenti con concentrazioni diverse e crescenti di glucosio (6 mM, 25 mM, 45 mM, 57 mM). La durata delle colture è stata pari a 1 gg, 2 gg, 3 gg, 4 gg o 5 gg. Gli espianti trattati in queste 2 prove sono stati utilizzati per analisi morfologiche su sezioni trasversali colorate con DAPI e per la valutazione della morte cellulare tramite una tecnica di staining vita/morte con PI.

### 3.2.2. Coltura su inserti Millicell-CM

La coltura è stata realizzata su membrane microporose (Millicell-CM culture inserts, Sigma), di dimensioni 0.4 mm x 30 mm, adagiate sul fondo dei pozzetti di piastre 6-well sterili in cui, precedentemente, era stato messo 1 ml di terreno adatto per ciascun trattamento. Su ogni inserto sono stati disposti espianti, con lo stesso sistema descritto in precedenza, in numero compreso tra 3 ed 8 e destinati ad uno stesso trattamento. Le piastre sono state riposte nell'incubatore a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> dove è avvenuta la coltura. In prove successive sono stati utilizzati due terreni con composizione differente; la formula di base impiegata inizialmente prevede: 50% Modified Eagle Medium (MEM, Sigma), 25% Heat Inactivated Horse Serum (HIHS, Sigma), 25% Hank's Salt Solution (Sigma), Penicillina 25 U/ml, Streptomicina 25mg/ml, Amfotericina B 1 µg/ml, l-glutammina 200 µM e D-glucosio 6 mM. In seguito, la composizione è stata modificata eliminando HIHS. I trattamenti iperglicemici sono stati ottenuti aggiungendo al terreno quantità di D-glucosio tali da raggiungere concentrazioni finali pari a 25 mM, 45 mM o 75 mM. L'incubazione ha avuto una durata compresa tra 1 gg e 10 gg; il terreno è stato sostituito ogni due giorni. I trattamenti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hanno previsto l'aggiunta, di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µM, 10 µM o 100 µM; la composizione del terreno è identica a quella utilizzata per i controlli negli esperimenti in

condizioni di alto glucosio. Gli espianti retinici sono stati incubati per 1, 3 o 5 gg, e il terreno è stato cambiato giornalmente, data l'instabilità dell' $H_2O_2$ . Gli espianti così trattati sono stati utilizzati per la valutazione della morte cellulare per apoptosi tramite quantificazione relativa dei livelli di citocromo c con Western Blot, per la misurazione dei livelli di mRNA per la caspasi-3 e per il VEGF mediante Real-Time RT-PCR o per la valutazione del danno a selezionate popolazioni cellulari e dell'entità del processo apoptotico in atto mediante tecniche di immunostochimica. Sui terreni raccolti al termine delle colture sono state misurate le quantità relative di VEGF tramite un saggio ELISA.

### **3.3. Trattamenti farmacologici**

Espianti in coltura su inserti Millicell-CM sono stati trattati con OCT o VEGF-trap aggiunti al terreno di coltura. OCT, analogo sintetico del neuropeptide SST, è stato impiegato alla concentrazione di 1  $\mu$ M; VEGF-trap è stato impiegato alla concentrazione di 1 ng/ml. Il trattamento è stato ripetuto per ogni cambio del terreno, fino al termine delle colture.

### **3.4. Preparazione delle sezioni retiniche**

Al termine del periodo di incubazione, gli espianti utilizzati per la colorazione con DAPI o per l'immunostochimica sono stati fissati in paraformaldeide (PAFA) al 4% in PB 0,1M per 45–60 minuti a temperatura ambiente. Gli espianti fissati sono stati poi conservati in saccarosio al 25% in PB 0,1M contenente 0,01% sodio azide ( $NaN_3$ ) a 4°C per almeno una notte. Sono state realizzate sezioni di ogni frammento, di 10  $\mu$ m di spessore, tagliando gli espianti di retine al criostato perpendicolarmente alla superficie vitreale. Le sezioni sono state montate su vetrini gelatinati e conservate a -20°C. Per ogni campione sono stati fatti 5-10 vetrini, ciascuno contenente 5 sezioni.

### **3.5. Colorazione con DAPI**

L'analisi della morfologia retinica è stata effettuata tramite colorazione di sezioni retiniche con DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole; Sigma), molecola organica fluorescente che lega fortemente il DNA e permette di rilevare i nuclei cellulari. I vetrini sono stati montati con

coprioggetto utilizzando come mezzo montante una miscela di glicerolo in PB 0,1 M contenente 1 µg/ml di DAPI.

### **3.6. Colorazione con ioduro di propidio**

Per valutare la vitalità degli espianti al termine della coltura su vetrini poli-lisinati in presenza di alto glucosio o in condizioni di controllo, è stata adoperata una tecnica di staining vita-morte che utilizza ioduro di propidio (PI). PI è un intercalante del DNA; si lega in maniera stechiometrica all'acido nucleico ed emette fluorescenza nel rosso. Solo le cellule morte, in cui il colorante ha accesso all'interno della cellula, risultano marcate, per cui è possibile utilizzare l'intensità della fluorescenza emessa come indice del grado di morte cellulare in ciascun frammento. Al termine del periodo di coltura, il terreno è stato sostituito con 200 µl di soluzione PI 20 µg/ml in PBS sterile, contenente Amfotericina B 1 µg/ml, Penicillina 25 U/ml, Streptomycina 25 mg/ml, che mantenesse la corretta concentrazione di glucosio relativa a ciascun trattamento. Si è lasciato incubare per 1h a temperatura ambiente. Al termine, gli espianti sono stati lavati, utilizzando per ciascuno il relativo terreno in cui era avvenuta la coltura, e sono stati fissati con PAFA 4% in PB 0,1 M. Di seguito, è stata effettuata l'analisi della fluorescenza ed l'acquisizione delle immagini posizionando gli espianti su un vetrino portaoggetto, con il GCL rivolto verso l'alto, e montando il coprioggetto con una soluzione di glicerolo in PB 0,1 M.

### **3.7. Immunoistochimica**

Gli anticorpi primari utilizzati in questo lavoro sono stati scelti per marcare specifiche popolazioni cellulari, in particolare cellule endoteliali (CD31), cellule di Müller (GFAP) o fotorecettori (recoverina), o per rivelare l'entità e la localizzazione di fenomeni apoptotici (caspasi 3 attiva). I vetrini con le sezioni ottenute al criostato (vedere paragrafo "Preparazione delle sezioni retiniche") sono stati asciugati, lavati in PB 0.1M e successivamente incubati per tutta la notte a 4 °C con ciascuno degli anticorpi primari diluiti in Triton X-100 0.1% in PB 0.1M. Le diluizioni utilizzate sono: 1:50 per il CD31, 1:400 per la GFAP e 1:100 per la recoverina. Successivamente i vetrini sono stati lavati in PB 0.1M ed incubati a temperatura ambiente per 1-2h, con un anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488 o con Alexa Fluor 546, diluito 1:200 in Triton X-100 0.1% in PB 0.1M. Infine, i vetrini sono stati lavati in PB 0.1M e montati

con coprioggetto utilizzando come mezzo montante una miscela di PB 0.1M e glicerolo. Doppie marcature sono state eseguite incubando overnight sezioni con anticorpi per il CD31 insieme ad anticorpi per la caspasi 3 attiva; successivamente le sezioni sono state incubate per 2h a temperatura ambiente con una miscela contenente gli opportuni anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 488 o con Alexa Fluor 546.

### **3.8. Analisi dell'immagine**

Immagini di preparati colorati con PI o di preparati di immunofluorescenza sono state acquisite al microscopio a fluorescenza utilizzando gli obiettivi 4x o 20x. Le immagini sono state convertite in scala di grigi e normalizzate al background. Le misure dello spessore del bordo marcato, su immagini di espianti whole mount colorati con PI, e della densità di marcatura, indicata dalla misura del livello medio di grigio, su sezioni di espianti trattati per l'immunoistochimica, sono state eseguite utilizzando lo strumento "analisi" del software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

### **3.9. Real-Time RT-PCR**

Mediante Real-Time RT-PCR, sono stati valutati i livelli di espressione dell'mRNA della caspasi-3 e del VEGF. Al termine della coltura, gli espianti utilizzati per l'RT-PCR sono stati immediatamente congelati a -80°C. L'mRNA totale è stato estratto dagli espianti utilizzando il protocollo di estrazione con Triazol; è stato purificato, risospeso in acqua sterile e quantificato tramite lettura allo spettrofotometro. Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale. I primer per la caspasi-3 e per il VEGF (Eurofins) sono stati disegnati per ibridare con le regioni corrispondenti nel topo. Per la caspasi-3 hanno sequenze:

"forward" - GCACTGGAATGTCATCTCGCTCTG

"reverse" - GCCCATGAATGTCTCTCTGAGGTTG

Per il VEGF le sequenze dei primer sono:

"forward" - GCACATAGGAGAGATGAGCTTCC

"reverse" - CTGCGCTCTGAACAAGGCT

Come standard interno è stato utilizzato l'mRNA per Rpl13a, espresso costitutivamente nella retina. I primer per Rpl13a sono stati scelti in accordo alla sequenza genica nel topo.

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un termociclatore (MJ-Mini™, Bio-Rad) per 40 cicli. Ciascun ciclo consiste in 10'' di denaturazione a 95°C e 20'' di annealing ed estensione dei filamenti a 58°C. Al termine della reazione di amplificazione sono state analizzate le curve di melting, tramite aumento della temperatura da 65,0 °C a 95,0 °C, con incrementi di 0.5°C ogni secondo.

### **3.10. Western Blot**

Al termine delle colture gli espianti sono stati raccolti all'interno di vials, in numero di 4 espianti per ciascuno, a cui sono stati aggiunti 100 µl di buffer di lisi contenente 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 4 mg/ml n-dodecil-β-maltoside, 1% TRITON-X 100, 0,1% SDS, un cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi, e sono stati sonicati a freddo. Gli omogenati sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 15 min a 4°C. È stata determinata la concentrazione proteica, sui surnatanti, tramite metodo di Bradford. Aliquote di ciascun campione, contenenti la stessa quantità di proteine (30 µg), sono state sottoposte a corsa elettroforetica SDS-PAGE. Le proteine sono state trasferite dal gel a membrane di polivinilidenefluoruro (PVDF) per mezzo di Transblot (Trans-Blot Turbo™, Biorad) o trasferimento manuale. Queste sono state sottoposte a blocking, tramite incubazione in latte al 3% in agitazione su bascula per 1h. Le membrane sono state incubate overnight con l'anticorpo primario, a 4°C. È stato utilizzato un anticorpo monoclonale fatto nel topo e diretto contro il citocromo c (diluizione 1:500); le stesse membrane sono state incubate successivamente con un anticorpo monoclonale fatto nel topo e diretto contro la β-actina (diluizione 1:2500), usata come controllo di caricamento. Infine le membrane sono state incubate per 1h a temperatura ambiente in presenza di un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con perossidasi di rafano (IgG HRP) (diluizione 1:12.500). Le bande marcate sono state rivelate con un reagente chemoluminescente (Luminol).

Le immagini sono state acquisite usando un apparecchio Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). L'analisi comparativa dei livelli di citocromo c è stata effettuata misurando la densità ottica (OD) delle bande grazie al software Image Lab 3.0. I dati sono stati normalizzati per i livelli di OD della banda corrispondente di β-actina. I dati sono stati espressi come media ± SE e sono originati da 3

campioni, ciascuno costituito da 4 espianti (che formano una retina), per ogni condizione sperimentale.

### **3.11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

I livelli di VEGF nei terreni finali, raccolti al termine delle colture *ex-vivo*, o in omogenati di espianti retinici sono stati misurati tramite l'utilizzo di un kit disponibile in commercio. La misurazione è stata eseguita tramite una lettura spettrofotometrica (Microplate Reader 680 XR; Bio-Rad). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM.

### **3.12. Statistica**

L'analisi statistica dei dati provenienti dall'analisi di immagine condotta sugli espianti colorati con PI o immunomarcati, dall'RT-PCR, dal Western blot e dell'ELISA è stata effettuata con il test ANOVA e il post-test Newman Keuls utilizzando il software Graph Pad Prism (Graph Software, San Diego, CA, USA).  $P < 0.05$  è stato considerato significativo. I risultati sono sempre stati espressi come media  $\pm$  SEM.

### **3.13. Preparazione delle figure**

Tutte le immagini con DAPI, PI e quelle dell'immunofluorescenza sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza NIKON Eclipse E800, provvisto di telecamera Digital-Sight DS-U3, utilizzando il software DS-filc camera (Nikon Europe). Le immagini digitali sono state ottimizzate per luminosità e contrasto tramite il software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

## 4. Risultati

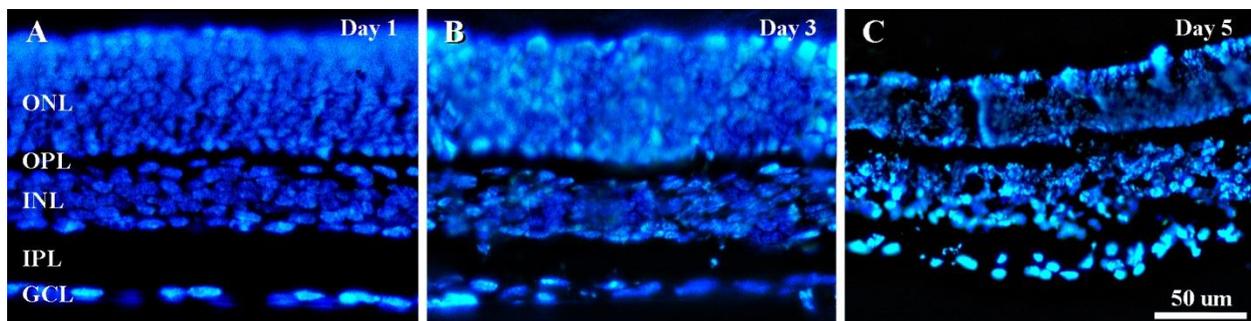
### 4.1. Definizione e validazione di un modello *ex vivo* di DR

Sono stati messi a punto due setup sperimentali che riproducono due delle condizioni associate alla DR; in particolare i modelli ideati e validati sono rappresentati da espianti retinici trattati con alto glucosio o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.1.1. Espianti su vetrini poli-lisinati in alto glucosio

##### 4.1.1.1. Analisi morfologica di sezioni colorate con DAPI

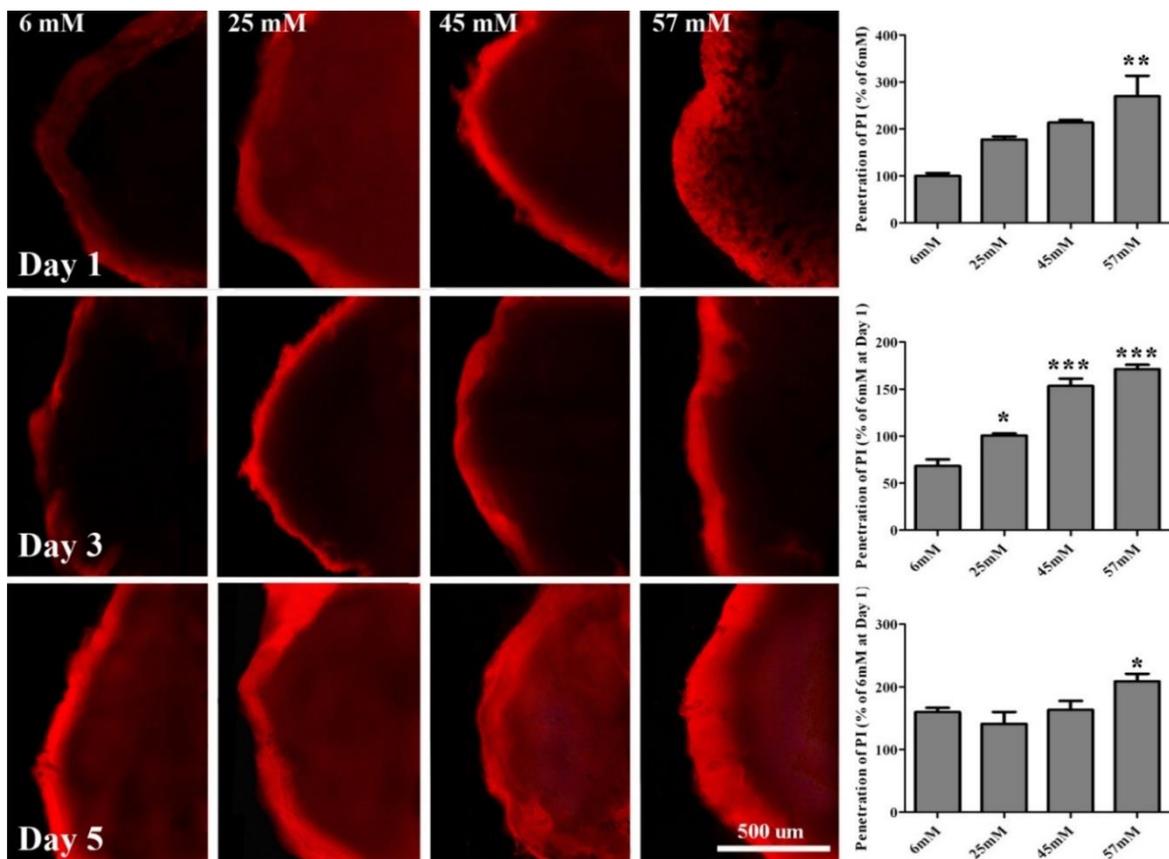
L'analisi di sezioni trasversali marcate con DAPI di espianti coltivati per 1gg, 3gg o 5gg, ha mostrato che gli espianti in coltura mantengono l'integrità della struttura e la morfologia (macroscopica) classica fino a 3gg di incubazione; negli espianti mantenuti per 5gg si è osservata riduzione dello spessore sia dell'INL che dell'OPL, in associazione a perdita di struttura del tessuto retinico rimanente (Fig. 21).



**Figura 21** Sezioni di espianti coltivati su vetrini poli-lisinati per 1gg (A), 3gg (B) o 5gg (C). L'incubazione protratta per più di 3gg, in queste condizioni sperimentali, non garantisce la preservazione delle caratteristiche del tessuto *ex vivo*. Per le abbreviazioni vedere “Abbreviazioni”. Barra di calibrazione: 50 µm.

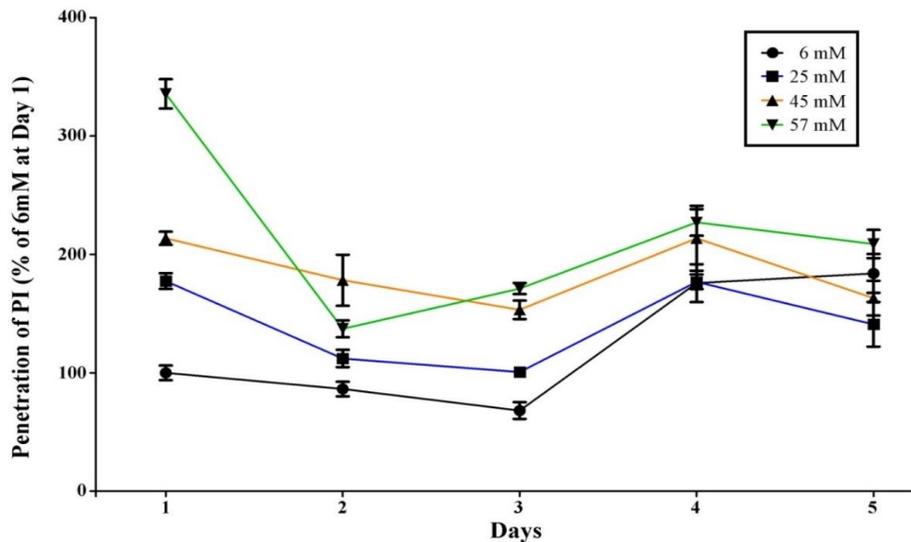
#### 4.1.1.2. Analisi della morte cellulare tramite staining vita/morte con PI

PI è un molecola fluorescente che permea la membrana plasmatica solo quando la cellula non è più vitale; quindi, in un tessuto trattato con PI, l'entità della fluorescenza è un indice della vitalità del tessuto stesso. Espianti di retina sono stati coltivati per 1gg, 3gg o 5gg, in presenza di concentrazioni di glucosio di controllo (6 mM) o in un mezzo contenente alto glucosio (25 mM, 45 mM o 57 mM) (Fig. 22).



**Figura 22** Assorbimento di PI, misura del bordo marcato. Comparazione dello spessore del bordo marcato in espianti coltivati in condizioni di controllo o in presenza di alto glucosio per 1 gg, 3 gg o 5 gg. A sinistra, immagini al microscopio a fluorescenza di una porzione periferica di un frammento relativo a ciascun trattamento; si nota la diversità nel grado di penetrazione di PI. A destra, grafici che indicano l'andamento della variazione dello spessore del bordo marcato tra i vari trattamenti, rispettivamente, dall'alto verso il basso, dopo 1gg, 3 gg e 5 gg. I valori sono espressi in percentuale rispetto a quello misurato al primo giorno con glucosio 6mM; n = 3. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (ANOVA) rispetto al controllo (6 mM). Barra di calibrazione: 500 μm.

In seguito al trattamento con PI, è stata comparata la fluorescenza presente negli espianti nelle diverse condizioni, mediante acquisizione di immagini delle porzioni periferiche e misura, su di esse, dello spessore del bordo marcato che indica il grado di penetrazione di PI nel tessuto, quindi fornisce una stima della morte cellulare (Fig. 23).

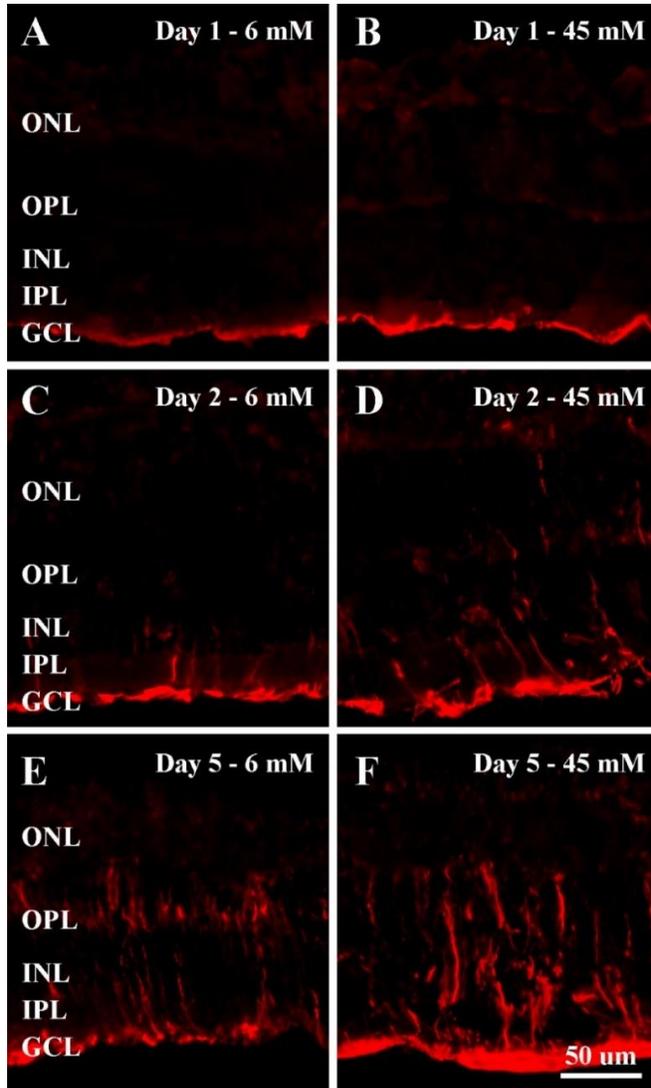


**Figura 23** Grafico che mostra l'andamento, nei giorni, della penetrazione di PI in espianti retinici incubati in presenza di glucosio 6 mM, 25 mM, 45 mM o 57 mM. La penetrazione di PI, espressa in percentuale rispetto a quella del controllo 6 mM 1 gg, negli espianti trattati con alto glucosio si mantiene più alta che nei controlli per i primi 3 gg. Dopo il terzo giorno, invece, le differenze tra espianti trattati con alto glucosio e quelli di controllo non sono più evidenti.

Negli espianti mantenuti in coltura per 1 gg, è stato rilevato un aumento dello spessore del bordo marcato al crescere della concentrazione di glucosio nel terreno di coltura, con una differenza significativa tra il massimo trattamento (57 mM) e il controllo (6 mM). Lo stesso andamento è stato riscontrato anche per gli espianti coltivati per 3gg; la marcatura del bordo presente nel trattamento 25 mM (3 gg) è significativamente maggiore rispetto a quella misurata nel relativo controllo (3 gg 6 mM) e la variazione diventa più accentuata dopo trattamento con glucosio 45 mM e 57 mM. La stessa analisi dopo 5 giorni di incubazione degli espianti ha indicato, invece, che non ci sono differenze nel grado di penetrazione di PI negli espianti coltivati in presenza di alto glucosio o di controllo. Lo spessore del bordo marcato si assesta sui valori simili per i trattamenti 6 mM, 25 mM e 45 mM, con un aumento significativo solo negli espianti trattati con glucosio 57 mM.

## 4.1.2. Espianti su inserti Millicell-CM

### 4.1.2.1. Coltura in terreno contenente HIHS



#### *Analisi dei livelli di espressione di GFAP in condizioni di alto glucosio*

È stata valutata l'attivazione gliale in espianti coltivati per 1 gg, 2 gg o 5 gg, su inserti Millicell-CM in terreno contenente HIHS, in presenza di concentrazioni di glucosio pari a 6 mM (controllo) o 45 mM (alto glucosio). L'espressione della GFAP, analizzata mediante immunistochemica in sezioni trasversali degli espianti, è utilizzata come indice di gliosi, associata a sofferenza tissutale. È stata osservata marcatura basale della GFAP, a livello del GCL, negli espianti coltivati per 1 gg. All'aumentare del tempo di incubazione, si assiste ad un progressivo aumento dell'espressione della GFAP, che, a 2 gg, interessa la metà prossimale dello spessore della retina, mentre, a 5 gg, coinvolge quasi tutto lo spessore della retina (Fig. 24).

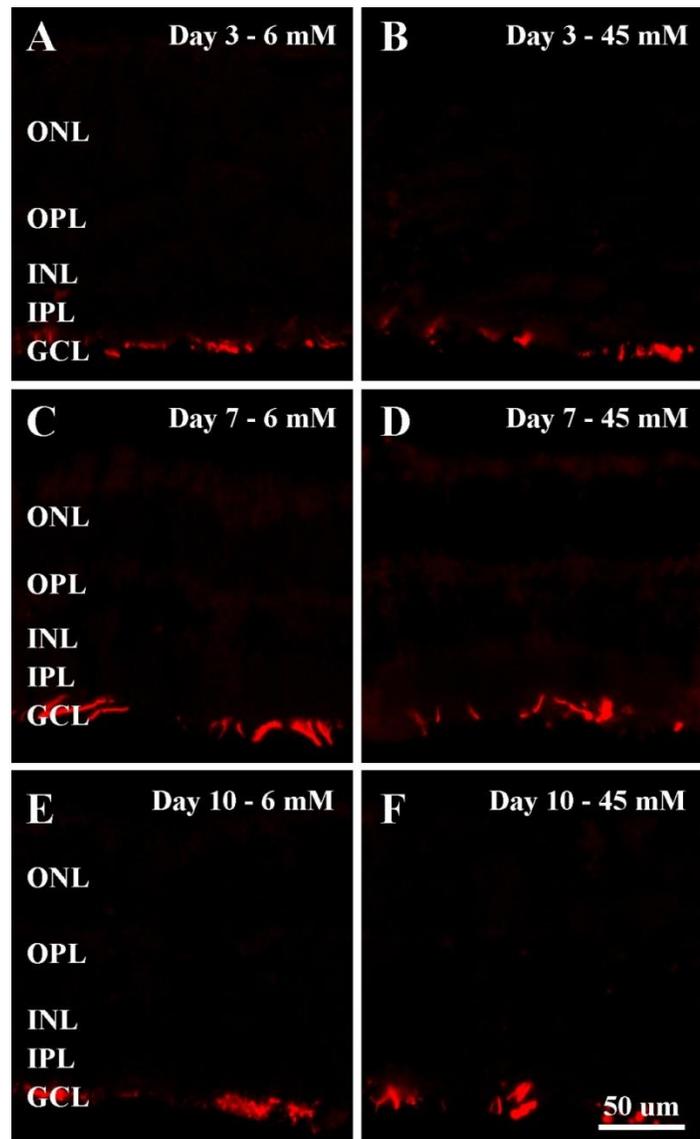
**Figura 24** Espressione della GFAP in espianti di retina coltivati in terreno contenente HIHS, in condizioni di controllo o in presenza di alto glucosio. Dopo un giorno di incubazione si rileva marcatura basale a livello del GCL (A e B). L'espressione aumenta progressivamente nei trattamenti di durata pari a 2 gg (C e D) o 5 gg (E e F), dove interessa tutta l'estensione dei processi delle cellule di Müller. Il trattamento con alto glucosio causa un effetto aggiuntivo che si evidenzia come incremento della densità dei processi marcati, a 2 gg, unita ad aumento dell'intensità della fluorescenza nel GCL, a 5 gg, rispetto ai relativi controlli. Per le abbreviazioni vedere "Abbreviazioni". Barra di calibrazione: 50 µm.

Si è notato che, sebbene l'incremento dell'espressione della GFAP sia stato rilevato, dopo 2 e 5 gg, anche nei controlli, l'incubazione con alto glucosio ha determinato un effetto aggiuntivo indicato dal maggior numero di processi cellulari marcati e dall'immunomarcatura più intensa a livello del GCL, negli espianti coltivati in alto glucosio.

#### 4.1.2.2. Coltura in terreno senza HIHS

##### *Analisi dei livelli di espressione di GFAP in condizioni di alto glucosio*

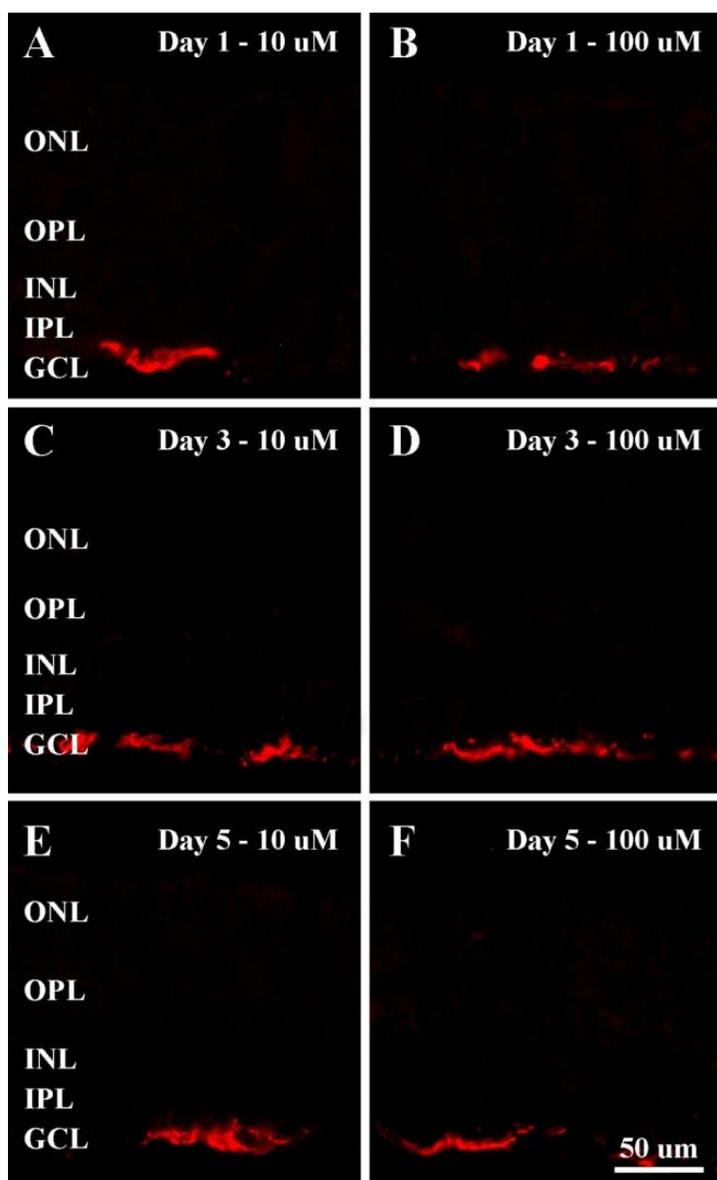
L'espressione della GFAP è stata valutata, secondo quanto descritto sopra, anche in espianti coltivati per 3, 7 o 10 gg in terreno privo di HIHS, in condizioni di controllo (6 mM) o in presenza di alto glucosio (45 mM). In tutte le condizioni sperimentali, la marcatura della GFAP è simile a quella basale, ovvero riguarda solo le terminazioni espanse delle cellule di Müller nel GCL. Non si osservano variazioni di immunolocalizzazione né tra i trattamenti (controllo e iperglicemico) né all'aumentare del tempo di incubazione che, in questa prova, è protratto fino a 10 gg (Fig. 25).



**Figura 25** Espressione della GFAP in espianti di retina coltivati in terreno privo di HIHS, in condizioni di controllo o in presenza di alto glucosio. Non si osservano variazioni nell'immunomarcatura né indotte dall'alto glucosio, né in funzione del tempo di coltura, pari a 3 gg (A e B), 7 gg (C e D) o 10 gg (E e F). Per le abbreviazioni vedere "Abbreviazioni". Barra di calibrazione: 50  $\mu$ m.

*Analisi dei livelli di espressione di GFAP in condizioni di stress ossidativo*

L'immunomarcatura della GFAP è stata analizzata in espianti di retina coltivati *ex vivo*, per 1, 3 o 5 gg, in terreno privo di siero, in condizioni in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentrazioni pari a 10 µM o 100 µM. L'espressione della GFAP si mantiene circoscritta alle terminazioni espanse delle cellule gliali nel GCL e non si osservano variazioni indotte nè dal trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> né dal tempo di incubazione (Fig. 26).



**Figura 26** Espressione della GFAP in espianti di retina coltivati in terreno privo di HIHS, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Non ci sono differenze nell'immunomarcatura né indotte dal trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> né in funzione del tempo di coltura, pari a 1 gg (A e B), 3 gg (C e D) o 5 gg (E e F). Per le abbreviazioni vedere "Abbreviazioni". Barra di calibrazione: 50 µm.

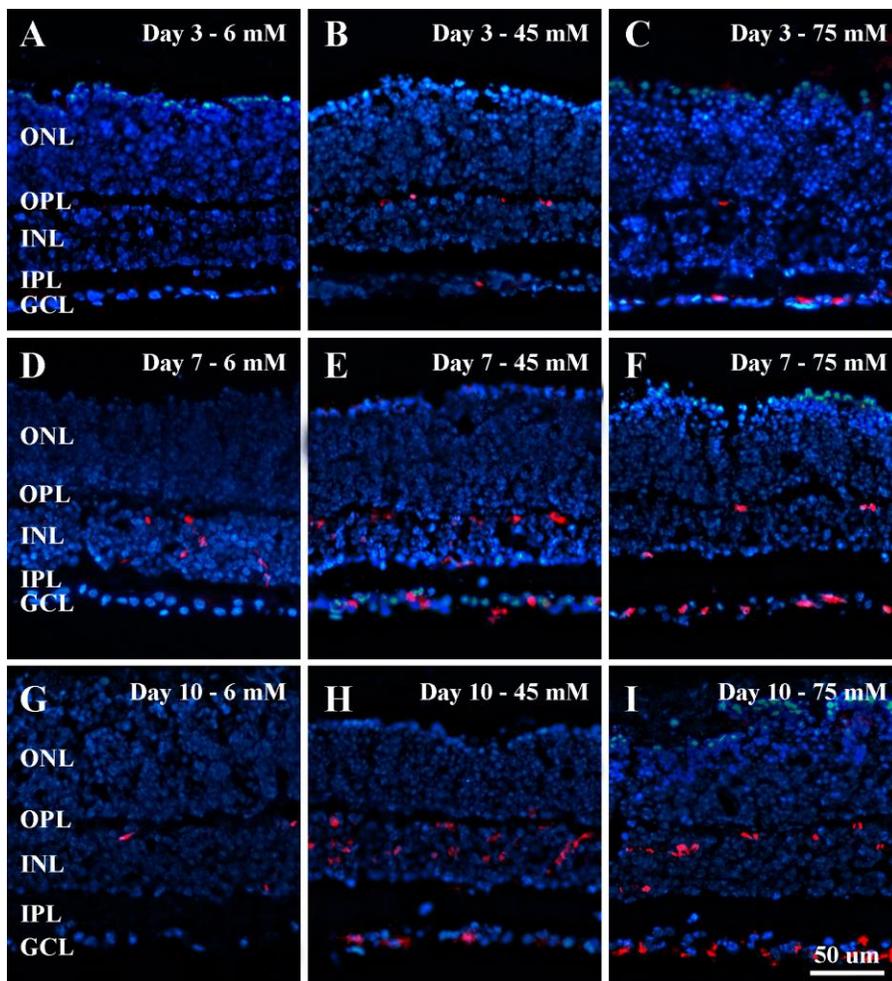
## 4.2. Morte cellulare e produzione/rilascio di VEGF

In questi esperimenti, gli espianti sono stati coltivati su supporti Millicel-CM in terreno privo di HIHS, dal momento che gli esperimenti descritti sopra hanno indicato queste condizioni come quelle in cui si ha un migliore mantenimento degli espianti in condizioni di controllo.

### 4.2.1. Modello “alto glucosio”

#### *Analisi dei livelli di espressione della caspasi 3 attiva tramite immunohistochimica*

Abbiamo analizzato le variazioni nell'espressione della caspasi 3 attiva, indicate dai cambiamenti nell'immunomarcatura per questo marker apoptotico, sia in funzione della concentrazione di glucosio nel mezzo (6 mM, 45 mM o 75 mM), sia della durata dell'incubazione (3, 7 o 10 gg)

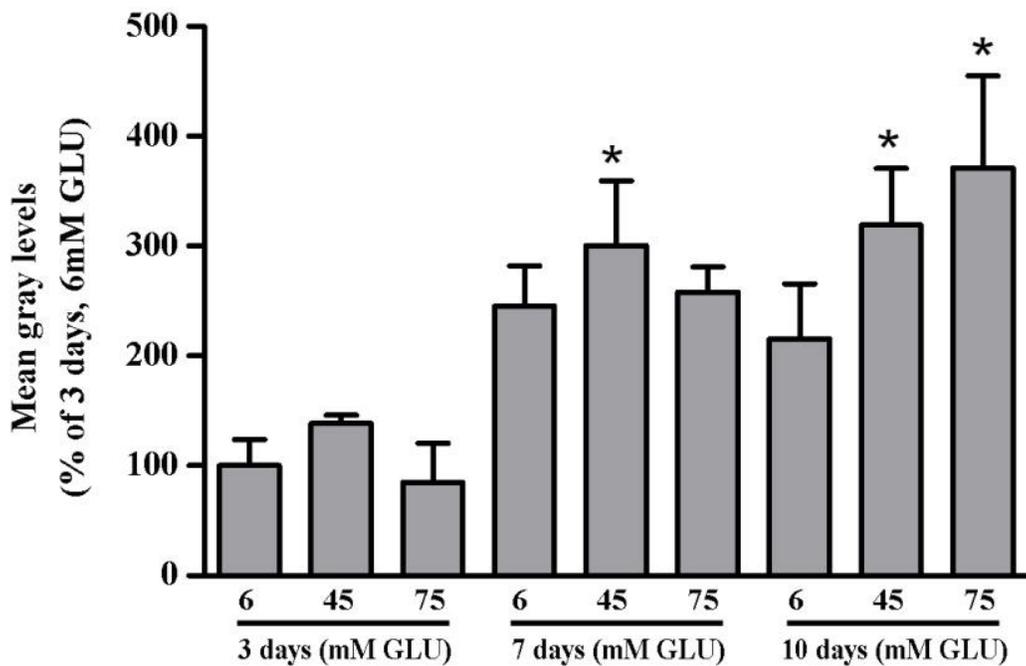


(Fig. 27).

#### **Figura27**

Immunomarcatura per la caspasi 3 attiva in espianti di retina coltivati per 3, 7 o 10 gg, in terreno privo di siero, in condizioni di controllo (A, D e G) o in due condizioni di alto glucosio, 45 mM (B, E e H) e 75 mM (C, F e I). L'alto glucosio è efficace nel produrre un aumento dell'espressione del marker apoptotico che si evidenzia massimamente dopo 10 gg. Per le abbreviazioni vedere “Abbreviazioni”. Barra di calibrazione: 50 µm.

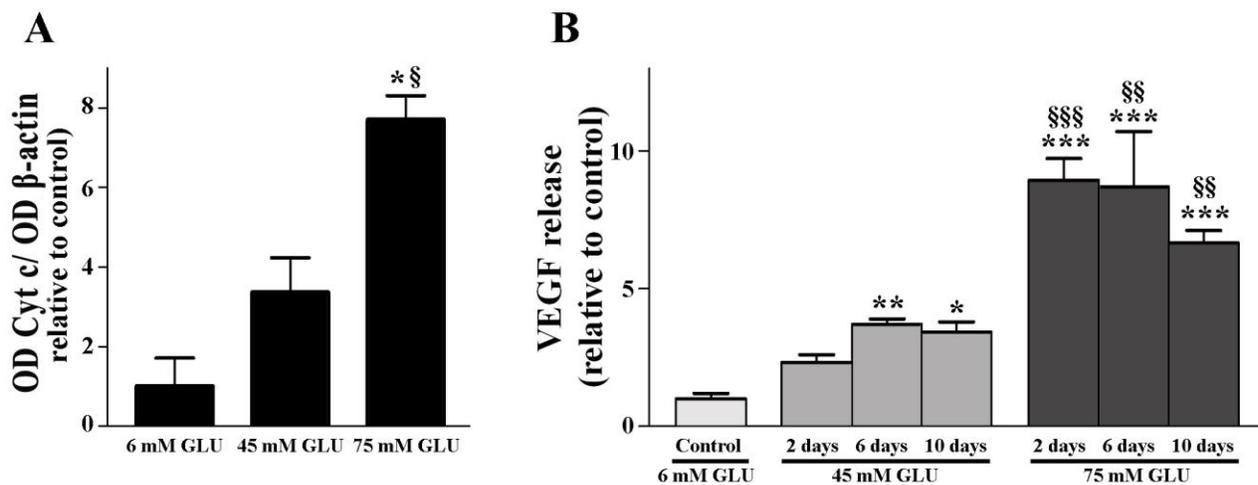
L'analisi dei livelli medi di grigio in immagini di sezioni immunomarcate per la caspasi 3 attiva ha confermato il quadro mostrato in figura 27. In particolare, in condizioni di controllo (6 mM), l'immunomarcatura per la caspasi 3 attiva è praticamente assente dopo 3 gg di coltura e molto scarsa dopo 7 gg o 10 gg. L'alto glucosio invece suscita un effetto che è già rilevabile in colture di 7 gg. Infatti, l'aumento delle cellule marcate per la caspasi 3 attiva negli espianti incubati con glucosio 45 mM è significativo a 7 e 10 gg di coltura, mentre l'effetto massimo è visibile dopo 10 gg di incubazione, dove si nota un trend di aumento progressivo al crescere della concentrazione di glucosio (Fig. 28).



**Figura 28** Analisi quantitativa dei livelli medi di grigio in immagini di sezioni retiniche immunomarcate per la caspasi 3 attiva derivanti da espianti incubati per 3, 7 o 10 gg in condizioni di controllo o in presenza di alto glucosio (45 mM o 75 mM). \* $p < 0.05$  (ANOVA) rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$ SEM;  $n = 3$ .

## Livelli di apoptosi e rilascio di VEGF

La misura dei livelli di citocromo c, effettuata mediante Western blot, è accettata come marker riconosciuto di apoptosi. Come mostrato in figura 29A, i livelli di citocromo c in espianti retinici coltivati per 10 gg in presenza di glucosio 45 mM sono risultati aumentati rispetto alla condizione di controllo (6 mM). L'incubazione con una più alta concentrazione di glucosio, pari a 75 mM, ha determinato un effetto ancora maggiore; la differenza nei livelli di citocromo c, nel trattamento 75 mM 10 gg rispetto sia al controllo, sia al 45 mM è significativa (Fig. 29A).



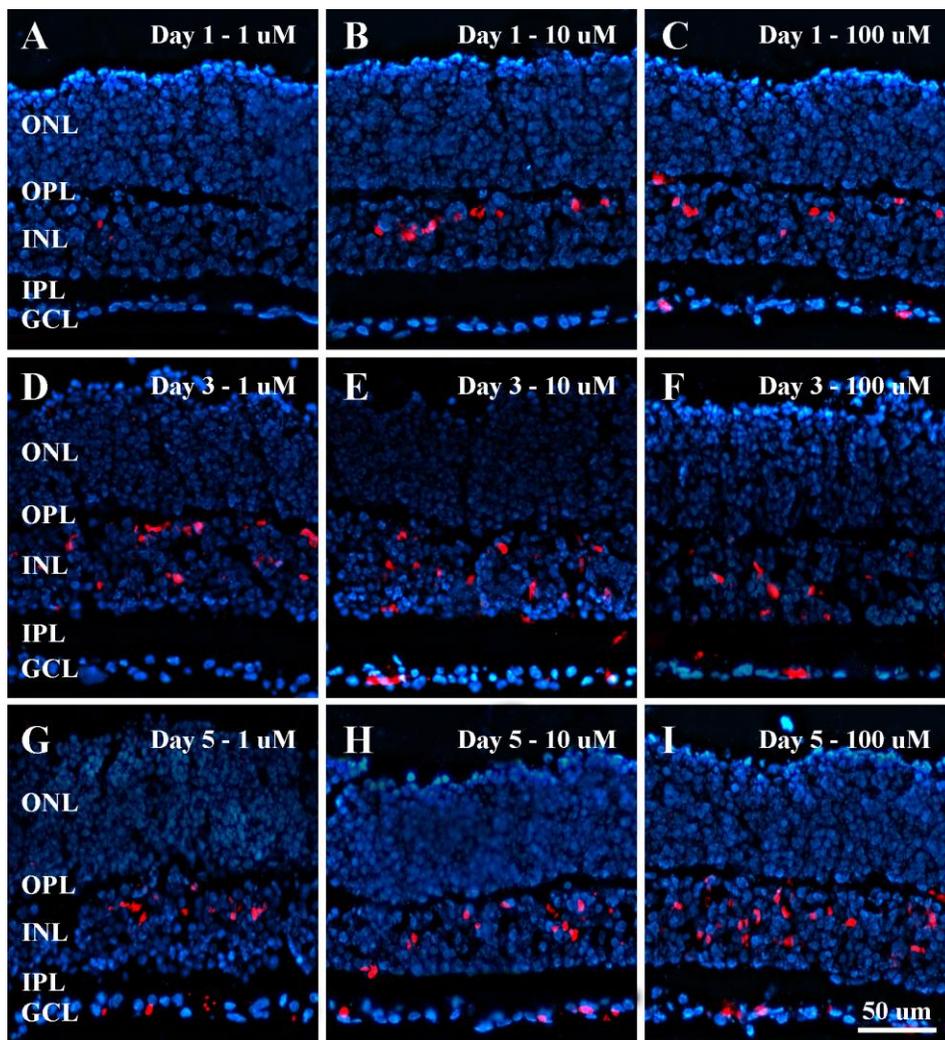
**Figura 29** (A) Analisi quantitativa dei livelli di citocromo c in espianti di retina incubati per 10 gg in condizioni di controllo o di alto glucosio (western blot). (B) Rilascio di VEGF nel terreno di coltura misurato con ELISA. Sia in A che in B, i valori sono espressi come percentuali dei valori di controllo (6mM GLU). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  rispetto al controllo (6 mM GLU); § $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$  rispetto al relativo 45 mM GLU. Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$  SEM.  $n = 3$ .

Le variazioni della quantità di citocromo c negli espianti correlano positivamente con il rilascio di VEGF da parte degli stessi. Infatti, come mostrato nella figura 29B, il dosaggio del VEGF, effettuato tramite ELISA nei terreni di coltura di espianti incubati per 2, 6 o 10 gg in presenza di glucosio pari a 6 mM (controllo), 45 mM o 75 mM (alto glucosio), ha mostrato un incremento progressivo dei livelli di VEGF in funzione dell'aumento della concentrazione di glucosio nel mezzo. In particolare, il trattamento con glucosio 45 mM per 6 o 10 gg ha indotto un aumento

significativo del rilascio di VEGF rispetto al controllo. Per quanto riguarda il massimo trattamento, glucosio 75 mM, l'incremento indotto nel rilascio di VEGF è stato ancora maggiore e la differenza è già significativa sia rispetto al controllo 6mM, sia rispetto al 45 mM, dopo 2 gg di trattamento. Risultati simili sono stati ottenuti anche dal confronto a 6 gg e a 10 gg.

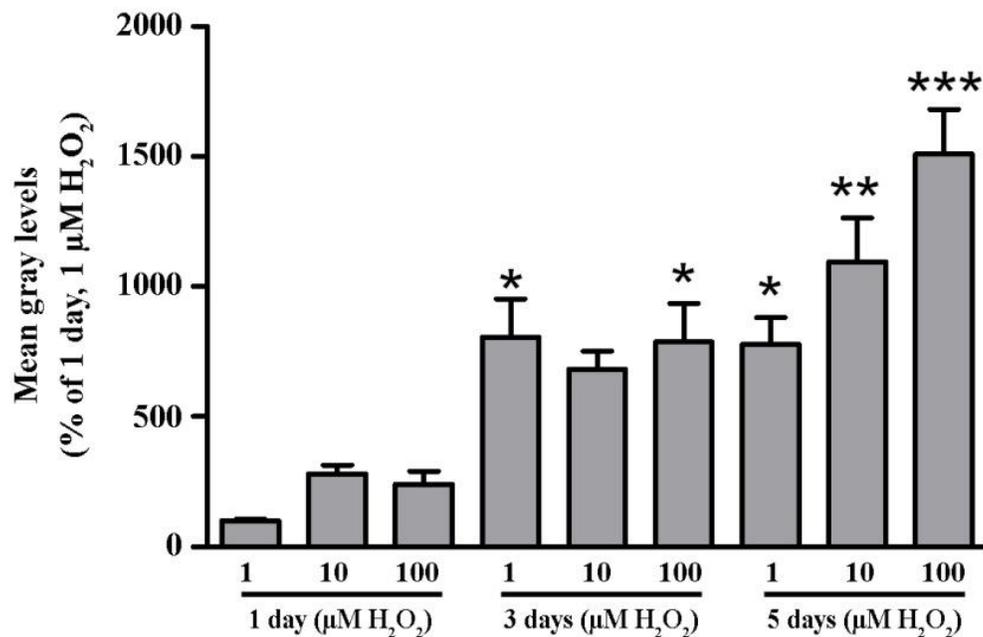
#### 4.2.2. Modello “stress ossidativo”

*Analisi dei livelli di espressione della caspasi 3 attiva tramite immunohistochimica*



**Figura 30** Immunomarcatura per la caspasi 3 attiva in espianti di retina coltivati per 1, 3 o 5 gg, in terreno privo di siero, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 μM (A, D e G), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM (B, E e H) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (C, F e I). Barra di calibrazione: 50 μm.

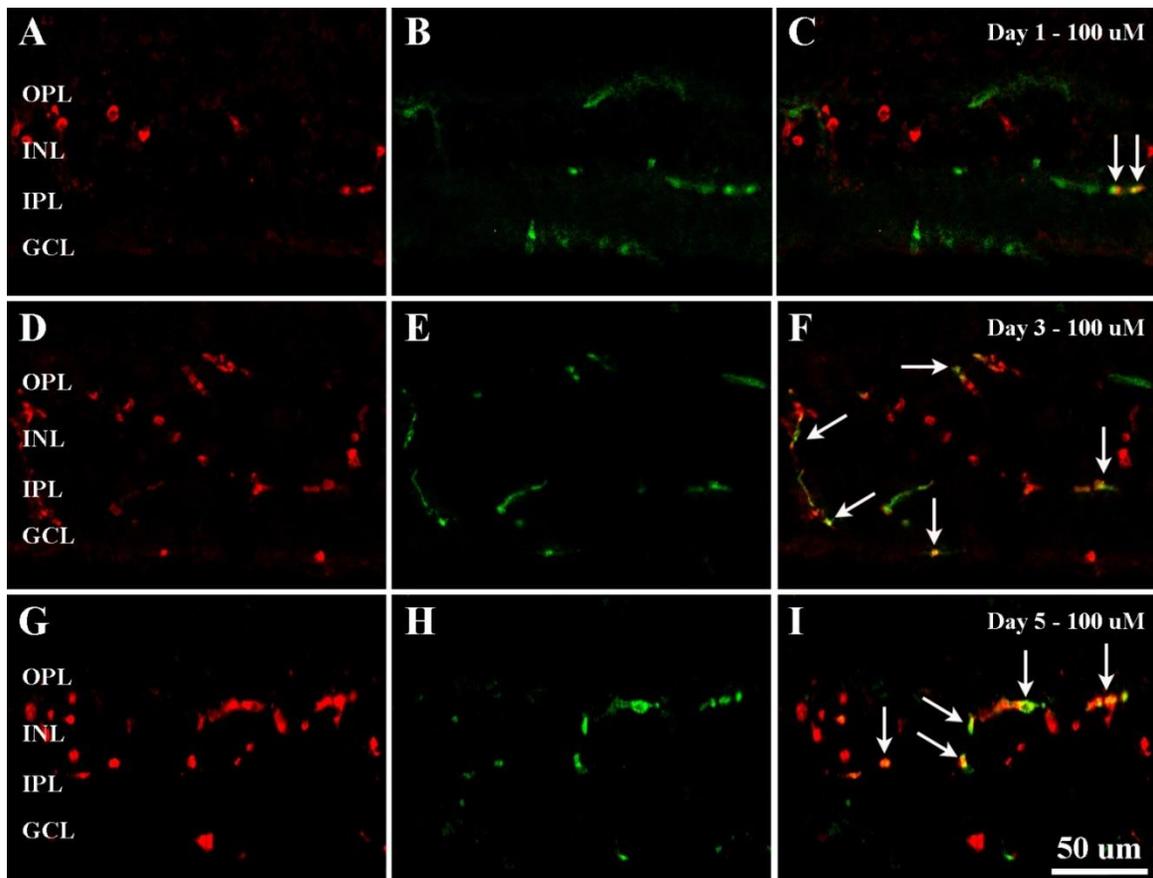
L'incubazione di espianti per 1, 3 o 5 gg in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha determinato un aumento dell'immunomarcatura della caspasi 3 attiva, rilevata su sezioni trasversali. Tale incremento è funzione sia dell'innalzamento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sia del protrarsi della coltura (Fig. 30). L'analisi dei livelli medi di grigio in immagini di sezioni immunomarcate per la caspasi 3 attiva ha confermato il quadro mostrato in figura 30. In particolare, dopo 1 gg di incubazione, l'immunomarcatura per la caspasi 3 attiva è risultata praticamente assente in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µM, mentre è stata rilevata all'aumentare delle concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 10 µM e 100 µM. La coltura protratta per 3 gg è stata associata ad un significativo aumento delle cellule marcate per la caspasi 3 attiva già con la minima concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µM), rispetto al trattamento 1 µM 1 gg. L'incubazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM o 100 µM non ha aggiunto ulteriore differenza e la marcatura è stata simile a quella degli espianti incubati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µM. Dopo 5 gg di coltura l'incremento dell'immunomarcatura per la caspasi 3 attiva è risultato più accentuato (Fig. 31).



**Figura 31** Analisi quantitativa dei livelli medi di grigio in immagini di sezioni retiniche immunomarcate per la caspasi 3 attiva derivanti da espianti incubati per 1, 3 o 5 gg in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µM, 10 µM o 100 µM. \*p< 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (ANOVA) rispetto a 1 gg, 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gli istogrammi rappresentano la media ±SEM; n= 3.

*Doppia immunomarcatura caspasi 3 attiva – CD31: valutazione dell'apoptosi nei vasi*

L'analisi della doppia immunomarcatura con caspasi 3 attiva e CD31, in sezioni di espianti incubati in terreno contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM, ha mostrato un aumento progressivo dell'interessamento delle cellule dei capillari retinici nei fenomeni apoptotici in corso, al crescere del tempo di incubazione (Fig. 32).

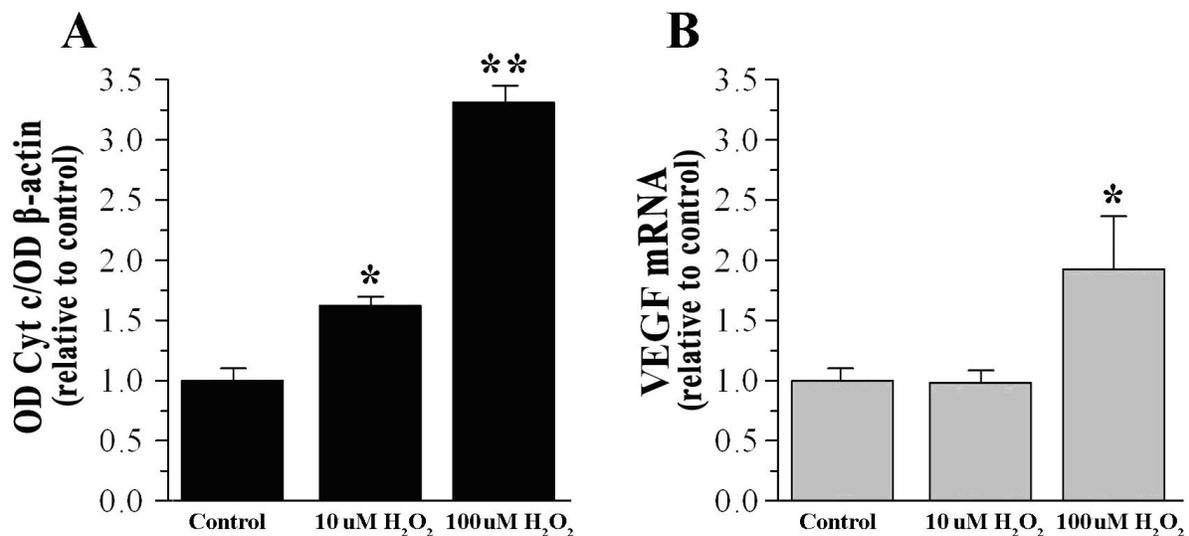


**Figura 32** Doppia immunomarcatura per caspasi 3 attiva e CD 31. Immagini di espianti incubati per 1, 3 o 5 gg con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM marcati per caspasi 3 attiva (A, D e G) e CD 31 (B, E e H). In C, F e I sono mostrate le sovrapposizioni delle immagini delle due immunomarcature per ciascuna condizione; le frecce indicano i punti in cui le marcature di caspasi 3 attiva e CD 31 si sovrappongono. Per le abbreviazioni vedere “Abbreviazioni”. Barra di calibrazione: 50 µm.

Nel dettaglio, dopo 1gg di incubazione in queste condizioni sperimentali si è osservata marcatura della caspasi 3 attiva in diversi elementi cellulari della retina; di questi, solo una piccola frazione è risultata marcata anche da CD31. A 3 gg, è aumentata l'entità della marcatura complessiva della caspasi 3 attiva ma, in particolare, è stato notato un considerevole incremento nel numero di elementi riconosciuti contemporaneamente da entrambi i marker immunostochimici adoperati. Lo stesso andamento è stato confermato e accentuato negli espianti coltivati per 5 gg, dove una frazione considerevole delle cellule marcate dalla caspasi 3 attiva è risultata immunomarcata anche per CD31.

*Valutazione della quantità di citocromo c relativa e confronto con i livelli di mRNA del VEGF*

I livelli di citocromo c, misurati tramite Western blot, in espianti incubati per 5 gg in condizioni di controllo (6 mM, no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM o di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM hanno mostrato un andamento progressivo di aumento della morte cellulare al crescere della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel mezzo di coltura degli espianti (Fig. 33A).

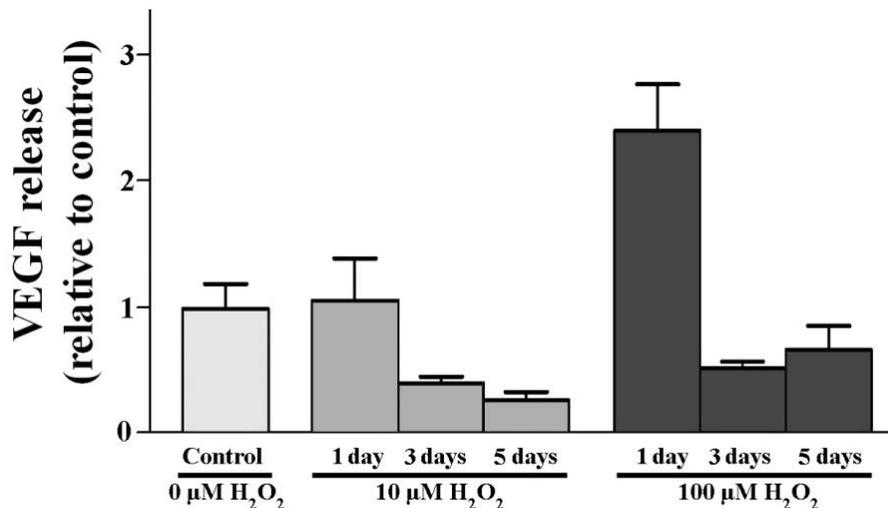


**Figura 33** (A) Analisi quantitativa dei livelli di citocromo c in espianti di retina incubati per 5 gg in condizioni di controllo o in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 o 100 µM (western blot). (B) Espressione dell'mRNA del VEGF misurato con RT-PCR. In entrambi i grafici i valori sono espressi come percentuali del controllo. \*p<0.05, \*\*p<0.01 rispetto al controllo. Gli istogrammi rappresentano la media ± SEM; n= 3.

In particolare, negli espianti trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM l'espressione di citocromo c è aumentata di circa il 50% e tale differenza è statisticamente significativa. Il massimo trattamento, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM, ha indotto un effetto ancora maggiore, dove la quantità di citocromo c è stata incrementata di circa 3 volte rispetto al controllo. L'espressione dell'mRNA del VEGF, analizzata negli stessi campioni tramite RT-PCR ha mostrato un andamento che correla positivamente con quello, appena descritto, del citocromo c, anche se sono presenti alcune variazioni (Fig. 33B). L'incubazione per 5 gg in terreno contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM non sembra aver indotto variazioni nell'espressione dell'mRNA del VEGF, rilevato a livelli praticamente identici rispetto al controllo non trattato. L'innalzamento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fino a 100 µM, ha comportato, invece, un aumento dei livelli dell'mRNA del VEGF pari a 2 volte quelli del controllo. Tale variazione è statisticamente significativa.

#### *Rilascio di VEGF*

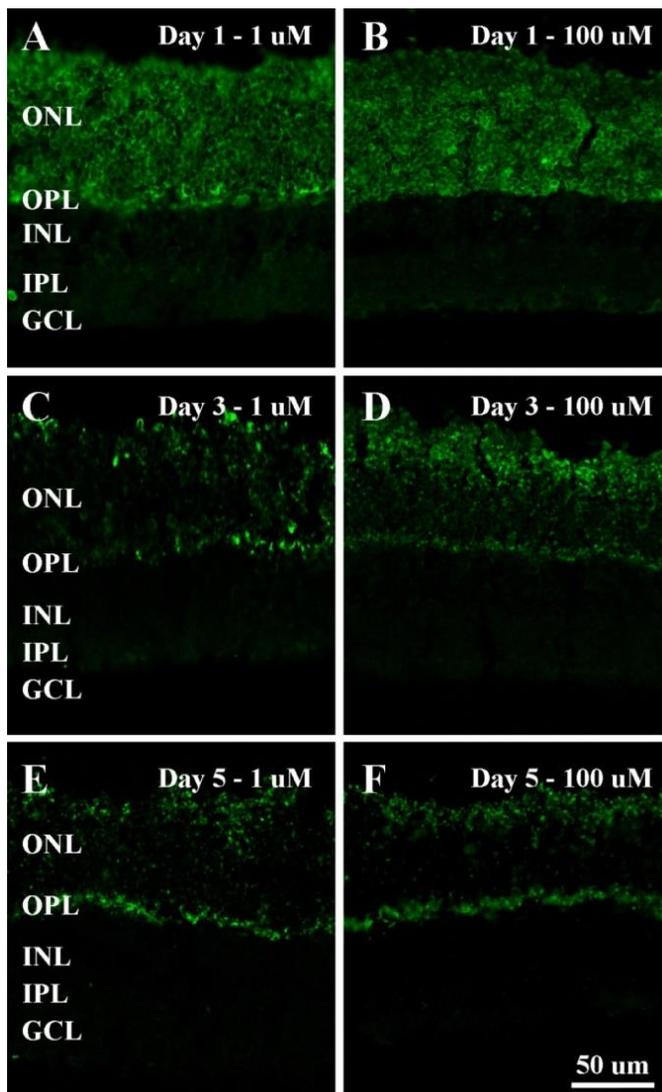
Sono stati misurati i livelli di VEGF nei terreni di coltura in cui erano stati incubati espianti, rispettivamente per 1, 3 o 5 gg, in condizioni di controllo o in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM o 100 µM (Fig. 34).



**Figura 34** Rilascio di VEGF nel terreno di coltura misurato con ELISA. Le differenze riscontrate non sono statisticamente significative a causa, probabilmente, dell'esiguo numero di campioni adoperati in ciascuna prova. Gli istogrammi rappresentano la media ± SEM; n=3.

Nei terreni relativi ai trattamenti di durata pari ad 1 gg, i livelli di VEGF non sono variati tra controllo e trattamento intermedio ( $H_2O_2$  10  $\mu M$ ) mentre sono aumentati, in maniera netta, seppure non significativa, nei terreni di espianti trattati con  $H_2O_2$  100  $\mu M$ . All'aumentare del tempo di incubazione, questo andamento non è stato più riscontrato; sia a 3 gg che a 5 gg, la quantità di VEGF nei terreni di espianti trattati con  $H_2O_2$  (sia 10  $\mu M$  che 100  $\mu M$ ) è risultata più bassa rispetto al controllo (1 gg, no  $H_2O_2$ ). Per entrambi i tempi di coltura, è stato notato un leggero aumento, non significativo, passando dal trattamento con  $H_2O_2$  10  $\mu M$  a quello con  $H_2O_2$  100  $\mu M$ .

#### *Analisi dell'immunomarcatura della recoverina*



La recoverina è un marcatore dei bastoncelli poiché si localizza nei soma di queste cellule. L'immunomarcatura tipica, in una sezione trasversale di retina è rappresentata dalla immunofluorescenza che interessa tutto lo spessore dell'ONL, creando uno strato densamente marcato, in maniera uniforme. Variazioni in questo dato possono essere dovute ad alterazioni nel numero di bastoncelli o ad una diminuzione intrinseca dell'espressione della recoverina stessa. La rilevazione immunoistochimica della Recoverina è stata effettuata in sezioni di espianti incubati per 1, 3 o 5 gg, in presenza di  $H_2O_2$  1  $\mu M$  o 100  $\mu M$  (Fig. 35).

**Figura35** Immunomarcatura della Recoverina in espianti di retina coltivati per 1, 3 o 5 gg, in presenza di  $H_2O_2$  1  $\mu M$  (A, C e E) o  $H_2O_2$  100  $\mu M$  (B, D e F). Barra di calibrazione: 50  $\mu m$ .

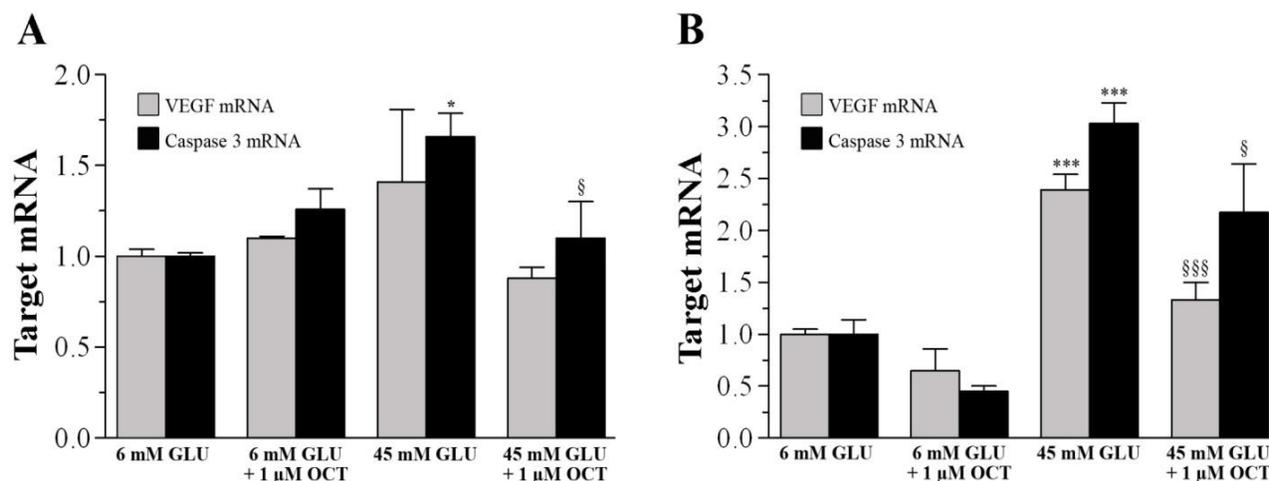
Da questa analisi è emerso che, in seguito al trattamento per 1 gg con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ad entrambe le concentrazioni, la localizzazione della recoverina è simile a quella osservabile in retine non trattate. All'aumentare della durata dell'incubazione fino a 3 gg, invece, è stata osservata una netta diminuzione della fluorescenza, già nel trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µM. Non è stato evidenziato più uno strato interamente marcato, coincidente con l'ONL, bensì una marcatura molto meno diffusa che, in generale, si è presentata circoscritta a due "bande" alle estremità distale e prossimale dell'ONL. Un quadro simile è stato osservato anche dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM. L'analisi su espianti coltivati per 5 gg ha mostrato un risultato simile, anche se si è potuta individuare una ulteriore riduzione dell'immunofluorescenza rispetto agli espianti incubati per 3 gg. Dopo 5 gg, la marcatura è risultata circoscritta unicamente alle due bande di cui detto in precedenza, che sono diventate molto sottili, senza differenze apparenti tra i due trattamenti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4.3. Effetti della neuroprotezione**

#### 4.3.1. Modello "alto glucosio"

*Analisi dei livelli di espressione di mRNA per caspasi 3 e VEGF in espianti trattati con OCT*

L'espressione dell'mRNA del VEGF e della caspasi 3 è stata valutata in espianti retinici coltivati in condizioni di controllo o in presenza di alto glucosio (45 mM) e trattati con OCT, al fine di analizzare l'effetto della neuroprotezione ottenuta mediante la somministrazione di quest'ultima. Espianti di retina incubati con alto glucosio per 2 gg (Fig. 36A) hanno mostrato una tendenza all'aumento dell'espressione del VEGF, sebbene non significativa. Tale tendenza è stata inibita dalla somministrazione di OCT 1 µM. Allo stesso tempo, è stato osservato un significativo incremento dell'espressione della caspasi 3 negli espianti trattati con alto glucosio; questo incremento è stato inibito significativamente dalla somministrazione di OCT 1 µM. Dopo 6 gg di incubazione (Fig. 36B), i livelli dell'mRNA, sia del VEGF che della caspasi 3, sono stati fortemente aumentati negli espianti coltivati con glucosio 45 mM ed entrambi gli incrementi sono risultati significativamente contrastati dall'applicazione di OCT 1 µM.

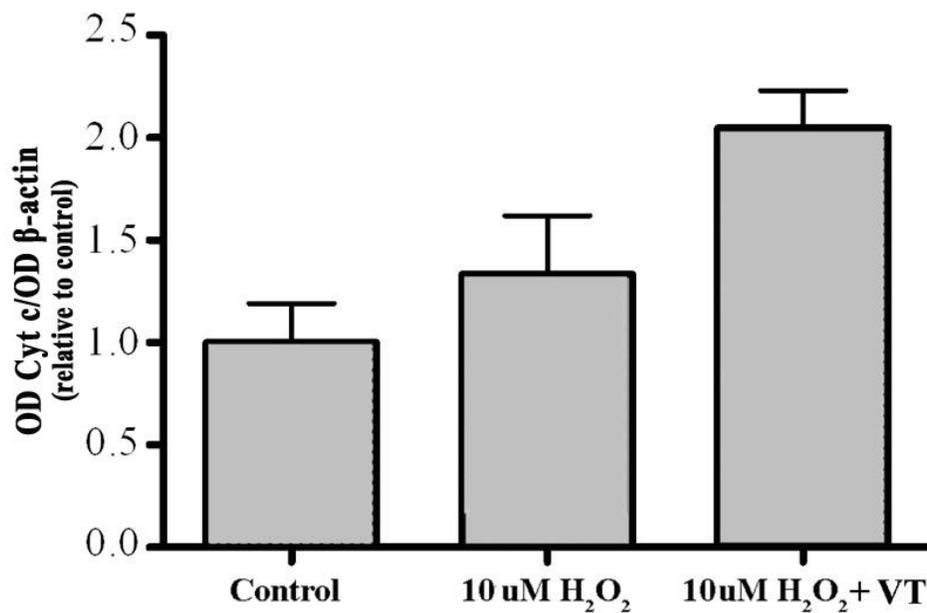


**Figura 36** Effetto della neuroprotezione ottenuta con OCT 1 μM sui livelli dell'mRNA della caspasi 3 (marker di morte cellulare per apoptosi) e dell'mRNA del VEGF dopo 2 gg (A) e 6 gg (B) di incubazione con alto glucosio. p\* p<0.05, p\*\*\* p<0.001 (ANOVA) rispetto al controllo (6 mM GLU); § p<0.05, §§§ p<0.001 rispetto a 45 mM GLU. Gli istogrammi rappresentano la media ± SEM; n=3.

#### 4.3.2. Modello “stress ossidativo”

*Valutazione della quantità relativa di citocromo c in espianti incubati in presenza di VEGF-trap e di controllo*

È stato analizzato l'andamento dei livelli di citocromo c, misurati tramite Western blot, in espianti coltivati in condizioni di controllo (6 mM, no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM ed è stato valutato l'effetto, in quest'ultima condizione, della somministrazione di una VEGF-trap (Fig.37). Come già riportato in precedenza, il trattamento, per 5 gg, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM ha indotto un aumento dei livelli di citocromo c di circa il 50%. La somministrazione VEGF-trap ad espianti incubati in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM, ha determinato un ulteriore incremento dell'espressione di citocromo c. Tali differenze non hanno raggiunto la significatività, a causa probabilmente dell'esiguo numero di campioni utilizzati, ma l'andamento appare evidente.



**Figura 37** Effetto della VEGF-trap sull'apoptosi indotta dall'incubazione per 5 gg in presenza di  $H_2O_2$  10  $\mu$ M e analizzata tramite western blot per il citocromo c. VT, VEGF-trap. Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$  SEM; n=3.

## 5. Discussione

Nel lavoro sperimentale illustrato, è stata descritta la messa a punto di un modello *ex vivo* in condizioni iperglicemiche o di stress ossidativo, nella retina di topo, con l'obiettivo di adoperare tale sistema per indagare la possibilità della neuroprotezione come strategia terapeutica nel trattamento della DR. È noto che l'iperglicemia è il fattore iniziale scatenante la patogenesi della DR, poiché l'esposizione della retina a concentrazioni di glucosio superiori a quelle fisiologiche costituisce uno stimolo necessario e sufficiente ad innescare le risposte cellulari tipiche della malattia. Di conseguenza, un modello *ex vivo* in cui espianti organotipici sono incubati in presenza di alto glucosio offre una piattaforma per indagare, a livello di ricerca di base, gli eventi che contraddistinguono le fasi iniziali della DR.

### 5.1. Definizione e validazione del modello sperimentale *ex vivo*

Il punto di partenza delle indagini svolte è stato rappresentato dalla scelta dell'approccio sperimentale e dalla successiva definizione e validazione del modello.

In generale, l'utilizzo di un modello *ex vivo* è sostenuto da alcune considerazioni; per prima cosa esso si configura come un anello di congiunzione ideale tra sistemi *in vitro* ed *in vivo* poiché è in grado di mediare i vantaggi e le criticità di ciascuno di essi (Zhang et al., 2002). Infatti, il modello *in vitro* è limitato nel punto in cui offre la possibilità di indagare un processo solo isolatamente nel singolo elemento cellulare; quello *in vivo*, invece, è vincolato alla complessità tipica dell'organismo considerato nell'insieme che rende spesso difficile l'interpretazione dei risultati, quantomeno nell'ottica di una ricerca di base.

La coltura organotipica *ex vivo* consente di analizzare un fenomeno nell'ambito della retina espiantata e coltivata fuori dall'organismo, eludendo la complessità di quest'ultimo ma, allo stesso tempo, mantenendo integre le interazioni alla base del funzionamento dell'organo (Johnson and Martin, 2008). Inoltre, a differenza di altri tessuti per i quali la coltura organotipica richiede la realizzazione di "fettine", la struttura sottile della retina permette l'incubazione dell'organo intatto. Recentemente diversi studi hanno utilizzato questa metodica rivolgendo, per

prima cosa, l'attenzione alla validazione del sistema. È stato dimostrato che la retina in coltura preserva l'organizzazione classica degli strati retinici e l'architettura nel complesso, per diverse settimane (Caffe et al., 1989, Caffe et al., 2001, Johnson and Martin, 2008). Inoltre, lo sviluppo dei vari tipi neuronali avviene come nella controparte *in vivo* e, allo stesso tempo, anche il processo di formazione della rete vascolare nella retina espiantata da topi neonati mima fedelmente quanto accade nell'animale vivente (Curatola et al., 2005). In aggiunta, in prospettiva dell'impiego di modelli *ex vivo* nello studio dei processi patologici della retina, è stato mostrato che i fenomeni degenerativi in coltura hanno luogo in una maniera comparabile, per modalità e tempi, a quanto accade nell'occhio *in vivo* (Caffè et al., 2001).

Basandosi sull'insieme di queste evidenze preliminari, i modelli *ex vivo* di retina sono stati impiegati, ad esempio, per studiare lo sviluppo e il differenziamento della retina in diverse condizioni (Caffe et al., 1993, Feigenspan et al., 1993, Rowe-Rendleman et al., 1996, Germer et al., 1997, Engelsberg et al., 2004, Pinzon-Duarte et al., 2004, Zelina et al., 2005, Beier et al., 2006), per indagare i processi patologici alla base di malattie neurodegenerative (Ogilvie et al., 1999, Ogilvie et al., 2000, Katsuki et al., 2004, Pinzon-Duarte et al., 2004, Cossenza et al., 2006, Hartani et al., 2006, Xin et al., 2007, Liljekvist-Soltic et al., 2008), per esaminare il ruolo di diversi fattori di crescita (Curatola et al., 2005, Delyfer et al., 2005, Franke et al., 2006, Murakami et al., 2006, Rezzola et al., 2013) e per testare sostanze ad azione terapeutica (Katsuki et al., 2004, Cossenza et al., 2006, DeNiro et al., 2009, Unoki et al., 2010). In quest'ottica e nell'ambito specifico delle tematiche trattate nel presente lavoro si può far riferimento all'utilizzo di un modello di ischemia retinica *ex vivo* attraverso il quale è stato dimostrato il ruolo di OCT nell'inibire la produzione ed il rilascio di VEGF da parte della retina e, di conseguenza, limitare lo stimolo pro-angiogenico indotto dall'ipossia (Mei et al., 2012). In generale, l'insieme dei lavori citati indicano che la ricerca rivolta a molti degli aspetti connessi allo sviluppo, alla fisiologia e alla patologia retinica ha tratto vantaggio dall'introduzione dell'analisi *ex vivo* (Zhang et al., 2002, Kaempf et al., 2008).

Tuttavia, nonostante la coltura organotipica *ex vivo* di retina sia un valido approccio, ad oggi sono riportati solo pochi casi in letteratura in cui tali metodologie sperimentali sono adoperate per lo studio di fenomeni connessi alla DR. Tra i lavori realizzati, la maggior parte sono indirizzati all'analisi degli effetti dell'alto glucosio per ciò che riguarda la stimolazione dello "sprouting" vascolare (Aranda et al., 2012); sono stati studiati anche l'induzione mediata dall'iperglicemia di molecole facenti parte dei sistemi antiossidanti della cellula, compreso il meccanismo attraverso

cui ciò avviene (He et al., 2013), e l'effetto dell'alto glucosio sulla rigenerazione dei neuriti in coltura (Oshitari et al., 2010).

Il lavoro di tesi svolto si è basato su questi presupposti e si è posto l'obiettivo di estendere l'utilizzo di tale sistema all'indagine di aspetti ulteriori nell'ambito degli effetti dell'iperglicemia sulla retina, in primo luogo l'apoptosi e la risposta associata al VEGF, con l'obiettivo di dimostrare la correlazione tra di esse.

Per prima cosa, un modello *ex vivo* che sia efficiente deve offrire un sistema di coltura in cui gli espanti, in assenza di trattamenti, si mantengano in uno stato ideale e siano preservate le caratteristiche sia biochimiche che strutturali (Caffè et al., 2001). Nelle prove eseguite questo obiettivo è stato assolto tramite impiego, in esperimenti successivi, di due sistemi di coltura diversi, al fine di incrementare la sopravvivenza e la qualità degli espanti. È noto che le due variabili da cui spesso dipende l'esito dell'incubazione sono rappresentate dal tipo di supporto tissutale e dalla composizione del mezzo di coltura (Zhang et al., 2002).

La coltura su vetrini poli-lisinati, primo approccio sperimentale adoperato, è ampiamente diffusa per colture cellulari poiché il trattamento con poli-lisina favorisce l'adesione delle cellule al substrato (Freshney, 2010). In letteratura sono descritti pochi casi di impiego della poli-lisina nella coltura di espanti *ex vivo*. Questi, però, riportano esiti positivi per ciò che concerne il mantenimento del tessuto in coltura, come indicato dalla preservazione della struttura retinica e delle caratteristiche neurochimiche e morfologiche delle diverse popolazioni neuronali (Xin et al., 2007).

Nell'ambito del lavoro svolto, la coltura di frammenti su vetrini poli-lisinati ha fornito alcuni risultati preliminari interessanti; l'analisi della morte cellulare, basata sull'assorbimento di PI, ha indicato l'esistenza di una relazione tra aumento della concentrazione di glucosio nel terreno di coltura e riduzione della vitalità degli espanti. Il principio su cui si basa l'utilizzo di tale tecnica è dato dal fatto che PI è un intercalante del DNA, che si lega in maniera stechiometrica all'acido nucleico ed emette fluorescenza nel rosso. Solo le cellule morte, in cui il colorante ha accesso all'interno della cellula, risultano marcate per cui è possibile utilizzare l'intensità della fluorescenza emessa come indice del grado di morte cellulare in ciascun frammento. In letteratura è ampiamente descritto l'utilizzo di questo sistema per la rilevazione di apoptosi in colture cellulari; sono riportati anche alcuni casi in cui esso è adoperato per saggiare la vitalità di espanti in colture tissutali (Echevarria et al., 2001, Bauer et al., 2006, Johnson and Martin, 2008, Runge et al., 2012).

I risultati ottenuti indicano che l'alto glucosio, anche negli espianti *ex vivo*, è efficace nel procurare un danno alla retina che si esplica come diminuzione della vitalità.

Tuttavia, la coltura di espianti retinici su vetrini polilisinati si è rivelato un sistema il cui utilizzo è fortemente limitato dalla scarsa resistenza dei frammenti incubati, in tali condizioni sperimentali, che si è visto non essere superiore a 3 giorni. Dopo tale tempo, infatti, subentrano alterazioni nella struttura e nella morfologia retinica, associate a degenerazione del tessuto.

Per sopperire a questo deficit, i vetrini poli-lisinati sono stati sostituiti con inserti microporosi (Millicell-CM). I frammenti di retina sono adagiati su una membrana e si trovano all'interfaccia con l'aria ma, allo stesso tempo, sono a contatto con il terreno sia inferiormente che superiormente; tale situazione garantisce un migliore scambio tra tessuto e mezzo nutritivo. L'adozione di questo supporto di coltura è suggerito anche dalla letteratura, in cui, molti dei lavori che trattano della realizzazione di espianti *ex vivo* di retina, a scopi vari, indicano questo come il sistema preferenziale per ottimizzare, prima di tutto, il mantenimento del tessuto (Eichler et al., 2001, Johnson and Martin, 2008, He et al., 2013).

La modifica descritta, unita all'adozione di un terreno di coltura con formulazione più completa (comprendente MEM, soluzione salina Hanks, l-glutamina, Amfotericina B e penicillina/streptomina) che, in principio, prevedeva anche una percentuale di siero, ha apportato un primo miglioramento alla qualità degli espianti in coltura, evitando la degenerazione molto precoce. Tuttavia è stato mostrato il perpetuarsi di segni di sofferenza tissutale dovuta alla coltura e indicati dall'aumento dell'espressione della GFAP, anche in condizioni di controllo. È noto, infatti che il livello di espressione della GFAP è un indice per rilevare la presenza o meno di attivazione gliale che si realizza nel momento in cui cellule di Müller e astrociti rispondono alla presenza di insulti nocivi (Middeldorp and Hol, 2011, Bringmann and Wiedemann, 2012, Hol and Pekny, 2015). La reazione della glia è connessa ad alterazione dell'omeostasi e della sopravvivenza del tessuto.

La rilevazione di uno stato di sofferenza anche in condizioni di controllo non permette di mettere in luce chiaramente l'effetto, comunque presente, dovuto al trattamento iperglicemico. Tale sistema, quindi, si è rivelato non essere adatto all'impiego nelle successive valutazioni.

Diverso risultato è stato, invece, ottenuto mediante rimozione del siero dalla formula del terreno. Abbiamo mostrato che espianti retinici incubati in assenza di siero si preservano vitali e non mostrano segni di sofferenza fino a 10 gg di incubazione; il dato è emerso ancora dall'analisi dell'espressione della GFAP. Qui, la marcatura di questa proteina tipica delle cellule di Müller e

degli astrociti è confinata alle loro terminazioni espanse a livello del GCL ed è in linea con quella che in letteratura è riportata come la situazione basale in assenza di fattori che inducano gliosi (Bringmann et al., 2006). Del resto, l'adozione di un mezzo di coltura privo di siero per la realizzazione di colture retiniche, *in vitro* ed *ex vivo*, è descritta in diversi casi in letteratura (Caffe et al., 2001, Zhang et al., 2002, Johnson and Martin, 2008); è stato riportato che l'incubazione in terreno contenente siero ha un effetto stimolante l'attivazione gliale e, allo stesso tempo, accelera la degenerazione delle cellule neuronali. In assenza di siero, invece, è incrementata la sopravvivenza dei neuroni in coltura (Brewer, 1997, Zhang et al., 2002, Harrill et al., 2015). Inoltre, un aspetto ulteriore a sostegno della rimozione del siero dalla composizione del terreno è rappresentato dal fatto che questo, essendo una miscela di un numero imprecisato di componenti (proteine, polipeptidi, lipidi e altre molecole organiche e inorganiche) presenti in quantità non sempre identiche, può introdurre una variabilità che ostacola l'analisi dei risultati dell'esperimento svolto (Caffè et al., 2001).

In definitiva, attraverso la serie di prove e di modifiche descritte è stato impostato un sistema di coltura organotipica che costituisce una piattaforma valida per lo studio dei fenomeni implicati nella DR. Il trattamento con alto glucosio o con  $H_2O_2$  permette di riprodurre il danno iniziale associato alla malattia; nel contesto della retina isolata, così come *in vivo*, esso si manifesta, in particolar modo, come aumento della morte cellulare per apoptosi e incremento dell'espressione/produzione e rilascio di VEGF (Qaum et al., 2001, Kern and Barber, 2008, Barber et al., 2011, Gaspar et al., 2013). Come detto sopra, l'associazione tra alto glucosio e diminuzione di vitalità degli espianti è emersa già dalla prova preliminare eseguita sui vetrini poli-lisinati ed è stata ulteriormente suggerita dall'aumento indotto dall'alto glucosio dell'espressione della GFAP, in presenza di siero. Di seguito, il lavoro svolto ha avuto l'obiettivo di confermare quanto visto in queste prime prove, realizzate nell'ambito della validazione del modello, e di mostrare la correlazione tra morte cellulare ed espressione/produzione o rilascio di VEGF, al fine di sostenere l'ipotesi per cui esisterebbe uno stretto legame causale tra eventi che riguardano i neuroni (apoptosi) e i successivi cambiamenti nei vasi (indicati dall'aumento del VEGF).

## 5.2. Relazione tra morte cellulare ed espressione/ rilascio di VEGF

### 5.2.1. L'alto glucosio e lo stress ossidativo promuovono l'apoptosi negli espianti retinici *ex vivo*

L'iperglicemia, tramite l'attivazione delle vie biochimiche descritte sopra (vedi paragrafo 1.2.2. Patogenesi della DR) è in grado di innescare le segnalazioni cellulari che conducono alla apoptosi sia di cellule dei vasi sia, in particolar modo, di neuroni retinici (Martin et al., 2004, Santiago et al., 2007, Kern and Barber, 2008, Barber et al., 2011, Gaspar et al., 2013, Jindal, 2014).

Nel presente studio, abbiamo dimostrato che l'incubazione di espianti di retina in un mezzo contenente alto glucosio determina un precoce aumento della morte cellulare per apoptosi, rispetto al controllo, indicato dall'analisi dei livelli di citocromo c, noto marker della via intrinseca di morte programmata. Il dato è stato confermato dall'immunolocalizzazione della forma attiva della caspasi 3, ovvero la proteasi esecutrice crocevia delle vie apoptotiche, su sezioni dei frammenti. L'utilizzo della rilevazione della caspasi 3 come indicatore di processo apoptotico in corso è ampiamente riportato in letteratura, compreso nell'analisi della morte di cellule retiniche indotta dal diabete (Martin et al., 2004, Barber et al., 2005, Oshitari et al., 2008, Yang et al., 2013).

A tal proposito, quanto visto è in linea con i dati citati; il trattamento con alto glucosio determina un aumento del numero di elementi cellulari in cui la caspasi 3 è rilevata, rispetto al controllo, e l'andamento riscontrato è emerso essere in funzione sia dell'incremento della concentrazione di glucosio nel mezzo, sia della durata dell'incubazione. Il massimo effetto è riportato dopo 10 gg di trattamento alla più alta concentrazione di glucosio saggiata (75 mM), suggerendo che, anche nel modello *ex vivo*, il danno indotto dall'iperglicemia è aggravato dalla persistenza dell'insulto nocivo a carico delle cellule retiniche. Del resto il diabete è una malattia cronica e le ripercussioni sui vari organi, quali l'insorgenza della DR, spesso richiedono tempi piuttosto lunghi per manifestarsi.

Nell'induzione dell'apoptosi nella DR è noto il ruolo particolarmente rilevante dello stress ossidativo e dell'incremento della produzione di AGE, associati ad effetto letale in molti tipi cellulari della retina, in particolar modo nei neuroni (Lecleire-Collet et al., 2005, Kassab and Piwowar, 2012). A conferma di questa evenienza, si è dimostrato sperimentalmente che la

risposta determinata dall'incubazione di espianti retinici *ex vivo* in presenza di concentrazioni crescenti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presenta un andamento, in termini di morte cellulare per apoptosi, paragonabile a quello visto con l'esposizione a concentrazioni crescenti di glucosio. L'utilizzo dell'esposizione a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è accettato come sistema per mimare sperimentalmente una condizione di stress ossidativo, anche nella retina, ed è riportato in diversi casi in letteratura (Koriyama et al., 2009, Zhou et al., 2014, Chen et al., 2015). Inoltre è stato dimostrato che i livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nello specifico, sono aumentati nella retina diabetica (Gough and Cotter, 2011, Kassab and Piwowar, 2012). Il trattamento di espianti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> costituisce, quindi, un sistema per isolare un aspetto cruciale nella patogenesi della DR, ovvero l'aumento dello stress ossidativo, ed indagarlo in maniera più diretta.

Per quanto riguarda la comprensione dei dettagli del processo delineato, è noto che la morte cellulare neuronale è un evento che precede, temporalmente, l'apoptosi degli elementi vascolari e, inoltre, assume proporzioni più ampie, posto il fatto che il tessuto nervoso costituisce il 95% della retina e che i neuroni sono particolarmente sensibili all'apoptosi indotta dall'insulto iperglicemico (Barber et al., 2011). Le prove eseguite vanno a supporto di questa teoria e indicano che, nel modello proposto, la morte cellulare programmata indotta dallo stress ossidativo interessa per prime cellule non vascolari, in maggioranza, quindi, presumibilmente, appartenenti alla componente nervosa della retina. Questo dato è emerso dall'analisi di una doppia-marcatura immunofluorescente di sezioni dei frammenti trattati, utilizzando un marker di cellule endoteliali, CD31, contemporaneamente alla caspasi 3 attiva. Il perpetuarsi del trattamento incrementa progressivamente l'entità totale del fenomeno apoptotico e, allo stesso tempo, induce anche un aumento nell'interessamento dei vasi, seppure sono ancora rilevati diversi elementi marcati dalla caspasi 3 oltre quelli indicati anche da CD31.

Per confermare che la componente nervosa della retina è danneggiata direttamente dalle risposte indotte dallo stress ossidativo, e che questo è un evento precoce, è stata valutata l'espressione della recoverina, marcatore dei fotorecettori, nello specifico dei bastoncelli, tramite immunistoichimica. Infatti, in situazioni normali questa proteina è presente a livello dei corpi cellulari di queste cellule e l'immunomarcatura tipica è rappresentata da uno spesso strato fluorescente che coincide con l'ONL. È stato visto che il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce un effetto, in termini di riduzione della marcatura, dipendente dal protrarsi della permanenza degli espianti in condizioni ossidanti piuttosto che dall'aumento delle concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; è probabile che, trascorsi 3 gg, anche l'effetto cumulato del trattamento più blando sia stato sufficiente a

determinare un danno ai fotorecettori, che si ripercuote sul “metabolismo” della recoverina. Le variazioni individuate potrebbero essere imputate a diminuzione del numero di cellule nell’ONL o ad alterazioni nell’espressione della recoverina stessa, anche se il meccanismo non è stato indagato ulteriormente.

In sintesi, pur non potendo definire con precisione il destino di ciascuna popolazione neuronale in presenza di insulto iperglicemico, o direttamente di stress ossidativo, le prove effettuate suggeriscono, in forma preliminare, che la neuroretina è effettivamente coinvolta nei cambiamenti precoci indotti dall’alto glucosio e che l’apoptosi rilevata coinvolge, almeno in parte, i neuroni. Ulteriori prove saranno necessarie per delineare gli effetti dell’alto glucosio nell’ambito specifico di ogni tipo neuronale della retina, posto che ciascuno assolve una precisa funzione nella fisiologia dell’organo e che la suscettibilità all’insulto iperglicemico è nota essere diversa.

Infine, a riguardo ancora degli effetti indotti, in generale, sulla componente nervosa della retina va sottolineato che gli esperimenti realizzati, e descritti, non sono stati in grado di riprodurre il danno associato alle cellule gliali, in special modo alle cellule di Müller. In letteratura è ampiamente descritto che l’iperglicemia danneggia anche questi elementi e che tale effetto è indicato, principalmente, dalla sovraespressione della GFAP, come descritto in precedenza, quale marker generico di attivazione gliale e di sofferenza tissutale (Fletcher et al., 2010, Middeldorp and Hol, 2011, Bringmann and Wiedemann, 2012). L’analisi sia di retine umane post-mortem, sia di retine ottenute da modelli diabetici *in vivo* conferma questo dato (Lieth et al., 1998, Barber, 2003, Szabadfi et al., 2014a). La valutazione dell’espressione della GFAP in espianti incubati su inserti microporosi in assenza di siero non mostra questo incremento indotto né dall’alto glucosio né dallo stress ossidativo. Tale risultato inatteso è ancora oggetto di studio ma potrebbe essere motivato considerando che la manifestazione della sovraespressione di GFAP potrebbe richiedere un tempo maggiore di quello indagato. E’ riportato infatti che, in modelli *in vivo*, l’attivazione gliale si osserva a partire da 3 settimane dall’induzione del diabete e che questo processo è incentivato dal protrarsi dell’iperglicemia (Szabadfi et al., 2014a). Nell’ambito dei cambiamenti precoci in espianti retinici caratterizzati da apoptosi neuronale, questa è descritta precedere la sovraregolazione di GFAP e la risposta gliale (Taylor et al., 2014). Infine, il fatto che, in presenza di siero, è possibile notare un incremento nell’espressione della GFAP, rispetto al controllo normoglicemico, sarebbe spiegabile considerando che, in queste condizioni, l’effetto cumulato indotto dal siero e dalla stimolazione con alto glucosio è sufficiente per generare uno stato di

sofferenza nel tessuto retinico tale da innescare la risposta delle cellule gliali. Al contrario, il solo insulto iperglicemico, anche se protratto per 10 gg, o la permanenza in condizioni ossidanti per 5 gg non sarebbero sufficienti per determinare la stessa attivazione. Che l'incubazione di espianti retinici in presenza di siero porti, dopo un certo tempo, alla sovraespressione di GFAP, è riportato in letteratura (Szabadfi et al., 2014a, Taylor et al., 2014).

### 5.2.2. L'alto glucosio e lo stress ossidativo alterano il metabolismo del VEGF negli espianti retinici ex vivo

I risultati ottenuti, riguardanti l'induzione dell'apoptosi da parte dell'alto glucosio, o direttamente dello stress ossidativo, sono stati affiancati all'analisi della risposta in termini di variazioni dell'espressione/rilascio del VEGF, nelle stesse condizioni sperimentali. In letteratura è riportato che il diabete è associato ad aumento dei livelli di VEGF nel liquido vitreale (Aiello et al., 1994, Caldwell et al., 2003, Abcouwer and Gardner, 2014); inoltre, in modelli *in vivo* ed *in vitro*, la stimolazione iperglicemica o con alto glucosio produce un rapido incremento di questo fattore di crescita, che è stato analizzato a tutti i livelli, dall'aumento della trascrizione genica fino al rilascio (De Almodovar et al., 2009). Gli esperimenti svolti per questa tesi confermano che il trattamento degli espianti retinici con alto glucosio determina un aumento dei livelli di VEGF misurati nel terreno di coltura e che tale effetto è proporzionale alla concentrazione di glucosio. Inoltre, come descritto per quanto riguarda l'indagine della morte cellulare, l'effetto diretto dello stress ossidativo causa una risposta analoga; anche in questo caso è stato visto che l'aumento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è associato ad un incremento nei livelli di espressione dell'mRNA del VEGF.

### 5.2.3. L'apoptosi e i livelli di VEGF indotti da alto glucosio e stress ossidativo mostrano correlazione positiva

La conduzione dell'analisi della morte cellulare e delle dinamiche del VEGF ha indicato che queste risposte si evolvono in maniera parallela. Sia nel caso del trattamento iperglicemico, sia

direttamente in presenza di stress ossidativo, l'andamento riscontrato nell'espressione/rilascio del VEGF correla positivamente con i dati riguardanti la morte cellulare. La manifestazione concomitante delle due risposte in entrambi i casi permette di sostenere l'ipotesi secondo cui la sofferenza cellulare, che sfocia poi nell'induzione di apoptosi, innesca una risposta "protettiva" promossa dall'aumento del VEGF. Sebbene l'esatta natura delle cellule che vanno incontro a morte nel modello proposto non sia stata chiarita approfonditamente, i dati iniziali raccolti circa il coinvolgimento dei neuroni trovano riscontro nei risultati provenienti da studi pubblicati circa la precedenza dell'apoptosi neuronale rispetto a quella vascolare (Carrasco et al., 2007, Kern and Barber, 2008, Barber et al., 2011). A completare il quadro, diverse evidenze riportate in letteratura indicano che la componente nervosa della retina, neuroni e cellule gliali, rispondono a diversi insulti nocivi tramite stimolazione della produzione del VEGF (Nishijima et al., 2007, Bai et al., 2009, Cervia et al., 2012, Cervia and Casini, 2013, Rodrigues et al., 2013, D'Alessandro et al., 2014). Nello specifico è noto che anche la stimolazione con alto glucosio o l'incubazione di cellule in condizioni ossidanti determina un aumento dell'espressione e del rilascio di VEGF (Hu et al., 2013).

Le evidenze della realizzazione di questa risposta sono state, finora, associate primariamente al ruolo del VEGF, a lungo termine, nella promozione della neoangiogenesi che è parte integrante delle fasi finali di sviluppo della DR. Nonostante ciò, l'innalzamento dei livelli di VEGF è noto essere un cambiamento precoce, come ribadito sperimentalmente anche nel lavoro svolto. In queste prime fasi della malattia il rilascio osservato di questo fattore sembra assolvere primariamente alla funzione di "richiesta d'aiuto" immediato inviata dai neuroni in sofferenza piuttosto che alla promozione della neovascolarizzazione. È plausibile, quindi, che in questo contesto il VEGF abbia un'azione a breve termine esplicita in parte tramite stimolazione ancora delle cellule endoteliali, inducendo aumento della permeabilità vascolare, che ha poi risvolti deleteri, ma in parte anche tramite azione diretta sui neuroni. Infatti, come discusso nei paragrafi successivi, l'ipotesi del ruolo del VEGF come sostanza ad azione neuroprotettiva sembra poter essere implicata nella protezione dei neuroni anche dal danno indotto precocemente nella DR. Secondo l'ipotesi delineata, per cui l'effetto riguardante la produzione di VEGF è una conseguenza dello stato di sofferenza indotto dall'iperglicemia, primariamente sui neuroni, l'impiego di sostanze con azione neuroprotettiva dovrebbe essere efficace nell'inibire/diminuire l'incremento del VEGF attraverso la riduzione della sofferenza neuronale. Tale evenienza è stata indagata, ancora a livello iniziale, nella parte finale del lavoro svolto.

## 5.3. Effetto della neuroprotezione

5.3.1. La neuroprotezione promossa da OCT è efficace nel ridurre sia l'apoptosi sia l'espressione del VEGF indotta dall'alto glucosio

Il potenziale neuroprotettivo dell'OCT, analogo sintetico della SST specifico per il recettore sst2, è ampiamente descritto in letteratura. La somministrazione di OCT riduce l'entità della morte cellulare indotta dall'ischemia nella retina (Casini et al., 2005, Mastrodimou et al., 2005, Cervia et al., 2008a, Cervia et al., 2012, Cervia and Casini, 2013, D'Alessandro et al., 2014) e, allo stesso tempo, il rilascio o l'espressione di VEGF da parte dei neuroni in sofferenza (Cervia et al., 2012, D'Alessandro et al., 2014); tale effetto sarebbe ottenuto grazie alla protezione dei neuroni dal danno eccitotossico, tramite riduzione del rilascio di glutammato. Lo stesso meccanismo di azione è stato visto essere alla base anche dell'azione protettiva della SST nel contesto della DR, in quanto il trattamento topico con SST o OCT previene la neurodegenerazione in un modello di ratto diabetico (Krassas et al., 2007, Hernandez et al., 2014). A sottolineare il contributo della SST, fisiologicamente presente nella retina, nel mantenimento di una condizione omeostatica tra stimoli pro- e anti-apoptotici, diversi studi hanno dimostrato che la neurodegenerazione nella DR è associata a riduzione dei livelli del neuropeptide nella retina (Mastrodimou et al., 2005, Carrasco et al., 2007). A tal proposito, la somministrazione esogena della SST stessa, o di analoghi quali OCT si configura come una strategia dal potenziale interessante nell'ambito del trattamento precoce della malattia.

Nel lavoro svolto, OCT è stata impiegata, proprio a fronte della sua azione protettiva sulle cellule neuronali, per provare che la neuroprotezione è efficace anche nell'inibire gli aumenti del VEGF. La protezione dei neuroni dalla morte causata dallo stress iperglicemico è indicata, anche in questo caso, dalla valutazione dei livelli di espressione della caspasi 3. I risultati sono in linea con quanto riportato in letteratura e ipotizzato nel presente lavoro; è stato visto che il trattamento con OCT riduce gli aumenti dell'espressione dell'mRNA sia della caspasi 3 che del VEGF indotti dal alto glucosio. Questo risultato iniziale non permette ancora di dimostrare con certezza che l'apoptosi rilevata sia a carico delle cellule neuronali, né che il miglioramento della risposta riguardante il VEGF sia secondario e mediato dalla protezione dei neuroni stessi da parte del peptide; tuttavia, il fatto che l'azione neuroprotettiva dell'OCT sia indubbia, unito alla

concomitanza riportata dei due effetti permette, quantomeno, di sostenere questa ipotesi circa il meccanismo attraverso il quale si realizza il collegamento tra di essi.

Ulteriori prove a riguardo, con l'introduzione anche di altre molecole ad azione neuroprotettiva, quali il neuropeptide PACAP o le neurotrofine BDNF o NGF, potrebbero fornire dati a sostegno della validità di questa opzione terapeutica che attrae sempre più attenzione visto l'avanzamento delle conoscenze circa la successione temporale e la relazione causale tra neurodegenerazione e cambiamenti vascolari (Hernandez and Simo, 2012, Zhang et al., 2013, Abcouwer and Gardner, 2014, Ola and Alhomida, 2014, Verbraak, 2014).

### 5.3.2. Il blocco del VEGF causa un aumento dell'apoptosi indotta dallo stress ossidativo, ipotesi del suo ruolo come neuroprotettore

Come descritto in precedenza, negli ultimi anni sta emergendo come il VEGF, oltre alla ben nota azione mitogena e stimolante sulle cellule endoteliali, agisca anche come fattore trofico sui neuroni. Il potenziale neuroprotettivo del VEGF è stato dimostrato in molte porzioni del SNC, compresa la retina (Jin et al., 2000, Veves and King, 2001, Saint-Geniez et al., 2008, Mackenzie and Ruhrberg, 2012). È stato visto infatti che l'esposizione al fattore comporta una riduzione dose-dipendente dell'apoptosi dei neuroni sia *in vitro*, indotta da ischemia o eccitotossicità da glutammato, sia in un modello di ischemia-riperfusion *in vivo* (Nishijima et al., 2007, Tolosa et al., 2008, Mackenzie and Ruhrberg, 2012). Tale effetto è dovuto all'attivazione, in seguito all'interazione VEGF-VEGFR2, di vie intracellulari di sopravvivenza che esercitano un effetto anti-apoptotico (Jin et al., 2000, Gomes et al., 2007, Foxton et al., 2013).

L'indicazione per cui cellule nervose retiniche, neuroni e cellule di Müller in condizioni iperglicemiche rispondono tempestivamente aumentando l'espressione ed il rilascio di VEGF permette di ipotizzare che la funzione a breve termine di questa induzione sia proprio quella di agire per via autocrina sugli stessi neuroni, nel tentativo di combattere le segnalazioni pro-apoptotiche in atto (Sapieha et al., 2008, Wang et al., 2010, Kern, 2014). I dati ottenuti nell'ambito di una prova preliminare nel lavoro svolto sembrano validare questa ipotesi. Si è visto che il blocco del VEGF, tramite utilizzo di una trappola (VEGF-trap), costituita da una proteina di fusione tra la porzione di binding dei recettori VEGFR1/2 e un frammento Fc, contro

il fattore di crescita, determina aumento dell'apoptosi in espianti in condizioni di stress ossidativo. L'inibizione della funzione del VEGF comporta la perdita di questo contributo protettivo e si ripercuote negativamente sull'apoptosi, che aumenta.

Questo risultato trova conferma in alcuni lavori presenti in letteratura; è stato dimostrato che la neutralizzazione del VEGF, ottenuta tramite somministrazione di bloccanti del fattore, determina un aumento dell'apoptosi in un modello *in vivo* di glaucoma (Foxton et al., 2013); allo stesso modo, in caso di ischemia retinica indotta *ex vivo*, il trattamento con VEGF-trap comporta un aumento dell'apoptosi nella retina interna (Casini et al., 2014). Inoltre, nella situazione specifica del danno indotto dallo stress ossidativo sui neuroni, è riportato che la somministrazione esogena di VEGF riduce l'entità dell'apoptosi causata dal trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di RGC *in vitro*. Lo stesso studio conferma che l'apoptosi rilevata è un processo caspasi-dipendente e che la protezione assoluta dal VEGF nei confronti di questa induzione si realizza tramite attivazione della via di sopravvivenza PI3K/Akt, in seguito ad interazione del VEGF con VEGFR2 espresso sulle RGC (Foxton et al., 2013).

Concludendo, poiché l'espressione del VEGF è finemente controllata dalla tensione di ossigeno così come dai livelli di glicemia, questo fattore si configura come un candidato ideale per preservare l'omeostasi retinica nelle fasi iniziali del danno prodotto dall'iperglicemia, dallo stress ossidativo e dall'ischemia (Saint-Geniez et al., 2008, Hu et al., 2013). Il potenziale ruolo del VEGF come molecola ad azione neuroprotettiva nella DR deve essere ancora analizzato nel dettaglio e confermato da prove ulteriori; tuttavia questa prima evidenza incoraggia la ricerca in questo senso e, allo stesso tempo, pone attenzione sulle potenziali controindicazioni delle terapie anti-VEGF nel trattamento della malattia.

## 6. Conclusioni

La rilevanza clinica ed epidemiologica della DR richiede uno sforzo nel tentativo di trovare sistemi in grado di promuovere l'avanzamento della ricerca. A tal proposito, un modello *ex vivo*, come quello indicato nel lavoro svolto, costituisce una riproduzione basale fedele ed efficiente delle condizioni iniziali connesse all'insorgenza della malattia e allo stesso tempo rappresenta un compromesso tra le criticità e i limiti dei due modelli estremi (*in vitro* e *in vivo*). Attraverso questo sistema è possibile indagare diversi aspetti connessi alla patogenesi, all'evoluzione e alla cura della malattia, tra cui merita particolare attenzione la neuroprotezione. Le nuove prospettive, infatti, sostenendo l'ipotesi "neurodegeneration-first", spingono la ricerca in questo senso e prospettano l'utilizzo di sostanze che contrastano la sofferenza neuronale come strategia terapeutica per prevenire precocemente l'induzione della DR che conduce, in ultimo, alla perdita della visione. Ancora molti punti devono essere chiariti e l'esatto meccanismo della consequenzialità tra neurodegenerazione e alterazioni vascolari deve essere studiato e dimostrato nel dettaglio. In ogni caso, quanto visto finora costituisce un punto di partenza incoraggiante che, unito all'ottimizzazione di un modello sperimentale congeniale, permette di prospettare l'avanzamento necessario nella comprensione della DR.

## 7. Bibliografia

- Abcouwer SF, Gardner TW (2014) Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann Ny Acad Sci* 1311:174-190.
- Abu El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Geboes K (2007) Expression of antiapoptotic and proapoptotic molecules in diabetic retinas. *Eye (Lond)* 21:238-245.
- Afzal A, Shaw LC, Ljubimov AV, Boulton ME, Segal MS, Grant MB (2007) Retinal and choroidal microangiopathies: Therapeutic opportunities. *Microvascular research* 74:131-144.
- Ahsan H (2015) Diabetic retinopathy--biomolecules and multiple pathophysiology. *Diabetes & metabolic syndrome* 9:51-54.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL (1994) Vascular Endothelial Growth-Factor in Ocular Fluid of Patients with Diabetic-Retinopathy and Other Retinal Disorders. *New England Journal of Medicine* 331:1480-1487.
- Al-Shabrawey M, Smith S (2010) Prediction of diabetic retinopathy: role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers. *The EPMA journal* 1:56-72.
- Alamouti B, Funk J (2003) Retinal thickness decreases with age: an OCT study. *The British journal of ophthalmology* 87:899-901.
- Alvaro AR, Martins J, Costa AC, Fernandes E, Carvalho F, Ambrosio AF, Cavadas C (2008) Neuropeptide Y protects retinal neural cells against cell death induced by ecstasy. *Neuroscience* 152:97-105.
- Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Govoni S, Pascale A (2010) The PKCbeta/HuR/VEGF pathway in diabetic retinopathy. *Biochemical pharmacology* 80:1230-1237.
- Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW (1997) Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 38:36-47.
- Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA (2006) Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 55:2401-2411.
- Aranda J, Motiejunaite R, Im E, Kazlauskas A (2012) Diabetes disrupts the response of retinal endothelial cells to the angiomodulator lysophosphatidic acid. *Diabetes* 61:1225-1233.

- Arden GB, Sivaprasad S (2012) The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. *Documenta Ophthalmologica* 124:15-26.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research* 97:512-523.
- Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Racz B, Gallyas F, Tamas A, Gaal V, Marton Z, Gabriel R, Reglodi D (2010) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1200:128-139.
- Bai Y, Ma JX, Guo J, Wang J, Zhu M, Chen Y, Le YZ (2009) Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *The Journal of pathology* 219:446-454.
- Barber AJ (2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 27:283-290.
- Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW (2000) Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Investigative ophthalmology & visual science* 41:3561-3568.
- Barber AJ, Antonetti DA, Kern TS, Reiter CE, Soans RS, Krady JK, Levison SW, Gardner TW, Bronson SK (2005) The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:2210-2218.
- Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF (2011) The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:1156-1163.
- Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW (1998) Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *Journal of Clinical Investigation* 102:783-791.
- Barile GR, Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Donmoyer CM, Ma WC, Rong LL, Buciarelli LG, Wendt T, Horig H, Hudson BI, Qu W, Weinberg AD, Yan SF, Schmidt AM (2005) The RAGE axis in early diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:2916-2924.
- Barnett PA, Gonzalez RG, Chylack LT, Jr., Cheng HM (1986) The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* 35:426-432.
- Bauer M, Kristensen BW, Meyer M, Gasser T, Widmer HR, Zimmer J, Ueffing M (2006) Toxic effects of lipid-mediated gene transfer in ventral mesencephalic explant cultures. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 98:395-400.
- Baynes C, Anyaoku V, Johnston DG, Elkeles RS (1991) Feedback inhibition of insulin secretion in type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 81:685-690.

- Behl Y, Krothapalli P, Desta T, DiPiazza A, Roy S, Graves DT (2008) Diabetes-enhanced tumor necrosis factor-alpha production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy. *The American journal of pathology* 172:1411-1418.
- Behzadian MA, Windsor LJ, Ghaly N, Liou G, Tsai NT, Caldwell RB (2003) VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:752-754.
- Beier M, Franke A, Paunel-Gorgulu AN, Scheerer N, Dunker N (2006) Transforming growth factor beta mediates apoptosis in the ganglion cell layer during all programmed cell death periods of the developing murine retina. *Neuroscience research* 56:193-203.
- Bigiani A, Petrucci C, Ghiaroni V, Dal Monte M, Cozzi A, Kreienkamp HJ, Richter D, Bagnoli P (2004) Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. *Brain research* 1025:177-185.
- Blake AD, Badway AC, Strowski MZ (2004) Delineating somatostatin's neuronal actions. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 3:153-160.
- Boehm BO (2007) Use of long-acting somatostatin analogue treatment in diabetic retinopathy. *Developments in ophthalmology* 39:111-121.
- Bogdanov P, Corraliza L, Villena JA, Carvalho AR, Garcia-Arumi J, Ramos D, Ruberte J, Simo R, Hernandez C (2014) The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration. *PloS one* 9:e97302.
- Brewer GJ (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience methods* 71:143-155.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006) Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397-424.
- Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P (2005) Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand* 83:528-538.
- Bringmann A, Wiedemann P (2012) Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde* 227:1-19.
- Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625.
- Brussee V, Cunningham FA, Zochodne DW (2004) Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. *Diabetes* 53:1824-1830.

- Busik JV, Olson LK, Grant MB, Henry DN (2002) Glucose-induced activation of glucose uptake in cells from the inner and outer blood-retinal barrier. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:2356-2363.
- Caffe AR, Ahuja P, Holmqvist B, Azadi S, Forsell J, Holmqvist I, Soderpalm AK, van Veen T (2001) Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium. *Journal of chemical neuroanatomy* 22:263-273.
- Caffe AR, Soderpalm A, van Veen T (1993) Photoreceptor-specific protein expression of mouse retina in organ culture and retardation of rd degeneration in vitro by a combination of basic fibroblast and nerve growth factors. *Current eye research* 12:719-726.
- Caffe AR, Visser H, Jansen HG, Sanyal S (1989) Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture. *Current eye research* 8:1083-1092.
- Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW (2003) Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes/metabolism research and reviews* 19:442-455.
- Campochiaro PA (2000) Retinal and choroidal neovascularization. *Journal of cellular physiology* 184:301-310.
- Carlson NR (2014) *Physiology of Behaviour*. USA: Pearson Education.
- Carrasco E, Hernandez C, Miralles A, Huguet P, Farres J, Simo R (2007) Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes care* 30:2902-2908.
- Casini G, Catalani E, Dal Monte M, Bagnoli P (2005) Functional aspects of the somatostatinergic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histology and histopathology* 20:615-632.
- Casini G, Dal Monte M, Fornaciari I, Filippi L, Bagnoli P (2014) The beta-adrenergic system as a possible new target for pharmacologic treatment of neovascular retinal diseases. *Progress in retinal and eye research* 42:103-129.
- Castellon R, Hamdi HK, Sacerio I, Aoki AM, Kenney MC, Ljubimov AV (2002) Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Experimental eye research* 74:523-535.
- Catalani E, Cervia D, Martini D, Bagnoli P, Simonetti E, Timperio AM, Casini G (2007) Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *The European journal of neuroscience* 25:1447-1459.
- Celiker U, Ilhan N, Ozercan I, Demir T, Celiker H (2002) Octreotide reduces ischaemia-reperfusion injury in the retina. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 80:395-400.

- Cervia D, Casini G (2013) The Neuropeptide Systems and their Potential Role in the Treatment of Mammalian Retinal Ischemia: A Developing Story. *Current neuropharmacology* 11:95-101.
- Cervia D, Casini G, Bagnoli P (2008a) Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Molecular and cellular endocrinology* 286:112-122.
- Cervia D, Catalani E, Dal Monte M, Casini G (2012) Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *Journal of neurochemistry* 120:818-829.
- Cervia D, Martini D, Ristori C, Catalani E, Timperio AM, Bagnoli P, Casini G (2008b) Modulation of the neuronal response to ischaemia by somatostatin analogues in wild-type and knock-out mouse retinas. *Journal of neurochemistry* 106:2224-2235.
- Chen YJ, Huang YS, Chen JT, Chen YH, Tai MC, Chen CL, Liang CM (2015) Protective effects of glucosamine on oxidative-stress and ischemia/reperfusion-induced retinal injury. *Investigative ophthalmology & visual science* 56:1506-1516.
- Chen YQ, Pan WH, Liu JH, Chen MM, Liu CM, Yeh MY, Tsai SK, Young MS, Zhang XM, Chao HM (2012) The effects and underlying mechanisms of S-allyl l-cysteine treatment of the retina after ischemia/reperfusion. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 28:110-117.
- Cheung N, Mitchell P, Wong TY (2010) Diabetic retinopathy. *Lancet* 376:124-136.
- Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM (2007) Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 3:3-14.
- Chistiakov DA (2011) Diabetic retinopathy: pathogenic mechanisms and current treatments. *Diabetes & metabolic syndrome* 5:165-172.
- Colafrancesco V, Coassin M, Rossi S, Aloe L (2011) Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration. *Ann Ist Super Sanita* 47:284-289.
- Cossenza M, Cadilhe DV, Coutinho RN, Paes-de-Carvalho R (2006) Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production. *Journal of neurochemistry* 97:1481-1493.
- Croxen R, Baarsma GS, Kuijpers RW, van Hagen PM (2004) Somatostatin in diabetic retinopathy. *Pediatr Endocrinol Rev* 1 Suppl 3:518-524.
- Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, Pinilla I (2014) Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res* 43:17-75.

- Curatola AM, Moscatelli D, Norris A, Hendricks-Munoz K (2005) Retinal blood vessels develop in response to local VEGF-A signals in the absence of blood flow. *Experimental eye research* 81:147-158.
- Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW (2009) Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye (Lond)* 23:1496-1508.
- D'Alessandro A, Cervia D, Catalani E, Gevi F, Zolla L, Casini G (2014) Protective effects of the neuropeptides PACAP, substance P and the somatostatin analogue octreotide in retinal ischemia: a metabolomic analysis. *Molecular bioSystems* 10:1290-1304.
- Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P (2007) Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 48:3480-3489.
- Dal Monte M, Petrucci C, Cozzi A, Allen JP, Bagnoli P (2003) Somatostatin inhibits potassium-evoked glutamate release by activation of the sst(2) somatostatin receptor in the mouse retina. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 367:188-192.
- Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M, Bagnoli P (2009) Effects of somatostatin analogues on retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: involvement of the somatostatin receptor subtype 2. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:3596-3606.
- Davis MI, Wilson SH, Grant MB (2001) The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 33:295-299.
- Davson H (2012) *The Physiology of the Eye*. USA: Elsevier.
- De Almodovar CR, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P (2009) Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiol Rev* 89:607-648.
- Delyfer MN, Forster V, Neveux N, Picaud S, Leveillard T, Sahel JA (2005) Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Molecular vision* 11:688-696.
- DeNiro M, Alsmadi O, Al-Mohanna F (2009) Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway as a therapeutic modality to regulate retinal angiogenesis. *Experimental eye research* 89:700-717.
- Doft BH, Kingsley LA, Orchard TJ, Kuller L, Drash A, Becker D (1984) The Association between Long-Term Diabetic Control and Early Retinopathy. *Ophthalmology* 91:763-769.
- Du Y, Miller CM, Kern TS (2003) Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free radical biology & medicine* 35:1491-1499.

- Durham JT, Herman IM (2011) Microvascular Modifications in Diabetic Retinopathy. *Current diabetes reports* 11:253-264.
- Echevarria D, Vieira C, Martinez S (2001) Mammalian neural tube grafting experiments: an in vitro system for mouse experimental embryology. *The International journal of developmental biology* 45:895-902.
- Eichler W, Kuhrt H, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A (2000) VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply. *Neuroreport* 11:3533-3537.
- Eichler W, Yafai Y, Kuhrt H, Grater R, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A (2001) Hypoxia: modulation of endothelial cell proliferation by soluble factors released by retinal cells. *Neuroreport* 12:4103-4108.
- Elman MJ, Aiello LP, Beck RW, Bressler NM, Bressler SB, Edwards AR, Ferris FL, 3rd, Friedman SM, Glassman AR, Miller KM, Scott IU, Stockdale CR, Sun JK (2010) Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 117:1064-1077 e1035.
- Engelsberg K, Ehinger B, Wasselius J, Johansson K (2004) Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 242:229-239.
- Engerman RL, Kern TS (1995) Retinopathy in animal models of diabetes. *Diabetes/metabolism reviews* 11:109-120.
- Eshaq RS, Wright WS, Harris NR (2014) Oxygen delivery, consumption, and conversion to reactive oxygen species in experimental models of diabetic retinopathy. *Redox biology* 2:661-666.
- Feigenspan A, Bormann J, Wassle H (1993) Organotypic slice culture of the mammalian retina. *Visual neuroscience* 10:203-217.
- Fernandez DC, Pasquini LA, Dorfman D, Aldana Marcos HJ, Rosenstein RE (2012) Early distal axonopathy of the visual pathway in experimental diabetes. *The American journal of pathology* 180:303-313.
- Fletcher EL, Downie LE, Hatzopoulos K, Vessey KA, Ward MM, Chow CL, Pianta MJ, Vingrys AJ, Kalloniatis M, Wilkinson-Berka JL (2010) The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology* 120:67-86.
- Foxton RH, Finkelstein A, Vijay S, Dahlmann-Noor A, Khaw PT, Morgan JE, Shima DT, Ng YS (2013) VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *The American journal of pathology* 182:1379-1390.

- Frank RN, Dutta S, Mancini MA (1987) Pericyte Coverage Is Greater in the Retinal Than in the Cerebral Capillaries of the Rat. *Investigative ophthalmology & visual science* 28:1086-1091.
- Franke AG, Gubbe C, Beier M, Duenker N (2006) Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic proteins: cooperative players in chick and murine programmed retinal cell death. *The Journal of comparative neurology* 495:263-278.
- Freshney RI (2010) Database of misidentified cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer* 126:302.
- Fruttiger M (2002) Development of the mouse retinal vasculature: Angiogenesis versus vasculogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:522-527.
- Fulton AB, Akula JD, Mocko JA, Hansen RM, Benador IY, Beck SC, Fahl E, Seeliger MW, Moskowitz A, Harris ME (2009) Retinal degenerative and hypoxic ischemic disease. *Documenta Ophthalmologica* 118:55-61.
- Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S (2002) Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology* 86:311-315.
- Gabbay KH, Mayman C, Henshaw E, Field R (1973) Sorbitol Pathway and Complications of Diabetes. *New Engl J Med* 288:831-836.
- Gabriel R (2013) Neuropeptides and diabetic retinopathy. *British journal of clinical pharmacology* 75:1189-1201.
- Gardner TW, Abcouwer SF, Barber AJ, Jackson GR (2011) An integrated approach to diabetic retinopathy research. *Archives of ophthalmology* 129:230-235.
- Gaspar JM, Martins A, Cruz R, Rodrigues CM, Ambrosio AF, Santiago AR (2013) Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience* 253:380-388.
- Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ (2006) Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Investigative ophthalmology & visual science* 47:3143-3150.
- Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello LP, Kern TS, King GL (2009) Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nature medicine* 15:1298-1306.
- Germer A, Kuhnel K, Grosche J, Friedrich A, Wolburg H, Price J, Reichenbach A, Mack AF (1997) Development of the neonatal rabbit retina in organ culture. 1. Comparison with histogenesis in vivo, and the effect of a gliotoxin (alpha-aminoadipic acid). *Anatomy and embryology* 196:67-79.

- Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM (2005) The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:120-126.
- Gilbert SF (2000) *Developmental Biology*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Giuliari GP (2012) Diabetic retinopathy: current and new treatment options. *Curr Diabetes Rev* 8:32-41.
- Gomes E, Papa L, Hao T, Rockwell P (2007) The VEGFR2 and PKA pathways converge at MEK/ERK1/2 to promote survival in serum deprived neuronal cells. *Molecular and cellular biochemistry* 305:179-190.
- Gough DR, Cotter TG (2011) Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell death & disease* 2:e213.
- Grant MB, Caballero S (2002) Somatostatin analogues as drug therapies for retinopathies. *Drugs Today (Barc)* 38:783-791.
- Gray H (1918) *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Hamilton NB, Attwell D, Hall CN (2010) Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics* 2.
- Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED (1999) Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 42:728-736.
- Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M (1995) Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med* 1:527-534.
- Harrill JA, Robinette BL, Freudenrich TM, Mundy WR (2015) Media formulation influences chemical effects on neuronal growth and morphology. *In vitro cellular & developmental biology Animal*.
- Hartani D, Belguendouz H, Guenane H, Chachoua L, Lahlou-Boukoffa OQ, Touil-Boukoffa C (2006) [Effect of nitrites and nitrates on bovine retina in vitro]. *Journal francais d'ophtalmologie* 29:32-36.
- Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D (2000) Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes care* 23:234-240.
- Haverkamp S, Ghosh KK, Hirano AA, Wassle H (2003) Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology* 455:463-476.

- He M, Pan H, Xiao C, Pu M (2013) Roles for redox signaling by NADPH oxidase in hyperglycemia-induced heme oxygenase-1 expression in the diabetic retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 54:4092-4101.
- Hernandez C, Simo-Servat O, Simo R (2014) Somatostatin and diabetic retinopathy: current concepts and new therapeutic perspectives. *Endocrine* 46:209-214.
- Hernandez C, Simo R (2012) Neuroprotection in diabetic retinopathy. *Current diabetes reports* 12:329-337.
- Hofman P, Blaauwgeers HG, Vrensen GF, Schlingemann RO (2001) Role of VEGF-A in endothelial phenotypic shift in human diabetic retinopathy and VEGF-A-induced retinopathy in monkeys. *Ophthalmic research* 33:156-162.
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology* 32C:121-130.
- Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO (2014) Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in retinal and eye research* 42:44-84.
- Hu J, Wu Q, Li T, Chen Y, Wang S (2013) Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Experimental eye research* 109:31-39.
- Hueber A, Wiedemann P, Esser P, Heimann K (1996) Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR). *International ophthalmology* 20:345-350.
- Jackson GR, Barber AJ (2010) Visual dysfunction associated with diabetic retinopathy. *Current diabetes reports* 10:380-384.
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA (2000) Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:10242-10247.
- Jindal V (2014) Neurodegeneration as a Primary Change and Role of Neuroprotection in Diabetic Retinopathy. *Molecular neurobiology*.
- Jo DH, Cho CS, Kim JH, Jun HO (2013) Animal models of diabetic retinopathy: doors to investigate pathogenesis and potential therapeutics. *J Biomed Sci* 20:38.
- Johnson TV, Martin KR (2008) Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:3503-3512.
- Kaempf S, Walter P, Salz AK, Thumann G (2008) Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium. *Journal of neuroscience methods* 173:47-58.

- Kassab A, Piwowar A (2012) Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. *Biochimie* 94:1837-1848.
- Kato M, Castro NE, Natarajan R (2013) MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. *Free Radical Biology and Medicine* 64:85-94.
- Katsuki H, Yamamoto R, Nakata D, Kume T, Akaike A (2004) Neuronal nitric oxide synthase is crucial for ganglion cell death in rat retinal explant cultures. *Journal of pharmacological sciences* 94:77-80.
- Kempner JH, O'Colmain BJ, Leske MC, Haffner SM, Klein R, Moss SE, Taylor HR, Hamman RF (2004) The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Archives of ophthalmology* 122:552-563.
- Kern TS (2007) Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research* 2007:95103.
- Kern TS (2014) Interrelationships between the Retinal Neuroglia and Vasculature in Diabetes. *Diabetes & metabolism journal* 38:163-170.
- Kern TS, Barber AJ (2008) Retinal ganglion cells in diabetes. *The Journal of physiology* 586:4401-4408.
- Kern TS, Berkowitz BA, Feldman EL (2009) National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) meeting summary: Advances toward measuring diabetic retinopathy and neuropathy: from the bench to the clinic and back again (April 4-5, 2007, Baltimore, Maryland). *Journal of diabetes and its complications* 23:219-223.
- Kern TS, Engerman RL (1994) Comparison of Retinal Lesions in Alloxan-Diabetic Rats and Galactose-Fed Rats. *Curr Eye Res* 13:863-867.
- Kern TS, Tang J, Berkowitz BA (2010) Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice. *Molecular vision* 16:2121-2131.
- Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, Weich H, Gregor Z, McLeod D, Boulton M (1998) Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest* 78:109-116.
- Kohzaki K, Vingrys AJ, Bui BV (2008) Early inner retinal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:3595-3604.
- Koriyama Y, Ohno M, Kimura T, Kato S (2009) Neuroprotective effects of 5-S-GAD against oxidative stress-induced apoptosis in RGC-5 cells. *Brain research* 1296:187-195.
- Kowluru RA (2001) Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta diabetologica* 38:179-185.
- Kowluru RA, Chan PS (2007) Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research* 2007:43603.

- Koya D, King GL (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47:859-866.
- Krassas GE, Tzotzas T, Papazisis K, Pazaitou-Panayiotou K, Boboridis K (2007) The efficacy of somatostatin analogues in the treatment of diabetic retinopathy and thyroid eye disease. *Clin Ophthalmol* 1:209-215.
- Kumagai AK (1999) Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 15:261-273.
- Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E, Friedlander M (2012) Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *Journal of Clinical Investigation* 122:4213-4217.
- L'Esperance FA, Jr. (1968) An ophthalmic argon laser photocoagulation system: design, construction, and laboratory investigations. *Trans Am Ophthalmol Soc* 66:827-904.
- Laabich A, Cooper NG (2000) Neuroprotective effect of AIP on N-methyl-D-aspartate-induced cell death in retinal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 85:32-40.
- Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvascular research* 55:29-42.
- Langmann T (2007) Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of leukocyte biology* 81:1345-1351.
- Lecleire-Collet A, Tessier LH, Massin P, Forster V, Brasseur G, Sahel JA, Picaud S (2005) Advanced glycation end products can induce glial reaction and neuronal degeneration in retinal explants. *The British journal of ophthalmology* 89:1631-1633.
- Levin LA, Louhab A (1996) Apoptosis of retinal ganglion cells in anterior ischemic optic neuropathy. *Archives of ophthalmology* 114:488-491.
- Li B, Xu W, Luo C, Gozal D, Liu R (2003) VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Brain research Molecular brain research* 111:155-164.
- Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I (2002) Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Experimental eye research* 74:615-625.
- Li Y, Zhang F, Nagai N, Tang Z, Zhang S, Scotney P, Lennartsson J, Zhu C, Qu Y, Fang C, Hua J, Matsuo O, Fong GH, Ding H, Cao Y, Becker KG, Nash A, Heldin CH, Li X (2008) VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *The Journal of clinical investigation* 118:913-923.

- Lieth E, Barber AJ, Xu B, Dice C, Ratz MJ, Tanase D, Strother JM (1998) Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes* 47:815-820.
- Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA (2000) Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. In: *Clinical & experimental ophthalmology*, vol. 28, pp 3-8.
- Liljekvist-Soltic I, Olofsson J, Johansson K (2008) Progenitor cell-derived factors enhance photoreceptor survival in rat retinal explants. *Brain research* 1227:226-233.
- Ling TL, Mitrofanis J, Stone J (1989) Origin of Retinal Astrocytes in the Rat - Evidence of Migration from the Optic-Nerve. *Journal of Comparative Neurology* 286:345-352.
- Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP (1998) Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of clinical investigation* 101:1219-1224.
- Lutty GA (2013) Effects of Diabetes on the Eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 54.
- Mackenzie F, Ruhrberg C (2012) Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 139:1371-1380.
- Maher P, Hanneken A (2005a) Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:4796-4803.
- Maher P, Hanneken A (2005b) The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:749-757.
- Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB (2004) Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 45:3330-3336.
- Mastrodimou N, Lambrou GN, Thermos K (2005) Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 371:44-53.
- Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM (2004) Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Archives of ophthalmology* 122:1631-1640.
- Maxwell PH, Ratcliffe PJ (2002) Oxygen sensors and angiogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 13:29-37.
- Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology* 93:421-443.

- Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB (1989) In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *Journal of Cell Biology* 108:671-682.
- Murakami T, Suzuma K, Takagi H, Kita M, Ohashi H, Watanabe D, Ojima T, Kurimoto M, Kimura T, Sakamoto A, Unoki N, Yoshimura N (2006) Time-lapse imaging of vitreoretinal angiogenesis originating from both quiescent and mature vessels in a novel ex vivo system. *Investigative ophthalmology & visual science* 47:5529-5536.
- Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K (1996) The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 74:819-825.
- Mysona B, Dun Y, Duplantier J, Ganapathy V, Smith SB (2009) Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc<sup>-</sup> in mouse retinal Muller glial cells. *Cell and tissue research* 335:477-488.
- Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K (2013) Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles. *Journal of pharmacological sciences* 123:79-84.
- Nakamachi T, Matkovits A, Seki T, Shioda S (2012) Distribution and protective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the retina. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:145.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb Journal* 13:9-22.
- Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, Akita J, Samuelsson SJ, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT (2007) Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *The American journal of pathology* 171:53-67.
- Nitti M, Furfaro AL, Traverso N, Odetti P, Storace D, Cottalasso D, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C (2007) PKC delta and NADPH oxidase in AGE-induced neuronal death. *Neuroscience letters* 416:261-265.
- Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, Williamson JR (2004) Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. *Diabetes* 53:2931-2938.
- O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS (1991) Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *Journal of neurochemistry* 57:860-869.
- Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM (2000) Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture. *Experimental neurology* 161:676-685.

- Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM, Fleming TT (1999) A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival. *Journal of neuroscience methods* 87:57-65.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *Journal of molecular neuroscience* : MN 36:16-25.
- Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Viores MA, LaRochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *The American journal of pathology* 151:281-291.
- Ola MS, Alhomida AS (2014) Neurodegeneration in diabetic retina and its potential drug targets. *Current neuropharmacology* 12:380-386.
- Ola MS, Nawaz MI, Siddiquei MM, Al-Amro S, Abu El-Asrar AM (2012) Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Journal of diabetes and its complications* 26:56-64.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W (2004) Regulation and function of somatostatin receptors. *Journal of neurochemistry* 89:1057-1091.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM, Chidlow G, Graham M, Melena J (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91-147.
- Osborne NN, Larsen AK (1996) Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochemistry international* 29:263-270.
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Childlow G, Bae JH, Wood JPM, Nash MS (1999) Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Survey of ophthalmology* 43:S102-S128.
- Oshitari T, Roy S (2005) Diabetes: a potential enhancer of retinal injury in rat retinas. *Neuroscience letters* 390:25-30.
- Oshitari T, Yamamoto S, Hata N, Roy S (2008) Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology* 92:552-556.
- Oshitari T, Yoshida-Hata N, Yamamoto S (2010) Effect of neurotrophic factors on neuronal apoptosis and neurite regeneration in cultured rat retinas exposed to high glucose. *Brain research* 1346:43-51.
- Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y (1998) Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circulation research* 82:619-628.

- Palii SS, Caballero S, Jr., Shapiro G, Grant MB (2007) Medical treatment of diabetic retinopathy with somatostatin analogues. *Expert opinion on investigational drugs* 16:73-82.
- Paques M, Massin P, Gaudric A (1997) Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab* 23:125-130.
- Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ (2003) Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 46:1260-1268.
- Patel JJ, Tombran-Tink J, Hykin PG, Gregor ZJ, Cree IA (2006) Vitreous and aqueous concentrations of proangiogenic, antiangiogenic factors and other cytokines in diabetic retinopathy patients with macular edema: Implications for structural differences in macular profiles. *Experimental eye research* 82:798-806.
- Pinzon-Duarte G, Arango-Gonzalez B, Guenther E, Kohler K (2004) Effects of brain-derived neurotrophic factor on cell survival, differentiation and patterning of neuronal connections and Muller glia cells in the developing retina. *The European journal of neuroscience* 19:1475-1484.
- Plaine HL (1955) The Effect of Oxygen and of Hydrogen Peroxide on the Action of a Specific Gene and on Tumor Induction in *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 40:268-280.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D (2001) *Neuroscience*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Qaum T, Xu Q, Jousen AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, Hassessian H, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD, Adamis AP (2001) VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science* 42:2408-2413.
- Rakoczy EP, Ali Rahman IS, Binz N, Li CR, Vagaja NN, de Pinho M, Lai CM (2010) Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization. *The American journal of pathology* 177:2659-2670.
- Reiter CE, Sandirasegarane L, Wolpert EB, Klinger M, Simpson IA, Barber AJ, Antonetti DA, Kester M, Gardner TW (2003) Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 285:E763-774.
- Reiter CE, Wu X, Sandirasegarane L, Nakamura M, Gilbert KA, Singh RS, Fort PE, Antonetti DA, Gardner TW (2006) Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes* 55:1148-1156.
- Rezzola S, Belleri M, Ribatti D, Costagliola C, Presta M, Semeraro F (2013) A novel ex vivo murine retina angiogenesis (EMRA) assay. *Experimental eye research* 112:51-56.
- Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, Hart CE, Robertson JE, Westra I, Planck SR, Rosenbaum JT (1994) Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in

- proliferative retinal diseases. *Investigative ophthalmology & visual science* 35:3649-3663.
- Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, Wong TY, Kern TS (2012) Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Disease Models & Mechanisms* 5:444-456.
- Rodrigues M, Xin X, Jee K, Babapoor-Farrokhran S, Kashiwabuchi F, Ma T, Bhutto I, Hassan SJ, Daoud Y, Baranano D, Solomon S, Luty G, Semenza GL, Montaner S, Sodhi A (2013) VEGF secreted by hypoxic Muller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes* 62:3863-3873.
- Rosenstock J, Friberg T, Raskin P (1986) Effect of Glycemic Control on Microvascular Complications in Patients with Type-I Diabetes-Mellitus. *American Journal of Medicine* 81:1012-1018.
- Rowe-Rendleman C, Mitchell CK, Habrecht M, Redburn DA (1996) Expression and downregulation of the GABAergic phenotype in explants of cultured rabbit retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 37:1074-1083.
- Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, Carretero A, Nacher V, Haurigot V, George M, Llombart C, Casellas A, Costa C, Bosch A, Bosch F (2004) Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *The Journal of clinical investigation* 113:1149-1157.
- Runge EM, Hoshino N, Biehl MJ, Ton S, Rochlin MW (2012) Neurotrophin-4 is more potent than brain-derived neurotrophic factor in promoting, attracting and suppressing geniculate ganglion neurite outgrowth. *Developmental neuroscience* 34:389-401.
- Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, Darland DC, Young MJ, D'Amore PA (2008) Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PloS one* 3:e3554.
- Santiago AR, Cristovao AJ, Santos PF, Carvalho CM, Ambrosio AF (2007) High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiology of disease* 25:464-472.
- Santiago AR, Rosa SC, Santos PF, Cristovao AJ, Barber AJ, Ambrosio AF (2006) Elevated glucose changes the expression of ionotropic glutamate receptor subunits and impairs calcium homeostasis in retinal neural cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 47:4130-4137.
- Santos-Carvalho A, Elvas F, Alvaro AR, Ambrosio AF, Cavadas C (2013) Neuropeptide Y receptors activation protects rat retinal neural cells against necrotic and apoptotic cell death induced by glutamate. *Cell Death & Disease* 4:e636.
- Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, Honore JC, Kermorvant-Duchemin E, Varma DR, Tremblay S, Leduc M, Rihakova L, Hardy P, Klein WH, Mu X,

- Mamer O, Lachapelle P, Di Polo A, Beausejour C, Andelfinger G, Mitchell G, Sennlaub F, Chemtob S (2008) The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature medicine* 14:1067-1076.
- Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K (2010) Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia* 53:971-979.
- Scott A, Fruttiger M (2010) Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina. *Eye (Lond)* 24:416-421.
- Scuderi S, D'Amico AG, Castorina A, Imbesi R, Carnazza ML, D'Agata V (2013) Ameliorative effect of PACAP and VIP against increased permeability in a model of outer blood retinal barrier dysfunction. *Peptides* 39:119-124.
- Seki M, Tanaka T, Nawa H, Usui T, Fukuchi T, Ikeda K, Abe H, Takei N (2004) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes* 53:2412-2419.
- Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88:1474-1480.
- Semkova I, Huemmeke M, Ho MS, Merkl B, Abari E, Paulsson M, Jousen AM, Plomann M (2010) Retinal localization of the glutamate receptor GluR2 and GluR2-regulating proteins in diabetic rats. *Experimental eye research* 90:244-253.
- Semkova I, Kriegstein J (1999) Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res Brain Res Rev* 30:176-188.
- Shepro D, Morel NML (1993) Pericyte Physiology. *Faseb Journal* 7:1031-1038.
- Silva AP, Xapelli S, Grouzmann E, Cavadas C (2005) The putative neuroprotective role of neuropeptide Y in the central nervous system. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4:331-347.
- Simo R, Hernandez C (2012) Prevention and treatment of diabetic retinopathy: evidence from large, randomized trials. The emerging role of fenofibrate. *Rev Recent Clin Trials* 7:71-80.
- Smialowska M, Domin H, Zieba B, Kozniewska E, Michalik R, Piotrowski P, Kajta M (2009) Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists in vitro and in vivo. *Neuropeptides* 43:235-249.
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA (1994) Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 35:101-111.

- Spirin KS, Saghizadeh M, Lewin SL, Zardi L, Kenney MC, Ljubimov AV (1999) Basement membrane and growth factor gene expression in normal and diabetic human retinas. *Curr Eye Res* 18:490-499.
- Stahl A, Connor KM, Sapielha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Lofqvist C, Hellstrom A, Smith LE (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:2813-2826.
- Stefansson E (2009) Physiology of vitreous surgery. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247:147-163.
- Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME (2002) Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1205-1223.
- Stone J, Dreher Z (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *The Journal of comparative neurology* 255:35-49.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo G, Jr., Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R (2012) Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell and tissue research* 348:37-46.
- Szabadfi K, Mester L, Reglodi D, Kiss P, Babai N, Racz B, Kovacs K, Szabo A, Tamas A, Gabriel R, Atlasz T (2010) Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *International journal of molecular sciences* 11:544-561.
- Szabadfi K, Pinter E, Reglodi D, Gabriel R (2014a) Neuropeptides, trophic factors, and other substances providing morphofunctional and metabolic protection in experimental models of diabetic retinopathy. *International review of cell and molecular biology* 311:1-121.
- Szabadfi K, Szabo A, Kiss P, Reglodi D, Setalo G, Kovacs K, Tamas A, Toth G, Gabriel R (2014b) PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochemistry international* 64:84-91.
- Szabo A, Danyadi B, Bogner E, Szabadfi K, Fabian E, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gabriel R, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Kovacs K (2012) Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. *Neuroscience letters* 523:93-98.
- Takano M, Sango K, Horie H, Sato M, Iijima Y, Ohno S, Inoue S, Ishikawa Y (1999) Diabetes alters neurite regeneration from mouse retinal explants in culture. *Neuroscience letters* 275:175-178.
- Tarr JM, Kaul K, Wolanska K, Kohner EM, Chibber R (2013) Retinopathy in Diabetes. *Diabetes: An Old Disease, a New Insight* 771:88-106.
- Taylor L, Arner K, Ghosh F (2014) First Responders: Dynamics of Pre-Gliotic Muller Cell Responses in The Isolated Adult Rat Retina. *Current eye research* 1-16.

- Tee LB, Penrose MA, O'Shea JE, Lai CM, Rakoczy EP, Dunlop SA (2008) VEGF-induced choroidal damage in a murine model of retinal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology* 92:832-838.
- Thoreson WB, Witkovsky P (1999) Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 18:765-810.
- Tolosa L, Mir M, Asensio VJ, Olmos G, Llado J (2008) Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of neurochemistry* 105:1080-1090.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 153:557-562.
- Unoki N, Murakami T, Ogino K, Nukada M, Yoshimura N (2010) Time-lapse imaging of retinal angiogenesis reveals decreased development and progression of neovascular sprouting by anecortave desacetate. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:2347-2355.
- Valverde AM, Miranda S, Garcia-Ramirez M, Gonzalez-Rodriguez A, Hernandez C, Simo R (2013) Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy. *Molecular vision* 19:47-53.
- Vasilaki A, Mouratidou M, Schulz S, Thermos K (2002) Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* 43:899-909.
- Verbraak FD (2014) Neuroretinal degeneration in relation to vasculopathy in diabetes. *Diabetes* 63:3590-3592.
- Veves A, King GL (2001) Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *The Journal of clinical investigation* 107:1215-1218.
- Villarroel M, Ciudin A, Hernandez C, Simo R (2010) Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World journal of diabetes* 1:57-64.
- Villeneuve LM, Reddy MA, Natarajan R (2011) Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 38:451-459.
- Vujosevic S, Midena E (2013) Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and Muller cells alterations. *Journal of Diabetes Research* 2013:905058.
- Wachtmeister L (1998) Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* 17:485-521.
- Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ (2010) Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes* 59:2297-2305.

- Wang Y, Vom Hagen F, Pfister F, Bierhaus A, Feng Y, Gans R, Hammes HP (2008) Receptor for advanced glycation end product expression in experimental diabetic retinopathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1126:42-45.
- Wegner M, Neddermann D, Piorunska-Stolzmann M, Jagodzinski PP (2014) Role of epigenetic mechanisms in the development of chronic complications of diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 105:164-175.
- White NH, Sun W, Cleary PA, Danis RP, Davis MD, Hainsworth DP, Hubbard LD, Lachin JM, Nathan DM (2008) Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial. *Archives of ophthalmology* 126:1707-1715.
- Whitmire W, Al-Gayyar MMH, Abdelsaid M, Yousufzai BK, El-Remessy AB (2011) Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Molecular vision* 17:300-308.
- Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW (1994) Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* 5:1485-1488.
- Wilkinson-Berka JL (2006) Angiotensin and diabetic retinopathy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38:752-765.
- Wirotko BM (2007) Vascular endothelial growth factor. *Ophthalmology* 114:1954-1955.
- Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schlingemann RO (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22:1-29.
- Xi X, Gao L, Hatala DA, Smith DG, Codispoti MC, Gong B, Kern TS, Zhang JZ (2005) Chronically elevated glucose-induced apoptosis is mediated by inactivation of Akt in cultured Muller cells. *Biochemical and biophysical research communications* 326:548-553.
- Xin H, Yannazzo JA, Duncan RS, Gregg EV, Singh M, Koulen P (2007) A novel organotypic culture model of the postnatal mouse retina allows the study of glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of neuroscience methods* 159:35-42.
- Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T (2006) Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) system in diabetic retinopathy. *Curr Drug Discov Technol* 3:83-88.
- Yang JH, Guo Z, Zhang T, Meng XX, Sun T, Wu J (2013) STZ treatment induced apoptosis of retinal cells and effect of up-regulation of calcitonin gene related peptide in rats. *Journal of diabetes and its complications* 27:531-537.
- Yang XJ (2004) Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 15:91-103.
- Yilmaz T, Weaver CD, Gallagher MJ, Cordero-Coma M, Cervantes-Castaneda RA, Klisovic D, Lavaque AJ, Larson RJ (2009) Intravitreal triamcinolone acetonide injection for treatment

- of refractory diabetic macular edema: a systematic review. *Ophthalmology* 116:902-911; quiz 912-903.
- Zelina P, Avci HX, Thelen K, Pollerberg GE (2005) The cell adhesion molecule NrCAM is crucial for growth cone behaviour and pathfinding of retinal ganglion cell axons. *Development* 132:3609-3618.
- Zeng XX, Ng YK, Ling EA (2000) Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual neuroscience* 17:463-471.
- Zhang SS, Fu XY, Barnstable CJ (2002) Tissue culture studies of retinal development. *Methods* 28:439-447.
- Zhang X, Wang N, Barile GR, Bao S, Gillies M (2013) Diabetic retinopathy: neuron protection as a therapeutic target. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45:1525-1529.
- Zheng L, Kern TS (2009) Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:3974-3987.
- Zhou X, Su CF, Zhang Z, Wang CY, Luo JQ, Zhou XW, Cai L, Yan L, Zhang W, Luo HM (2014) Neuroprotective effects of methyl 3,4-dihydroxybenzoate against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in RGC-5 cells. *Journal of pharmacological sciences* 125:51-58.
- Zong H, Ward M, Stitt AW (2011) AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Current diabetes reports* 11:244-252.