

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

“FARMACOLOGIA E BIOCHIMICA DELLA MORTE CELLULARE”

XXII Ciclo

Caratterizzazione del profilo neurochimico, neuropatologico e neurofarmacologico di un modello sperimentale di glaucoma acuto

Settore Scientifico Disciplinare: BIO\14 Farmacologia

Coordinatore

Chiar.mo Prof.
Giacinto Bagetta

Relatore

Chiar.mo Prof.

Luigi Antonio Morrone

Dottoranda

Dott.ssa Federica Cavaliere

Anno Accademico 2009/2010

Indice

Sommario	1
Abstract	3
1 Introduzione	5
1.1 Glaucoma	5
1.1.1 Epidemiologia	5
1.1.2 Classificazione	6
1.1.3 Teorie patogenetiche: l'ipotesi meccanica e l'ipotesi vascolare	7
1.2 Cenni di anatomia e fisiologia oculare	8
1.2.1 Fisiologia della produzione e del deflusso dell'umor acqueo	10
1.3 Organizzazione strutturale e funzionale del tessuto nervoso retinico	13
1.3.1 Vascolarizzazione della retina	19
1.4 Ischemia retinica e patologie correlate	21
1.4.1 Morte cellulare ed ischemia	22
1.5 La trasmissione glutammatergica	24
1.6 Eccitotossicità	27
1.6.1 Meccanismi molecolari	29
1.7 Meccanismi di produzione dei radicali liberi	33
1.7.1 Target proteici dei ROS nell'ischemia retinica	38
1.8 Effetti neuroprotettivi degli scavenger dei radicali liberi	40
1.8.1 Effetti antiossidanti degli estrogeni	41
1.9 Modelli sperimentali di ischemia retinica	43
2 Scopo della tesi	46
3 Materiali e Metodi	48
3.1 Animali	48
3.2 Ischemia retinica	48

3.3	Microdialisi	49
3.4	Analisi aminoacidica dei microdializzati	50
3.5	Trattamento farmacologico	51
3.6	Marcatura delle RGC e conta cellulare	52
3.7	Sinaptosomi e considerazioni metodologiche	54
	3.7.1 Preparazione dei sinaptosomi	55
	3.7.2 Esperimenti di rilascio di trasmettitore da sinaptosomi	56
	3.7.3 Esperimenti di uptake su sinaptosomi	58
3.8	Preparazione degli estratti proteici totali	58
3.9	Preparazione degli estratti retinici sinaptosomiali	59
3.10	Western Blotting	60
3.11	Calcoli per esperimenti di rilascio	61
3.12	Calcoli per esperimenti di uptake	61
3.13	Analisi statistica	62
4	Risultati	63
4.1	Modulazione dei livelli di glutammato nella retina di ratto sottoposta ad ischemia/riperfusione	63
4.2	L'attività delle calpaine è modulata dall'ischemia/riperfusione nella retina	64
4.3	Il trattamento intravitreale con MK801 previene l'attivazione della calpaina indotta dall'aumento della IOP	67
4.4	L'ischemia/riperfusione determina la perdita selettiva delle RGC	68
4.5	Il coenzima Q10 previene la perdita delle RGC indotta dall'ischemia/riperfusione	70
4.6	Il 17β-estradiolo riduce i livelli di glutammato osservati in corso di ischemia/riperfusione	72
4.7	Il 17α-estradiolo riduce i livelli extracellulari di glutammato nella fase tardiva della riperfusione	75
4.8	L'ischemia/riperfusione riduce il rilascio di [3H]D-Aspartato mediato dal trasportatore in sinaptosomi retinici	77

4.9	L'uptake di [³ H]D-Aspartato è ridotto in corso di riperfusione	79
4.10	L'schemia/riperfusione modifica il contenuto proteico di GLT1 nei terminali nervosi retinici	80
5	Discussione	82
	Bibliografia	94
	Produzione Scientifica	118

Sommario

Il glaucoma è un'otticopatìa progressiva caratterizzata dalla perdita delle cellule ganglionari retiniche (RGC) a cui si associano alterazioni delle funzioni visive. La patologia glaucomatosa rappresenta la seconda causa di cecità irreversibile nel mondo e risulta essere una malattia dal grave impatto sociale ed economico. Il principale fattore di rischio nell'insorgenza del glaucoma è rappresentato dall'aumento pressorio intraoculare e l'attuale terapia farmacologica si basa pertanto sull'uso di farmaci ipotonizzanti. Tuttavia, a dispetto dell'adeguato controllo del tono intraoculare, non sempre il trattamento farmacologico si concretizza in un effetto neuroprotettivo. La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della morte delle RGC è pertanto fondamentale per individuare nuovi *target* molecolari che permettano di prevenire la perdita delle cellule ganglionari. Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* indicano un coinvolgimento dell'eccitotossicità nella patogenesi del glaucoma. Tuttavia, dati discordanti sono presenti in letteratura riguardo al ruolo svolto dal glutammato nello sviluppo e progressione del glaucoma. Il presente lavoro ha pertanto avuto lo scopo di studiare e modulare i livelli di glutammato in un modello sperimentale di glaucoma ad angolo acuto basato sull'ischemia retinica indotta dall'aumento transitorio della pressione intraoculare. In tale modello, i livelli di glutammato, monitorati prima, durante e dopo l'insulto ischemico sono risultati essere significativamente aumentati sia nella fase precoce (10min) che tardiva (150min) della ri-perfusione. L'aumento di glutammato è stato accompagnato alla precoce e sostenuta attivazione delle calpaine e alla perdita significativa, a 7 giorni di ri-perfusione, del 25.9% delle RGC. Il trattamento con farmaci

antiossidanti, quali il coenzima Q10, ha significativamente ridotto i livelli di glutammato in corso di riperfusione e conseguentemente prevenuto la perdita cellulare tipicamente osservata negli animali soggetti ad ischemia retinica. Altri farmaci con attività antiossidante e neuroprotettiva, quali il 17β ed il 17α -estradiolo, che presentano attività antiossidanti a dosi sovralfisiologiche, sono stati in grado di prevenire l'aumento intravitreale di glutammato. Per escludere il coinvolgimento di un'azione recettore-mediata del 17β -estradiolo, nel prevenire l'accumulo di glutammato, è stato valutato l'effetto del pre-trattamento con ICI 182-780. L'antagonista recettoriale ha revertito l'effetto dell'estrogeno nella fase precoce della riperfusione, ma non in quella tardiva. Questo dato, in accordo con il dato ottenuto dal trattamento con il coenzima Q10, ha confermato l'ipotesi di un coinvolgimento dello stress ossidativo nell'aumento dei livelli di glutammato osservato in fase di riperfusione. I meccanismi molecolari che sottendono all'aumento di glutammato, in corso di riperfusione, sono stati successivamente studiati *ex-vivo* in preparazioni sinaptosomiali. I risultati ottenuti hanno dimostrato un ridotto coinvolgimento dei trasportatori del glutammato nei meccanismi di rilascio indotto da KCl 15 mM in sinaptosomi provenienti da retine sottoposte ad ischemia e riperfusione. Inoltre, nelle stesse condizioni sperimentali, anche la capacità di *uptake* è risultata ridotta. Questa riduzione è sostenuta dalla minore espressione del trasportatore neuronale GLT1. In conclusione, i dati presentati in questo lavoro, sostengono il ruolo centrale del glutammato e dello stress ossidativo nella morte delle RGC indotta dall'ischemia e dimostrano che l'aumento di glutammato, osservato *in vivo*, è direttamente correlato al minore *uptake*, sostenuto dalla ridotta espressione dei GLT1.

Abstract

Glaucoma is a leading cause of irreversible blindness characterized by the progressive loss of retinal ganglion cells (RGCs). Elevated intraocular pressure is a major risk factor for glaucoma; however, medical therapies aimed to reduce intraocular pressure, are not always successful blocking the glaucoma-associated retinal degeneration. This observation suggests that mechanisms other than intraocular pressure are also implicated in glaucomatous neurodegeneration. Experimental evidences suggest that alteration of glutamate homeostasis contributes to retinal dysfunction and neuropathy. However, the involvement of excitotoxicity in RGCs loss is still controversial. Therefore, the aim of the present study was to investigate the modulation of intravitreal glutamate levels in high intraocular pressure (IOP) induced ischemia, an established animal model that recapitulates features of acute angle closure glaucoma. Using this experimental model we monitored extracellular glutamate in the vitreous of rat before, during and after high IOP-induced ischemia. A significant increase of extracellular glutamate occurred during reperfusion, 10 and 150 minutes after ischemia. In our experimental setting, calpain activation is detected in the retina explants early after ischemia. Excess activation of calpain caused deleterious effects on RGCs, in fact we have observed 25.9% loss of cells in the RGCs layer at 7 days of the reperfusion. A pre-treatment with coenzyme Q10 prevented retinal ganglion cells loss and inhibited the increase of glutamate observed in the vitreous during reperfusion. In addition, systemic pre-treatment with 17α and 17β -

estradiol, endowed with neuroprotective and antioxidant properties, minimized the elevation of glutamate observed during the reperfusion period. The reported effects seem to be only in part mediated by the activation of the estrogen receptor, since a pre-treatment with ICI 182-780, a specific estrogen receptor antagonist, partially counteracts the effect afforded by the estrogen in the early phase of reperfusion. In order to investigate the mechanisms supporting the observed increase of extracellular glutamate levels we performed *ex-vivo* experiments using synaptosomes prepared from the retina of rats subjected to high IOP-induced ischemia. Continuous superfusion of synaptosomes allowed a direct measurement of release and mechanisms involved. These data obtained indicated a reduced involvement of glutamate transporters in the mechanisms of release induced by KCl 15 mM in ischemic synaptosomes. In addition, in the same experimental conditions also the *uptake* is reduced. This is supported by reduced expression of the neuronal transporter GLUT1.

Altogether these data, straighten the role of glutamate and oxidative stress in ischemia-induced RGCs death and demonstrate that the observed increase of intravitreal glutamate is associated to a reduction of the *uptake* and GLUT1 expression.

1. Introduzione

1.1 Glaucoma

Il termine glaucoma indica delle entità cliniche eterogenee accomunate dalla comparsa di un'otticopatia progressiva caratterizzata dalla esclusiva perdita delle cellule ganglionari retiniche (RGC) e da una tipica escavazione della papilla ottica a cui si associano alterazioni delle funzioni visive. Questa condizione patologica colpisce circa 70 milioni di persone nel mondo e, tra questi, 7 milioni soffrono di cecità bilaterale (Quingley, 1996). La patologia glaucomatosa ha un'incidenza annua dello 0,025% e colpisce maggiormente soggetti al di sopra dei 40 anni, con una prevalenza negli individui di sesso maschile e di razza nera (Wensor et al., 1998). Pertanto, il glaucoma rappresenta la seconda causa di cecità irreversibile nel mondo e risulta essere una patologia dal grave impatto sociale ed economico (Klein et al., 1992; Rylander et al., 2008).

1.1.1 Epidemiologia

Sebbene il più importante fattore di rischio per lo sviluppo del danno glaucomatoso sia rappresentato dall'aumento pressorio intraoculare, la patogenesi del glaucoma riconosce una eziologia multifattoriale. Esistono infatti altri fattori causali che sono considerati importanti nell'insorgenza dell'otticopatia, tra questi, concorrono in misura differente, le anomalie vascolari, l'alterazione della pressione di perfusione

(Casson et al., 2006; Quaranta et al., 1994), la familiarità, il diabete, il fumo (Bonovas et al 2004 a, b) e la struttura del nervo ottico (Tielsch et al., 1994). I fattori elencati hanno quasi tutti una base genetica multifattoriale a penetranza variabile (Tielsch et al., 1994) e sembrano essere il substrato su cui meglio si sviluppa la malattia glaucomatosa. I soggetti con un'elevata miopia, inoltre, presentano un rischio più elevato rispetto ai soggetti non miopi (Wilson et al., 1987).

I fattori di rischio elencati giustificano la presenza di soggetti affetti da glaucoma a pressione normale così come di soggetti con elevato tono endoculare, i quali non svilupperanno necessariamente riduzione del campo visivo per un danno alla retina e al nervo ottico.

1.1.2 Classificazione

È possibile distinguere due principali tipologie di glaucoma: i glaucomi primari ed i secondari.

I glaucomi primari sono quelli che non riconoscono evidenti contributi causali da parte di altre affezioni a sede sia oculare che sistemica ed in cui i meccanismi eziologici dell'ipertono (quando presente) risiedono esclusivamente a livello della camera anteriore e della via di deflusso trabecolare. Queste forme sono generalmente bilaterali e con decisa impronta genetica e familiare (vedi Fuse, 2010). In questo gruppo è possibile identificare una quota in cui l'otticopatìa progredisce pur in assenza di un franco ipertono (glaucoma a pressione normale). I glaucomi primari comprendono: il glaucoma congenito

primario, il glaucoma ad angolo aperto (forma che si manifesta prevalentemente nella popolazione caucasica ed africana) ed il glaucoma ad angolo chiuso (la forma prevalente tra gli asiatici e gli esquimesi). Quest'ultimo tipo si manifesta in individui particolarmente suscettibili che possiedono di per sè un angolo camerale stretto; tale forma è caratterizzata da un rapido ed elevato aumento della pressione intraoculare con valori tra 60 e 100 mmHg associato a dolore intenso.

I glaucomi secondari presentano invece una o più entità causali oculari o sistemiche identificabili, che provocano la comparsa dell'ipertono e dell'otticopatia. Possono essere sia mono che bilaterali; in alcuni casi possiedono caratteri di trasmissione genetica, in altri hanno carattere acquisito sporadico. Nella gran maggioranza dei casi l'aumento della pressione intraoculare è dovuto all' ostruzione delle normali vie di deflusso dell'umor acqueo.

1.1.3 Teorie patogenetiche: l'ipotesi meccanica e l'ipotesi vascolare

I meccanismi alla base della degenerazione delle RGC non sono ancora del tutto chiari, tuttavia le principali teorie patogenetiche sono due: la teoria meccanica e la teoria vascolare (vedi Nickell, 2007).

Secondo la teoria meccanica, l'ipertensione oculare cronica determinerebbe direttamente sulla neuroretina, ed in particolar modo sulle fibre assionali delle RGC, una interruzione del flusso assoplasmatico che si eserciterebbe soprattutto a livello dell'anello

sclerale di Elschnig e dei pori della lamina cribrosa sclerale, causando, in ultima analisi, la morte delle cellule ganglionari (Quigley et al., 1981).

Secondo la teoria vascolare/ischemica invece, un deficit di perfusione a carico della papilla ottica potrebbe indurre un'atrofia della componente nervosa papillare con conseguente insorgenza e progressione dell'otticopatìa glaucomatosa. Quest'ultima teoria, in particolar modo, potrebbe spiegare, meglio della precedente, i casi di glaucoma a pressione normale (Shields & Wadsworth, 1977).

1.2 Cenni di anatomia e fisiologia oculare

L'occhio umano è un organo sensoriale costituito da un complesso di formazioni anatomiche altamente specializzate.

Il globo oculare è costituito da tre membrane sovrapposte (Fig. 1). La prima membrana (o tunica esterna) forma il guscio oculare ed è costituita dalla sclera e dalla cornea. La sclera, una membrana fibrosa dura ed opaca, di colore bianco, ha prettamente una funzione meccanica. La cornea, invece, è una membrana trasparente, convessa, attraverso la quale la luce penetra all'interno dell'occhio ed è separata dalla sclera da una limitata area di transizione, il *limbus* sclerocorneale.

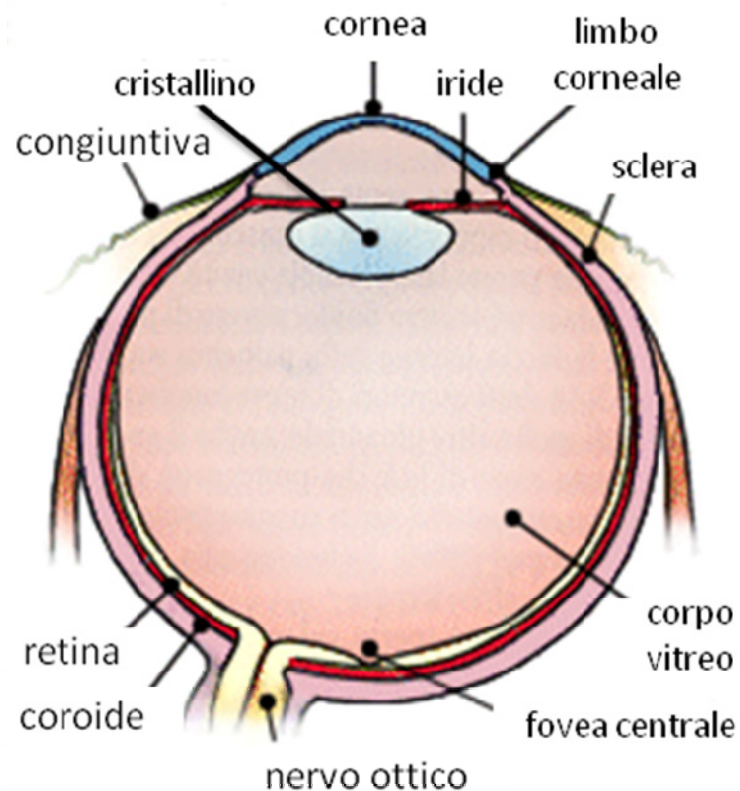


Figura 1. *Sezione verticale dell'occhio adattata da www.europtical.it*

All'interno della membrana fibrosa è applicata la tonaca vascolare (uvea), ricca di vasi sanguigni e di pigmento scuro. Questa, nella parte posteriore del bulbo ha una disposizione semplice e regolare e prende il nome di coroide; anteriormente si presenta come una struttura più complicata a formare il corpo ciliare e, più avanti, l'iride. Quest'ultimo è un diaframma con un forame centrale circolare, la pupilla, la cui funzione è quella di regolare la quantità di luce che entra nell'occhio. La più profonda delle tre membrane, la retina, è di natura nervosa e da essa origina il nervo ottico.

All'interno del globo oculare, fra cornea ed iride si trova uno spazio, la camera anteriore, riempito di un liquido incolore che prende il nome di umor acqueo. Posteriormente alla camera anteriore, dietro l'iride e la pupilla, è localizzato il cristallino, un corpo trasparente e biconvesso, connesso con la regione ciliare per mezzo di un particolare apparato sospensore. Tra l'iride, il corpo ciliare ed il cristallino è compreso uno spazio anulare, la camera posteriore, comunicante con la camera anteriore per mezzo della pupilla, contenente anch'esso umor acqueo.

L'umor acqueo ha tre funzioni principali:

- nutritiva per il bulbo
- statica, di regolazione della pressione intraoculare
- di rimozione dei residui metabolici.

Un eccessivo accumulo di umor acqueo all'interno del bulbo oculare determina un aumento della sua pressione, l'ipertono che ne consegue rappresenta, come detto precedentemente, il principale fattore di rischio per lo sviluppo della patologia glaucomatosa.

1.2.1 Fisiologia della produzione e del deflusso dell'umor acqueo

L'umore acqueo è prodotto dall'epitelio bistratificato dei processi ciliari al volume di 2.0-3.5 microlitri al minuto (Brubaker, 1991) e quindi riversato nella camera posteriore. Com'è noto, il movimento di fluidi attraverso le membrane biologiche coinvolge

meccanismi fisici (trasporto passivo), biochimici (trasporto attivo) o meccanismi combinati.

La produzione dell'umor acqueo a livello dei processi ciliari avviene mediante due meccanismi: l'ultrafiltrazione per effetto della pressione idrostatica e la secrezione attiva energia-dipendente (Morrison & Pollack, 2003). L'ultrafiltrazione è regolata dal gradiente pressorio esistente tra i capillari e lo stroma dei processi ciliari; tale processo è influenzato dall'aumento della pressione intraoculare (IOP), il cui valore fisiologico è compreso fra 14 ed 20 mmHg. La secrezione attiva è, invece, pressoché indipendente dalla pressione intraoculare e dipende dal trasporto unidirezionale di soluti (Soto et al., 2004) che sono seguiti passivamente dall'acqua per un gradiente di concentrazione osmotica. I meccanismi attivi spiegano la maggiore concentrazione nell'umor acqueo di sostanze come sodio, cloro, acido ascorbico, acido lattico (Krupin et al., 1996) e sebbene i dati sperimentali in merito non siano univoci, si può ritenere che la secrezione attiva partecipi per circa l'80-90% alla produzione totale di umor acqueo (Bill, 1975). Inoltre, i capillari dei processi ciliari sono altamente permeabili pertanto, l'ultrafiltrato risulta essere anche ricco di proteine: circa il 60% di quelle presenti nel plasma (Bill, 1968). L'umore acqueo prodotto passa poi, attraverso il forame pupillare, nella camera anteriore da cui viene allontanato a livello dell'angolo camerulare (irido-corneale), attraversando una struttura cribriforme, detta trabecolato, per arrivare ad un canale circonferenziale (su 360°) posto nello spessore sclerale a ridosso delle strutture angolari: il canale di Schlemm (figura 2) (vedi Morrison & Pollack, 2003).

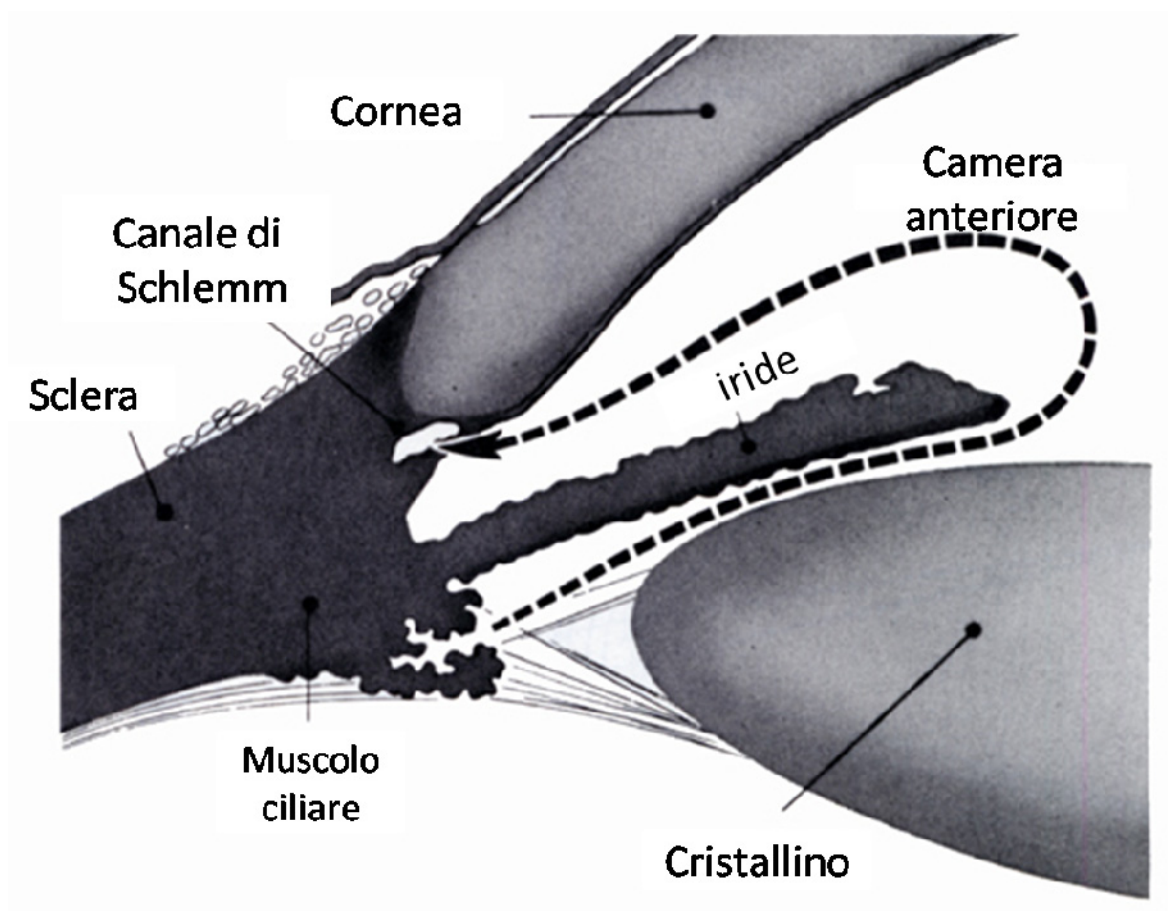


Figura 2. *La circolazione intraoculare dell'umor acqueo.* La freccia tratteggiata indica il percorso dell'umor acqueo che, prodotto dai processi ciliari a livello dell'angolo retro irideo (angolo cilio-irideo), si riversa nella camera posteriore per trasferirsi, lungo il corridoio irido-lenticolare, nella camera anteriore prima e nel canale di Schlemm dopo. Modificato da: *The ophthalmic assistant, Stein, Slatt ed. Mosby 1976.*

Dal canale di Schlemm l'umore acqueo viene convogliato, attraverso dei collettori radiali o vene acquose, verso la circolazione episclerale e quindi allontanato dall'occhio (via trabecolare o convenzionale). Accanto al deflusso trabecolare esiste una via accessoria, o uveo-sclerale, mediante la quale l'umore acqueo viene eliminato percolando attraverso gli spazi interstiziali connettivali della radice iridea, della banda ciliare e della faccia anteriore del corpo ciliare, e da qui nello spazio sovracoroideale e poi attraverso la

sclera. Tale via accessoria provvede, in condizioni fisiologiche, al 5-20% del deflusso acqueo totale (Sagara et al., 1999).

1.3 Organizzazione strutturale e funzionale del tessuto nervoso retinico

La retina dei vertebrati pur presentando, in tutta la sua estensione, una struttura stratificata ordinata, manifesta la stessa complessità funzionale dei centri cerebrali superiori (Bagnoli et al., 2003; Bloomfield & Dacheux, 2001; Kolb et al., 2001; Masland, 2001a,b). Essa è composta da cinque tipi neuronali principali: i fotorecettori (distinti in coni e bastoncelli), le cellule bipolari, le cellule orizzontali, le cellule amacrine e le cellule ganglionari (vedi fig. 3).

Oltre ai tipi cellulari elencati è presente una componente gliale rappresentata dalle cellule di Müller, le quali fungono da “spina dorsale” per la disposizione dei neuroni (Poitry et al, 2000). Complessivamente, si tratta di una struttura organizzata in strati, con strati nucleari, all’interno dei quali sono presenti i corpi cellulari, separati da strati plessiformi, all’interno dei quali si realizzano le connessioni sinaptiche. Gli strati nucleari rappresentano i neuroni di primo, secondo e terzo ordine delle vie ottiche.

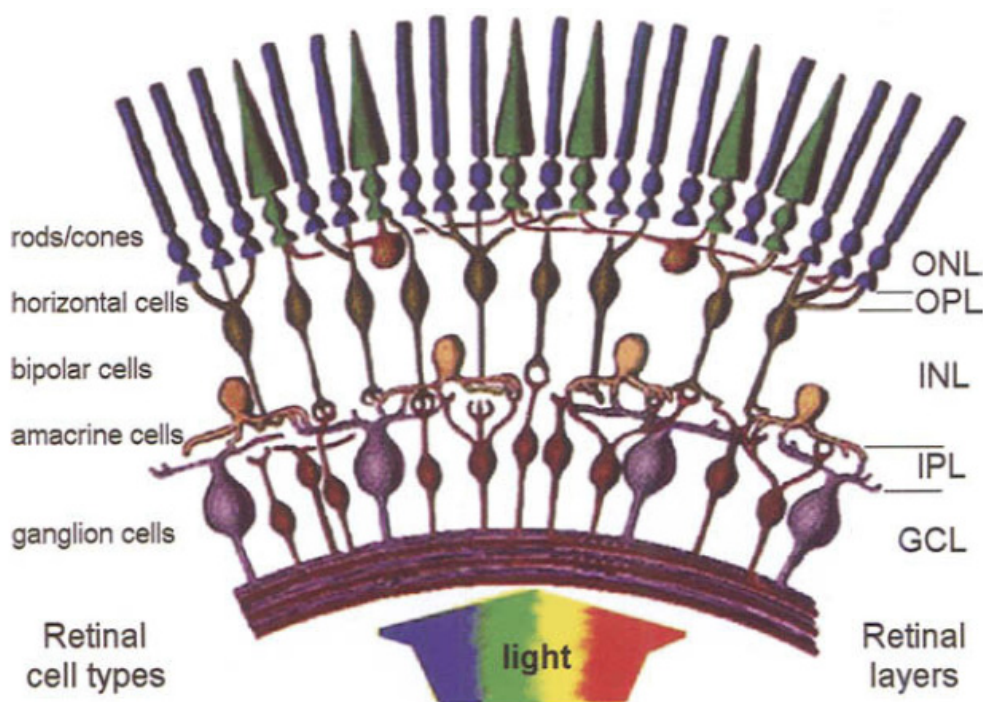


Figura 3. *Organizzazione della retina dei vertebrati.* Il diagramma schematico rappresenta i differenti tipi cellulari (indicati a sinistra) localizzati nei diversi strati retinici (indicati a destra). Le pathway verticali di trasduzione del segnale, che usano il glutammato come neurotrasmettitore, contengono i fotorecettori (coni e bastoncelli) che iniziano il segnale, le cellule bipolari e le cellule ganglionari. Le cellule orizzontali e le cellule amacrine costituiscono delle pathway laterali inibitorie. I fotorecettori sono presinaptici alle cellule orizzontali e bipolari nello strato plessiforme esterno (OPL). I terminali delle cellule bipolari creano connessioni sinaptiche con i dendriti delle amacrine e delle ganglionari nello strato plessiforme interno (IPL). ONL, strato nucleare esterno; INL, strato nucleare interno; GCL, cellule ganglionari. Adattata da: The Vertebrate Retina di Victoria P. Connaughton edited by Santokh Gill and Olga Pulido Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2005

I neuroni di primo ordine, i fotorecettori, i cui corpi cellulari formano lo strato nucleare esterno (ONL), ricevono il segnale luminoso ed iniziano la cascata di trasduzione del segnale visivo. La concentrazione di fotorecettori è più elevata in una zona che prende il nome di *macula lutea*, così chiamata perché gli strati maculari interni sono permeati da un pigmento giallognolo. Al centro della macula lutea, in perfetta opposizione alla pupilla,

si trova la *fovea centralis*, che corrisponde alla regione di massima acutezza visiva dell'occhio.

Proseguendo verso il corpo vitreo (quindi verso la retina interna), si trovano i nuclei delle cellule di Muller, delle cellule bipolari, orizzontali e delle cellule amacrine che, nel loro insieme, costituiscono lo strato nucleare interno (INL). In particolare, le cellule amacrine sono presenti nella porzione più interna dello strato nucleare interno, mentre le cellule orizzontali nella porzione più esterna.

Le cellule bipolari, dal punto di vista funzionale, sono divise in due tipologie principali: le cellule ON e quelle OFF. Questa divisione è fatta in funzione del tipo di risposta che le due tipologie di cellule danno quando vengono investite dalla luce: le cellule bipolari ON si depolarizzano mentre, al contrario, le OFF si iperpolarizzano. Si ritiene che la diversa risposta delle cellule bipolari alla luce sia il risultato di un complesso meccanismo che dipende dalla diversa espressione dei recettori del glutammato presenti su di esse. In particolare, le cellule bipolari ON esprimono i recettori metabotropici (mGluR6 soprattutto) a livello della sinapsi con i fotorecettori, mentre le cellule bipolari OFF esprimono i recettori ionotropici del glutammato (Brandstätter et al., 1997; DeVries, 2000; Hack et al., 1999, 2001; Haverkamp et al., 2001; Vardi et al., 2000).

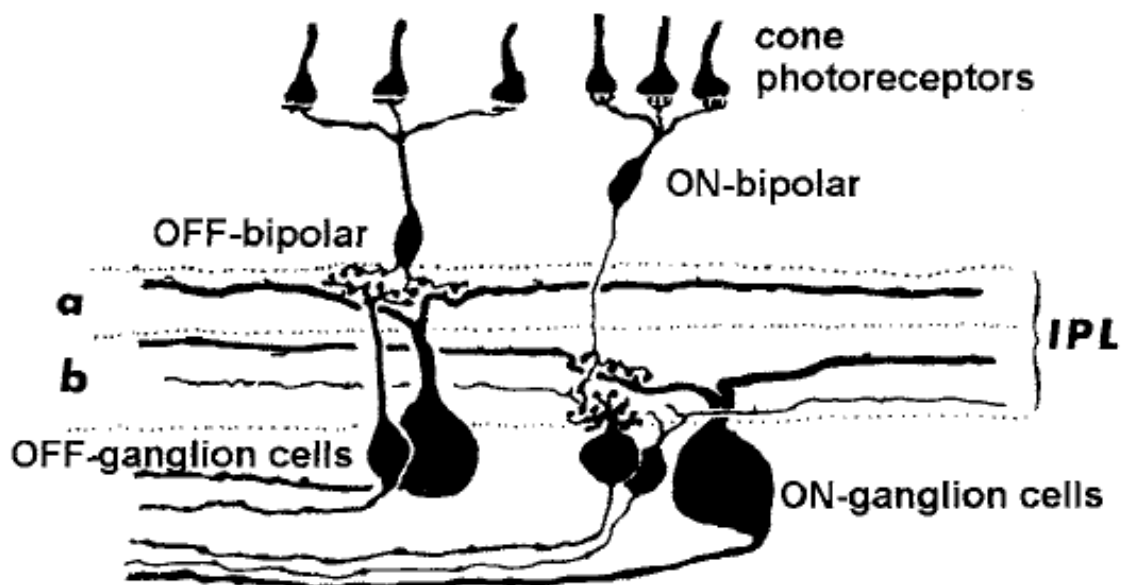


Figura 4. *Disposizione spaziale dei neuroni retinici ON and OFF. I terminali assiali delle cellule bipolari OFF sono localizzati nella zona distale dello strato plessiforme interno (IPL) (lamina a) dove entrano in contatto con i dendriti delle cellule ganglionari OFF. Al contrario, i bottoni sinaptici delle cellule bipolari ON sono localizzati nella metà prossimale dell'IPL (lamina b), dove sono presinaptici alle cellule amacrine e ganglionari di tipo ON (Modificata da Nelson et al., 1978; figure 1).*

Lo strato nucleare interno è confinato tra due strati plessiformi, così da permettere connessioni sia con lo strato dei fotorecettori che con lo strato più interno delle cellule ganglionari.

Da queste semplici considerazioni anatomiche consegue che i coni ed i bastoncelli entrano in sinapsi con le cellule bipolari ed orizzontali nello strato plessiforme esterno mentre le cellule bipolari ed amacrine dello strato nucleare interno, entrano in sinapsi con i dendriti delle cellule ganglionari nello strato plessiforme interno. La differenziazione in cellule ON ed OFF viene mantenuta: infatti le cellule ganglionari OFF ricevono input

dalle bipolari OFF mentre le cellule ganglionari ON ricevono input dalle bipolari ON (Figura 4) (Kolb et al., 1981).

La connessione tra fotocettori, cellule bipolari e cellule ganglionari viene definita *pathway* verticale di trasduzione del segnale visivo. Il neurotrasmettitore rilasciato dagli elementi cellulari di questa via è il glutammato e la *pathway* è modulata dalle cellule orizzontali, a livello dello strato plessiforme esterno, e dalle cellule amacrine, a livello dello strato plessiforme interno (Dowling, 1987).

Le informazioni visive così elaborate, si dipartono dalla retina verso i centri nervosi superiori per mezzo di un'unica popolazione neuronale: le cellule ganglionari. Gli assoni di circa 1 milione di cellule ganglionari convergono a formare il nervo ottico che procede verso il diencefalo (Martini et al., 2008). Nel punto in cui il nervo ottico penetra nel bulbo oculare si trova una piccola zona rotonda di retina priva di cellule fotosensibili, la papilla ottica, che rappresenta il punto cieco dell'occhio.

I due nervi ottici, provenienti dalle due orbite, si uniscono in un incrocio detto chiasma. Dal chiasma ottico si separano nuovamente con uno scambio di fibre nervose, in modo che una parte delle fibre provenienti dall'occhio destro proietti ai centri cerebrali superiori controlaterali. Lo stesso, simmetricamente, accade per il nervo emergente dall'occhio sinistro.

Le informazioni veicolate dai tratti ottici hanno fondamentalmente 3 destinazioni: il pretetto, il collicolo superiore ed il corpo genicolato laterale. Le prime due aree sono responsabili, rispettivamente, delle risposte vegetative connesse con l'apparato visivo e

dell'integrazione dei diversi segnali sensoriali. Solo le fibre nervose che decorrono al corpo genicolato laterale del talamo sono proiettate alla corteccia visiva. In particolare, da questa stazione talamica, l'informazione visiva viene proiettata intorno alla scissura calcarina (corteccia visiva) (figura 5). L'insieme degli assoni tesi tra queste due strutture prende il nome di via genicolo-calcarina o radiazione ottica. La radiazione visiva assume un aspetto a "ventaglio", con il "manico" posto nel corpo genicolato laterale e con il bordo perpendicolare alla scissura calcarina. Di fatto, le informazioni provenienti dalla metà superiore del campo visivo vengono proiettate al labbro inferiore (rispetto alla scissura calcarina) della corteccia visiva, mentre le informazioni provenienti dalla metà inferiore del campo visivo sono proiettate al labbro superiore (vedi Kandel et al., 2007).

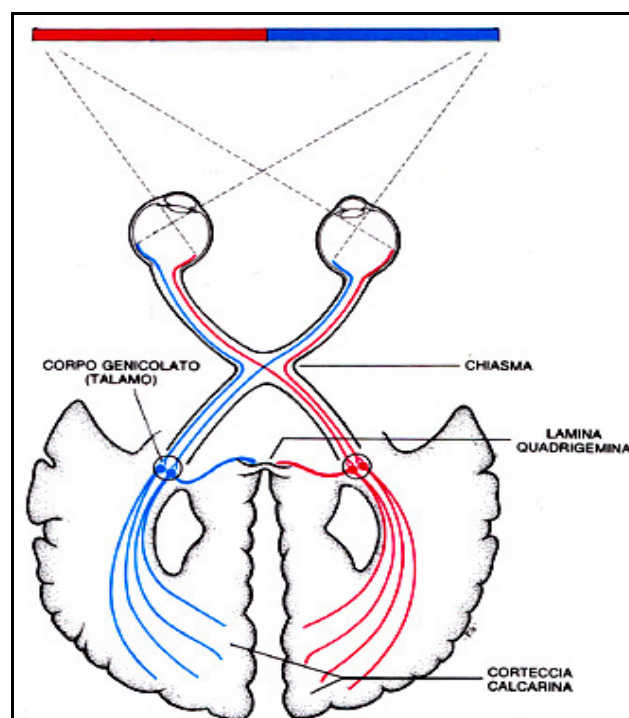


Figura 5. *Schema dei nervi ottici adattata da users.unimi.it*

1.3.1 Vascolarizzazione della retina

La retina è un tessuto particolarmente attivo dal punto di vista metabolico e presenta una richiesta di ossigeno superiore a quella di altri tessuti (Cohen & Noell, 1965) confrontabile solo con quella dei centri cerebrali superiori (Ames, 1992). La sua integrità funzionale e strutturale dipende, pertanto, dal regolare apporto di ossigeno, mediato da due letti capillari indipendenti, stratificati l'uno sulla faccia interna (sistema dell'arteria retinica centrale) e l'altro sulla faccia esterna della neuroretina (sistema della coriocapillare). L'intero flusso sanguigno dell'occhio deriva dall'arteria oftalmica, una branca di primo ordine dell'arteria carotide interna (figura 6).

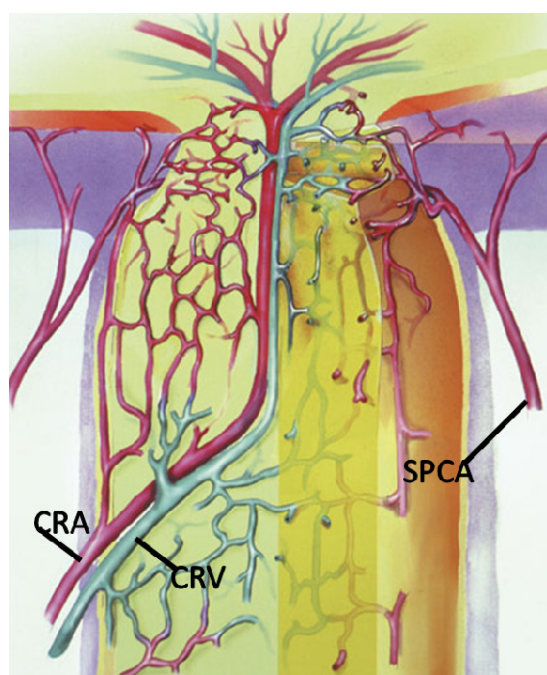


Figura 6. *Rappresentazione schematica del flusso sanguigno del nervo ottico e della testa del nervo ottico.* CRA, arteria retinica centrale; CRV, vena retinica centrale; SPCA, arterie ciliari posteriori corte. Modificata da *Glaucoma Science and Practice* di Morrison & Pollack (2003).

L'arteria oftalmica entra nell'orbita attraverso il canale ottico e qui si divide in branche, l'esatto ordine delle quali può essere variabile. In generale queste includono: l'arteria retinica centrale, le due arterie ciliari posteriori e le arterie muscolari.

L'arteria retinica centrale entra, insieme al nervo ottico, immediatamente dietro l'occhio a livello della papilla e si divide nelle arterie papillari superiore ed inferiore, che a loro volta si dividono nelle branche nasali e temporali. Questi 4 rami raggiungono la periferia della retina senza contrarre anastomosi. Le arterie e le arteriole retiniche sono presenti nella retina interna, mentre solo i capillari sono presenti profondamente, sino a livello dello strato nucleare interno (vedi Osborne et al., 2004).

Le arterie ciliari posteriori, invece, viaggiano sui lati del nervo ottico e danno origine a 10-20 piccole arterie ciliari che entrano nella sclera irrorando la struttura uveale. Il sistema circolatorio coroidale è responsabile del nutrimento dei fotorecettori e dell'epitelio pigmentato retinico, interposto fra la coroide e la retina. Le arterie ciliari posteriori, oltre a dare origine a queste arterie corte, danno anche origine alle arterie ciliari posteriori lunghe e mediali che entrano nella sclera, nasalmente e temporalmente al nervo ottico, e viaggiano lungo l'orizzonte equatoriale nello spazio supracoroideo verso il segmento anteriore. Da qui si diramano per irrorare l'iride, il corpo ciliare ed i processi ciliari (Morrison & Van Buskirk, 1984).

1.4 Ischemia retinica e patologie correlate

L'ischemia è una condizione che si instaura in corso di totale o parziale assenza di flusso sanguigno ai tessuti; le cellule che la subiscono vanno incontro ad una condizione di completa (anossia) o parziale (ipossia) assenza di ossigeno, accompagnata da un insufficiente apporto di substrati metabolici ed un'inadeguata rimozione dei prodotti del catabolismo. A livello retinico, l'ischemia si manifesta in seguito all'occlusione dell'arteria retinica centrale o della vena retinica. Condizioni patologiche di questo tipo determinano la degenerazione solo degli strati più interni della retina, dal momento che essi risultano essere altamente sensibili ai cambiamenti ipossici (Janàky et al., 2007; Kergoat et al., 2006). Viceversa, in queste condizioni, gli strati più esterni mostrano una discreta resistenza, pertanto mantengono una certa integrità (Tinjust et al., 2002). Danni funzionali e strutturali a questo livello si verificano solo a seguito del collasso dei capillari coroidei o della separazione dall'epitelio pigmentato (fenomeno indicato come distacco della retina). Il danno di entrambi gli strati, e quindi l'infarto del tessuto, consegue all'ischemia retinica completa, condizione che richiede l'occlusione dell'arteria oftalmica.

Nella retina dei mammiferi, i fenomeni ischemici sono comuni ad alcune condizioni patologiche a carico dell'occhio, come la neuropatia ischemica anteriore del nervo ottico, l'occlusione dei vasi coroideali e retinici e la retinopatia ottica traumatica (Osborne et al., 1999, 2004). Oltre ai fenomeni locali, esistono anche delle cause sistemiche che possono condurre ad eventi ipossici/ischemici, questi includono gli effetti

cardiovascolari conseguenti a malattie ostruttive croniche o sindromi ischemiche che portano all'ostruzione dell'arteria retinica come: la stenosi della carotide (Brown & Magargal 1988) e l'artrite di Takayasu (Shelhamer et al., 1985) o i traumi (Buckley & James, 1997). Inoltre, i fenomeni ischemici a carico della retina sono anche coinvolti nella patogenesi della retinopatia diabetica (Leinsenmeier et al., 1998), nello sviluppo del glaucoma (Chung et al., 1999; Costa et al., 2003; Flammer, 1994; Osborne et al., 1999; Tezel & Wax, 2004; Tielsch et al., 1995) e nella degenerazione maculare età-dipendente (Bek, 2009).

Caratteristica comune alle patologie elencate è l'assottigliamento del nervo ottico causato dalla perdita delle RGC (vedi Chidlow & Osborne, 2003). Pertanto, indipendentemente dalla condizione che conduce all'evento ischemico, l'ischemia retinica rappresenta una causa comune di riduzione della vista e, eventualmente, di cecità (Osborne et al., 2004).

1.4.1 Morte cellulare ed ischemia

A livello cellulare, il danno ischemico retinico si traduce in una cascata auto-sostenuta che coinvolge la depolarizzazione neuronale, l'influsso di calcio e lo stress ossidativo, innescati da un deficit energetico e da un aumento della stimolazione glutammatergica (Osborne et al., 2004) che porta alla perdita delle RGC (Adachi et al., 1998; Chidlow & Osborne, 2003; Goto et al., 2002; Lafuente et al., 2002; Wang et al., 2002).

Numerosi studi hanno evidenziato che la morte conseguente ad un insulto ischemico è caratterizzata sia da una componente apoptotica che da una necrotica (Macaya, 1996; MacManus & Nakajima et al., 2000; Mehmet et al., 1994; Yue et al., 1997). Allo stesso modo, nelle RGC sono stati osservati cambiamenti necrotici (Buchi et al., 1992; Joo et al., 1999) ed apoptotici in condizioni sperimentali ipossico/ischemiche (Buchi et al., 1992; Joo et al., 1996, 1999), in modelli di glaucoma sperimentale (Garcia-Valenzuela et al., 1995; Quigley et al., 1995) ed in casi clinici di glaucoma (Kerrigan et al., 1997), eventi questi in cui l'ischemia è coinvolta nel danno retinico in maniera diretta o indiretta.

L'elevata suscettibilità all'ischemia dei neuroni interni della retina, in particolare modo delle RGC, è in parte dovuta agli elevati livelli di recettori ionotropici del glutammato presenti su questo tipo cellulare (Brandstätter et al., 1994; Grunert et al., 2002), la cui eccessiva stimolazione può causare morte della cellula su base eccitotossica. Anche le cellule amacrine risultano particolarmente suscettibili al danno ischemico ed anch'esse, come le RGC, nel corso dello sviluppo e del differenziamento, diventano sempre più sensibili al glutammato (Fletcher & Kalloniatis, 1997; Zeevalk & Hyndman, 1986). Questa osservazione avvalorava l'ipotesi della componente eccitotossica come componente centrale della cascata di eventi attivata dall'insulto ischemico che conduce alla neurodegenerazione retinica (Arundine & Tymianski, 2003; Camacho & Massieu, 2006; Lipton, 1999; Louzada-Junior et al. 1992; Osborne et al., 2004).

1.5 La trasmissione glutammatergica

Il glutammato è il più importante amminoacido eccitatorio a livello del sistema nervoso centrale dei vertebrati. La neurotrasmissione eccitatoria, ed in particolare quella glutammatergica, è coinvolta in numerose ed importanti funzioni cerebrali: riveste un ruolo centrale nei processi cognitivi di apprendimento e memoria, nella plasticità neuronale delle connessioni sinaptiche, nella percezione ordinata delle sensazioni e del dolore, nel controllo della funzione motoria e nella regolazione delle secrezioni endocrine (vedi Bergink et al., 2004).

Nella retina, il glutammato è responsabile della trasmissione sinaptica eccitatoria tra fotorecettori, cellule bipolari e RGC (Yang, 2004), è coinvolto nei processi alla base della plasticità neuronale e della sopravvivenza e riveste un ruolo importante nello sviluppo del sistema visivo (Kleinschmidt et al., 1987; Komuro & Rakic, 1993; Simon et al., 1992).

I recettori del glutammato sono stati divisi, in base al loro meccanismo primario di trasduzione del segnale, in ionotropici e metabotropici (Hollmann & Heinemann, 1994; Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993).

I recettori ionotropici prendono il nome dai loro agonisti esogeni e sono distinti in: recettori N-metil-D-aspartato (NMDA), acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) e kainato. I recettori AMPA e kainato, altamente permeabili al Na^+ e poco al Ca^{2+} , sono anche indicati come recettori non-NMDA, dal momento che le proprietà funzionali dei due gruppi non sono così distinte. Il recettore NMDA è, invece, un

recettore permeabile al Ca^{2+} , dotato di un sensore di voltaggio operato da uno ione magnesio (Mg^{2+}). In seguito alla depolarizzazione della membrana plasmatica il blocco esercitato dallo ione Mg^{2+} viene rimosso, per cui il legame del glutammato al suo recettore, in presenza di glicina, è in grado di indurre l'apertura del canale e l'influsso di calcio all'interno della cellula neuronale (Mayer et al., 1984).

I recettori metabotropici del glutammato (mGluR) sono recettori accoppiati a proteine G che modulano la produzione di secondi messaggeri; gli mGluR sono classificati in tre gruppi, in base all'omologia della loro sequenza amminoacidica ed in funzione delle loro proprietà farmacologiche e biochimiche. I recettori del gruppo I (mGluR1 e mGluR5) stimolano la fosfolipasi C (PLC) e la conseguente idrolisi del fosfatidilinositolo che porta al rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari (Abe et al., 1992; Masu et al. 1991). Sono localizzati principalmente nelle postsinapsi dove regolano l'eccitabilità neuronale mediante la modulazione di canali ionici. I recettori del gruppo II (mGluR2 e mGluR3) e del gruppo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) inibiscono la produzione di cAMP; con alcune eccezioni questi recettori sono localizzati nella membrane presinaptica, dove regolano il rilascio di glutammato o di altri neurotrasmettitori (Alagarsamy et al., 2001; Conn & Pin, 1997).

In condizioni fisiologiche, il glutammato è rilasciato dalla vescicole sinaptiche in risposta alla depolarizzazione ed attiva i recettori ionotropici postsinaptici NMDA e non-NMDA che mediano le componenti veloci e lente dei potenziali postsinaptici eccitatori (Michaelis, 1998). Il neurotrasmettitore è quindi rapidamente rimosso da trasportatori ad

alta affinità Na^+ -dipendenti per gli amminoacidi eccitatori (EAAT), localizzati sia a livello neuronale che a livello gliale (Danbolt, 2001). Si tratta di neurotrasportatori elettrogenici, la cui attività dipende dal gradiente elettrochimico del Na^+ generato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi. In condizioni fisiologiche, una molecola di glutammato è trasportata nel citoplasma insieme a due o tre ioni Na^+ ed uno ione H^+ , mentre uno ione K^+ viene estruso nell'ambiente extracellulare (vedi Danbolt, 2001). Il successivo recupero del gradiente elettrochimico del sodio, dopo l'uptake dell'aminoacido, avviene a spese dell'ATP consumato dalla pompa di membrana Na^+/K^+ ATPasi (Bonvento et al., 2002).

La rimozione del glutammato dallo spazio extracellulare rappresenta l'evento che termina la risposta eccitatoria, pertanto l'efficienza del processo di ricaptazione è fondamentale per lo spegnimento del segnale eccitatorio e per la prevenzione del danno neuronale eccitotossico.

Nella retina sono stati identificati quattro diversi EAAT che presentano una diversa localizzazione, nonché differenti caratteristiche molecolari. Gli EAAT1 (L-glutammato/L-aspartato trasportatore, GLAST) sono presenti a livello delle cellule di Müller (Bringmanne et al., 2009; Pow & Barnett, 1999); gli EAAT2 (glutammato trasportatore 1, GLT-1) risultano essere localizzati a livello dei fotorecettori e delle cellule bipolari (Hasegawa et al., 2006; Rauen & Kanner, 1994); gli EAAT3 (carrier degli amminoacidi eccitatori, EAAC1) sono presenti nelle cellule orizzontali, in alcune cellule amacrine e nelle cellule ganglionari (Schultz & Stell, 1996); infine, gli EAAT5 (trasportatori espressi

unicamente a livello retinico) sono associati ai fotocettori ed alle cellule bipolari (Hasegawa et al., 2006; Pow & Barnett, 2000).

In condizioni fisiologiche, il trasportatore presente sulle cellule di Müller, GLAST, è il principale responsabile della *clearance* del glutammato extracellulare (Barnett et al., 2001; Pow & Barnett, 1999; Rauen et al., 1998). Una volta captato dalla glia, il glutammato è convertito dalla glutammina sintasi in glutammina; quest'ultima, è poi riutilizzata dai neuroni per la formazione di nuovo glutammato (ciclo glutammato-glutammina) (Thoreson & Witkovsky, 1999).

1.6 Eccitotossicità

L'attivazione patologica dei recettori del glutammato è una delle principali cause di morte cellulare nel danno neuronale acuto (fra cui quello provocato da traumi, epilessia ed ischemia cerebrale) e nelle malattie neurodegenerative croniche (come il morbo di Parkinson e di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica e la demenza associata all'HIV) (Choi, 1988; Doble, 1999; Lipton & Rosemberg, 1994).

Le patologie dell'occhio e, in particolare della retina, nelle quali si riconosce un coinvolgimento della tossicità mediata dal glutammato comprendono il glaucoma, l'occlusione della vena o dell'arteria retinica, il trauma del nervo ottico, la neurite ottica e la neuropatia ischemica anteriore del nervo ottico (Bek, 2009; Casson, 2006; Sucher et al., 1997).

La suscettibilità della retina agli effetti tossici del glutammato è stata documentata per la prima volta nel 1957 da Lucas & Newhouse, che rilevarono danno retinico in seguito all'iniezione sottocutanea di glutammato in topi neonati ed in ratti adulti. Tali effetti sono stati confermati successivamente da Olney nel 1969, che coniò il termine eccitotossicità per descrivere questa lesione, e pochi anni più tardi da Sisk & Kuwabara (1985) che riportarono la degenerazione degli strati nucleari interni e dello strato delle cellule ganglionari in seguito all'iniezione intravitreale di un bolo di glutammato in ratti albini adulti.

Diverse evidenze sperimentali *in vivo*, sottolineano il ruolo cruciale dell'eccitotossicità nelle condizioni ischemiche a carico del cervello (Aarts et al., 2003; Camacho & Massieu, 2006; Dirnagl et al., 1999) e dati sperimentali analoghi sostengono un ruolo comparabile per il glutammato anche nell'ischemia retinica (Donello et al., 2001; Neal et al., 1994; Nucci et al., 2005). L'importante ruolo dell'eccesso di glutammato nel danno retinico è stato anche documentato dall'evidenza che antagonisti dei recettori NMDA e non-NMDA offrono protezione in modelli sperimentali di morte delle RGC, sia *in vivo* che *in vitro* (Adachi et al., 1998; Joo et al., 1999; Nucci et al., 2005; Osborne et al., 1999).

I primi a descrivere l'accumulo di glutammato in corso di ischemia retinica furono Louzada-Junior e collaboratori che riportarono, nel coniglio, un aumento dei livelli del neurotrasmettitore sia in fase ischemica che in fase di riperfusione (Louzada-Junior et al., 1992). Questo dato è stato successivamente corroborato da Adachi et al. (1998) nel gatto, mentre un unico studio pubblicato nel 1996 (Dreyer et al., 1996) ha rilevato elevati livelli di glutammato nel corpo vitreo di pazienti e primati con glaucoma. Tuttavia, studi più

recenti hanno fallito nel confermare tali dati nell'uomo (Honkanen et al., 2003), nei primati (Carter-Dawson et al., 2002; Wamsley et al., 2005) e nei ratti (Levkovitch-Verbin et al., 2002) aprendo un dibattito riguardo al ruolo dell'eccitotossicità nello sviluppo e progressione del glaucoma, patologia che, come precedentemente detto, vede il coinvolgimento di fenomeni ischemici a carico della retina nella sua patogenesi.

1.6.1 Meccanismi molecolari

La tossicità mediata dal glutammato può essere considerata un processo articolato in tre *step* sequenziali: 1) l'overstimolazione dei recettori postsinaptici del glutammato che porta all'accumulo intracellulare di Ca^{2+} ; 2) l'amplificazione dei segnali del Ca^{2+} per apertura dei canali voltaggio-dipendenti e successivo rilascio dai depositi intracellulari; 3) l'attivazione di vie cataboliche e generazione di radicali liberi (Choi, 1990).

In corso di ischemia, questa cascata di eventi insorge a seguito della deprivazione di ossigeno e di nutrienti, eventi che portano al fallimento del metabolismo energetico cellulare. Il rallentamento della glicolisi e della fosforilazione ossidativa determinano, conseguentemente, la caduta dei livelli di ATP. Dal momento che l'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi è particolarmente vulnerabile e sensibile alla riduzione dell'ATP, in tali condizioni, il potenziale di membrana è perso (Lipton, 1999) con conseguente inibizione della ripolarizzazione degli assoni e delle membrane sinaptiche in seguito a depolarizzazione. In particolare, l'alterazione nell'omeostasi ionica potrebbe essere più

pronunciata nella retina, struttura nella quale il 50% dell'ATP prodotto è usato per mantenere il gradiente del Na^+ (Ames et al., 1992; Quinones Hinojosa et al., 1999).

Il perdurare della depolarizzazione, secondo il meccanismo descritto, riduce il blocco da Mg^{2+} voltaggio-dipendente sui recettori NMDA (Zeevalk & Nicklas, 1992) ed aumenta la conduttanza agli ioni Na^+ e Ca^{2+} . L'ingresso di Ca^{2+} induce la fusione delle vescicole sinaptiche con le zone attive della membrana, promuovendo ed aumentando la concentrazione del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico. Dall'altra parte, l'aumento delle concentrazioni citoplasmatiche di Ca^{2+} è ulteriormente sostenuto dall'apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (Lipton, 1999) e dall'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato che stimolano il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico. L'istaurarsi di un aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} inibisce il metabolismo ossidativo, creando un circolo che si auto-potenzia (De Flora et al., 1998). In tali condizioni, inoltre, i sistemi tampone del Ca^{2+} risultano essere compromessi. È stato infatti dimostrato che l'ischemia induce la disattivazione del sistema di trasporto Ca^{2+} ATPasi della membrana plasmatica neuronale e l'inversione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (vedi Pignataro et al., 2009). L'attività di tale scambiatore, in condizioni fisiologiche, è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. In particolare, l'attività dello scambiatore prevede l'ingresso di tre ioni Na^+ all'interno della cellula e l'estrusione di uno ione Ca^{2+} . In condizioni estreme di riduzione del gradiente del Na^+ , come nel caso dell'ischemia, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inverte il suo funzionamento (vedi Annunziato et al., 2004) generando un aumento della concentrazione del calcio citosolico che va a

sommarsi a quello indotto dal malfunzionamento delle pompe del Ca^{2+} ATP-dipendenti, a quello generato dai canali ionici per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti ed a quello che deriva dai depositi intracellulari. L'elevato incremento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare può portare a :

- I) attivazione di enzimi Ca^{2+} -dipendenti, quali endonucleasi, lipasi e proteasi cellulari, responsabili della degradazione di numerosi substrati con conseguente danno ed, eventualmente, morte (Choi, 1990; Lipton, 2006; Lipton & Nicotera, 1998; Lynch & Guttman, 2002).
- II) attivazione della nitrossido sintasi con produzione di NO che può portare a processi neurodegenerativi (Bonfoco et al., 1995; Nicotera et al., 1995; Lipton, 1999)
- III) ulteriore aumento del rilascio di neurotrasmettitori, tra cui il glutammato (Orrenius et al., 2003; Osborne et al., 1999).

Essendo i gradienti transmembrana la forza trainante per l'*uptake* mediato dagli EAAT del neurotrasmettitore, la perdita dei gradienti ionici, durante l'episodio ischemico, si ripercuote anche sul funzionamento dei trasportatori, la cui capacità di trasporto risulta ridotta o la loro modalità di funzionamento invertita (Massieu et al., 2000). I livelli extracellulari di glutammato aumentano quindi, verosimilmente, per una combinazione di eventi, quali il meccanismo di rilascio vescicolare e la reversione dei trasportatori (Barnett et al., 2001; Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000).

A differenza dei meccanismi che sottendono al rilascio di tipo esocitotico, la reversione del trasportatore rappresenta un meccanismo di rilascio indipendente dal Ca^{2+}

(David et al., 1988). È stato inoltre dimostrato che il rilascio di glutammato nella retina ischemica non è bloccato da basse concentrazioni extracellulari di Ca^{2+} (Neal et al., 1994) escludendo così il rilascio vescicolare del neurotrasmettitore in tali condizioni.

Sebbene sia stata documentata un'inversione dei trasportatori in corso di ischemia, i dati di letteratura relativi all'ischemia retinica sono però contrastanti. In particolare, l'attività del trasportatore gliale, GLAST, risulta essere mantenuta in corso di ischemia. Tale dato è supportato dall'osservazione che topi GLAST-deficienti presentano esacerbazione del danno indotto dall'ischemia retinica se confrontati con animali GLT1-deficienti e *wild-type* (Harada et al., 1998).

L'accumulo del glutammato extracellulare potrebbe anche essere la diretta conseguenza di una ridotta attività dei GLAST dal momento che, in corso di ischemia retinica acuta, il GLAST, presenta una ridotta capacità di mantenere il trasporto entrante del glutammato e l'*uptake* neuronale mediato da EAAT5, GLT1 e EAAC1 non è sufficiente a compensare il fallimento funzionale del trasportatore gliale (Barnett et al., 2001). D'altra parte, però, è stata anche riportata una ridotta espressione dei GLAST in un modello di glaucoma ad angolo aperto nel ratto (Martin et al., 2002), nel topo (Schuettauf et al., 2007) e nell'uomo (Naskar et al., 2000).

Gli aumenti di glutammato in corso di ischemia retinica potrebbero anche essere correlati all'alterata espressione dei trasportatori neuronali; nel glaucoma sperimentale, infatti, l'espressione del GLT1 risulta essere ridotta (Martin et al., 2002; Schuettauf et al., 2007). Anche in questo caso, però, la letteratura presenta dati contrastanti,

verosimilmente legati all'utilizzo di modelli sperimentali differenti. Infatti, in un differente modello di glaucoma cronico nel ratto è stato rilevato un aumento dell'espressione dei GLT1 (Park et al., 2009).

Un altro importante fattore che può contribuire ad un ulteriore aumento dei livelli extracellulari di glutammato risiede a livello delle cellule gliali. In particolare, in corso di ischemia, la bassa concentrazione di ATP rallenta l'attività della glutammina sintasi (Oliver et al., 1990). Tale evento aumenta fortemente il rapporto glutammato/glutammina impedendo conseguentemente l'uptake di altro glutammato a livello delle cellule gliali (Vorwerk et al., 2000). Il meccanismo descritto può essere esacerbato dall'accumulo di radicali liberi, essendo la glutammina sintasi suscettibile al danno ossidativo (Oliver et al., 1990).

Esistono però delle evidenze contraddittorie che documentano, in corso di ischemia, un'aumentata attività della glutammina sintasi nelle cellule di Müller (Shaked et al., 2002) indicando che questo potrebbe essere un meccanismo di difesa del tessuto mirato ad attenuare l'eccitotossicità nella retina sottoposta ad insulto ischemico.

1.7 Meccanismi di produzione dei radicali liberi

Lo stress ossidativo insorge quando la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) supera le capacità antiossidanti del tessuto; tale fenomeno è stato implicato in

numerose malattie neurodegenerative e nei processi dell'invecchiamento (Andersen, 2004; Potashkin & Meredith, 2006).

I ROS sono prodotti nel corso di numerosi processi durante il normale metabolismo aerobio e come secondi messaggeri in varie vie di trasduzione del segnale (Fleury et al., 2002; Frodovich, 1978). In condizioni fisiologiche nessun danno risulta dalla loro produzione, grazie alla presenza dei sistemi di detossificazione presenti nelle cellule (Beal, 1999; Boveris & Chance, 1973; Sanders et al., 1993). Tali sistemi, detti *scavenger*, possono essere di natura enzimatica (come nel caso della superossido dismutasi, della catalasi o della glutazione perossidasi) o non enzimatica (per esempio il glutazione, l' α -tocoferolo, l' acido ascorbico ed il β -carotene). Viceversa, esistono condizioni patologiche nel corso delle quali i ROS possono essere prodotti in quantità tali da non poter essere neutralizzati dai sistemi antiossidanti endogeni ed agiscono pertanto come metaboliti citotossici.

Alcuni studi condotti sulla retina hanno suggerito che, così come riportato anche nell'ischemia cerebrale (Dugan et al., 1995; Sen & Phillis, 1993; Zini et al., 1992), i radicali liberi sono prodotti sia nella fase ischemica (Vériac et al., 1993) che in fase di riperfusione (Ophir et al., 1993). Nella retina ischemica e post-ischemica, vi sono numerose sorgenti di produzione dei ROS, fra queste i mitocondri rappresentano il principale sito di produzione di radicali liberi dal momento che il trasporto degli elettroni mitocondriale consuma approssimativamente l'85% dell'O₂ usato dalle cellule.

Il metabolismo aerobio, infatti, dipende dalla fosforilazione ossidativa, un processo attraverso il quale l'energia di ossidoriduzione del trasporto elettronico mitocondriale è usata per produrre l'ATP. L'O₂ serve come accettore elettronico finale della citocromo ossidasi, il componente enzimatico terminale del complesso mitocondriale, che catalizza la riduzione dell'O₂ a H₂O. I metaboliti parzialmente ridotti ed altamente reattivi dell'O₂, formati durante queste reazioni di trasferimento elettronico, includono l'anione superossido (O₂⁻) ed il perossido di idrogeno (H₂O₂) (Chance et al., 1979). In presenza di ioni metallici di transizione può essere anche formato un radicale molto più reattivo, il radicale ossidrilico (OH[•]) (Finkel & Holbrook, 2000; Starkov et al., 2004).

Una volta generati, i ROS reagiscono con proteine, DNA e lipidi alterando importanti funzioni, oltre che l'integrità cellulare. Le proteine vengono spesso modificate a livello dei gruppi tiolici dei residui cisteinici o a livello di gruppi ossidrilici dei residui tirosinici. Tali residui amminoacidici potrebbero essere localizzati nel sito attivo delle proteine per cui la reazione con i radicali liberi potrebbe risultare in una severa compromissione della loro funzione. Inoltre, i ROS possono essi stessi inibire gli enzimi del complesso nella catena di trasporto elettronico dei mitocondri riducendo ulteriormente l'efficienza del processo di produzione dell'ATP. A sua volta, l'inibizione degli enzimi che partecipano alla fosforilazione ossidativa, oltre a ridurre la produzione di energia, aumenta la produzione di radicali liberi (Orrenius, 2007) portando ad un circolo che si auto-amplifica.

Oltre ad attaccare i residui amminoacidici, i ROS possono provocare la rottura delle catene nucleotidiche degli acidi nucleici (Saccà et al., 2005) ed ossidare le componenti lipidiche a livello dei doppi legami degli acidi grassi polinsaturi presenti nei fosfolipidi e la cui degradazione contribuisce alla perdita di integrità strutturale cellulare (Banin et al., 2000; Celebi et al., 2002; Shibuki et al., 2000).

Responsabili dello stress ossidativo sono anche i fenomeni eccitotossici che sottendono al danno retinico ischemico.

È noto, infatti, che concentrazioni tossiche di glutammato, NMDA e kainato inducono la generazione di ROS in colture neuronali retiniche (Dutrait et al., 1995). In queste condizioni, i ROS possono essere prodotti da tre famiglie di enzimi Ca^{2+} dipendenti:

-le *Calpaine*, nel convertire la xantina deidrogenasi in xantina ossidasi, comportano la formazione di specie reattive dell'ossigeno (Cazevieille et al., 1994). Inoltre, la xantina ossidasi che deriva da questo processo potrebbe essere un'altra sorgente di produzione di radicali liberi (Zhang et al., 1995). Quest'ultimo enzima, infatti, catalizza la reazione di ossidazione della ipoxantina a xantina ed anche della xantina ad acido urico, generando O_2^- .

-la *Fosfolipasi A2*, che mobilita l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana e ne permette il suo metabolismo ossidativo attraverso la ciclossigenasi (COX) e la lipossigenasi (LOX) con conseguente produzione di ROS. Nella retina gli inibitori della ciclossigenasi (Chemtob et al., 1993) e della fosfolipasi A_2 (Cazevieille et al., 1994) prevengono il danno da ipossia mediante la riduzione dei ROS.

-la *Nitrossido sintasi neuronale costitutiva (NOS)*, presente in numerose cellule retiniche, è un enzima Ca^{2+} -dipendente attivato dalla stimolazione dei recettori ionotropici del glutammato (Dutrait et al., 1995). Il coinvolgimento nella perdita delle RGC indotta da fenomeni ischemici è stato dimostrato *in vivo* mediante l'uso di inibitori della NOS (Adachi et al., 1998; Lam & Tso, 1996; Nucci et al., 2005) che riducono la perdita cellulare. La tossicità del nitrossido (NO) è legata soprattutto ai suoi prodotti, il perossinitrito (ONOO^-) ed OH^- (Beckman et al., 1990), due molecole altamente tossiche che possono reagire con DNA, con enzimi mitocondriali o con membrane.

I fenomeni eccitotossici possono essere alla base dello stress ossidativo, non solo per le reazioni metaboliche precedentemente elencate ma anche a seguito dell'inibizione dell'antiporto cisteina/glutammato (Murphy et al., 1989; Schubert & Piasecki, 2001). Di fatto, tale sistema, fisiologicamente, rappresenta un meccanismo di rilascio del glutammato a livello extrasinaptico (Baker et al., 2002) e trasporta il glutammato a livello extracellulare in controtrasporto con la cisteina. Le alte concentrazioni di glutammato, accoppiate al fenomeno eccitotossico, inducono un rallentamento di tale sistema di trasporto con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di glutatione ed accumulo di perossidi (Murphy et al., 1989; Schubert & Piasecki, 2001).

L'elenco delle potenziali sorgenti di ROS è probabilmente più complesso di quello illustrato. In particolare i ROS, come accade nell'ischemia cerebrale, potrebbero essere prodotti durante la riperfusione attraverso meccanismi correlati all'infiltrazione dei

leucociti (Matsuo et al., 1995), dal momento che essi possono partecipare alla produzione del superossido mediante l'enzima NADPH ossidasi (Lipton, 1999).

1.7.1 Target proteici dei ROS nell'ischemia retinica

Le evidenze sperimentali suggeriscono che lo stress ossidativo ha un ruolo importante nella morte delle RGC che caratterizza l'ischemia retinica ed il glaucoma (Tezel, 2006). È stata infatti riportata la modulazione ossidativa di molte proteine retiniche in corso di stress; le proteine ossidate si accumulano poi sotto forma di aggregati proteici con conseguente riduzione e perdita della funzionalità accompagnata da una eccessiva *clearance* delle stesse (Berlett & Stadtman, 1997).

Nella retina, lo sbilanciamento ionico (Szabo et al., 1992) e le alterazioni dell'elettroretinogramma in condizioni ischemiche (Muller et al., 1997) sono la diretta conseguenza del danno mediato dai radicali liberi, infatti, il trattamento con sostanze antiossidanti è in grado di prevenire tali alterazioni (Szabo et al., 1992; Muller et al., 1997). Sebbene i *target* molecolari responsabili di tali alterazioni non siano completamente chiari, la Na^+/K^+ ATPasi sembra essere una delle proteine implicate in quanto la sua attività risulta ridotta (Szabo et al., 1992).

D'altra parte anche l'attività del trasportatore del glutammato, Na^+ -dipendente, è influenzata dai ROS. Diversi studi hanno documentato che i ROS possono inibire l'*uptake* di glutammato da parte delle cellule gliali (Volterra et al., 1994), incluse le cellule di Müller, per ossidazione dei gruppi tiolici delle cisteine presenti nella struttura

amminoacidica del trasportatore (Muller et al., 1998). Allo stesso modo, il perossinitrito può inibire, per interazione diretta con il trasportatore del glutammato, l'uptake dello stesso (Trotti et al., 1996; 1998). Tali fenomeni potrebbero parzialmente spiegare l'aumento delle concentrazioni extracellulari di glutammato che si osserva nei processi ischemici del tessuto nervoso (Szatkowski & Attwell, 1994).

Diversi studi hanno anche dimostrato che gli intermedi radicalici possono causare morte cellulare attraverso l'alterazione del metabolismo energetico mediante l'inibizione di enzimi chiave del ciclo degli acidi tricarbossilici, della catena di trasporto elettronico mitocondriale e dell'omeostasi mitocondriale del calcio (Duchen, 2000; Patel et al., 1996). Per esempio, l'inattivazione mediata dall'ossidazione della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, il principale enzima nella via della glicolisi, determina una riduzione nella capacità di utilizzo del glucosio nella retina sottoposta ad ischemia (Tezel et al., 2005).

Un altro *target* per l'ossidazione proteica in ratti con ipertono intraoculare a seguito dell'iniezione di soluzione iperosmotica a livello delle vene episclerali, è rappresentato dalle proteine dello shock termico (Tezel et al., 2005). Quest'ultime, fisiologicamente, agendo da *chaperon* per il *folding* delle proteine, costituiscono un importante meccanismo di difesa intrinseco e sono responsabili della sopravvivenza delle RGC (Ishii et al., 2003; Park et al., 2001). In questo stesso modello anche la glutammato sintasi, enzima responsabile della conversione del glutammato in glutammina, in seguito a danno mediato dai ROS presenta una ridotta attività (Tezel et al., 2005).

Altri importanti complessi proteici di membrana sono *target* dei radicali. Tra questi, i recettori ionotropici del glutammato che, in condizioni di ischemia, presentano un'aumentata attività che si riflette in un aumento dei livelli di Na⁺ intracellulare in colture cellulari retiniche di pollo sottoposte a deprivazione di ossigeno e glucosio (Agostinho et al., 1996). Infatti, i recettori NMDA presentano un sito modulatore redox (Levy et al., 1990; Sucher & Lipton, 1991) di particolare interesse dal momento che la modificazione dello stato redox influenza l'attivazione del recettore stesso (Choi & Lipton, 2000; Levy et al., 1990, 1991).

1.8 Effetti neuroprotettivi degli scavenger dei radicali liberi

Gli scavenger dei radicali liberi sono dei potenti *tools* farmacologici in grado di migliorare la funzione mitocondriale e prevenire la morte neuronale in condizioni di eccitotossicità (Lipton & Rosemberg, 1994). In particolare, i cambiamenti funzionali, biochimici e morfologici che conseguono all'ischemia retinica, possono essere parzialmente o totalmente prevenuti con scavenger dei radicali come la superossido dismutasi e la catalasi (Delbarre et al., 1995; Gehlbache & Purple, 1994; Yamamoto et al., 1994) e da sostanze che sono in grado di tamponare l'attività delle specie radicaliche.

Tra le sostanze endogene con forte potere antiossidante ricordiamo il coenzima Q10, un importante cofattore della catena mitocondriale di trasporto degli elettroni. Le proprietà neuroprotettive del coenzima Q10 sono state dimostrate nel morbo di

Parkinson, d'Alzheimer e nell'Huntington ed in altre patologie a carattere neurodegenerativo (Beal., 1999, 2004; Beal & Matthews, 1997; Yang et al., 2009; Shults, 2003). In particolare, nelle cellule neuronali soggette a stress ossidativo il coenzima Q10 inibisce la produzione di ROS e mantiene il potenziale mitocondriale di membrana (McCarthy et al., 2004; Somayajulu et al., 2005); inoltre la somministrazione topica del coenzima Q10 riduce la perdita delle RGC in modelli sperimentali di glaucoma (Cordeiro et al., 2007; Nucci et al., 2007).

1.8.1 Effetti antiossidanti degli estrogeni

Sono state riportate numerose evidenze sperimentali che attribuiscono agli estrogeni proprietà neurotrofiche e neuroprotettive sia *in vivo* che *in vitro*.

Gli estrogeni incrementano la vitalità, la sopravvivenza e il differenziamento di colture neuronali primarie sottoposte a deprivazione di glucosio e siero (Behl et al., 1997; Faivre-Bauman et al., 1981), proteggono colture neuronali primarie e tumorali dall'anossia e da differenti insulti neurotossici quali l'esposizione ad amminoacidi eccitatori (Singer et al., 1996; Sribnick et al., 2004), agenti ossidanti e beta-amiloide (Green et al., 1996; Zhang et al., 2004).

Questi dati *in vitro* sono avvalorati da altrettanti studi *in vivo* che documentano la capacità degli estrogeni di attenuare la morte neuronale in modelli animali di ischemia cerebrale (Hurn et al., 2000; Simpkins et al., 1997; Zhang et al., 1998), nonché di ridurre la

perdita neuronale dovuta alla somministrazione di tossine dopaminergiche (Dluzen, 2000) e acido kainico (Azcoitia et al., 1998).

Molti sebbene non tutti gli effetti degli estrogeni sono mediati dal legame ai loro recettori (ER) distinti in due diversi tipi: il recettore ER α (Green et al., 1996) ed il recettore ER β (Kuipper et al., 1996). Gli estrogeni posseggono infatti proprietà antiossidanti che si esplicano indipendentemente dal legame al recettore (vedi Amantea et al., 2005; Simpkins et al., 2010). L'attività antiossidante è una proprietà intrinseca alla molecola dell'estrogeno, dovuta alla presenza del gruppo idrossilico in C3 sull'anello A del nucleo steroideo; tale azione si osserva normalmente a concentrazioni elevate (1-10 μ M), considerate sovr fisiologiche.

Diversi studi hanno dimostrato la chiara correlazione fra l'azione antiossidante degli estrogeni e le proprietà neuroprotettive (Behl et al., 1997; Moosman et al., 1999). In particolare, il 17 β -estradiolo può, per esempio, attenuare la perossidazione lipidica indotta da β -amiloide o glutammato (Goodman et al., 1996). Inoltre, in uno studio *in vitro*, su colture primarie di neuroni retinici, è stato documentato che il 17 β -estradiolo protegge dalla morte indotta da H₂O₂ (Cao et al., 2003) e riduce il danno da glutammato nella linea cellulare RGC-5 (Kumar et al., 2005). *In vivo*, l'estrogeno, migliora la funzionalità retinica per inibizione dell'accumulo di leucociti nella fase post-ischemica (Nonaka et al., 2000) ed è documentata la riduzione della sopravvivenza delle cellule ganglionari retiniche, a seguito dell'assotomia del nervo ottico, in ratte ovariectomizzate. In quest'ultimo

paradigma sperimentale, la perdita delle RGC è significativamente minimizzata dall'iniezione intravitreale del 17 β -estradiolo (Nakazawa et al., 2006).

In molti degli studi citati e condotti sulle RGC, il 17 β -estradiolo ha mostrato un'attività protettiva simile a quella del suo diastereoisomero inattivo, il 17 α -estradiolo. Quest'ultimo infatti, diversamente dal 17 β -estradiolo, che è in grado di legare ed attivare i recettori estrogenici α e β , è inattivo su entrambi i recettori (Behl et al., 1997). Da qui l'ipotesi che l'attività neuroprotettiva possa essere raggiunta attraverso meccanismi che non coinvolgono i recettori classici.

1.9 Modelli sperimentali di ischemia retinica

Per comprendere i meccanismi che stanno alla base del danno prodotto dai fenomeni ischemici a carico della retina sono stati sviluppati diversi modelli sperimentali. Numerosi sono i modelli *in vitro* di danno alle RGC basati, essenzialmente, sulla riduzione della disponibilità di ossigeno e glucosio (Izumi et al., 2003; Kinukawa et al., 2005; Mastrodimou et al., 2005; Osborne et al., 1997; Payet et al., 2004; Quinones-Hinojosa et al., 1999). Nei modelli *in vitro* la disponibilità di ossigeno varia da diversi gradi d'ipossia, fino alla totale sostituzione dell'ossigeno con N₂; inoltre, alcuni sistemi sperimentali prevedono l'impiego di agenti chimici, come i cianati (per bloccare la catena respiratoria) o come l'acido iodoacetico (IAA) (per bloccare la glicolisi). Certamente questi modelli, rispetto ai modelli *in vivo*, hanno il vantaggio di presentare una maggior facilità di

manipolazione sia del tessuto che delle condizioni sperimentali ma, chiaramente, la possibilità di estrapolare dati richiede modelli che riproducano il più possibile la situazione clinica dei soggetti con glaucoma. I modelli *in vivo* hanno il vantaggio di avvicinarsi molto di più di quelli *in vitro* alla condizione clinica, simulando, più o meno efficacemente, il reale meccanismo che si verifica nelle patologie umane (vedi Osborne et al., 2004). I modelli più impiegati sono quelli basati principalmente sulla riduzione del flusso sanguigno che si può ottenere mediante l'incremento della IOP.

Uno dei modelli animali più utilizzati prevede l'innalzamento acuto della IOP che determina un'ischemia completa, marcata e permanente, con interruzione sia della circolazione retinica che della circolazione uveale. Tale tecnica è stata descritta per la prima volta da Smith e Braid nel 1952 e successivamente rivista da Buchi et al. nel 1991. Consiste nell'inserimento, nella camera anteriore dell'occhio dell'animale, di un ago da infusione connesso ad una bottiglia contenente soluzione fisiologica sterile, elevata ad un'altezza tale da determinare un innalzamento della IOP fino a valori di 110-120 mmHg, in modo tale che la IOP superi la pressione di perfusione dell'occhio. L'aumento della pressione comporta lo schiacciamento delle arterie che vascolarizzano l'occhio, causando ischemia retinica per mancato apporto di sangue al tessuto. Per produrre cambiamenti istologici quantificabili e permanenti è necessario che il periodo ischemico duri almeno 45 minuti. Infatti, solo dopo un periodo ischemico di tale durata ed entità non è più possibile osservare alcuna attività retinica nel retinogramma (Selles-Navarro et al., 1996). Tale condizione ischemica riproduce le principali caratteristiche patologiche dell'ischemia

dopo occlusione dell'arteria retinica centrale (CRAO) e può rappresentare un modello di glaucoma ad angolo chiuso (Osborne et al., 2004). Un fattore limitante alla traslazione dei dati è tuttavia rappresentato dalle differenze anatomiche nella rete vascolare tra le varie specie. I primati condividono un'anatomia vascolare retinica identica all'uomo, ma motivi pratici ed etici ne limitano l'uso. Sono stati invece ampiamente utilizzati piccoli animali da laboratorio, come il ratto, il coniglio ed il porcellino d'india. Il ratto, in particolare, presenta elevate analogie con l'anatomia oculare umana (vedi Osborne et al., 2004) ed è stato pertanto scelto per lo sviluppo dello studio riportato nel presente lavoro di tesi.

2. Scopo della tesi

Ad oggi, l'approccio terapeutico utilizzato per la cura del glaucoma è basato sulla riduzione della pressione intraoculare. Tuttavia, il trattamento ipotonizzante non sempre si concretizza in un effetto neuroprotettivo e questo, insieme all'esistenza delle forme di glaucoma a pressione normale, riflette la non completa conoscenza dei meccanismi alla base della neurodegenerazione glaucomatosa. D'altra parte l'assenza di un modello di glaucoma su base genetica contribuisce ulteriormente alla mancanza di informazioni chiave per la comprensione dei meccanismi che sottendono alla morte delle RGC in corso di glaucoma.

L'identificazione di nuovi approcci terapeutici per la cura del glaucoma non può pertanto prescindere dalla conoscenza delle *pathways* molecolari coinvolte nella morte delle cellule ganglionari retiniche. La disponibilità di un modello sperimentale con caratteristiche cliniche analoghe a quelle presentate dai pazienti glaucomatosi consentirebbe quindi di studiare tali meccanismi.

Pertanto, i principali obiettivi del presente lavoro di ricerca sono stati i seguenti:

- I. mettere a punto un modello sperimentale *in vivo* che riproduca le condizioni di stress a cui sono soggette le cellule ganglionari della retina nel glaucoma. Il modello di ischemia retinica scelto (Buchi et al., 1991) è stato messo a punto nel ratto per via

dell'elevata analogia dell'anatomia vascolare retinica con quella umana che consente una maggiore possibilità di traslazione dei dati;

- II. verificare che lo stimolo ischemico induca la perdita selettiva delle cellule ganglionari retiniche, riproducendo pertanto il danno cellulare osservato nella patologia glaucomatosa;
- III. valutare le variazioni intravitreali dei livelli di glutammato nel modello sperimentale utilizzato ed identificare i meccanismi coinvolti nelle variazioni osservate al fine di stabilire una correlazione fra eccitotossicità e morte delle RGC;
- IV. modulare farmacologicamente i livelli intravitreali di glutammato e valutarne gli eventuali effetti sulla morte cellulare.

3. Materiali e Metodi

3.1 Animali

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti maschi, ceppo Wistar, del peso di 280–330 g, forniti dalla Charles-River (Lecco, Italia), stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C), umidità relativa (65%) e illuminazione, con un ciclo luce/buio di 12 ore e con libero accesso ad acqua e cibo. Tutti gli studi sono stati effettuati nel pieno rispetto delle direttive del Ministero della Salute per la cura ed il benessere degli animali secondo il D.M.116/1992.

3.2 Ischemia retinica

L'ischemia retinica è stata indotta nell'occhio destro di ciascun animale attraverso un aumento acuto della pressione intraoculare (IOP) secondo il metodo precedentemente riportato da Buchi e collaboratori (1991) e da Osborne e collaboratori (2004). In breve, gli animali sono stati anestetizzati attraverso iniezione intraperitoneale (i.p.) di uretano (1500 mg/Kg) e adagiati su di un tappetino riscaldato per mantenere una temperatura corporea costante di 37°C. L'anestesia totale è stata potenziata da un anestetico locale, oxibuprocaina 0.4% (Novesina, Novartis Farma, Italy). Nella camera anteriore dell'occhio destro è stato inserito un ago da infusione da 27-gauge, collegato ad un flacone di soluzione salina sterile da 500 ml, innalzato ad un'altezza di 170 cm per produrre una

pressione intraoculare pari a 120 mmHg per 50 minuti. Tale valore, ben al di sopra dei normali livelli di pressione fisiologica nel ratto (13-18 mmHg), determina una condizione d'ischemia dovuta al blocco del flusso sanguigno attraverso l'arteria retinica centrale e quindi una riduzione dell'apporto di ossigeno e nutrienti alla retina stessa. L'ischemia retinica è stata confermata mediante l'osservazione dell'opacizzazione dell'iride e della perdita del riflesso rosso della retina. Per ciascun animale l'occhio sinistro è stato utilizzato come controllo non ischemico. Inoltre, una parte degli animali (ratti *sham*) è stata sottoposta ad una procedura di controllo che prevede l'inserimento nell'occhio destro dell'ago da infusione senza l'innalzamento del flacone di soluzione salina sterile ad esso correlato e pertanto senza provocare l'aumento della pressione intraoculare. La temperatura corporea è stata monitorata prima e dopo l'induzione dell'ischemia; gli animali con una temperatura corporea inferiore a 35.5°C sono stati esclusi dallo studio.

3.3 Microdialisi

Gli animali anestetizzati con uretano (1500 mg/Kg, i.p.) sono stati immobilizzati in un apparecchio stereotassico (Kopf 900, Analytical Control, Milano, Italia). L'anestesia totale è stata potenziata da un anestetico locale, oxibuprocaina 0.4% (Novesina, Novartis Farma, Italia) e successivamente una sonda da microdialisi è stata impiantata nel corpo vitreo dell'occhio destro. Le sonde da microdialisi sono state costruite seguendo la tecnica già descritta da Sandberg et al. (1986). Dopo aver creato un punto d'ingresso mediante un

ago da 23 *gauge*, le sonde (lunghe 3 mm, cut-off 5,000 Dalton) sono state impiantate nel vitreo passando attraverso la *pars plana*, una regione della sclera non vascolarizzata. La sonda da dialisi è stata perfusa con CSF artificiale (mM: NaCl 125; KCl 2.5; MgCl₂ 1.18; CaCl₂ 1.26; NaH₂PO₄ 0.2; pH 7.0) ad un flusso costante di 2 µl/min. Dopo 2 ore di stabilizzazione del sistema, è stato raccolto un campione di dializzato ogni 10 minuti per un'ora, al fine di determinare le concentrazioni basali degli aminoacidi.

Con la sonda da microdialisi in posizione, è stata indotta l'ischemia (come riportato nel precedente paragrafo) per 50 minuti ed in tale periodo sono stati raccolti ulteriori 5 campioni di dializzato. Successivamente, al fine di investigare le variazioni neurochimiche prodotte nel periodo post-ischemico, l'ago inserito nella camera anteriore è stato rimosso e l'aumento pressorio bloccato. Con la sonda da dialisi ancora in posizione sono stati raccolti, ogni 10 minuti, campioni di dializzato per altre 3 ore.

Gli animali *sham* sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica senza l'induzione dell'ipertono.

A conclusione dell'esperimento i campioni di dializzato raccolti sono stati conservati ad una temperatura di -80°C fino al momento della loro analisi cromatografica.

3.4 Analisi aminoacidica dei microdializzati

La misurazione dei livelli degli aminoacidi presenti nel dializzato è stata eseguita mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) (Richards et al., 2000). Il

sistema cromatografico utilizzato è costituito da una pompa (PU-1580, Jasco, Cremella, Italia), da una colonna analitica a fase inversa (5 μ m, 150 x 3 mm, Chrompack, Londra, UK) da un degasatore a 3 linee (DG 980-50 Jasco, Cremella, Italia) e da un rilevatore a fluorescenza (FP-1520, Jasco, Cremella, Italia).

La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una fase mobile costituita da un gradiente ternario di metanolo (2-30% in 27 minuti), acqua (48-20% in 27 minuti) e sodio acetato (50%, Ph= 6.9), ad una velocità di flusso di 0.5 ml/min. Il campione è stato iniettato in colonna mediante un autocampionatore refrigerato (CMA 200, Analytical Control, Milano, Italia) previa derivatizzazione con ortoftaldeide (OPA; 975 μ l)/acido mercaptopropionico (AMP) 10% (V/V) in metanolo (25 μ l) (Sigma, Milano, Italia). I livelli di dializzato (espressi in μ mol/l) sono stati calcolati, dopo la calibrazione con una soluzione standard di aminoacidi, tramite il programma software Borwin (Jasco, Cremella, Italia).

3.5 Trattamento farmacologico

Per gli studi neuropatologici e neurochimici gli animali sono stati trattati con 17 β -estradiolo (E_2) (0.2 mg/kg, i.p.) o 17 α -estradiolo (0.2 mg/kg, i.p.) somministrati 30 minuti prima dell'induzione dell'ischemia. L'antagonista recettoriale ICI 182-780 (0.2 mg/kg e 2 mg/kg, i.p.) è stato somministrato 30 minuti prima dell'iniezione del 17 β -estradiolo.

I farmaci sono stati sciolti in una soluzione idroalcolica al 30%. La somministrazione del solo veicolo è stata effettuata negli animali di controllo secondo lo stesso protocollo sperimentale seguito per i farmaci.

Un ulteriore gruppo è stato trattato con coenzima Q 10. Il coenzima Q10 (CSF contenete lo 0.1% di coenzima Q10) è stato somministrato nel vitreo, 30 minuti prima dell'induzione dell'ischemia, attraverso la sonda da microdialisi (flusso di 2 μ l/min, per 5 minuti).

Per l'analisi degli estratti proteici derivanti dalle retine intere, gli animali sono stati trattati con l'antagonista del recettore NMDA, MK-801. Il farmaco è stato sciolto in PBS sterile ed una doppia dose di MK-801 (50 nmol) o di veicolo (PBS 100%) è stata iniettata nella cavità vitreale 5 minuti prima dell'induzione dell'ischemia ed alla fine dell'ischemia stessa. L'iniezione intravitreale è stata eseguita praticando un foro nell'occhio del ratto anestetizzato con un ago da 23-gauge in prossimità della giunzione cornea/sclera e la somministrazione è stata effettuata utilizzando una siringa Hamilton da 5 μ l.

Tutti i farmaci indicati sono stati acquistati dalla Sigma (Milano, Italia).

3.6 Marcatura delle RGC e conta cellulare

Al fine di marcare le cellule ganglionari retiniche, i cui assoni innervano il mesencefalo dorsale, il colorante fluorescente FluoroGold (Fluka, Sigma-Aldrich, Milano) è stato somministrato nel collicolo superiore. Il FluoroGold, sfruttando il trasporto

retrogrado assonale, è in grado di evidenziare solo i corpi cellulari dei neuroni che non hanno subito degenerazione assonale (Selles-Navarro et al., 1996). In particolare, è stato dimostrato che in condizioni fisiologiche, 7 giorni dopo la somministrazione del *marker*, più del 90% delle RGC risultano marcate (Sawada & Neufeld, 1999). In breve, tre giorni dopo l'insulto ischemico, gli animali sono stati anestetizzati (uretano, 1500 mg/Kg i.p.) ed immobilizzati in un apparecchio stereotassico (Kopf 900, Analytical Control, Milano, Italia). Le posizioni dei collicoli superiori sono state calcolate utilizzando le coordinate riportate dall'atlante stereotassico di Paxinos-Watson (2001). Il cranio è stato esposto e l'iniezione effettuata 6 mm posteriormente al bregma e 1.2 mm lateralmente alla sutura sagittale. L'iniezione bilaterale di FluoroGold (2.0 µl di soluzione acquosa al 5% del colorante fluorescente) è stata eseguita mediante una siringa Hamilton (Reno, NV), con un ago da 33 *gauge* ad una profondità di 4 mm a partire dalla *dura madre*. La cute è stata successivamente suturata ed una pomata antibiotica è stata applicata esternamente. Trascorsi sette giorni dall'ischemia, gli animali sono stati sacrificati, gli occhi enucleati e fissati in paraformaldeide (PFA) al 4% per 30 minuti. La parte anteriore dell'occhio è stata rimossa e le porzioni posteriori post-fissate con PFA al 4% per un'ora. Le retine sono state poi isolate, divise in quattro quadranti (nasale, temporale, superiore ed inferiore) e montate su vetrino utilizzando il mezzo montante Vectashield (Laboratori Vector, DBA Milano, Italia) per l'osservazione al microscopio. Le immagini sono state acquisite ad un ingrandimento 40X utilizzando un microscopio a deconvoluzione (Leica EL6000 Microsystem CMS; GbH, Mannheim, Germania). Per ogni quadrante sono state valutate la

zona peripapillare, quella media e quella periferica per un totale di tre aree microscopiche per quadrante. Al fine di quantificare le cellule ganglionari marcate, le 12 aree risultanti per ogni retina sono state sottoposte a conta cellulare. Il numero totale delle cellule marcate nell'occhio ischemico (destra) è stato comparato con quello relativo all'occhio controlaterale (sinistra) ed espresso in valore percentuale.

3.7 Sinaptosomi e considerazioni metodologiche

Al fine di ottenere maggiori informazioni sui processi molecolari alla base della morte cellulare delle RGC e delle variazioni nei livelli di glutammato retinico, sono stati condotti esperimenti con preparazioni di terminazioni nervose purificate (sinaptosomi) ottenute da retine provenienti da ratti controllo o ischemici. Sebbene i sinaptosomi siano una frazione distaccata dall'intero neurone, tutti i sistemi presenti nel terminale nervoso sono conservati e perfettamente funzionanti (vedi Raiteri & Raiteri, 2000); in particolare, i neurotrasmettitori radioattivi possono essere captati attraverso i loro specifici trasportatori e liberati in seguito a vari tipi di stimoli in grado di indurre esocitosi del trasmettitore.

35 anni fa è stato introdotto, per la prima volta, un semplice apparato per studiare il rilascio dei neurotrasmettitori dai sinaptosomi (Raiteri et al., 1974). In breve, i sinaptosomi, sono stratificati su filtri microporosi di un apparato di superfusione in maniera tale che le particelle possano formare un sottile monostrato, e sono, successivamente, superfusi

dall'alto verso il basso. La rapida rimozione del fluido di perfusione impedisce che le sostanze rilasciate dai sinaptosomi vengano ricaptate da parte dei trasportatori o interagiscano con i recettori o con altri bersagli presenti sulle terminazioni nervose stesse. Rimanendo liberi, questi *target* possono essere selettivamente attivati da appropriati ligandi aggiunti nel mezzo di superfusione. In particolare, i sinaptosomi in superfusione permettono lo studio degli auto ed etero-recettori che regolano la liberazione dei neurotrasmettitori (vedi Raiteri et al., 1984; Bonanno & Raiteri 1993) dal momento che consentono di identificare e caratterizzare farmacologicamente i recettori presinaptici e i loro sottotipi attraverso la modulazione del rilascio di neurotrasmettitore nelle diverse aree del Sistema Nervoso Centrale (Marcoli et al., 1999; Pittaluga et al., 1997; Raiteri, 2008; Russo et al., 1993; Schmid et al., 1996). Attraverso la superfusione è, inoltre, possibile distinguere tra *releasers* veri ed inibitori del reuptake nonché studiare anche l'interazione recettore-recettore (vedi Raiteri & Raiteri, 2000).

3.7.1 Preparazione dei sinaptosomi

Gli animali sono stati sacrificati e le retine sono state prelevate rapidamente mantenendo il tessuto ad una temperatura compresa tra 0° e 4°C. I sinaptosomi purificati (Dunkley et al., 1998; Nakamura et al., 1993) sono stati preparati tramite omogenizzazione del tessuto in 10 volumi di saccarosio 0.32 M, tamponato a pH 7.4 con Tris-HCl, utilizzando un omogenizzatore di tessuto in vetro-teflon (clearance 0.25 mm). L'omogenato ottenuto è stato centrifugato a 1000 g per 5 minuti, per rimuovere cellule,

detriti e nuclei che sedimentano sul fondo della provetta. Il sovranatante è stato stratificato gentilmente su un gradiente discontinuo di Percoll® (6%, 10% e 20% v/v in una soluzione di saccarosio tamponato con Tris-HCl) e quindi centrifugato per 5 minuti a 33500g. La frazione sinaptosomiale, all'interfaccia tra 10% e 20% di Percoll®, è stata raccolta e quindi lavata con una successiva centrifugazione. Il precipitato ottenuto, contenente i sinaptosomi purificati, è stato risospeso con medium fisiologico avente la seguente composizione (mM): NaCl, 140; KCl, 3; MgSO₄, 1.2; CaCl₂ 1.2; NaH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 5; glucosio, 10; HEPES, 5; a pH 7.4. Tutte le procedure sono state condotte ad una temperatura compresa tra 0° e 4°C. La quantità di proteine sinaptosomiali, ove necessario, è stata determinata secondo il metodo di Bradford (1976), usando albumina bovina come standard.

3.7.2 Esperimenti di rilascio di trasmettitore da sinaptosomi

Dopo l'aggiunta del radioattivo, la sospensione dei sinaptosomi di retina marcati con [³H]D-Aspartato (0.1μM), analogo non metabolizzabile dell'L-glutammato, è stata mantenuta in incubazione a 37°C per 15 minuti, in un bagno termostato dotato di piastra a movimento rotatorio. Al termine dell'incubazione, la sospensione è stata diluita con *medium* fisiologico, precedentemente riscaldato, e poi suddivisa in aliquote identiche che sono state distribuite a formare un monostrato e quindi stratificate, sotto vuoto moderato, su filtri di porosità 0.65 μm posti sui setti di vetro che costituiscono il fondo delle camere

del sistema di superfusione (Ugo Basile, Varese, Italia). Ciascuna camera era termostata in modo da mantenere il *medium* fisiologico, contenuto al suo interno, ad una temperatura costante di 37°C (vedi Raiteri & Raiteri, 2000). Dopo la stratificazione, i sinaptosomi sono stati superfusi con *medium* fisiologico ad una velocità di 0.5 mL/min. I primi 36 minuti di superfusione sono stati necessari per equilibrare il sistema e per raggiungere un livello costante di liberazione basale (spontanea) del neurotrasmettitore. Dopodichè frazioni di superfusato sono state raccolte nel modo seguente: due frazioni da tre minuti (t=36-39 minuti e t=45-48 minuti; rilascio basale) prima e dopo una frazione da sei minuti (t=39-45 minuti; rilascio evocato). Lo stimolo depolarizzante è stato applicato alla fine della prima frazione raccolta (t=39 minuti) per una durata di 90 secondi; successivamente la superfusione è continuata con *medium* fisiologico. La depolarizzazione è avvenuta tramite l'applicazione di differenti concentrazioni di KCl (15 e 35 mM). In una serie di esperimenti, al fine di valutare il rilascio esocitotico, il Ca²⁺ è stato omissso dal *medium* di superfusione a partire da t=20 minuti di superfusione. Il *medium* privo di Ca²⁺ conteneva MgCl₂ (8.8mM), che sostituiva una quantità iso-osmotica di Na⁺. In un'altra serie di esperimenti, al fine di valutare il rilascio *carrier*-mediato, l'inibitore dei trasportatori per il glutammato, DL-threo-beta-benzilossiaspartato (DL-TBOA) (10⁻⁵ M) (Sigma, Milano, Italia) è stato aggiunto a partire da t= 30 minuti.

Al termine dell'esperimento, il livello di radioattività delle frazioni raccolte e dei sinaptosomi stratificati sui filtri è stato determinato attraverso scintillazione in fase liquida.

3.7.3 Esperimenti di uptake su sinaptosomi

Il pellet sinaptosomiale è stato risospeso in un appropriato volume di *medium* standard ed aliquote (500 µL) della sospensione contenenti 6-9 µg di proteine di sinaptosomi di retina, sono state incubate per 2 minuti a 37°C con [³H]D-Asparato (3-10-30-100 µM). Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati filtrati rapidamente tramite filtri Whatman microporosi (GF/B) (Millipore). Ogni campione è stato lavato tre volte con 5 ml di *medium* standard e la radioattività presente nei filtri è stata misurata mediante scintillazione in fase liquida. I valori del legame aspecifico di [³H]D-Aspartato ("bianco") sono stati ottenuti effettuando la medesima procedura su campioni mantenuti in un bagno di acqua e ghiaccio mentre i trasportatori del glutammato bloccati con DL-TBOA (10⁻⁵ M).

3.8 Preparazione degli estratti retinici totali

Gli animali, previa somministrazione di una dose sub-letale di cloralio idrato, sono stati sacrificati a 0, 1, 6 e 24 ore di riperfusione, attraverso dislocazione cervicale. Entrambi gli occhi sono stati immediatamente enucleati e la retina rapidamente isolata, immersa in azoto liquido e conservata ad una temperatura di -80°C fino al momento dell'estrazione delle proteine totali. Per l'estrazione, ogni retina è stata omogeneizzata, utilizzando un potter di vetro/teflon, in 130 µl di tampone di lisi freddo contenente 50 mM di Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM di NaCl, 2

mM di EDTA, 2 mM di EGTA, 1% Triton X-100, 1 nM di acido okadaico, ed un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma, Milano, Italia). Il lisato tissutale è stato centrifugato per 15 minuti a 10.000 g a 4°C e, successivamente, è stato raccolto il surnatante destinato all'analisi. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il metodo DC per l'analisi delle proteine (Laboratori Bio-Rad, Milano, Italia) con albumina sierica bovina (BSA) usata come standard.

3.9 Preparazione degli estratti retinici sinaptosomiali

Per la preparazione dei sinaptosomi sono stati utilizzate retine provenienti da ratti *naive* e da ratti sottoposti ad ischemia seguita da 0, 2.5 e 24 ore di riperfusione. Il pellet sinaptosomiale ottenuto è stato risospeso in un *buffer* di estrazione a pH 6.8 (0.625M Tris HCl, 2% SDS, 10% glicerolo, 5% 2-mercaptoetanololo, 0.002% blue bromofenolo) supplementato dall'aggiunta del 10% di inibitori delle proteasi, riscaldati per 5 minuti a 95°C e quindi conservati a -80°C fino al momento dell'uso. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il metodo DC per l'analisi delle proteine (Laboratori Bio-Rad, Milano, Italia) con albumina sierica bovina (BSA) usata come standard.

3.10 Western blotting

I livelli delle proteine studiate sono stati analizzati quantizzandone l'espressione con la tecnica del Western Blotting, utilizzando l'elettroforesi sul gel di poliacrilammide, in condizioni denaturanti e riducenti. Otto microgrammi di proteine provenienti dagli estratti totali retinici e quindici microgrammi di quelli provenienti da estratti sinaptosomiali sono stati risolti attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) al 12% e successivamente trasferiti, elettroforeticamente, su membrana di nitrocellulosa (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schuell, Bioscienze, Dassel, Germania).

I siti aspecifici sulla membrana sono stati bloccati utilizzando latte al 5% in un tampone salino contenente Tris 10mM, (pH8), NaCl 150mM, Tween-20 0.05% (TBS-T) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, la membrana è stata incubata per una notte a 4°C con l'anticorpo primario, diretto contro la proteina d'interesse. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-GLT1 (policlonale, prodotto nel topo) alla diluizione di 1:2000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); anti- α -spectrina non-eritroide (MAB 1622) (policlonale, prodotto nel topo) alla diluizione 1:3000 (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA); anti-actina (monoclonale, prodotto nel topo) (clone AC-40, Sigma) alla diluizione di 1:1000; anti- β -tubulina (monoclonale, prodotto nel topo) (clone B-5-1-2, Sigma) alla diluizione di 1:20.000. Per la rilevazione del segnale, le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con

un anticorpo secondario (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), coniugato con perossidasi di rafano, per 1 ora a temperatura ambiente e l'attività enzimatica determinata in chemiluminescenza (ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Milano, Italia) esponendo le membrane ad una lastra fotografica. Le lastre fotografiche sono state successivamente scannerizzate e l'analisi densitometrica delle bande relative alla proteina d'interesse è stata realizzata utilizzando il Software QuantiScan (Biosoft, Cambridge, UK).

3.11 Calcoli per esperimenti di rilascio

In ogni frazione raccolta il rilascio di [³H]D-Aspartato è stato espresso come percentuale del contenuto totale di radioattività presente nei sinaptosomi all'inizio del corrispondente periodo di raccolta ("fractional rate" X 100). "L'overflow" del neurotrasmettitore evocato dalla depolarizzazione è stato calcolato sottraendo il contenuto di trasmettitore delle frazioni corrispondenti al rilascio basale da quello della frazione da 6 minuti, raccolta durante e dopo lo stimolo depolarizzante.

3.12 Calcoli per esperimenti di uptake

L'*uptake* specifico da parte dei sinaptosomi è stato calcolato sottraendo alla radioattività totale dei filtri il valore relativo al legame non specifico per la concentrazione di tracciante radiattivo presa in esame. L'*uptake* specifico è stato,

quindi, espresso in funzione dei μg di sinaptosomi presenti in ogni singolo campione ed il valore finale dell'*uptake* espresso come nmoli di [^3H]D-Aspartato captato da un μg di sinaptosomi nell'unità di tempo.

3.13 Analisi statistiche

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard (SEM) dei singoli esperimenti. Le differenze sono state valutate attraverso l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal post-test di Dunnett per comparazioni multiple o, dove possibile, attraverso il *t test* di Student (GrafPAD Software for Scienze, San Diego, California, USA). Le differenze sono state considerate significative per valori di $p < 0.05$.

4. Risultati

4.1 Modulazione dei livelli di glutammato nella retina di ratto sottoposta ad ischemia/riperfusion

Per studiare le variazioni neurochimiche dei livelli retinici di glutammato, le sonde da dialisi sono state impiantate nel corpo vitreo di ratti anestetizzati sottoposti ad ipertono oculare acuto o a procedura *sham*. Le sonde sono state perfuse con CSF ad un flusso di 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dopo 2 ore di stabilizzazione del sistema, i campioni di dializzato sono stati raccolti ad intervalli di 10 minuti prima, durante e dopo l'induzione dell'ischemia. Il profilo temporale delle variazioni dei livelli extracellulari di glutammato nel vitreo di ratto ($n=6$) nell'arco di 290 minuti è illustrato in Figura 1. Al fine di stabilire i livelli basali dell'amminoacido, è stata effettuata una raccolta di 6 campioni di dializzato prima dell'induzione dell'ischemia. La concentrazione basale di glutammato, ottenuta dalla media dei sei campioni, risulta essere pari a $1.09 \pm 0.16 \mu\text{M}$.

Durante l'ischemia, in conseguenza dell'insulto pressorio acuto nella camera anteriore, si verifica un aumento transitorio dei livelli extracellulari di glutammato rispetto ai valori basali che, tuttavia, non raggiunge la significatività statistica ($3.06 \pm 0.64 \mu\text{M}$).

Nella fase di riperfusion, quando il valore pressorio nella camera anteriore è riportato a livelli fisiologici, si assiste ad un graduale aumento della concentrazione extracellulare dell'amminoacido che raggiunge valori statisticamente significativi a 10 e 150 minuti di riperfusion ($4.46 \pm 0.75 \mu\text{M}$, $p < 0.01$ e $3.68 \pm 1.16 \mu\text{M}$, $p < 0.05$, rispettivamente).

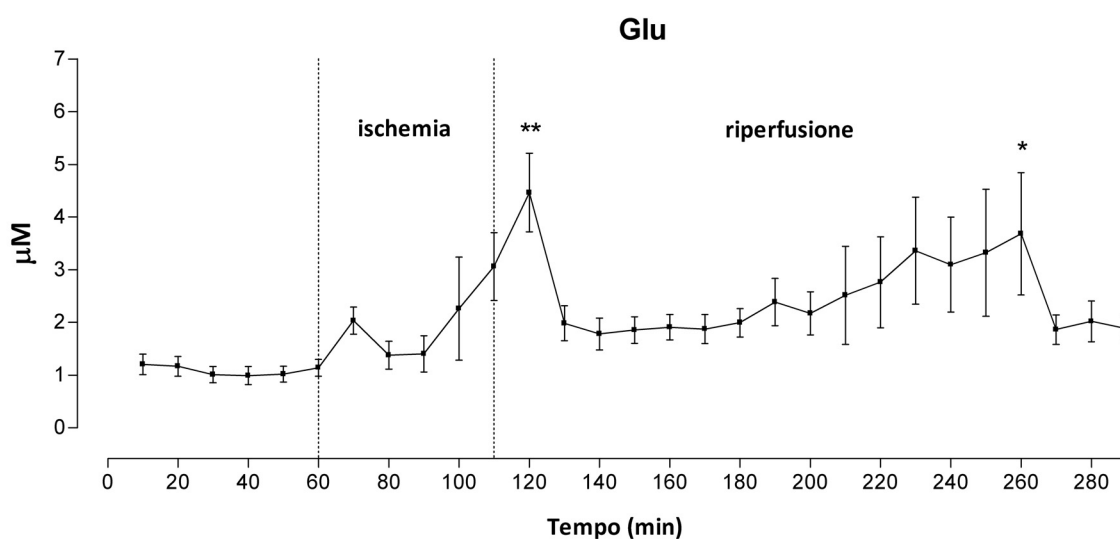


Figura 1. *Variazioni delle concentrazioni intravitreali di glutammato in corso d'ischemia/riperfusione nel ratto.* I dati sperimentali, ottenuti mediante l'impiego della tecnica della microdialisi, dimostrano che i livelli extracellulari di glutammato (Glu) tendono ad aumentare in fase di ischemia con un più sostenuto e statisticamente significativo aumento dopo 10 e 150 minuti di riperfusione. I valori riportati in grafico sono le medie \pm l'errore standard di 6 esperimenti. La significatività statistica è stata valutata tramite ANOVA seguita dal test di Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs valori basali.

Viceversa, nessuna variazione rispetto ai valori basali si osserva nei livelli di glutammato misurati in animali sottoposti a procedura *sham* (dati non mostrati).

4.2 L'attività delle calpaine è modulata dall'ischemia/riperfusione nella retina

In corso d'ischemia, l'aumento dei livelli di glutammato porta all'attivazione di enzimi calcio-dipendenti con attività proteolitica come le calpaine (Branca et al., 2004). La proteina non eritroide α -spectrina è clivata dalle calpaine in due frammenti inattivi rispettivamente di 150 e 145 kDa. Anche la caspasi-3 è in grado di clivare l' α -spectrina,

generando però frammenti di 120 e 150 kDa (Nath et al., 1996). Abbiamo, pertanto, studiato lo stato di attivazione delle calpaine, valutando, mediante Western Blotting la produzione dei caratteristici frammenti dell' α -spectrina.

I dati ottenuti dimostrano che, già dopo 50 minuti di ischemia, i frammenti di 145 e 150 KDa aumentano significativamente se confrontati con quelli relativi all'occhio controlaterale non-ischemico (Fig. 2). I frammenti di clivaggio dell' α -spectrina denotano l'intensa attivazione delle calpaine che rimane sostenuta anche dopo 1, 6 e 24 ore di riperfusione. Ai tempi analizzati non si osserva nessuna modulazione significativa del frammento di 120 kDa, tipicamente associato all'attivazione della caspasi-3.

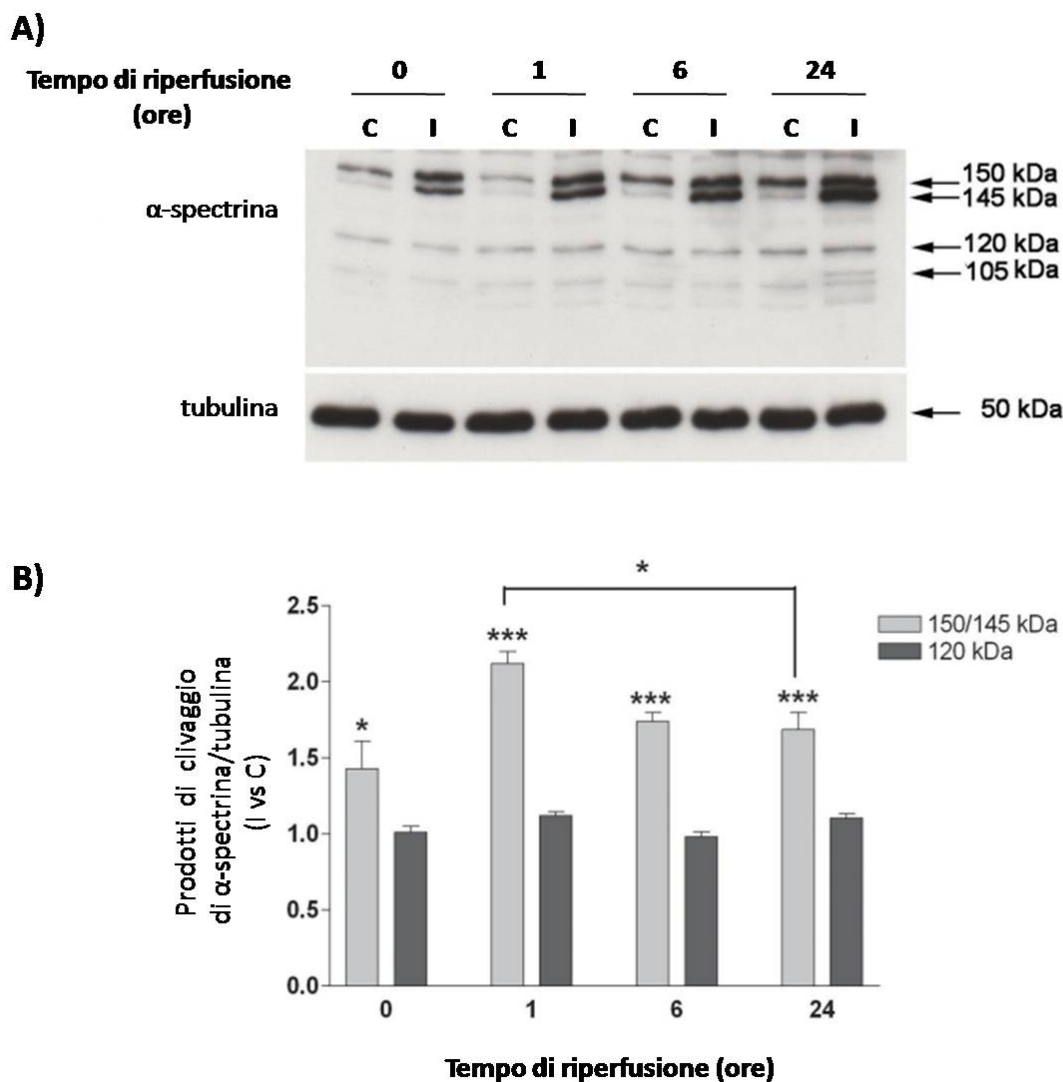


Figura 2. *Variazioni dell'attività proteolitica delle calpaine indotta dall'ischemia/riperfusione.* L'immunoblotting (pannello A) mostra l'aumento dei frammenti di clivaggio dell' α -spectrina, prodotti dall'attività proteolitica della calpaina (150/145 kDa) alla fine dell'ischemia (tempo di riperfusione zero) e dopo 1, 6 e 24 ore di riperfusione. La figura mostra altresì l'assenza di un accumulo del prodotto di clivaggio mediato dalla caspasi-3 a 120 kDa. L'istogramma in B deriva dall'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche relative ai frammenti 150/154 e 120 kDa, normalizzati sul valore della tubulina e confrontati con l'occhio controlaterale non ischemico (C). Ciascun valore è espresso come la media \pm l'errore standard di 3-5 esperimenti; *** $p < 0.001$ * e $p < 0.05$ vs non ischemico. (I = occhio ischemico, C = occhio controlaterale).

4.3 Il trattamento intravitreale con MK801 previene l'attivazione della calpaina indotta dall'aumento della IOP

La somministrazione intravitreale dell'antagonista del recettore NMDA, MK801 (50 nmol), somministrato 5 minuti prima dell'ischemia, previene l'attivazione della calpaina, come dimostrato in Figura 3A dalla riduzione dei tipici prodotti di clivaggio dell' α spectrina. Tale effetto di inibizione del processo proteolitico mediato dalle calpaine è mantenuto mediante un'ulteriore somministrazione intravitreale di MK801 (50 nmol), all'inizio della riperfusione stessa (Figura 3B).

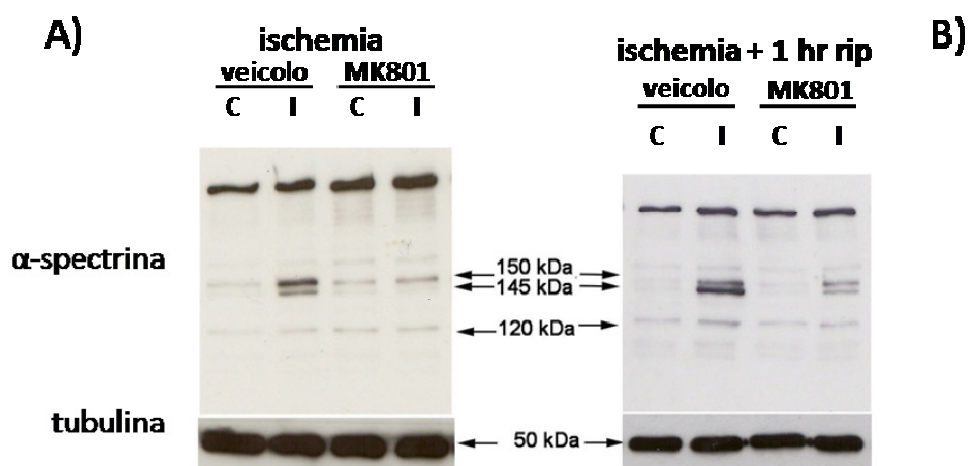


Figura 3. *Effetti della somministrazione intravitreale di MK-801 sulla degradazione dell' α -spectrina* La figura mostra un esperimento rappresentativo dell'effetto del trattamento intravitreale con MK801 sull'attivazione della calpaina al termine dell'ischemia (pannello A) o dopo 1 ora di riperfusione (pannello B). L'attività della calpaina è stata studiata mediante l'analisi dei prodotti di clivaggio dell' α -spectrina di 150/145 kDa, caratteristici della proteolisi calpainomediata. * $P < 0.05$ vs veicolo (Test di Student). (I = occhio ischemico; C = occhio controlaterale).

4.4 L'ischemia/riperfusion determina la perdita selettiva delle RGC

I glaucomi sono caratterizzati dalla perdita esclusiva delle cellule ganglionari retiniche (Quingley, 1996). Al fine di poter correlare l'aumento transitorio della pressione intraoculare alla progressiva perdita di cellule vitali nello strato delle cellule ganglionari è stata eseguita un'analisi quantitativa, marcando in maniera selettiva per via intracolicolare le RGC con il colorante fluorescente FluoroGold (Fig. 4). Le retine sono state prelevate a 7 giorni dall'induzione dell'ipertono, ed il numero totale di RGC presenti nelle retine sottoposte ad ischemia/riperfusion (Fig. 4b) è stato confrontato con quello presente nelle retine provenienti da animali *sham* (Fig. 4a).

Il numero complessivo di RGC contate nei 12 campi analizzati per ogni retina corrisponde circa a 2500-3000 cellule/retina e rappresenta il 2-3% delle RGC normalmente presenti in una retina di ratto. Nelle nostre condizioni sperimentali, i dati relativi alla conta cellulare mostrano che l'ischemia seguita da 7 giorni di riperfusion produce una significativa riduzione nel numero di RGC. Tale perdita risulta essere del $25.9 \pm 4.2\%$ ($p < 0.05$) se confrontata con quella di animali *sham* (Fig. 4 c).

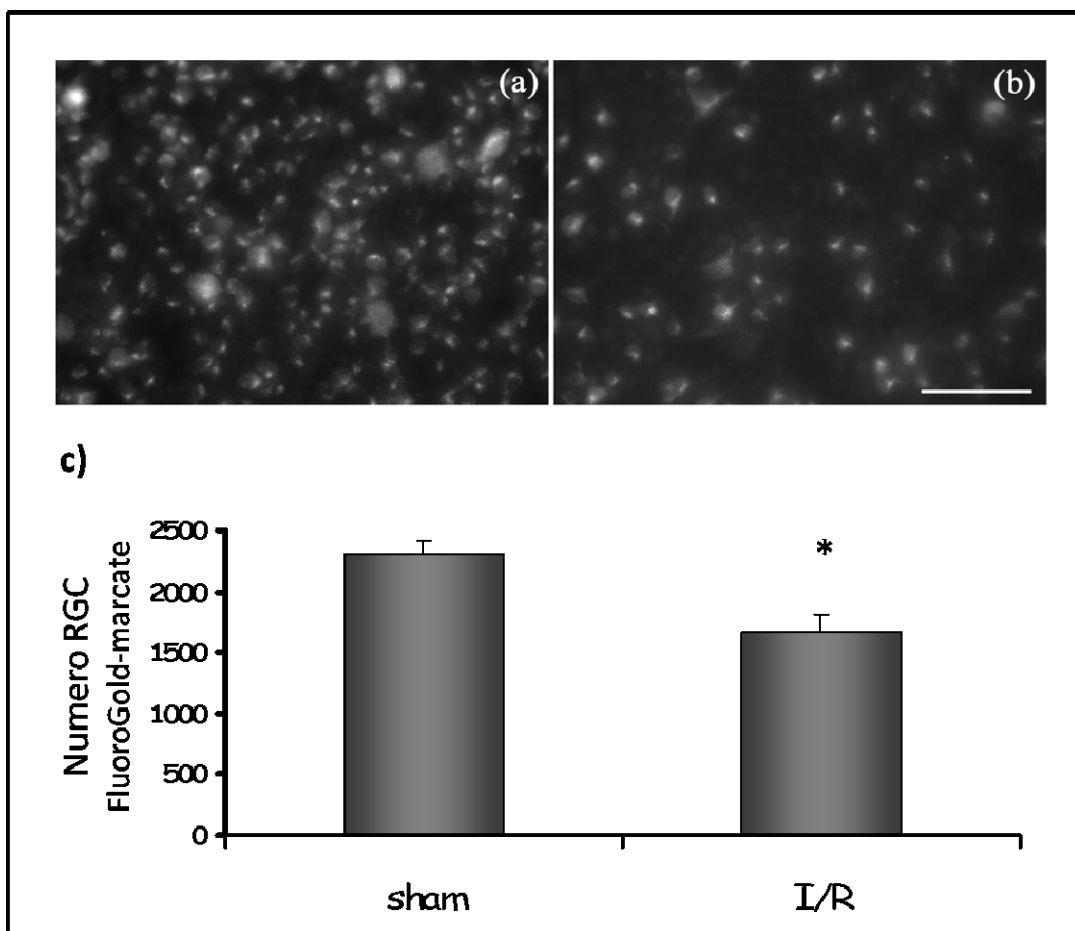


Figura 4. *L'ischemia/riperfusion induce la perdita significativa di RGC. Le retine sottoposte ad ischemia mostrano, dopo 7 giorni di riperfusione, una riduzione nel numero delle RGC marcate con FluoroGold (b) se confrontate con quelle presenti nelle retine di ratti sottoposti a procedura sham (a). Le immagini mostrate si riferiscono all'area retinica periferica e la barra presente in figura corrisponde a 50 μ m. Negli istogrammi (c) sono riportati i risultati relativi alle conte cellulari effettuate nelle retine di animali sottoposti a procedura sham ed ad ischemia seguita da 7 giorni di riperfusione (I/R). Il valore riportato indica la media \pm l'errore standard di 3-4 ratti per gruppo. * $p < 0.05$ vs sham.*

4.5 Il coenzima Q10 previene la perdita delle RGC indotta dall'ischemia/riperfusione

Il coenzima Q10 è un importante componente della catena di trasporto degli elettroni, dotato di elevate proprietà antiossidanti, che ha evidenziato interessanti proprietà neuroprotettive (Beal & Matthews, 1997; Ferrante et al., 2002; Beal, 2004). Per verificare se il coenzima Q10 potesse esercitare un'azione protettiva nei confronti del danno selettivo alle RGC, indotto dall'aumento acuto della IOP, sono stati eseguiti degli studi morfologici al fine di valutare l'effetto del trattamento sulla perdita di RGC causata dall'induzione dell'ipertono. I risultati ottenuti mostrano che la somministrazione intravitreale di coenzima Q10 previene la morte delle RGC (Fig. 5b) tipicamente osservata a 7 giorni dall'insulto ischemico (Fig. 5a). In particolare, i dati relativi alle conte cellulari mostrano che la perdita cellulare è pari al $12.0 \pm 3.8\%$ negli animali pretrattati con il coenzima Q 10 rispetto al $25.9 \pm 4.2\%$ negli animali ischemici non trattati (n=3 ratti per esperimento).

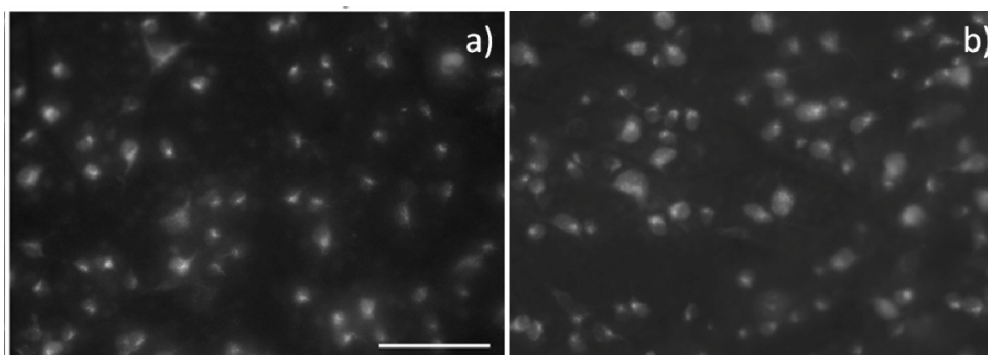


Figura 5. *Il coenzima Q10 previene la perdita delle RGC nel modello di ischemia/riperfusione nel ratto. Le retine sottoposte ad ischemia/riperfusione (a) mostrano, dopo 7 giorni di riperfusione, una riduzione nel numero delle RGC marcate con FluoroGold. Tale perdita è prevenuta dal trattamento intravitreale, via sonda, con coenzima Q10 (b). Le RGC sono state marcate iniettando il colorante fluorescente, Fluorogold, a livello dei collicoli superiori. Le immagini si riferiscono all'area retinica periferica. La barra presente in figura corrisponde a 50 μm .*

Successivamente, al fine di verificare se l'azione protettiva del coenzima Q10 fosse direttamente correlata alla modulazione dei livelli retinici di glutammato sono stati eseguiti studi di neurochimica mediante l'impiego della tecnica della microdialisi.

Il coenzima Q10 è stato somministrato focalmente, attraverso la sonda da dialisi (per 5 minuti), 30 minuti prima dell'induzione dell'ischemia. I risultati evidenziano che il pretrattamento con coenzima Q10 (Fig. 6) non influenza in modo significativo l'aumento di glutammato tipicamente osservato dopo 10 minuti di ischemia, mentre riduce in maniera significativa l'incremento del neurotrasmettitore eccitatorio osservato a 10 e 150 minuti di riperfusione ($2.29 \pm 0.55 \mu\text{M}$ e $2.07 \pm 0.38 \mu\text{M}$ rispettivamente).

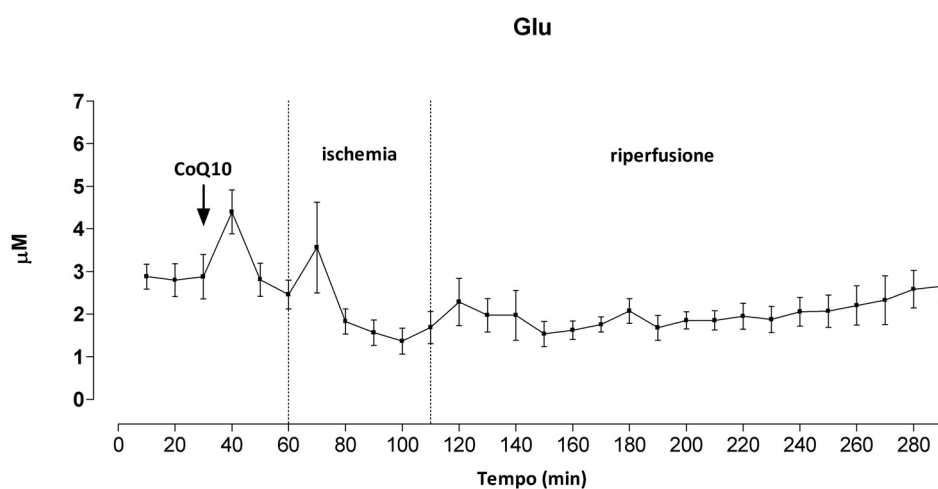


Figura 6. *Il coenzima Q10 previene l'incremento di glutammato osservato in corso di riperfusione. La somministrazione del coenzima Q10 (CoQ10) non modifica l'aumento di glutammato (Glu) tipicamente osservato, nei ratti controllo, dopo 10 min d'ischemia, ma previene l'incremento osservato a 10 e 150 min di riperfusione. Le concentrazioni basali dei livelli di glutammato rappresentano la media dei campioni raccolti prima dell'ischemia. I valori sono riportati come medie \pm errore standard di 4 animali.*

4.6 Il 17 β -estradiolo riduce i livelli di glutammato osservati in corso di ischemia/riperfusion

Per rafforzare l'ipotesi che l'attività antiossidante del coenzima Q10 potesse essere alla base della modulazione dei livelli di glutammato in corso di riperfusion, è stato utilizzato il 17 β -estradiolo (E₂). L'ormone steroideo possiede, infatti, proprietà anti-ossidanti intrinseche e nello stesso modello sperimentale, ha evidenziato proprietà neuroprotettive, riducendo la perdita delle RGC dopo 24 ore dall'insulto ischemico (Russo et al., 2008). Analogamente al coenzima Q10, E₂ è stato somministrato 30 minuti prima dell'induzione dell'ischemia (0.2 mg/kg, i.p.). I risultati ottenuti dimostrano che E₂ modula i livelli extracellulari di glutammato (Fig. 7), riducendoli significativamente rispetto ai valori ottenuti negli animali di controllo. In particolare i livelli di glutammato negli animali trattati con E₂ risultano essere 2.40 \pm 0.8 μ M e 1.26 \pm 0.19 μ M a 10 e 150 minuti di riperfusion rispettivamente. Agli stessi tempi, negli animali di controllo i livelli di glutammato risultano invece essere 4.46 \pm 0.75 μ M e 3.68 \pm 1.16 μ M. Il trattamento con il solo veicolo (soluzione idroalcolica al 30%, i.p.) non modifica il profilo temporale dei livelli di glutammato osservato nei controlli (dato non mostrato).

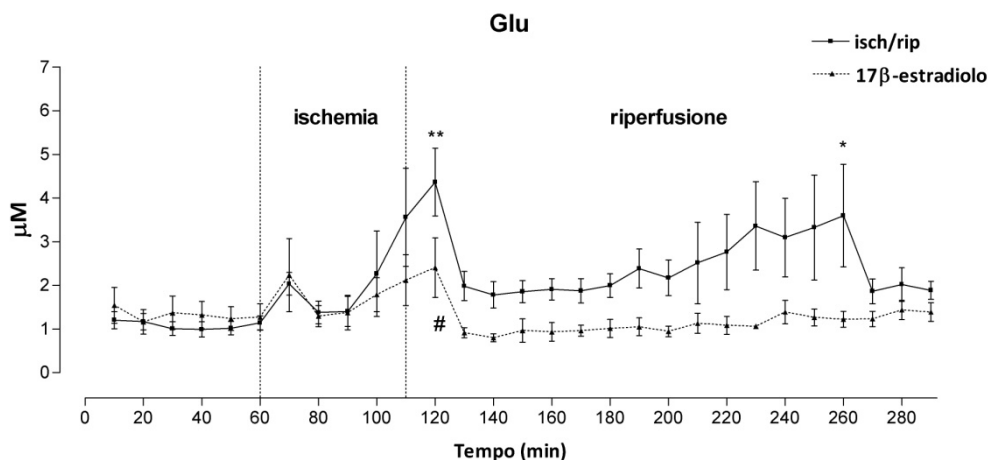


Figura 7. *Effetto del 17β-estradiolo sui livelli di glutammato in corso di ischemia/riperfusion.* La somministrazione di 17β-estradiolo, 30 min prima dell'induzione dell'ischemia (0.2 mg/kg, i.p., n=5; linea tratteggiata), riduce le concentrazioni extracellulari di glutammato (Glu) monitorate in ratti sottoposti ad ischemia riperfusion (n=6; linea continua). Le concentrazioni basali dei livelli di glutammato rappresentano la media dei campioni raccolti prima dell'ischemia. La significatività statistica è stata valutata tramite ANOVA seguita dal test di Dunnett. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ # $p < 0.05$ vs i valori basali.

Per escludere che l'effetto di E_2 sui livelli di glutammato fosse mediato dall'attivazione dei recettori estrogenici, è stato valutato l'effetto del composto ICI 182-780, un antagonista dei recettori per gli estrogeni.

Trenta minuti prima del trattamento con 17β-estradiolo, gli animali sono stati trattati con ICI 182-780 (0.2-2 mg/Kg, i.p.). Come evidenziato in Figura 8, il pretrattamento con l'antagonista, a dosi di 0.2 mg/kg (n=5), non reverte l'effetto di E_2 sui livelli extracellulari di glutammato in corso di ischemia/riperfusion.

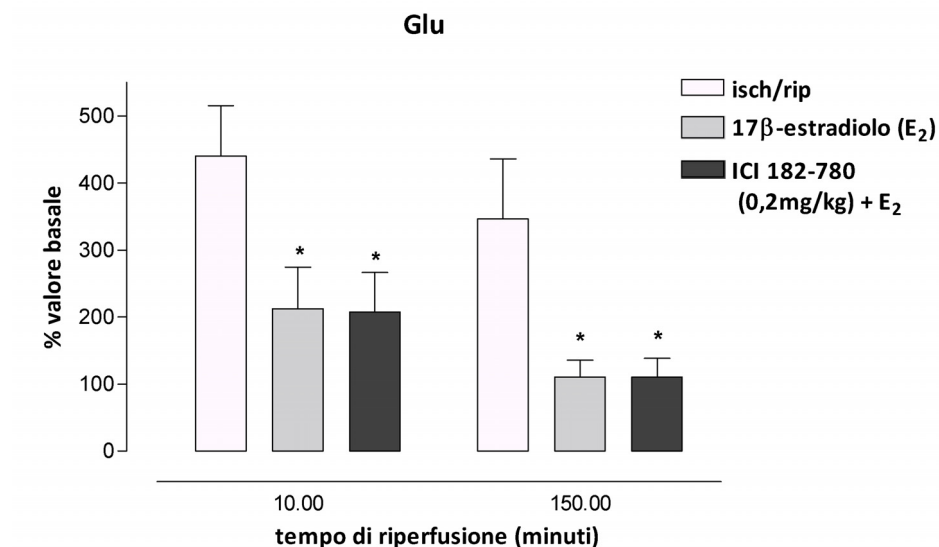


Figura 8. *Effetto dell'ICI 182-780 sui livelli di glutammato modulati dal 17β-estradiolo in corso di ischemia/riperfusione.* La somministrazione dell'antagonista del recettore estrogenico, ICI 182-780, somministrato 30 min prima di E₂, (n=5) non reverte l'effetto del 17β-estradiolo (n=5) sui livelli di glutammato osservato a 10 e 150 min di riperfusione. I livelli di glutammato rilevati nei 6 esperimenti di controllo (isch/rip) sono indicati dalla colonna bianca. I valori (% valore basale) sono riportati come media ± errore standard. La significatività statistica è stata valutata mediante t test. *p < 0.05 vs ischemia riperfusione (isch/rip).

Viceversa, la somministrazione di una dose 10 volte maggiore (2 mg/kg, i.p. n=3) dell'antagonista reverte parzialmente l'effetto dell'estrogeno, nella fase precoce (10 minuti) della riperfusione ($4.30 \pm 1.68 \mu\text{M}$) (Fig. 9).

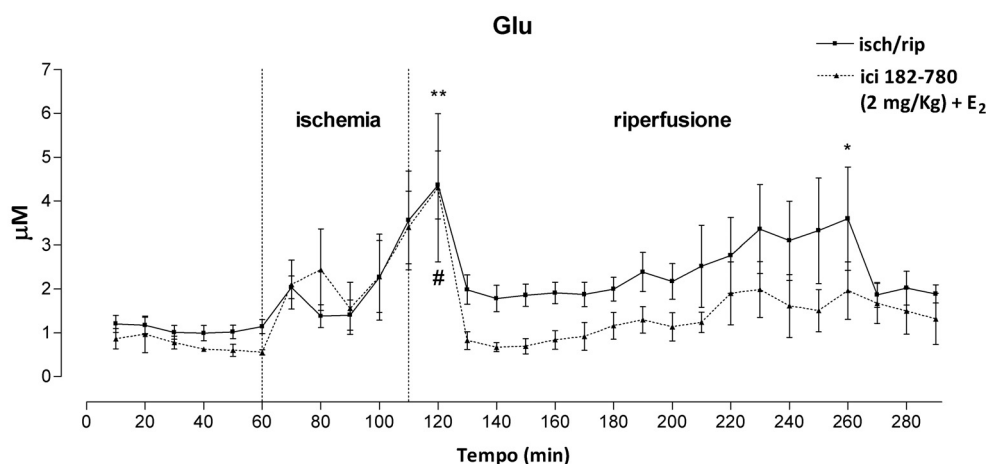


Figura 9. *Dosi elevate di ICI 182-780 revertono l'effetto dell'estrogeno sui livelli di glutammato nella fase precoce della reperfusion. La somministrazione di ICI 182-780 alla dose di 2 mg/kg (i.p. n=3), 30 min prima del 17 β -estradiolo (E₂), reverte l'effetto dell'estrogeno sui livelli di glutammato (Glu) osservato a 10 min di reperfusion. Nelle stesse condizioni sperimentali l'ICI 182-780 fallisce nel bloccare l'effetto di E₂ a 150 min di reperfusion. Le concentrazioni basali dei livelli di glutammato sono ottenute dalla media dei campioni raccolti prima dell'ischemia. I valori riportati sono le medie \pm l'errore standard. La significatività statistica è stata valutata tramite ANOVA seguita dal test di Dunnett. *p<0.05 **p<0.01 #p<0.01 vs i valori basali.*

4.7 Il 17 α -estradiolo riduce i livelli extracellulari di glutammato nella fase tardiva della reperfusion

I risultati ottenuti con il 17 β -estradiolo e con l'antagonista estrogenico, ICI 182-780, rafforzano l'ipotesi di un coinvolgimento dello stress ossidativo nell'aumento dei livelli intravitreali di glutammato in corso di reperfusion. Per rafforzare ulteriormente questa ipotesi, è stato valutato, sui parametri studiati, l'effetto con l'isomero alfa dell'estradiolo. Il 17 α -estradiolo, infatti, a differenza dell'isomero β , non è in grado di attivare il recettore per gli estrogeni, ma conserva le proprietà antiossidanti. Il 17 α -estradiolo, usato alle stesse concentrazioni di E₂ (0.2 mg/Kg, i.p.), e somministrato analogamente 30 minuti prima dell'insulto ischemico, presenta la stessa efficacia

dell'isomero β nel prevenire l'accumulo di glutammato nella fase tardiva della riperfusione (Fig. 10) ma, a differenza del diastereoisomero attivo a livello recettoriale, non interferisce con l'incremento osservato precocemente a 10 minuti di riperfusione ($3.80 \pm 1.50 \mu\text{M}$). Quest'ultimo dato corrobora, quindi, i risultati precedentemente ottenuti, escludendo, nella fase tardiva della riperfusione, il coinvolgimento del recettore estrogenico nei meccanismi di neuromodulazione.

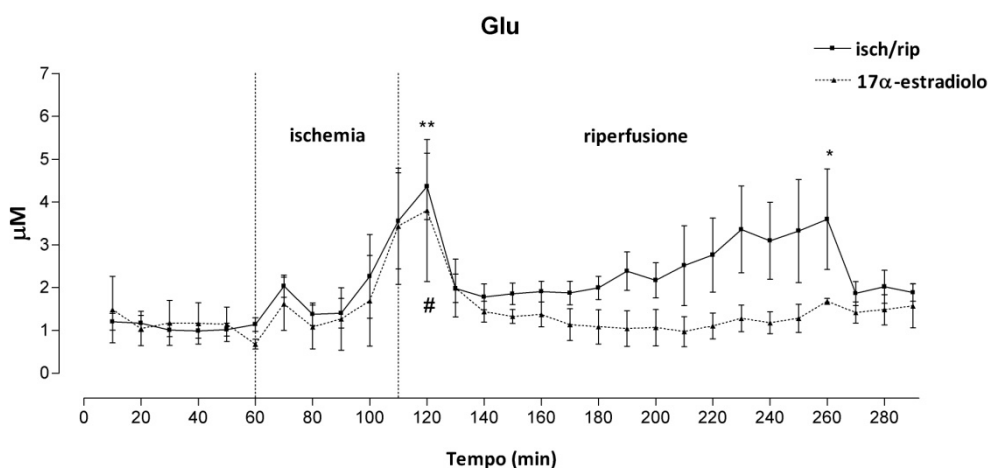


Figura 10. *Effetto del 17 α -estradiolo sui livelli di glutammato in corso di ischemia/riperfusione. La somministrazione del 17 α -estradiolo (0,2mg/Kg, i.p. n=3), 30 minuti prima dell'ischemia, riduce i livelli di glutammato (Glu) nella fase tardiva della riperfusione. Le concentrazioni basali dei livelli di glutammato sono ottenute dalla media dei campioni raccolti prima dell'ischemia. I risultati sono riportati come medie \pm errore standard. La significatività statistica è stata valutata tramite ANOVA seguita dal test di Dunnett. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ # $p < 0.05$ vs i valori basali*

4.8 L'ischemia/riperfusion riduce il rilascio di [³H]D-Aspartato mediato dal trasportatore in sinaptosomi retinici

Gli esperimenti di rilascio sono stati condotti misurando l'efflusso di aspartato radioattivo accumulato selettivamente nelle terminazioni nervose attraverso i trasportatori EAAT. Per indurre depolarizzazione della membrana sono state impiegate concentrazioni di KCl 15 o 35 mM (Bonanno et al., 2009; Raiteri et al., 2007). I sinaptosomi retinici, provenienti da ratti *naive* o ischemici, sono stati sottoposti, in superfusione, ai due stimoli depolarizzanti e sono stati esaminati i meccanismi di rilascio del neurotrasmettitore a 150 minuti di riperfusion. L'applicazione di un impulso della durata di 90 sec con KCl 35 mM (Fig. 11 , pannello a) o con KCl 15 mM (Fig. 11, pannello b) evoca, nelle nostre condizioni sperimentali, la liberazione di [³H]D-Aspartato dai sinaptosomi in modo concentrazione-dipendente. Il KCl 35 mM produce un *overflow* superiore di circa il 100% rispetto a quanto osservato con KCl 15 mM ($4.68 \pm 0.43\%$ vs $2.26 \pm 0.26\%$ rispettivamente in animali *naive*). Nessuna differenza però è stata evidenziata a livello quantitativo tra i diversi gruppi sperimentali ed anche le caratteristiche del rilascio di [³H]D-Aspartato indotto da KCl 35 mM non differiscono tra le diverse preparazioni. In particolare, circa il 70% del rilascio di [³H]-D-Aspartato è inibito dal bloccante non selettivo del trasportatore del glutammato, DL-TBOA (Fig. 11 a), mentre l'eliminazione del Ca^{2+} dal mezzo di superfusione induce un'inibizione del rilascio di [³H]-D-Aspartato pari al 30% (Fig. 11 a).

Nella retina di ratto anche l'*overflow* di [³H]D-Aspartato evocato da KCl 15mM non è totalmente dipendente dal Ca^{2+} esterno (Fig. 11, pannello b). Di fatto, in questo caso, l'omissione del Ca^{2+} induce una riduzione del rilascio pari al 40% mentre, la liberazione del

neurotrasmettitore, mediata dall'inversione del trasportatore, risulta essere circa del 60%. In queste condizioni, tuttavia, è stata osservata una differenza significativa tra i sinaptosomi provenienti dall'occhio sottoposto ad ischemia/riperfusione e quelli provenienti dall'occhio controlaterale (controllo). In particolare, la stimolazione con KCl 15 mM dei sinaptosomi purificati dall'occhio ischemico induce un rilascio di [³H]D-Aspartato dipendente solo per il 26% dall'inversione del carrier.

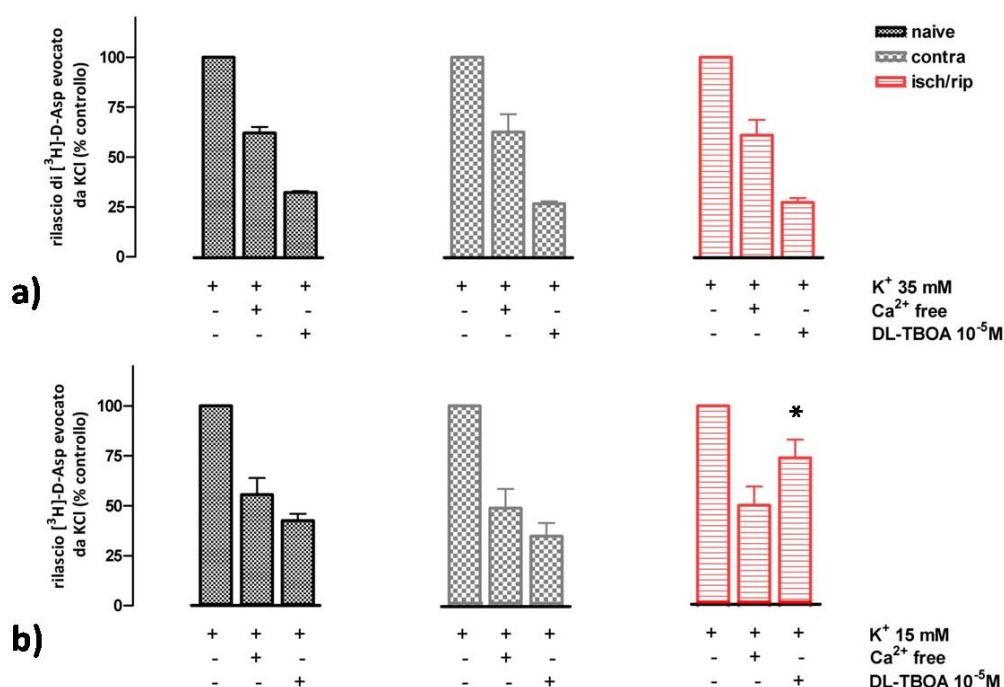


Figura 11. *Effetto dell'ischemia/riperfusione sul rilascio di [³H]D-Aspartato nei sinaptosomi retinici.* In animali sottoposti ad ischemia e riperfusi per 150 minuti (isch/rip) sono stati studiati i meccanismi di rilascio di [³H]D-Asp. Gli occhi controlaterali (contra) e quelli provenienti da animali naive sono stati usati come controllo. Per caratterizzare il rilascio, lo ione Ca²⁺ è stato eliminato dal mezzo di superfusione, o l'inibitore dei trasportatori, DL-TBOA, aggiunto. Il rilascio evocato da KCl (35mM) è mediato dal Ca²⁺ per il 30% e dal trasportatore per il 70% in tutti i gruppi considerati (a) Il rilascio evocato da KCl (15mM) è mediato dal Ca²⁺ per circa il 40% in tutti i gruppi considerati. La rimanente quota risulta essere dipendente dal trasportatore per circa il 60% nei naive e nei controlaterali e per il 26% in quelli sottoposti ad ischemia/riperfusione (b). I risultati (% del controllo) sono espressi come medie ± SEM di 3-5 esperimenti in triplicato. La significatività statistica è stata valutata tramite t test *p<0.05 vs sinaptosomi retine controlaterali.

4.9 L'uptake di [³H]D-Aspartato è ridotto in corso di riperfusione

I risultati ottenuti con KCl, sembrano suggerire un minore coinvolgimento dei trasportatori nel rilascio di [³H]D-Aspartato dopo 150 minuti di riperfusione. Per meglio comprendere il ruolo giocato dai trasportatori in tale fenomeno, sono state studiate le caratteristiche cinetiche dell'uptake di [³H]D-Aspartato allo stesso tempo di riperfusione. Sulla base dei risultati di rilascio solo i sinaptosomi prodotti dall'occhio controlaterale al danno sono stati usati come controllo.

L'accumulo di [³H]D-Aspartato da parte dei sinaptosomi è stato misurato a diverse concentrazioni (3-10-30 e 100 μ M, n=3-5 animali per gruppo). I risultati mostrati in Figura 12 evidenziano la presenza di un sistema di trasporto ad alta affinità ($K_m = 65 \mu$ M; V_{max} sinaptosomi retine riperfuse = 6.04 ± 0.32 nmol/min/ μ g proteine; V_{max} sinaptosomi retine controlaterali = 10.42 ± 0.40 nmol/min/ μ g proteine). L'uptake di [³H]D-Aspartato, nei sinaptosomi provenienti da retine ischemiche, è significativamente differente rispetto a quello osservato nei sinaptosomi provenienti da retine controlaterali. In particolare, la percentuale di riduzione tra i due gruppi sperimentali è del 34%.

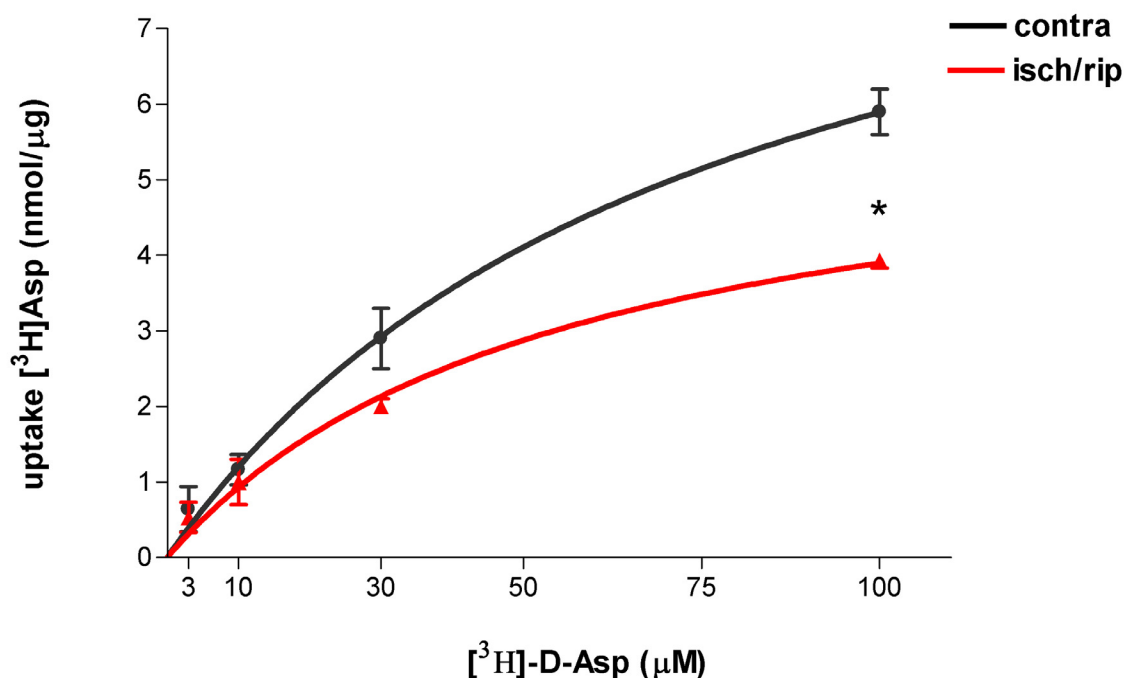


Figura 12. *L'uptake di [³H]D-Aspartato nei sinaptosomi purificati di retina è ridotto dall'ischemia/riperfusione. In sinaptosomi, provenienti da retine riperfuse per 150 min (isch/rip) e da retine controlaterali (contra) è stato studiato l'uptake di [³H]D-Asp. I sinaptosomi sono stati incubati per 2 minuti a 37°C in un medium standard contenente [³H]D-Asp in un range di concentrazione compreso tra 3 e 100μM (vedi Materiali e Metodi). La figura mostra la ridotta attività dei trasportatori in corso di riperfusione. I dati rappresentano la media ± SEM di 3-5 esperimenti in duplicato. La significatività statistica è stata valutata tramite t test. *p<0.05 vs sinaptosomi retine controlaterali.*

4.10 L'schemia/riperfusione modifica il contenuto proteico di GLT1 nei terminali nervosi retinici

La riduzione dei valori di Vmax osservata negli studi di uptake nei sinaptosomi di retine ischemiche e riperfuse suggerisce una potenziale alterazione funzionale dei trasportatori neuronali o una riduzione della loro espressione. Per tale motivo è stata valutata, mediante Western Blotting, l'espressione dei trasportatori GLT1, i principali trasportatori neuronali a livello retinico. I risultati ottenuti dimostrano che l'ischemia influenza il contenuto di GLT1 nella preparazione sinaptosomiale, riducendo quest'ultimo

ad ogni tempo considerato se confrontato con la preparazione della retina controlaterale (Fig. 13). In particolare, al termine dei 50 minuti di ischemia si osserva una riduzione del 16% dell'espressione dei trasportatori. Tale riduzione risulta essere più marcata e statisticamente significativa a 150 minuti (52%) e 24 ore di riperfusione (50%).

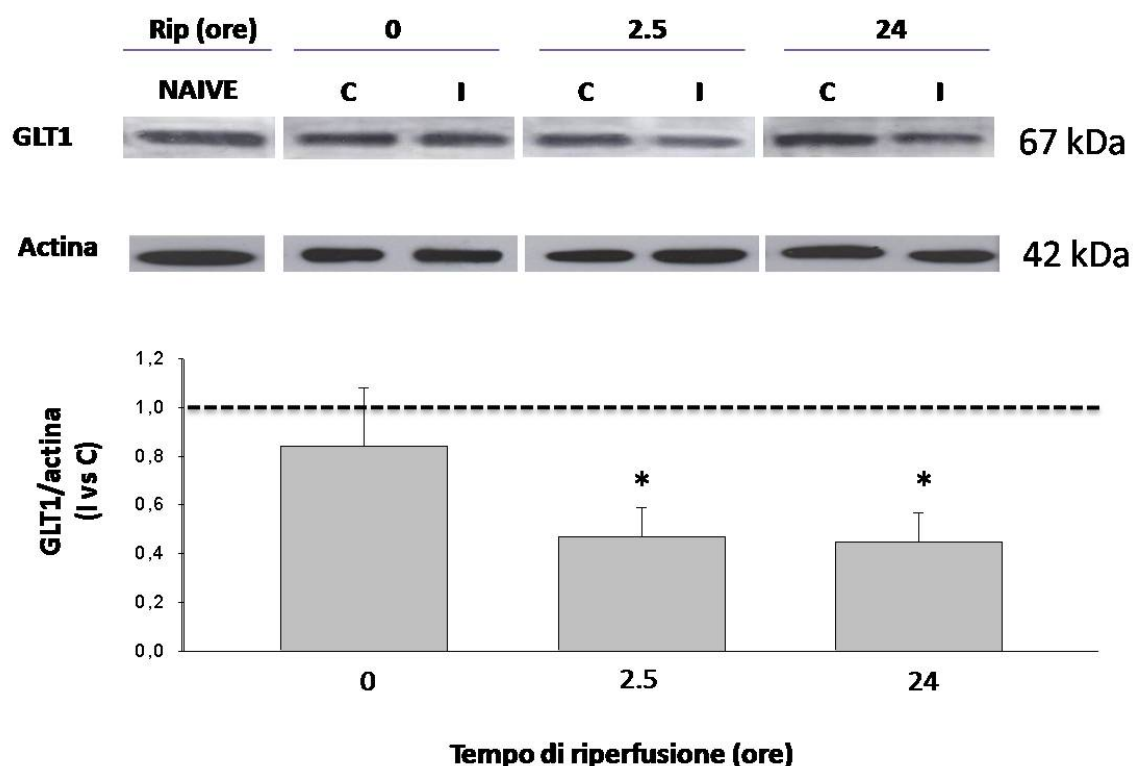


Figura 13. *L'espressione dei GLUT1 nei sinaptosomi di retina è ridotta durante la riperfusione. Gli animali sono stati sottoposti ad ischemia retinica nell'occhio destro (I) e la riperfusione condotta per 0, 2.5 (150 min) e 24 ore. L'occhio sinistro è stato usato come controllo (C). L'espressione di GLUT1 è valutata ex vivo mediante Western Blotting. Il blot è rappresentativo di 2-3 esperimenti indipendenti. Gli istogrammi rappresentano l'analisi densitometrica delle bande immunoreattive normalizzate sui valori dell'actina ed espressi come variazioni di GLUT1 verso l'occhio di sinistra. La significatività statistica è stata valutata tramite t test * $p < 0.05$ vs sinaptosomi retine controlaterali.*

5. Discussione

L'ischemia retinica indotta dall'aumento della pressione intraoculare riproduce le caratteristiche cliniche del glaucoma ad angolo chiuso, rappresentando pertanto un modello utile per lo studio dei meccanismi che stanno alla base della morte delle RGC (Osborne et al., 2004). È stato infatti ampiamente documentato come, in queste condizioni, si produca un danno a carico delle strutture interne della retina che porta alla perdita delle RGC con meccanismi che, tuttavia, non sono ancora completamente chiari (Donello et al., 2001; Neal et al., 1994; Nucci et al., 2005; Osborne et al., 2004).

Le patologie ischemiche del sistema nervoso centrale sono mediate da una complessa cascata di eventi biochimici nella quale, il neurotrasmettitore eccitatorio glutammato, rappresenta un elemento comune e gioca un ruolo centrale (Lipton, 1999). Anche nella retina i meccanismi che stanno alla base della perdita cellulare indotta dai fenomeni ischemici vedono il coinvolgimento dell'eccessiva attivazione dei recettori NMDA e non-NMDA oltre che del conseguente accumulo dell'ossido nitrico; infatti, tale perdita è prevenuta dal pretrattamento sistemico con antagonisti dei recettori NMDA e non-NMDA e dal pretrattamento sistemico con L-NAME, un inibitore della NOS (Adachi et al., 1998; Nucci et al., 2005).

La natura eccitotossica della morte delle RGC in seguito ad ischemia è stata confermata dai dati di neurochimica riportati in questo lavoro di ricerca. Gli esperimenti di microdialisi *in vivo* hanno infatti dimostrato, per la prima volta, che nel vitreo di ratto

l'ischemia induce un aumento dei livelli extracellulari di glutammato e tale incremento risulta ancora più marcato durante il periodo di riperfusione. Il profilo temporale osservato nel ratto conferma i dati precedentemente riportati in letteratura nel coniglio (Louzada-Junior et al., 1992) e nel gatto (Adachi et al., 1998). Tuttavia, in termini quantitativi, nell'occhio di ratto, i livelli di glutammato misurati risultano essere più bassi, sia in corso di ischemia che in fase di riperfusione, rispetto a quelli osservati nei modelli animali precedentemente descritti. Questa discrepanza potrebbe essere semplicemente dovuta ad una differenza interspecie.

L'eccessivo rilascio di glutammato osservato in queste condizioni sperimentali è accompagnato dall'attivazione delle calpaine, enzimi proteolitici la cui attività, Ca^{2+} -dipendente, è classicamente associata all'eccessiva stimolazione dei recettori di tipo NMDA (Branca et al., 2004; Faddis et al., 1997). I dati riportati dimostrano che l'attivazione delle calpaine è già sostenuta alla fine dell'ischemia, si mantiene elevata nelle 24 ore successive ed è prevenuta dal trattamento con l'antagonista del recettore NMDA, MK-801. L'attività proteolitica delle calpaine conferma quindi che l'aumento di glutammato osservato in corso di ischemia/riperfusione è responsabile dell'attivazione dei recettori NMDA e del conseguente aumento di Ca^{2+} a livello citosolico.

La diretta conseguenza dell'eccessiva stimolazione dei recettori del glutammato è, 7 giorni dopo l'insulto, la perdita delle RGC che risulta essere circa del 26%.

La regolazione dei livelli extracellulari di glutammato in condizioni fisiologiche e patologiche è dunque un prerequisito per la prevenzione della neurodegenerazione,

specialmente nella retina, dove aumentati livelli di tale neurotrasmettitore sono associati allo sviluppo del glaucoma (Dreyer et al., 1996; Osborne et al., 1999).

L'accumulo di glutammato che si verifica dopo l'insulto ischemico, può derivare da alterazioni a carico del sistema di *uptake* del glutammato nei neuroni retinici (White & Neal, 1976) o da un'inversione dei *carrier* (Massieu et al., 2000; Rossi et al., 2000). Il trasporto del glutammato è, infatti, guidato dai gradienti del sodio e del potassio, mantenuti, a loro volta, dall'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi. In condizioni ischemiche, l'alterazione degli equilibri ionici transmembrana, porta alla riduzione della concentrazione del Na^+ extracellulare e del K^+ intracellulare alterando così il normale funzionamento dei trasportatori del glutammato e determinando, in ultima analisi, l'aumento dello stesso nel compartimento extracellulare (vedi Camacho & Massieu, 2006).

Gli elevati livelli extracellulari di glutammato sono alla base della perdita delle RGC come dimostrato da numerosi studi *in vitro* (Hare & Wheeler; 2009; Luo et al., 2001) ed *in vivo* (Adachi et al., 1998; Nucci et al., 2005). Tuttavia, numerose evidenze sperimentali individuano nello stress ossidativo, di fatto correlato al processo eccitotossico, uno dei meccanismi principali coinvolti nel danno e nella successiva perdita delle RGC in seguito ad un insulto detrimentalmente (vedi Tezel, 2006).

Il coenzima Q10, un importante componente della catena di trasporto degli elettroni, dotato anche di un elevato potere antiossidante (McCarthy et al., 2004; Somayajulu et al., 2005), nelle nostre condizioni sperimentali previene l'aumento dei livelli di glutammato in corso di ischemia/riperfusion e reverte la perdita cellulare tipicamente

osservata 7 giorni dopo l'insulto ischemico. È noto, da dati di letteratura, che le specie radicali dell'O₂ possono causare la morte cellulare mediante: l'inibizione degli enzimi chiave del ciclo dell'acido citrico, l'inibizione della catena di trasporto degli elettroni o perturbazioni dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale, eventi che nel complesso portano ad un'alterazione del metabolismo energetico (Beal, 2005; Duchen, 2000; Patel et al., 1996). D'altra parte, i ROS possono ridurre l'attività dei sistemi di trasporto per il glutammato ad alta affinità come dimostrato in colture astrocitarie corticali. In particolare, l'esposizione di colture astrocitarie a sistemi in grado di generare radicali liberi o a H₂O₂ risulta in una marcata riduzione dell'attività di trasporto del glutammato, effetto prevenuto da enzimi *scavenger* dei radicali liberi o da agenti riducenti quali il glutatione (Volterra et al., 1994).

L'alterazione del sistema di trasporto del glutammato conduce ad un aumento della concentrazione del neurotrasmettitore a livello sinaptico ed è, a sua volta, responsabile dell'eccessiva stimolazione che sta alla base del processo eccitotossico (Sandhu et al., 2003; Trotti et al., 1996).

L'ipotesi che scaturisce dalle nostre osservazioni sperimentali sostiene che la neuroprotezione fornita dal coenzima Q10 sia soprattutto dovuta alla sua attività di *scavenger* di radicali liberi, dal momento che esso agisce, prevenendolo, sull'aumento di glutammato tipicamente osservato in corso di riperfusione. Un'ipotesi alternativa potrebbe essere che l'effetto neuroprotettivo del coenzima Q10, nelle nostre condizioni sperimentali, derivi dalla sua azione di supporto del metabolismo energetico mitocondriale (Sandhu et al., 2003). Quest'ultimo evento potrebbe, infatti, garantire la funzionalità dei trasportatori

per il glutammato limitando quindi l'accumulo extracellulare del neurotrasmettitore e prevenendo conseguentemente la morte delle cellule ganglionari.

Gli studi da noi condotti sostengono entrambe le ipotesi. Infatti, il trattamento sistemico con 17 β -estradiolo, così come riportato per il coenzima Q10, fallisce nel bloccare l'aumento di glutammato tipicamente osservato nei primi 10 minuti di ischemia, mentre inibisce in maniera significativa l'aumento di glutammato in corso di riperfusione.

Il meccanismo che sottende alla neuroprotezione mediata dall'estrogeno non è ancora completamente chiaro; tuttavia, potrebbe coinvolgere azioni antiossidanti (Behl et al., 1997), un miglioramento della perfusione (Pellegrino & Galea, 2001) ed effetti antiapoptotici (Sawada et al., 2000). Tali effetti possono essere mediati dall'attivazione del recettore estrogenico classico o esserne indipendenti (vedi Amantea et al., 2005; Simpkins et al., 2010).

Nel 1997 Weaver e collaboratori hanno dimostrato che l'effetto protettivo del 17 β -estradiolo, in colture neuronali ippocampali di ratto stimulate con NMDA, è una diretta conseguenza dell'inibizione del recettore NMDA da parte dello stesso estrogeno, dal momento che quest'ultimo inibisce le correnti mediate dal recettore NMDA (Weaver et al., 1997).

I nostri dati confermano una ridotta attivazione del recettore NMDA mediata, tuttavia, da un'azione dell'estrogeno a monte dell'attivazione recettoriale, ovvero come diretta conseguenza della riduzione delle concentrazioni extracellulari del neurotrasmettitore. Nelle nostre condizioni sperimentali, la modulazione esercitata dal

17 β -estradiolo sui livelli di glutammato sembra essere mediata, solo in parte, dall'attivazione del recettore per gli estrogeni. Infatti, il pretrattamento con un antagonista del recettore estrogenico, ICI 182-780, blocca parzialmente l'effetto dell'estradiolo sui livelli del glutammato. In particolare, a dosi elevate, l'ICI 182-780, previene l'effetto dell'estrogeno sui livelli di glutammato nella fase precoce della riperfusione, ma non nella fase tardiva. A dosi più basse, invece, l'antagonista fallisce nel bloccare l'effetto dell'estradiolo sui livelli extracellulari di glutammato sia nella fase precoce della riperfusione che nella fase tardiva. Questo suggerisce che l'accumulo di glutammato, durante la fase tardiva della riperfusione, non è modulato dal recettore estrogenico.

I nostri risultati dimostrano, inoltre, che il pretrattamento con il 17 α -estradiolo, inattivo sul recettore estrogenico (Lubahn et al., 1985; Yang et al., 2003), non influenza l'aumento di glutammato osservato nella fase precoce della riperfusione ma, analogamente al 17 β -estradiolo, ne riduce i livelli durante la fase tardiva. Quest'ultimo risultato suggerisce e sostiene ulteriormente l'ipotesi che l'effetto degli estrogeni sui livelli di glutammato, nella fase tardiva della riperfusione, non richiede il legame al recettore estrogenico classico. La riduzione dei livelli di glutammato potrebbe pertanto essere ascritta all'attività antiossidante dovuta alla presenza di una struttura fenolica nell'anello A del nucleo estrogenico (Behl et al., 1997; Green et al., 2001) o essere associata, ancora una volta, alla capacità degli estrogeni di stabilizzare il potenziale di membrana mitocondriale e garantire la produzione di ATP (Dykens et al., 2003).

Al fine di poter chiarire i meccanismi che stanno alla base dell'aumento del glutammato, abbiamo analizzato il sistema *ex-vivo*. La tecnica di eccellenza in questo caso risulta essere quella basata sull'utilizzo dei sinaptosomi, terminazioni nervose isolate che permettono, attraverso esperimenti di rilascio, lo studio dei recettori presenti sulle terminazioni ma anche dei sistemi di trasporto (Raiteri & Raiteri, 2000). I meccanismi di rilascio dei neurotrasmettitori endogeni o degli analoghi radioattivi, sono già stati studiati a partire dal 1985 nelle retine intere, nelle cellule retiniche isolate (Ayoub & Lam, 1985; Faillace et al., 1996; O'Malley & Masland, 1989) ed in sinaptosomi ottenuti da tessuto retinico (Gaspar et al., 2010; Kamisaki et al., 1991; Wang et al., 2002). Tali studi hanno posto le basi dell'analisi fisiologica del rilascio nella retina ed hanno permesso di distinguere una doppia componente nel rilascio evocato dal K^+ , ovvero, una componente Ca^{2+} -dipendente, che risulta essere saturabile, ed una componente Ca^{2+} -indipendente che è invece linearmente dipendente dal potenziale di membrana. Fino ad oggi però non erano mai stati condotti studi su sinaptosomi retinici in superfusione, purificati e/o provenienti da retine sottoposte ad un insulto ischemico. Nel presente lavoro, l'approccio sperimentale ha previsto l'utilizzo di due diverse concentrazioni di K^+ per studiare il rilascio di [3H]D-Aspartato evocato dalla depolarizzazione: una concentrazione 15 mM che può essere considerata uno stimolo depolarizzante fisiologico ed una concentrazione più alta, 35mM, che invece rappresenta uno stimolo patologico. Nella retina è stato riportato che lo ione potassio alla concentrazione 30 mM aumenta il potenziale di membrana da -70 a -40 mV (Kamisaki et al., 1991). I dati ottenuti nel presente lavoro dimostrano che in corso di

riperfusion, dopo 2.5 ore dall'insulto ischemico, ovvero quando, nell'analisi *in vivo*, i livelli di glutammato risultano essere significativamente aumentati rispetto ai livelli basali, il 70% del rilascio dell'aminoacido, stimolato dal KCl (35 mM), è Ca^{2+} indipendente. Questo dato ci permette di concludere che, quando la $[\text{K}^+]$ extracellulare è sufficientemente alta ed il gradiente del Na^+ ai lati della membrana è marcatamente alterato, gli EAAT sono capaci di operare in una direzione invertita e trasportare [^3H]D-Aspartato dal compartimento sinaptosolico all'ambiente extracellulare, come già riportato in preparazioni sinaptosomiali di ippocampo (Terrian et al., 1990), corteccia (Raiteri et al., 2007) e corpo striato (Maura et al., 1988).

Tuttavia, i dati da noi ottenuti per la caratterizzazione del rilascio, differiscono da quelli riportati da Kamisaki e collaboratori nel 1991 che, utilizzando come stimolo depolarizzante una concentrazione elevata di K^+ (30mM), hanno documentato un rilascio di aspartato e glutammato mediato per l'80% da meccanismi Ca^{2+} -dipendenti e, per la rimanente quota, dal trasportatore; la diversità nella percentuale di Ca^{2+} -dipendenza, può essere dovuta, *in primis* alla diversa preparazione utilizzata. Di fatto, nel nostro caso lo studio è stato condotto su preparazioni di sinaptosomi purificati, ovvero su terminazioni neuronali isolate e purificate dalla componente gliale, mentre lo studio citato utilizza sinaptosomi crudi, ovvero una preparazione in cui è presente anche la componente gliale. Un ulteriore motivo alla base dei differenti dati ottenuti potrebbe risiedere nel fatto che nel nostro sistema, abbiamo studiato il rilascio di un analogo radioattivo, mentre nello studio di Kamisaki e colleghi si è valutato il rilascio endogeno. È facile infatti immaginare che

l'incubazione dei sinaptosomi con il tracciante radioattivo, sebbene sia un metodo appropriato per studiare il rilascio endogeno di glutammato, porti all'ingresso ed alla concentrazione dello stesso nel citosol più che nelle vescicole sinaptiche dal quale poi verrà rilasciato attraverso un meccanismo fortemente dipendente dal trasportatore (Cavallero et al., 2009).

Nelle nostre condizioni sperimentali non è stata osservata nessuna differenza di rilascio, né quantitativa né qualitativa, tra i sinaptosomi provenienti da retine ischemiche e quelli provenienti dalle retine controlaterali, usate come controlli. Viceversa, una pronunciata differenza tra sinaptosomi provenienti da retine ischemizzate/riperfuse e quelli provenienti dalle retine controlaterali è stata osservata in presenza di uno stimolo depolarizzante fisiologico, KCl 15 mM. In queste condizioni è stato possibile osservare che nelle retine ischemiche e riperfuse per 2.5 ore, il rilascio del tracciante radioattivo è mediato dal trasportatore solo per il 26%, mentre nelle retine controlaterali la quota mediata dal trasportatore risulta essere circa il 60%: si osserva pertanto, nel rilascio, una riduzione pari al 34% della componente dipendente dal trasportatore.

Alla luce di questi risultati, abbiamo analizzato la capacità di *uptake* delle diverse preparazioni sinaptosomiali. I dati ottenuti dimostrano una riduzione del 34% nella capacità di *uptake* dei sinaptosomi provenienti da retine sottoposte a 2.5 ore di riperfusione rispetto a quelli provenienti da retine controlaterali. In tali condizioni sperimentali nessuna differenza significativa è stata rilevata per il valore della K_m . Questo dato suggerirebbe un'alterazione funzionale o una ridotta espressione del trasportatore sulla membrana

cellulare. D'altra parte questa ipotesi è ulteriormente sostenuta dal fatto che il veleno estratto dal ragno *Parawixia bistriata*, che risulta aumentare la capacità di *uptake* di glutammato in sinaptosomi corticali, è anche in grado di prevenire la morte cellulare nel modello da noi usato (Fontana et al., 2003). Questo lavoro sostiene ulteriormente l'ipotesi che in corso di ischemia e riperfusione si abbia un ridotto *turnover* del carrier per il glutammato o una ridotta espressione delle molecole di trasportatore. Quest'ultima ipotesi è stata avvalorata dall'analisi dell'espressione dei trasportatori che mostra una riduzione significativa dell'espressione del GLT1 in fase di riperfusione. Il risultato ottenuto è in accordo con precedenti lavori che documentano la riduzione dei trasportatori GLT1 sia in un modello di glaucoma ad angolo aperto nel ratto (Martin et al., 2002) che in un modello di glaucoma ad angolo chiuso in topi della linea DBA/2J che manifestano spontaneamente la forma di glaucoma indicata (Schuettauf et al., 2007). Tuttavia i nostri dati differiscono da altri lavori nei quali l'espressione del trasportatore risulta essere aumentata a tre giorni dalla cauterizzazione delle vene episclerali ed è ulteriormente aumentata a sei settimane dall'induzione dell'ipertono (Park et al., 2009). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta al differente modello di glaucoma usato. Nel nostro caso infatti è stato usato un modello di glaucoma ad angolo chiuso, mentre la cauterizzazione delle vene episclerali, usata da Park e colleghi, è considerata un modello di glaucoma ad angolo aperto.

Dal momento che studi recenti hanno dimostrato anche la ridotta espressione dei GLAST nella retina glaucomatosa (Martin et al., 2002; Naskar et al 2000; Schuettauf et al.,

2007), il risultato da noi riportato potrebbe suggerire che i GLT1 insieme ai GLAST giochino un ruolo importante nell'aumento dei livelli di glutammato in condizioni patologiche.

D'altra parte risulta che, in condizioni fisiologiche, il trasporto del glutammato è dominato nella retina, dai GLAST (Barnett & Pow, 2001) e che il loro funzionamento è ridotto quando la pressione intraoculare aumenta di al di sopra di 70 mmHg (Holcombe et al., 2008). Poichè nella fase di riperfusione la pressione intraoculare ritorna ai valori fisiologici, l'aumento dei livelli di glutammato potrebbe essere la conseguenza diretta della ridotta espressione dei GLT1 e non dipendere invece da alterazioni a carico dei GLAST.

L'*uptake* del glutammato mediato dai GLT1 e dai GLAST di origine astrocitaria rappresenta il principale meccanismo responsabile della *clearance* del glutammato cerebrale, nonchè uno dei principali meccanismi coinvolti nel processo eccitotossico (Rothstein et al., 1996). I GLAST ed i GLT1 sono infatti i tipi dominanti tra i trasportatori del glutammato presenti nel cervello e sono co-espressi negli astrociti (Levy et al., 1993; Lehre et al., 1995). Nella retina le cellule di Müller rappresentano l'equivalente degli astrociti presenti a livello cerebrale, ma contrariamente agli astrociti, le Müller esprimono solamente i GLAST (Izumi et al., 2002; Pow, 2001; Rauen, 2000), mentre il GLT1 è espresso nei neuroni retinici, coni e alcuni tipi di cellule bipolari (Pow, 2001; Rauen, 2000). L'ipotesi avanzata è che i GLT1, nella retina, rappresentino una componente importante responsabile dell'*uptake* del glutammato al pari dei GLAST. D'altra parte questa ipotesi è avvalorata da evidenze sperimentali che dimostrano come il trattamento con

oligonucleotidi antisenso per il GLT1 porti all' aumento del glutammato nel vitreo e quindi alla morte delle RGC nel ratto (Vorwerk et al., 2000).

Nel complesso quindi, i dati presentati in questo lavoro suggeriscono che l'aumento di glutammato è alla base della morte delle RGC. Tra i meccanismi responsabili dell'aumento del neurotrasmettitore un ruolo importante è svolto dallo stress ossidativo. In corso di riperfusione, infatti, i trasportatori del glutammato potrebbero subire processi di ossidazione che ne determinerebbero la rimozione dalla membrana plasmatica, come avviene in altre condizioni (González et al., 2007). Dopo l'internalizzazione, le proteine sono inviate agli endosomi e successivamente reinviata in membrana o ai lisosomi per la degradazione (Maxfield & McGraw, 2004; Wilcke et al. 2000). Quest'ultimo meccanismo, in particolare, spiegherebbe la ridotta espressione dei GLT1 riscontrata in corso di ri-perfusione. Il trattamento con farmaci antiossidanti potrebbe bloccare tali processi di ossidazione prevenendo la degradazione del trasportatore e impedendo conseguentemente l'aumento di glutammato.

Concludendo quindi i dati riportati contribuiscono a sottolineare l'importanza dell'eccitotossicità e dello stress ossidativo nello sviluppo del glaucoma. In particolare, l'aumento di glutammato, correlato alla riduzione dell'espressione del trasportatore GLT1, è prevenuto dal trattamento con agenti antiossidanti. Quest'ultimi potrebbero rappresentare quindi degli importanti *tools* farmacologici in grado di prevenire la morte delle RGC nella patologia glaucomatosa.

Bibliografia

- Aarts, M.M., Arundine, M., Tymianski, M. (2003). Novel concepts in excitotoxic neurodegeneration after stroke. *Expert Rev. Mol. Med.* **5**, 1–22.
- Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem.* **267**(19), 13361-8.
- Adachi, K., Kashii, S., Masai, H., Ueda, M., Morizane, C., Kaneda, K., Kume, T., Akaike, A., Honda, Y. (1998). Mechanism of the pathogenesis of glutamate neurotoxicity in retinal ischemia. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **236**, 766–774.
- Agostinho, P., Duarte, C.B., Oliveira, C.R. (1996). Activity of ionotropic glutamate receptors in retinal cells: effect of ascorbate/Fe(2+)-induced oxidative stress. *J Neurochem.* **67**(3), 1153-63.
- Alagarsamy, S., Sorensen, S.D., Conn, P.J. (2001). Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* **11**(3), 357-62.
- Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G., Corasaniti, MT. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res.* **52**, 119-32.
- Ames, A. 3rd. (1992). Energy requirements of CNS cells as related to their function and to their vulnerability to ischemia: a commentary based on studies on retina. *Can J Physiol Pharmacol.* **70** Suppl, S 158-64.
- Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* **10** Suppl, S 18-25.
- Arundine, M., Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* **34**(4-5), 325-37.
- Ayoub, G.S., Lam, D.M.K. (1985). The content and release of endogenous GABA in isolated horizontal cells of the goldfish retina. *Vision Res.* **25**, 1187-1193.
- Azcoitia, I., Sierra, A., Garcia-Segura, L.M. (1998). Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport.* **9**(13), 3075-9.

- Bagnoli, P., Dal Monte, M., Casini, G. (2003). Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol.* **18**, 1219-42.
- Baker, D.A., Shen, H., Kalivas, P.W. (2002). Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids.* **23**(1-3), 161-2.
- Banin, E., Berenshtein, E., Kitrossky, N., Pe'er, J, Chevion, M. (2000). Gallium-desferrioxamine protects the cat retina against injury after ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med.* **28**(3), 315-23.
- Barnett, N.L., Pow, D.V., Bull, N.D. (2001). Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem. Int.* **39**, 291–299.
- Beal, M.F. (1999). Mitochondria, NO and neurodegeneration. *Biochem. Soc. Symp.* 66, 43–54.
- Beal, M.F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* **58**(4), 495-505.
- Beal, M.F. and Matthews, R.T. (1997). Coenzyme Q10 in the central nervous system and its potential usefulness in the treatment of neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* **18** Suppl, S 169-79.
- Beal, M.F. (2004). Therapeutic effects of coenzyme Q10 in diseases. *Methods Enzymol.* **382**, 473-487.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(4), 1620-4.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newyon, C.J., Holsboer, F. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure–activity relationship. *Mol. Pharmacol.* **51**, 535–541.
- Bek, T. (2009). Inner retinal ischaemia: current understanding and needs for further investigations. *Acta Ophthalmologica.* **87**, 362–367.
- Bergink, V., Van Megen, H.J., Westenberg, H.G. (2004). Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol.* **14**(3), 175-83.
- Berlett, B. S. and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313–20316.

- Bill, A. (1968). Capillary permeability to and extravascular dynamics of myoglobin, albumin and gammaglobulin in the uvea. *Acta Physiol Scand.* **73**, 204–219.
- Bill, A. (1975). Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiol. Rev.* **55**, 383–417.
- Bloomfield, S.A. and Dacheux, R.F. (2001). Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 351- 384.
- Bonanno, G. and Raiteri, M. (1993). Multiple GABAB receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 259–261.
- Bonanno, G., Fumagalli, E., Milanese, M., Zappettini, S., Mennini, T. (2009). Release of [³H]D-aspartate induced by K⁺-stimulation is increased in the cervical spinal cord of the wobbler mouse: a model of motor neuron disease. *Neurochem Int.* **55**(5), 302-6.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., Lipton S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(16), 7162-6.
- Bonovas, S., Peponis, V., Filioussi, K. (2004). Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis. *Diabet Med.* **21**(6), 609-14.
- Bonvento, G., Sibson, N., Pellerin L. (2002). Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci.* **25**, 359-364.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* **134**(3), 707-16.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-54.
- Branca, D. (2004). Calpain-related diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1098–1104.
- Brandstätter, J.H., Hartveit, E., Sassoè-Pognetto, M., Wässle, H. (1994). Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci.* **6**(7), 1100-12.
- Brandstätter, J.H., Koulen, P., Wässle, H. (1997). Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci.* **17**, 9298–9307.

- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke M, landiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., Reichenbach, A. (2009). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* **54**(3-4), 143-60.
- Brown, G.C., Magargal, L.E. (1988). The ocular ischemic syndrome. Clinical, fluorescein angiographic and carotid angiographic features. *Int Ophthalmol.* **11**, 239–51.
- Brubaker, R.F. (1991). Flow of aqueous humor in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **32**, 3145.
- Buchi, E.R. (1992). Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischemia-reperfusion insult: an electron microscopic study, I: Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res.* **55**, 605–13.
- Buchi, E.R., Suivaizdis, I., Fu, J. (1991). Pressure-induced retinal ischemia in rats: An experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica.* **203**, 138–147.
- Camacho, A. and Massieu, L. (2006). Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch. Med. Res.* **37**, 11–18.
- Cao, W., Rajala, R.V., Li, F., Aanderson, R.E., Wei, N., Soliman, C.E., Mcginnis, J.F. (2003). Neuroprotective effect of estrogen upon retinal neurons in vitro. *Adv Exp Med Biol.* **533**, 395–402.
- Carter-Dawson, L., Crawford, M.L., Harwerth, R.S., Smith3rd, E.L., Feldman, R., Shen, F.F., Mitchell, C.K., Whitetree, A. (2002). Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2633-2637.
- Casson, R.J. (2006). Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clinical and Experimental Ophthalmology.* **34**, 54–63
- Cavallero, A., Marte, A., Fedele, E. (2009). L-aspartate as an amino acid neurotransmitter: mechanisms of the depolarization-induced release from cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem.* **110**(3), 924-34.
- Cazevielle, C., Muller, A., Meynier, F., Dutrait, N., Bonne, C. (1994). Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons. *Neurochem Int.* **24**(4), 395-8.
- Celebi, S., Dilsiz, N., Yilmaz, T., Kükner, A.S. (2002). Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J Ophthalmol.* **12**(2), 77-83.

- Chance, B., Sies, A., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **237**, 408–414.
- Chemtob, S., Roy, M.S., Abran, D., Fernandez, H., Varma, D.R. (1993). Prevention of postasphyxial increase in lipid peroxides and retinal function deterioration in the newborn pig by inhibition of cyclooxygenase activity and free radical generation. *Pediatr Res.* **33**(4), 336-40.
- Chidlow, G. and Osborne, N.N. (2003). Rat retinal ganglion cell loss caused by kainate, NMDA and ischemia correlates with a reduction in mRNA and protein of Thy-1 and neurofilament light. *Brain Res.* **963**, 298–306.
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**, 623–634.
- Choi, D.W. (1990). Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **2**, 105–147.
- Choi, Y.B. and Lipton, S.A. (2000). Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci.* **57**(11), 1535-41.
- Chung, H.S., Harris, A., Evans, D.W., et al. (1999). Vascular aspects in the pathophysiology of glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol.* **43**(Suppl 1), S 43–50.
- Cohen, L.H. and Noell, W.K. (1965). Relationships between visual function and metabolism. In: Graymore CN, (ed). *Biochemistry of the Retina*. Orlando, Fla: Academic Press Inc, pp. 36–50.
- Conn, P.J. and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**, 205-37.
- Cordeiro, M.F., Guo, L., Cheung, W., Wood, N., Salt, T.E. (2007). Topical CoQ10 is neuroprotective in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **48** 4369.
- Costa, V.P., Harris, A., Stefánsson, E., et al. (2003). The effects of antiglaucoma and systemic medications on ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res.* **22**, 769–805.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **65**, 1–105.
- David, P., Lusky, M., Teichberg, V.I. (1988). Involvement of excitatory neurotransmitters in the damage produced in chick embryo retinas by anoxia and extracellular high potassium. *Exp. Eye Res.* **46**, 657–662.

- De Flora, A., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E. (1998). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca(2+)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem Biophys.* **28**(1), 45-62.
- Delbarre, B., Delbarre, G., Pillion, G., Calinon, F. (1995). Effects of Daflon 500 mg on haemoconcentration and alterations of white blood cell count elicited by the upright position in anaesthetized dogs. *Int Angiol.* **14** (3 Suppl 1), 23-5.
- DeVries, S.H. (2000). Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron.* **28**, 847–856.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397.
- Dluzen, D.E. (2000). Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol.* **29**(5-6), 387-99.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* **81**, 163–221.
- Donello, J.E., Padillo, E.U., Webster, M.L., Wheeler, L.A., Gil, D.W. (2001). alpha(2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* **296**(1), 216-23
- Dowling, J.E. (1987). *The Retina, an Approachable Part of the Brain.* The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Dreyer, E.B., Zurakowski, D., Schumer, R.A., Podos, S.M., Lipton, S.A. (1996). Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **114**, 299–305.
- Duchen, M.R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death. *J Physiol* **529** (1),57– 68.
- Dugan, L.L., Lin, T.S., He, Y.Y., Hsu, C.Y., Choi, D.W. (1995). Detection of free radicals by microdialysis/spin trapping EPR following focal cerebral ischemia-reperfusion and a cautionary note on the stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). *Free Radic Res.* **23**(1), 27-32.
- Dunkley, P.R., Heath, J.W., Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Glenfield, P.J., Rostas, J.A. (1998). A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* **441**, 59-71.

- Dutrait, N., Culcasi, M., Cazevieille, C., Pietri, S., Tordo, P., Bonne, C., Muller, A. (1995). Calcium-dependent free radical generation in cultured retinal neurons injured by kainate. *Neurosci Lett.* **198**(1), 13-6.
- Dykens, J.A., Simpkins, J.W., Wang, J. Gordon K. (2003). Polycyclic phenols, estrogens and neuroprotection: a proposed mitochondrial mechanism. *Experimental Gerontology.* **38**, 101–107.
- Faddis, B.T., Hasbani, M.J. Goldberg, M.P. (1997). Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro. *J. Neurosci.* **17**, 951–959.
- Faillace, M.P., Sarmiento, M.I., Rosenstein, R.E. (1996). Melatonin effect on [3H] glutamate uptake and release in the golden hamster retina. *J Neurochem.* **67**(2), 623-8.
- Faivre-Bauman, A., Rosenbaum, E., Puymirat, J., Grouselle, D., Tixier-Vidal, A. (1981). Differentiation of fetal mouse hypothalamic cells in serum-free medium. *Dev Neurosci.* **4**(2), 118-29.
- Ferrante, R.J., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, K.L., Jenkins, B.G., Hersch, S.M., Beal, M.F. (2002). Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci.* **22**(5), 1592-9.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* **408** (6809), 239-47.
- Flammer, J. (1994). The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol.* **38**(Suppl), S 3–6.
- Fletcher, E.L. and Kalloniatis, M. (1997). Neurochemical development of the degenerating rat retina. *J Comp Neurol.* **388**(1), 1-22.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssiere, J.L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* **84**, 131– 141.
- Fontana, A.C.K., Guizzo, R., Beleboni, R., Meirelles, A.R., Coimbra, N., Amara, G., Ferreira dos Santos, W., Coutinho-Netto, J. (2003). Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *British Journal of Pharmacology.* **139**, 1297–1309.
- Frodovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* **201**, 875– 880.
- Fuse, N. (2010). Genetic bases for glaucoma. *J. Exp. Mol.* **221**, 1-10.

- Garcia-Valenzuela, E., Shareef, S., Walsh, J., et al. (1995). Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* **61**, 33–44.
- Gaspar, J.M., Baptista, F.I., Galvão, J., Castilho, A.F., Cunha, R.A., Ambrósio, A.F. (2010). Diabetes differentially affects the content of exocytotic proteins in hippocampal and retinal nerve terminals. *Neuroscience.* **169**(4), 1589-600.
- Gehlbach, P. and Purple, R.L. (1994). Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**(2), 669-76.
- González, M.I., Susarla, B.T.S., Fournier, K.M., Amanda, L., Sheldon, A.L., Robinson, M.B. (2007). Constitutive endocytosis and recycling of the neuronal glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1. *Journal of Neurochemistry.* **103**, 1917–1931.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., Mattson, M.P. (1996). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem.* **66**, 1836–44.
- Goto, W., Ota, T., Morikawa, N., et al. (2002). Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. *Brain Res.* **958**, 10–9.
- Green, P.S., Gridley, K.E., Simpkins, J.W. (1996). Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)- induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* **218**(3), 165-8.
- Green, P.S., Yang, S.H., Nilsson, K.R., Kumar, A.S., Covey, D.F., Simpkins, J.W. (2001). The nonfeminizing enantiomer of 17beta estradiol exerts protective effects in neuronal cultures and a rat model of cerebral ischemia. *Endocrinology.* **142**, 400–406.
- Grünert, U., Haverkamp, S., Fletcher, E.L., Wässle, H. (2002). Synaptic distribution of ionotropic glutamate receptors in the inner plexiform layer of the primate retina. *J Comp Neurol.* **447**(2), 138-51.
- Hack, I., Frech, M., Dick, O., Peichl, L., Brandstätter, J.H. (2001). Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *Eur J Neurosci.* **13**, 15–24.
- Hack, I., Peichl, L., Brandstätter, J.H. (1999). An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 14130–14135.

- Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., Tanaka, K. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 4663–4666.
- Hare, W.A. and Wheeler, L. (2009). Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: block by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **50**(6), 2940-48.
- Hasegawa, J., Obara, T., Tanaka, K., Tachibana, M. (2006). High-density presynaptic transporters are required for glutamate removal from the first visual synapse. *Neuron*. **50**(1), 63-74.
- Haverkamp, S., Grünert, U., Wässle, H. (2001). Localization of kainate receptors at the cone pedicles of the primate retina. *J Comp Neurol*. **436**, 471–486.
- Holcombe, D.J., Lengefeld, N., Gole, G.A., Barnett, N.L. (2008) The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport. *Acta Ophthalmol*. **86**(4), 408-14.
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. **17**, 31-108.
- Honkanen, R.A., Baruah, S., Zimmerman, M.B., Khanna, C.L., Weaver, Y.K., Narkiewicz, J., Waziri, R., Gehrs, K.M., Weingeist, T.A., Boldt, H.C., Folk, J.C., Russell, S.R., et al. (2003). Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch. Ophthalmol*. **121**, 183–188.
- Hurn, P.D. and Macrae, I.M. (2000). Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. **20**, 631–52.
- Ishii, Y., Kwong, J.M., Caprioli, J. (2003). Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **44**(5), 1982-92.
- Izumi, Y., Hammerman, S.B., Kirby, C.O., Benz, A.M., Olney, J.W., Zorumski, C.F. (2003). Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. *Vis Neurosci*. **20**, 97-107.
- Izumi, Y., Shimamoto, K., Benz, A.M., Hammerman, S.B., Olney, J.W., Zorumski, C.F. (2002). Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia*. **39**, 58–68.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gahwilwer, B.H., Gerber, U. (2000). Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 5610–5615.

- Janáky, M., Grósz, A., Tóth, E., et al. (2007). Hypobaric hypoxia reduces the amplitude of oscillatory potentials in the human ERG. *Doc Ophthalmol.* **114**, 45–51.
- Joo, C.K., Choi, J.S., Ko, H.W., et al. (1999). Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **40**, 713–20.
- Joo, C.K., Park, K.Y., Park, M.S., et al. (1996). Occurrence of neuronal necrosis and apoptosis following the retinal ischemia: induction of p53 and bcl-2 mRNA. *Soc Neurosci Abstr.* **26**, 464–15.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2007). *Principi di neuroscienze*, Milano, Casa Editrice Ambrosiana.
- Kamisaki, Y., Hamahashi, T., Mita, C., Itoh, T. (1991). D-2 Dopamine Receptors Inhibit Release of Aspartate and Glutamate in Rat Retina. *J. Pharmacol Exp.* **256**, 634-638.
- Kergoat, H., Hérard, M.E., Lemay, M. (2006). RGC sensitivity to mild systemic hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **47**, 5423–7.
- Kerrigan, L.A., Zack, D.J., Quigley, H.A., et al. (1997). TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* **115**, 1031–5.
- Kinukawa, J., Shimura, M., Harata, N., Tamai, M. (2005). Gliclazide attenuates the intracellular Ca²⁺ changes induced in vitro by ischemia in the retinal slices of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Curr Eye Res.* **30**, 789-98.
- Klein, B.E., Klein, R., Sponsel, W.E., Franke, T., Cantor, L.B., Martone, J., Menage, M.J. (1992). Prevalence of glaucoma. *The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology.* **99**, 1499-1504.
- Kleinschmidt, A., Bear, M.F., Singer, W. (1987). Blockade of "NMDA" receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science.* **238**(4825), 355-8.
- Kolb, H., Nelson, R., Mariani A. (1981). Amacrine cells, bipolar cells, and ganglion cells of the cat retina: A Golgi study. *Vision Res.* **21**, 1081-1114.
- Kolb, H., Nelson, R., Ahnelt, P., Cuenca, N. (2001). Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog. Brain Res.* **131**, 3-26.
- Komuro, H. and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* **260**(5104), 95-7.

- Krupin, T. and Civan, M.M. (1996). Physiologic basis of aqueous humor formation. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, eds. *The Glaucomas*. St. Louis, Mosby. 252–253.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(12), 5925-30.
- Kumar, D.M., Perez, E., Cai, Z.Y., Aoun, P., Brun-Zinkernagel, A.M., Covey, D.F., Simpkins, J.W., Agarwal, N. (2005). Role of nonfeminizing estrogen analogues in neuroprotection of rat retinal ganglion cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*. **38**, 1152-63.
- Lafuente, M.P., Villegas-Perez, M.P., Sells-Navarro, I., et al. (2002). Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience*. **109**, 157–68.
- Lam, T.T. and Tso, M.O. (1996). Nitric oxide synthase (NOS) inhibitors ameliorate retinal damage induced by ischemia in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. **92**(3), 329-40.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*. **15**, 1835–1853.
- Linsenmeier, R.A., Braun, R.D., McRipley, M.A., Padnick, L.B., Ahmed, J., Hatchell, D.L., McLeod, D.S., Luty, G.A. (1998). Retinal hypoxia in long-term diabetic cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **39**(9), 1647-57.
- Levkovitch-Verbin, H., Martin, K.R., Quigley, H.A., Baumrind, L.A., Pease, M.E., Valenta, D. (2002). Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. *Glaucoma*. **11**, 396–405.
- Levy, D.I., Sucher, N.J., Lipton, S.A. (1991). Glutathione prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *NeuroReport*. **2**, 345-347.
- Levy, D.I., Sucher, N.J., Lipton, S.A. (1990). Redox modulation of NMDA receptor-mediated toxicity in mammalian central neurons. *Neuroscience Letters*. **110**, 291-296.
- Levy, L.M., Lehre, K.P., Rolstad, B., Danbolt, N.C. (1993). A monoclonal antibody raised against an [Na⁺ K⁺] coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett*. **317**, 79–84.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. **79**(4), 1431-568.

- Lipton, S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 160–170.
- Lipton, S.A. and Nicotera, P. (1998). Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium.* **23**, 165–171.
- Lipton, S.A. and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* **330**, 613–622.
- Louzada-Junior, P., Dias, J. J., Santos, W. F., Lachat, J. J., Bradford, H. F. Coutinho-Netto, J. (1992). Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: An approach using microdialysis. *J. Neurochem.* **59**, 358–363.
- Lubahn, D.B., McCarty, K.S. Jr, McCarty, K.S. Sr. (1985). Electrophoretic characterization of purified bovine, porcine, murine, rat, and human uterine estrogen receptors. *J Biol Chem.* **260**(4), 2515-26.
- Lucas, D.R. and Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium 1-glutamate on the inner layers of the retina. *Am Arch Ophthalmol.* **58**, 193–201.
- Luo, X., Heidinger, V., Picaud, S., Lambrou, G., Dreyfus, H., Sahel, J., Hicks, D. (2001). Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42**(5), 1096-106.
- Lynch, D.R. and Guttman, R.P. (2002). Excitotoxicity: Perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 717–723.
- Macaya, A. 1996. [Apoptosis in the nervous system]. *Rev Neurol.* **24**, 1356–60.
- MacManus, J.P. and Linnik, M.D. (1997). Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab.* **17**, 815–32.
- Marcoli, M., Maura, G., Munari, C., Ruelle, A., Raiteri, M. (1999). Pharmacological diversity between native human 5-HT1B and 5-HT1D receptors sited on different neurons and involved in different functions. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 607–612.
- Martin, K.R., Levkovitch-Verbin, H., Valenta, D., Baumrind, L., Pease, M.E., Quigley, H.A. (2002). Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**, 2236–2243.
- Martini, F.H., Timmons, M.S., Tallitsch, R.B. (2008). Anatomia Umana. Seconda edizione EdiSES.

- Masland, R.H. (2001b). The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* **4**, 877-886.
- Masland, R.H. (2001a). Neuronal diversity in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 431-436.
- Massieu, L., Gomez-Roman, N., Montiel, T. (2000). In vivo potentiation of glutamate mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* **165**, 257-267.
- Mastrodimou, N., Lambrou, G.N., Thermos, K. (2005). Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **371**, 44-53.
- Masu, M., Iwakabe, H., Tagawa, Y., Miyoshi, T., Yamashita, M., Fukuda, Y., Sasaki, H., Hiroi, K., Nakamura, Y., Shigemoto, R., Takada, M., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Nakanishi, S. (1995). Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell.* **80**, 757-765.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature.* **349**(6312), 760-5.
- Maura, G., Giardil, A. Raiteril, M. (1988). Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **247**, 680-684.
- Maxfield, F.R. and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**(2), 121-32.
- McCarthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S. (2004). Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1**(1), 21-31.
- Mehmet H., Yue, X., Squier, M.V., et al. 1994. Increased apoptosis in the cingulate sulcus of newborn piglets following transient hypoxia-ischaemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult. *Neurosci Lett.* **181**, 121-5.
- Michaelis, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* **54**, 369-415.
- Moosmann, B. and Behl, C. (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(16), 8867-72.

- Morrison, J. C. and Pollack, I.P. (2003). *Glaucoma : Science and practice*. Edited by Thieme.
- Morrison, J.C. and Van Buskirk, E.M. (1984). Ciliary process microvasculature of the primate eye.. *Am J Ophthalmol.* **97**(3), 372-83.
- Muller, A., Maurin, L., Bonne, C. (1998). Free radicals and glutamate uptake in the retina. *Gen. Pharmacol.* **30**, 315–318.
- Muller, A., Pietri, S, Villain, M., Frejaville, C., Bonne, C., Culcas, M. (1997). Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res.* **64**(4), 637-43.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., Coyle, J.T. (1989). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron.* **2**, 1547–1558.
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M.S., et al. (2000). Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.* **20**, 7994–8004.
- Nakamura, Y., Iga, K., Shibata, T., Shudo, M., Kataoka, K. (1993). Glial plasmalemmal vesicles: a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. *Glia.* **9**(1), 48-56.
- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* **258**(5082), 597-603.
- Nakazawa, T., Takahashi, H., Shimura, M. (2006). Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. *Brain Res* **1093**, 141–149.
- Narahashi T. (1974). Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol Rev.* **54**(4), 813-89
- Naskar, R., Vorwerk, C.K., Dreyer, E.B. (2000). Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**, 1940–1944.
- Nath, R., Raser, K.J., McGinnis, K., Nadinmpalli, R., Stafford, D., Wang, K.K. (1996). Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport.* **8**, 249-255.
- Neal, M.J., Cunningham, J.R., Hutson, P.H., Hogg, J. (1994) Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem.* **62** (3), 1025-33.

- Neal, M.J., Cunningham, J.R., Hutson, P.H., Hogg, J., (1994). Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J. Neurochem.* **62**, 1025–1033.
- Nickells, R.W. (2007). From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can. J. Ophthalmol.* **42**, 278-87.
- Nicotera, P., Bonfoco, E., Brüne, B. (1995). Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol.* **5**(4), 411-20.
- Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell.* **77**, 361–369.
- Nonaka, A., Kiryu, J., Tsujikawa, A., Yamashiro, K., Miyamoto, K., Nishiwaki, H., Mandai, M., et al. (2000). Administration of 17 β -estradiol attenuates retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**, 2689–2696.
- Nucci, C., Tartaglione, R., Cerulli, A., Mancino, R., Spanò, A., Cavaliere, F., Rombolà, L., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. (2007). Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat. *Int Rev Neurobiol.* **82**, 397-406.
- Nucci, C., Tartaglione, R., Rombolà, L., Morrone, L.A., Fazzi, E., Bagetta, G. (2005). Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat. *NeuroToxicology.* **26**, 935-941.
- O'Malley, D.M. and Masland, R.H. (1989). Co-release of acetylcholine and gammaaminobutyric acid by a retinal neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3414-3418.
- Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M., Floyd, R.A. (1990). Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87** (13), 5144-7.
- Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* **164**, 719–21
- Ophir, A., Berenshtein, E., Kitrossky, N., Berman, E.R., Photiou, S., Rothman, Z., Chevion, M. (1993). Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res.* **57**(3), 351-7.

- Orrenius, S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab. Rev.* **39**, 443–455.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**(7), 552-65.
- Osborne, N.N., Chidlow, G., Nash, M.S., Childlow, G., Bae, J.H., Wood, J.P., Nash, M.S. (1999). The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol.* **10**, 82–92.
- Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P., et al. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* **23**, 91–147.
- Osborne, N.N., Cazevielle, C., Carvalho, A.L., Larsen, A.K., DeSantis, L. (1997). In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res.* **751**, 113-23.
- Park, C.K., Cha, J., Park, S.C., Lee Y.P., Kim, J.H., Kim, H.S., Kim, S.A., Kim, I.B., Chun, M.H. (2009) Differential expression of two glutamate transporters, GLAST and GLT-1, in an experimental rat model of glaucoma. *Exp Brain Res.* **197**, 101–109.
- Park, K.H., Cozier, F., Ong, O.C., Caprioli, J. (2001). Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42**(7), 1522-30.
- Patel, M., Day, B.J., Crapo, J.D., Fridovich, I., McNamara, J.O. (1996). Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron.* **16**, 345–355.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2001). The Rat Brain in stereotaxic coordinates: compact. ACADEMIC PRESS.
- Payet, O., Maurin, L., Bonne, C., Muller, A. (2004). Hypoxia stimulates glutamate uptake in whole rat retinal cells in vitro. *Neurosci Lett.* **356**, 148-50.
- Pellegrino, D.A., Galea, E. (2001). Estrogen and cerebrovascular physiology and pathophysiology. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**, 137– 158.
- Pignataro, G., Scorziello, A., Di Renzo, G., Annunziato, L. (2009). Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *FEBS J.* **276**(1), 46-57.

- Pittaluga, A., Bonfanti, A., and Raiteri, M. (1997) Differential desensitization of ionotropic non-NMDA receptors having distinct neuronal location and function. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **356**, 29–38.
- Poitry, S., C. Poitry-Yamate, J. Ueberfeld, PR. MacLeish, and M. Tsacopoulos (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signalling in retinal glial (Muller) cells. *J. Neurosci.* **20**, 1809-1821.
- Potashkin, J.A., and Meredith, G.E. (2006). The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 144–151.
- Pow, D.V. and Barnett, N.L. (1999). Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Müller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res.* **297**, 57–66.
- Pow, D.V. and Barnett, N.L. (2000). Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci. Lett.* **280**, 21–24.
- Pow, D.V. (2001). Amino acids and their transporters in the retina. *Neurochem Int.* **38**, 463–484.
- Quaranta, L., Manni, G., Donato, F., Bucci, M.G. (1994). The effect of increased intraocular pressure on pulsatile ocular blood flow in low tension glaucoma. *Surv Ophthalmol.* **38**, Suppl:S177-81.
- Quigley, H.A. (1996). The number of person with glaucoma worldwide. *Br. J. Ophthalmol.* **80**, 389-393.
- Quigley, H.A., Addicks, E.M., Green, W.R., Maumene, A.E. (1981). Optic nerve damage in human glaucoma: II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* **99**, 635-649.
- Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., et al. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **36**, 774–86.
- Quiñones-Hinojosa, A., Ames, A 3rd, Malek, J.Y., Maynard, K.I. (1999) An in vitro rabbit retina model to study electrophysiologic and metabolic function during and following ischemia. *J Neurosci Methods.* **90**(2), 107-15.

- Raiteri, L. and Raiteri, M. (2000). Synaptosomes Still Viable after 25 Years of Superfusion. *Neurochemical Research*. **25**, 1265–1274.
- Raiteri, L., Zappettini, S., Milanese, M., Fedele, E., Raiteri, M., Bonanno, G. (2007). Mechanisms of glutamate release elicited in rat cerebrocortical nerve endings by 'pathologically' elevated extraterminal K⁺ concentrations. *J Neurochem*. **103**(3), 952-61.
- Raiteri, M. (2008). Presynaptic metabotropic glutamate and GABAB receptors. *Handb Exp Pharmacol*. **184**, 373-407.
- Raiteri, M., Angelini, F. Levi, G. (1974). A simple apparatus for studying the release of neurotransmitter from synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol*. **25**, 411– 414..
- Raiteri, M., Marchi, M. Maura, G. (1984). Release of catecholamines, serotonin and acetylcholine from isolated brain tissue. Pages 431– 462, in Lajtha, A. (ed.) Handbook of Neurochemistry, vol. 6, Plenum Publishing Co., New York.
- Raiteri, M., Sala, R., Fassio, A., Rossetto, O., Bonanno, G. (2000). Entrapping of impermeant probes of different size into nonpermeabilized synaptosomes as a method to study presynaptic mechanisms. *J. Neurochem*. **74**, 423–431.
- Rauen, T. (2000). Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids*. **19**, 53–62.
- Rauen, T. and Kanner, B.I. (1994). Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinæ. *Neurosci. Lett*. **169**, 137–140.
- Rauen, T., Taylor, W.R., Kuhlbrodt, K., Wiessner, M. (1998). High-affinity glutamate transporters in the rat retina: A major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res*. **291**, 19–31.
- Richards, D.A., Morrone, L.A., Bagetta, G., Bowery, N.G. (2000). Effects of α -dendrotoxin and dendrotoxin k on extracellular excitatory amino acids and on electroencephalograph spectral power in the hippocampus of anaesthetized rats. *Neurosci Lett*. **293**, 183-6.
- Rossi, D.J., Oshima, T., Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. **403**, 316–321.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. **16**, 675–686.

- Russo, C., Marchi, M., Andrioli, G. C., Cavazzani, P., Raiteri, M. (1993). Enhancement of glycine release from human brain cortex by acetylcholine acting at M4 muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**, 142–146.
- Russo, R., Cavaliere, F., Watanabe, C., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Sakurada, S., Morrone, L.A. (2008). 17Beta-estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat. *Prog Brain Res.* **173**, 583-90.
- Rylander, N.R and Vold, S.D. (2008). Cost Analysis of Glaucoma Medications. *Am J Ophthalmol.* **145**, 106–113.
- Saccà, S.C., Pascotto, A., Camicione, P., Capris, P. Izzotti, A. (2005). Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary openangle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **123**, 458–463.
- Sagara, T., Gason, D.D., Lindsey, J.D., et al. (1999). Reduction of collagen type I in the ciliary muscle of inflamed monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **40**, 2568.
- Sanders, S.P., Zweier, J.L., Kuppuswamy, P., Harrison, S.J., Bassett, D.J., Gabrielson, E.W., Sylvester, J.T. (1993). Hypoxic sheep pulmonary microvascular endothelial cells generate free radicals via mitochondrial electron transport. *J. Clin. Invest.* **91**, 46–52.
- Sandhu, J. K., Pandey, S., Ribocco-Lutkiewicz, M., Monette, R., Borowy-Borowski, H., Walzer, P. R., and Sikorska, M. (2003). Molecular mechanisms of glutamate neurotoxicity in mixed cultures of NT2-derived neurons and astrocytes: Protective effects of coenzyme Q10. *J. Neurosci. Res.* **72**, 691–703.
- Sawada, A. and Neufeld A.H. (1999). Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res.* **69**(5), 525-531.
- Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Honda, K., Nakanishi, M., Akaike, A., Shimohama, S. (2000.). Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J.* **14**, 1202–1214.
- Schmid, G., Bonanno, G., Raiteri, M. (1996). Functional evidence for two native GABA A receptor subtypes in adult rat hippocampus and cerebellum. *Neuroscience* **73**, 697–704.
- Schubert, D. and Piasecki, D. (2001). Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci.*; **21**(19), 7455-62.
- Schuettauf, F., Thaler, S., Bolz, S., Fries, J., Kalbacher, H., Mankowska, A., Zurakowski, D., Zrenner, E., Rejdak, R. (2007). Alterations of amino acids and glutamate transport in the

- DBA/2J mouse retina; possible clues to degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* **245**, 1157–1168.
- Schultz, K., Stell, W.K. (1996). Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci. Lett.* **211**, 191–194.
- Seeburg, P.H. (1993). The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* **16**(9), 359-65.
- Selles-Navarro, I., Villegas-Perez, M., Salvador-Silva, M., Ruiz- Gomez, J., Vidal-Sanz, M. (1996). Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 2002–2014.
- Sen, S. and Phillis, J.W. (1993). alpha-Phenyl-tert-butyl-nitron (PBN) attenuates hydroxyl radical production during ischemia-reperfusion injury of rat brain: an EPR study. *Free Radic Res Commun.* **19**(4), 255-65.
- Shaked, I., Ben-Dror, I., Vardimon, L. (2002). Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina. *J Neurochem.* **83**(3), 574-80.
- Shibuki, H., Katai, N., Yodoi, J., Uchida, K., Yoshimura, N. (2000). Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**(11), 3607-14.
- Shields, M.B. and Wadsworth, J.A. (1977). An evaluation of anticoagulation in glaucoma therapy. *Ann Ophthalmol.* **9**, 1115-8.
- Shults, C.W. (2003). Coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem.* **10**(19), 1917-21.
- Simon, D.K., Prusky, G.T., O'Leary, D., Constantine-Paton, M. (1992). N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**(22), 10593-7.
- Simpkins, J.W., Yi, K.D., Yang, S.H., Dykens, J.A. (2010). Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochim Biophys Acta.* **1800**(10), 1113-20.
- Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J., et al. (1997). Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg.* **87**, 724–30.

- Sisk, D.R. and Kuwabara, T. (1985). Histologic changes in the inner retina of albino rats following intravitreal injection of monosodium L-glutamate. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **223**, 250–258.
- Smith, G.G. and Baird, C.D. (1952). Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure. *Am. J. Ophthalmol.* **35**, 133–136.
- Sohn, S., Kim, E.Y., Gwag, B.J. (1998). Glutamate neurotoxicity in mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation. *Neurosci Lett.* **240**, 1–4.
- Somayajulu, M., McCarthy, S., Hung, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S. (2005). Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress: neuroprotection by Coenzyme Q10. *Neurobiol Dis.* **18**(3), 618-27.
- Soto, D., Comes, N., Ferrer, E., Morales, M., Escalada, A., Pales, J., Solsona, C., Gual, A., Gasull, X. (2004). Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**, 3650-3661.
- Sribnick, E.A., Ray, S.K., Nowak, M.W., Li, L., Banik, N.L. (2004). 17 β -Estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J Neurosci Res.* **76**, 688–96.
- Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., Beal, M.F. (2004). Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci.* **24**(36), 7779-88.
- Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1991). Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex: regulation by oxidized glutathione. *Journal of Neuroscience Research.* **30**, 582-591.
- Sullivan, R.K., Woldemussie, E., Macnab, L., Ruiz, G., Pow, D.V. (2006). Evoked expression of the glutamate transporter GLT-1c in retinal ganglion cells in human glaucoma and in a rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **47**, 3853–3859.
- Sucher, N.J., Lipton, S.A., Dreyer, E.B. (1997). Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res.* **37**, 3483–93
- Szabo, M.E., Droy-Lefaix, M.T., Doly, M. (1992). Modification of reperfusion-induced ionic imbalance by free radical scavengers in spontaneously hypertensive rat retina. *Free Radic Biol Med.* **13**(6), 609-20.

- Szatkowski, M., Attwell, D. (1994). Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci.* **17**(9), 359-65.
- Tamada, Y., Fukiage, C., Daibo, S., Yoshida, Y., Azuma, M., Shearer, T.R. (2002). Involvement of calpain in hypoxia-induced damage in rat retina in vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **131**, 221-5.
- Terrian, D.M., Gannon, R.L., Rea, M.A. (1990). Glutamate is the endogenous amino acid selectively released by rat hippocampal mossy fiber synaptosomes concomitantly with prodynorphin-derived peptides. *Neurochem Res.* **15**(1), 1-5.
- Tezel, G. and Wax, M.B. (2004). The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol.* **15**, 80-4.
- Tezel, G. (2006). Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog. Ret. Eye Res.* **25**, 490-513.
- Tezel, G., Yang, X., Cai, J. (2005). Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 3177-3187.
- Thoreson, W.B. and Witkovsky, P. (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* **18**(6), 765-810.
- Tielsch, J.M., Katz, J., Sommer, A., et al. (1995). Hypertension, perfusion pressure, and primary open-angle glaucoma. A population-based assessment. *Arch Ophthalmol.* **113**, 216-21.
- Tielsch, J.M., Katz, J., Sommer, A., Quigley, H.A. Javitt, J.C. (1994). Family history and risk of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol.* **112**, 69-73.
- Tinjust, D., Kergoat, H., Lovasik, J.V. (2002). Neuroretinal function during mild systemic hypoxia. *Aviat Space Environ Med.* **73**, 1189-94.
- Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* **19**, 328-334.
- Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C., Volterra, A. (1996). Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem.* **271**, 5976-5979.

- Vardi, N., Duvoisin, R., Wu, G., Sterling, P. (2000). Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol.* **423**, 402–412.
- Veriac, S., Tissie, G., Bonne, C. (1993). Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. *Exp Eye Res.* **56**(1), 85-8.
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S., and Racagni, G. (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.* **14**, 2924–2932.
- Vorwerk, C.K., Naskar, R., Schuettauf, F., Quinto, K., Zurakowski, D., Gochenauer, G., Robinson, M.B., Mackler, S.A., Dreyer, E.B. (2000). Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**, 3615–3621.
- Wamsley, S., Gabelt, B.T., Dahl, D.B., Case, G.L., Sherwood, R.W., May, C.A., Hernandez, M.R., Kaufman, P.L., (2005). Vitreous glutamate concentration and axon loss in monkeys with experimental glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **123**, 64-70.
- Wang, X., Butowt, R., Vasko, M.R., von Bartheld, C.S. (2002). Mechanisms of the Release of Anterogradely Transported Neurotrophin-3 from Axon Terminals. *The Journal of Neuroscience.* **22**(3), 931–945.
- Weaver, C.E., JR, Park-Chung, M., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1997). 17beta Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* **761**(2), 338-41.
- Wensor, M.D., McCarty, C.A., Stanislavsky, Y.L., Livingston, P.M., Taylor HR. (1998). The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project. *Ophthalmology.* **105**(4), 733-9.
- White, R.D. and Neal, M.J. (1976). The uptake of L-glutamate by the retina. *Brain Res.* **111**(1), 79-93.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol.* **151**(6), 1207-20.
- Wilson, M.R., Hertzmark, E., Walker, A.M., et al. (1987). A case control study of risk factors in open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* **105**, 1066–1071.

- Yamamoto, F., Hiroi, K., Honda, Y. (1994). Effects of intravenous superoxide dismutase and catalase on electroretinogram in the cat postischemic retina. *Ophthalmic Res.* **26**(3), 163-8.
- Yang, L., Calingasan, N.Y., Wille, E.J., Cormier, K., Smith K, Ferrante, R.J., Beal, M.F. (2009). Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. *J Neurochem.* **109**(5), 1427-39.
- Yang, S.H., Liu, R., Wu, S.S., Simpkins, J.W. (2003). The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* **1007**, 101-7.
- Yang, X.L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog. Neurobiol.* **73**, 127–150.
- Yue, X., Mehmet, H., Penrice, J., et al. (1997). Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **23**, 16–25.
- Zeevalk, G.D. and Hyndman, A.G. (1986). Glutamate and kainate are not directly toxic to developing amacrine cells: analysis in a Lucifer Yellow-labeled population. *Neurosci Lett.* **64**(3), 281-6.
- Zeevalk, G.D. and Nicklas, W.J. (1992). Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem.* **59**(4), 1211-20.
- Zhang, H., Agardh, C.D., Agardh, E. (1995). Increased catalase levels and hypoxanthine-enhanced nitro-blue tetrazolium staining in rat retina after ischemia followed by recirculation. *Curr Eye Res.* **14**(1), 47-54.
- Zhang, Y., Champagne, N., Beitel, L.K., Goodyer, C.G., Trifiro, M., LeBlanc, A. (2004). Estrogen and androgen protection of human neurons against intracellular amyloid beta1–42 toxicity through heat shock protein 70. *J Neurosci.* **24**, 5315–21.
- Zhang, Y.Q., Shi, J., Rajakumar, G., Day, A.L., Simpkins, J.W. (1998). Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res.* **784**(1-2), 321-4.
- Zini, I., Tomasi, A., Grimaldi, R., Vannini, V., Agnati, L.F. (1992). Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. *Neurosci Lett.* **138**(2), 279-82.

Produzione scientifica

Pubblicazioni scientifiche *in extenso*:

- 1) Russo, R., Cavaliere, F., Watanabe, C., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Sakurada, S., Morrone, L.A. (2008). "17Beta-estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat.". *Progress in Brain Research*. **173**, 583-590.
- 2) Russo, R., Cavaliere, F., Berliocchi, L., Nucci, C., Gliozzil, M., Mazzei, C., Tassorelli, C., Corasaniti, M., Rotoroti, D., Bagetta, G., Morrone, L.A. (2008). "Modulation of pro-survival and death associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade.". *Journal of Neurochemistry*. **107** (5), 1347-1357
- 3) Russo, R., Cavaliere, F., Rombolà, L., Gliozzi, M., Cerulli, A., Nucci, C., Fazzi, E., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. (2008). "Rational basis for the development of coenzyme Q10 as a neurotherapeutic agent for retinal protection.". *Progress in Brain Research*. **173**, 575-582.
- 4) Nucci, C., Tartaglione, R., Cerulli, A., Mancino, R., Spano, A., Cavaliere, F., Rombolà, L., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. (2007). Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat. *Int Rev Neurobiol*. **82**, 397-406.

Comunicazioni a congressi internazionali:

1. Cavaliere, F., Bonanno, G., Morrone, L.A. The increase of glutamate caused by ischemia/reperfusion is sustained by reduced neuronal glutamate transport in rat retina. Contributo a New Perspectives in Neuroscience: Joint Meeting of Young Italian and Japanese Neuroscientists, Naples, September 21 2010.
2. Nucci, C., Russo, R., Cavaliere, F., Varano, G.P., Rombola, L., Morrone, L.A., Bagetta, G., Corasaniti, M.T. "Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 in Retinal Ganglion Cells (RGCs) Death Induced by Retinal Ischemia/Reperfusion". Contributo a ARVO 2010 Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology", Fort Lauderdale, Florida, May 2-6 2010.

3. Russo, R., Cavaliere, F., Varano, G.P., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. "The Glutamate Transporter Inhibitor, DL-Threo-Beta-Benzoyloxyaspartate (DL-TBOA), Prevents Neurochemical Effects But Not Neurotoxicity Yielded In The Retina By Elevated Intraocular Pressure (IOP)-Induced Ischemia/Reperfusion in Rat.". Contributo a ARVO 2010 Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology", Fort Lauderdale, Florida, May 2-6 2010.
4. Cavaliere, F., Russo, R., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Morrone, L.A. "Evidence that reversal of glutamate uptake is involved in retinal excitotoxicity". Contributo a XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia(VV), Calabria, Italy, May 20-22 2009.
5. Varano, G.P., Cavaliere, F., Russo, R., Corasaniti, M.T. , Bagetta, G., Morrone, L.A. "Retinal ischemia/reperfusion induced by high intraocular pressure (IOP) modulates PI-3L/Akt pro-survival pathway in rat". Contributo a XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia(VV), Calabria, Italy, May 20-22 2009.
6. Nucci, C., Cerulli, A., Cavaliere, F., Russo, R., Rombolà, L., Fazzi, E., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. "High Intraocular Pressure (IOP)-Induced Ischemia Elevates Extracellular Glutamate in the Retina of Rat: Pharmacological Evidence to Implicate Derangement of Glutamate Transporters". Contributo a ARVO 2008 Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, 27/04 - 01/05 2008.
7. Russo, R., Nucci, C., Ciociaro, A., Cavaliere, F., Cerulli, A., Fazzi, E., Bagetta, G., Corasaniti, M.T. "Evidence That High Intraocular Pressure (IOP)-Induced Retina Ischemia/Reperfusion Modulates PI-3K/Akt Pro-Survival Pathway in Rat". Contributo a ARVO 2008 Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, 27/04 - 01/05 2008.
8. Morrone, L.A., Cavaliere, F., Russo, R., Rombolà, L., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M. "Evidence that reversal of glutamate uptake is involved in retinal excitotoxicity". Contributo a 6th FENS forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, 12-16 July 2008.

9. Russo R., Cavaliere, F., Ciociaro, A., Mazzei, C., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. "PI-3K/Akt pro-survival pathway is modulated by retina ischemia/reperfusion induced by high intraocular pressure (HIOP) in rat". Contributo a 6th FENS forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, 12-16 July 2008.
10. Russo, R., Cavaliere, F., Varano, G.P., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. "Involvement of matrix metalloproteinases in the loss of retinal ganglion cells (RGCs) induced by retinal ischemia/reperfusion". Contributo a XI Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Educational Building, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan, september 12-14 2008.
11. Russo, R., Nucci, C., Cavaliere, F., Rombolà, L., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A. "Mechanisms of retinal ganglion cell death and repair in the course of experimental ischemia". Contributo a Italian-Japanese young researcher's joint seminar 2007 in Sendai, Sendai, Japan, May 19th 2007.
12. Morrone, L.A., Rombolà, L., Cavaliere, F., Tartaglione, R., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Nucci, C. "Coenzyme Q10 prevents retinal damage caused by high intraocular pressure(IOP)-induced transient ischemia in rat". Atti del convegno "British Pharmacological Society - Winter Meeting 2006", Oxford (UK), 2006.
13. Nucci, C., Tartaglione, R., Cerullo, A., Cavaliere, F., Rombolà, L., Bagetta, G., Morrone, L.A. "Neurochemical and neuropathological evidence that coenzyme Q10 prevents retinal damage caused by high intraocular pressure (IOP)-induced transient ischemia in rat". Contributo a IX workshop on Apoptosis in Biology and Medicine: Neuroinflammation in neuronal death and repair, Porto Pargos Hotel Parghelia (VV), Italia, 13-16 settembre 2006.

Comunicazioni a congressi nazionali:

1. Cavaliere, F., Russo, R., Varano, G., Corasaniti, M.T., Bagetta G., Morrone L.A. (2009). Involvement of matrix metalloproteinases in the excitotoxic cell death induced by retinal ischemia/reperfusion. Contributo a: Riunione Nazionale Dottorandi e borsisti italiani in neuroscienze e materie affini. Busto Arsizio 27-28 maggio 2010

2. Cavaliere, F., Russo, R., Varano, G.P., Rombolà, L., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Morrone, L.A. "17beta-estradiol minimizes intravitreal glutamate increase after transient ischemia/reperfusion in rat". Contributo a 34' Congresso Nazionale della Societa' di Farmacologia, Rimini, October 14-17 2009.
3. Cavaliere, F., Russo, R., Nucci, C., Corasaniti, M.T. , Bagetta, G., Morrone, L.A. "Evidence that reversal of glutamate uptake is involved in retinal excitotoxicity". Contributo a New Perspective in neuroscience: Research results of Young Italian Neuroscientist, Naples, April 17 2009.
4. Varano, G.P., Cavaliere, F., Russo, R., Nucci, C., Mazzei, C., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A., Bagetta, G. "Evidence that high intraocular pressure (IOP)-induced retina ischemia/reperfusion modulates PI-3K/Akt pro-survival pathway in rat". Contributo a New Perspective in neuroscience: Research results of Young Italian Neuroscientist, Naples, April 17 2009.
5. Russo, R., Cavaliere, F., Varano, G.P. , Rombolà, L., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Morrone, L.A. "Pharmacological modulation of the extracellular glutamate changes induced by retinal ischemia/reperfusion in rat targets to minimize retinal damage". Contributo a 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Rimini, October 14-17 2009.
6. Russo, R., Cavaliere, F., Varano, G.P., Rombolà, L., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Morrone, L.A. "Role of matrix metalloproteinases in retinal ganglion cells (RGCs) loss induced by retinal ischemia/reperfusion". Contributo a 34' Congresso Nazionale della Societa' di Farmacologia, Rimini, October 14-17 2009.
7. Morrone, L.A., Nucci, C., Rombolà, L., Cavaliere, F., Cerulli, A., Maccarrone, M., Corasaniti, M.T., Bagetta, G. "Ruolo del sistema endocannabinoide nei meccanismi alla base del danno retinico in un modello sperimentale di ischemia da aumentata pressione endoculare nel ratto". Contributo a 33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Cagliari, 6-9 Giugno 2007.