

# Επιπτώσεις της εκπεμπόμενης από θερμικές πηγές υπέρυθρης ακτινοβολίας σε παράγοντες του εξωκυτταρικού χώρου στον κερατοειδή και στον κρυσταλλοειδή φακό κονικλών και η επίδραση της αναστολής της κυκλοοξυγένεσης

Π. Δαδούκης

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη των επιδράσεων της υπέρυθρης ακτινοβολίας στους διάφορους ιστούς του οφθαλμού έχει κατά το παρελθόν αποτελέσει και συνεχίζει και στις μέρες μας να αποτελεί ένα ευρύ αντικείμενο έρευνας. Κι αυτό γιατί όλοι μας βρισκόμαστε καθημερινά εκτεθειμένοι στην υπέρυθρη ακτινοβολία, είτε αυτή προέρχεται από τον ήλιο, είτε από διάφορες τεχνητές πηγές οπτικής ακτινοβολίας όπως π.χ. κλίβανοι, θερμάστρες, λάμπες, συσκευές ψησίματος κ.α. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την έκθεση στην υπέρυθρη ακτινοβολία με πρόκληση διαφόρων βλαβών στους ιστούς του οφθαλμού, συμπεριλαμβανομένων της καταρρακτογένεσης, των θερμικών εγκαυμάτων του κερατοειδούς και του αμφιβληστροειδή και του δερματικού ερυθήματος ab igne.

Παρόλ' αυτά, λίγα είναι γνωστά μέχρι στιγμής για τους μηχανισμούς πρόκλησης των βλαβών αυτών από την υπέρυθρη ακτινοβολία, σε αντίθεση με την υπεριώδη, όπου αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει την συμμετόχη μορίων του εξωκυτταρίου χώρου, μεταξύ αυτών και των μεταλλοπρωτεΐνών, στις βλαπτικές επιδράσεις της.

*Λέξεις κλειδιά: Κερατοειδής, υπέρυθρη ακτινοβολία, κρυσταλλοειδής φακός, κυκλοοξυγένεση.*

Εργαστήριο Πειραματικής Οφθαλμολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ.

Corresponding author: P. Dadoukis  
e-mail: panagiotisdad@yahoo.gr

Έρευνες πάντως σε ινοβλάστες δέρματος ανθρώπου δείχνουν ότι και η υπέρυθρη, όπως ακριβώς και η υπεριώδη ακτινοβολία, φαίνεται να ασκεί τις βλαπτικές επιδράσεις της με παρόμοιο τρόπο, επηρεάζοντας δηλαδή κι αυτή μόρια του εξωκυτταρίου χώρου, όπως είναι οι μεταλλοπρωτεΐνες. Εξάλλου, είναι γνωστό ότι οι μεταλλοπρωτεΐνες ενοχοποιούνται σε διάφορες παθήσεις των ιστών του οφθαλμού, όπως σε καταρρακτογένεση, στην ξηροφθαλμία, στις αποπτώσεις του κερατικού επιθηλίου, ενώ παράλληλα κι άλλα μόρια του εξωκυτταρίου χώρου, όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες, φαίνεται να συμμετέχουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του οφθαλμού, όπως στην δημιουργία καταρράκτη και οιδήματος του κερατοειδούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής εργασίες που να έχουν μελετήσει τον πιθανό μηχανισμό πρόκλησης βλαβών στον οφθαλμό από την υπέρυθρη ακτινοβολία IR και την επίδραση που μπορεί να επιφέρει η έκθεση σε IR στις μεταλλοπρωτεΐνες και τις γλυκοζαμινογλυκάνες.

Σε αυτό το πλαίσιο σχεδιάστηκε η παρούσα εργασία, με στόχο την μελέτη της επίδρασης της οξείας και χρόνιας έκθεσης της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε μόρια του εξωκυτταρίου χώρου στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονικλών, καθώς και της επίδρασης της αναστολής της κυκλοοξυγένεσης σε αυτά. Απώτερος σκοπός της μελέτης αυτής είναι να συμβάλλει τόσο στην προσπάθεια αποσαφήνισης των πιθανών μηχανισμών πρόκλησης των βλαπτικών συνεπειών της υπέρυθρης ακτινοβολίας, όσο και στον τομέα ανίχνευσης προληπτικών ή και θεραπευτικών μέτρων.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη των επιδράσεων των διαφόρων μορφών ακτινοβολίας στους διάφορους ιστούς του οφθαλμού έχει κατά το παρελθόν αποτελέσει και συνεχίζει και στις μέρες μας να αποτελεί ένα ευρύ αντικείμενο έρευνας με κυρίαρχο στόχο την κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων είναι δυνατόν αυτές να εμφανισθούν. Απώτερος σκοπός των ερευνών αυτών είναι βέβαια η συμβολή στην προσπάθεια για την αποφυγή πρόκλησης διαφόρων βλαβών λόγω της ηθελημένης ή μη έκθεσης του οφθαλμού σε αυτές τις ακτινοβολίες<sup>1</sup>.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία το μήκος κύματος της οποίας περιλαμβάνεται μεταξύ των 100 και 1000000 nm αποκαλείται συνήθως ως «οπτική ακτινοβολία». Σύμφωνα με τις υποδείξεις της CIE (International Commission on Illumination), η οπτική ακτινοβολία με μήκος κύματος μεταξύ 100 και 400 nm ονομάζεται υπεριώδης (Ultraviolet - UV) και υποδιαιρείται αναλόγως του μήκους κύματος της σε UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) και UVC (100-280 nm). Η ακτινοβολία με μήκος κύματος μεταξύ 380 και 780 nm ονομάζεται ορατή ακτινοβολία ή απλά «φως» (visible radiation). Η ακτινοβολία με μήκος κύματος μεταξύ 780 nm και 1000000 nm είναι γνωστή ως υπέρυθη (Infrared - IR) ακτινοβολία η οποία με τη σειρά της υποδιαιρείται στην IRA (780-1400 nm), στην IRB (1400-3000 nm) και στην IRC (3000-1000000 nm). Όπως παρατηρεί κανείς, υπάρχει μια επικάλυψη μεταξύ της υπεριώδους και της ορατής ακτινοβολίας στην περιοχή μεταξύ των 380 και 400 nm<sup>1</sup>.

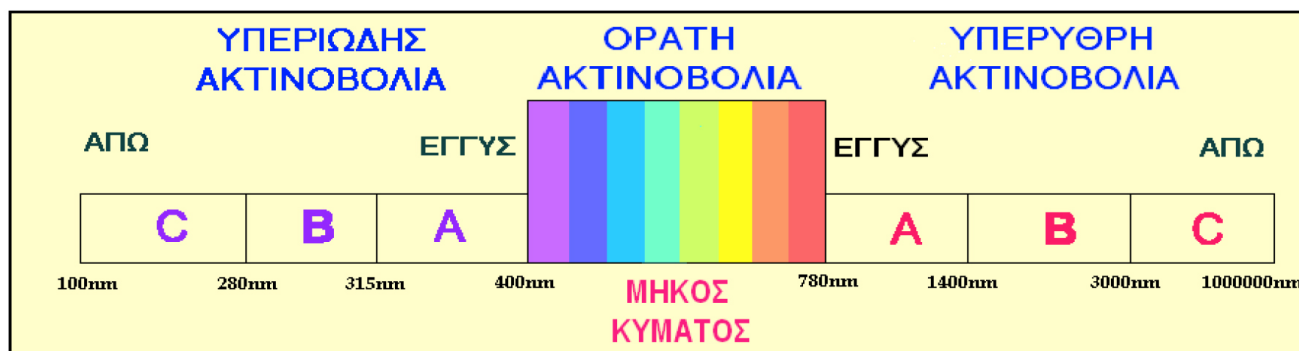
Η IRA αναφέρεται συχνά και ως εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία (Near Infrared Radiation - NIR), ενώ η IRB ως μέση (Middle Infrared Radiation - MIR) και η IRC ως άπω υπέρυθη ακτινοβολία (Far Infrared Radiation - FIR). Οι ίδιοι επιθετικοί προσδιορισμοί χρησιμοποιούνται και για τον χαρακτηρισμό της υπεριώδους ακτινοβολίας (Σχήμα 1)<sup>1</sup>.

Ο ήλιος, όπως είναι γνωστό, αποτελεί την κύρια πηγή οπτικής ακτινοβολίας στη φύση εκπέμποντας τόσο υπεριώδη όσο ορατή και υπέρυθη ακτινοβολία, μεγάλο ποσοστό των οποίων φθάνει στην επιφάνεια της Γης. Υπάρχουν όμως παράλληλα και τεχνητές πηγές οπτικής ακτινοβολίας όπως π.χ. κλίβανοι, θερμάστρες, λάμπες, συσκευές ψησίματος κ.α. στις οποίες είναι δυνατόν να είναι εκτεθειμένα διάφορα άτομα, ηθελημένα ή μη, και η έκθεσή τους αυτή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις να ξεπερνά κατά μεγάλο βαθμό τα «φυσιολογικά» επίπεδα της IR ακτινοβολίας που δέχονται. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από τις προαναφερθείσες πηγές είναι κατά κανόνα ευρέως φάσματος και ασύμφωνη (non coherent) σε αντιδιαστολή με την μονοχρωματική (συγκεκριμένου μήκους κύματος), σύμφωνη (coherent) ακτινοβολία των lasers<sup>1</sup>.

## ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ - ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΟΦΘΑΛΜΟΥ

Είναι γνωστό ότι το νερό, το κύριο συστατικό των διαφόρων ιστών του οφθαλμού, είναι διαπερατό για την IRA ακτινοβολία ενώ η IRB ακτινοβολία είναι πολύ ελαφρά διεισδυτική και η IRC ακτινοβολία εμφανίζει σχεδόν πλήρη επιφανειακή απορρόφηση<sup>1</sup>.

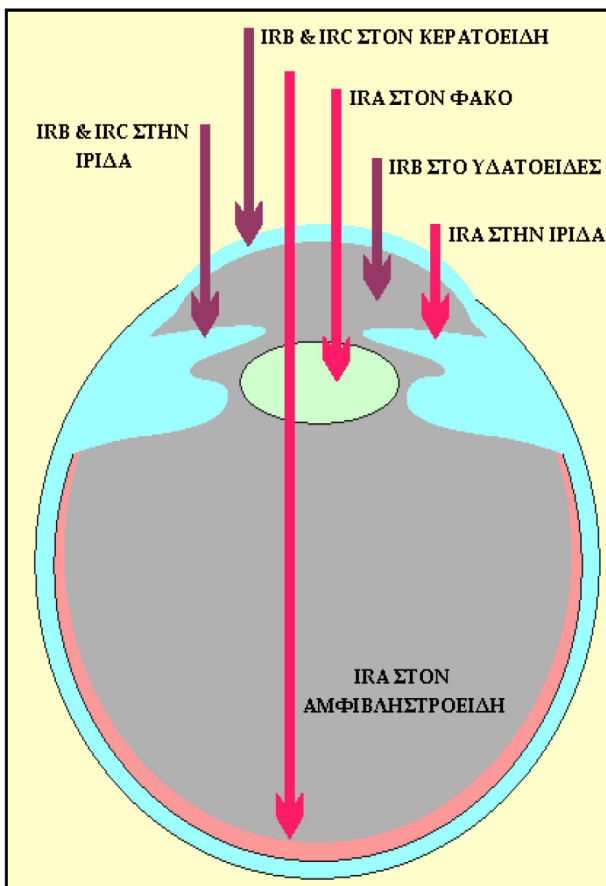
Ο κερατοειδής, το υδατοειδές υγρό, ο φυσιολογικός φακός και το υαλώδες σώμα εμφανίζουν μεγάλη διαπερατότητα για την ορατή και την εγγύς (IRA) υπέρυθη ακτινοβολία. Ειδικότερα, ο κερατοειδής είναι διαπερατός για το 96% περίπου της προσπίπτουσας σε αυτόν ακτινοβολίας με μήκος κύματος μεταξύ 700 και 1400 nm, όπου περιλαμβάνεται και η IRA ακτινοβολία. Από την άλλη πλευρά, η απορρόφηση της οπτικής ακτινοβολίας από την ίριδα στην περιοχή μεταξύ 300-1000 nm



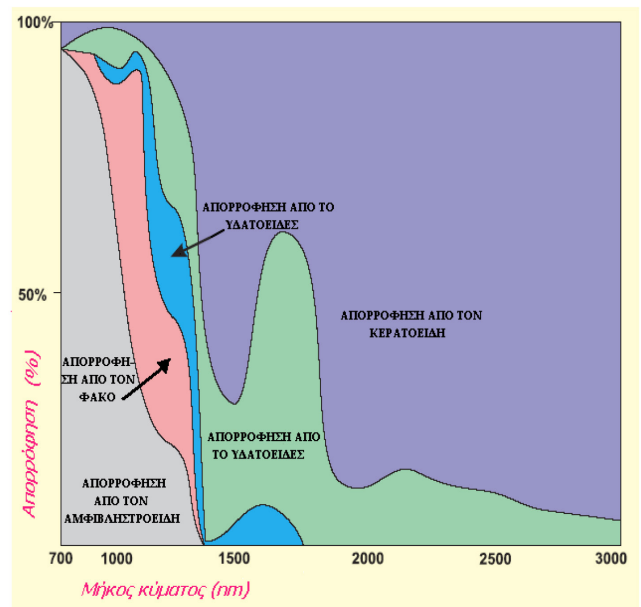
Σχήμα 1: Ανάλυση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ των 100 και 1000000 nm (1 mm)<sup>1</sup>

είναι σημαντική. Για μήκη κύματος μικρότερα από τα 700 nm η ίριδα απορροφά περισσότερο από 80% της προσπίπτουσας σε αυτήν ακτινοβολίας ενώ σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από τα 1000 nm η ίριδα εμφανίζει σχετικά μικρότερη απορρόφηση. Ο κρυσταλλοειδής φακός, όπως προαναφέρθηκε, είναι διαπερατός για την ορατή ακτινοβολία ενώ εμφανίζει κάποιου βαθμού απορρόφηση για την εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία (IRA). Τελικά, λόγω της συνδυασμένης διαπερατότητας και απορρόφησης των διάφορων προσθίων τμημάτων του οφθαλμού, η υπέρυθη ακτινοβολία που φθάνει τελικά στον αμφιβληστροειδή μπορεί να έχει μέγιστο μήκος κύματος περίπου στα 1400 nm<sup>1</sup>.

Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται η απορρόφηση της IR από τα διάφορα τμήματα του οφθαλμού ενώ στο Σχήμα 3 αποδίδεται η ποσοστιαία απορρόφηση της IR κατά τη διέλευση της από τα διάφορα τμήματα του οφθαλμού σε συνάρτηση με το μήκος κύματος αυτής<sup>2</sup>.



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα διάφορα τμήματα του οφθαλμού<sup>2</sup>.



Σχήμα 3: Ποσοστιαία απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας κατά τη διέλευση της από τα διάφορα τμήματα του οφθαλμού σε συνάρτηση με το μήκος κύματος αυτής<sup>2</sup>.

## ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟΝ ΟΦΘΑΛΜΟ

Ο υπολογισμός της έκθεσης του κερατοειδούς (αλλά και του κρυσταλλοειδούς φακού) επηρεάζεται σημαντικά από τη σχετική θέση της φωτεινής πηγής και το βαθμό του κλεισίματος των βλεφάρων. Ο κίνδυνος εμφάνισης θερμικών βλαβών (εγκαυμάτων) του κερατοειδούς παρουσιάζεται κατά κύριο λόγο κατά την οξεία έκθεση του σε ακτινοβολίες με μήκος κύματος μεταξύ 1400 και 1000000 nm (IRB και IRC ακτινοβολία) όπου ο κερατοειδής εμφανίζει έντονη απορρόφηση. Μεταβολές όμως του ενδοθηλίου του κερατοειδούς έχουν επίσης παρατηρηθεί σε εργαζόμενους (υαλοουργούς) που υφίστανται μακροχρόνια, χαμηλής σχετικά ισχύος έκθεση σε υπέρυθη ακτινοβολία<sup>2</sup>.

Διάφορες αναφορές στις αρχές του προηγούμενου αιώνα διατύπωσαν την άποψη ότι η παρατεταμένη έκθεση (σε μία διάρκεια χρόνου έως και αρκετών ετών) σε επίπεδα IR ανώτερα των φυσιολογικών οδηγεί στην εμφάνιση καταρράκτη σε διάφορες κατηγορίες εργαζόμενων, με κύριο εκπρόσωπο τους εργαζόμενους σε υαλοργεία. Το θέμα αυτό αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης και περισσότερο σύγχρονων επιδημιολογικών ερευνών. Η έρευνα των Lydhal και Philipson (1984) κα-

τέδειξε ότι η επαγγελματική έκθεση σε υψηλά επίπεδα IR συνδυάζεται με έναν σαφώς αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση καταρράκτη σε συνδυασμό όμως με την αναμφισβήτητη και κυρίαρχη επίδραση της αυξημένης ηλικίας στην ανάπτυξη των καταρρακτικών αλλοιώσεων<sup>3</sup>. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι κατά πάσα πιθανότητα η IR επιταχύνει την εξέλιξη των πιθανών προ-καταρρακτικών αλλοιώσεων του κρυσταλλοειδούς φακού έτσι ώστε αυτές να λάβουν γρηγορότερα την μορφή του κλασσικού καταρράκτη<sup>3</sup>.

Το υδατοειδές υγρό και το υαλώδες σώμα εμφανίζουν σε μεγάλο βαθμό τα χαρακτηριστικά απορρόφησης του ύδατος και δεν εμφανίζουν ειδικές επιδράσεις από την έκθεση τους στην IR. Από την άλλη πλευρά, η ίριδα εμφανίζει κάποιου βαθμού ευαισθησία στην IR και κατά την έκθεση της σε αυτήν είναι δυνατόν να εμφανισθούν οίδημα, υπεραϊμία, μύση και διαρροή πρωτεϊνικών στοιχείων από τα αγγεία της στο υδατοειδές υγρό, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών της αντίδρασης στον πρόσθιο θάλαμο<sup>4</sup>.

Η κύρια επιπλοκή που είναι δυνατόν να εμφανισθεί από την άμεση έκθεση σε έντονες πηγές οπτικής ακτινοβολίας στον αμφιβληστροειδή είναι η φωτοαμφιβληστροειδοπάθεια με συχνότερο παράδειγμα την ηλιακή αμφιβληστροειδοπάθεια, η οποία οφείλεται στην παρατεταμένη ατένιση του ήλιου χωρίς τις αναγκαίες προφυλάξεις. Αν και παλαιότερα η ηλιακή αμφιβληστροειδοπάθεια αναφερόταν ως «τύφλωση λόγω έκλειψης» με συνοδό «έγκυαμα» του αμφιβληστροειδούς, φαίνεται ότι τελικά αυτή οφείλεται στις φωτοχημικές αντιδράσεις που εμφανίζονται στον αμφιβληστροειδή μετά από την έκθεση του σε περιοχές του ορατού φάσματος με μικρό μήκος κύματος, στην περιοχή δηλαδή του ιώδους και του κυανού. Από την άλλη πλευρά όμως, έχει παρατηρηθεί ότι η οξεία έκθεση σε σχετικά μεγάλης έντασης ακτινοβολίες που εκπέμπονται από πηγές, όπως π.χ. μία λυχνία τόξου Ξένου (Xenon-arc flash lamp), καθώς και η έκθεση σε διάφορες laser ακτινοβολίες, είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην εμφάνιση βλαβών του αμφιβληστροειδούς θερμικής αιτιολογίας (retinal thermal injury) σε περιοχές με μήκος κύματος μεταξύ 380 και 1400 nm. Όπως είναι γνωστό, όσο αυξάνει το μήκος κύματος μίας συγκεκριμένης οπτικής ακτινοβολίας τόσο ελαττώνεται η ενέργεια των φωτονίων της. Οι φωτοχημικές αντιδράσεις απαιτούν την παρουσία φωτονίων υψηλής ενέργειας τα οποία απαντώνται κατά κύριο λόγο στις υπεριώδεις ακτινοβολίες ή στις ακτινοβολίες του ορατού φάσματος με μικρότερο μήκος κύματος κατά δεύτερο λόγο. Ακτινοβολίες με μεγαλύτερα μήκη κύματος (στην περιοχή του υπερόθρου) είναι υπεύθυνες κυρίως για την πρόκληση θερμικών επιδράσεων<sup>5,6,7</sup>.

Επανεπιλημμένη έκθεση, επίσης, σε θερμικές πηγές και κατά συνέπεια σε IR, προκαλεί δερματική βλάβη που χαρακτηρίζεται ως ερύθημα ab igne, που χαρακτηρίζεται κλινικά από δικτυωτό υπερχρωματισμό και τηλεαγγειεκτασία και συνοδεύεται ιστολογικά από επιδερμική ατροφία, διεύρυνση αγγείων και εναποθέσεις μελανίνης και αιμοσιδηρίνης στο δέρμα<sup>8</sup>. Μετά από πολλά χρόνια, αυτές οι αλλοιώσεις μπορούν να αναπτύξουν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της θερμικής κεράτωσης, όπως υπερχεράτωση, κερατινοκυτταρική δυσπλασία και δερματική ελάστωση, οι οποίες είναι παρόμοιες με τις αλλοιώσεις που παρατηρούνται μετά από μακροχρόνια έκθεση σε UV στα πλαίσια της φωτογήρανσης και της ακτινικής κεράτωσης<sup>9</sup>. Τόσο η θερμική όσο και η ακτινική κεράτωση είναι προκαρκινωματώδεις βλάβες, χαρακτηριζόμενες από επιδερμική δυσπλασία, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα δέρματος<sup>10,11,12,13,14</sup>.

## ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΕΙΔΗΣ ΦΑΚΟΣ

Η μελέτη αυτή θα προσπαθήσει να προσδιορίσει ενδεχόμενες μεταβολές που επιφέρει η έκθεση σε IR σε μόρια του εξωκυττάρου χώρου του κερατοειδή και του κρυσταλλοειδή φακού κονίκλων. Επομένως, μια σύντομη αναφορά σε στοιχεία ιστολογίας, βιοχημείας και φυσιολογίας των παραπάνω ιστών κρίνεται απαραίτητη.

### 1 Κερατοειδής

Ο κερατοειδής είναι υπεύθυνος πρωταρχικά για την διόδο του φωτός στον οφθαλμό. Περίπου 70% του εστιασμένου φωτός στον αμφιβληστροειδή οφείλεται στον κερατοειδή (κυρίως εξαιτίας της μεγάλης μεταβολής του δείκτη διάθλασης μεταξύ αέρα και κερατοειδή. Ο κερατοειδής αποτελείται από έξι διακριτές στιβάδες: το επιθήλιο, την επιθηλιακή βασική μεμβράνη, τη μεμβράνη του Bowman, το στρώμα (substantia propria), τη δεσμετικό μεμβράνη και το ενδοθήλιο<sup>15</sup>.

- **Επιθήλιο:** Το επιθήλιο αποτελείται από πέντε ή έξι στιβάδες κυττάρων. Η πρώτη στιβάδα φέρει συνήθως αποπεπλατυσμένα πλακώδη κύτταρα. Οι μεσαίες στιβάδες αποτελούνται από κύτταρα τα οποία προοδευτικά γίνονται όλο και περισσότερο κυλινδρικά όσο προχωράμε σε βαθύτερες στιβάδες. Η εσωτερική ή βασική στιβάδα αποτελείται από κυλινδρικά κύτταρα τοποθετημένα πολύ κοντά το ένα με το άλλο. Μεταξύ των βασικών κυττάρων του επιθηλίου και της μεμβράνης του Bowman βρίσκεται μια εξαιρετικά λεπτή βασική

μεμβράνη, η οποία συνδέεται με τα βασικά κύτταρα με ημιδεσμοσωμάτια<sup>15</sup>. Τα ημιδεσμοσωμάτια περιέχουν ινίδια και συγκολλητικές γλυκοπρωτεΐνες, όπως η λαμνίνη και η φμπρονεκτίνη, οι οποίες πιστεύεται ότι παρέχουν το κλειδί προσκόλλησης μεταξύ των βασικών κυττάρων και των κυριότερων συστατικών της βασικής μεμβράνης, του κολλαγόνου τύπου IV και της θεικής ηπαράνης. Φμπρίνη και κολλαγόνου τύπου VII έχουν επίσης ανιχνευθεί στην ανθρώπινη κερατική βασική μεμβράνη<sup>16</sup>.

- **Μεμβράνη Bowman:** Η μεμβράνη του Bowman είναι ένας διαφανής ιστός που δεν περιέχει κύτταρα και φαίνεται να αποτελείται από ομοίμορφα ινίδια, πιθανότατα κολλαγόνου τύπου I, που διατρέχουν παράλληλα την επιφάνεια του κερατοειδή<sup>15</sup>.

- **Στρώμα:** Το στρώμα αποτελεί το 90% του πάχους του κερατοειδούς. Συντίθεται από στρώματα πεταλίων, που διατρέχουν όλο το μήκος του κερατοειδούς και αποτελούνται από δεσμίδες κολλαγόνων ινιδίων οι οποίες διαπλέκονται η μία με την άλλη αν και είναι σχεδόν παράλληλες με την επιφάνεια. Τα κύτταρα του στρώματος ονομάζονται κερατοκύτταρα και είναι αποπεπλατυσμένα και παράλληλα κι αυτά με την επιφάνεια του κερατοειδούς<sup>15</sup>. Το κερατικό στρώμα είναι διαφοροποιημένος συνδετικός ιστός αποτελούμενος από νερό κατά 75%-85%. Το υπόλοιπο 20%-25% αποτελείται από κολλαγόνο, διάφορες πρωτεΐνες και γλυκοζαμινογλυκάνες (Glycosaminoglycans, GAGs). Τέσσερις τύποι κολλαγόνου έχουν ταυτοποιηθεί: οι τύποι I (50%-55%), III (1%), V (8%-10%) και VI (25%-30%). 4%-4.5% του καθαρού βάρους του κερατοειδή αποτελείται από GAGs. Οι GAGs ενώνονται πιθανώς με κολλαγόνα ινίδια ή διαιλυτές πρωτεΐνες και ενεργούν ως ανιόντα για τη δέσμευση κατιόντων και νερού. Τρεις κυρίως GAGs ανιχνεύονται στον κερατοειδή: η θεική κερατάνη (50%), η θεική δερματάνη (25%) και η θεική χονδροϊτίνη Α (25%). Οι ελάχιστες έως καθόλου GAGs στον σκληρό χιτώνα του οφθαλμού οδηγούν στην υποψία ότι οι GAGs συμβάλλουν στην διατήρηση του επιπέδου ενυδάτωσης και διαφάνειας του κερατοειδή<sup>15</sup>. Είναι αποφασιστικής σημασίας ο βαθμός ενυδάτωσης να παραμένει σταθερός και η διάταξη των κολλαγόνων ινιδίων αμετάβλητη, καθώς αυτά είναι τα κλειδιά που καθορίζουν τη διαφάνεια του κερατοειδούς<sup>16</sup>.

- **Δεσκαμέτειος μεμβράνη:** Η δεσκαμέτειος μεμβράνη διαχωρίζει το βαθύ στρώμα από το ενδοθήλιο. Πιθανολογείται ότι είναι προϊόν έκκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και υψηλά ποσά γλυκίνης, υδροξυγλυκίνης και υδροξυπρολίνης<sup>15</sup>. Ενδεχομένως να υπάρχει και κολλαγόνο τύπου VIII. Ποσά λαμνίνης και φμπρονεκτίνης έχουν επίσης ανευρεθεί<sup>16</sup>.

- **Ενδοθήλιο:** Την επένδυση της δεσκαμέτειος μεμβράνης αποτελεί μια μονήρης κυτταρική στιβάδα γνωστή ως ενδοθήλιο. Στους ανθρώπους, το ενδοθήλιο έχει εξαιρετικά περιορισμένη, αν όχι ανύπαρκτη, αναπαραγωγική ικανότητα. Γι'αυτό λοιπόν, καθώς τα κύτταρα χάνονται εξαιτίας του γήρατος ή κάποιου τραύματος, τα υπόλοιπα αυξάνονται σε μέγεθος και απλώνονται για να διατηρήσουν τον φραγμό. Τα εξαγωνικά ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να εξυπηρετούν δύο κύριες λειτουργίες. Η πρώτη περιλαμβάνει συνεχή άντληση υγρών και ιόντων από το στρώμα προς το υδατοειδές υγρό, για την αφυδάτωση και κατά συνέπεια τη διαφάνεια του κερατοειδούς. Η δεύτερη είναι η δράση του ενδοθηλίου ως φραγμού, για τον έλεγχο της εισόδου υγρών και διαλυμένων ουσιών από το υδατοειδές. Παρόλο που μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων υπάρχουν ισχυρές συνδέσεις, αυτές δε φαίνεται να αποτρέπουν την είσοδο ιόντων και διαφόρων μικρομοριακών ουσιών. Το ενδοθήλιο, επομένως, πιστεύεται ότι αποτελεί έναν ατελή φραγμό, όπου η αντλία λειτουργεί αντιροπιστικά για τη διατήρηση της κυτταρικής διαφάνειας<sup>15</sup>.

## 2 Κρυσταλλοειδής φακός

Ο κύριος ρόλος του κρυσταλλοειδούς φακού είναι η εστίαση της εικόνας στον αμφιβληστροειδή. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, είναι απαραίτητη η διατήρηση της διαφάνειάς του, η οποία εξαρτάται από το σωστό μεταβολισμό του. Ο κρυσταλλοειδής φακός αποτελείται από 66% νερό και 33% πρωτεΐνες. Ο εξωκυτταρικός χώρος είναι ελάχιστος και τα κύτταρα είναι τοποθετημένα πολύ κοντά το ένα στο άλλο. Δεν περιέχει αγγεία και νεύρα. Το κέντρο της πρόσθιας επιφάνειας είναι ο πρόσθιος πόλος, το κέντρο της οπίσθιας επιφάνειας ο οπίσθιος πόλος και η κυκλωτερής περιφέρεια σε ίση απόσταση από τους δύο πόλους είναι ο ισημερινός. Ο κρυσταλλοειδής φακός αναρτάται από το ακτινωτό σώμα με λεπτές ίνες της ζιννείου ζώνης, οι οποίες αποτελούνται από ελαστικοειδείς ίνες και παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της προσαρμογής. Ο κρυσταλλοειδής φακός αυξάνει κατά το προσθιοπίσθιο πάχος του κατά 0,2mm περίπου κάθε χρόνο. Η διοπτρική ισχύς του είναι περίπου 20 διοπτρίες (20D), ενώ η ακτίνα καμπυλότητας της πρόσθιας επιφάνειας είναι 8-14mm και της οπίσθιας 4,5-7,4mm. Ο μέσος δείκτης διάθλασης είναι 1,420 και αυξάνει με την ηλικία. Ο κρυσταλλοειδής φακός αποτελείται από την κάψα (περιφάκιο), το επιθήλιο, τα κυτταρικά πετάλια (ίνες) και τις πρωτεΐνες.

- **Περιφάκιο:** Η κάψα του κρυσταλλοειδούς φακού αποτελεί ακυτταρικό, ελαστικό και διαφανή φάκελο που περιέχει το επιθήλιο και τις ίνες-πετάλια του φακού

κι αποτελεί την παχύτερη βασική μεμβράνη του σώματος. Συντίθεται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV και 10% GAGs (κυρίως θεική ηπαράνη, θεική δερματάνη και θεική χονδροϊτίνη. Εκκρίνεται στο πρόσθιο μέρος από τη βασική μοίρα των κυττάρων του επιθηλίου, ενώ στο οπίσθιο από τη βασική μοίρα των επιμηκυμένων πεταλίων-ινών. Η κάψα είναι παχύτερη στον πρόσθιο παρά στον οπίσθιο πόλο και ακόμα πιο παχιά στον ισημερινό. Κατά πρώτο λόγο το περιφάκιο ανάλογα με την τάση ή τη χαλάρωση της ζιννείου ζώνης καθορίζει το σχήμα και την κυρτότητα του κρυσταλλοειδούς φακού, παίζοντας με τον τρόπο αυτό πρωτεύοντα ρόλο στη λειτουργία της προσαρμογής. Κατά δεύτερο ρόλο η κάψα αποτελεί εκλεκτικό φραγμό εμποδίζοντας τη διόδου ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, ενώ επιτρέπει τη διέλευση μικρομοριακών ουσιών.

- **Επιθήλιο:** Είναι μονόστιβο κυβοειδές και βρίσκεται αμέσως κάτω από την πρόσθια κάψα. Δεν υπάρχουν επιθηλιακά κύτταρα κάτω από την οπίσθια κάψα. Όλα τα κύτταρα του επιθηλίου έχουν πυρήνα και το κυτταρόπλασμά τους περιέχει πολλαπλά οργανύλια (μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi). Από λειτουργικής άποψης, το πρόσθιο επιθήλιο του κρυσταλλοειδούς φακού χωρίζεται σε δύο περιοχές: στο επιθήλιο που βρίσκεται στο πρόσθιο μέρος του ισημερινού, του οποίου τα κύτταρα εμφανίζουν μιτώσεις και σχηματίζουν τις νέες κυτταρικές ίνες του φακού και στο επιθήλιο της κεντρικής ζώνης, όπου τα κύτταρα δε διαιρούνται, αλλά είναι υπεύθυνα για τη διακίνηση μεταβολικών και ιόντων.

- **Κυτταρικά πετάλια-ίνες:** Τα παραγόμενα από το επιθήλιο του ισημερινού κυτταρικά πετάλια επιμηκύνονται με τρόπο που τα δύο αντίθετα άκρα τους οδεύουν το ένα προς τον πρόσθιο και το άλλο προς τον οπίσθιο πόλο, όπου σχηματίζουν τις ραφές. Η κεντρική μοίρα του κυτταρικού πετάλου παραμένει στον ισημερινό. Ο πυρήνας του κρυσταλλοειδούς φακού των ενηλίκων αποτελείται από πετάλια που σχηματίστηκαν από τη γέννηση μέχρι την σεξουαλική ωρίμανση, ενώ ο φλοιός από πετάλια που σχηματίστηκαν μετά την σεξουαλική ωρίμανση του ατόμου. Καθώς με την πάροδο της ηλικίας τα κυτταρικά πετάλια συμπιέζονται προς το κέντρο από την παραγωγή νεότερων, χάνουν τον πυρήνα και τα κυτταρικά οργανύλια τους και σχηματίζουν με τα γειτονικά κυτταρικές αλληλοεγκλωπώσεις με τις πλάγιες κυτταρικές τους μεμβράνες.

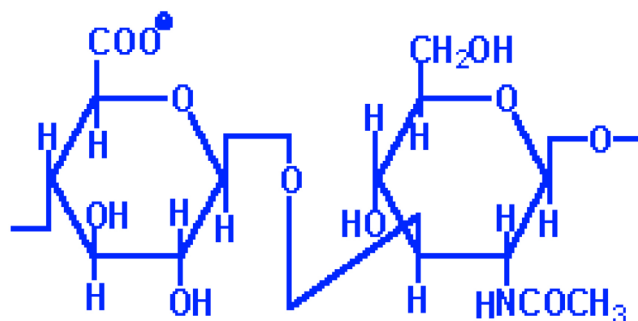
- **Πρωτεΐνες:** Οι πρωτεΐνες του κρυσταλλοειδούς φακού ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, στις μη υδατοδιαλυτές που είναι το 10% και στις υδατοδιαλυτές, που ονομάζονται και κρυσταλλίνες, και αποτελούν το 20%. Η αφθονία των κρυσταλλινών και το γεγονός ότι είναι τοποθετημένες στενά η μία πάνω στην άλλη

καθορίζουν τον δείκτη διάθλασης του φακού και την ικανότητα να εστιάζει την εικόνα στον αμφιβληστροειδή με ελάχιστη παραμόρφωση. Η συγκέντρωση των κρυσταλλινών είναι μικρότερη στο φλοιό (15%) και μεγαλύτερη (70%) στον πυρήνα και με τον τρόπο αυτό καθορίζει τη βαθμιαία μεταβολή του δείκτη διάθλασης του κρυσταλλοειδούς φακού<sup>17</sup>.

## ΜΟΡΙΑ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ - ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΚΑΙ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

### 1. Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι όξινοι, γραμμικοί κι ετερογενείς πολυσακχαρίτες που περιέχουν έναν επαναλαμβανόμενο δισακχαρίτη. Η δισακχαριτική μονάδα αποτελείται από γλυκοζαμίνη ή γαλακτοζαμίνη κι από γλυκουρονικό ή ιδουρονικό οξύ ή γαλακτόζη (Εικόνα 1). Η γλυκοζαμίνη είναι N-ακετυλιωμένη (N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη) ή N-θειωμένη (N-θειική-γλυκοζαμίνη), ενώ η γαλακτοζαμίνη είναι πάντα N-ακετυλιωμένη (N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη)<sup>18</sup>.



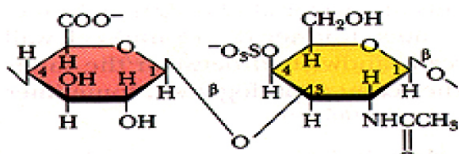
Γλυκουρονικό/ιδουρονικό οξύ

N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη/γαλακτοζαμίνη

Εικόνα 1. Δομή του επαναλαμβανόμενου δισακχαρίτη των GAGs<sup>18</sup>.

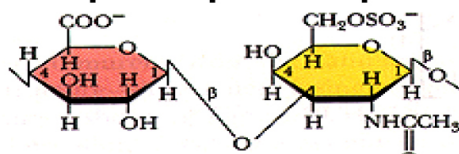
Οι GAGs ποικίλλουν ως προς το μήκος και τη σύστασή τους κι ανάλογα με τους δισακχαρίτες που περιέχουν διακρίνονται σε τέσσερις ξεχωριστές δομικά κατηγορίες: θεικές χονδροϊτίνες/θεική δερματάνη, ηπαρίνη/θεική ηπαράνη, θεική κερατάνη και υαλου-

### Χονδροϊτίνη-4-θειική



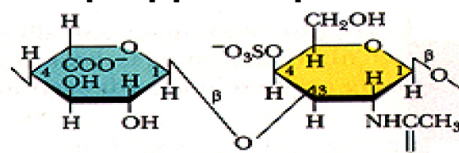
D-γλυκουρονικό οξύ N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη  
-4-θειική

### Χονδροϊτίνη-6-θειική



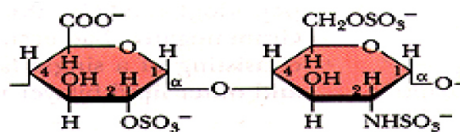
D-γλυκουρονικό οξύ N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη  
-6-θειική

### Θειική δερματάνη



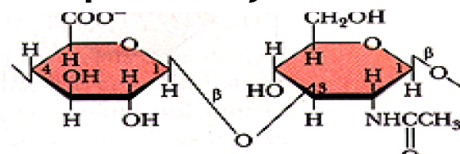
D-ιδουρονικό οξύ N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη  
-4-θειική

### Ηπαρίνη



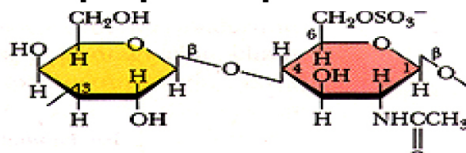
D-γλυκουρονικό-2-θειικό N-σουλφο-D-γλουκοζαμίνη  
-6-θειική

### Υαλουρονικό οξύ



D-γλυκουρονικό οξύ N-ακετυλο-D-γλουκοζαμίνη

### Θειική κερατάνη

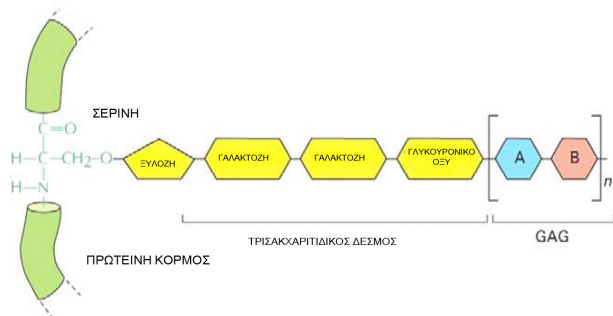


D-γαλακτόζη N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη  
-6-θειική

Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των επαναλαμβανόμενων δισακχαριδικών μονάδων που συνιστούν τις διαφορετικές κατηγορίες GAGs<sup>19</sup>.

ρονικό οξύ (Εικόνα 2)<sup>19</sup>.

Η πλειονότητα των GAGs, με εξαίρεση το υαλουρονικό οξύ, βρίσκεται συνδεδεμένη με μία πρωτεΐνη-πυρήνα σχηματίζοντας τις πρωτεογλυκάνες (PGs)<sup>20</sup> (Εικόνα 3).



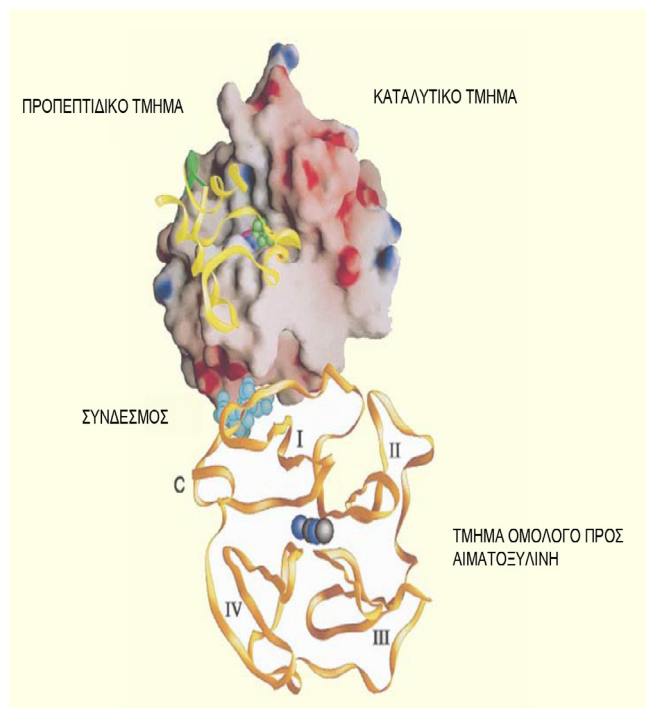
Εικόνα 3. Σχηματικό μοντέλο της σύνδεσης GAG και πρωτεΐνης κορμού. Διακρίνεται ο τρισακχαριτιδικός ειδικός δεσμός<sup>21</sup>.

Οι GAGs είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια με εκτεταμένη διαμόρφωση που προσδίδει υψηλό ιξώδες στο διάλυμα. Οι GAGs βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων ή μέσα στον εξωκυτταρικό χώρο. Το υψηλό ιξώδες των GAGs συνεπάγεται και χαμηλή συμπιεστικότητα, γεγονός που καθιστά τα μόρια αυτά ιδανικά λιπαντικά μέσα στις αρθρώσεις. Συγχρόνως η ακαμψία τους παρέχει δομική συνοχή και ακεραιότητα στα κύτταρα καθώς επίσης και οδούς επικοινωνίας ανάμεσα σε αυτά επιτρέποντας τη μετανάστευσή τους. Οι βιολογικές λειτουργίες των GAGs και των PGs κυμαίνονται από σχετικά απλές μηχανικές υποστηρικτικές λειτουργίες μέχρι περίπλοκες επιδράσεις σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η κυτταρική ένωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Οι επιδράσεις αυτές οφείλονται στην ικανότητα των PGs να δρουν ως υποδοχείς διαφόρων ουσιών, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και μια ποικιλία ενζύμων περιλαμβανομένων διαφόρων πρωτεασών και ενζύμων συγκόλλησης<sup>22,23</sup>.

Η διάταξη των κολλαγόνων ινιδίων και των GAGs στο στρώμα του κερατοειδούς είναι σημαντικά στη διατήρηση της διαύγειας του<sup>24</sup>. Σε κερατοειδείς με οίδημα του στρώματος έχει παρατηρηθεί απώλεια GAGs<sup>25</sup>, ενώ σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκαν ελαττωμένα ποσά θεικής ηπαράνης, θεικής χονδροϊτίνης και θεικής δερματάνης στο περιβάλλιο καταρρακτικών φακών<sup>26</sup>.

## 2. Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs)

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του εξωκυττάριου στρώματος (Matrix Metalloproteinases, Matrilysins, MMPs)<sup>27</sup> συγγροτούν μια οικογένεια εδοπεπτιδασών που προκαλούν διάσπαση των μορίων του εξωκυττάριου χώρου. Οι MMPs αποτελούν μια οικογένεια δομικά και λειτουργικά παρόμοιων ενδοπεπτιδασών, εξαρτώμενων από την ύπαρξη ψευδαργύρου (Εικόνα 4)<sup>28</sup>.



Εικόνα 4. Τρισδιάστατο μοντέλο της γενικής δομής των προ-MMPs. Απεικονίζονται τα τρία κύρια δομικά τμήματα καθώς και οι 4 λεπιδωτές β-δομές του C-τελικού τμήματος που έχει ομολογία προς την αιματοξυλίνη (I, II, III, IV)<sup>28</sup>.

Υπάρχουν αρκετές αποδείξεις ότι οι MMPs παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των ιστών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, συμπεριλαμβανόμενων της αναπτυξιακής ιστικής μορφογένεσης, της ιστικής επανόρθωσης και της αγγειογένεσης. Επιπλέον, οι

MMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην καταστροφή της αρχιτεκτονικής των ιστών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στην οστεοαρθρίτιδα, στις αυτοάνοσες φυμαλιδώδεις δερματικές διαταραχές, στη φωτογήρανση του δέρματος και στις μεταστάσεις όγκων<sup>29,30,31</sup>. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν επίσης, ότι οι MMPs διασπούν αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, χυμοκίνες και τους υποδοχείς τους και μπορούν με τον τρόπο αυτό να ρυθμίζουν την απάντηση των κυττάρων σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες, καθώς και την φλεγμονώδη αντίδραση<sup>31</sup>.

Οι MMPs φαίνεται ότι εμπλέκονται και στην παθολογία σειράς αλλοιώσεων στον οφθαλμό, όπως στην νεοαγγείωση αμφιβληστροειδούς, χοριοειδούς και κερατοειδούς<sup>32</sup>, στη μορφολογία του γωνιακού δικτυωτού (trabeculum) και στο γλαύκωμα<sup>33</sup>, στις εκφυλιστικές παθήσεις του βυθού, όπως στη δυστροφία Sorsby<sup>34</sup>, στις μεταστάσεις όγκων και στην επούλωση τραυμάτων<sup>35</sup>, καθώς επίσης και στις ραγοειδίτιδες<sup>36</sup>.

Στις MMPs περιλαμβάνονται 25 ένζυμα που κατηγοριοποιούνται σε: ζελατινάσες (MMP-2 και -9), κολλαγενάσες (MMP-1,-8,-13), στρωματολυσίνες (MMP-3,-10,-11), ματριλυσίνη (MMP-7), ελαστάση μακροφάγων (MMP-12), εναμελυσίνη (MMP-20), ενδομετάση (MMP-26), μεμβρανικές (membrane type MMP- 14,-15,-16,-17,-24,-25) και αυτές που δεν έχουν κατηγοριοποιηθεί<sup>37,38</sup>.

Η δραστηριότητα των MMPs ρυθμίζεται πρώτον, με προαγωγή ή αναστολή της γονιδιακής έκφρασης του προενζύμου - μορφή με την οποία παράγονται από τα κύτταρα -, δεύτερον, με προαγωγή ή αναστολή της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης - μετατροπής του προενζύμου σε ένζυμο και τρίτον, με αναστολή της δράσης των ενζύμων από τους ιστικούς αναστολείς των ενζύμων αυτών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases - TIMPs), οι οποίοι απενεργοποιούν τα εν λόγω ένζυμα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ιστικοί αναστολείς των MMPs (TIMP-1,-2,-3,-4) ειδικοί για ορισμένες MMPs<sup>37,38</sup>.

Οι MMPs διαδραματίζουν, επομένως, πρωτεύοντα ρόλο στη διαδικασία αποδόμησης -αναδόμησης των ιστών και στην αναδιαμόρφωσή τους μέσω της διάσπασης των συστατικών της μεσοκυττάριας ουσίας<sup>39</sup> η ομοιοστάση της οποίας εξαρτάται μεταξύ άλλων και από την ισορροπία μεταξύ MMPs και TIMPs<sup>40</sup>.

Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στις ζελατινάσες, την ζελατινάση A (MMP-2) και τη ζελατινάση B (MMP-9), μιας εκ των κύριων ομάδων των MMPs. Η MMP-2 (ζελατινάση ουδετεροφίλων, 72-kDa ζελατινάση) έχει ως υπόστρωμα κολλαγόνο τύπου I,IV,V,VII,X,XI, XIV, ζελατίνη, ελαστίνη, φμπρονεκτίνη, λαμνίνη-1, λαμνίνη-5, ιντερλευκίνη-1β, MMP-1, MMP-9 και MMP-13. Η



MMP-9 (92-kDa ζελατινάση) έχει ως υπόστρωμα κολλαγόνο τύπου IV, V, VII, X, XIV, ζελατίνη, φιμπρονεκτίνη, εντακτίνη, ελαστίνη, α1-αντιτριψίνη, ιντερλευκίνη-1β, πλασμινογόνο<sup>41</sup>. Στον κερατοειδή, είναι τα κύρια ένζυμα διάσπασης του εξωκυτταρίου στρώματος και παράγονται από το κερατικό επιθήλιο και από τους ινοβλάστες του στρώματος<sup>42,43</sup>. Συμμετέχουν στην επαναδιαμόρφωση του εξωκυτταρίου στρώματος μετά από τραυματισμό της κερατικής επιφάνειας κι έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της άσηπτης κερατικής εξέλκωσης<sup>44</sup> και του ξηρού οφθαλμού<sup>45</sup>. Έχει διαπιστωθεί, επίσης, ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1β (Interleukin-1β) και TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) αυξάνουν την MMP-9 σε επίπεδο mRNA, πρωτεΐνης και ενζυματικής δραστηριότητας σε ανθρώπινα κερατικά επιθηλιακά κύτταρα<sup>46</sup>, όπως κι ότι ο ενοφθαλμισμός φακών με MMP-9 οδηγεί άμεσα σε καταρράκτη μέσω της διάσπασης της βήτα B1- κρυσταλλίνης<sup>47</sup>. Αυξημένη δραστηριότητα της MMP-2 και MMP-9 έχει βρεθεί ότι μπορεί να σχετίζεται με καταρρακτογένεση<sup>48</sup> και θόλωση του οπισθίου περιφακίου μετά από επέμβαση καταρράκτη<sup>48,49</sup>. Σε ασθενείς, επίσης, με υποτροπιάζουσες αποπλώσεις του κερατικού τους επιθηλίου έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση της MMP-2 στα επιθηλιακά τους κύτταρα<sup>50</sup>. Σε κερατοειδείς κυνών με χρόνια επιφανειακή κερατίτιδα διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της MMP-2 και MMP-9 σε σχέση με φυσιολογικούς κερατοειδείς, ενώ συγχρόνως η έκθεση σε UV φυσιολογικών κερατοειδών κυνών προκάλεσε ομοίως μια χρονο- και δοσοεξαρτώμενη αύξηση της εκφράσεως των MMP-2 και MMP-9, σχετίζοντας με τον τρόπο αυτό την έκθεση σε UV ακτινοβολία με πρόκληση χρόνιας επιφανειακής κερατίτιδας<sup>51</sup>.

Οι κολλαγενάσες αποτελούν τη δεύτερη μεγάλη κατηγορία των MMPs. Περιλαμβάνουν την κολλαγενάση-1 (MMP-1) και την κολλαγενάση-2 (MMP-8, κολλαγενάση ουδετεροφίλων) και την κολλαγενάση-3

(MMP-13). Όλες αποδομούν το κολλαγόνο τύπου I, II, III και συγχρόνως αποτελούν υπόστρωμα διαφόρων άλλων MMPs, όπως οι ζελατινάσες<sup>52</sup>. Η MMP-13 διασπά, επίσης, το κολλαγόνο τύπου IV, X, και XIV, τη φιμπρονεκτίνη, τη τεναςκίνη C, τον πρωτεϊνικό πυρήνα της αγκρεκάνης (aggrecan core protein) και παρουσιάζει δραστηριότητα ζελατινάσης τουλάχιστον σαράντα φορές περισσότερο από τις MMP-1 και MMP-8<sup>53</sup>.

Οι στρωμελυσίνες περιλαμβάνουν τη στρωμελυσίνη-1 (MMP-3) και τη στρωμελυσίνη-2 (MMP-10), οι οποίες αποδομούν τον πρωτεϊνικό πυρήνα των πρωτεογλυκανών, τη λαμινίνη, την φιμπρονεκτίνη, την ελαστίνη, τη ζελατίνη και τα κολλαγόνα τύπου III, IV, V, VII και IX, ενώ η στρωμελυσίνη-3 (MMP-11) είναι ασυνήθιστη και δε διασπά κάποιο από τα κύρια συστατικά του εξωκυτταρίου στρώματος<sup>54,55</sup>.

Οι κολλαγενάσες και οι στρωμελυσίνες έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στην επέκταση όγκων, στη νεοαγγείωση, στην επούλωση τραυμάτων και σε διάφορες φλεγμονώδεις νόσους. Έχει ανιχνευθεί mRNA της MMP-13 σε επιθηλιακά κύτταρα τραυματισμένων κερατοειδών ποτικών, αλλά όχι σε φυσιολογικούς κερατοειδείς μαρτύρων<sup>56</sup>. Υπάρχει, επίσης, αύξηση της έκφρασης της MMP-10 σε κερατικό επιθήλιο διαβητικών ανθρώπων, όπως και έκλυση των MMP-1 και -3 στην κεφαλή του πτερυγίου<sup>57</sup>. Τέλος, μια έρευνα μελέτησε την έκλυση των κολλαγενάσων (MMP-1,-8, και -13) και των στρωμελυσινών (MMP-3,-10,-11) από ανθρώπινα κερατικά επιθηλιακά κύτταρα μετά από χορήγηση IL-1β και TNF-α). Η ημιποσοτική πραγματικού χρόνου PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) και η μέθοδος υβριδισμού κατά Northern (Northern hybridization) αποκάλυψαν δοσοεξαρτώμενη αύξηση των mRNAs των MMP-1,-13,-3,-10 και -11 από τη IL-1β και τον TNF-α, ενώ η MMP-8 δεν παρουσίασε μεταβολές<sup>58</sup>.

Στον πίνακα 1 αναφέρονται συνοπτικά οι γνωστές MMPs και τα υποστρώματά τους.

Πίνακας 1. MMPs των θηλαστικών και υποστρώματα

Πρωτεάση	Αρίθμηση MMP	Υπόστρωμα Εξωκυτταρίου χώρου	Ενεργοποίηση pro-MMP
Κολλαγονάσες Κολλαγονάση-1	<b>MMP-1</b>	Κολλαγόνο τύπου: III > I > II, VII, X, ζελατίνη, αγκρεκάνη, εντακτίνη, τεναςκίνη, περλεκάνη	pro-MMP-1 pro-MMP-2
Κολλαγονάση-2	<b>MMP-8</b>	Κολλαγόνο τύπου: I > II > III, VII, X, ζελατίνη, αγκρεκάνη, τεναςκίνη	pro-MMP-8
Κολλαγονάση-3	<b>MMP-13</b>	Κολλαγόνο τύπου: II > III > I, VII, X, ζελατίνη, αγκρεκάνη, εντακτίνη, τεναςκίνη	pro-MMP-9 pro-MMP-13

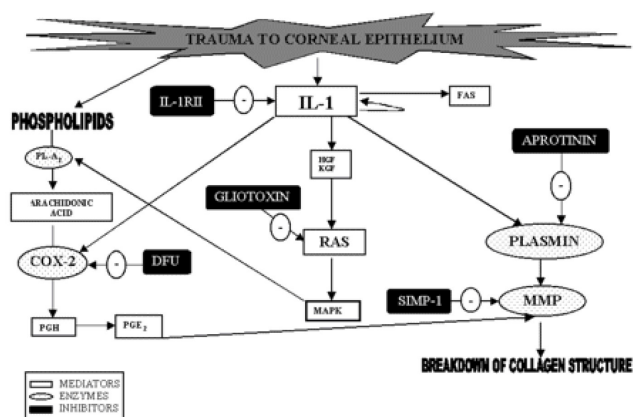
Πρωτεάση	Αρίθμηση MMP	Υπόστρωμα Εξωκυττάριου χώρου	Ενεργοποίηση pro-MMP
<b>Ζελατινάσες</b> Ζελατινάση Α	<b>MMP-2</b>	Αποδομημένο κολλαγόνο (ζελατίνη), κολλαγόνο τύπου: I, IV, V, VII, X, XI, ελαστίνη, ινονεκτίνη, λαμινίνη-5, αγκρεκάνη, μπρεβικάνη, νευροκάνη, ντεκορίνη, υαλοσυνδετίνη	pro-MMP-1 pro-MMP-2 pro-MMP-13
Ζελατινάση Β	<b>MMP-9</b>	Αποδομημένο κολλαγόνο (ζελατίνη), κολλαγόνο τύπου: I, IV, V, VII, X, XI, ελαστίνη, ινονεκτίνη, λαμινίνη-5, αγκρεκάνη, υαλονεκτίνη	pro-MMP-2 pro-MMP-9 pro-MMP-13
<b>Μεμβρανικού τύπου MMP</b>			
MT1-MMP	<b>MMP-14</b>	Κολλαγόνο τύπου: I, II, III, ζελατίνη, ινονσυνδετίνη, υαλονεκτίνη, αγκρεκάνη	pro-MMP-2 pro-MMP-13
MT2-MMP	<b>MMP-15</b>	PGs	pro-MMP-2
MT3-MMP	<b>MMP-16</b>	Κολλαγόνο τύπου: III, ινονσυνδετίνη	pro-MMP-2
MT4-MMP	<b>MMP-17</b>	Ζελατίνη, ινώδες / ινωδογόνο	pro-MMP-2
MT5-MMP	<b>MMP-24</b>	PGs, ζελατίνη	Pro-MMP-2
MT6-MMP, Λευκολυσίνη	<b>MMP-25</b>	Κολλαγόνο τύπου IV, ζελατίνη, PGs θεικής δερματάνης και κερατάνης, λαμινίνη-1, ινώδες / ινωδογόνο	pro-MMP-2 pro-MMP-9
<b>Στρωμαλυσίνες</b>			
Στρωμαλυσίνη-1	<b>MMP-3</b>	Αγκρεκάνη, λαμινίνη, λαμινίνη, περιοχές χωρίς τριπλή έλικα φυσιολογικών κολλαγόνων τύπου: II, III, IV, V, IX, X, XI, ζελατίνη, εντακτίνη, περλεκάνη, ντεκορίνη, τεναςκίνη, υαλονεκτίνη, ινώδες / ινωδογόνο, ελαστίνη	pro-MMP-1 pro-MMP-3 pro-MMP-7 pro-MMP-8 pro-MMP-9 pro-MMP-13
Στρωμαλυσίνη-2	<b>MMP-10</b>	Ζελατίνη, κολλαγόνο τύπου: I, III IV, V, PGs	pro-MMP-1 pro-MMP-8 pro-MMP-10
Στρωμαλυσίνη-3	<b>MMP-11</b>	λαμινίνη, αγκρεκάνη	
Ματριλυσίνη	<b>MMP-7</b>	λαμινίνη, περιοχές χωρίς τριπλή έλικα φυσιολογικών κολλαγόνων τύπου: IV, V, IX, X, XI, ζελατίνη, αγκρεκάνη, εντακτίνη, τεναςκίνη, υαλονεκτίνη, ινώδες / ινωδογόνο	pro-MMP-1 pro-MMP-2 pro-MMP-7 pro-MMP-9
Ματριλυσίνη-2	<b>MMP-26</b>	Κολλαγόνο τύπου IV, ζελατίνη, ινώδες / ινωδογόνο	pro-MMP-9
<b>Άλλες MMP</b>			
Μεταλλοελαστάση	<b>MMP-12</b>	Ελαστίνη, λαμινίνη, PGs, ινώδες / ινωδογόνο	

Πρωτεάση	Αρίθμηση MMP	Υπόστρωμα Εξωκυτταρίου χώρου	Ενεργοποίηση pro-MMP
Στρωμαλυσίνη-4	<b>MMP-19</b>	Κολλαγόνο τύπου IV, ζελατίνη, λαμινίνη, τενασκίνη, εντακτίνη, αγκρεκάνη, ινώδες / ινωδογόνο	
Εναμελυσίνη	<b>MMP-20</b>	Αδαμαντινίνη	
CMMP -ανάλογο ανθρώπου	(ορνίθια) <b>MMP-22a,b/ MMP-27</b>	Δεν έχει διευκρινισθεί	
CA-MMP	<b>MMP-23</b>	Ζελατίνη	
Επιλυσίνη	<b>MMP-28</b>	Δεν έχει διευκρινισθεί	

### 3. Φλεγμονώδεις Μεσολαβητές – Κυκλοοξυγενάση (COX)

Η κυκλοοξυγενάση (cyclooxygenase, COX), γνωστή και ως συνθετάση προσταγλανδινών, είναι ένας φλεγμονώδης μεσολαβητής<sup>59</sup>. Δύο ξεχωριστές μορφές έχουν αναγνωριστεί<sup>60</sup>. Η COX-1 συνδέεται με την παραγωγή προσταγλανδινών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της οργανικής και ιστικής ομοιόστασης<sup>61,62</sup>. Η COX-2, εκλύεται κάτω από την επίδραση διαφόρων προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων<sup>63</sup>. Είναι προφανές ότι η COX-2 είναι υπεύθυνη για την αυξημένη παραγωγή προσταγλανδινών που διαμεσολαβούν στις φλεγμονώδεις διεργασίες, στον πόνο και τον πυρετό, καθώς και το ένζυμο-στόχος διαφόρων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων<sup>64</sup>.

Μελέτη προσπάθησε να διερυνήσει τις βιοχημικές οδούς που εμπλέκονται στην αρχική φάση της φλεγμονώδους αντίδρασης, η οποία προκαλεί οίδημα κερατοειδούς μετά από αφαίρεση κερατικού επιθηλίου κονιγίων<sup>65</sup>. Είναι γνωστό ότι τραύμα στον κερατοειδή προκαλεί μια αλυσίδα φλεγμονωδών επιδράσεων που περιλαμβάνουν απόπτωση κερατοκυττάρων, οίδημα και έναρξη επουλωτικών διεργασιών στο στρώμα<sup>66,67,68,69,70,71,72,73,74</sup>. Οι δράσεις, επίσης, διαφόρων προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως πρωτεασών και ιντερλευκίνων, έχουν αναγνωριστεί μέσα σε κερατικούς ιστούς μετά από τραύμα επιθηλίου<sup>68,69,75,76,77,78,79,80</sup>. Επειδή η φλεγμονώδης αντίδραση περιλαμβάνει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση διαφόρων βιοχημικών μεσολαβητών (Σχήμα 4), η έρευνα επικεντρώθηκε στις επιδράσεις που επιφέρουν οι αναστολείς συγκεκριμένων προφλεγμονωδών μεσολαβητών<sup>65</sup>.



Σχήμα 4. Βιοχημικές οδοί που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διαδικασία<sup>65</sup>.

- Η χρησιμοποίηση του DFU (ειδικός αναστολέας της COX-2), όπως είχε παρατηρηθεί και με την δικλοφενάκη (μη ειδικός αναστολέας της COX) σε προηγούμενη εργασία<sup>81</sup>, εμπόδισε μερικώς το στρωματικό οίδημα μετά από αφαίρεση του επιθηλίου του κερατοειδούς. Επομένως, η COX-2 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες<sup>65</sup>.

- Έχει αποδειχθεί ότι η πλασμίνη αυξάνεται σε τραυματισμένους κερατοειδείς<sup>82</sup>. Εξετάστηκε, λοιπόν, η επίδραση της εφαρμογής ενός αναστολέα της, της απροτινίνης, στο παρατηρούμενο στρωματικό οίδημα. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωσή του, υποδηλώνοντας με τον τρόπο αυτό τη συμμετοχή των πλασμινογόνων στην οξεία κερατική αντίδραση σε τραυματισμό του επιθηλίου<sup>65</sup>.

- Έχει προταθεί ότι μια αιτία στρωματικού οιδήματος αποτελεί η αποδόμηση στοιχείων του εξωκυτταρίου

στρώματος (κολλαγόνου, GAGs) από την ενεργοποίηση φλεγμονωδών μεσολαβητών<sup>67,81</sup>. Οι MMPs είναι γνωστό ότι αποδομούν στοιχεία του εξωκυττάρου χώρου και διάφοροι φλεγμονώδεις παράγοντες συμβάλλουν στην έκλυσή τους, όπως είναι η IL-1 και η πλασμίνη<sup>68,79,80,83</sup>. Η εφαρμογή του SIMP-1 (μη ειδικός συνθετικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών), προκάλεσε μείωση του οίδηματος, φανερώνοντας την έκλυση των MMPs σε τραυματισμό του επιθηλίου<sup>65</sup>.

- Η IL-1, επίσης, ένας διαμεσολαβητής-κλειδί στην φλεγμονώδη αντίδραση, ευθύνεται για την αύξηση της δραστηριότητας διάφορων προφλεγμονωδών ενζύμων, όπως είναι η COX-2 και οι MMPs, καθώς και για τη ρύθμιση των επιπέδων της πλασμίνης<sup>70,71,84</sup>. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν, ότι η εφαρμογή του υδατοδιαλυτού υποδοχέα τύπου II της IL-1 ελάττωσε σημαντικά το οίδημα του στρώματος που σχετίζεται με επιθηλιακό τραύμα<sup>65</sup>.

Η προσθήκη σε καλλιέργειες εμβρυϊκών ηπατοκυττάρων ποντικού προφλεγμονωδών κυτοκινών, λιποπυρροσουλφονίων και αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρου προώθησε την έκφραση της COX-2 και την σύνθεση υψηλών ποσοτήτων προσταγλανδινών. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι ενεργές μορφές των MMP-2 και MMP-9 ελευθερώθηκαν στον εξωκυττάρου χώρο της καλλιέργειας. Αυτή η διαδικασία όμως αναστάλη όταν η σύνθεση των προσταγλανδινών εμποδίστηκε φαρμακολογικά με COX-2 αναστολείς<sup>85</sup>.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η αύξηση της COX-2 σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου ενεργοποιεί τις MMPs και αυξάνει την πιθανότητα μετάστασης. Σε άλλη μελέτη, ερευνήθηκε η δράση ενός εκλεκτικού αναστολέα της COX-2, του NS398, πάνω στην έκφραση και την ενζυματική δραστηριότητα των MMPs σε καρκινικά κύτταρα από πνεύμονες ασθενών. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι ο NS398 ανέστηλε τη μετάφραση του mRNA της MMP-2, όχι όμως και της MMP-9. Ο NS398, επίσης, μείωσε τα επίπεδα της MMP-2 κι όχι της MMP-9 που ελευθερώθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας. Τέλος, ο NS398 δυσχέρανε την αποικοδομητική δραστηριότητα της MMP-2, όπως φάνηκε με ζυμογραφία ζελατίνης<sup>86</sup>.

Άλλη μελέτη αξιολόγησε τη σημασία της COX-2 δραστηριότητας στην έκλυση του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (urokinase plasminogen activator-uPA) και των MMP-1, MMP-9 στον κερatoειδή μετά από χορήγηση παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι κατά τη διάρκεια κερατικού τραυματισμού και φλεγμονής, ο PAF αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών διεργασιών, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε επιθηλιακά ελλείματα και τελικά σε εξέλκωση. Ένας σημαντικός στόχος για τη θεραπεία

αυτών των ελλειμάτων είναι η ρύθμιση της δραστηριότητας ενζύμων που καταστρέφουν το εξωκυττάρου στρώμα. Η έκλυση της COX-2 ύστερα από τη χορήγηση του PAF και την επακόλουθη απελευθέρωση εικοσανοειδών, ενδεχομένως να διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην έκλυση του uPA, της MMP-1 και της MMP-9. Ειδική, επομένως, αναστολή της COX-2 θα μπορούσε να αποτρέψει αυτές τις επιδράσεις<sup>87</sup>.

Η επίδραση της COX-2 αναστολής, εκτός από τις MMP, έχει μελετηθεί σε σχέση και με το μεταβολισμό των GAGs. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα χονδροκύτταρα από τους χόνδρους με τη μεγαλύτερη καταπόνηση από το βάρος των οπίσθιων ποδιών πέντε ώριμων κουνελιών. Καλλιέργειες αυτών επώστηκαν για τρεις μέρες με έξι διαφορετικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs) σε διάφορες συγκεντρώσεις: η θειική δικλοφενάκη και η ινδομεθακίνη (0,4-50 μg/ml), η πιροξικάμη, η ναπροξένη και η ιμπουπροφένη (4-100 μg/ml) και το σαλικυλικό οξύ (8-1000 μg/ml). Όλα τα NSAIDs ανέστηλαν σημαντικά την συνολική ενσωμάτωση του 35S στις GAGs τόσο στο στρώμα όσο και στο μέσο της καλλιέργειας σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις κανένα από τα NSAIDs δεν επηρέασε σημαντικά το μεταβολισμό των χονδροκυττάρων αναφορικά με τις GAGs. Η επίδραση των NSAIDs στο μεταβολισμό της θειικής κερατίνης ήταν ποικίλη<sup>88</sup>.

Σε μια άλλη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση της θειικής δικλοφενάκης στο μεταβολισμό των GAGs σε κουνέλια κατά τη διάρκεια ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας στο γόνατο, εξαιτίας ακινητοποίησής των. Καθορίστηκαν οι περιεκτικότητες σε εξοζαμίνας, σε ουρονικά οξέα και η ραδιενέργεια από την ενσωμάτωση του 35S σε απομονωμένες GAGs. Θειική δικλοφενάκη δόθηκε σε έξι ακινητοποιημένα κουνέλια για δεκαεπτά μέρες σε δόση των 1,5mg/kg μέσω ενός γαστρικού σωλήνα. Οι ομάδες ελέγχου αποτελούνταν από οκτώ ακινητοποιημένα κουνέλια χωρίς αγωγή και από εικοσιένα μη ακινητοποιημένα κουνέλια, έξι από τα οποία έλαβαν θειική δικλοφενάκη για διάστημα δεκαεπτά ημερών. Η θειική δικλοφενάκη δεν ανέστηλε in vivo το μεταβολισμό των θειικών GAGs, σύμφωνα με τις μετρήσεις της ενσωμάτωσης του 35S σε αυτές. Τα υγιή κουνέλια στα οποία δόθηκε θειική δικλοφενάκη εμφάνισαν μόνο οριακές αλλαγές στην περιεκτικότητα των GAGs στις αρθρώσεις. Η θειική δικλοφενάκη δεν απέτρεψε την απώλεια των GAGs από τους χόνδρους στα ακινητοποιημένα γόνατα, ενώ προκάλεσε περαιτέρω απώλεια της θειικής χονδροϊτίνης, συνοδευόμενη από αύξηση του υαλουρονικού οξέος στους ιστούς. Τέλος, η θειική δικλοφενάκη εμπόδισε τη συσσώρευση των GAGs, η οποία συμβαίνει φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας σε

περιοχές όπως είναι τα σημεία έκφυσης και κατάφυσης των πλαγίων συνδέσμων<sup>89</sup>.

Ερευνήθηκε, τέλος, η *in vitro* επίδραση της σελεκοξίμπης (celecoxib), ενός εκλεκτικού αναστολέα της COX-2, στο εξωκυττάριο στρώμα χόνδρου κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές (φλεγμονώδεις) συνθήκες. Καλλιεργήθηκε υγιής ανθρώπινος ιστός αρθρικού χόνδρου μόνος του, όπως και ιστός που καλλιεργήθηκε μαζί με περιφερικά μονοκύτταρα κύτταρα αίματος από τη μία και IL-1β και TNF-α από την άλλη. Όλοι οι ιστοί καλλιεργήθηκαν για επτά ημέρες παρουσία σελεκοξίμπης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σελεκοξίμπη δεν έχει άμεση επίδραση στον υγιή χόνδρο. Η προσθήκη μονοκύτταρων και IL-1β με TNF-α προκάλεσαν ισχυρή αναστολή της σύνθεσης πρωτεογλυκάνων από το χόνδρο και σημαντική απελευθέρωσή τους, ελαττώνοντας με τον τρόπο αυτό το περιεχόμενο του χόνδρου σε πρωτεογλυκάνες. Η σελεκοξίμπη μπόρεσε κι ανέστρεψε τις δυσμενείς αυτές επιπτώσεις σε επίπεδα σχεδόν φυσιολογικά. Εκ των αποτελεσμάτων συνάγεται ότι κάτω από την επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων η COX-2 αυξάνεται και προκαλεί διαταραχή της σύνθεσης του στρώματος του αρθρικού χόνδρου. Η σελεκοξίμπη, ελαττώνοντας τη δραστηριότητα της COX-2 αποτρέπει τις επιδράσεις αυτές, χωρίς όμως να έχει απευθείας δράση πάνω στον φυσιολογικό χόνδρο<sup>90</sup>.

Οι αλλαγές στον μεταβολισμό των MMPs και των GAGs σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις διαδραματίζουν, όπως αναφέρθηκε, σημαντικό ρόλο στην πρόκληση των βλαβών. Η IR, επίσης, φαίνεται ότι ασκεί τις βλαπτικές της επιδράσεις επηρεάζοντας τα μόρια αυτά του εξωκυτταρίου χώρου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επομένως η προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης των επιδράσεων της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε μόρια του εξωκυτταρίου χώρου με και χωρίς τη χορήγηση NSAIDs, προκειμένου πρώτον να κατανοήσουμε καλύτερα τις συνέπειες και τις ποιοτικές μεταβολές που προκαλεί στους διαφόρους ιστούς - και εν προκειμένω στον οφθαλμό - η έκθεση στην υπέρυθρη ακτινοβολία, αλλά και δεύτερον να ανιχνεύσουμε τρόπους αντιμετώπισης των βλαπτικών αυτών επιδράσεων. Σε πειραματικό επίπεδο λοιπόν, η μελέτη της επίδρασης της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε παράγοντες του εξωκυτταρίου χώρου του κερατοειδούς και του κρυσταλλοειδούς φακού οφθαλμών κονιζών, με και χωρίς τη χρήση των NSAIDs, αποτελεί πεδίο για περαιτέρω έρευνα.

## ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΩΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Κατά το παρελθόν πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να αποσαφηνίσουν τις επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας σε μόρια του εξωκυτταρίου χώρου σε διάφορους ιστούς και κατ'επέκταση τους μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών.

Κύτταρα πτερυγίου, επιπεφυκώτος και επιθηλιακά κύτταρα του σκληροκερατοειδούς ορίου ανακαλλιεργήθηκαν και εκτέθηκαν σε διάφορες ποσότητες UVB ακτινοβολίας. Το μέσο συντήρησης και το RNA συλλέχθηκαν για ανάλυση με ζυμογραφία, με Western blot ανάλυση, ELISA και RT-PCR. Επίσης ολόκληρα δείγματα πτερυγίου ακτινοβολήθηκαν για να υπολογιστούν τα εκκρινόμενα επίπεδα της MMP-1. Η ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις αποκάλυψαν αυξημένη έκκριση της MMP-1 που συμφωνούσε επακριβώς με αυτή σε r63- θετικά επιθηλιακά κύτταρα. Σε αντίθεση, σημαντικά λιγότερη δραστηριότητα της MMP-1 βρέθηκε σε φυσιολογικό επιπεφυκώτα, σκληροκερατοειδές όριο και κερατοειδή. Μια εξαρτώμενη από τη δόση και το χρόνο αύξηση της MMP-1 παρατηρήθηκε όταν επιθηλιακά κύτταρα πτερυγίου εκτέθηκαν σε UVB ακτινοβολία χωρίς σημαντική εναρμόνιση της ανασταλτικής δραστηριότητας. Η MMP-1 δεν επηρεάστηκε σε ακτινοβολημένα κύτταρα επιπεφυκώτα ή σε ινοβλάστες πτερυγίου άλλα αυξήθηκε σε κύτταρα του σκληροκερατοειδούς ορίου. Συλλογικά τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση της συμμετοχής της UV και των MMPs στην ανάπτυξη των πτερυγίων και μπορεί να βοηθήσουν στην ανακάλυψη καινούργιων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την πρόληψη και τη θεραπεία των πτερυγίων<sup>91</sup>.

Άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σκοπό είχε να χαρακτηρίσει την έκφραση των MMPs και των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs) σε φλοιώδη καταρράκτη ανθρώπου, να προσδιορίσει αν υπάρχει συσχέτιση με την εντόπιση του φλοιώδους καταρράκτη και να εκτιμήσει την έκφραση και τη δραστηριότητα των MMPs και TIMPs μετά από έκθεση σε κυτοκίνες και σε UVB ακτινοβολία σε επιθηλιακά κύτταρα κρυσταλλοειδούς φακού ανθρώπου. Εικοσιοκτώ οφθαλμοί ανθρώπων-δοτών με φλοιώδη καταρράκτη και εικοσιέννας φυσιολογικοί φωτογραφήθηκαν. Τριάντα φακοί με φλοιώδη καταρράκτη και έξι φυσιολογικοί αναλύθηκαν ανοσοϊστοχημικά για MMP-1,-2,-3,-9 και TIMP-1,-2 και -3. Δώδεκα φακοί με αρχόμενο καταρράκτη και δώδεκα φυσιολογικοί διαρέθηκαν σε τεταρτημόρια για να υπολογιστεί με ELISA η έκφραση

των MMP-1,-2,-3 και -9 και TIMP-1. Τέλος, επιθηλιακά κύτταρα φακού ανθρώπου εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ακτινοβολήθηκαν με UVB ακτινοβολία με σκοπό να προσδιοριστεί η έκφραση των MMP-1,-2,-3 και -9 και TIMP-1και -2. Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:

Οι ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις αποκάλυψαν συγκεκριμένη εντόπιση της MMP-1 στο επιθήλιο του φακού και σε φακικές ίνες στο φλοιώδη καταρράκτη. Οι φυσιολογικοί φακοί είχαν εξίσου χαμηλή ανοσοαντιδραστικότητα, έκφραση και δραστηριότητα των MMP-1, -2, -3 και -9 και TIMP -1, -2 και -3 σε όλα τα τεταρτημόριά τους. Οι κυτοκίνες, και συγκεκριμένα η IL-1 και ο TNF- $\alpha$ , αύξησαν την έκφραση των MMP-2,-3 και -9, ενώ η UVB ακτινοβολία αύξησε την έκφραση της MMP-1 σε επιθηλιακά κύτταρα φακού ανθρώπου<sup>92</sup>.

Έκθεση του ανθρώπινου σώματος σε UV επάγει την έκφραση των MMPs με επακόλουθο την αποδόμηση του κολλαγόνου και τελικά την διαταραγμένη δομική συνοχή της επιδερμίδας. Ανεπαρκής επιδιόρθωση και επανειλημμένη έκθεση σε UV οδηγεί σε αθροιστική βλάβη του συνδετικού ιστού, που είναι παθοφυσιολογικός παράγοντας κλειδί στη φωτογήρανση<sup>93,94,95,96</sup>. Η περιγραφόμενη ακτινική βλάβη στο ανθρώπινο σώμα πραγματοποιείται μέσω διάφορων κυτταρικών οδών που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων. Τα κύτταρα αντιδρούν στην ακτινοβολία με UV με ενεργοποίηση διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, όπως είναι οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinase- MAPK)<sup>97</sup>. Τρεις διακριτοί MAPK οδοί έχουν μελετηθεί επισταμένως: η οδός της ERK 1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 ή κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια μηνύματα), η οδός της JNK (c-Jun N-terminal Kinase) και αυτή της p-38 κινάσης, οι δύο τελευταίες οδοί γνωστές κι ως ενεργοποιούμενες από το στρες πρωτεϊνικές κινάσες (SAPKs). Η ERK 1/2 οδός ενεργοποιείται κυρίως από μιτογόνα όπως είναι αυξητικοί παράγοντες, ενώ οι SAPKs οδοί από φλεγμονώδεις κυτοκίνες και διάφορα περιβαλλοντολογικά στρες, όπως είναι η UV, η ζέστη και το οσμωτικό σοκ. Οι ενεργοποιημένες MAPKs μεταναστεύουν στον κυτταρικό πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν διάφορους παραγοντές αντιγραφής, οδηγώντας τελικά σε ενεργοποίηση του παραγοντά αντιγραφής AP-1<sup>98,99,100</sup>. Η περιοχή του προαγωγού (promoter region) του γονιδίου της MMP-1 φέρει πολλαπλές θέσεις σύνδεσης με τον AP-1<sup>101,102</sup>, η ενεργοποίηση των οποίων από τη σύνδεση του ενεργού AP-1 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου της MMP-1 ως απάντηση σε UVB<sup>103,104</sup> και UVA<sup>105</sup>.

Σε αντίθεση με την υπεριώδη ακτινοβολία, λίγα είναι γνωστά για τις μοριακές επιδράσεις και τα βιολογικά

αποτελέσματα της υπέρυθρης ακτινοβολίας.

Σε πρόσφατη έρευνα παρατηρήθηκε ότι, σε απάντηση στην IR-A, ινοβλάστες δέρματος ανθρώπου παρουσιάζουν μια χρονο- και δόσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης της MMP-1, ενώ η έκφραση του ενδογενούς αναστολέα της, TIMP-1, δεν παρουσίασε αύξηση. Αυτή η μη εξισορροπούμενη αύξηση της MMP-1 υποδηλώνει την πιθανότητα ότι οι ακτινοβολημένοι με IR-A ινοβλάστες έχουν αυξημένη δραστηριότητα πρωτεολυτικής αποδόμησης δερματικών κολλαγόνων ινών. Στην ίδια έρευνα άρχισαν να αναγνωρίζονται και οι πιθανές κυτταρικές οδοί που υπεισέρχονται στην έκφραση της MMP-1. Παρόμοια με την UVA και UVB, η IR-A προκαλεί ταχεία ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών ERK1/2 και p38. Ενώ η ενεργοποίηση της p38 ελαττώθηκε σημαντικά 15 λεπτά μετά την ακτινοβολία, αυτή της ERK1/2 διατηρήθηκε για πάνω από 120 min. Η αναστολή της ERK1/2 με ειδική φαρμακολογική ουσία εμπόδισε την προκαλούμενη από την IR αύξηση της MMP-1, υποδηλώνοντας ότι η IR-A αυξάνει την έκφραση της MMP-1 μέσω ενεργοποίησης της ERK1/2 οδού. Η ενεργοποιημένη ERK1/2 μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί παράγοντες αντιγραφής (για παράδειγμα τον AP-1), με συνέπεια την αύξηση της MMP-1 σε επίπεδο mRNA πρωτεΐνης<sup>106</sup>.

Άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος ανθρώπου απέδειξε την έκλυση MMP-1 και MMP-3 με την επίδραση της IR, η οποία με τη θερμική ενέργεια που μεταφέρει λειτουργεί ως ένα θερμικό στρες-σοκ. Αναλυτικότερα, οι καλλιέργειες ινοβλαστών υποβλήθηκαν σε θερμοκρασίες 37°C, 43°C και 45°C χρησιμοποιώντας λουτρά με τρεχούμενο νερό και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA 24ώρου των MMP-1 και-3 με ημιποσοτική RT-PCR και επιβεβαιώθηκαν όσον αφορά την MMP-1 με ποσοτική RT-PCR. Παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα επίπεδα mRNA των MMP-1 και-3 στους 43°C και 45°C από ότι στους 37°C. Έπειτα υποβλήθηκαν οι καλλιέργειες των ινοβλαστών στους 37°C, 43°C και 45°C για μισή ώρα και συλλέχθηκε το μέσο συντήρησης της καλλιέργειας 72 ώρες μετά. Τα επίπεδα των MMP-1 και-3 μετρήθηκαν με Western blot ανάλυση χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον των MMP-1 και-3. Όπως αποδείχθηκε τα επίπεδα των MMP-1 και-3 αυξήθηκαν με την επίδραση του θερμικού σοκ<sup>107</sup>.

Εκτός από την παραγωγή MMPs, διαπιστώθηκε και η έκλυση τριών διακριτών πρωτεϊνικών κινασών των ERK, c-JNK και p38 MAPK, εκ των οποίων οι δύο πρώτες παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην έκλυση των MMP-1 και MMP-3. Η ενεργοποίηση των κινασών αυτών προσδιορίστηκε με Western blot ανάλυση χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίον των φωσφορυλιωμέ-

νων μορφών των κινασών αυτών<sup>107</sup>.

Τέλος, ως αποτέλεσμα του θερμικού shock, παρατηρήθηκε αύξηση της σύνθεσης και ελευθέρωσης της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), η οποία, μέσω ενός αυτοκρινούς μηχανισμού μη επαρκώς αποσαφηνισμένου ακόμη, συμβάλλει στην έκλυση των MMP-1 και MMP-3. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η έκφραση της IL-6 ρυθμίζεται από τον παράγοντα αντιγραφής AP-1 καθώς και διάφορους άλλους. Είναι πιθανόν, επομένως, οι ενεργοποιούμενες από το θερμικό σοκ ERK και JNK οδοί, ενδεχομένως μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα αντιγραφής AP-1, να ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση της MMP-1 και MMP-3 ενεργοποιώντας την περιοχή του προαγωγού των γονιδίων της MMP-1 και MMP-3 και/ή έμμεσα μέσω ενεργοποίησης της IL-6, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έκλυση των μεταλλοπρωτεϊνών αυτών<sup>107</sup>.

Άλλη μελέτη εξέτασε αν μία ή επαναλαμβανόμενη (τρεις φορές την εβδομάδα για τέσσερις εβδομάδες) έκθεση σε IR μεταβάλλει την έκφραση του προκολλαγόνου τύπου-1 και της MMP-1. Χρησιμοποιώντας ανοσοαποτύπωση κατά Western και ημιποσοτική RT-PCR, εξετάστηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA του προκολλαγόνου τύπου-1 και της MMP-1 δέρματος γλουτού νέων ανθρώπων: Μια μοναδική δόση IR αύξησε την έκφραση του προκολλαγόνου τύπου-1 εντός διαστήματος 24 ωρών, αλλά δεν μετέβαλε την έκφραση της MMP-1. Από την άλλη, πολλαπλές δόσεις IR ελάττωσαν την έκφραση του προκολλαγόνου τύπου-1 κι αύξησαν αυτήν της MMP-1. Βρέθηκε, επίσης, ότι ο TGF-β ίσως να υπεισέρχεται στη σύνθεση του προκολλαγόνου τύπου-1 σε ακτινοβολημένο με IR ανθρώπινο δέρμα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ρύθμιση της έκφρασης του προκολλαγόνου τύπου-1 και της MMP-1 διαφέρει στην οξεία και την χρόνια έκθεση του δέρματος σε IR. Πιο συγκεκριμένα, ελαττωμένα επίπεδα κολλαγόνου και αυξημένα επίπεδα MMP-1 σε χρόνια ακτινοβολημένο με IR δέρμα μπορεί να σχετίζονται με βλάβη του συνδετικού ιστού. Γι'αυτό λοιπόν εικάζεται ότι η επανειλημμένη έκθεση σε IR να οδηγεί ενδεχομένως σε πρόωρη γήρανση του δέρματος (φωτογήρανση) ανθρώπων in vivo<sup>108</sup>.

## ΣΚΟΠΟΣ - ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της οξείας και της χρόνιας έκθεσης σε IR στις MMPs και τις GAGs στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονικίων. Στην οξεία έκθεση, συγ-

χρόνως, διερευνήθηκε και η επίδραση της αναστολής της κυκλοοξυγενάσης (COX).

### 2. Υλικό

Για τη μελέτη των επιδράσεων της IR σε πειραματικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκαν συνολικά δεκατέσσερις κόνικλοι, δύο ομάδες των τεσσάρων κονικίων στην οξεία και δύο ομάδες των τριών κονικίων στη χρόνια έκθεση. Η αρχική ηλικία των κονικίων ήταν περίπου τριών έως τεσσάρων (3-4) μηνών. Μετά την ολοκλήρωση της χρόνιας και της οξείας έκθεσης και κατόπιν αναισθητοποίησης των πειραματόζων ακολουθήσε η λήψη του κερατοειδούς και του κρυσταλλοειδούς φακού έκαστου και μετέπειτα έγινε ευθανασία των κονικίων. Τα δείγματα ιστών που ελήφθησαν τοποθετήθηκαν σε Eppendorfs κι αυτά στη συνέχεια σε θερμοσφύρα στους -70°C στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζυμογραφία ζελατίνης για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ζελατινασών (MMP-2, MMP-9), καθώς και απομόνωση των γλυκοζαμινογλυκάνων (GAGS) και μέτρηση των ουρονικών οξέων στα δείγματα, τα οποία τελικά ηλεκτροφορήθηκαν σε οξικές κυτταρίνες για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των GAGS.

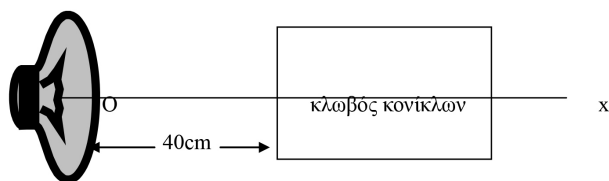
### 3. Μεθοδολογία

#### 3.1 Διάταξη ακτινοβολήσης - Λήψη δειγμάτων.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο χώρο του Εργαστηρίου Πειραματικής Οφθαλμολογίας. Η μέση θερμοκρασία του δωματίου ήταν 22°C με μια διακύμανση ±3°C κατά την διάρκεια των συνεδριών ακτινοβολήσης. Ο φωτισμός του δωματίου ήταν χαμηλός με σχεδόν σταθερή ένταση κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην ασύμφωνη IR ακτινοβολία. Η πειραματική διάταξη που εφαρμόστηκε περιελάμβανε ως πηγή ασύμφωνης υπέρυθρης ακτινοβολίας μια λυχνία με κατανάλωση ενέργειας 150W, μια τυπική δηλαδή λυχνία υπέρυθρης που χρησιμοποιείται για υγειονομικούς σκοπούς, προκαλώντας τοπική δερματική θέρμανση και υπεραίμια, αλλά και με χαρακτηριστικά εκπομπής που προσεγγίζουν σε ικανοποιητικό βαθμό αυτά που εμφανίζει μια πληθώρα άλλων τέτοιων τεχνητών πηγών (π.χ. συσκευές ψησίματος κ.α.) που απαντώνται κατά κύριο λόγο σε διάφορες ειδικές περιπτώσεις επαγγελματικής έκθεσης. Η δέσμη φωτός εξέρχεται της λυχνίας αφού διέλθει διαμέσου ενός φίλτρου απορρόφησης οπτικών ακτινοβολιών μήκους κύματος χαμηλότερων των 600nm, σε μορφή δίσκου κυκλικής εγκάρσιας τομής διαμέτρου 12.1cm. Η φασματική κατανομή της ακτινοβολίας της λυχνίας προσεγγίζει ικανοποιητικά την ακτινοβολία

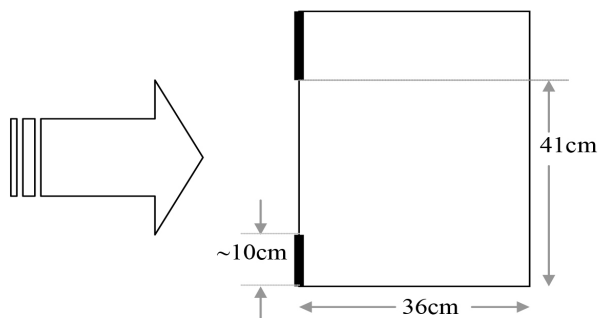
μελανού σώματος με μέγιστο μήκος κύματος γύρω στα 1000nm, όπως διερευνήθηκε πειραματικά με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου (Jobin-Yvon THR). Ένας ανιχνευτής CCD πυριτίου (Charge Coupled Device Si – συσκευή συζευγμένου φορτίου πυριτίου) χρησιμοποιήθηκε για μήκη κύματος μικρότερα των 950nm κι ένας ανιχνευτής CCD InGaAs (συσκευή συζευγμένου φορτίου ινδίου-γάλλιου-αρσενικού) για μήκη κύματος μεγαλύτερα των 1050nm. Η πυκνότητα ροής ακτινοβολίας της λυχνίας, τόσο του ορατού όσο και του υπέρυθρου τμήματός της, εκτιμήθηκε με τη βοήθεια θερμοκού ανιχνευτή (Ophir, DGX) κατά μήκος του άξονα της δέσμης φωτός της λυχνίας σε επιφάνεια κάθετη στον εν λόγω άξονα. Η μέση τιμή αυτής της πυκνότητας ροής για αποστάσεις μεταξύ 40cm και 56cm από τη λυχνία, που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διάταξη που περιγράφεται παρακάτω, εκτιμήθηκε σε 175 mW/cm<sup>2</sup>.

Κατά τη διάρκεια τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας έκθεσης χρησιμοποιήθηκε η ίδια πειραματική διάταξη. Η λυχνία τοποθετήθηκε μπροστά από τον κλωβό των κονίκλων σε μια απόσταση περίπου 40cm (σχήμα 5).



Σχήμα 5: Τοποθέτηση λυχνίας IR σε απόσταση 40cm από τον κλωβό των κονίκλων.

Τόσο η απόσταση λυχνίας- κονίκλων όσο και η γωνία ακτινοβολίας των οφθαλμών των κονίκλων ποίκιλλαν τυχαία, σύμφωνα με τη θέση των κονίκλων εντός του κλωβού (σχήμα 6).



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση της κάτοψης του κλωβού των κονίκλων σε σχέση με την κατεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας.

Λαμβάνοντας υπόψη την ανατομία του κεφαλιού του κονίκλου και τις τυχαίες κινήσεις του κονίκλου μέσα στον κλωβό κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας, που σχετίζονται με την ελάττωση της πυκνότητας ροής της ακτινοβολίας της λυχνίας με την αύξηση της γωνίας πρόσπτωσης, αλλά και αυτής που προσπίπτει κάθετα σε στοιχειώδη επιφάνεια τόσο στον άξονα της λυχνίας σε μεγάλες αποστάσεις από αυτήν, όσο και σε κάποια απόσταση από τον εν λόγω άξονα, όπως επίσης και τη γεωμετρική σκιά που παράγεται από το συρμάτινο πλέγμα με διάμετρο εγκάρσιας τομής του σύρματος 1.6mm, μπορεί να επιχειρηθεί μια πολύ αδρή εκτίμηση της μέσης πυκνότητας ροής της ακτινοβολίας που δέχτηκε ο οφθαλμός του κονίκλου περίπου στα 55mW/cm<sup>2</sup>.

Αναλυτικότερα, για τη χρόνια έκθεση στην υπέρυθρη ακτινοβολία (IR) χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες των τριών κονίκλων η κάθε μία. Η πρώτη αποτέλεσε την ομάδα των μαρτύρων, ενώ η δεύτερη εκτέθηκε σε IR για διάστημα τεσσάρων μηνών. Η ακτινοβολία διαρκούσε τέσσερις ώρες ημερησίως και πραγματοποιούταν κάθε εργάσιμη μέρα εξαιρουμένων των Σαββατοκύριακων. Λαμβάνοντας υπόψη ως μέση τιμή της πυκνότητας ροής ακτινοβολίας στους οφθαλμούς των κονίκλων την τιμή των 55mW/cm<sup>2</sup>, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπολογίζεται μια μέση ημερήσια έκθεση περίπου 800 J/cm<sup>2</sup>.

Όσον αφορά τη μελέτη της οξείας έκθεσης χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες των τεσσάρων κονίκλων η κάθε μία. Η πρώτη ομάδα δεν ακτινοβολήθηκε και αποτέλεσε την ομάδα των μαρτύρων. Τα πειραματόζωα της δεύτερης ομάδας εκτέθηκαν στην IR για δώδεκα ώρες. Παράλληλα στους δεξιούς οφθαλμούς των κονίκλων αμφοτέρων των ομάδων έγινε ενστάλαξη οφθαλμικών σταγόνων θεϊκής δικλοφενάκης 0,1% με σκοπό να προσδιορισθεί ο ρόλος της COX αναστολής με και χωρίς την επίδραση IR, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες τους αριστερούς οφθαλμούς των κονίκλων. Η ενστάλαξη των οφθαλμικών σταγόνων δικλοφενάκης πραγματοποιήθηκε ως εξής: μία ώρα πριν την ακτινοβολία ενστάλαξη μίας σταγόνας ανά τριάντα λεπτά. Στη συνέχεια, κατά την έκθεση, εφαρμογή μιας σταγόνας κάθε τέσσερις ώρες και τέλος, μετά το πέρας της ακτινοβολίας, ανά έξι ώρες για τις επόμενες δώδεκα ώρες. Όπως και στη χρόνια έκθεση, ο μέσος όρος του ποσού της ακτινοβολίας που δέχθηκαν τα πειραματόζωα, τα 55mW/cm<sup>2</sup> δηλαδή, έχει ως αποτέλεσμα μια συνολική ημερήσια έκθεση περίπου στα 2400 J/cm<sup>2</sup>.

Μετά την ολοκλήρωση τόσο της χρόνιας όσο και της οξείας έκθεσης και κατόπιν αναισθητοποίησης των πειραματόζωων με ενδομυϊκή ένεση ξυλαζίνης (3-5mg/kg βάρους σώματος) και κεταμίνης (30-50mg/kg βάρους



σώματος) ακολούθησε η λήψη του κερατοειδούς και του κρυσταλλοειδούς φακού έκαστου και μετέπειτα έγινε ευθανασία των κονιζών με ενδοφλέβια ένεση πεντοθάλης σε υψηλές δόσεις. Τα δείγματα ιστών που ελήφθησαν τοποθετήθηκαν σε Eppendorfs κι αυτά στη συνέχεια σε θερμός που περιείχε υγρό άζωτο κι αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους  $-70^{\circ}\text{C}$  στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

### 3.2 Απομόνωση, καθαρισμός, κλασματοποίηση και ταυτοποίηση των GAGs από κερατοειδή και κρυσταλλοειδή φακό κονιζών.

Τα δείγματα κερατοειδούς και κρυσταλλοειδούς φακού ομογενοποιήθηκαν με 1,5 mL παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και χλωριούχου νατρίου (Phosphate Buffer Saline, PBS). Από το διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκαν 1000  $\mu\text{L}$  για απομόνωση, καθαρισμό και ταυτοποίηση των GAGs, όπως περιγράφεται παρακάτω<sup>109,110,111</sup>.

### 3.3 Απολιπίδωση των δειγμάτων

Το πρώτο βήμα στην πορεία της απομόνωσης των GAGs είναι η απομάκρυνση των λιπιδίων και γλυκολιπιδίων από τα δείγματα με χρήση 4 όγκων διαλύματος χλωροφορμίου / μεθανόλης (1:2) (PANREAC, MERCK), ανάδευση και επώαση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 18 ώρες (h). Κατά τη διαδικασία αυτή απενεργοποιούνται όλα τα υδρολυτικά ένζυμα και έτσι ελαχιστοποιείται η διάσπαση των GAGs. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων (3.200 x g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, επαναδιαλυτοποίηση του ίζηματος σε 10 ml αιθανόλης (PANREAC) με στόχο την απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών και φυγοκέντρηση των δειγμάτων κάτω από τις ίδιες συνθήκες (3.200 x g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Το ίζημα που προέκυψε ξηράθηκε σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  για 4-6h.

### 3.4 Ενζυμική διάσπαση πρωτεϊνών

Ακολούθησε η πλήρης ενζυμική διάσπαση των πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος προνάσης (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, που περιείχε 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) και υποβλήθηκε σε πρωτεϊνική πέψη με την προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  από διάλυμα προνάσης 30 mg/mL, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,1 KU προνάσης (*Streptomyces griseus*, Calbiochem, Lucerne, Switzerland). Ακολούθησε επώαση για 72h, στους  $37^{\circ}\text{C}$ , προσθέτοντας την ίδια ποσότητα προνάσης σε διαστήματα 24h. Να σημειωθεί πως το διάλυμα της προνάσης είχε προ-επωασθεί για 30 min, στους  $37^{\circ}\text{C}$ , προκειμένου να εξαλειφθεί η δράση γλυκοσιδασών που ενδεχόμενα υπήρχαν ως προσμίξεις στο

παρασκεύασμα της προνάσης.

### 3.5 Ενζυμική διάσπαση νουκλεϊνικών οξέων

Το επόμενο στάδιο ήταν η ενζυμική διάσπαση των νουκλεϊνικών οξέων. Για το σκοπό αυτό η συγκέντρωση των δειγμάτων ρυθμίστηκε σε 150 mM NaCl και 10 mM  $\text{MgCl}_2$  και η ενζυμική διάσπαση του DNA επιτεύχθηκε με την προσθήκη 400 KU DNase I (EC 3.1.21.1, Calbiochem) και επώαση για 16h, στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Στο τέλος της επώασης η συγκέντρωση του  $\text{CaCl}_2$  ρυθμίστηκε σε 1 mM και ακολούθησε προσθήκη προνάσης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,1 KU και επώαση του μίγματος στους  $37^{\circ}\text{C}$ , για 24h.

### 3.6 $\beta$ -απόσπαση τελικού αμινοξέος

Σε αυτό το στάδιο, στόχος είναι να απομακρυνθεί το αμινοξύ που συνδέει τις GAGs στον πρωτεϊνικό κορμό. Για το λόγο αυτό, το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε σε 10,0-11,0 με την προσθήκη 10 mM NaOH, και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε  $\beta$ -απόσπαση παρουσία 1 M  $\text{NaBH}_4$  (Merck) για 16h, στους  $45^{\circ}\text{C}$ , απουσία οξυγόνου σε περιβάλλον αζώτου. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα εξουδετερώθηκαν με χρήση 1/10 του συνολικού όγκου του κάθε δείγματος κρυσταλλικού οξικού οξέος, το οποίο προστέθηκε στάγδην στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7 Απομόνωση των ολικών GAGs

Ακολούθησε καταβύθιση των GAGs με προσθήκη 4 όγκων διαλύματος αιθανόλης 95% (v/v) που περιείχε 2,5% (w/v) οξικό νάτριο και παραμονή των δειγμάτων στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 18h. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (3.200 x g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποξηράθηκε για 4-6 h στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Τέλος, το ίζημα που περιείχε το σύνολο των απομονωμένων GAGs διαλυτοποιήθηκε σε 300  $\mu\text{L}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ , φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 x g για 1 λεπτό (Eppendorf centrifuge, 5415C). Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα αποθηκεύτηκε στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ουρονικών οξέων στα δείγματα των απομονωμένων ολικών γλυκοζαμινογλυκανών

Η συγκέντρωση των ουρονικών οξέων στα δείγματα των απομονωμένων ολικών GAGs μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο των Bitter και Muir<sup>112</sup>. Αναλυτικότερα, 30  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από τον κερατοειδή ή από τον κρυσταλλοειδή φακό, αραιώθηκαν μέχρι τα 250  $\mu\text{L}$ . Ακολούθησε προσθήκη 1,25 mL παγωμένου διαλύματος 0,025 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrodt) διαλυμένο σε πυκνό θειικό οξύ (Merck), με μεγάλη προσοχή και αφού τα δείγματα είχαν τοποθετηθεί σε πάγο.

Τα δείγματα αναδεύτηκαν με προσοχή και τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά σε βράζων υδατόλουτρο. Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο και προστέθηκαν 50 μL φρέσκου διαλύματος 0,125 % w/v καρβαζόλης (Merck) διαλυμένης σε 100% αιθανόλη (Merck). Ακολούθησε ανάδευση και μεταφορά των δειγμάτων για 15 λεπτά σε βράζων υδατόλουτρο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, αναδεύτηκαν και μετρήθηκε η απορρόφηση του ροζ χρώματος που αναπτύχθηκε στα 530 nm σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu Corporation, Japan, UV-120-01). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και η συγκέντρωση των ουρονικών οξέων στα δείγματα υπολογίστηκε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπο, διάλυμα γλυκουρονικού οξέος (0,5-20μg) (Fluka).

### 3.9 Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των επιμέρους GAGs των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης (M.A.L.T.A. Chemetron SRL, Milano, Italy). Για το λόγο αυτό, από κάθε δείγμα κερατοειδούς φακού χρησιμοποιήθηκε όγκος διαλύματος που να περιέχει 4 μg ουρονικών οξέων ενώ από κάθε δείγμα κρυσταλλοειδούς φακού χρησιμοποιήθηκε όγκος διαλύματος που να περιέχει 6 μg ουρονικών οξέων. Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν με φυγοκέντρηση σε κενό (Speed Vac Plus, SC110A, Refrigerator Vapor Trap-RVT4104, Savant Instruments Inc., Holbrook, NY) και επαναδιαλύθηκαν σε 4 μL ddH<sub>2</sub>O. Ακολούθησε τοποθέτηση των δειγμάτων σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης οι οποίες είχαν πρώτα ξεπλυθεί αρχικά με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια είχαν παραμείνει για τουλάχιστον 20 λεπτά στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Η τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε σε απόσταση 10 mm από την αρχή της κυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM πυριδίνης (Carlo Erba)/ 470 mM φορμικού οξέος (Merck), pH 3.0 για την ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης (Apelex, France) υπό συνεχές ρεύμα 100V σε θερμοκρασία δωματίου για 70 min<sup>112</sup>. Να σημειωθεί ότι καθώς οι GAGs έχουν όλες αρνητικό φορτίο, η τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε έτσι, ώστε η κίνηση των δειγμάτων να γίνεται από την κάθοδο προς την άνοδο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Ακόμα, σε κάθε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης τοποθετήθηκαν πρότυπα διαλύματα GAGs: HA (από βόειο τραχεία), HS (από βόειο εντερικό βλεννογόνο ChSC (από χόνδρο καρχαρία) και DS (από χοίρειο δέρμα) (όλα από Sigma-Aldrich), έτσι ώστε να γίνει ο χαρακτηρισμός των γλυκοζαμινογλυκανών που υπάρχουν σε κάθε δείγμα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι μεμβράνες οξικής

κυτταρίνης χρωματίστηκαν με 0,2% (w/v) Alcian blue (Sigma), σε 0,1% (v/v) οξικό οξύ (Mallinckrodt U.S.P), για 10 min, και ξεπλύθηκαν με 0,1% (v/v) οξικό οξύ για 20 min. Η ένταση της χρώσης υπολογίστηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (1D Image Analysis Software, version 3.0 of Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, New York)<sup>113</sup>.

### 3.10 Ταυτοποίηση των γλυκοζαμινογλυκανών με ειδικά ένζυμα

Η ταυτοποίηση των GAGs πραγματοποιήθηκε με πέψη των δειγμάτων με ειδικά ένζυμα που διασπούν τις GAGs. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα διαλύματος ολικών GAGs που περιείχε 4 μg ουρονικών οξέων για τον κερατοειδή φακό και 6 μg ουρονικών οξέων για τον κρυσταλλοειδή φακό, αφού προηγουμένως αποξηράνθηκαν με φυγοκέντρηση σε κενό. Τα δείγματα επώαστηκαν σε τελικό όγκο 10 μl, όπως περιγράφεται παρακάτω.

#### α) Υαλουρονιδάση (Hyaluronidase, Seikagaku)

Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM οξικού νατρίου/οξικού οξέος, pH 6,0 που περιείχε 0,15 M NaCl και επώαστηκαν με 5,0 U υαλουρονιδάσης (hyaluronate lyase, EC 4.2.2.1, Streptomyces hyalurolyticus, SEIKAGAKU, Tokyo, Japan), για 17h, στους 60°C.

#### β) Χονδροϊτινάση ABC (Chondroitinase ABC, Sigma)

Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, που περιείχε 50 mM οξικό νάτριο και επώαστηκαν με  $5 \times 10^{-3}$  U χονδροϊτινάσης ABC (chondroitin ABC lyase, EC 4.2.2.4, Proteus vulgaris, Sigma-Aldrich) για 17h, στους 37°C.

#### γ) Χονδροϊτινάση B (Chondroitinase B, Seikagaku)

Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0 και επώαστηκαν με  $1,5 \times 10^{-3}$  U χονδροϊτινάσης B (chondroitinase B, Flavobacterium heparinum, SEIKAGAKU Corp., Tokyo, JAPAN), για 17h, στους 30°C.

#### δ) Ηπαρινάση

Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl, pH 7,0, που περιείχε 3 mM CaCl<sub>2</sub> και επώαστηκαν με  $4 \times 10^{-4}$  U ηπαρινάσης (heparin lyase I, EC 4.2.2.7, Flavobacterium heparinum, Seikagaku, Tokyo), για 17h, στους 30°C.

#### ε) Ηπαριτινάση (Heparitinase, Seikagaku)

Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM οξικού νατρίου/οξικού οξέος, pH 7,0, που

περιείχε 3,0 mM CaCl<sub>2</sub> και επωάστηκαν με 1,5 x10<sup>-3</sup> U ηπαριτινάσης (heparan sulfate lyase, heparitinase, EC 4.2.2.8, Flavobacterium heparinum, Seikagaku, Tokyo), για 17h , στους 43°C.

### στ) Κερατανάση

Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, και επωάστηκαν με 0,05 U κερατανάσης (keratan sulphate Endo-β-D-galactosidase, EC 3.2.10.3, Pseudomonas species, Sigma-Aldrich), για 17h, στους 37°C.

Οι χρόνοι επώασης καθώς και οι συγκεντρώσεις των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν αυτοί που χρειάστηκαν για πλήρη πέψη των αντίστοιχων υποστρωμάτων τους, όπως προσδιορίστηκε από μια προκαταρκτική μελέτη. Στις αρχικές αυτές μελέτες, 10 μg CS-A (από βόειο τραχεία), CS-B (από χοίρειο δέρμα), CS-C (από χόνδρο καρχαρία), HA (από βόειο τραχεία), θειική κερατάνη (από βόειο κερατοειδή), HS (από βόειο εντερικό βλεννογόνο) και ηπαρίνη (όλα από Sigma-Aldrich) επωάστηκαν με τα προαναφερθέντα ένζυμα στις κατάλληλες συνθήκες επώασης. Υποστρώματα που επωάστηκαν με τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα χωρίς την παρουσία ενζύμου αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Ο βαθμός πέψης εκτιμήθηκε ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης και πηκτές πολυακρυλαμίδιου και υπολογίστηκε με πυκνόμετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman .Kodak, Rochester, NY).

### 3.11 Προσδιορισμός δραστικότητας των MMPs με ζυμογραφία ζελατινής

Με τη μέθοδο αυτή διαπιστώνεται η ύπαρξη των ζελατινασών τόσο σε μορφή προενζύμου, όσο και σε ενεργοποιημένη μορφή<sup>114,115</sup>. Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 3 μg πρωτεΐνης από 500 μL ομογενοποιημένου διαλύματος των δειγμάτων κερατοειδούς και κρυσταλλοειδούς φακού. Παρασκευάστηκαν πηκτές πολυακρυλαμίδιου, συγκέντρωσης 8% (w/v) σε ακρυλαμίδιο.

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδιου αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού (separating gel) σύμφωνα με τον Πίνακα 1 και 2 τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή παρασκευής πηκτών πολυακρυλαμίδιου της BioRad. Να σημειωθεί ότι πραγματοποιείται προσθήκη 1 mg/ml ζελατινής κολλαγόνου τύπου I που αποτελεί υπόστρωμα για τις MMP-2 και MMP-9. Αφού τοποθετήθηκε το διάλυμα στην ειδική συσκευή, η επιφάνεια του καλύφθηκε με ισοπροπανόλη ώστε να αποφευχθεί η επαφή του με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, το οποίο παρεμποδίζει τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

Πίνακας 2

	Πηκτή (8%)	Διαχωρισμού		Πηκτή Στοιβαξης (4%)	
		V <sub>T</sub> =5 mL	V <sub>T</sub> =10 mL	V <sub>T</sub> =2.5 mL	V <sub>T</sub> =5 mL
30% ακρυλαμίδιο	1,330 mL	2,662 mL	0,333 mL	0,670 mL	
H <sub>2</sub> O	2,140 mL	4,280 mL	1,490 mL	2,970 mL	
Ζελατινή (w/v) 2%	0,250 mL	0,500 mL	-----	-----	
LGB	1250 mL	2,500 mL	-----	-----	
UGB	-----	-----	0,625 mL	1,250 mL	
APS 10%	25 μL	50 μL	50 μL	100 μL	
TEMED	4 μl	8 μL	5 μL	10 μL	

όπου V<sub>T</sub>: τελικός όγκος, LGB : ροθμιστικό διάλυμα 0,5M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8, UGB: ροθμιστικό διάλυμα 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8, APS : υπερθειικό αμμώνιο, T.E.M.E.D: N,N,N',N'-τετραμεθιλενεδιαμίνη.

Στη συνέχεια αφού στερεοποιήθηκε η πηκτή διαχωρισμού, παρασκευάστηκε η πηκτή στοιβαξης των δειγμάτων (stacking gel) και τοποθετήθηκε πάνω στη στερεοποιημένη πηκτή διαχωρισμού. Για να δημιουργηθούν κατάλληλες υποδοχές (wells) για την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή στοιβαξης, χρησιμοποιήθηκε ένα κομμάτι ειδικού πλαστικού με σχήμα χτένας έτσι ώστε όταν στερεοποιηθεί η πηκτή στοιβαξης να διαμορφωθούν οι κατάλληλες αυτές υποδοχές για την τοποθέτηση των δειγμάτων.

Για το λόγο αυτό ποσότητα που να περιέχει 3 μg ολικής πρωτεΐνης από τα ομογενοποιημένα διαλύματα κερατοειδούς και κρυσταλλοειδούς φακού, αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,125 % (w/v) SDS, 30% γλυκερόλη και 0,025% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης) και τοποθετήθηκαν με προσοχή με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton στις κατάλληλες υποδοχές της πηκτής στοιβαξης (wells). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιώντας κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,05 % SDS, pH 8,0) με σταθερή τάση 150V για 2h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομακρύνθηκε η πηκτή στοιβαξης και για την απομάκρυνση του SDS, η πηκτή ξεπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 200mM NaCl, pH 7,5, το οποίο περιέχει 2,5% Triton X-100, και στη συνέχεια επωάστηκαν για 20h στους 37oC στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,1% Triton X-100 (Sigma). Μετά την επώαση η πηκτή χρωματίστηκε με διάλυμα 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) σε 25% (v/v) ισοπροπυλικής αλκοόλης και 2,5% (v/v) οξικού οξέος, για 12h. Διάλυμα 30% (v/v) ισοπροπυλικής αλκοόλης και 10% (v/v) οξικού οξέος, χρησιμοποιήθηκε για τον αποχρωματισμό της

πηκτής. Στις θέσεις που είχαν ηλεκτροφορηθεί οι MMPs MMP-2 και MMP-9, λόγω τοπικής αποδόμησης του υποστρώματος της ζελατίνης, εμφανίστηκαν διαφανείς ζώνες λύσεως.

Το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στις διαφανείς ζώνες λύσης λόγω ενζυμικής δραστηριότητας υπολογίστηκε με ηλεκτροφόρηση και σύγκριση με καθαρή μορφή proMMP-2 (72,0 kDa), ενεργό MMP-2 (64,0 kDa), proMMP-9 (92,0 kDa) και ενεργό MMP-9 (78,0 kDa) του εμπορίου (Anawa Trading, Wangen), καθώς και με ηλεκτροφόρηση δειγμάτων πρωτεϊνών αναφοράς γνωστού μοριακού βάρους: μυοσίνη (250 kDa), φωσφορυλάση (148 kDa), αλβουμίνη βόειου ορού (98 kDa), αφυδρογονάση του L-γλουταμινικού (64 kDa), αλκοολική δεϋδρογονάση (50 kDa), καρβονική ανυδράση (36 kDa), μυογλοβίνη (22 kDa), λυσοζύμη (16 kDa), απροτινίνη (6 kDa), ινσουλίνη β-αλυσίδα (4 kDa) (SeeBlue Plus2 Prestained, Invitrogen, USA).

Η σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων των ζωνών λύσης που εμφανίστηκαν μετά τη ζυμογραφία με αρνητική χρώση, ύστερα από το χρωματισμό των πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R 250, ποσοτικοποιήθηκαν με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY)<sup>116,117</sup>. Ο υπολογισμός της δραστηριότητας των ζελατινασών έγινε αρχικά σε αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units) και ακολούθως εκφράστηκε ως % των επιπέδων του μάρτυρα.

### 3.12 Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Σε κάθε ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς και κρυσταλλοειδούς φακού έγινε προσδιορισμός του ολικού ποσού των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad, Glattbrugg, Switzerland), χρησιμοποιώντας αλβουμίνη από βόειο ορό (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) για τον καθορισμό της πρότυπης καμπύλης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 5 μL από κάθε δείγμα και αραιώθηκαν μέχρι τα 800 μL με ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και προστέθηκαν 200 μL αντιδραστηρίου Bradford. Ακολούθησε ανάδευση, εμφάνιση μπλε χρώματος και μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 595 nm. Παράλληλα κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη εύρους 1μg έως 20μg πρωτεΐνης (αλβουμίνης), με τη βοήθεια της οποίας προσδιορίστηκε το ποσό της ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 3.13 Στατιστική ανάλυση

Όπου κρίνεται αναγκαίο, τα στοιχεία παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± SD. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο Student's t-test

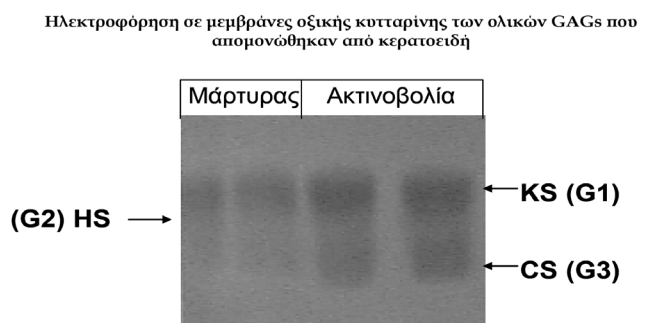
for unpaired samples, two sided καθώς και με τη μέθοδο ANOVA. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρήθηκαν όταν  $p < 0,05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1 Απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση GAGs από κερατοειδή και κρυσταλλοειδή φακό κονίκλων μετά από οξεία έκθεση τους σε υπέρυθρη ακτινοβολία.

Μετά τη λήψη των κερατοειδών και των κρυσταλλοειδών φακών των αριστερών οφθαλμών των κονίκλων που εκτέθηκαν σε IR για 12 ώρες (12h - οξεία έκθεση) και των κονίκλων που δεν ακτινοβολήθηκαν, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίησή τους με 1.5 mL PBS. {Υπενθυμίζεται ότι στους αριστερούς οφθαλμούς αμφότερων των ομάδων δεν έγινε ενστάλαξη σταγόνων δικλοφενάκης (δικλοφενάκη -), σε αντίθεση με τους δεξιούς οφθαλμούς όπου ενσταλάχθηκε δικλοφενάκη (δικλοφενάκη +)}. Οι ολικές GAGs απομονώθηκαν από 1.0 mL του διαλύματος που προέκυψε για κάθε δείγμα με απολιπιδοποίηση, εξαντλητική πέψη με προνάση, πέψη με DNase και β-απόσπαση με NaBH<sub>4</sub>. Οι ολικές GAGs καταβύθιστηκαν τελικώς με αιθανόλη και έγινε ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο των Bitter και Muir<sup>12</sup>.

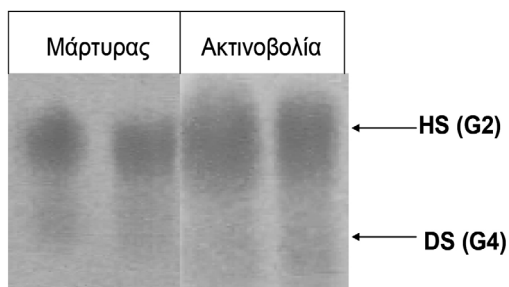
Ο διαχωρισμός των ολικών GAGs πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 4 μg ουρονικών οξέων από κάθε δείγμα κερατοειδή και 6 μg ουρονικών



Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (4μg ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή που προέρχεται από τους αριστερούς οφθαλμούς (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κι ακτινοβολημένων κονίκλων επί 12h. Μάρτυρας : κερατοειδείς αριστερών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία: κερατοειδείς αριστερών οφθαλμών ακτινοβολημένων κονίκλων (12h), KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη.

οξέων από κάθε δείγμα φακού απομονωμένων ολικών GAGs. Η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα συγκρίθηκε με αυτή πρότυπων διαλυμάτων GAGs. Διαπιστώθηκε η ύπαρξη τριών πληθυσμών GAGs, G1, G2 και G3 στα δείγματα κερατοειδούς (εικόνα 5) και 2 πληθυσμών GAGs, G2 και G4 στα δείγματα φακού (εικόνα 6). Οι πληθυσμοί G1, G2, G3 και G4 κινήθηκαν με την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με τα πρότυπα διαλύματα KS, HS, CS και DS αντίστοιχα (εικόνα 5, 6).

Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό



Εικόνα 6. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (6μg ουρικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό που προέρχεται από τους αριστερούς οφθαλμούς (δικλοφενάκη-) μη ακτινοβολημένων κι ακτινοβολημένων κονιγίων επί 12h. Μάρτυρας: φακοί αριστερών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κονιγίων, Ακτινοβολία: φακοί αριστερών οφθαλμών ακτινοβολημένων κονιγίων (12h), HS: θειική ηπαράνη, DS: θειική δερματάνη.

Ενζυμική πέψη των GAGs που απομονώθηκαν, με ένζυμα που διασπούν τις GAGs, επιβεβαίωσε πως ο πληθυσμός G1 είναι η θειική κερατάνη (KS), ο πληθυσμός G2 είναι θειική ηπαράνη (HS), ο πληθυσμός G3 είναι η θειική χονδροϊτίνη (CS) και ο πληθυσμός G4 είναι η θειική δερματάνη (DS) (Πίνακας 3).

Από τις GAGs που διαχωρίστηκαν στις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρήθηκε ότι αυτές που κυριαρχούν στον κερατοειδή είναι κατά κύριο λόγο η KS ενώ σε μικρότερα ποσοστά η HS και η CS (Εικόνα 5).

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, έδειξε πως στον κερατοειδή των ακτινοβολημένων κονιγίων υπάρχει επαγωγή της KS και της CS χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 7).

Από τις GAGs που διαχωρίστηκαν στις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρήθηκε ότι αυτές που κυριαρχούν στον κρυσταλλοειδή φακό είναι κατά κύριο λόγο η HS και σε μικρότερα ποσοστά η DS (Εικόνα 6).

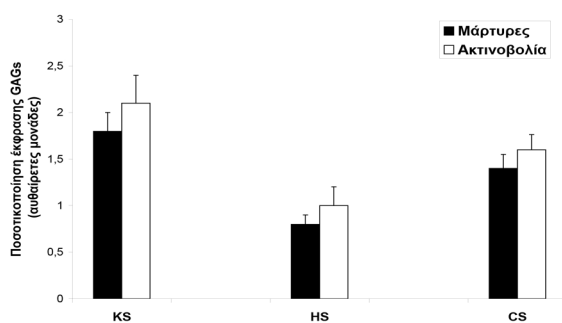
Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, έδειξε πως στον κρυσταλλοειδή φακό η οξεία έκθεση σε IR, επάγει στατιστικώς σημαντικά το ποσό της θειικής ηπαράνης που βρίσκεται στον φακό (εικόνα 8).

**Πέψη των απομονωμένων GAGs με ειδικά ένζυμα που διασπούν τις GAGs**

Υπόστρωμα	πληθυσμοί GAG	Κερατανάση	Χονδροϊτινάση ABC	Χονδροϊτινάση B	Ηπαριτινάση	Ηπαρινάση
Κερατοειδής	G1	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	G2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	G3	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Κρυσταλλοειδής Φακός	G2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	G4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
CSA		(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
CSB (DS)		(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
CSC		(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
H		(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
HS		(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
KS		(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

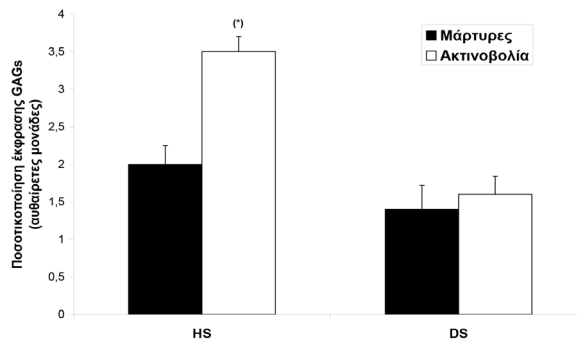
Πίνακας 3. Ενζυμική πέψη των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από τον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονιγίων, με ένζυμα που διασπούν τις GAGs. Η πέψη ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης. CSA: θειική χονδροϊτίνη A, CSB: θειική χονδροϊτίνη B (DS, θειική δερματάνη), CSC: θειική χονδροϊτίνη C, H: ηπαρίνη, HS: θειική ηπαράνη, KS: θειική κερατάνη. (+): 100% αποδόμηση, (-): μη ανιχνεύσιμη αποδόμηση.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κερατοειδή



Εικόνα 7. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή ID Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Μάρτυρας: κερατοειδείς αριστερών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων, Ακτινοβολία : κερατοειδείς αριστερών οφθαλμών ακτινοβολημένων κόνιγκλων (12h), KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο ± SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνιγκλο υπολογισμένη από 4 ακτινοβολημένους και 4 μη ακτινοβολημένους κόνιγκλες.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κρυσταλλοειδούς φακού



Εικόνα 8. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή ID Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Μάρτυρας: φακός αριστερών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων, Ακτινοβολία: φακός αριστερών οφθαλμών ακτινοβολημένων κόνιγκλων (12h), HS: θειική ηπαράνη, DS: θειική δερματάνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο ± SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνιγκλο υπολογισμένη από 4 ακτινοβολημένους και 4 μη ακτινοβολημένους κόνιγκλες, (\*)  $p < 0,05$ .

## 2 Απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση GAGs από κερατοειδή και κρυσταλλοειδή φακό κόνιγκλων μετά από οξεία έκθεση τους σε υπέρυθρη ακτινοβολία με ταυτόχρονη επίδραση δικλοφενάκης.

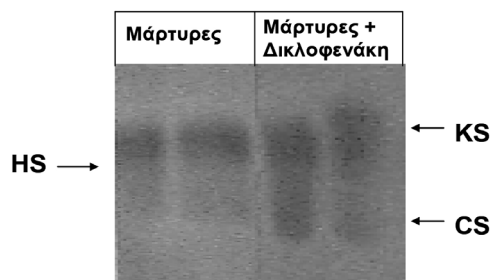
Πραγματοποιήθηκε λήψη κερατοειδών και κρυσταλλοειδών φακών κόνιγκλων που εκτέθηκαν σε IR για 12h (οξεία έκθεση) με ταυτόχρονη ενστάλαξη δικλοφενάκης στους δεξιούς οφθαλμούς τους, καθώς και κόνιγκλων που δεν ακτινοβολήθηκαν κι έγινε στους δεξιούς οφθαλμούς τους ενστάλαξη σταγόνων δικλοφενάκης και μόνο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ομογενοποίησή τους όπως προηγουμένως (7.3.2).

Ο διαχωρισμός των ολικών GAGs πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 4 μg ουρονικών οξέων από κάθε δείγμα κερατοειδή και 6 μg ουρονικών οξέων από κάθε δείγμα φακού απομονωμένων ολικών GAGs.

- Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της δικλοφενάκης στις GAGs από δείγματα κερατοειδή χωρίς έκθεση σε IR, συγκρίνοντας τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) με τους αριστερούς κερατοειδείς (δικλοφενάκη -) των μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων.

Από τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρείται ότι η χρήση δικλοφενάκης από μόνη της (χωρίς επίδραση IR) δεν είχε καμία επίδραση στις GAGs του κερατοειδή των μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων (Εικόνα 9).

Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή

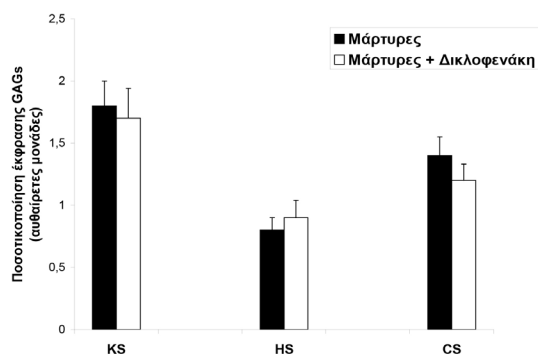


Εικόνα 9. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (4μg ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή χιτώνα που προέρχεται από τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) κι από τους αριστερούς (δικλοφενάκη -) οφθαλμούς μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων. Μάρτυρες: κερατοειδείς αριστερών μη ακτινοβολημένων οφθαλμών, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη: κερατοειδείς δεξιών μη ακτινοβολημένων οφθαλμών, KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, επιβεβαίωσε πως η χρήση δικλοφενάκης χωρίς την επίδραση IR δεν

είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στις GAGs στον κερατοειδή (Εικόνα 10).

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κερατοειδή



Εικόνα 10. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Μάρτυρες: κερατοειδείς αριστερών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κόνικλων, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη: κερατοειδείς δεξιών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κόνικλων. KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνικλο υπολογισμένη από 4 μη ακτινοβολημένους κόνικλους.

- Στη συνέχεια μελετήθηκε αν η τοπική ενστάλαξη δικλοφενάκης επηρεάζει τις επιδράσεις που επιφέρει η έκθεση σε IR στις GAGs από δείγματα κερατοειδή, συγκρίνοντας τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) με τους αριστερούς (δικλοφενάκη -) κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνικλων.

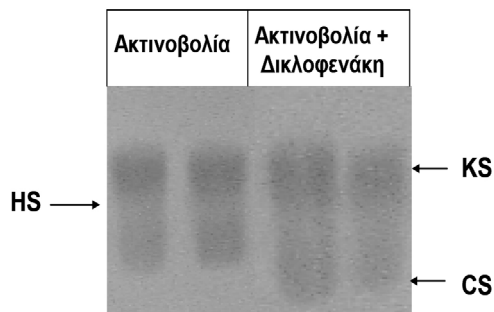
Από τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρείται ότι η χρήση δικλοφενάκης δεν είχε καμία επίδραση στις GAGs του κερατοειδή στους ακτινοβολημένους κόνικλους (Εικόνα 11).

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, επιβεβαίωσε πως η χρήση δικλοφενάκης δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στις GAGs στον κερατοειδή των ακτινοβολημένων κόνικλων (Εικόνα 12).

- Αμέσως μετά, μελετήθηκε η επίδραση της δικλοφενάκης στις GAGs από δείγματα κρυσταλλοειδούς φακού, χωρίς έκθεση σε IR, συγκρίνοντας τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) με τους αριστερούς φακούς (δικλοφενάκη -) των μη ακτινοβολημένων κόνικλων.

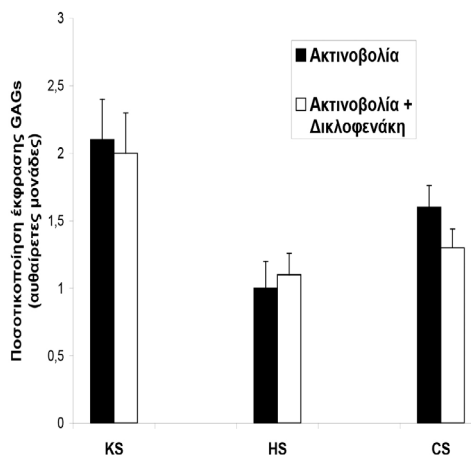
Από τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρείται ότι η χρήση δικλοφενάκης, χωρίς IR, δεν είχε καμία επίδραση στις GAGs του κρυσταλλοειδή φακού των μη ακτινοβολημένων κόνικλων (Εικόνα 13).

Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή



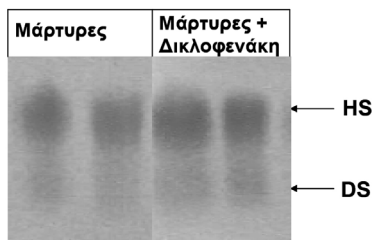
Εικόνα 11. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (4μg ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή χιτώνα που προέρχεται από τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) και αριστερούς (δικλοφενάκη -) οφθαλμούς ακτινοβολημένων κόνικλων (12h). Ακτινοβολία: αριστεροί κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνικλων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη: δεξιοί κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνικλων. KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κερατοειδή



Εικόνα 12. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Ακτινοβολία : αριστεροί κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνικλων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη : δεξιοί κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνικλων, KS : θειική κερατάνη, HS : θειική ηπαράνη, CS : θειική χονδροϊτίνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνικλο υπολογισμένη από 4 ακτινοβολημένους (οξεία έκθεση 12h) κόνικλους.

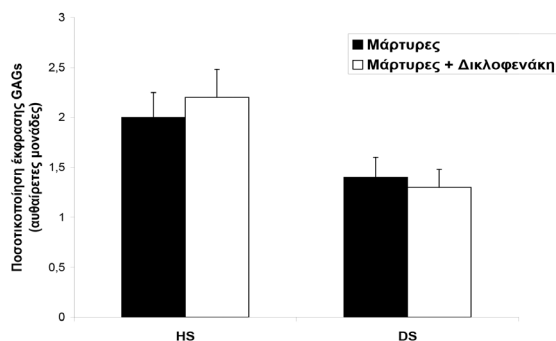
Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό



Εικόνα 13. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (6μg ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό που προέρχεται από τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) κι από τους αριστερούς (δικλοφενάκη -) οφθαλμούς μη ακτινοβολημένων κονίκλων. Μάρτυρες : φακοί αριστερών μη ακτινοβολημένων οφθαλμών, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη : φακοί δεξιών μη ακτινοβολημένων οφθαλμών, HS : θειική ηπαράνη, DS : θειική δερματάνη.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, επιβεβαίωσε πως η χρήση δικλοφενάκης χωρίς επίδραση IR δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στις GAGs του κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων κονίκλων (Εικόνα 14).

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κρυσταλλοειδή φακού

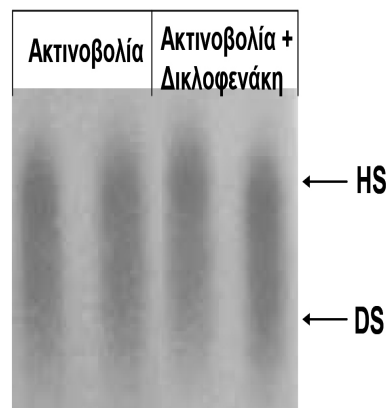


Εικόνα 14. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Μάρτυρες : φακοί αριστερών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη : φακοί δεξιών οφθαλμών μη ακτινοβολημένων κονίκλων. HS: θειική ηπαράνη, DS : θειική δερματάνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνιγλο υπολογισμένη από 4 μη ακτινοβολημένους κόνιγκες.

- Στη συνέχεια μελετήθηκε, αν η τοπική ενστάλαξη δικλοφενάκης επηρεάζει τις επιδράσεις που επιφέρει η έκθεση σε IR στις GAGs στον κρυσταλλοειδή φακό (αναφέρθηκε προηγουμένως ότι η οξεία έκθεση σε IR επάγει στατιστικά σημαντικά το ποσό της θειικής ηπαράνης στον φακό -Εικόνα 8), συγκρίνοντας τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) με τους αριστερούς (δικλοφενάκη -) φακούς ακτινοβολημένων κονίκλων.

Από τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρείται ότι η χρήση δικλοφενάκης φαίνεται να μειώνει ελαφρώς την προκαλούμενη από την οξεία έκθεση σε IR επαγωγή του ποσού της θειικής ηπαράνης στον κρυσταλλοειδή φακού των ακτινοβολημένων κονίκλων, χωρίς ωστόσο να είναι σημαντική η διαφορά (Εικόνα 15).

Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό

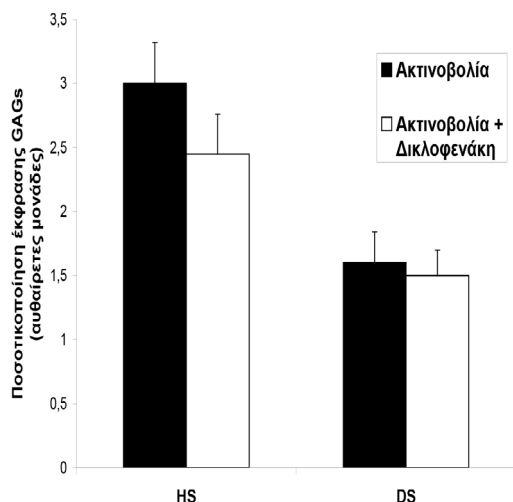


Εικόνα 15. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (6μg ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό που προέρχεται από τον προέρχεται από τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) κι αριστερούς (δικλοφενάκη -) οφθαλμούς ακτινοβολημένων κονίκλων (οξεία έκθεση 12h). Ακτινοβολία : αριστεροί φακοί ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη : δεξιοί φακοί ακτινοβολημένων κονίκλων, HS : θειική ηπαράνη, DS : θειική δερματάνη.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, έδειξε πως η χρήση δικλοφενάκης προκαλεί μικρή αναστολή της επαγόμενης από την IR αύξησης της HS, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 16).



Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κρυσταλλοειδούς φακού



Εικόνα 16. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή ID Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Ακτινοβολία: αριστεροί φακοί ακτινοβολημένων κόνιγκλων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη : δεξιοί φακοί ακτινοβολημένων κόνιγκλων, HS: θειική ηπαράνη, DS: θειική δερματάνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνιγκλο υπολογισμένη από 4 ακτινοβολημένους (οξεία έκθεση -12h) κόνιγκλους.

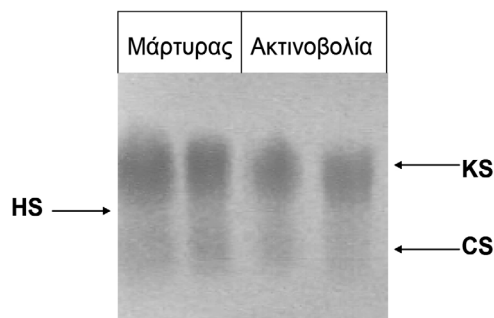
### 3. Απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση GAGs από κερατοειδή και κρυσταλλοειδή φακό κόνιγκλων μετά από χρόνια έκθεση τους σε υπέρυθρη ακτινοβολία.

Πραγματοποιήθηκε λήψη κερατοειδών και κρυσταλλοειδών φακών κόνιγκλων που εκτέθηκαν σε IR για 4 μήνες (χρόνια έκθεση), καθώς και κόνιγκλων που δεν εκτέθηκαν σε IR και αποτέλεσαν τους μάρτυρες των πρώτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ομογενοποίησή τους όπως προηγουμένως (παρ.7.3.2).

Ο διαχωρισμός των ολικών GAGs πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 4  $\mu$ g ουρονικών οξέων από κάθε δείγμα κερατοειδή και 6  $\mu$ g ουρονικών οξέων από κάθε δείγμα φακού απομονωμένων ολικών GAGs.

Από τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρείται ότι η επίδραση της IR (χρόνια έκθεση) δεν προκάλεσε καμία ποιοτική, αλλά ούτε και ποσοτική, μεταβολή στις GAGs του κερατοειδή των ακτινοβολημένων κόνιγκλων (Εικόνα 17).

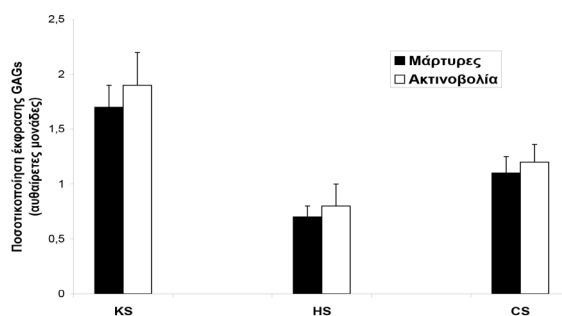
Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή



Εικόνα 17. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (4 $\mu$ g ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κερατοειδή χιτώνια που προέρχεται από μη ακτινοβολημένα και χρόνια ακτινοβολημένα κόνιγκλια. Μάρτυρας: κερατοειδείς μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων, Ακτινοβολία: κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνιγκλων (χρόνια έκθεση). KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, επιβεβαίωσε πως η χρόνια έκθεση σε IR δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις GAGs στον κερατοειδή κόνιγκλων (Εικόνα 18).

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με δείγματα κερατοειδή

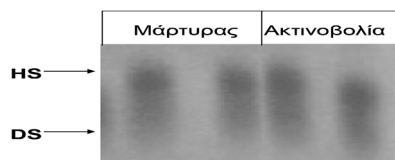


Εικόνα 18. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή ID Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Μάρτυρες : κερατοειδείς μη ακτινοβολημένων κόνιγκλων, Ακτινοβολία : κερατοειδείς ακτινοβολημένων κόνιγκλων (χρόνια έκθεση). KS: θειική κερατάνη, HS: θειική ηπαράνη, CS: θειική χονδροϊτίνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνιγκλο υπολογισμένη από 3 μη ακτινοβολημένους και 3 ακτινοβολημένους κόνιγκλους (n=6).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της IR (χρόνια έκθεση) στις GAGs από δείγματα κρυσταλλοειδούς φακού ακτινοβολημένων κονίκλων.

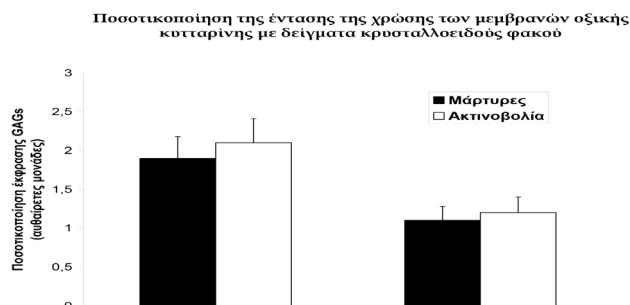
Από τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης παρατηρείται ότι η επίδραση της IR (χρόνια έκθεση) δεν προκάλεσε καμία ποιοτική αλλά ούτε και ποσοτική μεταβολή στις GAGs του κρυσταλλοειδή φακού των ακτινοβολημένων κονίκλων (Εικόνα 19).

Ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (6g ουρονικών οξέων) των ολικών GAGs που απομονώθηκαν από κρυσταλλοειδή φακό που προέρχεται από μη ακτινοβολημένους και χρόνια ακτινοβολημένους κονίκλους. Μάρτυρας: φακοί μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία: φακοί ακτινοβολημένων κονίκλων (χρόνια έκθεση). HS: θειική ηπαράνη, DS: θειική δερματάνη.

Ποσοτικοποίηση της έντασης της χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με Alcian Blue, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, επιβεβαίωσε πως η χρόνια έκθεση δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις GAGs (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Ποσοτικοποίηση της έντασης χρώσης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή ID Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Μάρτυρες : φακοί μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία : φακοί ακτινοβολημένων κονίκλων (χρόνια έκθεση). HS: θειική ηπαράνη, DS: θειική δερματάνη. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών για κάθε κόνικλο υπολογισμένη από 3 μη ακτινοβολημένους και 3 ακτινοβολημένους κονίκλους (n=6).

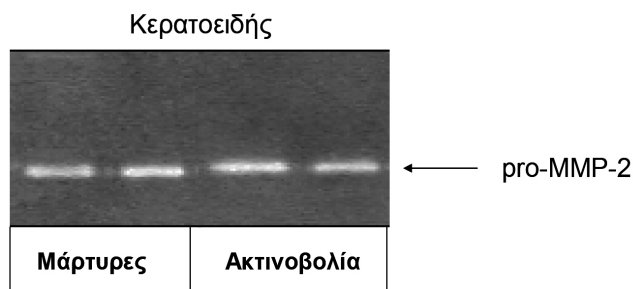
#### 4. Προσδιορισμός δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) που εντοπίζονται στον κερατοειδή και στον κρυσταλλοειδή φακό κονίκλων μετά από οξεία έκθεση τους σε υπέρυθη ακτινοβολία, με ζυμογραφία ζελατίνης

Οι MMPs, όπως ήδη αναφέρθηκε, μπορούν, εφόσον ενεργοποιηθούν, να αποδομήσουν πολλά συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος καθώς και να συμμετάσχουν σε πάρα πολλές βιοχημικές οδούς στον οφθαλμό. Σημαντικό ρόλο στον οφθαλμό διαδραματίζει η ζελατινάση A (MMP-2) και η ζελατινάση B (MMP-9). Καθώς δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της IR στις μεταλλοπρωτεϊνάσες αυτές στον οφθαλμό, ελέγχθηκε η δραστηριότητά τους με ζυμογραφία ζελατίνης.

Μετά τη λήψη των κερατοειδών και των κρυσταλλοειδών φακών των αριστερών οφθαλμών (δικλοφενάκη-) των κονίκλων που εκτέθηκαν σε IR για 12h (οξεία έκθεση) και των κονίκλων που δεν ακτινοβολήθηκαν και αποτέλεσαν τους μάρτυρες των πρώτων, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίησή τους με 1.5 mL PBS (παρ.7.3.2). Έγινε μέτρηση πρωτεϊνών (παρ.7.3.12) και για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 3μg ολικής πρωτεΐνης ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

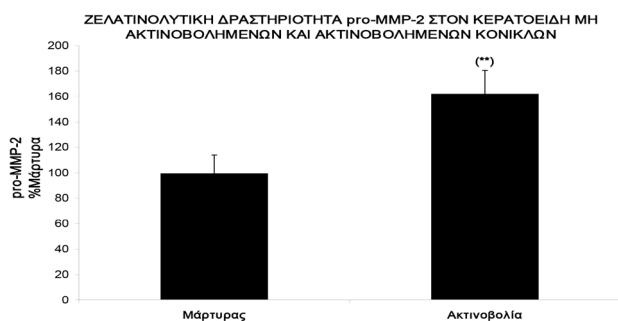
Στην αρχή διευρενήθηκε τυχόν επίδρασή της IR στη MMP-2 και MMP-9 στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό, συγκρίνοντας τους αριστερούς κερατοειδείς και φακούς (δικλοφενάκη-) των ακτινοβοληθέντων και μη κονίκλων.

- Στα δείγματα κερατοειδούς από όλους τους κόνικλες, ακτινοβοληθέντες και μη, διαπιστώθηκε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2, ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της pro-MMP-9 και της MMP-9. Φαίνεται ότι η οξεία έκθεση σε IR αυξάνει τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονίκλων (οξεία έκθεση -12h). Μάρτυρες : αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη-) μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία : αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη-) ακτινοβολημένων κονίκλων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Η οξεία έκθεση (12 h) σε IR των κονικίων επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή (Εικόνα 22).



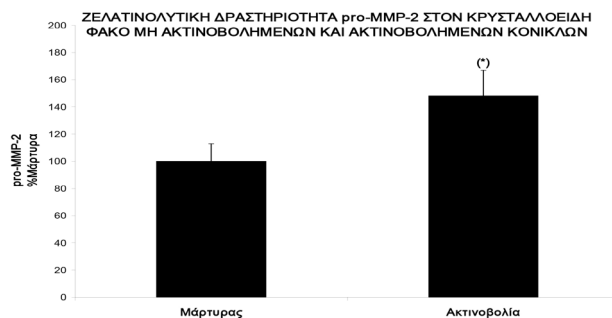
Εικόνα 22. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονικίων (οξεία έκθεση -12h). Μάρτυρες: αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κονικίων, Ακτινοβολία : αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη -) ακτινοβολημένων κονικίων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των μη ακτινοβολημένων κονικίων υπολογισμένη από 4 μη ακτινοβολημένους και 4 ακτινοβολημένους κονικίους, (\*\*) $p < 0,02$ .

- Στα δείγματα φακού από τους ακτινοβοληθέντες και μη κόνικλες διαπιστώθηκε, επίσης, δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2, ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της pro-MMP-9 και της MMP-9. Φαίνεται ότι η οξεία έκθεση σε IR αυξάνει τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονικίων (οξεία έκθεση -12h). Μάρτυρες: αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη-) μη ακτινοβολημένων κονικίων, Ακτινοβολία: αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) ακτινοβολημένων κονικίων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Η οξεία έκθεση (12 h) σε IR των κονικίων επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κρυσταλλοειδή φακό (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονικίων (οξεία έκθεση -12h). Μάρτυρες : αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κονικίων, Ακτινοβολία : αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) ακτινοβολημένων κονικίων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των μη ακτινοβολημένων κονικίων υπολογισμένη από 4 μη ακτινοβολημένους και 4 ακτινοβολημένους κονικίους, (\*) $p < 0,05$ .

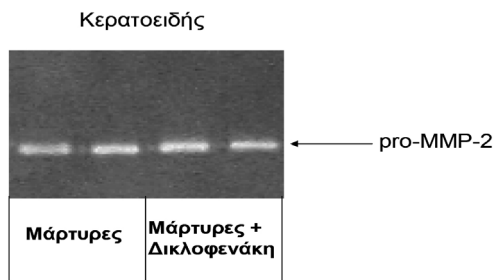
## 5. Προσδιορισμός δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) που εντοπίζονται στον κερατοειδή και στον κρυσταλλοειδή φακό κονικίων μετά από οξεία έκθεση τους σε υπέρυθρη ακτινοβολία, με ταυτόχρονη επίδραση δικλοφενάκης, με ζυμογραφία ζελατινής

Μετά τη λήψη των κερατοειδών και των κρυσταλλοειδών φακών κονικίων που εκτέθηκαν σε IR για 12h (οξεία έκθεση) με ταυτόχρονη ενστάλαξη δικλοφενάκης στους δεξιούς οφθαλμούς τους, καθώς και κονικίων που δεν ακτινοβολήθηκαν κι έγινε στους δεξιούς οφθαλμούς τους ενστάλαξη σταγόνων δικλοφενάκης και μόνο, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση τους με 1.5 mL PBS (παρ.7.3.2). Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 3μg ολικής πρωτεΐνης, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

- Αρχικά έγινε μελέτη της επίδρασης της δικλοφενάκης στην MMP-2 και MMP-9 στον κερατοειδή μη ακτινοβολημένων κονικίων, συγκρίνοντας τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) με τους αριστερούς (δικλοφενάκη -) κερατοειδείς τους.

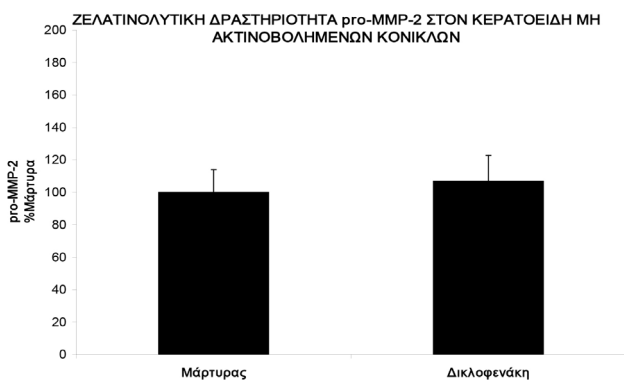
Σε όλα τα δείγματα κερατοειδούς, με και χωρίς δικλοφενάκη δηλαδή, διαπιστώθηκε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2, ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της

pro-MMP-9 και της MMP-9. Η δικλοφενάκη από μόνη της δε φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στην δραστηριότητα της pro-MMP-2 (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς μη ακτινοβολημένων κονιέκλων και μη ακτινοβολημένων κονιέκλων με επίδραση δικλοφενάκης. Μάρτυρες : αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κονιέκλων, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη : δεξιοί κερατοειδείς (δικλοφενάκη +) μη ακτινοβολημένων κονιέκλων.

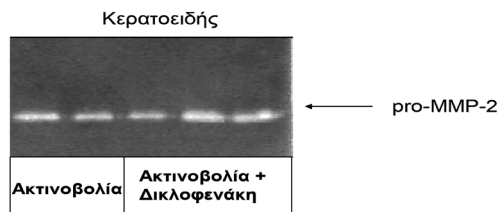
Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Διαπιστώνεται ότι η δικλοφενάκη από μόνη της (χωρίς δηλαδή επίδραση IR) δε έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων κονιέκλων και μη ακτινοβολημένων κονιέκλων στα οποία έγινε ενστάλαξη δικλοφενάκης. Μάρτυρες : αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κονιέκλων, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη : δεξιοί κερατοειδείς (δικλοφενάκη +) μη ακτινοβολημένων κονιέκλων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο± SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των μη ακτινοβολημένων κονιέκλων υπολογισμένη από 4 μη ακτινοβολημένους κονιέκλους.

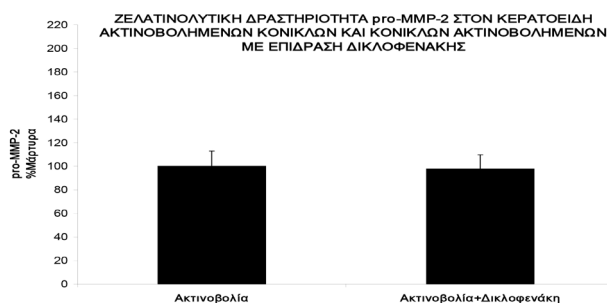
- Στη συνέχεια μελετήθηκε, αν η τοπική ενστάλαξη δικλοφενάκης επηρεάζει τις επιδράσεις που επιφέρει η οξεία έκθεση σε IR στη MMP-2 και MMP-9 στον κερατοειδή. Παρατηρήθηκε προηγουμένως ότι η οξεία έκθεση (12 h) σε IR των κονιέκλων επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή (Εικόνα 21,22).

Διαπιστώθηκε ότι η δικλοφενάκη δε φαίνεται να αναιρεί την επίδραση της IR στην δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς ακτινοβολημένων κονιέκλων και κονιέκλων ακτινοβολημένων με επίδραση δικλοφενάκης (οξεία έκθεση -12h). Ακτινοβολία: αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη -) ακτινοβολημένων κονιέκλων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη: δεξιοί κερατοειδείς (δικλοφενάκη +) ακτινοβολημένων κονιέκλων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Διαπιστώθηκε ότι η δικλοφενάκη δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την, επαγόμενη από την οξεία έκθεση σε IR, δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή ακτινοβολημένων κονιέκλων (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς ακτινοβολημένων (-12h) κονιέκλων και κονιέκλων ακτινοβολημένων (-12h) στα οποία έγινε ενστάλαξη δικλοφενάκης. Ακτινοβολία: αριστεροί κερατοειδείς (δικλοφενάκη-) ακτινοβολημένων κονιέκλων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη: δεξιοί κερατοειδείς (δικλοφενάκη +) ακτινοβολημένων κονιέκλων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο± SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των ακτινοβολημένων κονιέκλων υπολογισμένη από 4 ακτινοβολημένους κονιέκλους.

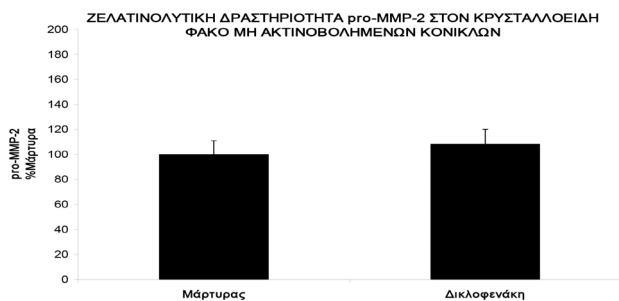
Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της δικλοφενάκης στην MMP-2 και MMP-9 στον κρυσταλλοειδή φακό μη ακτινοβολημένων κονικίων, συγκρίνοντας τους δεξιούς (δικλοφενάκη +) με τους αριστερούς (δικλοφενάκη -) φακούς τους.

Σε όλα τα δείγματα φακού μη ακτινοβολημένων κονικίων διαπιστώθηκε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2, ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της pro-MMP-9 και της MMP-9. Η δικλοφενάκη από μόνη της δε φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στην δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κρυσταλλοειδή φακό (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων κονικίων και μη ακτινοβολημένων κονικίων με επίδραση δικλοφενάκης. Μάρτυρες : αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κονικίων, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη : δεξιοί φακοί (δικλοφενάκη +) μη ακτινοβολημένων κονικίων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Διαπιστώνεται ότι η δικλοφενάκη από μόνη της (χωρίς επιδρασή IR) δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κρυσταλλοειδή φακό (Εικόνα 30).

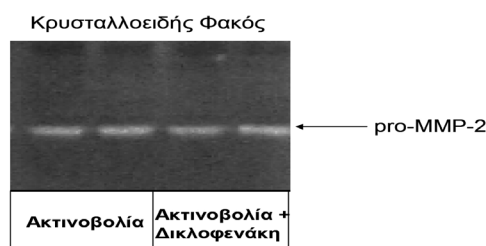


Εικόνα 30. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων κονικίων και μη ακτινοβολημένων κονικίων στα οποία έγινε ενστάλαξη δικλοφενάκης.

Μάρτυρες : αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) μη ακτινοβολημένων κονικίων, Μάρτυρες + Δικλοφενάκη : δεξιοί φακοί (δικλοφενάκη +) μη ακτινοβολημένων κονικίων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των μη ακτινοβολημένων κονικίων υπολογισμένη από 4 μη ακτινοβολημένους.

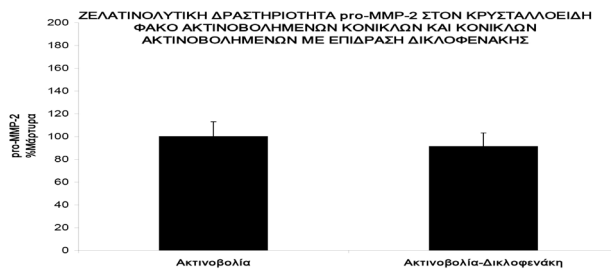
Ακολούθως μελετήθηκε, αν η τοπική ενστάλαξη δικλοφενάκης επηρεάζει τις επιδράσεις που επιφέρει η οξεία έκθεση σε IR στη MMP-2 και MMP-9 στον κρυσταλλοειδή φακό. Παρατηρήθηκε, προηγουμένως, ότι η οξεία έκθεση (12 h) σε IR των κονικίων επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό (Εικόνα 23,24).

Διαπιστώθηκε ότι η δικλοφενάκη φαίνεται να μειώνει κάπως την επαγόμενη από την IR δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό, χωρίς ωστόσο να είναι σημαντική η διαφορά (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού ακτινοβολημένων κονικίων και κονικίων ακτινοβολημένων με επίδραση δικλοφενάκης (οξεία έκθεση -12h). Ακτινοβολία: αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) ακτινοβολημένων κονικίων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη: δεξιοί φακοί (δικλοφενάκη +) ακτινοβολημένων κονικίων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Η δικλοφενάκη, ενώ φαίνεται να μειώνει την επαγόμενη από την IR δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό, η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 32).

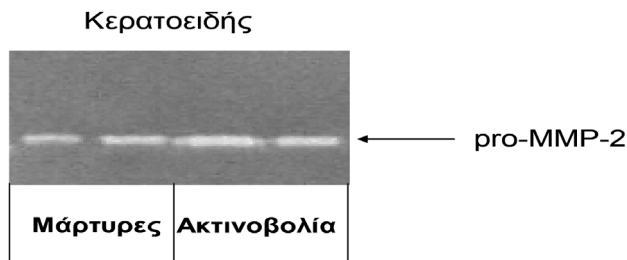


Εικόνα 32. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού ακτινοβολημένων (-12h) κονικίων και κονικίων ακτινοβολημένων (-12h) στα οποία έγινε ενστάλαξη δικλοφενάκης. Ακτινοβολία : αριστεροί φακοί (δικλοφενάκη -) ακτινοβολημένων κονικίων, Ακτινοβολία + Δικλοφενάκη : δεξιοί φακοί (δικλοφενάκη +) ακτινοβολημένων κονικίων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των ακτινοβολημένων κονικίων υπολογισμένη από 4 ακτινοβολημένους κονικίους.

## 6 Προσδιορισμός δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) που εντοπίζονται στον κερατοειδή και στον κρυσταλλοειδή φακό κονίκλων μετά από χρόνια έκθεση τους σε υπέρυθη ακτινοβολία, με ζυμογραφία ζελατίνης

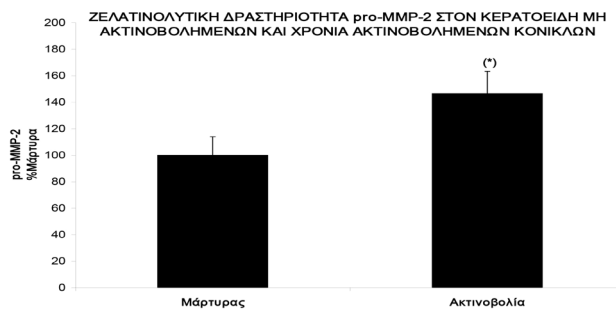
Μετά τη μελέτη της επίδρασης της οξείας έκθεσης (12h) σε IR στον κερατοειδή και κρυσταλλοειδή φακό των κονίκλων θεωρήθηκε σημαντικό να μελετηθεί η επίδραση της χρόνιας έκθεσης σε IR (4 μήνες). Για το λόγο αυτό μετά τη λήψη των κερατοειδών και των κρυσταλλοειδών φακών των κονίκλων που εκτέθηκαν σε IR για 4 μήνες (χρόνια έκθεση) καθώς και των μαρτύρων τους, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση τους με 1.5 mL PBS (παρ. παρ.7.3.2). Έγινε μέτρηση πρωτεϊνών (παρ.7.3.12) και για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 3μg ολικής πρωτεΐνης, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα και στη συνέχεια ελέγχθηκε η δραστηριότητά τους με ζυμογραφία ζελατίνης.

Στα δείγματα κερατοειδή από τους κόνικλες, ακτινοβοληθέντες και μη, η ζυμογραφία έδειξε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2 ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της pro-MMP-9 και της MMP-9. Φαίνεται ότι η χρόνια έκθεση σε IR αυξάνει τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή (Εικόνα 33).



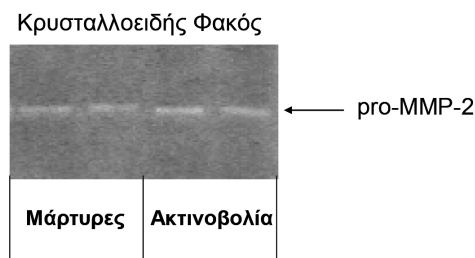
Εικόνα 33. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονίκλων (χρόνια έκθεση - 4μήνες). Μάρτυρες : κερατοειδείς μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία : κερατοειδείς ακτινοβολημένων κονίκλων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Διαπιστώθηκε ότι η χρόνια έκθεση (4 μήνες) σε ακτινοβολία IR των κονίκλων επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή (Εικόνα 34).



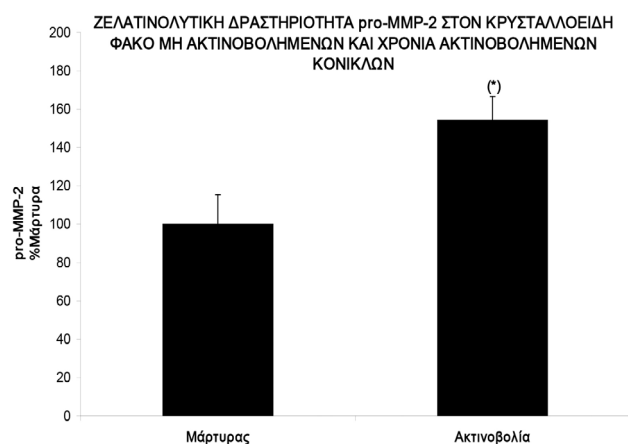
Εικόνα 34. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κερατοειδούς μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονίκλων (χρόνια έκθεση - 4μήνες). Μάρτυρες : κερατοειδείς μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία : κερατοειδείς ακτινοβολημένων κονίκλων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο ± SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των μη ακτινοβολημένων κονίκλων υπολογισμένη από 3 μη ακτινοβολημένους και 3 ακτινοβολημένους κόνικλους (n=6), (\*) p < 0,05.

Στα δείγματα φακού από τους κόνικλες, ακτινοβοληθέντες και μη, η ζυμογραφία έδειξε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2 ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της pro-MMP-9 και της MMP-9 (Εικόνα 35). Φαίνεται ότι η χρόνια έκθεση σε IR αυξάνει τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό.



Εικόνα 35. Αντιπροσωπευτική ζυμογραφία όπου εμφανίζεται η ζελατινολυτική δραστηριότητα της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονίκλων (χρόνια έκθεση - 4μήνες). Μάρτυρες : φακοί μη ακτινοβολημένων κονίκλων, Ακτινοβολία : φακοί ακτινοβολημένων κονίκλων.

Η ένταση από κάθε ζώνη ποσοτικοποιήθηκε με πυκνομετρία σάρωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα υπολογιστή 1D Image Analysis Software, version 3.0 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak, Rochester, NY). Η χρόνια έκθεση (4 μήνες) σε IR των κονίκλων επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κρυσταλλοειδή φακό (Εικόνα 36).



**Εικόνα 36. Ποσοτικοποίηση της ζελατινολυτικής δραστηριότητας της pro-MMP-2 από ομογενοποιημένο διάλυμα κρυσταλλοειδούς φακού μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κονικίων (χρόνια έκθεση). Η χρόνια έκθεση συνίσταται σε έκθεση των κονικίων σε IR ακτινοβολία για 4 μήνες. Μάρτυρες : φακοί μη ακτινοβολημένων κονικίων, Ακτινοβολία : φακοί ακτινοβολημένων κονικίων. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο ± SEM τριπλών προσδιορισμών της ζελατινολυτικής δραστηριότητας σε % των μη ακτινοβολημένων κονικίων υπολογισμένη από 3 μη ακτινοβολημένους και 3 ακτινοβολημένους κονικίους (n=6), (\*) p< 0,05.**

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ήλιος, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί την κύρια πηγή οπτικής ακτινοβολίας στη φύση εκπέμποντας υπεριώδη, ορατή και υπέρυθη ακτινοβολία, μεγάλο ποσοστό των οποίων φθάνει στην επιφάνεια της Γης. Όσον αφορά στο υπέρυθρο φάσμα, υπάρχουν παράλληλα και τεχνητές πηγές οπτικής ακτινοβολίας όπως π.χ. κλιβανοί, θερμάστρες, λάμπες, συσκευές ψησίματος κ.α. στις οποίες είναι δυνατόν να είναι εκτεθειμένα διάφορα άτομα, ηθελημένα ή μη, και η έκθεσή τους αυτή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις να ξεπερνά κατά μεγάλο βαθμό τα «φυσιολογικά» επίπεδα<sup>1</sup>. Η έρευνα των Lydhal και Philipson (1984) κατέδειξε ότι η επαγγελματική έκθεση σε υψηλά επίπεδα υπέρυθρης ακτινοβολίας συνδυάζεται με έναν σαφώς αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση καταρράκτη σε συνδυασμό όμως με την αναμφισβήτητη και κυρίαρχη επίδραση της αυξημένης ηλικίας στην ανάπτυξη των καταρρακτικών αλλοιώσεων<sup>3</sup>. Στον αμφιβληστροειδή χιτώνα η κύρια επιπλοκή που είναι δυνατόν να εμφανισθεί από την άμεση όραση έντονων πηγών οπτικής ακτινοβολίας με μικρό μήκος κύματος, στην περιοχή δηλαδή του ιώδους και του κυ-

ανού, είναι η φωτοαμφιβληστροειδοπάθεια που οφείλεται στις φωτοχημικές αντιδράσεις, ενώ ακτινοβολίες με μεγαλύτερα μήκη κύματος, μεταξύ 380 και 1400, μπορούν να προκαλέσουν θερμικές βλάβες<sup>5,6,7</sup>.

Η μελέτη των επιδράσεων της UV και της IR στους διάφορους ιστούς του οφθαλμού και μη και η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων είναι δυνατόν αυτές να εμφανιστούν έχει κατά το παρελθόν αποτελέσει και συνεχίζει και στις μέρες μας να αποτελεί ένα ευρύ αντικείμενο έρευνας. Απώτερος σκοπός των ερευνών αυτών είναι βέβαια η συμβολή στην προσπάθεια για την αποφυγή πρόκλησης διαφόρων βλαβών λόγω της ηθελημένης ή μη έκθεσης του οφθαλμού σε αυτές τις ακτινοβολίες<sup>1</sup>. Στη μελέτη των Di Girolamo N, Coroneo MT et al, κύτταρα πτερυγίου και επιθηλιακά κύτταρα, επιπεφυκότος του σκληροκερατοειδούς ορίου ανακαλλιέργηθηκαν και εκτέθηκαν σε διάφορες ποσότητες UVB ακτινοβολίας, όπου παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη από τη δόση και το χρόνο αύξηση της MMP-1<sup>91</sup>. Η έρευνα των Sachdev N, Di Girolamo N et al αποκάλυψε ότι η UVB ακτινοβολία αύξησε την έκφραση της MMP-1 σε επιθηλιακά κύτταρα φακού ανθρώπου, ότι υπάρχει συγκεκριμένη εντόπιση της MMP-1 στο επιθήλιο και σε φακικές ίνες ανθρώπινου κρυσταλλοειδούς φακού με φλοιώδη καταρράκτη κι ότι οι κυτοκίνες αύξησαν την έκφραση των MMP-2,-3 και -9<sup>92</sup>. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση του ανθρώπινου σώματος σε UV επάγει την έκφραση των MMPs με επακόλουθο την αποδόμηση του κολλαγόνου και τελικά την διαταραγμένη δομική συνοχή της επιδερμίδας. Ανεπαρκής επιδιόρθωση και επανειλημμένη έκθεση σε UV οδηγεί σε αθροιστική βλάβη του συνδετικού ιστού, που είναι παθοφυσιολογικός παράγοντας-κλειδί στη φωτογήρανση<sup>93,94,95,96</sup>, ενώ τα κύτταρα αντιδρούν στην ακτινοβολία με UV με ενεργοποίηση διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, όπως είναι οι MAPKs<sup>97</sup>. Όσον αφορά την IR, σε πρόσφατη έρευνα παρατηρήθηκε ότι, σε απάντηση στην IR-A, ινοβλάστες δέρματος ανθρώπου παρουσίασαν μια χρονο- και δόσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης της κολλαγενάσης (MMP-1), ενώ η έκφραση του ενδογενούς αναστολέα της, TIMP-1, δεν παρουσίασε αύξηση. Παρόμοια με την UVA και UVB, η IR-A προκάλεσε ταχεία ενεργοποίηση των οδών που συμμετέχουν η ERK1/2 και p38 πρωτεϊνικές κινάσες<sup>106</sup>. Άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος ανθρώπου απέδειξε ότι η έκθεση σε IR οδηγεί στην έκλυση της MMP-1, της MMP-3 και των πρωτεϊνικών κινασών ERK, c-JNK και p38 MAPK, εκ των οποίων οι δύο πρώτες παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην έκλυση των MMP-1 και MMP-3, καθώς κι αύξηση της σύνθεσης και ελευθέρωσης της IL-6, η οποία, μέσω ενός αυτοκρινούς μηχανισμού μη επαρκώς απο-

σαφηνισμένου ακόμη, συμβάλλει επίσης στην έκλυση των MMP-1 και MMP-3<sup>107</sup>. Η μελέτη των Kim MS, Kim YK et al σε δέρμα γλουτού νέων ανθρώπων κατέδειξε ότι μια μοναδική δόση IR αύξησε την έκφραση του προκαλαγγόνου τύπου-1 εντός διαστήματος 24 ωρών, αλλά δεν μετέβαλε την έκφραση της MMP-1, ενώ πολλαπλές δόσεις IR ελάττωσαν την έκφραση του προκολλαγόνου τύπου-1 και αύξησαν αυτήν της MMP-1, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με βλάβη του συνδετικού ιστού που μπορεί να οδηγήσει ενδεχομένως σε πρόωρη γήρανση του δέρματος (φωτογήρανση) ανθρώπων *in vivo*<sup>108</sup>.

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι η IR προκαλεί μεταβολές σε στοιχεία του εξωκυτταρίου χώρου, όπως είναι οι MMPs ίσως και σε άλλα, όπως για παράδειγμα οι GAGs, και με αυτόν τον τρόπο ενδεχομένως να ασκεί τελικά και τις βλαπτικές της δράσεις στους ιστούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής εργασίες που να έχουν μελετήσει τον πιθανό μηχανισμό πρόκλησης βλαβών στον οφθαλμό από την IR και την επίδραση που μπορεί να επιφέρει η έκθεση σε IR στις MMPs και τις GAGs. Σε αυτό το πλαίσιο, λοιπόν, σχεδιάστηκε η παρούσα εργασία, με στόχο την μελέτη της επίδρασης της οξείας και χρόνιας έκθεσης της IR σε μόρια του εξωκυτταρίου χώρου και συγκεκριμένα στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κοκίλων.

Είναι εξάλλου γνωστό, ότι οι MMPs αποτελούν οικογένεια ενζύμων ικανών να διασπούν συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας των ιστών παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των ιστών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, καθώς και στην καταστροφή της αρχιτεκτονικής τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στην οστεοαρθρίτιδα, στις αυτοάνοσες φυσαλιδώδεις δερματικές διαταραχές, στη φωτογήρανση του δέρματος και στις μεταστάσεις όγκων<sup>29,30,31</sup>. Φαίνεται ότι εμπλέκονται επίσης και στην παθογένεια σειράς αλλοιώσεων στον οφθαλμό, όπως στην νεοαγγείωση αμφιβληστροειδούς, χοριοειδούς και κερατοειδούς<sup>32</sup>, στη μορφολογία του γωνιακού δικτυωτού (trabeculum) και στο γλαύκωμα<sup>33</sup>, στις εκφυλιστικές παθήσεις του βυθού, όπως στη δυστροφία Sorsby<sup>34</sup>, στις μεταστάσεις όγκων και στην επούλωση τραυμάτων<sup>35</sup>, καθώς επίσης και στις ραγοειδίτιδες<sup>36</sup>. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν επίσης, ότι οι MMPs διασπούν αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, χυμοκίνες και τους υποδοχείς τους και μπορούν με τον τρόπο αυτό να ρυθμίζουν την απάντηση των κυττάρων σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες καθώς και την φλεγμονώδη αντίδραση<sup>31</sup>.

Οι βιολογικές λειτουργίες των GAGs, από την άλλη, κυμαίνονται από σχετικά απλές μηχανικές υποστηρικτικές λειτουργίες μέχρι περίπλοκες επιδράσεις σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η κυτταρική

ένωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Οι επιδράσεις αυτές οφείλονται στην ικανότητα τους να δρουν ως υποδοχείς διαφόρων ουσιών, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και μια ποικιλία ενζύμων περιλαμβανομένων διαφόρων πρωτεασών και ενζύμων συγκόλλησης<sup>22,23</sup>. Η διάταξη των κολλαγόνων ινιδίων και των GAGs στο στρώμα του κερατοειδούς είναι σημαντικά στη διατήρηση της διαύγειας του<sup>24</sup>. Σε κερατοειδείς με οίδημα του στρώματος έχει παρατηρηθεί απώλεια GAGs<sup>25</sup>, ενώ σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκαν ελαττωμένα ποσά θειικής ηπαράνης, θειικής χονδροϊτίνης και θειικής δερματάνης στο περιφάκιο καταρρακτικών φακών<sup>26</sup>.

Στην μελέτη που πραγματοποιήσαμε διερευνήθηκε κι ο ρόλος των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών, και συγκεκριμένα της θειικής δικλοφενάκης, ενός μη ειδικού αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης (COX), αν μπορεί δηλαδή να ελαττώσει ή και να εμποδίσει ακόμα τις αλλαγές που επιφέρει η έκθεση σε IR στις MMPs και GAGs. Κι αυτό γιατί, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι MMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση<sup>31</sup>, η οποία αποτελείται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση διαφόρων βιοχημικών μεσολαβητών<sup>65</sup>. Έχει αποδειχθεί η συμμετοχή της COX-2 στην έκλυση MMPs κατά τη διάρκεια τραύματος του κερατικού επιθηλίου, ενός ερεθίσματος δηλαδή που εκλύει την φλεγμονώδη αντίδραση<sup>65</sup>. Η μελέτη του Ottino P et al έδειξε έκλυση της COX-2 και των MMP-1 και MMP-9 στον κερατοειδή μετά από χορήγηση παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Η έκλυση της COX-2 ύστερα από τη χορήγηση του PAF και η επακόλουθη απελευθέρωση εικοσανοειδών ενδεχομένως να διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην έκλυση της MMP-1 και της MMP-9. Ειδική, επομένως, αναστολή της COX-2 θα μπορούσε να μπλοκάρει αυτές τις επιδράσεις<sup>87</sup>. Σύμφωνα με την έρευνα του Pan MR et al, η αύξηση της COX-2 σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου ενεργοποιεί τις MMPs και αυξάνει την πιθανότητα μετάστασης<sup>86</sup>. Η προσθήκη, επίσης, σε καλλιέργειες εμβρυϊκών ηπατοκυττάρων ποντικού προφλεγμονωδών κυτοκινών, λιποπολυσακχαριτών και αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρου προώθησε την έκφραση της COX-2, την σύνθεση υψηλών ποσοτήτων προσταγλανδινών και την έκλυση της MMP-2 και MMP-9. Αυτή η διαδικασία όμως αναστάλη όταν η σύνθεση των προσταγλανδινών εμποδίστηκε φαρμακολογικά με COX-2 αναστολείς<sup>85</sup>.

Όσον αφορά την επίδραση της COX αναστολής στο μεταβολισμό των GAGs, η μελέτη των Bjelle A και Eronen I, όπου χρησιμοποιήθηκαν χονδροκύτταρα από τα οπίσθια πόδια κοκίλων, κατέδειξε ότι έξι διαφορετικά NSAIDs, μεταξύ αυτών και η θειική δικλοφενάκη, ανέστλησαν σημαντικά την συνολική ενσωμάτωση



του 35S στις GAGs. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις κανένα από τα NSAIDs δεν επηρέασε σημαντικά το μεταβολισμό των χονδροκυττάρων αναφορικά με τις GAGs. Η επίδραση των NSAIDs στο μεταβολισμό τις θειικής κερατάνης ήταν ποικίλλη<sup>88</sup>. Αναφέρθηκε επίσης, ότι οι Eronen I και Videman T μελέτησαν την επίδραση της θειικής δικλοφενάκης στο μεταβολισμό των GAGs σε κουνέλια κατά τη διάρκεια ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας στο γόνατο εξαιτίας ακινητοποίησής τους. Η θειική δικλοφενάκη δεν ανέστλη in vivo το μεταβολισμό των θειικών GAGs, σύμφωνα με τις μετρήσεις της ενσωμάτωσης του 35S σε αυτές. Τα υγιή κουνέλια στα οποία δόθηκε θειική δικλοφενάκη εμφάνισαν μόνο οριακές αλλαγές στην περιεκτικότητα των GAGs στις αρθρώσεις. Η θειική δικλοφενάκη δεν απέτρεψε την απώλεια των GAGs από τους χόνδρους στα ακινητοποιημένα γόνατα, ενώ προκάλεσε περαιτέρω απώλεια της θειικής χονδροϊτίνης συνοδευόμενη από αύξηση του ναουροϊκού οξέος στους ιστούς. Τέλος, η θειική δικλοφενάκη εμπόδισε τη συσσώρευση των GAGs, η οποία συμβαίνει φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας σε περιοχές όπως είναι τα σημεία έκφυσης και κατάφυσης των πλαγίων συνδέσμων<sup>89</sup>.

Υπενθυμίζεται ότι στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της οξείας και της χρόνιας έκθεσης σε IRA στη MMP-2, στη MMP-9 και τις GAGs στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονιζών. Στην οξεία έκθεση μελετήθηκε συγχρόνως και η επίδραση της COX αναστολής με την τοπική ενστάλαξη σταγόνων θειικής δικλοφενάκης 0,1% : μία ώρα πριν την ακτινοβολία ενστάλαξη μίας σταγόνας ανά τριάντα λεπτά και στη συνέχεια, κατά την έκθεση σε IR, εφαρμογή μιας σταγόνας κάθε τέσσερις ώρες και τέλος, μετά το πέρας αυτής, ανά έξι ώρες για τις επόμενες δώδεκα ώρες. Για την ενστάλαξη των σταγόνων δικλοφενάκης στηριχθήκαμε στις εργασίες των Hayasaka Y, Hayasaka S et al και των Tomas-Barberan S, Torngrén L et al. Η πρώτη διερεύνησε το ρόλο της τοπικής ενστάλαξης αντιφλεγμονωδών και αντιαλλεργικών παραγόντων στην επαγόμενη από προσταγλανδίνη E2 (PGE2) πειραματική αύξηση της αντίδρασης στον πρόσθιο θάλαμο οφθαλμών κονιζών. Διπλή ενστάλαξη 0,1% θειικής δικλοφενάκης τέσσερις και δύο ώρες πριν την εφαρμογή της PGE2 δεν εμπόδισε την αύξηση της αντίδρασης, ενώ μονήρης ενστάλαξη μία ώρα πριν την εφαρμογή της PGE2 εμπόδισε την αύξησή της κατά 24%±/9 %<sup>118</sup>. Η δεύτερη εργασία μελέτησε τις συγκεντρώσεις μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (προσταγλανδίνη E2, 6-κετο προσταγλανδίνη F1 άλφα, θρομβοξάνη B2) καθώς και την διήθηση λευκοκυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο κονιζών μετά την εφαρμογή excimer laser κερατεκτομής. Διερευνήθηκε, επίσης, η ικανότητα της τοπικής

ενστάλαξης δικλοφενάκης να αναστείλει την έκλυση προσταγλανδίνης E2 στον πρόσθιο θάλαμο. Μία σταγόνα δικλοφενάκης ενσταλάχθηκε κάθε τέσσερις ώρες και η προσταγλανδίνη E2 μετρήθηκε δεκαέξι ώρες μετεγχειρητικά. Το συμπέρασμα ήταν ότι εφαρμογή μιας σταγόνας δικλοφενάκης κάθε τέσσερις ώρες εμπόδισε την απελευθέρωση προσταγλανδίνης E2 στον πρόσθιο θάλαμο<sup>119</sup>.

Ανακεφαλαιώνοντας λοιπόν, τα συμπεράσματα που εξήχθηκαν από την παρούσα μελέτη συνοψίζονται στα εξής:

1) Όσον αφορά στις **MMP-2 και MMP-9**:

- Η ζυμογραφία ζελατίνης σε όλα τα δείγματα κερατοειδούς και φακού (ακτινοβοληθέντα και μη) και της χρόνιας και της οξείας έκθεσης έδειξε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2, ενώ απουσιάζει τελείως η δράση της pro-MMP-9 και της MMP-9.

- Η IR επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή και τον φακό τόσο στην οξεία όσο και στην χρόνια έκθεση.

- Η δικλοφενάκη από μόνη της (χωρίς δηλαδή IR) δε φαίνεται να έχει κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση στην δραστηριότητα της pro-MMP-2, ενώ δε φαίνεται επίσης να αναστέλλει στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από την IR δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον φακό και τον κερατοειδή στην οξεία έκθεση (υπενθυμίζεται ότι στην χρόνια έκθεση δεν μελετήθηκε η επίδραση της δικλοφενάκης).

Έχει επισημανθεί προηγουμένως ο ρόλος των MMPs σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις τόσο στον οφθαλμό όσο και σε άλλους ιστούς. Υπενθυμίζεται ότι στον κερατοειδή, η MMP-2 και η MMP-9 είναι τα κύρια ένζυμα διάσπασης του εξωκυττάρου στρώματος<sup>42,43</sup>, συμμετέχουν στην επαναδιαμόρφωσή του μετά από τραυματισμό της κερατικής επιφάνειας κι έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της άσηπτης κερατικής εξέλκωσης<sup>44</sup> και του ξηρού οφθαλμού<sup>45</sup>. Έχει διαπιστωθεί, επίσης, ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1β και TNF-α αυξάνουν την MMP-9 σε επίπεδο mRNA, πρωτεΐνης και ενζυματικής δραστηριότητας σε ανθρώπινα κερατικά επιθηλιακά κύτταρα<sup>46</sup>, όπως κι ότι ο ενοφθαλμισμός φακών με MMP-9 οδηγεί άμεσα σε καταρράκτη μέσω της διάσπασης της βήτα B1- κρυσταλλίνης<sup>47</sup>. Αυξημένη δραστηριότητα της MMP-2 και MMP-9 έχει βρεθεί ότι μπορεί να σχετίζεται με καταρρακτογένεση<sup>48</sup> και θόλωση του οπισθίου περιφακίου μετά από επέμβαση καταρράκτη<sup>48,49</sup>. Σε ασθένεις, επίσης, με υποτροπιάζουσες αποπτώσεις του κερατικού τους επιθηλίου έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση της MMP-2 στα επιθηλιακά τους κύτταρα<sup>50</sup>. Σε κερατοειδείς κυνών με χρόνια επιφανειακή κερατίτιδα διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της MMP-2 και MMP-9 σε σχέση με φυσιο-

λογικούς κερατοειδείς, ενώ συγχρόνως η έκθεση σε UV φυσιολογικών κερατοειδών κυνών προκάλεσε ομοίως μια χρονο- και δόσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης των MMP-2 και MMP-9, σχετίζοντας με τον τρόπο αυτό την έκθεση σε UV ακτινοβολία με πρόκληση χρόνιας επιφανειακής κερατίτιδας<sup>51</sup>.

Η παρατηρούμενη αυτή αύξηση της δραστηριότητας της pro-MMP-2 με την επίδραση της IR, κι ενδεχομένως κι άλλων MMPs που δεν προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι πιθανόν να σηματοδοτεί την απαρχή πρόκλησης διαφόρων βλαβών, όπως για παράδειγμα αποπτώσεις επιθηλίου και ξηροφθαλμία στον κερατοειδή και καταρρακτογένεση στον φακό. Η αδυναμία της δικλοφενάκης να αναστείλλει στατιστικά σημαντικά την επαγωγή της pro-MMP-2 από την IR πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση οδών, στις οποίες η COX δεν λαμβάνει μέρος ή η συμμετοχή της είναι δευτερεύουσας σημασίας. Περισσότερες μελέτες στο μέλλον πιθανόν να αποσαφηνίσουν τους μηχανισμούς έκλυσης των MMPs συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην αναζήτηση αποτελεσματικών προληπτικών ή θεραπευτικών μέτρων.

## 2) Όσον αφορά στις **GAGs**:

- Σε όλα τα δείγματα κερατοειδή (ακτινοβολημένα και μη) και στην οξεία και στην χρόνια έκθεση ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό θειική κερατάνη και σε μικρότερα ποσοστά θειική ηπαράνη και θειική χονδροϊτίνη.

- Στα δείγματα του φακού (ακτινοβολημένα και μη) και στην οξεία και στην χρόνια έκθεση διαπιστώθηκαν κατά κύριο λόγο η θειική ηπαράνη και η θειική δερματάνη.

### **Κερατοειδής - Χρόνια έκθεση:**

- Δεν φαίνεται η χρόνια έκθεση σε IR να επηρεάζει ποσοτικά ή ποιοτικά τις GAGs στον κερατοειδή.

### **Κερατοειδής-Οξεία έκθεση:**

- Η οξεία έκθεση σε IR δεν προκάλεσε καμιά ποσοτική ή ποιοτική μεταβολή στις GAGs.

- Παρομοίως η χρήση δικλοφενάκης δεν είχε καμιά επίδραση με και χωρίς έκθεση σε IR.

### **Φακός - Χρόνια έκθεση:**

- Δεν φαίνεται η χρόνια έκθεση σε IR να επηρεάζει ποσοτικά ή ποιοτικά τις GAGs στον φακό.

### **Φακός-Οξεία έκθεση:**

- Η δικλοφενάκη από μόνη της (χωρίς IR) δεν προκάλεσε μεταβολή στις GAGs στον φακό των κονίκλων.

- Η έκθεση σε IR επάγει στατιστικώς σημαντικά το

ποσό της θειικής ηπαράνης που βρίσκεται στο φακό, ενώ η χρήση της δικλοφενάκης φαίνεται να προκαλεί μικρή μείωση του ποσού της θειικής ηπαράνης που επάγεται από την IR, ακόμα κι αν δεν είναι στατιστικά σημαντική η μείωση αυτή.

Η αύξηση αυτή της θειικής ηπαράνης κατά την οξεία έκθεση πιθανόν να αποκτά ιδιαίτερη σημασία αν αναλογιστούμε ότι υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν τις GAGs με καταρρακτογένεση. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί από τους Ishibashi T, Araki H et al ότι οι πρωτεογλυκάνες αποτελούν στοιχεία του ινώδους τύπου θλώσης του οπισθίου περιφακίου κρυσταλλοειδούς φακού ανθρώπων και συγκεκριμένα η θειική χονδροϊτίνη και η θειική δερματάνη εμπεριέχονται μέσα στα κολλαγόνα ινίδια, ενώ τα πολλαπλασιαζόμενα επιθηλιακά κύτταρα περιέχουν θειική ηπαράνη<sup>120</sup>. Η έρευνα του Hales AM et al έδειξε ότι κρυσταλλοειδείς φακοί ανθρώπων καλλιιεργούμενοι με TGF-β ανέπτυσαν διακριτές πρόσθιες θολερότητες ακριβώς κάτω από το πρόσθιο περιφάκιο. Ιστολογικά, αθροίσεις μη φυσιολογικών κυττάρων που περιείχαν συσσωρεύσεις κολλαγόνου τύπου I, λαμίνης και θειικής ηπαράνης αντιστοιχούσαν με τις θολερότητες αυτές<sup>121</sup>. Το 1997 η μελέτη των Sulochana KN, Ramakrishnan S et al αποτέλεσε την πρώτη αναφορά που συσχέτιζε τον συγγενή ή νεογνικό καταρράκτη με διαταραγμένο μεταβολισμό των πρωτεογλυκανών. Τα παιδιά αυτά παρουσίαζαν μια αύξηση της δραστηριότητας της βήτα-γλυκουρονιδάσης, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει εκτεταμένη κατάτμηση των GAGs, με επακόλουθο την συσσώρευση τους στο αίμα και στον φακό και την έκκρισή τους στα ούρα. Εξαιτίας της πολυανιωνικής φύσης τους, τα θραύσματα αυτά των GAGs στον φακό θα μπορούσαν να προσελκύσουν ιόντα Na<sup>+</sup> και μαζί με αυτά και νερό, αυξάνοντας την ενυδάτωση του φακού και προκαλώντας πιθανώς με τον τρόπο αυτό καταρράκτη<sup>122</sup>.

Παράλληλα, η έστω και μικρή και μη στατιστικά σημαντική αναστολή των επιδράσεων αυτών της IR χρησιμοποιώντας δικλοφενάκη, έναν αναστολέα της COX δηλαδή, θα μπορούσε να αποτελέσει μια πρώτη κατεύθυνση στην προσπάθεια πρόληψης, ή μέχρι ενός βαθμού και θεραπείας ακόμα, των βλαπτικών αυτών επιδράσεων της IR.

Επίσης, η διαφορά στον χρόνο ακτινοβολήσης μεταξύ οξείας και χρόνιας έκθεσης να ευθύνεται ενδεχομένως για τα διαφορετικά αποτελέσματα, ή πιθανόν κατά τη χρόνια έκθεση σε IR να ενεργοποιούνται αντιρροπτικοί μηχανισμοί, οι οποίοι να εξαλείφουν τις διαφορές που παρατηρούνται στην οξεία έκθεση.

Συμπερασματικά λοιπόν, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση της οξείας και της χρόνιας έκθεσης σε IR σε μόρια του εξωκυτταρίου

χώρου, και συγκεκριμένα στη MMP-2, τη MMP-9 και τις GAGs, στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονιόκλων, δεδομένου ότι δεν έχει μελετηθεί ακόμα η επίδραση της IR στον οφθαλμό, με αποτέλεσμα οι μηχανισμοί πρόκλησης των βλαβών που επιφέρει η έκθεση σε αυτήν να παραμένουν άγνωστοι. Διαπιστώθηκε ότι η IR επάγει στατιστικώς σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή και τον φακό, τόσο στην οξεία όσο και στην χρόνια έκθεση, καθώς κι ότι επάγει στατιστικώς σημαντικά το ποσό της θειικής ηπαράνης που βρίσκεται στο φακό κατά την οξεία έκθεση, με τη χρήση της θειικής δικλοφενάκης να μην μπορεί να επηρεάσει τις επιδράσεις αυτές της οξείας έκθεσης στην IR στην pro-MMP-2 και τη θειική ηπαράνη. Τα συμπεράσματα ενδεχομένως να αποκτούν ιδιαίτερη σημασία αναλογιζόμενοι τις βιολογικές δράσεις των παραπάνω μορίων αλλά και την αποδεδειγμένη βιβλιογραφικά συμμετοχή τους στην πρόκληση διαφόρων βλαβών στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό, όπως για παράδειγμα στην καταρρακτογένεση, στις αποπτώσεις και στην επούλωση τραυμάτων του κερατικού επιθηλίου και στη ξηροφθαλμία. Επιχειρείται δηλαδή, εκτός από τη συσχέτιση της έκθεσης σε IR και της πρόκλησης διαφόρων βλαβών στον οφθαλμό, και μια προσπάθεια αποσαφήνισης των πιθανών μηχανισμών πρόκλησης των βλαβών αυτών και συμβολής στον τομέα ανίχνευσης προληπτικών ή και θεραπευτικών μέτρων έναντι των βλαπτικών επιδράσεων της IR. Η διενέργεια φυσικά κι άλλων παρόμοιων μελετών κρίνεται απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης βλαβών από την έκθεση σε IR, καθώς και των πιθανών προληπτικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ήλιος αποτελεί την κύρια πηγή οπτικής ακτινοβολίας στη φύση εκπέμποντας υπεριώδη (UV), ορατή και υπέρυθη ακτινοβολία (IR), μεγάλο ποσοστό των οποίων φθάνει στην επιφάνεια της Γης. Υπάρχουν όμως παράλληλα και τεχνητές πηγές οπτικής ακτινοβολίας όπως π.χ. κλίβανοι, θερμάστρες, λάμπες, συσκευές ψησίματος κ.α. στις οποίες είναι δυνατόν να είναι εκτεθειμένα διάφορα άτομα, ηθελήμενα ή μη, και η έκθεση τους αυτή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις να ξεπερνά κατά μεγάλο βαθμό τα «φυσιολογικά» επίπεδα. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την έκθεση στην IR με πρόκληση διαφόρων βλαβών στους ιστούς του οφθαλμού, συμπεριλαμβανομένων της καταρρακτογένεσης, των θερμικών εγκαυμάτων του κερατοειδούς και του αμφιβληστροει-

δή και του δερματικού ερυθήματος ab igne.

Παρόλαυτά, λίγα είναι γνωστά μέχρι στιγμής για τους μηχανισμούς πρόκλησης των βλαβών αυτών από την IR, σε αντίθεση με την UV, όπου αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει την συμμετοχή μορίων του εξωκυτταρικού χώρου, μεταξύ αυτών και των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), στις βλαπτικές επιδράσεις της. Έρευνες πάντως σε ινοβλάστες δέρματος ανθρώπου δείχνουν ότι και η IR, όπως ακριβώς και η UV, φαίνεται να ασκεί τις βλαπτικές επιδράσεις της με παρόμοιο τρόπο, επηρεάζοντας δηλαδή κι αυτή μόρια του εξωκυτταρίου χώρου, όπως είναι οι MMPs.

Είναι γνωστό ότι οι MMPs ενοχοποιούνται σε διάφορες παθήσεις των ιστών του οφθαλμού, όπως σε καταρρακτογένεση, στην ξηροφθαλμία, στις αποπτώσεις του κερατικού επιθηλίου, ενώ παράλληλα κι άλλα μόρια του εξωκυτταρίου χώρου, όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs), φαίνεται να συμμετέχουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του οφθαλμού, όπως στην δημιουργία καταρράκτη και οιδήματος του κερατοειδούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής εργασίες που να έχουν μελετήσει τον πιθανό μηχανισμό πρόκλησης βλαβών στον οφθαλμό από την IR και την επίδραση που μπορεί να επιφέρει η έκθεση σε IR στις MMPs και τις GAGs.

Σε αυτό το πλαίσιο σχεδιάστηκε η παρούσα εργασία, με στόχο την μελέτη της επίδρασης της οξείας και χρόνιας έκθεσης της IR σε μόρια του εξωκυτταρίου χώρου και συγκεκριμένα στην MMP-2, την MMP-9 και τις GAGs (θειική κερατάνη, θειική δερματάνη, θειική χονροϊτίνη, θειική ηπαράνη, υαλουρονικό οξύ και ηπαρίνη) στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονιόκλων. Για την οξεία έκθεση χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες των τεσσάρων κονιόκλων. Η πρώτη ομάδα δεν ακτινοβολήθηκε και αποτέλεσε την ομάδα των μαρτύρων για τη δεύτερη ομάδα, της οποίας τα πειραματόζωα εκτέθηκαν στην IR για δώδεκα ώρες. Παράλληλα, στους δεξιούς οφθαλμούς των κονιόκλων αμφοτέρων των ομάδων έγινε ενστάλαξη οφθαλμικών σταγόνων θειικής δικλοφενάκης 0,1%, με σκοπό να προσδιορισθεί ο ρόλος της αναστολής της κυκλοοξυγενάσης (COX), χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες τους αριστερούς οφθαλμούς των κονιόκλων. Όσον αφορά στη μελέτη της χρόνιας έκθεσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες των τριών κονιόκλων. Η πρώτη αποτέλεσε την ομάδα των μαρτύρων, ενώ η δεύτερη εκτέθηκε σε IR για διάστημα τεσσάρων μηνών. Η ακτινοβολία διαρκούσε τέσσερις ώρες ημερησίως και πραγματοποιούταν κάθε εργάσιμη μέρα εξαιρουμένων των Σαββατοκύριακων. Κατόπιν αναισθητοποίησης των πειραματόζωων, ακολούθησε λήψη του κερατοειδούς και του κρυσταλλοειδούς φακού έκαστου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζυμογραφία ζελατίνης για

τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ζελατινασών ( MMP-2, MMP-9 ), καθώς και απομόνωση των GAGs και μέτρηση των ουρωνικών οξέων στα δείγματα, τα οποία τελικά ηλεκτροφορήθηκαν σε οξικές κυτταρίνες για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των GAGs.

Η ζυμογραφία ζελατίνης έδειξε δραστηριότητα κυρίως της pro-MMP-2 στα δείγματα από τον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό. Η IR διαπιστώθηκε ότι επάγει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα της pro-MMP-2 στον κερατοειδή και τον φακό τόσο στην οξεία όσο και στην χρόνια έκθεση, ενώ η θειική δικλοφενάκη δεν φαίνεται να αναστέλλει στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από την οξεία έκθεση σε IR δραστηριότητα αυτή της pro-MMP-2 στον φακό και τον κερατοειδή.

Όσον αφορά τις GAGs, στα δείγματα του κερατοειδή ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό θειική κερατάνη και σε μικρότερα ποσοστά θειική ηπαράνη και θειική χονδροϊτίνη, ενώ στα δείγματα του φακού διαπιστώθηκαν κατά κύριο λόγο η θειική ηπαράνη και η θειική δερματάνη. Η χρόνια έκθεση σε IR δε φάνηκε να επηρεάζει ποσοτικά ή ποιοτικά της GAGs στον κερατοειδή και τον φακό. Η οξεία έκθεση σε IR δεν προκάλεσε καμιά ποσοτική ή ποιοτική μεταβολή στις GAGs στον κερατοειδή, ενώ στον κρυσταλλοειδή φακό διαπιστώθηκε ότι επάγει στατιστικώς σημαντικά το ποσό της θειικής ηπαράνης, με τη χρήση της δικλοφενάκης να προκαλεί μικρή, αν κι όχι στατιστικά σημαντική, μείωση του ποσού της θειικής ηπαράνης που επάγεται από την IR.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η έκθεση σε IR μπορεί να επιφέρει αλλαγές σε μόρια του εξωκυτταρίου χώρου στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό κονίκλων, όπως είναι οι MMPs και οι GAGs. Συγκεκριμένα και η χρόνια και η οξεία έκθεση σε IR οδήγησε σε επαγωγή της δραστηριότητας της pro-MMP-2 τόσο στον φακό όσο και στον κερατοειδή, όπως επίσης η οξεία έκθεση σε IR αύξησε το ποσό της θειικής ηπαράνης στον φακό, με τη χρήση της δικλοφενάκης να μην μπορεί να αναστείλει στατιστικώς σημαντικά τις επιδράσεις αυτές κατά την οξεία έκθεση, όπου και μελετήθηκε. Αναλογιζόμενοι τις βιολογικές δράσεις των παραπάνω μορίων, αλλά και την αποδεδειγμένη βιβλιογραφικά συμμετοχή τους στην πρόκληση διαφόρων βλαβών στον κερατοειδή και τον κρυσταλλοειδή φακό, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, επιχειρήθηκε μια πρώτη συσχέτιση της έκθεσης σε IR και της πρόκλησης διαφόρων βλαβών στον οφθαλμό, καθώς και μια προσπάθεια αποσαφήνισης των πιθανών μηχανισμών πρόκλησης των βλαβών αυτών και συμβολής στον τομέα ανίχνευσης προληπτικών ή και θεραπευτικών μέτρων έναντι των βλαπτικών αυτών επιδράσεων της IR.

## SUMMARY

Sun is the main source of optical radiation in nature, emitting ultraviolet (UV), visible and infrared radiation (IR), large amount of which reaches Earth's surface. There are also artificial sources of IR radiation, such as furnaces, heaters, lamps etc, that many people are exposed to, deliberately or not, and this exposure can sometimes exceed "normal" limits. Several studies have tried to correlate the exposure to IR with several damages to ocular tissues, including cataract formation, corneal and retinal thermal burns and dermal erythema ab igne.

Nevertheless, little is known so far about the mechanisms involved in IR-induced tissue damages, in contrast to UV, where the interference of extracellular molecules, including matrix metalloproteinases (MMPs) have already been proven by many studies. Recent studies, however, using human dermal fibroblast, show that, similar to UV, IR probable exerts its harmful effects by affecting extracellular molecules, including MMPs.

It is known that MMPs are implicated in various diseases of ocular tissues, such as cataractogenesis, dry eye, corneal epithelial apoptosis, while other extracellular matrix molecules, such as glycosaminoglycans (GAGs), also appear to participate in various pathological ocular conditions, such as cataract formation and corneal edema. However, no work so far has studied the possible mechanism of IR-induced harmful effects to the eye and IR-exposure impact on MMPs and GAGs.

In this context, the objective of our study was to investigate the effect of acute and chronic exposure to IR on rabbit corneal and crystalline lens MMP-2, MMP-9 and GAGs (keratan sulfate, dermatan sulfate, chondroitin sulfate, heparan sulfate, hyaluronic acid and heparin). Two groups of four rabbits were used for acute exposure. The first group, which was not irradiated, was the control group for the second, the rabbits of which were exposed to IR for twelve hours. Furthermore, diclofenac sodium eye drops 0.1% were instilled in the right rabbit eye of both groups in order to determine the role of cyclooxygenase inhibition, using as controls the left eyes of the rabbits. As far as chronic exposure is concerned, two groups of three rabbits were used. The first was the control group, while the second was exposed to IR for a period of four months. The irradiation was lasting four hours and was taking place every working day except weekends. The cornea and the crystalline lens of each animal were extracted after anaesthesia, followed by gelatin zymography, in order to determine gelatinase activity (MMP-2, MMP-9), and GAGs isolation and measurement of uronic acids, which were finally electrophoresed on cellulose acetate membranes for the qualitative and quantitative

analysis of GAGs.

Gelatin zymography revealed mainly pro-MMP-2 activity in all samples. IR was found to induce the activity of corneal and lens pro-MMP-2 in a statistically significant manner, after both acute and chronic exposure, while diclofenac sodium did not appear to inhibit this induction during acute IR exposure, where the role of which was investigated.

As far as GAGs are concerned, keratan sulphate was mainly detected in corneal samples followed by heparan sulfate and chondroitin sulfate, whereas in lens samples heparan sulfate and dermatan sulfate were found predominantly. Chronic exposure to IR did not appear to have any effect on corneal and lens GAGs. Acute exposure to IR induced the amount of lens heparan sulfate in a statistically significant manner, whereas there were no quantitative or qualitative changes to be detected in corneal samples. The use of diclofenac sulfate did not appear to affect acute IR exposure effects.

In conclusion, the results of this study suggest that chronic IR exposure induced corneal and crystalline lens pro-MMP-2. Regarding acute IR exposure, an up-regulation of corneal and lens pro-MMP-2, as well as lens heparan sulphate amount was reported, with the use of diclofenac sodium to be unable to inhibit or reduce IR induced effects in a statistically significant manner. Considering the biological roles of these molecules and their scientifically proven participation in many ocular diseases, as previously mentioned, a first attempt was made to correlate them with IR exposure, so as to exploit possible mechanisms involved in various pathological ocular conditions and to contribute to the field of preventive and therapeutic solutions against IR potentially harmful effects.

*Key words: Cornea, infrared radiation, crystalline lens, cyclooxygenase inhibition.*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boettner EA, Walter JR. Transmission of the ocular media. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; 1:776-783.
2. Doughty MJ, Oriowo OM, Cullen AP. Morphometry of the corneal endothelium in glassblowers compared to non-glassblowers. *J Photochem Photobiol B* 2002; 67:130-138.
3. Lydahl E, Glansholm A. Infrared radiation and cataract III. Differences between the two eyes of glass workers. *Acta Ophthalmol* 1985; 63:39-44.
4. Pitts DG, Cullen AP. Determination of infrared radiation levels for acute ocular cataractogenesis. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1981; 217:285-297.
5. Brittain GP. Retinal burns caused by exposure to MIG-welding arcs: report of two cases. *Br J Ophthalmol* 1988; 72:570-575.
6. Fich M, Dahl H, Fledelius H, Tinning S. Maculopathy caused by welding arcs. A report of 3 cases. *Acta Ophthalmol* 1993; 71:402-404.
7. de Lint PJ, van Norren D, Toebosch AM. Effect of body temperature on threshold for retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:2382-2387.
8. Findlayson GR, Sams WM Jr, Smith JG. Erythema ab igne. A histopathological study. *J Invest Dermatol* 1966; 46:104-107.
9. Arrington JH III, Lockman DS. Thermal keratoses and squamous cell carcinoma in situ associated with erythema ab igne. *Arch Dermatol* 1979; 115:1226-1228.
10. Rudolf CM, Soyer HP, Wolf P, Kerl H. Squamous epithelial carcinoma in erythema ab igne. *Hautarzt* 2000; 51:260-263.
11. Cross F. On a turf (peat) fire cancer: malignant change superimposed on erythema ab igne. *Proc R Soc Med* 1967; 60:1307-1308.
12. Hewitt JB, Sherif A, Kerr KM, Stankler L. Merkel cell and squamous-cell carcinomas arising in erythema ab ignes. *Br J Dermatol* 1993; 128:591-592.
13. Jones CS, Tying SK, Lee PC, Fine JD. Development of neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma mixed with squamous-cell carcinoma in erythema ab igne. *Arch Dermatol* 1988; 124:110-113.
14. Peterkin GAG. Malignant changes in erythema ab igne. *Br Med J* 1955; J2:1599-1602.
15. Moses, Robert A, Hart, William M. *Adler's Physiology of the Eye - Clinical application* 1987.
16. Berman, Elaine R. *Biochemistry of the Eye* 1991.
17. Στάγκος Ν. *Κλινική Οφθαλμολογία* 2002;45-48.
18. Silbert JE, Sugumaran G. A starting place for the road to function. *Glycoconj J* 2002; 19(4-5):227-237.
19. Scott JE. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J* 1992; 6(9):2639-2645.
20. Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:443-475.
21. Bruce A, Dennis B, Julian L, Martin R, Keith R, James WD. In: *Molecular Biology of the Cell*, 1994. Third Edition. Garland Publishing.
22. *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9:553-566.
23. *Biochemical Journal* 1996; 316:1-11.
24. Hirooka M, Igarashi O, Nagayasu A, Minaguchi J, Hosaka YZ, Ueda H, Tangkawattana P, Takehana K. Morphological and biochemical analysis of intact and opaque cornea in dogs. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2010; 87(2):59-64.
25. Kangas TA, Edelhauser HF, Twining SS, O'Brien WJ. Loss of stromal glycosaminoglycans during corneal edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(10):1994-2002.
26. Winkler J, Wirbelauer C, Frank V, Laqua H. Quantative distribution of glycosaminoglycans in young and senile (cataractous) anterior lens capsules. *Exp Eye Res* 2001;

72(3):311-318.

27. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases 18. *Br J Surg* 1997; 84(2):160-166.

28. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases 48. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-21494.

29. Nagase H, Woessner J F Jr. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-21494.

30. Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:5-15.

31. Sternlicht MD, WerbZ. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.

32. Moses M. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997; 15:180-189.

33. Yan X, Edward DP, Wax MB. Matrix metalloproteinases in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:917.

34. Weber BHF, Vogt G, Pruetz RC, Stohr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet* 1994; 8:352-356.

35. Woessner JF. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP, eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press 1998; 1-14

36. Girolamo ND, Verna MJ, McCluskey PJ, Llod A, Wakefield D. Increased matrix metalloproteinases in the aqueous humor of patients and experimental animals with uveitis. *Cyrr Eye Res* 1996; 15:1060-1068.

37. Huang SH, Adamis AP, Wiederschain DG, Shima DT, Shima Y, Moses MA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor. *Exp Eye Res* 1996; 62:481-490.

38. De La Paz M, Yoshimuti I, Toth CA, Nagase H. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:1256-1260.

39. Planter JJ, Smine A, Quinn TA. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in human interphotoreceptor matrix and vitreous. *Cyrr Eye Res* 1998; 17:132-140.

40. Padgett LC, Lui GM, Werb Z, La Vail MM. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: vectorial secretion and regulation. *Exp Eye Res* 1997; 64:927-938.

41. Immonen I, Konttinen YT, Sorsa T, Tommila P, Siren V. Proteinases in subretinal fluid. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234:105-109.

42. Fini ME, Girard MT, Matsubara M, Bartlett JD. Unique regulation of the matrix metalloproteinase, gelatinase B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:622-633.

43. Meller D, Li DQ, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin and gelatinase B in human conjunctival and conjunctivochalasis fibroblasts by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

2000; 41:2922-2929.

44. Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:12-23.

45. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2506-2512.

46. Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2001; 73:449-459.

47. Descamps FJ, Martens E, Proost P, Starckx S, et al. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 provokes cataract by cleaving lens beta B1 crystallin. *FASEB J* 2005; 19(1):29-35.

48. Tamiya S, Wormstone IM, Marcantonio JM, Gavrilovic J, Duncan G. Induction of matrix metalloproteinases 2 and 9 following stress to the lens. *Exp Eye Res* 2000; 71(6):591-597.

49. Awasthi N, Wang-Su ST, Wagner BJ. Downregulation of MMP-2 and -9 by proteasome inhibition: a possible mechanism to decrease LEC migration and prevent posterior capsular opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(5):1998-2003.

50. Garrana RM, Zieske JD, Assouline M, Gipson IK. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(6):1266-1270.

51. Chandler HL, Kusewitt DF, Colitz CM. Modulation of matrix metalloproteinases by ultraviolet radiation in the canine cornea. *Vet Ophthalmol* 2008; 11(3):135-144.

52. Kahari VM, Saarialho - Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31:34-45.

53. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271:1544-1550.

54. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5:2145-2154.

55. Murphy G, Docherty AJP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7:120-125.

56. Ye HQ, Maeda M, Yu FS, Azar DT. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2894-2899.

57. Li DQ, Lee S-B, Gunja-Smith Z, et al. Overexpression of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) by pterygium head fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:71-80.

58. Li DQ, Shang TY, Kim H-S, Solomon A, Lokeshwar

- BL, Pflugfelder SC. Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2928-2936.
59. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271:33157-33160.
60. Rosen GD, Birkenmeier TM, Raz A, Holtzman MJ. Identification of a cyclooxygenase-related gene and its potential role in prostaglandin formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:1358-1365.
61. Seibert K, Masferrer JL. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor* 1994; 4:17-23.
62. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2692-2696.
63. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatology* 1997; 24:15-19.
64. Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL, Smith WL. Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem* 1994; 269:13207-13215.
65. Karon MD, Klyce SD. Effect of Inhibition of Inflammatory Mediators on Trauma - Induced Stromal Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2507-2511.
66. Kangas TA, Edelhauser HF, Twining SS, O'Brien WJ. Loss of stromal glycosaminoglycans during corneal edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:1994-2002.
67. Kim WJ, Shah S, Wilson SE. Differences in keratocyte apoptosis following transepithelial and laser - scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *Exp Eye Res* 1999; 68:377-397.
68. Lu PC, Ye H, Maeda M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:20-27.
69. Sotozono C, He J, Tei M, Honma Y, Kinoshita S. Effect of metalloproteinase inhibitor on corneal cytokine expression after alkali injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2430-2434.
70. Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996; 62:325-327.
71. Wilson SE, Li Q, Weng J, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:1582-1592.
72. Wilson SE, Pedroza L, Beuerman R, Hill JM. Herpes simplex virus type-1 infection of corneal epithelial cells induces apoptosis of the underlying keratocytes. *Exp Eye Res* 1997; 64:775-779.
73. Wilson SE. Stimulus-specific and cell type-specific cascades: Emerging principles relating to control of apoptosis in the eye. *Exp Eye Res* 1999; 69:255-266.
74. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retinal Eye Res* 1999; 18:293-309.
75. Murphy GJ, Murphy G, Reynolds JJ. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* 1991; 28:4-7.
76. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7:120-125.
77. Tao Y, Bazan HE, Bazan NG. Platelet-activating factor induces the expression of metalloproteinases-1 and -9, but not -2 or -3, in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:345-354.
78. Fini ME, Girard MT, Matsubara M, Bartlett JD. Unique regulation of the matrix metalloproteinase, gelatinase B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:622-633.
79. Matsubara MM, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodeling cornea. *Dev Biol* 1991; 147:425-439.
80. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J* 1991; 5:2145-2154.
81. Ruberti JW, Klyce SD, Smolek MK, Karon MD. Anomalous acute inflammatory response in rabbit corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2523-2530.
82. Cejkova J. Enzyme histochemistry of corneal wound healing. *Histol Histopathol* 1998; 13:553-564.
83. Girard MT, Matsubara M, Kublin C, Tessier MJ, Cintron C, Fini ME. Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodelling. *J Cell Sci* 1993; 104:1001-1011.
84. Twining SS, Wilson PM, Ngamkitidechakul C. Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1alpha and -1beta. *Biochem J* 1999; 339:705-712.
85. Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33:860-867.
86. Pan MR, Chuang LY, Hung WC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett* 2001; 508:365-368.
87. Ottino P, Bazan HE. Corneal stimulation of MMP-1, -9 and uPA by platelet-activating factor is mediated by cyclooxygenase-2 metabolites. *Curr Eye Res* 2001; 23(2):77-85.
88. Bjelle A, Eronen I. The in vitro effect of six NSAIDs on the glycosaminoglycan metabolism of rabbit chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9(4):369-374.

89. Eronen I, Videman T. Effects of sodium diclofenac on glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis in rabbits. *Scand J Rheumatol* 1985; 14(1):37-42.
90. Mastbergen SC, Lafeber FPJG, Bijlsma JWJ. Selective COX-2 inhibition prevents proinflammatory cytokine-induced cartilage damage. *Rheumatology* 2002; 41:801-808.
91. Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-elicited-induction of MMP-1 expression in human ocular surface epithelial cells is mediated through the ERK1/2 MAPK-dependent pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:4705-4714.
92. Sachdev N, Di Girolamo N, McCluskey P, Wakefield D, Coroneo M. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in the human lens: implications for cortical cataract formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(II):4075-4082.
93. Fisher GJ, Kang S, Varani J, et al. Mechanisms of photoageing and chronological skin ageing. *Arch Dermatol* 2002; 138:1462-1470.
94. Scharfetter K, Wlaschek M, Hogg A, et al. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* 1991; 283:506-511.
95. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin ageing induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337:1419-1428.
96. Brenneisen P, Sies H, Scharfetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann NY Acad Sci* 2002; 973:31-43.
97. Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* 2003; 2003:RE2.
98. Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:30-40.
99. Chang LF, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410:37-40.
100. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807-869.
101. Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2256-2266.
102. Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* 1990; 9:2241-2246.
103. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996; 379:335-339.
104. Chen WX, Borchers AH, Dong ZG, Powell MB, Bowden GT. UVB irradiation-induced activator protein-1 activation correlates with increased c-fos gene expression in a human keratinocyte cell line. *J Biol Chem* 1998; 273:32176-32181.
105. Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, et al. Stable over-expression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1 mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem* 1999; 274:25869-25876.
106. Shiek S, Stege H, Kurten V, et al. Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 119:1323-1329.
107. Park CH, Lee MJ, Ahn J, Kim S, Kim HH, Kim KH, Eun HC, Chung JH. Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop. *J Invest Dermatol* 2004; 123:1012.
108. Kim MS, Kim YK, Cho KH, Chung JH. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Ageing Dev* 2006; 127(12):875-882.
109. Papakonstantinou E, Roth M, Block LH, Mirtsou-Fidani V, Argiriadis P, Karakiulakis G. The differential distribution of hyaluronic acid in the layers of human atherosclerotic aortas is associated with vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Atherosclerosis* 1998; 138(1):79-89.
110. Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Perruchoud AP, Roth M. Hypoxia modifies the effect of PDGF on glycosaminoglycan synthesis by primary human lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(5):L825-L834.
111. Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Roth M, Block LH. Platelet-derived growth factor stimulates the secretion of hyaluronic acid by proliferating human vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(21):9881-9885.
112. Bitter T, Muir H. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 1962; 4:330-334.
113. Papakonstantinou E, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Perruchoud AP, Karakiulakis G. Hypoxia differentially enhances the effects of transforming growth factor-beta isoforms on the synthesis and secretion of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(3):830-837.
114. Karakiulakis G, Papanikolaou C, Jankovic SM, Aletras A, Papakonstantinou E, Vretou E, Mirtsou-Fidani V. Increased type IV collagen-degrading activity in metastases



originating from primary tumors of the human colon. *Invasion Metastasis* 1997; 17(3):158-168.

115. Papakonstantinou E, Aletras AJ, Glass E, Tsogas P, Dionyssopoulos A, Adjaye J et al. Matrix metalloproteinases of epithelial origin in facial sebum of patients with acne and their regulation by isotretinoin. *J Invest Dermatol* 2005; 125(4):673-684.

116. Papakonstantinou E, Aletras AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G. Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine* 2003; 24(1-2):25-35.

117. Papakonstantinou E, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Perruchoud AP, Karakiulakis G. Hypoxia differentially enhances the effects of transforming growth factor-beta isoforms on the synthesis and secretion of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(3):830-837.

118. Hayasaka Y, Hayasaka S, Zhang XY, Nagaki Y. Effects

of topical anti-inflammatory and antiallergic eyedrops on prostaglandin E2-induced aqueous flare elevation in pigmented rabbits. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(7):950-953.

119. Tomas-Barberan S, Törnngren L, Lundberg K, Fagerholm P, Rolfsen W. Effect of diclofenac on prostaglandin liberation in the rabbit after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1997; 13(2):154-157.

120. Ishibashi T, Araki H, Sugai S, Tawara A, Inomata H. Detection of proteoglycans in human posterior capsule opacification. *Ophthalm Res* 1995; 27(4):208-213.

121. Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(8):1709-1713.

122. Sulochana KN, Ramakrishnan S, Vasanthi SB, Madhavan HN, Arunagiri K, Punitham R. First report of congenital or infantile cataract in deranged proteoglycan metabolism with released xylose. *Br J Ophthalmol* 1997; 81(4):319-323.