

# Ιστολογική μελέτη των επιδράσεων της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης αντιμυκητιακών φαρμάκων στον αμφιβληστροειδή: πειραματική μελέτη

Σ. Καραχρυσάφη<sup>1</sup>, Α. Σιόγκα<sup>1</sup>, Α. Κομνηνού<sup>2</sup>, Α. Καραμίτσος<sup>3</sup>, Μ. Χιωτέλη<sup>4</sup>, Ι. Δωρή<sup>4</sup>, Γ. Δελής<sup>5</sup>, Ε. Κωφίδου<sup>2</sup>, Π. Αναστασιάδου<sup>6</sup>, Σ. Σωτηρίου<sup>7</sup>, Β. Καραμπατάκης<sup>8</sup>, Θ. Παπαμήτσου<sup>1</sup>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ενδοφθαλμίτιδα αποτελεί μια από τις πιο καταστροφικές παθήσεις στην οφθαλμολογία. Συχνά οδηγεί σε μερική ή πλήρη απώλεια της όρασης μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ασχέτως του λοιμογόνου παράγοντα, γεγονός που απαιτεί άμεση και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η αιτία είναι βακτηριακή, είτε ενδογενούς

είτε εξωγενούς προελεύσεως. Σε γενικές γραμμές, η συχνότητα εμφάνισης της ενδοφθαλμίτιδας παρουσιάζει μείωση τις τελευταίες δεκαετίες, ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτής της πάθησης μπορεί να αποδοθεί σε μυκητιασική αιτία. Παρά το γεγονός ότι οι μυκητιασικές ενδοφθαλμίτιδες είναι σπάνιες, παρατηρείται σχεδόν ένας διπλασιασμός του ποσοστού των μυκήτων που απομονώνονται από οφθαλμικές λοιμώξεις κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 ετών. Η εξάπλωση της χρήσης των ευρέως φάσματος αντιβιοτικών και των τοπικών στεροειδών στη θεραπεία οφθαλμολογικών παθήσεων, μπορεί να αποτελεί την αιτία του προαναφερθέντος αυξημένου ποσοστού των μυκητιασικών ενδοφθαλμίτιδων. Ωστόσο, η εμφανής σοβαρότητα και η απρόβλεπτη πρόγνωση τους εγείρει ανησυχίες και απαιτεί επαγρύπνηση.<sup>1</sup>

Η επίδραση των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων στη δομή των μορίων του οφθαλμού και κυρίως του αμφιβληστροειδούς δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Η σπουδαιότητα της παρούσας έρευνας έγκειται στην ανάδειξη μιας έγκαιρης, ασφαλούς και επιθετικής θεραπείας έναντι σοβαρών μυκητιασικών ενδοφθαλμίτιδων. Τα αντιμυκητιακά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στις οφθαλμικές λοιμώξεις με ποικίλες οδούς χορήγησης. Ωστόσο, η ενδοϋαλοειδική τους χορήγηση και μά-

1. Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ
2. Κτηνιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ
3. 2η Πανεπιστημιακή Οφθαλμιατρική Κλινική, Νοσοκομείο Παπαγεωργίου, ΑΠΘ
4. Εργαστήριο Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ
5. Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ
6. Τμήμα Στοματικής Ιατρικής/Παθολογίας, Οδοντιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ
7. Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA
8. Εργαστήριο Πειραματικής Οφθαλμολογίας, Ιατρική Σχολή, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ

Corresponding author: S. Karachrysafi  
e-mail: sofia\_karachrysafi@outlook.com

λιστα στη μέγιστη ασφάλη, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, δόση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Η μελέτη των ιστολογικών τους επιδράσεων στον αμφιβληστροειδή με τη χρήση οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αποτελεί την πρωτοτυπία της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Η εξέταση της ασφάλειας χρήσης της μέγιστης θεραπευτικής δόσης της βορικοναζόλης και της μικαφουγκίνης έπειτα από μια, πολλαπλές ή συνδυαστικές ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις, μέσω της χρήσης του οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και της ανοσοϊστοχημείας, θα αναδείξει τις επιδράσεις στον αμφιβληστροειδή και θα συμβάλει τόσο στη μελλοντική χρήση του κάθε φαρμάκου σε μια ενδοϋαλοειδική έγχυση όσο και στην πιθανή μελλοντική εφαρμογή πολλαπλών ενδοϋαλοειδικών εγχύσεων ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε ασθενούς. Στην περίπτωση της μη ανίχνευσης αλλοιώσεων, θα αποδειχθεί η ασφάλεια του προτεινόμενου πρωτοκόλλου, κάτι το οποίο θα συμβάλει σημαντικά στη δυνατότητα αντιμετώπισης αυτών των ενδοφθαλμίτιδων οι οποίες δύναται να προκαλέσουν πληθώρα οφθαλμολογικών αλλοιώσεων μέχρι και τύφλωση.<sup>1-7</sup> Στην περίπτωση ανίχνευσης αλλοιώσεων, ίσως να δοθεί η δυνατότητα να εξηγηθούν πολλές οφθαλμολογικές βλάβες που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της θεραπείας των μυκητιασικών ενδοφθαλμίτιδων και οι οποίες μπορούν πιθανόν να αποδοθούν στη χρήση του φαρμάκου και όχι στη βλαπτική δράση του μύκητα.<sup>8-13</sup> Τέλος, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση των φαρμάκων απαιτεί μικρότερη ποσότητα της ουσίας σε σχέση με την ενδοφλέβια ή *per os* χορήγηση για την επίτευξη του ίδιου θεραπευτικού αποτελέσματος, με συνέπεια η ενδοϋαλοειδική χρήση να αποτελεί μια πιο στοχευμένη και με λιγότερες συστηματικές ανεπιθύμητες επιδράσεις θεραπεία.<sup>10</sup>

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, του Τμήματος Ιατρικής και στην Πειραματική Μονάδα Κλινικής Ζώων Συντροφιάς του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Στο παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο έγινε χρήση κομμάτων και λήψη δειγμάτων ιστού αμφιβληστροειδούς.

Τα δείγματα των ιστών επεξεργάστηκαν για πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, χρώσης εωσίνης-αιματοξυλίνης και για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας του Ιατρικού τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κα Παπαμήτσου Θεοδώρα και την Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κα Σιόγκα Αντωνία, του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την αμέριστη στήριξη, καθοδήγηση και ανεκτίμητη βοήθειά τους ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή με επιτυχία. Θα ήθελα να επισημάνω τόσο το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας όσο και την ποιότητα των γνώσεων και των εμπειριών που έλαβα κατά την πρακτική μου άσκηση στο πλευρό τους. Επίσης, θερμές ευχαριστίες οφείλω στον οφθαλμίατρο Καραμήτσο Αθανάσιο για την πολύτιμη βοήθειά του κατά το στάδιο προετοιμασίας των ιστών, στο μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Στοματολογίας του Οδοντιατρικού Τμήματος Α.Π.Θ. κα Αναστασιάδου Πηνελόπη για την αμέριστη βοήθειά της κατά το στάδιο παρασκευής των ιστών για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ανατομικής, Ιστολογίας & Εμβρυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ. κα Δωρή Ιωάννα για την πολύτιμη βοήθειά της κατά το στάδιο προετοιμασίας των ιστών για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στο μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Ανατομικής, Ιστολογίας & Εμβρυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ. κα Χιωτέλη Μαρία για την αμέριστη και άμεση βοήθειά της κατά το στάδιο προετοιμασίας των ιστών για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στον τεχνολόγο ιατρικών εργαστηρίων κο Καμπέρη Δημήτριο για τη συμμετοχή και βοήθειά του κατά τις διαδικασίες εφαρμογής χρώσεων ανοσοϊστοχημείας, στον παθολογοανατόμο κο Σωτηρίου Σωτήριο για τη συμμετοχή του στη συμπαράτηση και την αξιολόγηση των δειγμάτων και, τέλος, στον κτηνίατρο κο Δελή Γεώργιο για την ανεκτίμητη βοήθεια και τη συμμετοχή του στη

στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Θα ήθελα να εκφράσω από καρδιάς την ευγνωμοσύνη και το σεβασμό μου στους προαναφερθέντες τόσο για την άψογη συνεργασία μας όσο και για το επίπεδο γνώσεων που τους χαρακτηρίζει και τις οποίες μοιράστηκαν μαζί μου ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Πειραματικής Οφθαλμολογίας κο Καραμπατάκη Βασίλειο, στην Καθηγήτρια Χειρουργικής-Συγκριτικής Οφθαλμολογίας- Κτηνιατρικής κατοικιδίων Εξωτικών και Αγριων Ζώων κα Κομνηνού Αναστασία, καθώς και στη Βιολόγο κα Κωφίδου Ευαγγελία για την ανεκτίμητη συμβολή τους στην κατάρτιση και διενέργεια του ερευνητικού πρωτοκόλλου. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της Πειραματικής Μονάδας Κλινικής Ζώων Συντροφιάς του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης που με βοήθησαν και στήριξαν την παρούσα έρευνα και διευκόλυναν με το έργο τους την υλοποίησή της.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για την απεριόριστη στήριξη, αγάπη και ενθάρρυνσή τους κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών. Ελπίζω η παρούσα διδακτορική διατριβή να προσφέρει υπερηφάνεια και ηθική ικανοποίηση σε όλους όσους μου πρόσφεραν υποστήριξη και εμπιστοσύνη κατά την ακαδημαϊκή μου πορεία μέχρι και σήμερα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενδοφθαλμίτιδα αποτελεί μια από τις πιο καταστροφικές παθήσεις στην οφθαλμολογία οδηγώντας συχνά σε μερική ή πλήρη απώλεια της όρασης μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ασχέτως του λοιμογόνου παράγοντα, γεγονός που απαιτεί άμεση και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση. Αν και η μυκητιασική ενδοφθαλμίτιδα είναι σπάνια στο σύνολο των ενδοφθάλμιων λοιμώξεων, παραμένει ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα στην οφθαλμολογία λόγω των δυνητικά καταστροφικών συνεπειών της. Επιπρόσθετα, οι οφθαλμικές λοιμώξεις

από μύκητες ήταν παραδοσιακά πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστούν λόγω των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών που υπήρχαν τόσο συστηματικά όσο και ενδοϋαλοειδικά. Στο παρελθόν, η Αμφοτερικίνη Β (AMB) αποτελούσε το μοναδικό αντιμυκητιακό παράγοντα με έγκριση για ενδοϋαλοειδική χορήγηση. Ωστόσο, η αμφοτερικίνη Β έχει περιοριστεί λόγω της σημαντικής νεφροτοξικότητας και της σχετικά χαμηλής ενδοφθάλμιας διείσδυσης, της αμφιβληστροειδικής νέκρωσης που προκαλεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς και της ανάπτυξης αντίστασης στη δράση της από πολλά είδη μυκήτων, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η ανάγκη χρήσης άλλων αντιμυκητιακών παραγόντων με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες και πιθανότατα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία των μυκητιασικών ενδοφθαλμίτιδων. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια, υπήρξαν σημαντικά βήματα στην ανάπτυξη αντιμυκητιακών παραγόντων. Τα νεότερα αντιμυκητιακά φάρμακα έχουν αντιμυκητιακή δράση ευρέος φάσματος, καλή βιοδιαθεσιμότητα με διάφορες οδούς χορήγησης και οφθαλμική διείσδυση. Οι νεότεροι εκπρόσωποι αυτών των φαρμάκων που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα είναι η Βορικοναζόλη, από την τάξη των Αζολών και η Μικαφουγκίνη, από την τάξη των Εχινοκανδινών. Υλοποιήθηκε πρωτόκολλο με χρήση κονίκλων albino New Zealand. Στους κονίκλους χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο οφθαλμοί κάθε ζώου. Οι δεξιοί οφθαλμοί των ζώων αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης, ενώ οι αριστεροί οφθαλμοί των ζώων αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου για την έγχυση του κάθε φαρμάκου αντίστοιχα. Όλα τα φάρμακα χορηγήθηκαν με ενδοϋαλοειδική έγχυση. Το διάλυμα βορικοναζόλης χορηγήθηκε σε δόση 40 μg/0.1ml για επίτευξη ενδοϋαλοειδικής συγκέντρωσης 25μg/ml, ενώ το διάλυμα μικαφουγκίνης χορηγήθηκε σε δόση 25μg/0.1ml, δηλαδή στην υψηλότερη ασφαλή δοσολογία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Αναλυτικότερα, οι υποομάδες C1 και C2 αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και σε αυτές χορηγήθηκαν μία και δύο εγχύσεις 0.1ml διαλύματος BSS, αντίστοιχα. Οι υποομάδες V1 και V2 αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης για τη μονή και διπλή έγχυση βορικοναζόλης αντίστοιχα. Οι υποομάδες M1 και M2 αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης

για τη μονή και διπλή έγχυση μιχαφουγκίνης αντίστοιχα. Ενώ η ομάδα VM αποτέλεσε την ομάδα μελέτης για τη συνδυαστική έγχυση βορικοναζόλης και μιχαφουγκίνης. Η πρώτη ένεση πραγματοποιήθηκε την ημέρα 0, η δεύτερη ένεση την ημέρα 4 και η προγραμματισμένη θανάτωση των ζώων πραγματοποιήθηκε 10 ημέρες μετά το πέρας των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων. Επίσης, προ της θανάτωσης πραγματοποιήθηκε οφθαλμολογικός έλεγχος. Ακολούθησε η αφαίρεση των οφθαλμών και η λήψη δειγμάτων από τους αμφιβληστροειδείς, ώστε να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και για χρώσεις ανοσοϊστοχημείας, καθώς και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρατήρησης των δειγμάτων, η βορικοναζόλη τόσο σε πρωτόκολλο μίας όσο και διπλής έγχυσης δεν προκαλεί μικροσκοπικές αλλοιώσεις αλλά υπερμικροσκοπικές αλλοιώσεις. Μάλιστα, με τη μία έγχυση ανευρίσκονται βλάβες στη στιβάδα των νευρικών ινών, στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και στην έξω κοκκώδη στιβάδα, ενώ με τις δύο εγχύσεις ανευρίσκονται πιο έντονες βλάβες στις προαναφερθείσες στιβάδες καθώς και επιπρόσθετα βλάβες τόσο στην έσω κοκκώδη στιβάδα όσο και στη στιβάδα των ραβδίων και των κωνίων. Η μιχαφουγκίνη σε πρωτόκολλο μίας έγχυσης δεν προκαλεί μικροσκοπικές αλλοιώσεις σε αντίθεση με τις δύο εγχύσεις της που προκαλούν αλλοιώσεις στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Ωστόσο, υπερμικροσκοπικές αλλοιώσεις σχεδόν σε όλες τις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς ανευρίσκονται σε όλα τα δείγματα τόσο με τη μία όσο και με τις δύο εγχύσεις μιχαφουγκίνης, και μάλιστα με τις αλλοιώσεις στη διπλή έγχυση να είναι πιο εκτεταμένες και έντονες σε σχέση με τη μία έγχυση μιχαφουγκίνης. Στη συνδυαστική χορήγηση βορικοναζόλης και μιχαφουγκίνης ανευρέθηκαν τόσο μικροσκοπικές όσο και υπερμικροσκοπικές αλλοιώσεις σχεδόν σε όλες τις στιβάδες και ιδιαίτερα στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και των φωτοϋποδοχέων. Όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική χρώση για τον δείκτη TNF-a, ήταν αρνητική σε όλες τις υποομάδες εκτός από τους οφθαλμούς με τη συνδυαστική έγχυση βορικοναζόλης και μιχαφουγκίνης όπου ανιχνεύθηκε

ως ήπια θετική με την παρουσία κυττάρων σε απόπτωση στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων στους 2 από τις 3 οφθαλμούς της ομάδας. Όσον αφορά τη χρώση για το δείκτη IL-6, ήταν αρνητική σε όλες τις υποομάδες εκτός από τους οφθαλμούς με μία έγχυση βορικοναζόλης όπου ανιχνεύτηκε ως ήπια θετική σε όλα τα δείγματα. Συμπερασματικά, η βορικοναζόλη φαίνεται πως είναι περισσότερο τοξική σε πρωτόκολλο περισσότερων δόσεων. Ο ανοσοϊστοχημικός δείκτης TNF-a δεν φαίνεται να διαδραματίζει παθογενετικό ρόλο στις αλλοιώσεις που προκαλεί η βορικοναζόλη στον αμφιβληστροειδή. Αντίθετα, αντικρουόμενα είναι τα συμπεράσματα όσον αφορά το ρόλο της διαμεσολαβούμενης από την IL-6 φλεγμονής στην πρόκληση αλλοιώσεων στον αμφιβληστροειδή από τη βορικοναζόλη. Όσον αφορά τη μιχαφουγκίνη, είναι τοξική επί του αμφιβληστροειδούς και μάλιστα βάσει της έκτασης και της έντασης των ευρημάτων της φαίνεται ότι είναι πιο τοξική σε σχέση με τη βορικοναζόλη. Ωστόσο, οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες TNF-a και IL-6 δεν φαίνεται να διαδραματίζουν παθογενετικό ρόλο στις αλλοιώσεις που προκαλεί η μιχαφουγκίνη στον αμφιβληστροειδή. Τέλος, ανευρέθηκε τοξική δράση επί του αμφιβληστροειδούς του συνδυαστικού σχήματος χορήγησης με την TNF-a διαμεσολαβούμενη απόπτωση να φαίνεται πως ανήκει στους μηχανισμούς της αμφιβληστροειδικής βλάβης που προκαλείται από τη συνδυαστική χορήγηση της βορικοναζόλης και της μιχαφουγκίνης. Αντίθετα, η διαμεσολαβούμενη από την IL-6 φλεγμονή δε φαίνεται πως συμβάλλει στην πρόκληση αλλοιώσεων στον αμφιβληστροειδή από συνδυαστική χορήγηση των δύο παραγόντων.

*Λέξεις κλειδιά:* Βορικοναζόλη, μιχαφουγκίνη, ενδοϋαλοειδικά, ιστολογία.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗΣ

Αμφιβληστροειδής χιτώνας ονομάζεται ο εσωτερικό-τερος από τους τρεις χιτώνες του οφθαλμικού βολβού.



Σε αυτόν το χιτώνα σχηματίζεται το οπτικό είδωλο από το σύστημα του οφθαλμού μέσω μιας φωτοχημικής διεργασίας, κατά τη διάρκεια της οποίας δημιουργούνται νευρικά ερεθίσματα, τα οποία μεταφέρονται κατά μήκος της οπτικής οδού προς τον εγκέφαλο όπου υφίστανται ανώτερη φλοιώδη επεξεργασία.<sup>14</sup>

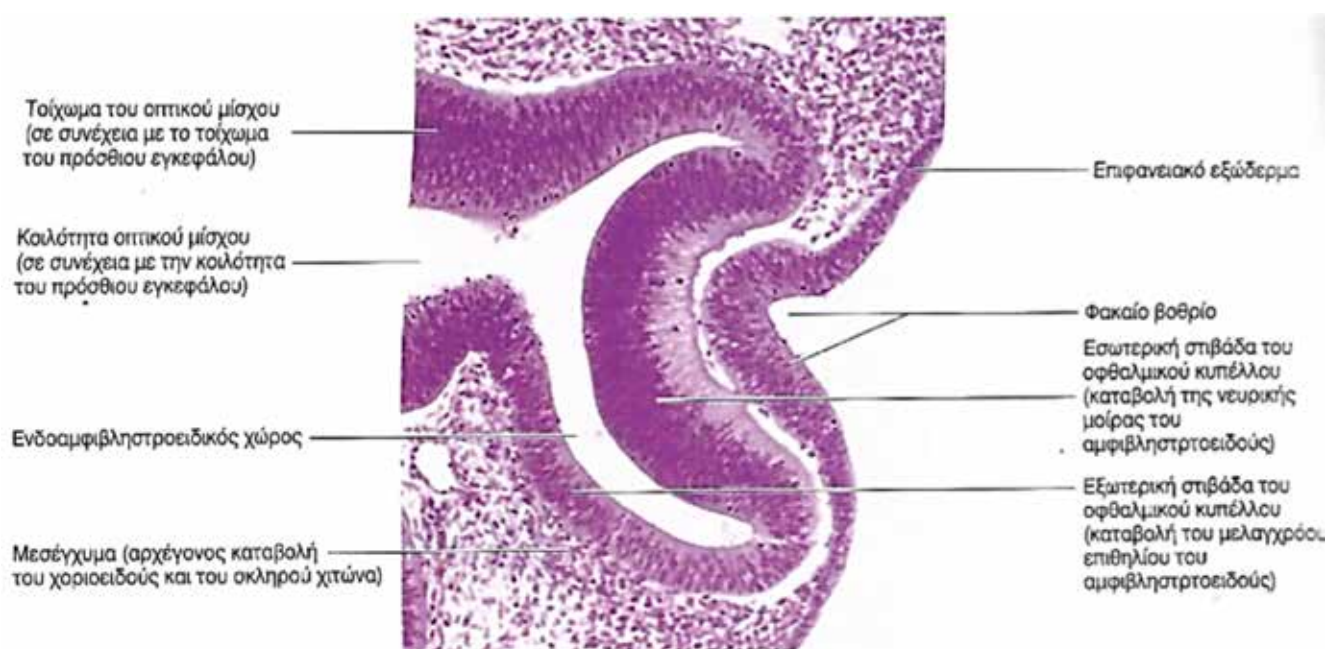
### 1.1 ΕΜΡΥΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η διάπλαση των οφθαλμών αρχίζει στις αρχές της τέταρτης εβδομάδας της ενδομήτριας ζωής από τέσσερις πηγές: το νευροεξώδερμα του προσθίου εγκεφάλου, το επιφανειακό εξώδερμα της κεφαλής, το μεσόδερμα ανάμεσα στις ανώτερω στιβάδες και τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Πιο συγκεκριμένα, το νευροεξώδερμα του προσθίου εγκεφάλου διαφοροποιείται σε αμφιβληστροειδή, οπίσθιες στιβάδες της ίριδας και οπτικό νεύρο, ενώ το επιφανειακό εξώδερμα της κεφαλής δίνει τον φακό και το επιθήλιο του κερατοειδούς. Το μεσόδερμα το οποίο βρίσκεται μεταξύ του νευροεξωδέρματος και του επιφανειακού εξωδέρματος θα σχηματίσει τον ινώδη και τον αγγειώδη χιτώνα του οφθαλμού. Κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν στο μεσέγγυμα, το οποίο προέρχεται από το

μεσόδερμα και διαφοροποιούνται σε χοριοειδή χιτώνα, σκληρό και επιθήλιο του κερατοειδούς.<sup>15-25</sup>

Η διάπλαση του οφθαλμού αρχίζει με την εμφάνιση των οπτικών αυλάκων στις νευρικές πτυχές οι οποίες βρίσκονται στο κεφαλικό άκρο του εμβρύου. Καθώς οι νευρικές πτυχές, επαγόμενες από το παρακείμενο μεσέγγυμα του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου, πιθανώς μέσω χημικών μεσολαβητών, ενώνονται για να σχηματίσουν τον πρόσθιο εγκέφαλο, οι οπτικές αυλάκες εγκολλώνονται για να σχηματίσουν κοίλα εκκολπώματα- τα οπτικά κυστίδια- τα οποία προσεκβάλλουν από το τοίχωμα του προσθίου εγκεφάλου στο παρακείμενο μεσέγγυμα. Οι κοιλότητες των οπτικών κυστιδίων συγχίζονται με την κοιλότητα του προσθίου εγκεφάλου. Καθώς τα οπτικά κυστίδια αυξάνουν, το περιφερικό άκρο τους επιμηκύνεται και η επικοινωνία τους με τον πρόσθιο εγκέφαλο περιορίζεται στο σχηματισμό κοίλων οπτικών μίσχων.<sup>15-25</sup>

Τα οπτικά κυστίδια σύντομα έρχονται σε επαφή με το επιφανειακό εξώδερμα. Τα οπτικά κυστίδια ασκούν επαγωγική επίδραση στα κύτταρα του παρακείμενου επιφανειακού εξωδέρματος με αποτέλεσμα το σχηματισμό των αρχέγονων φακών. Οι καταβολές των φακών



Εικόνα 1.1.1: Οβελιαία διατομή οφθαλμού εμβρύου 32 ημερών (οπτικό μικροσκόπιο)<sup>16</sup>

εγκολπώνονται εμβυθιζόμενες στο επιφανειακό εξώ-  
 δερμα, σχηματίζοντας τα φακαία βοθρία. Τα άκρα των  
 βοθρίων συμπλησιάζουν και συνενώνονται σχηματίζο-  
 ντας τα σφαιρικά φακαία κυστίδια τα οποία σύντομα  
 αποσπώνται από το επιφανειακό εξώδερμα.<sup>15-25</sup>

Καθώς διαπλάσσονται τα φακαία κυστίδια, τα οπτι-  
 κά κυστίδια εγκολπώνονται σχηματίζοντας διπλοτοι-  
 χωματικά οφθαλμικά κύπελλα. Αρχικά το άνοιγμα του  
 κάθε κυπέλλου είναι μεγάλο και τα χείλη του περιπτύ-  
 σονται γύρω από τους φακούς. Στο στάδιο αυτό τα φα-  
 καία κυστίδια χάνουν την επαφή τους με το επιφανει-  
 ακό εξώδερμα και εγκλωβίζονται στις κοιλότητες των  
 οφθαλμικών κυπέλλων. Επιμήκεις αύλακες-αμφιβλη-  
 στροειδικές (ή οπτικές ή οφθαλμικές) σχισμές σχημα-  
 τίζονται στην κοιλιακή επιφάνεια των οφθαλμικών κυ-  
 πέλλων και κατά μήκος των οπτικών μίσχων. Οι σχισμές  
 περιέχουν αγγειώδες μεσέγγυμα από το οποίο σχημα-  
 τίζονται τα υαλοειδή αγγεία. Καθώς τα χείλη της αμ-  
 φιβληστροειδούς σχισμής συνενώνονται, τα υαλοειδή  
 αγγεία εγκλείονται μέσα στην καταβολή του οπτικού  
 νεύρου. Το περιφερικό τμήμα των υαλοειδών αγγείων  
 εξαφανίζεται, αλλά τα εγγύς τμήματα παραμένουν ως  
 κεντρική αρτηρία και φλέβα του αμφιβληστροειδούς.<sup>15-17</sup>

### *Διάπλαση του αμφιβληστροειδούς*

Ο αμφιβληστροειδής διαπλάσσεται από τα τοιχώ-  
 ματα του οφθαλμικού κυπέλλου, μία προσεκβολή του  
 πρόσθιου εγκεφάλου. Το οπτικό κύπελλο αναπτύσσε-  
 ται από το οπτικό κυστίδιο κατά τις πρώτες έξι με επτά  
 εβδομάδες της κύησης και αποτελείται από δύο στιβά-  
 δες νευροξωδέρματος που χωρίζονται από έναν κενό  
 χώρο. Το εξωτερικό λεπτότερο τοίχωμα του οφθαλμι-  
 κού κυπέλλου σχηματίζει το μελάγχρουν επιθήλιο του  
 αμφιβληστροειδούς και το εσωτερικό, παχύτερο τοίχω-  
 μα διαφοροποιείται στη νευρική στιβάδα του αμφιβλη-  
 στροειδούς (νευροαμφιβληστροειδή).<sup>15-25</sup>

Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής περιόδου,  
 οι δύο στιβάδες του αμφιβληστροειδούς διαχωρίζονται  
 από τον ενδοαμφιβληστροειδικό χώρο, ο οποίος ουσι-  
 αστικά είναι η κοιλότητα του οφθαλμικού κυπέλλου.  
 Πριν τη γέννηση, ο ενδοαμφιβληστροειδικός χώρος,

προοδευτικά εξαφανίζεται καθώς οι δύο στιβάδες του  
 αμφιβληστροειδούς συνενώνονται, αλλά όχι στερεά,  
 έτσι ώστε κατά την εκτομή του οφθαλμικού βολβού  
 ενήλικα, η νευρική στιβάδα του αμφιβληστροειδούς  
 συχνά διαχωρίζεται από το μελάγχρουν επιθήλιο. Επει-  
 δή το οφθαλμικό κύπελλο είναι προσεκβολή του προ-  
 σθίου εγκεφάλου, οι στιβάδες του αποτελούν συνέχεια  
 του τοιχώματος του εγκεφάλου.<sup>15-25</sup>

Κάτω από την επίδραση των αναπτυσσόμενων φα-  
 κών, η εσωτερική στιβάδα του οπτικού κυπέλλου,  
 πολλαπλασιάζεται σχηματίζοντας ένα παχύ νευροε-  
 πιθήλιο. Ακολούθως τα κύτταρα αυτής της στιβάδας  
 διαφοροποιούνται σε νευροαμφιβληστροειδή, την  
 φωτοευαίσθητη περιοχή του αμφιβληστροειδούς, που  
 περιέχει φωτοϋποδοχείς (ραβδία και κωνία) και τα κυτ-  
 ταρικά σώματα νευρώνων (π.χ. δίπολα και γαγγλιακά  
 κύτταρα). Πιο συγκεκριμένα, η εσωτερική στιβάδα του  
 νευροξωδέρματος (δηλ. εκείνη που βρίσκεται σε επα-  
 φή με το υαλοειδές σώμα) αρχικά έχει πάχος περίπου  
 10 κυττάρων. Μέχρι τον τρίτο μήνα της κύησης έχει δι-  
 αμορφωθεί σε δύο στιβάδες, τις έσω και έξω νευρο-  
 βλαστικές στιβάδες, οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ  
 τους από την προσωρινή στιβάδα του Chievitz. Κατά τη  
 διάρκεια των επόμενων δύο μηνών ανάπτυξης, η έσω  
 νευροβλαστική στιβάδα διαφοροποιείται περαιτέρω:  
 τα γαγγλιακά κύτταρα εμφανίζονται πρώτα και μετα-  
 ναστεύουν προς την εσωτερική επιφάνεια του αμφιβλη-  
 στροειδούς όπου σχηματίζουν τη στιβάδα των γαγγλι-  
 ακών κυττάρων. Τα υπόλοιπα κύτταρα μεταναστεύουν  
 για να σχηματίσουν τα αμακρόινα κύτταρα της έσω  
 κοκκώδους στιβάδας των ενηλίκων, την έσω δικτυωτή  
 στιβάδα των νευρικών ινών και τις συνάψεις μεταξύ  
 τους. Τα κύτταρα του Müller διαφοροποιούνται νωρίς  
 από την έσω νευροβλαστική στιβάδα και στη συνέχεια  
 οι πυρήνες τους μεταναστεύουν προς τα κάτω στην  
 έσω κοκκώδη στιβάδα. Η έξω νευροβλαστική στιβάδα  
 συμβάλλει επίσης στο σχηματισμό της έσω κοκκώδους  
 στιβάδας παρέχοντας τα οριζόντια και δίπολα κύττα-  
 ρα, των οποίων η μετανάστευση εξαλείφει τη στιβάδα  
 του Chievitz. Οι φωτοϋποδοχείς είναι η τελική στιβάδα  
 που διαφοροποιείται αν και την δεκατη τρίτη εβδομά-

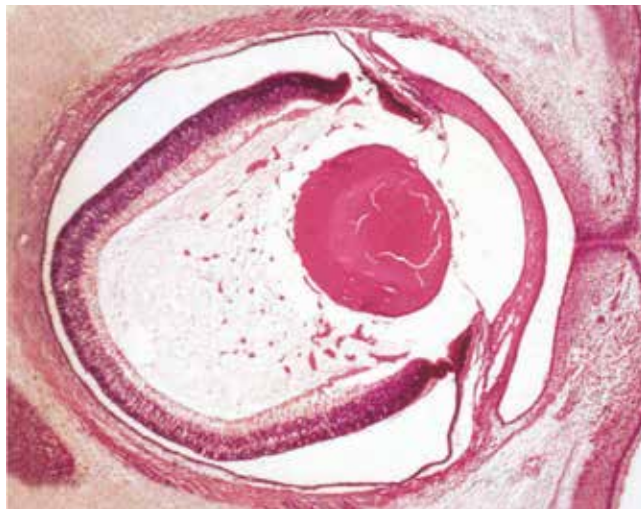
δα της κύησης τα εσωτερικά τμήματα των κωνίων είναι ορατά στην περιοχή της ωχράς κηλίδας. Σύμφωνα με ορισμένες θεωρίες οι φωτοϋποδοχείς προέρχονται από το νευροεξώδερμα της έξω νευροβλαστικής στιβάδας, αλλά είναι περισσότερο πιθανό να προέρχονται από την επενδυματική στιβάδα του πρωτογενούς νευρικού σωλήνα και του οπτικού κυστιδίου.<sup>18-25</sup>

Η τελική διάταξη των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς των ενηλίκων παρουσιάζεται στους πεντέμισυ μήνες της κύησης, αλλά η ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς δεν είναι πλήρης. Για παράδειγμα, αν και οι φωτοϋποδοχείς διαφοροποιούνται πρώτα στην ωχρά κηλίδα, αυτό σύντομα επικαλύπτεται από την ανάπτυξη τους σε άλλες περιοχές του αμφιβληστροειδούς, έτσι ώστε κατά τη γέννηση η ωχρά κηλίδα να είναι η μόνη περιοχή που δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως. Η ανάπτυξη των φωτοϋποδοχέων στην ωχρά κηλίδα ολοκληρώνεται περίπου τον τρίτο με τέταρτο μήνα μετά τη γέννηση οπότε και το βρέφος αρχίζει να εστιάζει.<sup>18-25</sup>

Πιο συγκεκριμένα, η ωχρά κηλίδα αρχικώς αναπτύσσεται ως εντοπισμένη προβολή πυρήνων στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, επί τα εκτός (κροταφικά) του οπτικού δίσκου, αμέσως μετά τον 5<sup>ο</sup> μήνα της κύησης. Κατά τη διάρκεια του 7<sup>ου</sup> μήνα συντελείται περιφερική παρεκτόπιση των γαγγλιακών κυττάρων, τα οποία αφήνουν ένα κεντρικό αβαθές εντύπωμα, το κεντρικό βοθρίο. Τα βοθρικά κωνία παρουσιάζουν μείωση του εύρους τους κατά τα έσω τμήματά τους, ενώ τα έξω τμήματα αυτών επιμηκύνονται. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την αύξηση της πυκνότητας των βοθρικών κωνίων. Κατά τη γέννηση, τα γαγγλιακά κύτταρα στο κεντρικό βοθρίο έχουν πλέον μειωθεί αποτελώντας μια μονή στιβάδα, ενώ μέχρι τον 4<sup>ο</sup> μήνα της ζωής οι πυρήνες των κωνίων στο βοθριόλιο (στο κέντρο του κεντρικού βοθρίου) δεν καλύπτονται από γαγγλιακά κύτταρα. Η αιτία της ατελούς κεντρικής προσήλωσης του νεογνού είναι το γεγονός ότι τα κωνία δεν ολοκληρώνουν την εξέλιξή τους αρκετούς μήνες μετά τη γέννηση.<sup>15, 18-25</sup>

Το μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς αρχίζει να γίνεται χρωστικοφόρο περίπου την έκτη εβδομάδα της κύησης και η διαδικασία φαίνεται να έχει

ολοκληρωθεί έως τον τρίτο μήνα οπότε και το επιθήλιο εμφανίζεται ως μια πυκνή χρωστικοφόρο μονοκυτταρική στιβάδα. Συνεπώς, το μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς, προερχόμενο από το νευροεξώδερμα, είναι πλήρες χρωστικής προτού η διαδικασία χρώσης του χοριοειδούς, προερχόμενου από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, να έχει ξεκινήσει.<sup>15-25</sup>



*Εικόνα 1.1.2: Αξονική τομή οφθαλμού ενός κνήματος 35 mm (9-10 εβδομάδες της κύησης). Διακρίνονται οι έσω και έξω στιβάδες του οπτικού κύπελλου, οι έσω και έξω νευροβλαστικές στιβάδες οι οποίες είναι καλά αναπτυγμένες, καθώς και το πρωτογενές υαλοειδές με το υαλοειδικό αγγειακό σύστημα.<sup>18</sup>*

Η σηματοδότηση μέσω του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Επειδή το οπτικό κυστίδιο εγκολπώνεται για να σχηματίσει το οφθαλμικό κύπελλο, η νευρική στιβάδα του αμφιβληστροειδούς «αναστρέφεται», έτσι ώστε τα φωτοευαίσθητα τμήματα των φωτοϋποδοχικών κυττάρων να γειτνιάζουν με το μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς. Έτσι το φως πρέπει να περάσει διαμέσου του πεπαχυσμένου τμήματος του αμφιβληστροειδούς, πριν φτάσει στους φωτοϋποδοχείς. Όμως επειδή ο αμφιβληστροειδής γενικά είναι λεπτός και διαφανής, δεν αποτελεί φραγμό για το φως. Οι νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων στην επιφανειακή στιβάδα του νευ-

ρικού αμφιβληστροειδούς αυξάνουν προς τον εγκέφαλο διερχόμενοι από το τοίχωμα του οπτικού μίσχου, με αποτέλεσμα η κοιλότητα του οπτικού μίσχου να αποφράσσεται σταδιακά από τους νευράξονες των άφθωνων γαγγλιακών κυττάρων, οι οποίοι σχηματίζουν το οπτικό νεύρο.<sup>15-25</sup>

Τέλος, η μυελίνωση των ινών του οπτικού νεύρου δεν είναι ολοκληρωμένη κατά τη γέννηση. Ολοκληρώνεται, μετά την έκθεση των οφθαλμών στο φως περίπου την 10η εβδομάδα και σταματά πλησίον του οπτικού δίσκου, στο σημείο όπου το οπτικό νεύρο εισέρχεται στον οφθαλμικό βολβό.<sup>15-25</sup>

## 1.2 ANATOMIA

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί μια λεπτή, διαφανή μεμβράνη η οποία στους ζώντες οργανισμούς έχει ένα πορφυροειδές (ρόδινο) χρώμα. Το πάχος του ποικίλλει από 0.56 mm κοντά στον οπτικό δίσκο έως 0.1mm στην προιονωτή περιφέρεια (ora serrata). Είναι λεπτότερος στο κέντρο της ωχράς κηλίδας. Προς τα πίσω συνεχίζεται με το οπτικό νεύρο, ενώ πρόσθια μεταπίπτει στο επιθήλιο του ακτινωτού σώματος και της ίριδας. Η εξωτερική επιφάνεια του αμφιβληστροειδή βρίσκεται σε επαφή με τη μεμβράνη του Bruch του χοριοειδούς, ενώ η εσωτερική του επιφάνεια βρίσκεται σε επαφή με το υαλοειδές σώμα. Είναι προσκολλημένος σταθερά στα χείλη του οπτικού δίσκου καθώς και κατά το πρόσθιο όριο του, στην προιονωτή περιφέρεια. Αντίστοιχα προς την έσω μοίρα του εκτείνεται περισσότερο πρόσθια, με αποτέλεσμα η προιονωτή περιφέρεια να βρίσκεται πιο κοντά στο σκληροκερατοειδικό όριο (ΣΚΟ) κατά την έσω πλευρά. Οδηγά σημεία για τα όρια του αμφιβληστροειδή στην εξωτερική επιφάνεια του βολβού αποτελούν, πάντα κατά προσέγγιση, το σημείο κατάφυσης του έσω ορθού για την έσω πλευρά και το σημείο κατάφυσης του έξω ορθού για την έξω πλευρά.<sup>14-17, 26, 27</sup>

Στο κέντρο της οπίσθιας (οπτικής) μοίρας του αμφιβληστροειδή βρίσκεται μια ωοειδής, χωρίς τριχοειδή αγγεία, υποκίτρινη περιοχή, η ωχρά κηλίδα, η οποία αποτελεί την αμφιβληστροειδική περιοχή για την πλέον ευκρινή όραση. Η ωχρά κηλίδα διαθέτει μια κεντρική

εμβύθιση, το κεντρικό βοθρίο. Το έδαφος του κεντρικού βοθρίου, το βοθριόλιο είναι η μόνη περιοχή όπου δεν βρίσκονται ραβδία.<sup>14-28</sup>

Ο περιφερειακός αμφιβληστροειδής καταλήγει στη προιονωτή περιφέρεια. Προς τη περιφέρεια λεπτύνεται και εξαφανίζεται η στιβάδα των νευρικών ινών, η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και η έσω και έξω κοκκώδης στιβάδα. Τα ραβδία τέλος εξαφανίζονται 1 χιλιοστό από την προιονωτή περιφέρεια.<sup>14-28</sup>

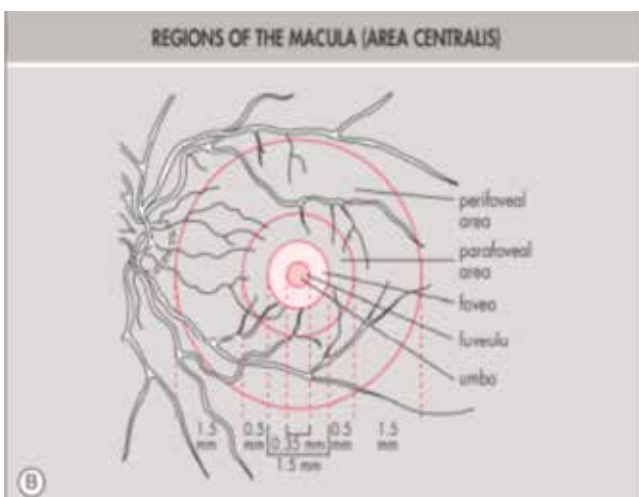
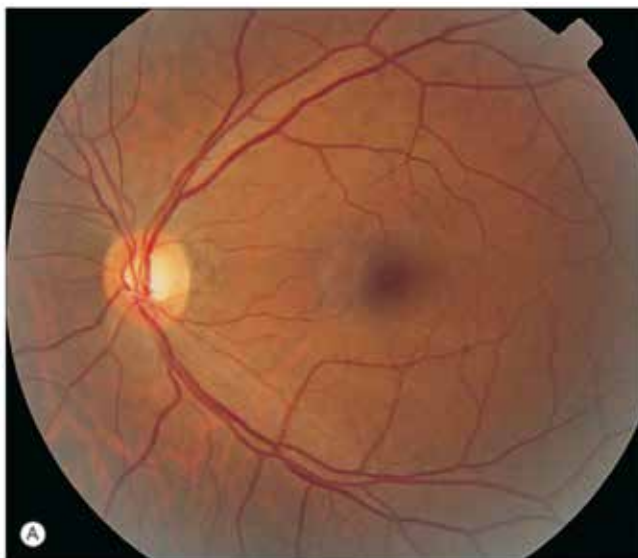
Το οπτικό νεύρο αποχωρίζεται τον αμφιβληστροειδή περί τα 3mm ρινηώς της ωχράς, στον οπτικό δίσκο. Ο οπτικός δίσκος εμφανίζει μια ελαφρά κοίλανση στο κέντρο, στο σημείο όπου διατιτράνεται από την κεντρική αρτηρία και φλέβα.<sup>14-28</sup>

Πιο αναλυτικά, ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από ένα εξωτερικό μελαγχρωστικό πέταλο (μελάγχρουν επιθήλιο) και ένα εσωτερικό νευροαισθητήριο πέταλο (ιδίως αμφιβληστροειδής). Η οπίσθια, οπτική μοίρα του αμφιβληστροειδή εκτείνεται από το οπτικό νεύρο ως ένα σημείο ακριβώς πίσω από το ακτινωτό σώμα όπου τερματίζεται με το πρόσθιο χείλος αυτού να σχηματίζει ένα κυματοειδή δακτύλιο, την προιονωτή περιφέρεια (ora serrata). Η πρόσθια, τυφλή μοίρα του αμφιβληστροειδή, κατά την ora serrata έρχεται σε συνέχεια με τη μελαγχρωματική και τη μη μελαγχρωματική επιθηλιακή στιβάδα (από κυλινδρικά κύτταρα) του ακτινωτού σώματος καθώς και των προβολών αυτού. Στη ίριδα τα δύο πέταλα συνεχίζονται στην οπίσθια επιφάνειά της, όπου γίνονται αμφοτέρω χρωστικοφόρα (μελαγχρωματικά), αποτελώντας το δίστιβο οπίσθιο επιθήλιο της ίριδας.<sup>14-28</sup>

Κλινικά, η ωχρά κηλίδα είναι η περιοχή διαφορετικής φωτεινής αντανάκλασης εντός των κροταφικών αρκάδων που εξυπηρετεί τις κεντρικές 20 μοίρες του οπτικού πεδίου και βρίσκεται 3.5 mm πλάγια και 1mm κάτω από το κροταφικό άκρο της οπτικής θηλής. Ανατομικά, η ωχρά κηλίδα είναι περίπου 5.5mm σε εγκάρσια διάμετρο ενώ στο κέντρο της εντοπίζεται το κεντρικό βοθρίο ως η σκοτεινή περιοχή της φωτεινής αντανάκλασης, με διάμετρο 1.9mm. Το έδαφος του κεντρικού βοθρίου είναι το βοθριόλιο με διάμετρο 0.35mm και με πληθυσμό αποκλειστικά κωνία. Το κεντρικό βοθρίο είναι πιο



σκούρο από τον περιβάλλοντα αμφιβληστροειδή, εν μέρει λόγω της παρουσίας μιας κίτρινης χρωστικής, της ξανθοφίλης, στον νευροαμφιβληστροειδή και εν μέρει επειδή τα υποκείμενα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου σε αυτήν την περιοχή είναι μικρότερα και πιο πυκνά χρωματισμένα. Τα κωνία ανευρίσκονται στη μεγαλύτερή τους πυκνότητα (15000 / mm<sup>2</sup>) στο βοθριόλιο και μειώνονται σε περίπου 4000- 5000 / mm<sup>2</sup> στην περιφέρεια. Αντίθετα, τα ραβδία επιτυγχάνουν τη μεγαλύτερη πυκνότητά τους σε περίπου 200 από το κέντρο



Εικόνα 1.2.1: Α. Φωτογραφία φυσιολογικού βυθού όπου φαίνονται ο οπτικός δίσκος, η ωχρά κηλίδα και τα αγγεία του αμφιβληστροειδούς. Β. Σχηματική απεικόνιση των ανατομικών υποπεριοχών της ωχράς κηλίδας από το κέντρο προς την περιφέρεια.<sup>28</sup>

προσήλωσης (στο ισόπερο του οπτικού πεδίου αμέσως περιφερικότερα της οπτικής θηλής). Συνολικά, ο αμφιβληστροειδής του νεαρού ενήλικα περιέχει περίπου 120 εκατομμύρια ραβδία και 6 εκατομμύρια κωνία.<sup>18-25,28</sup>

Πιο αναλυτικά, η ωχρά κηλίδα (macula) διαιρείται στις εξής υποπεριοχές: το κέντρο του βοθριολίου (umbo), το βοθριόλιο (foveola), το κεντρικό βοθρίο (fovea), την παραβοθρική περιοχή (parafovea) και την περιβοθρική περιοχή (perifovea). Το βοθριόλιο έχει διάμετρο 350 μm και πάχος 150 μm, ενώ αποτελεί ανάγγειο περιοχή με υψηλό αριθμό κωνίων όπως προαναφέρθηκε. Το κεντρικό βοθρίο έχει διάμετρο 1500 μm και πάχος 0.55 mm. Η παραβοθρική περιοχή αποτελεί μια ζώνη με πλάτος 0.5 mm και περιβάλλει τα όρια του κεντρικού βοθρίου. Η περιβοθρική περιοχή περιβάλλει την παραβοθρική περιοχή ως ζώνη με πλάτος 1.5 mm. (Εικόνα 1.2.1 Β)<sup>28</sup>

Όσον αφορά τον οπτικό δίσκο, βρίσκεται περίπου 3 mm ρινικά της ωχράς κηλίδας. Η χροιά του είναι ωχρο-ρόδινη ή σχεδόν λευκή ενώ γενικά είναι πολύ πιο ωχρή από αυτήν του περιβάλλοντα αμφιβληστροειδή. Η διάμετρός του είναι περίπου 1,5 mm, ενώ το χείλος του είναι ελαφρώς υπεγεωμένο και η κεντρική του μοίρα κοίλη. Εντός της κοίλασής του εισέρχονται και εξέρχονται τα κεντρικά αμφιβληστροειδικά αγγεία από τον οφθαλμό. Στον οπτικό δίσκο, οι οπτικές νευρικές ίνες εξέρχονται από τον βολβό αφού διαπυκνώνουν τον σκληρό. Αυτή η περιοχή του σκληρού ονομάζεται «ηθμοειδές πέταλο». Όπισθεν του οπτικού δίσκου, οι νευρικές ίνες είναι εμμύελες, ενώ έμπροσθεν αμύελες. Επίσης, στον οπτικό δίσκο απουσιάζουν πλήρως τα ραβδία και τα κωνία και επομένως η περιοχή αυτή είναι πλήρως ανερέθιστη στο φως και καλείται «τυφλή κηλίδα (ή σημείο)».<sup>18-25, 28</sup>

Όσον αφορά την αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς, προέρχεται από δύο πηγές: 1) οι εξωτερικές στιβάδες, συμπεριλαμβανομένων των ραβδίων και των κωνίων, καθώς και της έξω κοκκώδους στιβάδας, τροφοδοτούνται από τα χοριοειδικά τριχοειδή μέσω διάχυσης ιστικού υγρού μεταξύ των κυττάρων, 2) οι εσωτερικές στιβάδες τροφοδοτούνται από την κεντρική αρτηρία και φλέβα. Οι αρτηρίες του αμφιβληστροειδούς είναι ανα-

τομικά τελικές αρτηρίες και δεν υφίστανται αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις. Η αιμάτωση του αμφιβληστροειδούς εξαρτάται εξίσου και από τις δύο κυκλοφορίες καθώς καμία από μόνη της δεν είναι επαρκής. Επίσης, ο αμφιβληστροειδής προστατεύεται από μακρομόρια της κυκλοφορίας εξαιτίας της παρουσίας του μη θυριδωτού ενδοθηλίου των τριχοειδών αλλά και των στερεών συνδέσεων (tight junctions) των κυττάρων του ΜΕ.<sup>14-28</sup>

Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς αποτελεί τον πρώτο κλάδο της οφθαλμικής αρτηρίας. Έχει διάμετρο 0.3 mm και πορεύεται πρόσθια, προσκολλημένη στη σκληρή μήνιγγα του οπτικού νεύρου. Εισχωρεί στο οπτικό νεύρο από την κάτω-έσω πλευρά αυτού περίπου 12 mm πίσω από το βολβό, διατιτραίνοντας τη σκληρή και αραχνοειδή μήνιγγα, από τις οποίες και αποκτά περίβλημα. Αφού φθάσει στο κέντρο του οπτικού νεύρου, κάμπτεται και πάλι πρόσθια και εν συνεχεία, περιβαλλόμενη από ένα συμπαθητικό πλέγμα και συνοδευόμενη από την κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς, διαπερνά το ηθμοειδές πέταλο για να εισέλθει στον οφθαλμικό βολβό. Οι κλάδοι της κεντρικής αρτηρίας και φλέβας αναδύονται από το κέντρο του οπτικού δίσκου, συνήθως προς τη ρινική πλευρά. Στον οπτικό δίσκο η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς διαιρείται σε τέσσερις κύριους κλάδους οι οποίοι είναι αρτηριόλια καθένας των οποίων είναι τελικός κλάδος χωρίς αναστομώσεις. Αυτά τα αρτηριόλια έχουν ένα μέσο χιτώνα πάχους 7-8 λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ απουσιάζει το έσω ελαστικό πέταλο. Οι κύριοι αρτηριακοί κλάδοι βρίσκονται στη στιβάδα των νευρικών ινών κάτω από τον έσω αφοριστικό υμένα, όπου διασταυρώνονται με τις συνοδές φλέβες με τις οποίες έχουν κοινό έξω χιτώνα. Τα τριχοειδή του αμφιβληστροειδούς σχηματίζουν επιπολής και εν τω βάθει δίκτυα όμως δεν εκτείνονται πιο έξω από την έσω κοκκώδη στιβάδα. Αρχικά, η κεντρική αρτηρία διαιρείται ισομερώς σε δύο κλάδους, τον άνω και κάτω. Μετά από διαδρομή λίγων χιλιοστών, οι κλάδοι αυτοί διχοτομούνται σε άνω και κάτω κροταφικοί και ρινικοί κλάδοι. Η τελευταία αυτή διαίρεση λαμβάνει χώρα είτε εντός του οπτικού νεύρου είτε στην επιφάνεια του οπτικού

δίσκου. Κάθε ένας από τους τέσσερις κλάδους της κεντρικής αρτηρίας τροφοδοτεί ένα τεταρτημόριο του αμφιβληστροειδούς, χωρίς να επικαλύπτονται και χωρίς να δημιουργούνται αναστομώσεις μεταξύ κλάδων στο ίδιο τεταρτημόριο. Οι ρινικοί κλάδοι πορεύονται σχετικά ευθεία προς την προιονωτή περιφέρεια ενώ οι κροταφικοί κλάδοι πορεύονται τοξοειδώς πάνω και κάτω από το κεντρικό βοθρίο και εν συνεχεία προς την προιονωτή περιφέρεια.<sup>14-28</sup>

Πιο συγκεκριμένα για την περιοχή της ωχράς κηλίδας, τα τριχοειδικά δίκτυα παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση με εξαίρεση το κεντρικό βοθρίο. Το κεντρικό βοθρίο χαρακτηρίζεται ως ανάγγειος ζώνη λόγω απουσίας των τριχοειδών και έχει διάμετρο ίση περίπου με 500μm. Θηλεωχρικές αρτηρίες υπάρχουν στο 20% των ασθενών και είναι κυρίως υπεύθυνες για την αιμάτωση της ωχράς κηλίδας. Στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς, τα τριχοειδή είναι πιο αραιά και στην προιονωτή περιφέρεια απουσιάζουν.<sup>14-28</sup>

Η κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς σχηματίζεται από τη συμβολή φλεβικών κλάδων οι οποίοι συνοδεύουν τις αρτηρίες. Η κεντρική φλέβα έχει μεγαλύτερη διάμετρο κατά 25-30% από την κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς. Οι φλέβες έχουν παρόμοια αλλά όχι ταυτόσημη πορεία με τις αρτηρίες και πορεύονται λιγότερο επιφανειακά σε σχέση με τις αρτηρίες. Τα φλεβίδια προκύπτουν από τα τριχοειδή πλέγματα και συνενώνονται σχηματίζοντας τις μεγαλύτερες φλέβες. Η κεντρική φλέβα εξέρχεται από τον βολβό διαμέσου του ηθμοειδούς πετάλου, συνοδεύοντας σε όλη την πορεία της την κεντρική αρτηρία. Εν συνεχεία, διαμέσου του υπαραχνοειδούς χώρου διατιτραίνει τη σκληρή μήνιγγα και εκβάλλει στο σθραγγώδη κόλπο ή στην άνω οφθαλμική φλέβα.<sup>14-28</sup>

### 1.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ιστολογικά, ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από δέκα (10) στιβάδες. Αυτές, από έξω προς τα έσω, είναι οι ακόλουθες:

1. **Το μελάγχρουν επιθήλιο**, το οποίο αποτελείται από

μία στιβάδα κυβοειδών κυττάρων, πλούσιων σε μελανίνη. Η στιβάδα αυτή διαχωρίζεται από το χοριοειδή με τη μεμβράνη του Bruch και βρίσκεται μεταξύ του χοριοειδούς και των έξω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων.

2. **Η στιβάδα των ραβδίων και κωνίων**, είναι μια σημαντική στιβάδα με ινιδώδη μορφή, η οποία περιλαμβάνει τα έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων, που διατάσσονται παράλληλα μεταξύ τους.

3. **Η έξω αφοριστική μεμβράνη**, η οποία είναι μια γραμμή σχηματιζόμενη από τα συνδετικά συμπλέγματα μεταξύ των φωτοϋποδοχέων και των στηρικτικών κυττάρων του Müller.

4. **Η έξω κοκκώδης στιβάδα**, δημιουργούμενη από τα κυτταρικά σώματα με τον πυρήνα των ραβδίων και των κωνίων, τα οποία είναι διατεταγμένα με πασσαλοειδή τρόπο.

5. **Η έξω δικτυωτή στιβάδα**, που είναι μια ελαφρώς χρωματιζόμενη περιοχή, αντιστοιχούσα στον τόπο που γίνονται οι συνάψεις μεταξύ των φωτοϋποδοχέων και των δενδριτών των διπλών κυττάρων.

6. **Η έσω κοκκώδης στιβάδα**, η οποία περιέχει κυρίως

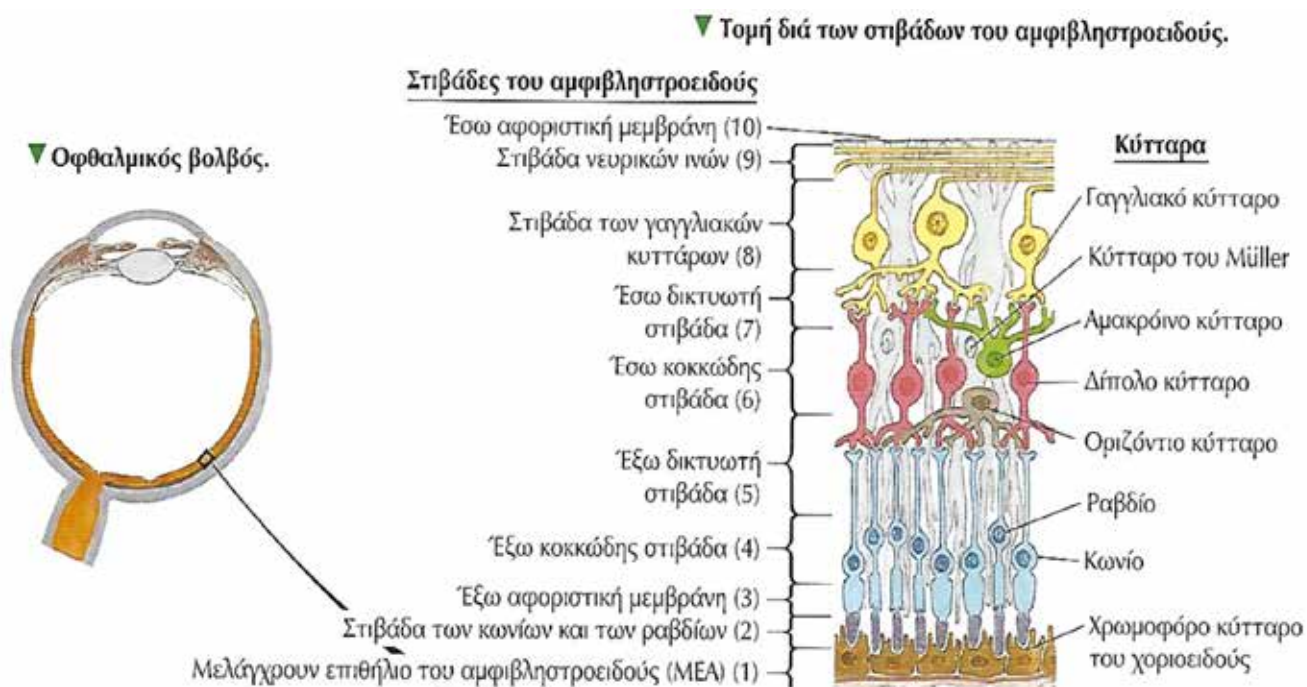
τα κυτταρικά σώματα των διπλών, των οριζόντιων και των αμακρόινων κυττάρων καθώς και τους πυρήνες των κυττάρων του Müller

7. **Η έσω δικτυωτή στιβάδα**, που είναι μια σχετικά παχιά συναπτική περιοχή με συνάψεις κυρίως μεταξύ των νευραξόνων των διπλών και των δενδριτών των γαγγλιακών κυττάρων, η οποία όμως περιέχει και προσεκβολές αμακρόινων κυττάρων, οι οποίες εξαπλώνονται πλαγίως, διασυνδέοντας νευρώνες.

8. **Η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων**, που περιέχει τα κυτταρικά σώματα των πολυπόλων γαγγλιακών κυττάρων. Οι δενδρίτες τους διακλαδίζονται προς την έσω δικτυωτή στιβάδα.

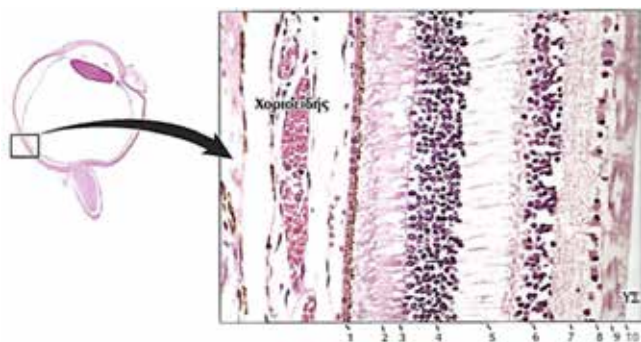
9. **Η στιβάδα των νευρικών ινών**, η οποία περιλαμβάνει τους νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων που αριθμούν περίπου 1000000 σε κάθε αμφιβληστροειδή και τον διατρέχουν ακτινοειδώς προς το οπτικό νεύρο.

10. **Η έσω αφοριστική μεμβράνη**, που είναι μια λεπτή βασική μεμβράνη, σχηματιζόμενη από τις αποφυάδες των κυττάρων του Müller και οριοθετεί τον νευροαμφιβληστροειδή από το υαλώδες σώμα.<sup>14, 17, 26, 29</sup>



Εικόνα 1.3.1: Σχηματική αναπαράσταση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς και των κυττάρων που τις αποτελούν.<sup>14</sup>





Εικόνα 1.3.2: Εικόνα οπτικού μικροσκοπίου με τις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς όπως έχουν αριθμηθεί στην εικόνα 1.3.1.<sup>14</sup>

Οι φωτοϋποδοχείς ανιχνεύουν φως και τα κύτταρα του μελαγχρού επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς τους υποστηρίζουν μεταβολικά. Η έσω αμφιβληστροειδική δομή υποστηρίζεται από τα κύτταρα του Müller. Ο υπόλοιπος νευροαμφιβληστροειδικός ιστός ολοκληρώνει και δημιουργεί οπτικές πληροφορίες, ώστε όταν το οπτικό σήμα φθάνει στους άξονες του οπτικού νεύρου έχει ήδη υποστεί κωδικοποίηση των πληροφοριών.<sup>18</sup>

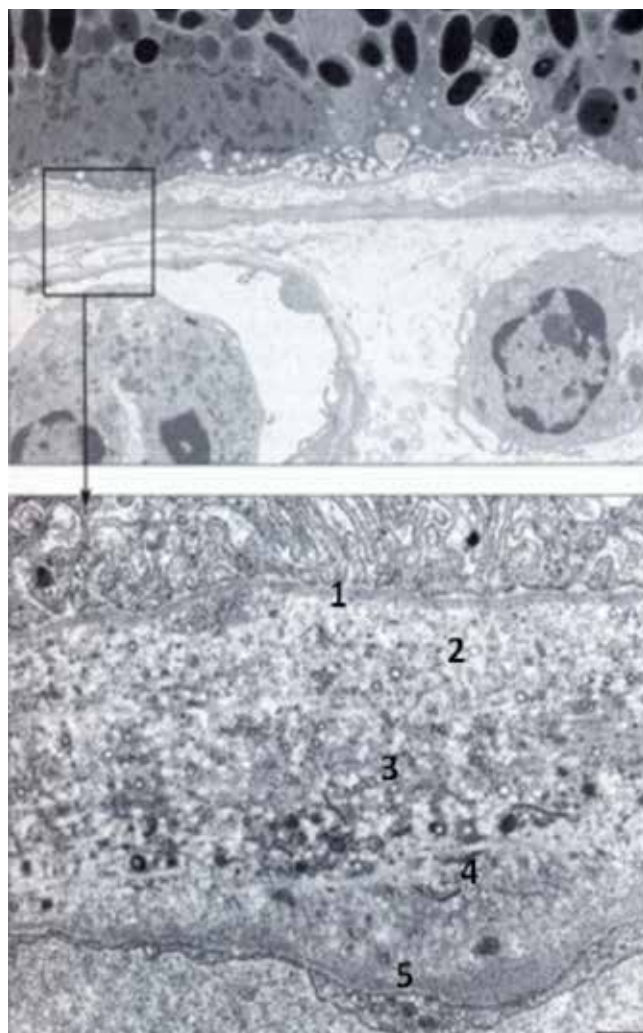
Συνεπώς ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από δέκα στιβάδες και συγκεκριμένα, αποτελείται από τέσσερις κυτταρικές στιβάδες, δύο στιβάδες νευρωνικών συνδέσεων και δύο αφοριστικές μεμβράνες. Σε ιστολογικές τομές του αμφιβληστροειδή αυτή η απλή κατασκευή των δέκα στιβάδων δεν υπάρχει και μια πολύ περισσότερο πολύπλοκη δομή προκύπτει από την παράθεση ομοίων τμημάτων γειτονικών κυττάρων. Για παράδειγμα, οι φωτοϋποδοχείς μόνο μετέχουν σε 4 στιβάδες. Οι δύο αφοριστικοί υμένες σχηματίζονται από τμήματα των κυττάρων του Müller, ένα αμφιβληστροειδικό κύτταρο γλοίας του οποίου οι αποφύσεις εκτείνονται κατά μήκος των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς μεταξύ των αφοριστικών υμένων και των οποίων οι πυρήνες βρίσκονται στην έσω κοκκώδη στιβάδα. Ο έξω αφοριστικός υμένας, ο οποίος βρίσκεται στο έξω άκρο των έσω τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, δεν είναι μια πραγματική μεμβράνη αλλά μια παράθεση συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του Müller και των φωτοϋποδοχέων. Σε αντίθεση, ο έσω αφοριστικός υμένας, στην αμφιβληστροειδική επιφάνεια, είναι μια αμγώως ακυτ-

ταρική μεμβράνη κείμενη κάτωθεν της στιβάδας των οπτικών ιών και εις την οποία εισδύουν ίνες της υαλοειδικής μεμβράνης του φλοιού του υαλοειδούς.<sup>18</sup>

Παρακάτω αναλύονται τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς.

#### A) Μembrάνη του Bruch

Η μεμβράνη του Bruch είναι ένα σύμπλεγμα βασικής μεμβράνης που βρίσκεται μεταξύ του αμφιβληστροειδικού μελαγχρού επιθηλίου και του χοριοειδούς χιτώνα. Αποτελείται από 5 στιβάδες οι οποίες είναι οι εξής (από τον αμφιβληστροειδή προς το χοριοειδή):



Εικόνα 1.3.3: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου φαίνονται οι πέντε στιβάδες της μεμβράνης του Bruch (αριθμημένες όπως έγινε περιγραφή τους στο κείμενο).<sup>18</sup>

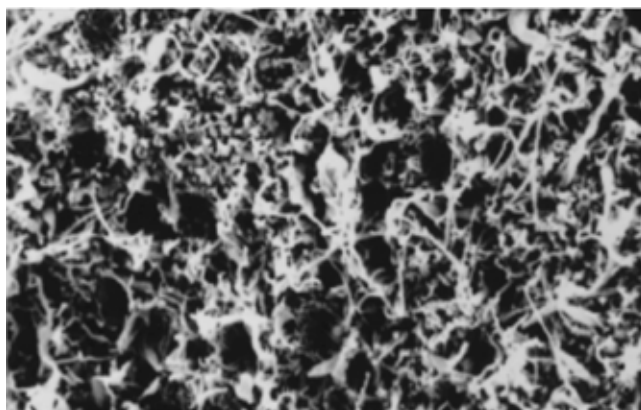


1. Η βασική μεμβράνη του μελαγχρόου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς
2. Η έσω κολλαγονική στιβάδα
3. Η στιβάδα ελαστίνης
4. Η έξω κολλαγονική στιβάδα
5. Η βασική μεμβράνη των χοριοτριχοειδών

Σε οφθαλμούς νεαρών ατόμων, η αμφιβληστροειδική επιφάνεια της μεμβράνης του Bruch είναι λεία και ακολουθεί την κανονική παράθεση των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου. Αντίθετα, η χοριοειδική επιφάνεια είναι ανώμαλη δημιουργώντας στήλες στους χώρους μεταξύ των χοριοτριχοειδών. Με την πάροδο της ηλικίας, το πάχος και η ινώδης διαπλοκή αυτών των στιβάδων αυξάνει και οι στήλες μεταξύ των χοριοτριχοειδών μεγαλώνουν.<sup>18,26</sup>

### **B) Μελαγχρωστικό πέταλο του αμφιβληστροειδή (Μελάγχρουν επιθήλιο)**

Το μελάγχρουν επιθήλιο (ME) του αμφιβληστροειδή αποτελείται από μια μονή στιβάδα κυττάρων που εκτείνεται από το χείλος του οπτικού νεύρου έως την προιονωτή περιφέρεια πρόσθια. Από εκεί συνεχίζεται προς τα εμπρός, μαζί με τη συνέχεια του ιδίως αμφιβληστροειδή, ως μελαγχρωματικό επιθήλιο του ακτινωτού σώματος. Τα κύτταρα του ME είναι στενά και επιμήκη στην περιοχή του οπίσθιου πόλου και περισσότερο αποπλατυσμένα κοντά στην προιονωτή περιφέρεια. Σε κατ'εφαπτομένη τομή, τα κύτταρα είναι εξαγωνικά. Το βασικό άκρο κάθε κυττάρου εμφανίζει πολλές πτυχώσεις και βρίσκεται σε επαφή με βασική μεμβράνη, η οποία σχηματίζει τμήμα της μεμβράνης του Bruch του χοριοειδούς. Το κορυφαίο άκρο του κυττάρου εμφανίζει πολυάριθμες μικρολάχνες μήκους 5-7 μm. Οι μικρολάχνες είναι εμβυθισμένες σε γλυκοζαμινογλυκάνες οι οποίες δρουν ως μέσον προσκόλλησης μεταξύ μελαγχρωστικού και νευροαισθητήριου πετάλου του αμφιβληστροειδούς. Συγκεκριμένα, προβάλλουν μεταξύ των εξωτερικών τμημάτων των ραβδίων και κωνίων, τα οποία και περιβάλλουν, χωρίς την παρουσία ειδικών μεταξύ τους συνδέσεων.



*Εικόνα 1.3.4: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης όπου απεικονίζεται η κορυφαία επιφάνεια του μελαγχρόου επιθηλίου. Μικρολάχνες καλύπτουν την επιφάνειά τους και εκτείνονται ανάμεσα στα έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων. Επίσης, φαίνεται το εξαγωνικό σχήμα των κυττάρων του.<sup>28</sup>*

Οι γειτονικές κυτταρικές μεμβράνες συνδέονται κατά τη βασική περιοχή με ζώνες προσκόλλησης, οι οποίες και περιβάλλουν το κύτταρο, ενώ στην κορυφαία περιοχή συνδέονται με αποφρακτικές ζώνες οι οποίες επίσης περιβάλλουν το κύτταρο και πρακτικώς εξαλείφουν τα μεσοκυττάρια διαστήματα. Αυτές οι «στερεές συνδέσεις» (tight junctions) είναι πολύ σημαντικές για τη διατήρηση της απομόνωσης του αμφιβληστροειδούς από τη συστηματική κυκλοφορία. Η διάταξη αυτή σχηματίζει ένα φραγμό, ο οποίος ονομάζεται αιματο-αμφιβληστροειδικός και ο οποίος εμποδίζει τη ροή των ιόντων και αποτρέπει τη διάχυση τοξικών μακρομορίων από τα χοριοειδικά τριχοειδή προς τους φωτοϋποδοχείς του ιδίως αμφιβληστροειδή.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Οι πυρήνες του ME βρίσκονται στο βασικό τμήμα του κυτταροπλάσματος, ενώ υπάρχουν και πολυάριθμα στρογγυλά ή ωοειδή κοκκία καφέ-μαύρης μελανίνης τα οποία εκτείνονται εντός των μικρολαχνών. Αυτή η χρωστική απορροφά φως μήκους κύματος μεταξύ 400 και 800 nm και έτσι ελαχιστοποιεί το ποσό του φωτός που ανακλάται ή διαχέεται μέσα στον οφθαλμό, προστατεύοντας τους φωτοϋποδοχείς από υποβάθμιση της σχηματιζόμενης εικόνας από τυχαία διαχεόμενο φως. Υπάρχει καλά αναπτυγμένο αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευές Golgi. Απαντώνται επίσης πολλά λυσοσώματα μαζί με υπολειμματικά σω-

μάτια ή φαγοσώματα. Η βάση των κυττάρων του ΜΕ δίπλα στη μεμβράνη του Bruch παρουσιάζει αναδιπλώσεις με μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων συγκεντρωμένο σε αυτό το σημείο. Αυτές οι πτυχώσεις αυξάνουν την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης που καλύπτεται από ειδικούς βιοχημικούς υποδοχείς. Έτσι τα κύτταρα του ΜΕ ενεργώς συγκεντρώνουν και μεταφέρουν μεταβολίτες διαχεόμενους δια της μεμβράνης του Bruch από τα υποκείμενα χοριοειδή και ενεργώς απεκκρίνουν άχρηστα προϊόντα μεταβολισμού (η αμφιβληστροειδική αρτηριακή κυκλοφορία δεν εξασφαλίζει τις μεταβολικές ανάγκες των φωτοϋποδοχέων).<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Επίσης, είναι πλέον γνωστό ότι κάθε κύτταρο του ΜΕ λειτουργεί σα στατικό μακροφάγο, δηλαδή εφόρου ζωής φαγοκυτταρώνει τις κορυφές των κωνίων και ραβδίων. Συγκεκριμένα, οι μικρολάχνες του κορυφαίου τμήματος διαρκώς διαβιβρώσκουν τα εξωτερικά άκρα των ραβδίων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα του ΜΕ φαγοκυτταρώνουν τα υπολείμματα, τα οποία περιέχουν τις μεμβρανώδεις δομές των εξωτερικών αποφυάδων των φωτοϋποδοχέων. Τα λυσοσώματα έχουν δραστικό ρόλο στην αποδόμηση του περιεχομένου των φαγοσωμάτων, ενώ τα κοκκία λιποφουσκίνης αποτελούν τα τελικά προϊόντα αυτής της διαδικασίας. Με την πάροδο της ηλικίας, αυτός ο μηχανισμός γίνεται λιγότερο αποτελεσματικός και τα προϊόντα αποδόμησης είτε αποθηκεύονται στο ΜΕ ως λιποφουσκίνη είτε στη μεμβράνη του Bruch ως drusen. Κάθε κύτταρο του ΜΕ εξυπηρετεί περίπου 45 φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι κρατούνται σε στενή επαφή με υποδεκτικά καλύμματα που επεκτείνονται από την επιφάνεια των κυττάρων του ΜΕ και παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην ανταλλαγή των μεταβολιτών μεταξύ των δύο κυτταρικών στιβάδων. Το εξωκυττάριο διάστημα σε αυτήν την περιοχή του αμφιβληστροειδούς γεμίζει με μεσοκυττάριο υλικό γλυκοζαμινογλυκανών, που ονομάζεται μεσοφωτοϋποδεκτικό υλικό και διαφέρει σε κατασκευή και χημική σύσταση γύρω από τα κωνία και τα ραβδία. Δεν υπάρχει ανατομική γέφυρα μεταξύ κυττάρων του ΜΕ και φωτοϋποδοχέων και αυτό είναι υπεύθυνο για την ευκολία με την οποία οι δύο αυτές στιβάδες αποχωρίζονται

παθολογικά. Πάντως η περιβάλλουσα αυτή ουσία τα κωνία, είναι περισσότερο συνδεδεμένη στο ΜΕ και ανθεκτική, γεγονός που εξηγεί την αυξημένη αντίσταση σε αποκόλληση που παρουσιάζει ο αμφιβληστροειδής στην περιοχή της ωχράς.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Όσον αφορά τις λειτουργίες του ΜΕ, σε αυτές περιλαμβάνονται η απορρόφηση του φωτός, η συμμετοχή στην ανακύκλωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, καθώς και στο σχηματισμό ροδοψίνης και ιωδοψίνης αποθηκεύοντας και εκλύοντας βιταμίνη Α, η οποία αποτελεί πρόδρομη ουσία για τις φωτοευαίσθητες χρωστικές. Τα κύτταρα του ΜΕ να έχουν επίσης εκκριτική λειτουργία. Συνεπώς, εξυπηρετεί και διατηρεί τους υπερκείμενους φωτοϋποδοχείς με πέντε κύριους μηχανισμούς: απορρόφηση του πλεονάζοντος φωτός, ενεργό μεταφορά μεταβολιτών, δημιουργία αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού, αναγέννηση φωτοχρωστικών και φαγοκυττάρωση.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Τα κύτταρα του ΜΕ απορροφούν φως μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος αποτρέπει την επιστροφή του φωτός (με αντανάκλαση) στο νευροαισθητήριο πέταλο του αμφιβληστροειδή και την επακόλουθη διαταραχή στην ευκρίνεια του ειδώλου.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

### **Γ) Νευροαισθητήριο πέταλο του αμφιβληστροειδή (ιδίως αμφιβληστροειδής)**

Ο ιδίως αμφιβληστροειδής αποτελείται από τρεις κύριες ομάδες νευρώνων: 1) τους φωτοϋποδοχείς (οπτικά κύτταρα), 2) τα δίπολα κύτταρα και 3) τα γαγγλιακά κύτταρα. Διαθέτει, επίσης και άλλα σημαντικά νευρικά κύτταρα, τα οριζόντια κύτταρα και τα αμακρόνια, που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των κυρίων νευρώνων. Τέλος, υπάρχουν και τα υποστηρικτικά κύτταρα (κύτταρα Müller).<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Οι φωτοϋποδοχείς είναι αντίστοιχοι με τους αισθητικούς υποδοχείς σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Τα δίπολα κύτταρα αντιστοιχούν στους νευρώνες των γαγγλίων των οπισθίων ριζών και σχηματίζουν τους νευρώνες πρώτης τάξεως (1ος αισθητικός νευρώνας). Τα γαγγλιακά κύτταρα αντιστοιχούν στους νευρώνες

του νωτιαίου μυελού και του στελέχους και αποτελούν τους νευρώνες δεύτερης τάξης (2ος αισθητικός νευρώνας). Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων αποκτούν έλυτρο μυελίνης αφού διέλθουν από το ηθμοειδές πέταλο και εισχωρήσουν στο οπτικό νεύρο. Τα έλυτρα μυελίνης αυτών των νευραξόνων σχηματίζονται μάλλον από ολιγοδενδροκύτταρα παρά από κύτταρα Schwann, καθώς το οπτικό νεύρο αποτελεί ανάλογο ταινίας νευρικών ινών του ΚΝΣ. Τα οπτικά νεύρα και ακολούθως οι οπτικές ταινίες άγουν τις ώσεις στα έξω γονατώδη σώματα, όπου οι περισσότεροι εκ των νευραξόνων καταλήγουν συναπτόμενοι με άλλα νευρικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά του έξω γονατώδους σώματος σχηματίζουν τους νευρώνες της τρίτης τάξης (3ος αισθητικός νευρώνας), οι δε άξονες αυτών καταλήγουν στον οπτικό φλοιό. Επομένως, αριθμός των νευρώνων που συμμετέχουν στην αγωγή οπτικών ερεθισμάτων, από τον αμφιβληστροειδή μέχρι τον οπτικό φλοιό, είναι ο ίδιος όπως και στις άλλες αισθητικές οδούς.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

### 1) Φωτοϋποδοχείς

Υπάρχουν δύο τύποι φωτοϋποδοχέων: τα ραβδία και τα κωνία. Έχουν την ίδια βασική οργανωτική δομή. Είναι επιμηκυσμένα κύτταρα και τα κυτταροπλασματικά τους συστατικά είναι κατανεμημένα με τέτοιο τρόπο, ώστε διαφορετικές λειτουργίες λαμβάνουν χώρα σε ειδικές θέσεις κατά μήκος του επιμήκη άξονά τους. Ο συνολικός αριθμός των ραβδίων στον αμφιβληστροειδή έχει υπολογισθεί περίπου σε 110-125 εκατομμύρια, ενώ αυτός των κωνίων 6.3-6.8 εκατομμύρια. Η πυκνότητα των ραβδίων και των κωνίων ποικίλει στις διάφορες περιοχές του αμφιβληστροειδή. Τα ραβδία απουσιάζουν στην ωχρά, αυξάνονται ταχέως προς την περιφέρεια για να ελαττωθούν προοδευτικά προς την άκρη περιφέρεια του αμφιβληστροειδή. Έχει υπολογισθεί ότι στην άκρη περιφέρεια απαντώνται περίπου 30000 ραβδία/mm<sup>2</sup>. Τα κωνία, αντίθετα, έχουν πυκνότερη κατανομή στην ωχρά και ο αριθμός τους ελαττώνεται στην περιφέρεια. Έχει ενδιαφέρον να τονισθεί ότι ο αριθμός των ραβδίων και κωνίων είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των γαγγλιακών κυττάρων (υπάρχουν περί-

που 1 εκατομμύριο γαγγλιακά κύτταρα σε κάθε αμφιβληστροειδή και περίπου 100 φωτοϋποδοχείς για κάθε ένα γαγγλιακό κύτταρο). Συνεπώς, μεγάλος αριθμός ραβδίων και κωνίων διεγείρουν έναν μόνο νευράξονα του οπτικού νεύρου.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Ο φωτοϋποδοχέας μετατρέπει το φως σε νευρικά σήματα. Η ενέργεια του φωτός στο φωτοϋποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα το «σβήσιμο» του κυττάρου. Η αλληλουχία ξεκινά με την απορρόφηση φωτονίων από την οπτική χρωστική στο έξω τμήμα, η οποία υφίσταται δομικές αλλαγές. Οι μοριακές αλλαγές στη φωτοχρωστική απελευθερώνουν έναν έσω μεταβιβαστή από τους δίσκους, ο οποίος πηγαίνοντας στην κυτταρική μεμβράνη προκαλεί μετατροπές δημιουργώντας υπερπόλωση του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεταβολή του δυναμικού πέριξ του φωτοϋποδοχέα και αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή στην κυτταρική σύναψη. Επιστρέφοντας στο σκοτάδι, η κατάσταση αναστρέφεται και ο νευροδιαβιβαστής απελευθερώνεται πάλι. Τα ραβδία είναι κυρίως υπεύθυνα για την όραση σε χαμηλό φωτισμό και παράγουν είδωλα που συνιστανται σε ποικιλία διαβαθμίσεων του άσπρου και του μαύρου. Αντίθετα, τα κωνία είναι προσαρμοσμένα στο έντονο φως και δύνανται να αναλύουν μικρές λεπτομέρειες και να παράγουν έγχρωμη όραση.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Όσον αφορά τη μορφή τους, τόσο τα κωνία όσο και τα ραβδία, είναι λεπτά και επιμηκυσμένα κύτταρα των οποίων οι ονομασίες περιγράφουν το σχήμα των ελεύθερων άκρων τους. Τα εξωτερικά άκρα τους περιβάλλονται από τις προσεκβολές του μελαγχρόου επιθηλίου, αναφέρονται δε ως έξω τμήματα. Ένας συνδετικός χροσσός συνδέει τα έξω τμήματα με τα έσω τμήματα.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Πιο συγκεκριμένα, τα ραβδιοφόρα κύτταρα είναι λεπτά κύτταρα μήκους 100-120μm. Το έξω τμήμα αυτών αποτελεί τον πραγματικό φωτοϋποδοχέα του κυττάρου και περιέχει την φωτοευαίσθητη χρωστική ροδοψίνη. Όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το έξω τμήμα διαθέτει 600-1000 εγκάρσια διατεταγμένα πετάλια ή δίσκους από μεμβράνη και βρίσκονται ο ένας πάνω στον άλλο, επάλληλα, σαν στήλη από νομίσματα. Τα μόρια της ροδοψίνης βρίσκονται εντός της μεμβρά-

νης των δίσκων. Κάθε δίσκος έχει διάμετρο κατά προσέγγιση 2 $\mu$ m και πάχος 14nm.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

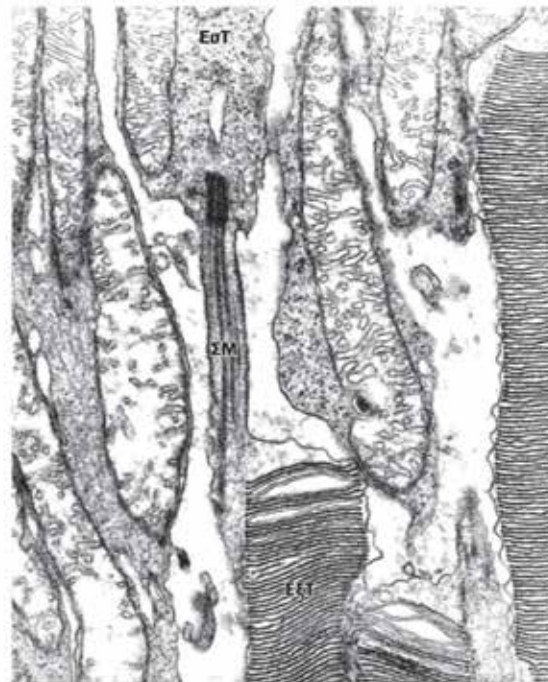
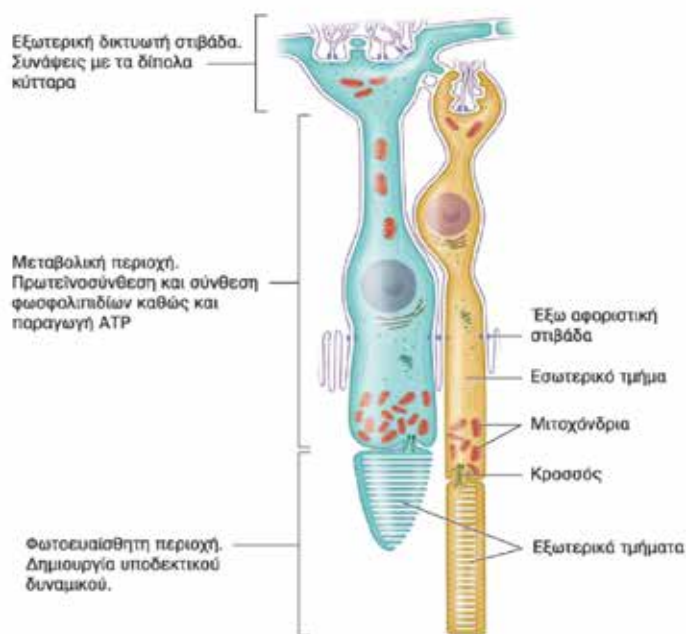
Έχει αποδειχθεί ότι οι δίσκοι σχηματίζονται στη βασική μοίρα του έξω τμήματος και εν συνεχεία ωθούνται προς το ελεύθερο άκρο του έξω τμήματος. Όταν οι δίσκοι φθάσουν στην κορυφή του έξω τμήματος, το ελεύθερο άκρο μαζί με τους περιεχόμενους δίσκους φαγοκυτταρώνονται από τα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου. Αυτή η αποδόμηση (ή απόπτωση) των δίσκων των ραβδίων δεν γίνεται με τρόπο συνεχή, αλλά μάλλον ακολουθεί 24ωρο κύκλο κατά τον οποίον οι περισσότεροι δίσκοι αποπίπτουν μια φορά ημερησίως, νωρίς το πρωί.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Ο συνδετικός κροσσός περιέχει τα συνήθη εννέα ζεύγη μικροσωληνίσκων αλλά δε διαθέτει κεντρικό ζεύγος. Εκφύεται από ένα βασικό σωματίο που ανευρίσκεται στο έσω τμήμα. Πρόσφατες έρευνες γύρω από τα έξω τμήματα των ραβδίων δείχνουν ότι πρόκειται στην πραγματικότητα για τροποποιημένους κροσσούς.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Το έσω τμήμα αποτελείται από δύο μέρη ή ζώνες, το ελλειψοειδές που βρίσκεται κοντά στον συνδετικό κροσσό και το μυοειδές προς τον πυρήνα. Το ελλειψοειδές περιέχει το βασικό σωματίο και πολυάριθμα μιτοχόνδρια, ενώ το μυοειδές περιέχει το αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ελεύθερα ριβοσώματα και συσκευές Golgi.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Το υπόλοιπο τμήμα του ραβδιοφόρου κυττάρου (επί τα εντός του έξω τμήματος, προς το υαλοειδές) αποτελείται από την έξω αποφυάδα, το κυτταρικό σώμα, την έσω αποφυάδα και το συναπτικό σώμα ή σφαιρίδιο. Η έξω αποφυάδα, εύρους 1 $\mu$ m, συνδέει το έσω τμήμα του ραβδίου με το σώμα του ραβδιοφόρου κυττάρου. Η έσω αποφυάδα περιέχει πολυάριθμους μικροσωληνίσκους και συνδέει το κυτταρικό σώμα με το απιοειδούς σχήματος σφαιρίδιο. Το σφαιρίδιο του ραβδιοφόρου κυττάρου περιέχει πολλά προσυναπτικά κυστίδια και συνάπτεται με τους δενδρίτες των διπόλων κυττάρων.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Όσον αφορά, τα κωνιοφόρα κύτταρα είναι επίσης

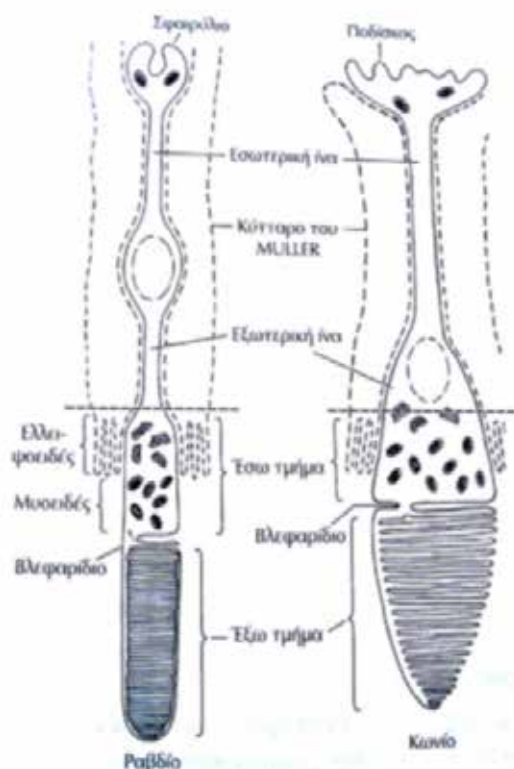


Εικόνα 1.3.5: α) Σχηματική απεικόνιση ενός ραβδίου (δεξιά) και ενός κωνίου (αριστερά). β) Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου όπου φαίνεται ένα ραβδί με το εσωτερικό τμήμα του (ΕσΤ) με παρουσία μιτοχονδρίων, συνδετικό μίσχο (ΣΜ) μεταξύ του έσω και έξω τμήματός του και το εξωτερικό φωτοευαίσθητο τμήμα του (ΕξΤ) με τους πολλαπλούς αποπλατυσμένους, παράλληλους μεμβρανικούς δίσκους. X24000.<sup>30</sup>



λεπτά και επιμήκη, έχουν δε μήκος περί τα 65-75μm. Η δομή των κωνίων είναι όμοια με αυτήν των ραβδίων, με ένα έξω τμήμα, ένα συνδετικό κροσσό και ένα έσω τμήμα. Το έξω τμήμα είναι κωνικό με αρκετά πιο ευρεία βάση σε σχέση με τα ραβδία και λεπταίνει κωνοειδώς καταλήγοντας σε στρογγυλεμένο άκρο. Οι μεμβράνες των εγκαρσίως διατεταγμένων δίσκων είναι συνεχόμενες με την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη. Ως εκ τούτου, τα πετάλια των δίσκων, σε αντίθεση με αυτά των ραβδίων, είναι σε συνέχεια με τον εξωκυττάριο χώρο. Οι κορυφές των κωνίων δεν φαγοκυτταρώνονται από τα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου. Διάφορες φωτοευαίσθητες ουσίες βρίσκονται εντός των κωνίων, με σύσταση παρόμοια με της ροδοψίνης και είναι γνωστές ως ιωδοψίνες. Όπως και στα ραβδία, οι φωτοευαίσθητες χρωστικές είναι συσσωρευμένες εντός της μεμβράνης των δίσκων.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Το έξω τμήμα του κωνίου συνδέεται με το έσω τμήμα μέσω ενός τροποποιημένου κροσσού που είναι κεντρικά



Εικόνα 1.3.6: Σχηματική απεικόνιση ραβδίου και κωνίου<sup>31</sup>

τοποθετημένος. Η δομή του έσω τμήματος των κωνίων μοιάζει με του αντίστοιχου των ραβδίων. Το έσω τμήμα συγχωνεύεται με το σώμα του κωνιοφόρου κυττάρου, το οποίο περιέχει ένα ευμεγέθη, ωχρό πυρήνα. Το σώμα συνδέεται μέσω της έσω αποφυάδας με διευρυσμένο άκρο, τον τελικό ποδίσκο. Ο τελευταίος συνάπτεται με τους δενδρίτες των διπλών κυττάρων.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

Τέλος, οι φωτούποδοχείς συνεχώς αντικαθιστούν ένα μεγάλο τμήμα τους εφόρου ζωής. Ωστόσο, αυτή η διεργασία διαφέρει στα ραβδία και στα κωνία. Στα ραβδία νέοι δίσκοι σχηματίζονται στο συνδετικό κροσσό με ρυθμό 1-5 ανά ώρα και κάθε νεοσχηματιζόμενος δίσκος παρεκτοπίζει τους παλαιότερους προς το ΜΕ. Οι παλαιότεροι δίσκοι αποπίπτουν από τα άκρα των έξω τμημάτων σε δέσμες των 30 με μία ισορροπημένη διεργασία που δεν αλλοιώνει το μήκος του ραβδίου. Ομάδες δίσκων των ραβδίων αποπίπτουν νωρίς το πρωί ή μετά από παρατεταμένη περίοδο σκότους στην εμφάνιση φωτός. Οι δίσκοι που αποπίπτουν φαγοκυτταρώνονται από το ΜΕ και γι'αυτό τα έξω τμήματα των ραβδίων αντικαθίστανται πλήρως κάθε 8-14 ημέρες. Αντίθετα, η αντικατάσταση των δίσκων στα κωνία είναι βραδύτερη και απαιτούνται 9 έως 12 μήνες για την πλήρη αντικατάσταση του έξω τμήματός τους. Επίσης, σε αντίθεση με τα ραβδία, τα κωνία απομακρύνουν τα φαγοσώματά τους τη νύχτα.<sup>14, 17, 18, 26, 29</sup>

## 2) Δίπολα κύτταρα

Τα δίπολα κύτταρα είναι ακτινοειδώς προσανατολισμένα. Ένας ή περισσότεροι δενδρίτες των διπλών κυττάρων οδεύουν προς το εξωτερικό όπου συνάπτονται με τα κύτταρα των φωτούποδοχέων στις τελικές απολήξεις αυτών. Ο μοναδικός νευράξονας κατευθύνεται προς το εσωτερικό όπου συνάπτεται με τα γαγγλιακά και τα αμακρόινα κύτταρα. Διάφοροι τύποι διπλών κυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί με βάση το είδος των συνάψεών τους. Τα σχετιζόμενα με ραβδία (Rod bipolar cells) συνδέουν πολλά ραβδιοφόρα κύτταρα με ένα έως τέσσερα γαγγλιακά κύτταρα. Τα πολυσυναπτικά δίκην ριπιδίου (Flat bipolar cells) συνδέουν πολλά κωνιοφόρα κύτταρα με πολλά γαγγλιακά κύτταρα. Τα

μονοσυναπτικά (Midget bipolar cells) συνδέουν ένα μοναδικό κωνιοφόρο κύτταρο με ένα γαγγλιακό κύτταρο midget (νάνος). Ο τελευταίος αυτός τύπος διάταξης παρέχει μια απευθείας σύνδεση (οδό) από ένα κωνίο προς μια μοναδική οπτική νευρική ίνα.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

### 3) Γαγγλιακά κύτταρα

Τα γαγγλιακά κύτταρα ονομάζονται έτσι διότι μοιάζουν με κύτταρα που απαντώνται στα νευρικά γάγγλια. Εντοπίζονται στην εσωτερη μοίρα του αμφιβληστροειδή. Τα γαγγλιακά κύτταρα αποτελούν τον 2ο αισθητικό νευρώνα στην οπτική οδό. Η διάμετρος τους ποικίλει από 10 έως 30μm. Τα περισσότερα εξ'αυτών είναι μικρά (midget ganglion cells), υπάρχει όμως και ένας αριθμός κυττάρων μεγάλου μεγέθους. Στη μεγαλύτερη έκταση του αμφιβληστροειδή τα γαγγλιακά κύτταρα σχηματίζουν μια μονή στιβάδα. Ωστόσο, ο αριθμός των στιβάδων αυξάνει από την περιφέρεια προς την ωχρά, όπου μπορεί να σχηματίζονται έως και 10 στιβάδες. Στη συνέχεια και πάλι μειώνεται προς το κεντρικό βοθρίο, όπου απουσιάζουν τελείως.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Τα γαγγλιακά κύτταρα είναι πολυσυναπτικά κύτταρα και οι δενδρίτες τους συνδέονται με τους άξονες των διπόλων και των αμακρόινων κυττάρων. Τα μικρά (midget) γαγγλιακά κύτταρα συνδέονται μέσω ενός μόνο midget-μονοσυναπτικού διπόλου νευρώνα, με ένα μοναδικό κωνιοφόρο κύτταρο.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Τα γαγγλιακά κύτταρα διαθέτουν αμύελους άξονες οι οποίοι κάμπτονται σε ορθή γωνία μόλις φθάσουν στην εσωτερη επιφάνεια του αμφιβληστροειδή. Στη συνέχεια, οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων συγκλίνουν στην έξοδο του οπτικού νεύρου αντίστοιχα προς τον οπτικό δίσκο. Οι οπτικές νευρικές ίνες διαπερνούν τον σκληρό και μια περιοχίτη γνωστή ως ηθμοειδές πέταλο, το οποίο αποτελεί το πλέον ασθενές τμήμα του σκληρού. Αφού διατιτραίνονται το ηθμοειδές πέταλο, οι νευρικές ίνες μετατρέπονται πλέον σε εμμύελους, με το έλυτρο μυελίνης να σχηματίζεται από ολιγοδενδροκύτταρα. Σε ορισμένα άτομα, οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων εμφανίζονται τμηματικά εμμύελοι, συνήθως σε περιοχές κοντά στον οπτικό δίσκο. Τέτοιες περιοχές δεν προσλαμβάνουν

ερεθίσματα και παράγουν τυφλά σημεία.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

### 4) Οριζόντια κύτταρα

Τα οριζόντια κύτταρα απαντώνται κοντά στις τελικές απολήξεις των ραβδιοφόρων και κωνιοφόρων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι πολυσυναπτικά (πολύπολα) και διαθέτουν μια μακρά αποφυάδα (νευρίτης) και πολλές βραχείες (δενδρίτες), οι οποίες πορεύονται οριζοντίως παράλληλα με την επιφάνεια του αμφιβληστροειδή. Η μακρά αποφυάδα μπορεί να έχει μήκος έως και 1mm. Το κυτταρόπλασμα περιέχει ένα οργανύλιο αποτελούμενο από σωληνοειδείς μεμβράνες επενδεδυμένες με πολυάριθμα ριβοσώματα (κρυσταλλοειδές σωματίο του Kolmer). Τα οριζόντια κύτταρα που συνδέονται με τα κωνία διαθέτουν βραχείες αποφυάδες οι οποίες συνάπτονται με 7 τελικούς μίσχους κωνιοφόρων κυττάρων. Τα οριζόντια κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία διαθέτουν βραχείες αποφυάδες οι οποίες συνάπτονται με 10-12 σφαιρίδια ραβδιοφόρων κυττάρων. Οι μακρές αποφυάδες συνάπτονται τόσο με κωνιοφόρα όσο και με ραβδιοφόρα κύτταρα σε κάποια απόσταση, καθώς και με δίπολα κύτταρα. Τα οριζόντια κύτταρα απαντούν στους νευροδιαβιβαστές που ελευθερώνονται από τα ραβδιοφόρα και κωνιοφόρα κύτταρα ως επακόλουθο ερεθισμού από το φως. Ακολούθως πιστεύεται πως απελευθερώνουν έναν ανασταλτικό διαβιβαστή GABA, που αναστέλλει τη δραστηριότητα των διπόλων κυττάρων σε ορισμένη απόσταση με αποτέλεσμα να οξύνεται η αντίθεση και η ευκρίνεια της ανάλυσης. Επίσης, είναι πιθανό ότι τα οριζόντια κύτταρα ενοποιούν τα οπτικά ερεθίσματα.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

### 5) Αμακρόινα κύτταρα

Τα αμακρόινα κύτταρα ονομάστηκαν έτσι καθώς πιστευόταν ότι δεν διέθεταν άξονες. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι τα μεγάλα κυτταρικά σώματα, με άφθονο κυτταρόπλασμα και λοβώδεις οδοντωτούς πυρήνες. Εντοπίζονται κοντά στα γαγγλιακά κύτταρα και οι μακρές τους αποφυάδες απλώνονται ακτινοειδώς σε μεγάλο εύρος, συνάπτονται δε τόσο μεταξύ τους όσο και με τους δενδρίτες των γαγγλιακών κυττάρων καθώς και με

τις αξονικές απολήξεις των διπόλων κυττάρων.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Τα αμακρόνια κύτταρα διεγείρονται από τα δίπολα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια ερεθίζουν τα γαγγλιακά κύτταρα. Οι μακρές, ακτινοειδώς φερόμενες, οριζόντιες αποφυάδες των αμακρόινων κυττάρων εξασφαλίζουν τη διέγερση των περιφερικότερα κειμένων γαγγλιακών κυττάρων. Φαίνεται επίσης ότι χρησιμεύουν ως ρυθμιστές των σημάτων των φωτοϋποδοχέων. Σήμερα αναγνωρίζονται διάφοροι τύποι αμακρόινων κυττάρων ανάλογα με το νευροδιαβιβαστή που περιέχουν.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

### 6) Υποστηρικτικά κύτταρα (κύτταρα Müller)

Επειδή ο ιδίως αμφιβληστροειδής αναπτύσσεται από το οπτικό κυτέλλιο, το οποίο αποτελεί μια προς τα έξω προέκταση του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι φυσικό επακόλουθο τα υποστηρικτικά κύτταρα να είναι όμοια με τα νευρογλοιακά κύτταρα. Ένα εκ των υποστηρικτικών κυττάρων είναι ακτινοειδώς προσανατολισμένο και ονομάζεται κύτταρο Müller. Πρόκειται για ένα επίμηκες λεπτό, ελαφρά χρωματισμένο κύτταρο, με μακρές αποφυάδες που εκτείνονται από το κυτταρικό σώμα σε όλο σχεδόν το πάχος του ιδίως αμφιβληστροειδή. Επικουρικοί κλάδοι εκτείνονται οριζόντια, περιβάλλοντας και υποστηρίζοντας τα νευρικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα του Müller καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος από το χώρο του ιδίως αμφιβληστροειδή που δεν καλύπτεται από τους νευρώνες και μάλιστα πλησιάζοντας το φλοιό του υαλοειδούς σχηματίζουν μια πλατεία κατάληξη, η οποία μερικές φορές είναι ορατή κλινικά στον οπίσθιο πόλο ως λεπτές απαστράπτουσες κηλίδες, γνωστές ως κηλίδες του Gunn.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Αντίστοιχα προς την εξωτερική επιφάνεια του ιδίως αμφιβληστροειδή, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε την ύπαρξη μιας σειράς ζωνών προσκόλλησης μεταξύ των φωτοϋποδοχέων και των ακτινοειδών αποφυάδων των κυττάρων Müller. Η διάταξη αυτή σχηματίζει μια πυκνοχρωματική γραμμή ορατή στο απλό μικροσκόπιο, που ονομάζεται έξω αφοριστική μεμβράνη. Από τα άκρα των κυττάρων του Müller προβάλλουν θύσανοι μικρολαχνών στους χώρους μεταξύ των έσω τμημάτων των ραβδίων και κωνίων.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Αντίστοιχα προς την εσωτερική (υαλοειδική) επιφάνεια του ιδίως αμφιβληστροειδή, οι αποφυάδες των κυττάρων του Müller εμφανίζουν αποπλατυσμένες απολήξεις οι οποίες καλύπτονται από βασική μεμβράνη. Ο συνδυασμός αυτός των απολήξεων και της βασικής μεμβράνης σχηματίζει τη λεγόμενη έσω αφοριστική μεμβράνη, που επίσης αναγνωρίζεται στο απλό μικροσκόπιο.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Άλλες αποφυάδες των κυττάρων του Müller πραγματοποιούν εκτεταμένες συνδέσεις με τα τοιχώματα των αιμοφόρων τριχοειδών. Αυτά τα ενδιαφέροντα γλοιόμορφα κύτταρα πιθανότατα παίζουν σημαντικό ρόλο στην υποστήριξη των νευρώνων του αμφιβληστροειδή. Είναι επίσης πιθανό ότι συμβάλουν στη θρέψη των αμφιβληστροειδικών νευρώνων. Ίσως είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των νευροδιαβιβαστικών ουσιών και την ηλεκτρική μόνωση των φωτοϋποδοχέων και των νευρώνων. Εκτός των άλλων, δρουν και σαν αποθήκη ιόντων στη διάρκεια της υπερπόλωσης των φωτοϋποδοχέων από το φως, πράγμα που αντανακλάται με τη συμμετοχή τους στο b-κύμα του ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφήματος.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

Άλλα νευρογλοιακού τύπου κύτταρα, όπως τα καλούμενα αστροκύτταρα του αμφιβληστροειδή, περιγαγειακά κύτταρα γλοίας και μικρογλοιακά κύτταρα, έχουν επίσης περιγραφεί. Τα αμφιβληστροειδικά μικρογλοιακά κύτταρα έχουν φαγοκυτταρική λειτουργία και πιθανώς και ανοσολογικές λειτουργίες.<sup>14, 17, 26, 29</sup>

## 1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

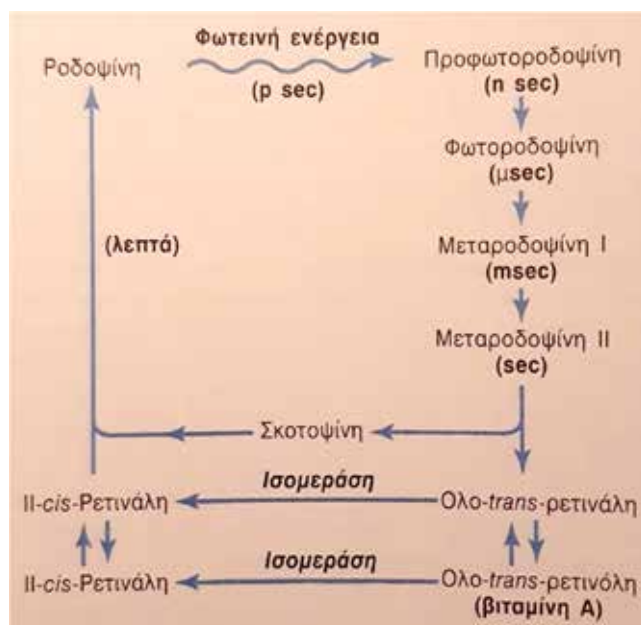
Η λειτουργία του αμφιβληστροειδούς αποτελεί μια διασύνδεση μεταξύ φωτεινού και χημικού ερεθίσματος στον ανθρώπινο οφθαλμό, με επακόλουθο τη δημιουργία νευρικών ερεθισμάτων τα οποία μεταφέρονται κατά μήκος της οπτικής οδού προς τον εγκέφαλο για ανώτερη φλοιώδη επεξεργασία. Το φωτεινό ερέθισμα που επιδρά στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς προκαλεί μια σειρά χημικών και μεταβολικών αντιδράσεων. Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι ένα και μοναδικό φωτόνιο είναι αρκετό για να πυροδοτήσει την αντίδραση ενός υποδεκτικού δυναμικού σε

ένα ραβδίο. Το φως δρα ώστε να προκληθεί διάσπαση των οπτικών χρωστικών. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια φωτοχημική διεργασία, η οποία ενισχύεται με μηχανισμούς που προκαλούν την τοπική παραγωγή απαντήσεων με τη μορφή ερεθισμάτων. Αποτέλεσμα αυτών είναι η διαταραχή της σχέσης των ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης και άρση της ηλεκτρικής ισορροπίας των κυττάρων. Η φωτοχρωστική των ραβδίων ονομάζεται ροδοψίνη, ενώ οι φωτοχρωστικές των κωνίων έχουν μικρές μόνο διαφορές στη χημική τους δομή από εκείνη της ροδοψίνης. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του φωτεινού σε νευρικό ερέθισμα, που στη συνέχεια μέσω των διπόλων κυττάρων μεταβιβάζεται στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς.<sup>29-36</sup>

Επίσης, τα οριζόντια και αμακρόνια κύτταρα πιστεύεται ότι πιθανόν δρουν αυξάνοντας ή ελαττώνοντας το λειτουργικό ηθμό των κωνίων και ραβδίων αφ'ενός και των διπόλων κυττάρων αφ'ετέρου. Έτσι επιτυγχάνεται ίσως μείωση ή και αναστολή ακόμα της μεταβίβασης του οπτικού ερεθίσματος προς τον επόμενο νευρώνα, δηλαδή τα γαγγλιακά κύτταρα ή αντίθετα, διευκολύνεται η μεταβίβαση προς αυτά.<sup>37,38</sup>

Πιο συγκεκριμένα, το εξωτερικό τμήμα των ραβδίων, που προβάλλει στο ΜΕ, περιέχει σε συγκέντρωση 40% περίπου τη φωτοευαίσθητη χρωστική που ονομάζεται ροδοψίνη ή οπτική πορφύρα. Η ουσία αυτή αποτελεί συνδυασμό της πρωτεΐνης σκοτοψίνη και της καρωτινοειδούς χρωστικής ρετινάλη (ή ρετινίνη) η οποία είναι συγκεκριμένου τύπου και ονομάζεται 11-cis-ρετινάλη. Ο τύπος αυτός έχει μέγιστη σημασία καθώς είναι ο μόνος που μπορεί να συνδεθεί με τη σκοτοψίνη ώστε να συντεθεί η ροδοψίνη. Η ροδοψίνη παρουσιάζει μέγιστη τιμή απορρόφησης της φωτεινής ακτινοβολίας στα 505nm.<sup>36</sup>

Επειδή τα ραβδία έχουν χαμηλή διακριτική ικανότητα σχηματίζουν εικόνες χωρίς σαφείς λεπτομέρειες. Επίσης, τα ραβδία δεν είναι ευαίσθητα στα χρώματα. Αντίθετα, τα κωνία έχουν υψηλότερο ουδό ευαισθησίας στο φως και είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό ευκρινών εικόνων καθώς και για την αντίληψη των χρωμάτων. Στον άνθρωπο τα κωνία περιέχουν 3 χρωστικές



Εικόνα 1.4.1: Σχηματική απεικόνιση του φωτοχημικού κύκλου της ροδοψίνης-ρετινάλης με τις χημικές διεργασίες που γίνονται στα ραβδία.<sup>36</sup>

(ιωδοψίνες), οι οποίες πιθανόν αποτελούν τη χημική βάση για την κλασική τρίχρωμη θεωρία της έγχρωμης όρασης.<sup>29,36</sup>

Όταν το φως προσπίπτει επάνω σε μόρια ροδοψίνης, η ρετιναλδεΐδη υφίσταται στερεοχημική μετατροπή από τη μορφή -cis στη μορφή -trans. Η μετατροπή αυτή έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό της ρετιναλδεΐδης από την οψίνη, μια αντίδραση που αποκαλείται λεύκανση (bleaching). Η λεύκανση της οπτικής χρωστικής, που είναι ενσωματωμένη στους μεμβρανώδεις δίσκους, αυξάνει την αγωγιμότητά τους ως προς το ασβέστιο, και έτσι προάγει τη διάχυση του ασβεστίου από το εσωτερικό των δίσκων στο ενδοκυττάριο διάστημα του εξωτερικού τμήματος του φωτοϋποδοχέα. Το ασβέστιο δρα επάνω στην κυτταρική μεμβράνη, ελαττώνοντας τη διαπερατότητά της σε ιόντα νατρίου και προάγοντας την υπερπόλωση του κυττάρου. Τα ηλεκτρικά σήματα που παράγονται από το κλείσιμο των διαύλων αυτών του νατρίου, μεταδίδονται στο εσωτερικό τμήμα και διαμέσου των χασματικών συνάψεων, στα γειτονικά κύτταρα.<sup>29,36</sup> (Εικόνα 1.4.1)

Σε ένα δεύτερο στάδιο, η οπτική χρωστική επανασυγκροτείται, ενώ τα ιόντα ασβεστίου μεταφέρονται



πίσω, μέσα στους δίσκους, με μια διεργασία που καταναλώνει ενέργεια. Οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις φαίνεται ότι δικαιολογούν την αφθονία μιτοχονδρίων κοντά στη φωτοευαίσθητη περιοχή των ραβδίων και των κωνίων. Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει σε άλλους υποδοχείς, όπου τα δυναμικά ενέργειας παράγονται μέσω εκπόλωσης του κυττάρου, τα ραβδία και τα κωνία υπερπολώνονται με το φως. Αυτό το σήμα μεταβιβάζεται στα δίπολα, τα αμακρόινα και τα οριζόντια κύτταρα και εν συνεχεία στα γαγγλιακά κύτταρα. Μόνο τα γαγγλιακά κύτταρα παράγουν δυναμικά ενέργειας κατά μήκος των νευραξόνων τους, οι οποίοι μεταφέρουν την πληροφορία στον εγκέφαλο.<sup>29,36</sup>

Όσον αφορά τα κωνία, οι φωτοχημικές χρωστικές τους έχουν όμοια σχεδόν χημική δομή με εκείνη της ροδοψίνης των ραβδίων με μια μόνο διαφορά στο πρωτεϊνικό μόριο, δηλαδή τις οψίνες, οι οποίες στα κωνία ονομάζονται φωτοψίνες και έχουν διαφορετική δομή από τη σκοτοψίνη των ραβδίων. Το τμήμα της ρετινάλης είναι ακριβώς το ίδιο και στα κωνία και στα ραβδία. Συνεπώς, οι χρωστικές των κωνίων που είναι ευαίσθητες στα χρώματα αποτελούν συνδυασμούς ρετινάλης και φωτοψινών. Υπάρχουν τρεις τύποι φωτοχρωστικών στα διάφορα είδη κωνίων, οι οποίες ευαισθητοποιούν τα κωνία εκλεκτικά στο γαλάζιο (κυανό), το πράσινο και το ερυθρό χρώμα και οι οποίες ονομάζονται αντίστοιχα «ευαίσθητη στο κυανούν», «ευαίσθητη στο πράσινο» και «ευαίσθητη στο ερυθρό φωτοχρωστική». Οι χρωστικές αυτές στα διάφορα είδη κωνίων εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας στα μήκη κύματος 445,535 και 570 nm αντίστοιχα. Τα μήκη κύματος αυτά αντιστοιχούν και στη μέγιστη ευαισθησία του κάθε τύπου κωνίου, γεγονός που ερμηνεύει ως ένα βαθμό τον μηχανισμό με τον οποίο ο αμφιβληστροειδής μπορεί να διακρίνει τα χρώματα.<sup>36</sup>

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γαγγλιακά κύτταρα, λειτουργικά, διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τη θέση που κατέχουν στον αμφιβληστροειδή. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός, ότι τα ηλεκτρικά δυναμικά που καταγράφονται με τη χρήση μικροηλεκτροδίων, ξεχωριστά από κάθε γαγγλιακό κύτταρο, δεν είναι πάντοτε

τα ίδια. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς οφείλεται στη μορφολογική διαφοροποίηση κάθε γαγγλιακού κυττάρου ή στην παρέμβαση ανασταλτικών μηχανισμών, άλλοτε άλλων, που επηρεάζουν τη λειτουργικότητά τους. Οι μηχανισμοί αυτοί αποδίδονται στη δράση των οριζόντιων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Ωστόσο και μέσα στο γαγγλιακό κύτταρο λειτουργούν μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη μετάδοση του ερεθίσματος στους νευράξονες διατηρώντας πάντα τους βασικούς του χαρακτήρες.<sup>36,38</sup>

Στο κεντρικό βοθρίο της περιοχής της ωχράς κηλίδας, ο αμφιβληστροειδής είναι πολύ λεπτός διότι τα δίπολα και τα γαγγλιακά κύτταρα συσσωρεύονται στην περιφέρεια του εντυπώματος αυτού, οπότε το κέντρο του αποτελείται μόνο από κωνία. Στην ωχρά κηλίδα τα κωνία είναι επιμήκη και στενά, και μοιάζουν με τα ραβδία. Αυτό αποτελεί μια μορφή προσαρμογής που επιτρέπει τη στενότερη παράταξη των κωνίων και έτσι λόγω της μεγάλης πυκνότητά τους, αυξάνεται η οπτική οξύτητα. Στην περιοχή αυτή δεν διατρέχουν αιμοφόρα αγγεία επάνω από τα φωτοευαίσθητα κύτταρα. Στο κεντρικό μέρος της ωχράς κηλίδας το φως προσπίπτει κατ'ευθείαν επάνω στα κωνία, γεγονός που εξηγεί την εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια της οπτικής οξύτητας στην περιοχή αυτή.<sup>29,36</sup>

Από τα γαγγλιακά κύτταρα ξεκινούν συνολικά 1200000 νευράξονες οι οποίοι αποτελούν τις οπτικές ίνες. Κατά την ενδοαμφιβληστροειδική πορεία τους οι οπτικές ίνες είναι αμύελες και πορεύονται κατά ομάδες που σχηματίζουν λεπτά δεμάτια. Τα δεμάτια αυτά χωρίζονται μεταξύ τους από προσεκβολές των ινών του Müller. Η διέγερση κάθε μιας οπτικής ίνας δεν ενεργοποιεί τη γειτονική της με αποτέλεσμα να μην προκαλείται σύγχυση οπτικών παραστάσεων. Οι νευρικές ίνες μετά τη διόδό τους από το ηθμοειδές πέταλο, περιβάλλονται απο μυελώδες έλυτρο που σχηματίζεται από ολιγοδενδροκύτταρα. Στον άνθρωπο η μυελίνωση των οπτικών ινών αρχίζει από τον πέμπτο μήνα της κύησης.<sup>36,38</sup>

Η μετάδοση του ερεθίσματος διαφέρει στις δύο μορφές της οπτικής ίνας. Στην ενδοαμφιβληστροειδική πο-

ρεία της, η μετάδοση γίνεται κατά συνεχή τρόπο, σιγά σιγά μέσω τοπικών ρευμάτων μεταξύ ενεργών και ανενεργών γειτονικών περιοχών. Η ταχύτητα μετάδοσης του ερεθίσματος είναι της τάξης των 3-5 m/sec. Ενώ στην μεταθημοειδική μοίρα, που είναι εμμύελη, η μετάδοση του ερεθίσματος γίνεται με ώσεις μεταξύ των κόμβων του Ranvier, που αποτελούν τις μόνες περιοχές επαφής μεταξύ της αξονικής μεμβράνης και του μυελώδους ελύτρου. Η ταχύτητα μεταβίβασης του ερεθίσματος σε αυτή τη μοίρα είναι της τάξης των 100m/sec. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οποιαδήποτε εκφύλιση ή διαταραχή του δικτύου μυελίνης των νευραξόνων των γαγγλιακών κυττάρων οδηγεί σε επιβράδυνση ή αναστολή της μετάδοσης του ερεθίσματος, καθώς τα ολιγοδενδροκύτταρα δεν μπορούν να αναγεννηθούν σε περίπτωση βλάβης τους.<sup>36, 38, 39</sup>

Επίσης, ο αμφιβληστροειδής αντιδρά κυρίως σε αλλαγές παρά σε σταθερή κατάσταση, γι'αυτό αλλαγές στην αντίθεση ή την κίνηση είναι σημαντικά ερεθίσματα. Κάθε νευρικό κύτταρο είτε στην έσω κοκκώδη είτε στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων έχει το δικό του υποδεκτικό πεδίο (δηλαδή μια πολλαπλή σύνδεση, με μια ομάδα φωτοϋποδοχέων), αλλά τα υποδεκτικά πεδία έχουν κυρίως μελετηθεί στο επίπεδο των γαγγλιακών κυττάρων. Τα κωνία του κεντρικού βοθρίου λέγεται ότι έχουν μια 1:1:1 σχέση με ένα δίπολο και ένα γαγγλιακό κύτταρο, παράγοντας έτσι μια εξαιρετικά ειδική απάντηση. Έξω από την ωχρά κηλίδα, οι φωτοϋποδοχείς ομαδοποιούνται σε ευρύτερα πεδία. Εάν ληφθεί ως μέσος όρος ότι ένα γαγγλιακό κύτταρο εξυπηρετεί 130 φωτοϋποδοχείς και από τη στιγμή που η ωχρική περιοχή εξυπηρετείται από το 50% των γαγγλιακών κυττάρων, τα υποδεκτικά πεδία σ'αυτήν την περιοχή είναι μικρότερα από αυτά της περιφέρειας.<sup>18</sup>

Μερικά γαγγλιακά κύτταρα απενεργοποιούνται από ένα ισχυρό φως διευθυνόμενο στο κέντρο του υποδεκτικού τους πεδίου ενώ άλλα ενεργοποιούνται, με αποτέλεσμα να δίνουν απάντηση σε μεταβολές μαύρου σε λευκό ή λευκού σε μαύρο. Ραβδία και κωνία ενσωματώνονται σε υποδεκτικά πεδία. Μερικά υποδεκτικά πεδία μπορούν να απαντούν σε διαφορετικό χρώμα ή πληθυ-

σμοί κωνίων απαντούν διαφορετικά όταν ερεθίζονται κεντρικά ή περιφερικά. Μερικά γαγγλιακά κύτταρα (X-κύτταρα) δίνουν συνεχή απάντηση όταν φως διευθύνεται στους φωτοϋποδοχείς τους, ενώ άλλα (Y-κύτταρα) απαντούν περιοδικά και άλλα απαντούν μόνον σε κινούμενους στόχους (W-κύτταρα). Υπάρχει μια ένδειξη ότι τα X-κύτταρα αφορούν την οπτική οξύτητα και την αντίληψη του χώρου ενώ τα Y και W κύτταρα αφορούν την ανίχνευση κίνησης και διεύθυνσης.<sup>18, 36</sup>

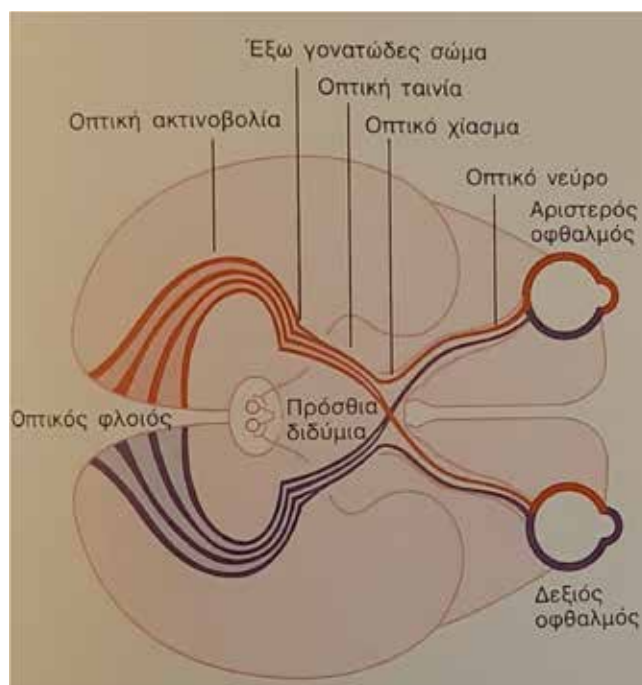
Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα W αποτελούν το 40% περίπου του συνόλου των γαγγλιακών κυττάρων, είναι μικρού μεγέθους και η διάμετρός τους είναι μικρότερη από 10μm. Η ταχύτητα αγωγής του νευράξονά τους στο οπτικό νεύρο είναι μόνο 8m/sec. Τα κύτταρα αυτά δέχονται το μεγαλύτερο μέρος της διέγερσής τους από ραβδία, με την παρεμβολή μικρού μεγέθους διπολικών και βραχύνων κυττάρων, ενώ το δεκτικό τους πεδίο είναι πολύ ευρύ καθώς οι δενδρίτες τους εκτείνονται ευρύτατα στην έσω δικτυωτή στιβάδα με συνέπεια να δέχονται ερεθίσματα από εκτεταμένες περιοχές. Φαίνεται ότι τα κύτταρα W εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση της κατεύθυνσης της κίνησης σε οποιοδήποτε τμήμα του οπτικού πεδίου και διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην όραση στο σκοτάδι.<sup>36</sup>

Τα γαγγλιακά κύτταρα X είναι τα πολυπληθέστερα και αποτελούν το 55% του συνόλου. Έχουν μέση διάμετρο, σε σχέση με τους άλλους τύπους, που κυμαίνεται μεταξύ 10 και 15μm, ενώ η ταχύτητα αγωγής στους νευράξονές τους στο οπτικό νεύρο είναι περίπου 14m/sec. Το δεκτικό τους πεδίο είναι πολύ μικρό γιατί οι δενδρίτες τους δεν εκτείνονται σε μεγάλη έκταση στον αμφιβληστροειδή με αποτέλεσμα οι ώσεις που μεταφέρουν να αντιπροσωπεύουν συνήθως συγκεκριμένες περιοχές του αμφιβληστροειδούς. Συνεπώς, η οπτική εικόνα μεταδίδεται κυρίως με τα X κύτταρα. Μάλιστα, επειδή το κάθε X κύτταρο προσλαμβάνει πληροφορίες από τουλάχιστον ένα κωνίο, πιστεύεται ότι οι ώσεις που μεταδίδουν ευθύνονται και για την αντίληψη των χρωμάτων.<sup>36</sup>

Τα κύτταρα Y είναι τα μεγαλύτερα γαγγλιακά κύτταρα και έχουν διάμετρο μέχρι και 35μm, ενώ η ταχύτητα αγωγής των σημάτων τους προς τον εγκέφαλο είναι με-

γαλύτερη από 50m/sec. Ωστόσο, είναι και τα λιγότερα σε αριθμό αποτελώντας μόλις το 5% του συνόλου των γαγγλιακών κυττάρων. Έχουν ευρύ δενδριτικό πεδίο, έτσι ώστε οι νευρικές ώσεις που δέχονται να προέρχονται από εκτεταμένες περιοχές του αμφιβληστροειδούς. Τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται σε ταχείες μεταβολές της οπτικής εικόνας είτε αυτή αφορά ταχεία κίνηση είτε ταχεία αλλαγή φωτισμού. Αποστέλλουν προς τον εγκέφαλο ριπές ώσεων για κλάσμα δευτερολέπτου και έπειτα σιγούν. Τα κύτταρα αυτά, επομένως, πληροφορούν σχεδόν αμέσως τον εγκέφαλο για μεταβολή των οπτικών φαινομένων οπουδήποτε στο οπτικό πεδίο, χωρίς όμως να είναι δυνατό να προσδιορίσουν ακριβώς τη θέση.<sup>36</sup>

Έπειτα, οι νευρικές ώσεις από τους αμφιβληστροειδείς άγονται προς τα πίσω με τα οπτικά νεύρα. Στο οπτικό χίασμα, όλες οι νευρικές ίνες που προέρχονται από τα ρινικά ημιμόρια των δύο αμφιβληστροειδών χιάζονται προς την αντίθετη πλευρά και μαζί με τις ίνες που προέρχονται από τα κροταφικά ημιμόρια των αντίθετων αμφιβληστροειδών, σχηματίζουν τις οπτικές ταινίες. Οι νευρικές ίνες της κάθε οπτικής ταινίας δημιουργούν συνάψεις στον ραχιαίο έξω γονατώδη πυρήνα. Από τον πυρήνα αυτό φέρονται οι γονατοπληκτρικές νευρικές ίνες με την οπτική ακτινοβολία (ή γονατοπληκτρική δεσμίδα) στον πρωτεύοντα οπτικό φλοιό και συγκεκριμένα στην περιοχή της πηκτρικής σχισμής του ινιακού λοβού του εγκεφάλου. Τέλος, νευρικές ίνες που αφορούν στην όραση φαίρονται και προς παλαιότερες προφλοιϊκές περιοχές του εγκεφάλου: προς τον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου (για ρύθμιση των ημερήσιων καρδιακών ρυθμών), προς προοροφιαίους πυρήνες (για έκλυση ορισμένων αντανακλαστικών οφθαλμικών κινήσεων κατά την εστίαση και για το αντανακλαστικό της κόρης), προς τα πρόσθια διδύμα (για έλεγχο των ταχείων κατευθυντήριων κινήσεων των οφθαλμών) και προς τον κοιλιακό έξω γονατώδη πυρήνα του οπτικού θαλάμου και από κει προς τις γύρω βασικές περιοχές του εγκεφάλου (για ρύθμιση ορισμένων λειτουργιών του σώματος που έχουν σχέση με τη γενικότερη συμπεριφορά).<sup>14, 26, 36</sup>



Εικόνα 1.4.2: Οι κύριες οπτικές οδοί από τους αμφιβληστροειδείς μέχρι τον οπτικό φλοιό.<sup>36</sup>

## 2. ANTIMΥΚΗΤΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Οι μυκητιασικές οφθαλμικές λοιμώξεις αποτελούν σημαντικές αιτίες των οφθαλμικών νοσηροτήτων. Η πρώτη καταγραφή μιας μυκητιασικής κερατίτιδας έλαβε χώρα το 1879 από τον Leber και έκτοτε ένας αυξανόμενος αριθμός περιστατικών έχει παρατηρηθεί.<sup>40</sup> Διάφοροι παράγοντες, όπως η χρήση κορτικοστεροειδών, η οποία διευκολύνει τη διείσδυση των παθογόνων, καθώς και η διάδοση τοπικών αντιβιοτικών, τα οποία δημιουργούν ένα περιβάλλον χαμηλότερου ανταγωνισμού μεταξύ των μικροοργανισμών στην οφθαλμική επιφάνεια, προτείνονται ως βασικοί παράγοντες για την αύξηση αυτή.<sup>5</sup>

Οι μυκητιασικές λοιμώξεις συνήθως προσβάλλουν τον κερατοειδή (μυκητιασική κερατίτιδα), το υαλοειδές σώμα (μυκητιασική ενδοφθαλμίτιδα) και τους οφθαλμικούς χιτώνες, όπως ο σκληρός (μυκητιασική πανοφθαλμίτιδα). Οι συνηθέστεροι οργανισμοί που απαντώνται στις μυκητιασικές ενδοφθαλμίτιδες ανήκουν στα είδη

*Candida*, *Aspergillus* και *Fusarium*.<sup>2,6,41</sup>

Η μυκητιασική ενδοφθαλμίτιδα αποτελεί μια σοβαρή και απειλητική για την όραση λοίμωξη, καθώς και συχνή επιπλοκή των ενδοφθάλμιων επεμβάσεων (κυρίως μετά την επέμβαση για τη διόρθωση του καταρράκτη), της χρήσης οφθαλμικών προϊόντων ή/και φαρμακευτικών σκευασμάτων (κυρίως φακών επαφής και κορτικοστεροειδών), των οφθαλμικών τραυμάτων, των συστηματικών μυκητιασικών λοιμώξεων (κυρίως καντιντίαση και ασπεργίλλωση) και ανοσοκατασταλτικών οντοτήτων (κυρίως HIV λοίμωξη).<sup>2,4,6,7,10,42-47</sup>

Η έγκαιρη διάγνωση και έναρξη της συστηματικής και ενδοϋαλοειδικής θεραπείας είναι σημαντική για τη μείωση τόσο της θνησιμότητας όσο και της οφθαλμικής νοσηρότητας. Απαιτείται στενή παρακολούθηση με εξετάσεις τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα αρχικά για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η ενδοφθαλμίτιδα από *Candida* σχετίζεται με σοβαρή απώλεια όρασης (20/200 ή λιγότερο) στο 33%–60% των ασθενών και τελική οπτική οξύτητα 20/50 ή καλύτερη στο 42%.<sup>48</sup> Η οπτική πρόγνωση της ενδοφθαλμίτιδας από *Aspergillus* είναι χειρότερη, παρά την επιθετική θεραπεία, λόγω της πρόωμης εμπλοκής της ωχράς κηλίδας, με οπτική οξύτητα 20/200 ή χειρότερη στην πλειονότητα των οφθαλμών και 20/50 ή καλύτερη μόνο στο 7%.<sup>49</sup> Παράγοντες που σχετίζονται με σοβαρή απώλεια όρασης είναι η χαμηλή οπτική οξύτητα κατά την έναρξη, βλάβες που εντοπίζονται στον οπίσθιο πόλο, και η ανάπτυξη αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς, η οποία έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει στο 29% των ασθενών. Η πρόωμη υαλοειδεκτομή (βιτρεκτομή) εντός 1 εβδομάδας από την έναρξη των συμπτωμάτων έχει συσχετιστεί με χαμηλότερη συχνότητα αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς και καλύτερη οπτική οξύτητα.<sup>48,50,51</sup>

Παρά την εμφάνιση νέων φαρμάκων, η θεραπεία εξακολουθεί να είναι δύσκολη σε πολλές περιπτώσεις. Σε σύγκριση με τα αντιβακτηριακά, τα αντιμυκητιακά φάρμακα έχουν χαμηλότερη αποτελεσματικότητα λόγω του μηχανισμού δράσης τους (συνήθως μυκητοστατικά, με μυκητοκτόνο δράση εξαρτώμενη από τη δόση), της χαμηλότερης ιστικής διείσδυσης και της

λιγότερο θορυβώθους φύσης της λοίμωξης.<sup>52</sup> Οι αντιμυκητιακοί παράγοντες που ανήκουν στις τάξεις των πολυενίων (Αμφοτερικίνη Β, Ναταμυσίνη) και των αζολών (Κετοконаζόλη, Βορικοναζόλη, Ιτρακοναζόλη, Φλουκοναζόλη) αποτελούν την τυπική φαρμακοθεραπεία αυτών των λοιμώξεων. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να χορηγηθούν συστηματικά (από του στόματος ή ενδοφλέβια), τοπικά και ενδοφθαλμικά με στόχο την επίτευξη μιας πιο στοχευμένης και εντοπισμένης θεραπευτικής δράσης στον οφθαλμό. Ωστόσο, εκτός των προαναφερθέντων φαρμάκων, στο προσκήνιο έχουν έρθει τα τελευταία χρόνια και οι εχινοκανδίνες (Κασποφουγκίνη, Μικαφουγκίνη, Ανιδουλαφουγκίνη). Πρόκειται για φάρμακα που χορηγούνται κατά κύριο λόγο συστηματικά και παρουσιάζουν θεραπευτική δράση στις συστηματικές μυκητιασικές λοιμώξεις, που προκαλούνται συνήθως από είδη *Candida* και *Aspergillus*. Η αυξημένη χρησιμότητά τους στις λοιμώξεις αυτές δικαιολογείται από τη χαμηλή τοξικότητα, την ομοιότητα στην αντιμυκητιασική δράση και αποτελεσματικότητα με την Αμφοτερικίνη Β και τη Φλουκοναζόλη, που αποτελούν τα κυρίαρχα φάρμακα στη θεραπεία των διηθητικών συστηματικών μυκητιάσεων, καθώς και από τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Λόγω των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών, οι εχινοκανδίνες έχουν ανοίξει ένα νέο δρόμο στη θεραπεία των μυκητιασικών ενδοφθαλμίτιδων και η εκτενής μελέτη τους αποτελεί επιτακτική ανάγκη στη σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση των λοιμώξεων αυτών.<sup>2,5</sup>

Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση αντιβιοτικών αποτελεί μια από τις κυρίαρχες θεραπευτικές προσεγγίσεις σε αυτές τις ενδοφθαλμίτιδες. Στο παρελθόν, η Αμφοτερικίνη Β αποτελούσε το μοναδικό αντιμυκητιακό παράγοντα με έγκριση για ενδοϋαλοειδική χορήγηση. Ωστόσο, η Αμφοτερικίνη Β δύναται να προκαλέσει αμφιβληστροειδική νέκρωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ έχει αναφερθεί ανάπτυξη αντίστασης στη δράση της από πολλά είδη μυκήτων.<sup>9,10</sup> Συνεπώς, δημιουργήθηκε η ανάγκη χρήσης άλλων αντιμυκητιακών παραγόντων με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες και πιθανότατα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη



θεραπεία των μυκητιασικών ενδοφθαλμίτιδων. Στο σημείο αυτό, πολλά υποσχόμενες παρουσιάζονται τόσο οι Αζόλες όσο και οι Εχινοκανδίνες, που αποτελούν νεότερες τάξεις αντιμυκητιακών φαρμάκων.<sup>2,4,5</sup>

## 2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι κύριες κατηγορίες αντιμυκητιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των οφθαλμικών λοιμώξεων είναι τα πολυένια, οι αζόλες, οι πυριμιδίνες και οι εχινοκανδίνες.

Οι κύριοι εκπρόσωποι της τάξης των **πολυενίων** είναι η Αμφοτερικίνη Β, η νυστατίνη και η ναταμυσίνη. Ωστόσο, η νυστατίνη δεν έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία οφθαλμικών λοιμώξεων για αρκετές δεκαετίες λόγω της χαμηλής ιστικής διείσδυσης, της τοξικότητας και των αναφορών αντίστασης στη δράση της.<sup>53,54</sup>

Η αμφοτερικίνη Β (AMB) είναι ένα πολυένιο που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως μέσω συστηματικής χορήγησης λόγω της αντιμυκητιασικής της δραστηριότητας. Λειτουργεί συνδεδεμένη με την εργοστερόλη, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων, μέσω της δημιουργίας πόρων που προκαλούν διαρροή του περιεχομένου του μυκητιακού κυττάρου και θάνατο.<sup>55</sup> Η AMB έχει δείξει ισχυρή αντιμυκητιακή δράση κλινικά έναντι των μυκητιακών ειδών *Candida*, *Aspergillus* και *Fusarium*.<sup>56-58</sup> Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ως θεραπευτικός παράγοντας στην αντιμετώπιση οφθαλμικών μυκητιασικών λοιμώξεων. Έχει επιδείξει θεραπευτική αποτελεσματικότητα στη μυκητιακή κερατίτιδα κατά την υπό τον επιπεφυκότα, τοπική, εντός του προσθίου θαλάμου, ενδοϋαλοειδική και ενδοστρωματική χορήγησης της.<sup>59-63</sup> Παρά την θεραπευτική της αποτελεσματικότητα, η οφθαλμική χρήση της AMB σχετίζεται με αρκετές παρενέργειες, παρεμποδίζοντας τη χρήση της σε οφθαλμικές μυκητιασικές λοιμώξεις. Οι προαναφερθείσες ενδοφθάλμιες ενέσεις (συγκέντρωσης πάνω από 1% w/v) συσχετίζονται με ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η τοξικότητα τους στον αμφιβληστροειδή, η απώλεια γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, η

φλεγμονή του υαλοειδούς, το οίδημα του κερατοειδούς καθώς και η νεοαγγείωση και φλεγμονή του κερατοειδούς.<sup>64-68</sup> Η αποτελεσματικότητα της AMB σε μυκητιακή κερατίτιδα, μέσω της τοπικής χορήγησης, εξαρτάται από την ακεραιότητα του κερατοειδούς. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις αποπτωτικού επιθηλίου του κερατοειδούς, αλλά όχι στην περίπτωση ανέπαφου κερατοειδούς σε μοντέλο κουνελιού.<sup>69</sup> Όταν στοχεύει τον οφθαλμό διαμέσου της ενδοφλέβιας οδού (IV), η AMB πρέπει να χορηγείται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ώστε να διαπεράσει τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, που μπορεί να οδηγήσει στη χαρακτηριστική δόσοεξαρτώμενη νεφροτοξικότητα που σχετίζεται με την AMB.<sup>70,71</sup> Αυτοί οι περιορισμοί έχουν οδηγήσει στην περιορισμένη χρήση της αμφοτερικίνης Β σε οφθαλμικές λοιμώξεις.

Η ναταμυσίνη είναι το μόνο αντιμυκητιασικό φάρμακο που διατίθεται στο εμπόριο για μυκητιασική κερατίτιδα, επιπεφυκίτιδα και βλεφαρίτιδα.<sup>72</sup> Ανήκει στην τάξη των πολυενίων και δρα δεσμευόμενη συγκρομμένα στην εργοστερόλη, η οποία είναι ένα βασικό κυτταρικό συστατικό που διατηρεί την ακεραιότητα της μυκητιακής κυτταρικής μεμβράνης. Εντούτοις, σε αντίθεση με την αμφοτερικίνη Β, δεν προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των μυκητιακών κυττάρων και επακόλουθη διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου, αλλά ασκεί μυκητοκτόνο δράση μόνο μέσω δέσμευσης της εργοστερόλης.<sup>73</sup> Η ναταμυσίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως ένας πρώτης γραμμής αντιμυκητιασικός παράγοντας στην μυκητιασική κερατίτιδα λόγω της δράσης της κατά των ειδών *Aspergillus* και *Fusarium* (κυρίως μολυσματικούς μύκητες που προκαλούν οφθαλμικές μυκητιασικές λοιμώξεις) και λόγω της καλύτερης οφθαλμικής ανεκτικότητάς της σε σύγκριση με τα άλλα αντιμυκητιασικά φάρμακα. Η χρησιμότητά της, ωστόσο, περιορίζεται μόνο σε μολύνσεις από νηματοειδείς μύκητες, δεδομένου ότι η αμφοτερικίνη Β παρουσιάζει καλύτερη αντιμυκητιασική δράση έναντι των ειδών *Candida*.<sup>74</sup> Επιπλέον, η ναταμυσίνη μπορεί να χορηγηθεί μόνο τοπικά καθώς η ενδοφλέβια και η υπό τον επιπεφυκότα χορήγησή της δεν οδηγεί σε θεραπευτικές

συγκεντρώσεις στο υδατοειδές υγρό και στο υαλοειδές σώμα.<sup>75</sup> Συνεπώς, χρησιμοποιείται γενικά στη θεραπεία της επιφανειακής μυκητιασικής κερατιτίδας, ενώ δε βρίσκει εφαρμογή στην εν τω βάθει κερατομύκωση. Επιπρόσθετα, μετά από τοπική εφαρμογή, η ναταμυκίνη παρουσιάζει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα μόλις 2%, γεγονός που απαιτεί τη συχνή χορήγησή της (αρχικά χορηγείται κάθε ώρα ή 2 ώρες και στη συνέχεια χορηγείται 6-8 φορές την ημέρα).<sup>69</sup> Λόγω των προαναφερθέντων περιορισμών που σχετίζονται με τη ναταμυκίνη, υπάρχει ανάγκη για χρήση άλλων αντιμυκητιασικών παραγόντων.

Όσον αφορά τις **πυριμιδίνες**, αντιπροσωπεύονται από την 5-φλουοροκυτοσίνη (5-FC) ή φλουκυτοσίνη, η οποία είναι ο μόνος αντιμυκητιασικός παράγοντας με ενδοκυτταρική δράση. Αφού απορροφηθεί από τον μύκητα, μετατρέπεται σε 5-φλουοροουρακίλη, έναν ισχυρό αντιμεταβολίτη που δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA.<sup>5, 52, 76</sup> Η χρήση της σε οφθαλμικές λοιμώξεις περιορίζεται λόγω του στενού αντιμυκητιακού της φάσματος και της χαμηλής διείσδυσης στους οφθαλμικούς ιστούς.<sup>77</sup> Είναι αποτελεσματική έναντι της *Candida* spp. και με ποικίλη δράση έναντι του *Aspergillus* spp., ενώ είναι αναποτελεσματική έναντι του *Fusarium* spp. Η συστηματική ή τοπική χορήγησή της θα πρέπει να συσχετίζεται με την AMB, κυρίως λόγω της ενισχυτικής της δράσης (συνεργική δράση) και λόγω της επαγωγής ανοχής όταν η 5FC χρησιμοποιείται μόνη της.<sup>5, 52, 78-80</sup>

### 2.1.1 AZOLES

Οι αζόλες εισήχθησαν στην ιατρική πρακτική τη δεκαετία του 1970, αντιπροσωπεύοντας μια σημαντική πρόοδο στην αντιμυκητιασική θεραπεία. Σε σύγκριση με την AMB, έχουν ένα ευρύτερο φάσμα δράσης και προκαλούν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η χρήση τους εξαπλώθηκε ταχύτατα, ειδικά στη θεραπεία λοιμώξεων του δέρματος και των βλεννογόνων.<sup>81</sup>

Οι αζόλες δρουν στα ένζυμα του μυκητιακού κυτοχρώματος P450 εμποδίζοντας τη σύνθεση της εργοστερόλης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αναστέλλοντας έτσι τη μυκητιακή ανάπτυξη. Όσον αφορά την

ταξινόμησή τους, χωρίζονται σε δύο κύριες τάξεις: τις ιμιδαζόλες, οι οποίες ήταν οι πρώτες που εισήχθησαν και τις τριαζόλες. Και οι δύο έχουν παρόμοια αντιμυκητιακά φάσματα, ωστόσο οι τριαζόλες έχουν τα πλεονεκτήματα ότι μεταβολίζονται πιο αργά και ασκούν λιγότερη επίδραση στο μεταβολισμό των στεροειδών στους ανθρώπους. Αυτά τα φάρμακα μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ. Επομένως, συνιστάται ο έλεγχος των ηπατικών ενζύμων. Επίσης, έχουν τερατογόνο δράση (κατηγορία C) και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.<sup>5, 52, 81-83</sup>

Οι ιμιδαζόλες που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην οφθαλμολογία περιλαμβάνουν τη μικοναζόλη, την εκοναζόλη και την κετοκοναζόλη. Μεταξύ των τριαζολών πρώτης γενιάς, οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι η ιτρακοναζόλη και η φλουκοναζόλη. Οι δεύτερης γενιάς τριαζόλες εισήχθησαν στην κλινική πράξη κατά την τελευταία δεκαετία και περιλαμβάνουν τη βορικοναζόλη και την ποζακοναζόλη.<sup>5</sup>

#### 2.1.1.1 BOPIKONAZOΛH

Η βορικοναζόλη, μια τριαζόλη δεύτερης γενιάς που χρησιμοποιείται συχνά για την προφύλαξη και τη θεραπεία των διεισδυτικών μυκητιασικών λοιμώξεων, υφίσταται πολύπλοκο μεταβολισμό κυρίως με συμμετοχή ποικίλων (πολυμορφικών) ενζύμων του κυτοχρώματος P450 στον άνθρωπο. Αν και έχει παρατηρηθεί υψηλή διακύμανση στη φαρμακοκινητική της βορικοναζόλης μεταξύ των ατόμων και το θεραπευτικό εύρος της θεωρείται στενό, ωστόσο ο μεταβολισμός της δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ακόμη.<sup>83</sup>

Η βορικοναζόλη έχει τον ίδιο μηχανισμό δράσης όπως οι πρώτης γενιάς τριαζόλες, αλλά είναι πιο αποτελεσματική στην παρεμπόδιση της σύνθεσης της εργοστερόλης. Αναπτύχθηκε από το μόριο της φλουκοναζόλης και παρουσιάζει καλύτερη αποτελεσματικότητα σε χαμηλότερες MIC από τις πρώτες τριαζόλες, γεγονός που αυξάνει την αποτελεσματικότητά της έναντι των νηματωδών μυκήτων.<sup>81</sup>

Εισήχθη στην αγορά από την Pfizer ως VFEND® το έτος 2002<sup>84</sup> και ενδείκνυται ως αντιμυκητιασικός παρά-

γοντας ευρέος φάσματος για ενήλικες και παιδιά άνω των 2 ετών στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EMA) και για ενήλικες και εφήβους άνω των 12 ετών στις Ηνωμένες Πολιτείες (FDA), όπου χρησιμοποιείται επίσης ανεπίσημα και σε παιδιά<sup>85</sup>. Αναλυτικότερα, αποτελεί ένα δεύτερης γενιάς συνθετικό παράγωγο της φλουκοναζόλης. Αναπτύχθηκε από την Pfizer Pharmaceuticals ως μέρος ενός προγράμματος που είχε σχεδιαστεί για την ενίσχυση της ισχύος και του φάσματος δράσης της φλουκοναζόλης (δηλαδή η *in vitro* δραστηριότητα της βορικοναζόλης ενάντια στους ζυμομύκητες είναι 60 φορές υψηλότερη από αυτήν της φλουκοναζόλης). Οι τροποποιήσεις του εγκεκριμένου φαρμάκου φλουκοναζόλη οδήγησαν σε μια πιο λιπόφιλη ένωση με μοριακή μάζα 349.317 g/mol.<sup>86</sup> Η βορικοναζόλη διαφέρει από τη φλουκοναζόλη από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στον προπυλικό σκελετό και με την αντικατάσταση ενός τμήματος τριαζολίου με μια ομάδα φλουοροπυριμιδίνης με αποτέλεσμα μια σημαντική αλλαγή στη δραστηριότητα. Η βορικοναζόλη διατίθεται ως λυοφιλιζμένο κόνις για διάλυμα για ενδοφλέβια έγχυση, επικαλυμμένα με λεπτό υμένιο δισκία για στοματική χορήγηση, και από το 2003 ως σκόνη για πόσιμο εναιώρημα.<sup>87</sup>

Η παρατηρούμενη φαρμακοκινητική χαρακτηρίζεται από ταχεία απορρόφηση, συσσώρευση μετά από πολλαπλές δόσεις και μη γραμμική συμπεριφορά σε υγιή ενήλικα άτομα καθώς και σε ασθενείς. Για να διασφαλιστεί η γρήγορη καθιέρωση σταθερής κατάστασης, η θεραπεία με βορικοναζόλη ξεκινά με ενδοφλέβια χορήγηση προσαρμοσμένη στο βάρος. Για ενήλικες και εφήβους (12–14 ετών και > 50 κιλά, 15–17 ετών), δόσεις εφόδου των 6 mg ανά kg σωματικού βάρους χορηγούνται ενδοφλεβίως κάθε 12 ώρες. Μετά από 24 ώρες, αυτό αλλάζει σε δόσεις συντήρησης είτε 4 mg ανά kg σωματικού βάρους με ενδοφλέβια έγχυση κάθε 12 ώρες ή 200 mg σε δισκία κάθε 12 ώρες. Σε παιδιά κάτω των 12 ετών και εφήβους με σωματικό βάρος κάτω των 50 kg, το τρέχον εγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα στην ΕΕ είναι δόση εφόδου 9 mg ανά kg σωματικού βάρους ενδοφλεβίως κάθε 12 ώρες το οποίο αλλάζει σε δόσεις συντήρησης μετά από 24 ώρες είτε σε 8 mg ανά kg σωματικού βάρους ενδοφλέβια έγχυση κάθε 12 ώρες είτε σε 9 mg / kg από του στόματος χορήγηση (μέγιστη δόση 350 mg σε δισκία) κάθε 12 ώρες.<sup>84</sup>

Παρόμοια με τη φλουκοναζόλη, η βορικοναζόλη παρουσιάζει καλή γαστρική απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα.<sup>52,88</sup> Η βορικοναζόλη έχει 96% βιοδιαθεσιμότητα μετά από του στόματος χορήγηση. Χορηγούμενη από το στόμα σε δόση 200 mg κάθε 12 ώρες, φθάνει τις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα μετά από 2-3 ώρες. Η ενδοφθάλμια διείσδυση με την από του στόματος χορήγηση της βορικοναζόλης σε μη φλεγμαινόντες οφθαλμούς βρέθηκε να είναι 1.13 +/- 0.57 μg/mL και 0.81 +/- 0.31 μg/mL στο υδατοειδές υγρό και στο υαλοειδές σώμα αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον Shen και τους συνεργάτες του, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση της βορικοναζόλης σε ζώα εργαστηρίου οδηγεί σε μέση συγκέντρωση στο υαλοειδές σώμα 18.912 +/- 2.058 μg/mL μια ώρα μετά τη χορήγηση, 0.292 +/- 0.090 μg/mL στις 16 ώρες μετά τη χορήγηση, ενώ παρουσιάζει χρόνο ημίσειας ζωής 2.5 ώρες. Η αντίστοιχη συγκέντρωση στο υδατοειδές υγρό φτάνει τα 0.240 +/- 0.051 μg/mL μια ώρα μετά την ενδοϋαλοειδική χορήγηση, ενώ η ουσία δεν ανιχνεύεται 8 ώρες μετά τη χορήγηση. Ωστόσο, στον ανθρώπινο οφθαλμό οι τιμές αυτές διαφοροποιούνται καθώς ο χρόνος ημίσειας ζωής του φαρμάκου όταν χορηγείται ενδοϋαλοειδικά είναι 6.5 ώρες.<sup>6</sup> Το φάρμακο έχει μελετηθεί στη θεραπεία της κερατίτιδας και της ενδοφθάλμιτιδας λόγω των σχετικά καλών συγκεντρώσεών του σε διάφορους οφθαλμικούς ιστούς (κερατοειδής, υαλοειδής και υδατοειδές υγρό).<sup>89,90</sup> Επομένως, η βορικοναζόλη σε τοπική χορήγηση είναι η πλέον προτιμώμενη αζόλη που χρησιμοποιείται στη θεραπεία οφθαλμικών μυκητιασικών λοιμώξεων, ενώ η συστηματική της χορήγηση πρέπει να γίνεται με προσοχή λόγω της πιθανής ηπατοτοξικότητας που δύναται να επιφέρει.<sup>2</sup>

Μετά την από του στόματος χορήγηση, η βορικοναζόλη απορροφάται γρήγορα και σχεδόν πλήρως. Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα σε ενήλικες μετά από του στόματος χορήγηση εκτιμάται ότι είναι 96%, με αποτέλεσμα η εναλλαγή μεταξύ της ενδοφλέβιας και της στοματικής χορήγησης να είναι εφικτή, εάν αυτό ενδείκνυ-

ματικού βάρους ενδοφλέβια έγχυση κάθε 12 ώρες είτε σε 9 mg / kg από του στόματος χορήγηση (μέγιστη δόση 350 mg σε δισκία) κάθε 12 ώρες.<sup>84</sup>

ται. Έχει επίσης εντοπιστεί σημαντική επίδραση από τα τρόφιμα, δηλαδή με γεύματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά η C<sub>max</sub> μειώθηκε σημαντικά. Επομένως, η βορικοναζόλη όταν χορηγείται με στοματική χορήγηση, θα πρέπει να χορηγείται είτε 1 ώρα πριν ή μετά το γεύμα. Ωστόσο, η απορρόφησή της δεν επηρεάζεται από αλλαγές στο γαστρικό pH.<sup>84</sup> Αξιίζει να σημειωθεί ότι βρέθηκε ότι η βιοδιαθεσιμότητα της βορικοναζόλης είναι (i) χαμηλότερη σε ασθενείς (45,9%, 83,0%, 58,0%) από ό, τι σε υγιή άτομα<sup>91-93</sup>, ii) χαμηλότερη σε άτομα με φυσιολογικό μεταβολισμό (75,2%) σε σύγκριση με άτομα με μειωμένη δραστηριότητα CYP2C19 (κακοί μεταβολιστές, 94,4%), πιθανώς λόγω έλλειψης έκφρασης CYP2C19 στο εντερικό τους τοίχωμα<sup>94</sup> και (iii) χαμηλότερη στα παιδιά (44,6%) από ό, τι στους ενήλικες<sup>95</sup>. Ο όγκος κατανομής σε σταθερή κατάσταση για τη βορικοναζόλη εκτιμήθηκε ότι ήταν 2-4,6 L/kg, υποδηλώνοντας εκτεταμένη κατανομή έξω από τον αγγειακό χώρο στους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.<sup>96</sup> Η δέσμευση της πρωτεΐνης πλάσματος με τη βορικοναζόλη είναι ανεξάρτητη από τη δόση και τη συγκέντρωση στο πλάσμα και αρχικά προσδιορίστηκε ότι είναι περίπου 58% *in vitro*.<sup>84,97</sup> Πιο πρόσφατες έρευνες *in vivo* έδειξαν ότι η δεσμευτική ικανότητα στο πλάσμα είναι 47,1% σε υγιείς εθελοντές<sup>98</sup> και 49,6% σε ασθενείς<sup>99</sup>. Το φάρμακο συνδέεται κυρίως με την αλβουμίνη (25,5% της συνολικής δέσμευσης πρωτεϊνών πλάσματος) και σε μικρότερο βαθμό με α1-οξική γλυκοπρωτεΐνη (4,8% της συνολικής δέσμευσης πρωτεϊνών πλάσματος).<sup>99</sup> Το υπόλοιπο 70% της δέσμευσης πρωτεϊνών πλάσματος παραμένει ανεξήγητο. Ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία δεν επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών πλάσματος της βορικοναζόλης.<sup>84</sup>

Η βορικοναζόλη αποτελεί ένα έντονα μεταβολιζόμενο φάρμακο: μόνο το 2% απεκκρίνεται αμετάβλητο ενώ το 98% υφίσταται κυρίως οξειδωτικό μεταβολισμό.<sup>97</sup> Έτσι, ένα μεγάλο φάσμα μεταβολικών και μεταβολικών οδών είναι γνωστό ότι εμφανίζονται στον άνθρωπο. Στα ένζυμα που μεταβολίζουν τη βορικοναζόλη περιλαμβάνονται τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP): 2C19, 2C9 και 3A4. Ενώ τα γονίδια

CYP3A4 διατηρούνται ως επί το πλείστον<sup>100</sup>, τα γονίδια του CYP2C9 και CYP2C19 εκφράζουν διαφορετικούς γονότυπους που οδηγούν σε φαινοτύπους φυσιολογικών μεταβολιστών (CYP2C9\*1/\*1, CYP2C19\*1/\*1), φτωχών μεταβολιστών (CYP2C9\*2/\*2,\*3/\*3,\*2/\*3; CYP2C19\*2/\*2,\*3/\*3,\*2/\*3), ενδιάμεσων μεταβολιστών (CYP2C9\*1/\*2,\*1/\*3; CYP2C19\*1/\*2,\*1/\*3,\*2/\*17), ταχέων μεταβολιστών (CYP2C19\*1/\*17) ή υπερταχέων μεταβολιστών (CYP2C19\*17/\*17)<sup>101-103</sup>.

Δεδομένου ότι η βορικοναζόλη υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό, λιγότερο από το 2% της δόσης εκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα.<sup>104</sup> Ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής της αποβολής της βορικοναζόλης είναι δοσοεξαρτώμενος και αναφέρεται ότι είναι περίπου 6 ώρες μετά από 200 mg από του στόματος. Περίπου το 80% της συνολικής δόσης ανακτάται στα ούρα, σχεδόν πλήρως ως μεταβολίτες.<sup>84</sup> Παρόλα αυτά, λόγω της μη γραμμικής φαρμακοκινητικής, ο χρόνος ημίσειας ζωής της αποβολής της δεν έχει νόημα για την πρόβλεψη συσσώρευσης ή εξάλειψής της. Οι τιμές πλήρους κάθαρσης της βορικοναζόλης κυμαίνονται από 13L/ώρα έως 36L/ώρα.<sup>104</sup> Λόγω της έλλειψης επιρροής της νεφρικής λειτουργίας στην κάθαρση της βορικοναζόλης, δεν απαιτείται προσαρμογή της δόσης για από του στόματος χορήγηση της βορικοναζόλης σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία. Ωστόσο, σύμφωνα με τον κατασκευαστή το έκδοχο σουλφοβουτυλαιθέρα-β-κυκλοδεξτρίνη στο ενδοφλέβιο σκεύασμα αποδείχθηκε ότι συσσωρεύεται σε νεφρική δυσλειτουργία (κάθαρση κρεατινίνης <50 mL/min) και, συνεπώς, η βορικοναζόλη θα πρέπει να χορηγείται από το στόμα σε αυτούς τους ασθενείς, αν και σε συνδυασμό με ενδεδειγμένη εκτίμηση κινδύνου-οφέλους, το ενδοφλέβιο σκεύασμα θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί. Η δεσμευτική ικανότητα στις πρωτεΐνες του πλάσματος, επίσης, ήταν παρόμοια σε άτομα με διαφορετικούς βαθμούς νεφρικής βλάβης. Μεγαλύτερο ενδεχόμενο να επηρεαστεί η κάθαρση της βορικοναζόλης και, ως εκ τούτου, να επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό η έκθεση σε αυτήν, υπάρχει σε χρόνια ηπατική δυσλειτουργία.<sup>84</sup>

Προηγούμενες *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η βο-



οικοναζόλη έχει ένα ευρύ φάσμα μυκητοστατικής δράσης κατά του *Aspergillus spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida spp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium spp.*, *Scedosporium spp.*, *Curvularia spp.*, και άλλων.<sup>83, 105-110</sup> Χρησιμοποιείται συχνά σε ενήλικες και παιδιά (από 2 ετών και άνω) ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τις διεισδυτικές μυκητιασικές λοιμώξεις, όπως η ασπεργίλλωση ή η καντιντιαιμία, και ως πρωτογενής ή δευτερογενής προφυλακτική αγωγή σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητάς της στην αντιμετώπιση διαδεδομένων μυκητιακών λοιμώξεων και με χαμηλότερη τοξικότητα σε σύγκριση με την AMB, η βορικοναζόλη αποτελεί σήμερα το φάρμακο επιλογής στη θεραπεία της διεισδυτικής ασπεργίλλωσης.<sup>111</sup> Επίσης, τα πλεονεκτήματά της σε σύγκριση με τα πολυένια περιλαμβάνουν τη μεγαλύτερη σταθερότητά της στο φως και στη θερμοκρασία, παραμένοντας αποτελεσματική για έως και 30 ημέρες.<sup>112, 113</sup>

Έχει δείξει θεραπευτική αποτελεσματικότητα έναντι της μυκητιασικής κερατίτιδας και ενδοφθαλμίτιδας ενδοστρωματικά, μέσω του προσθίου θαλάμου, ενδοϋαλοειδικά, από του στόματος, και τοπικής χορήγησης.<sup>114-120</sup> Διατίθεται στο εμπόριο για από του στόματος και παρεντερική χορήγηση.<sup>5</sup> Γενικά, η βορικοναζόλη χορηγείται από το στόμα για τη θεραπεία της κερατίτιδας λόγω της μεγαλύτερης συμμόρφωσης του ασθενούς με την από του στόματος χορήγηση και της σχετικά καλής διεισδυσης και της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου στους διάφορους οφθαλμικούς ιστούς.<sup>121</sup> Επιπλέον, οι αναφορές για την εμφάνιση της αντοχής στη βορικοναζόλη και της διασταυρούμενης αντίστασης είναι σπάνιες και οι δύο οδοί χορήγησης, από του στόματος και ενδοφθάλμια, έχουν δείξει καλά προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας.<sup>107</sup> Μεταβολίζεται από το ήπαρ, επομένως τα ηπατικά ένζυμα πρέπει να ελέγχονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Μεταξύ των παρενεργειών της είναι οι οπτικές διαταραχές (θολή όραση, μεταβολή στην αντίληψη χρωμάτων και φωτοφοβία), οι οποίες εμφανίζονται σε περίπου 30% των

ασθενών που χρησιμοποιούν το φάρμακο και είναι συνήθως αναστρέψιμες, καθώς και σπάνιες περιπτώσεις δερματικών εξανθημάτων, πυρετός, έμετος, ναυτία, διάρροια, κεφαλαλγία, σήψη, περιφερικό οίδημα, κοιλιακό άλγος, αναπνευστικές διαταραχές και αυξημένα ηπατικά ένζυμα.<sup>84</sup>

### 2.1.2 EXINOKANΔΙΝΕΣ

Οι εχινοκανδίνες είναι ημισυνθετικά λιποπεπτιδία που αναστέλλουν τη σύνθεση της γλυκάνης στο μυκητιακό κυτταρικό τοίχωμα μέσω μη ανταγωνιστικής αναστολής του ενζύμου συνθετάση της 1,3-β-γλυκάνης, προκαλώντας οσμωτική ανισορροπία και κυτταρική λύση.<sup>81, 122, 123</sup> Οι εχινοκανδίνες παρουσιάζουν ισχυρή αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι διαφορετικών μυκητιακών ειδών. Αυτή η κατηγορία φαρμάκων περιλαμβάνει την κασποφουγκίνη, τη μκαφουγκίνη και την ανιδουλαφουγκίνη.

Οι εχινοκανδίνες παρουσιάζουν ισχυρή αντιμυκητιακή δράση ενάντια σε διαφορετικά είδη μυκήτων. Αυτή η δράση έχει καταδειχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Παρουσιάζουν βιολογική δραστηριότητα έναντι διαφόρων ειδών *Candida* και *Aspergillus*, τα οποία ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για μυκητιασικές λοιμώξεις. Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μολύνσεις από ζυμομύκητες, οι εχινοκανδίνες έχουν ταχεία μυκητοκτόνο δράση κατά των περισσότερων ειδών *Candida*, συμπεριλαμβανομένων στελεχών ανθεκτικών στη φλουκοναζόλη, αλλά όχι κατά των *Cryptococcus*, *Rhodotorula* και *Trichosporon*.<sup>124</sup> Παρουσιάζουν μυκητοστατική δράση κατά ορισμένων νηματοειδών μυκήτων όπως ο *Aspergillus*, αλλά όχι κατά του *Fusarium* και του *Rhizopus*.<sup>125, 126</sup> Η διαφορετική αυτή δράση αιτιολογείται από την υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκάνη στα είδη *Candida* σε σύγκριση με τα είδη *Aspergillus*. Από την άλλη πλευρά, τα είδη *Fusarium* αν και είναι υπεύθυνα για την πλειονότητα των μυκητιασικών οφθαλμικών λοιμώξεων, παρουσιάζουν πολύ υψηλή MIC (minimum inhibitory concentration, ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) στις εχινοκανδίνες, κάτι που τις καθιστά λιγότερο δραστηριές απέναντί τους.<sup>2,5</sup> Οι περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας ανα-

φέρονται για μερικά είδη *Candida* όπως *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* και *C. tropicalis* εξαιτίας της παρατεταμένης χρήσης εχινοκανδινών.<sup>127</sup> Ωστόσο, οι αναφορές για την ανάπτυξη αντοχής έναντι του *Aspergillus* και άλλων μυκητοειδών παραμένουν περιορισμένες.<sup>128</sup>

Όσον αφορά τη δοσολογία τους, η κασποφουγκίνη χορηγείται ενδοφλέβια σε δόση 70 mg την πρώτη ημέρα και 50 mg τις επόμενες ημέρες, ενώ η μικαφουγκίνη χορηγείται ενδοφλεβίως σε δόση 100 έως 150 mg / ημέρα.<sup>52,81</sup> Η τοπική χορήγηση κασποφουγκίνης σε συγκέντρωση 1,5 έως 5 mg / ml ήταν εξίσου αποτελεσματική με την αμφοτερικίνη Β στη θεραπεία του έλκους κερατοειδούς από *Candida albicans* σε ένα ζωικό μοντέλο.<sup>129</sup> Δύο άλλες μελέτες με τοπική χορήγηση μικαφουγκίνης 1 mg / ml βρήκαν αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη ή ανώτερη από τη φλουκοναζόλη στη θεραπεία της κερατίτιδας από *Candida albicans* και *Candida parapsilosis*.<sup>130, 131</sup> Οι μελέτες σχετικά με την ανιδουλαφουγκίνη για τις οφθαλμικές μυκητιακές λοιμώξεις παραμένουν ανεπαρκείς. Μια εκτεταμένη in vivo μελέτη διεξήχθη από τους Livermore και τους συνεργάτες του σε κουνέλια με ενδοφθαλμίτιδα που προκλήθηκε από *C. albicans*. Η ανιδουλαφουγκίνη χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε δόση 5, 10 και 20 mg/kg χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες και τοξικότητα κατά τη χορήγηση. Η ανιδουλαφουγκίνη βρέθηκε να διεισδύει στο υαλοειδές υγρό με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και η δόση των 20mg/kg έδειξε μια μυκητοστατική δράση στη λοίμωξη.<sup>132</sup>

### 2.1.2.1 ΜΙΚΑΦΟΥΓΚΙΝΗ

Η μικαφουγκίνη (Mycamine, FK463) είναι ένα υδατοδιαλυτό, ημισυνθετικό λιποπεπτίδιο που συντίθεται από χημική τροποποίηση ενός προϊόντος ζύμωσης από το *Coleophoma empetri*.<sup>133</sup> Αναστέλλει, όπως και όλες οι εχινοκανδίνες όπως προαναφέρθηκε, επιλεκτικά τη σύνθεση της 1,3-β-D γλυκάνης, ένα ουσιαστικό συστατικό του τοιχώματος των μυκητιακών κυττάρων. Η συνεχής σύνθεση της 1,3-β-D-γλυκάνης είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος και η αναστολή οδηγεί σε οσμωτική αστάθεια και τελικά σε κυτταρική

λύση. Μυκητοκτόνος δράση παρατηρείται στην πλειονότητα των ειδών *Candida*, με χαμηλές in vitro ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) για τις *C. albicans*, *C. glabrata* και *C. tropicalis*, και σχετικά υψηλότερες MICs για τις *C. krusei* και *C. Parapsilosis*.<sup>134</sup> Μυκητοστατική δράση παρατηρήθηκε σε είδη *Aspergillus* όπου οι εχινοκανδίνες συγκεκριμένα δείχνουν αποτελέσματα κατά την ενεργή κυτταρική ανάπτυξη των υφών, οδηγώντας σε βλάβη αυτών των δομών.<sup>135</sup> Η μικαφουγκίνη δεν είναι ενεργή έναντι του *Cryptococcus neoformans* παρά το γεγονός ότι το κυτταρικό του τοίχωμα περιέχει 1,3-β-D-γλυκάνη, και επίσης δείχνει μικρή δραστηριότητα κατά του *Fusarium spp.* και των ζυγομυκήτων.<sup>136</sup>

Μαζί με την κασποφουγκίνη και την ανιδουλαφουγκίνη, η μικαφουγκίνη ενδείκνυται για τη θεραπεία τόσο της διεισδυτικής όσο και της οισοφαγικής καντιντίασης καθώς και ως προφυλακτική αγωγή από λοιμώξεις *Candida* που παρατηρούνται συχνά σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.<sup>137</sup> Σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, όπως ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία ή θεραπεία με άλλους ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, καθώς και ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση στη μονάδα εντατικής θεραπείας, οι διεισδυτικές λοιμώξεις από *Candida* παραμένουν σημαντική αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας, με τα αναφερόμενα ποσοστά θνησιμότητας σχετιζόμενης με λοίμωξη από *Candida* να κυμαίνονται μεταξύ 20 και 60%.<sup>138-140</sup> Οι εχινοκανδίνες υπερτερούν έναντι των αζολών όσον αφορά το θεραπευτικό αποτέλεσμα στις περιπτώσεις της διεισδυτικής καντιντίασης ή καντινταιμίας και προτείνονται ως θεραπεία πρώτης γραμμής τόσο για κρίσιμους όσο και μη κρίσιμους ασθενείς.<sup>141-144</sup>

Η μικαφουγκίνη είναι ένα μεγάλο μόριο με μοριακή μάζα 1270,28 g/mol. Αν και δεν έχει αναφερθεί βιοδιαθεσιμότητα από στοματική χορήγηση, προβλέπεται ότι είναι φτωχό ανάλογο της ανιδουλαφουγκίνης, η οποία έχει παρόμοια μοριακή μάζα και βιοδιαθεσιμότητα της τάξης 2-7%.<sup>145</sup> Λόγω της αναμενόμενης φτωχής βιοδιαθεσιμότητας, η μικαφουγκίνη προορίζεται μόνο για παρεντερική χρήση. Έχει δείξει γραμμική φαρμακοκινητική πάνω από μια δόση που κυμαίνεται μεταξύ 0,15

και 8 mg/kg/ημέρα, που αντιστοιχεί σε δόσεις 12,5-869 mg/ημέρα.<sup>137, 146-149</sup>

Η φαρμακοκινητική της μικαφουγκίνης σε υγιή άτομα έχει διερευνηθεί τόσο σε μελέτες μιας δόσης όσο και επαναλαμβανόμενων δόσεων. Μετά από μια εφάπαξ δόση 100 mg χορηγούμενη σε 60 λεπτά βρέθηκε μια μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (C<sub>max</sub>) της τάξεως των 9,1 mg/L, ενώ 24 ώρες μετά τη χορήγηση η μέση συγκέντρωση στο πλάσμα (C<sub>24h</sub>) βρέθηκε περίπου 2 mg/L. Επίσης, ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής (t) βρέθηκε ότι ήταν 15,4 h. Επιπλέον, μετά από μονή ημερήσια δόση 150 mg που εγχύθηκε σε 60 λεπτά, η τιμή C<sub>max</sub> μετά από μία εφάπαξ δόση βρέθηκε 12 mg/L, ενώ η τιμή C<sub>24h</sub> μετά μια εφάπαξ δόση ήταν περίπου 2,5 mg/L.<sup>150-155</sup>

Σε μια μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης σε υγιείς εθελοντές, ασθενείς με HIV λοίμωξη και αιματολογικούς ασθενείς που λαμβάνουν μικαφουγκίνη 50-150 mg ημερησίως, το φάρμακο βρέθηκε να εμφανίζει συσσώρευση στο σώμα με την πάροδο του χρόνου, με αναλογία περίπου 1.5. Αυτός ο παράγοντας συσσώρευσης περιγράφει την εξάλειψη της μικαφουγκίνης από το σώμα σε σχέση με το διάστημα δόσης.<sup>154, 156, 157</sup>

Έχει προβλέψιμη γραμμική φαρμακοκινητική σε μεγάλο εύρος δόσης 0,15-8 mg/kg τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά. Οι ειδικοί παράγοντες του ασθενούς επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική της μικαφουγκίνης, δείχνοντας ότι οι περισσότεροι ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση αναφέρεται ότι έχουν μειωμένη έκθεση στη μικαφουγκίνη, η οποία μπορεί να έχει συνέπειες στην αποτελεσματικότητά της. Η σημασία της χαμηλής έκθεσης μπορεί να μην τόσο μεγάλη σε λοιμώξεις με είδη με MIC κάτω από 0,016 mg/L, αλλά μπορεί να γίνει πιο σημαντική σε περιπτώσεις όπου η MIC του προσβεβλημένου οργανισμού είναι πάνω από 0,016 mg/L. Η φαρμακοκινητική της μικαφουγκίνης έχει διερευνηθεί διεξοδικά, ειδικά σε ενήλικες αιματολογικούς ασθενείς, παιδιά, και επίσης, πρόσφατα, ασθενείς στη ΜΕΘ. Όσον αφορά τα (πρώωρα) νεογνά, η φαρμακοκινητική έχει ελάχιστα μελετηθεί κυρίως λόγω δυσκολιών στην εκτέλεση κλινικών μελετών. Επιπρόσθετα, η ταχεία αλλαγή στην κάθαρσή της τους πρώτους μήνες μετά τη

γέννηση και η σχέση με τις αλλαγές στο κλάσμα της συνδεόμενης με πρωτεΐνες μικαφουγκίνης χρήζει περαιτέρω έρευνας. Επίσης, η γνώση σε αυτόν τον τομέα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη εξατομικευμένων δοσολογικών σχημάτων.<sup>158</sup>

Όσον αφορά την κατανομή της μικαφουγκίνης στους ιστούς, η κατάσταση ισορροπίας μεταξύ πλάσματος και ιστού επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα. Ωστόσο, η κατανομή στους ιστούς σε όλο το σώμα δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς και τα δεδομένα προέρχονται κυρίως από έναν περιορισμένο αριθμό κλινικών περιστατικών.<sup>159-169</sup> Επιπλέον, αυτά τα δεδομένα είναι συχνά δύσκολο να ερμηνευθούν καθώς μπορεί να εμφανίζονται εσφαλμένες συγκεντρώσεις λόγω διαφορών μεταξύ ενδο- και εξωκυτταρικών συγκεντρώσεων. Επίσης, ένας ασυνήθιστα υψηλός αριθμός μονοπύρηνων κυττάρων σε μια τοπική λοίμωξη θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης της μικαφουγκίνης.<sup>170</sup> Όσον αφορά τη διείσδυση της μικαφουγκίνης στους οφθαλμικούς ιστούς, έχει παρατηρηθεί χαμηλή ιστική διείσδυση ενδοφθάλμια μετά από ενδοφλέβια έγχυση. Οκτώ ασθενείς με ενδοφθαλμίτιδα από *Candida* παρουσίασαν μέση αναλογία υδατοειδούς υγρού/πλάσμα και υαλοειδούς/πλάσμα 0,0043 και 0,0046 αντίστοιχα.<sup>164-166</sup> Σε έναν ασθενή, μετρήθηκε επίσης η ιστική συγκέντρωση της μικαφουγκίνης σε άλλες οφθαλμικές δομές και η διείσδυση ήταν πολύ καλύτερη σε σχέση με την ενδοφθάλμια διείσδυση, με αναλογίες Ιστού/Πλάσμα 0,094 στον κερατοειδή, 0,86 στην ίριδα, 0,071 στον αμφιβληστροειδή και 0,34 στον χοριοειδή.<sup>165</sup>

Σε ασθενείς με HIV λοίμωξη οι οποίοι έπασχαν από οισοφαγική καντιντίαση και έλαβαν ενδοφλέβια δόση μικαφουγκίνης που κυμαινόταν από 50 έως 150 mg/ημέρα, βρέθηκε ότι ο όγκος κατανομής (V<sub>d</sub>) ήταν περίπου 0,4L/kg, με τον V<sub>d</sub> μετά από μία δόση να είναι παρόμοιος με τον V<sub>d</sub> σε σταθερή κατάσταση.<sup>146</sup> Η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται περίπου μετά από 4-5 ημέρες. Η μικαφουγκίνη δεσμεύεται σε μεγάλο ποσοστό στις πρωτεΐνες του πλάσματος (99,8%), κυρίως με την αλβουμίνη και την α-1-οξεική γλυκοπρωτεΐνη, γεγονός που είναι ανεξάρτητο από τη συγκέντρωση πέρα

από το εύρος των 10–100 mg/L. Σε κλινικά σχετικές συγκεντρώσεις, η δέσμευση στην αλβουμίνη αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ανταγωνιστική, δεν αντικατέστησε τη χολερυθρίνη στη σύνδεσή της με την αλβουμίνη και δεν έδειξε αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα που συνδέονται με πρωτεΐνες.<sup>133</sup> Η μικαφουγκίνη δεν λαμβάνεται σημαντικά από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, με αναλογία κυττάρων/πλάσματος 0,7. Μάλιστα, οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις της μικαφουγκίνης σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος και πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα ήταν σχεδόν δεκαπλάσιες σε σύγκριση με αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο πλάσμα.<sup>171</sup>

Η μικαφουγκίνη υφίσταται μεταβολισμό σε τουλάχιστον 11 ενώσεις (M1 – M11). Είναι η κύρια ένωση που κυκλοφορεί, αλλά επίσης η M1 (μορφή κατεχόλης), η M2 (μεθοξυ- μορφή της M1) και η M5 (υδροξυλίωση στην πλευρική αλυσίδα) έχουν ανιχνευθεί στο πλάσμα. Τόσο η M1 όσο και η M2 είναι φαρμακολογικά ενεργοί μεταβολίτες, με έκθεση έως και 11 και 2%, σε σχέση με τη μητρική ένωση.<sup>157</sup> Ο M1 μεταβολίτης παράγεται από αρυλσουλφατάση και μεταβολίζεται περαιτέρω σε M2 με κατεχόλη-Ο-μεθυλοτρανσφεράση.<sup>172</sup> Όλοι οι άλλοι μεταβολίτες πιστεύεται ότι είναι αδρανείς. Ο κύριος ανενεργός μεταβολίτης είναι το M5, με έκθεση 9–14% σε σχέση με τη μητρική ένωση. Αυτός ο μεταβολίτης σχηματίζεται κυρίως από το κυτόχρωμα P450 (CYP) 3A4 αλλά επίσης και από πολλά άλλα ισόένζυμα CYP (CYP1A2, 2B6, και 2C). Όπως και το μητρικό φάρμακο, όλοι οι μεταβολίτες δείχνουν γραμμική φαρμακοκινητική.<sup>157</sup>

Η συστηματική κάθαρση της μικαφουγκίνης μετά την έγχυση είναι περίπου 12 mL/h/kg, που είναι 840mL/h για έναν ενήλικα 70 kg. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 14–15 ώρες και είναι ανεξάρτητος από τη δόση. Ο κύριος μεταβολίτης, M5, έχει χρόνο ημίσειας ζωής 32 ώρες. Η απέκκριση της μικαφουγκίνης και των μεταβολιτών της διερευνήθηκε σε δύο μελέτες, καθεμία με έξι άτομα, με περίοδο συλλογής στις 169 ώρες και 28 ημέρες, αντίστοιχα. Μετά από 28 ημέρες, συνολικά 83% της χορηγηθείσας δόσης συλλέχθηκε και συγκεκριμένα 71% στα κόπρανα και 12% στα ούρα. Η κατανομή των μεταβολιτών σε αυτά τα υγρά απέκκρισης δεν αναφέρθηκε.

Ο μέσος όρος ημίσειας ζωής για όλους τους μεταβολίτες εκτιμήθηκε στις 340 ώρες.<sup>146</sup>

Η μικαφουγκίνη εισήχθη στην αγορά από την Astellas Pharma Co ως Mycamine και εγκρίθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία στα τέλη του 2002. και από το FDA των ΗΠΑ το Μάρτιο του 2005, ακολουθούμενος από αρκετές Ασιατικές χώρες μεταξύ του 2005 και του 2007 και στην ΕΕ τον Απρίλιο 2008.<sup>133</sup> Διατίθεται σε μορφή κόνις για ενδοφλέβιο διάλυμα και οι συνιστώμενες δόσεις είναι 50-200mg/ημέρα για ασθενείς βάρους 40 κιλών και άνω και 1-4mg/kg/ημέρα για παιδιά ηλικίας άνω των 4 μηνών με βάρος κάτω των 40 κιλών. Για παιδιά ηλικίας κάτω των 4 μηνών, συμπεριλαμβανομένων των πρόωγων νεογνών, καταγράφεται δόση 4-10mg/kg/ημέρα για τη θεραπεία της διεισδυτικής καντιντίασης. Επίσης, δεν απαιτείται δόση εφόδου.<sup>137</sup>

Υπάρχει, επίσης, ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την επέκταση των διαστημάτων δόσης από μία φορά την ημέρα σε μια φορά κάθε δεύτερη μέρα, και ακόμη έχει αναφερθεί και μία φορά κάθε 2 εβδομάδες, κυρίως λόγω του ευνοϊκού προφίλ τοξικότητας της μικαφουγκίνης και της πιθανής μεταμυκητιασικής επίδρασης. Η παράταση του διαστήματος δόσης θα επέτρεπε στους ασθενείς να είναι περιπατητικοί, να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής, να μειωθεί το νοσοκομειακό κόστος καθώς και να μειωθεί η ανάγκη και η συχνότητα πρόσβασης στον κεντρικό φλεβικό καθετήρα. Σε ουδετεροπενικά ποντίκια με διεισδυτική καντιντίαση, μία εφάπαξ υψηλή δόση μικαφουγκίνης ήταν ικανή να μειώσει ομοίως το μυκητιακό φορτίο όπως η ίδια συσσωρευτική δόση που χορηγείται δύο φορές την εβδομάδα.<sup>173</sup> Σε παιδιά, αυτό διερευνήθηκε ως προφυλακτική αγωγή σε 21 παιδιά που είχαν μέση ηλικία 9 ετών και στα οποία χορηγήθηκε δόση 3-4 mg/kg δύο φορές την εβδομάδα.<sup>174</sup> Αυτή η θεραπεία ήταν καλά ανεκτή χωρίς αναφερόμενη εμφάνιση μόλυνσης. Μια διαλείπουσα στρατηγική δοσολογίας σε ενήλικες με υψηλό κίνδυνο μυκητιασικής λοίμωξης χρησιμοποιώντας δόση 300 mg δύο φορές την εβδομάδα είναι σε εξέλιξη.<sup>158</sup>

Η μικαφουγκίνη δρα, όπως προαναφέρθηκε, με επιλεκτική αναστολή του μυκητιασικού ενζύμου που πα-



ράγει τη συνθάση του πολυμερούς 1,3-β-D-γλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος. Καθώς τα ανθρώπινα κύτταρα δεν περιέχουν αυτό το πολυμερές, ένα ευνοϊκό προφίλ τοξικότητας μπορεί να αναμένεται μέσω της απουσίας της άμεσης φαρμακολογικής επίδρασης. Πράγματι, δεν έχει αναφερθεί δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα έως ημερήσια δόση 8 mg/kg (896 mg) για 1-4 εβδομάδες σε ενήλικες.<sup>175</sup> Επίσης, ένας ασθενής περιγράφηκε ότι έλαβε 1400 mg κάθε δεύτερη εβδομάδα για 12 εβδομάδες χωρίς παρενέργειες που να σχετίζονται με τη μικαφουγκίνη.<sup>173</sup> Επιπλέον, ένα νεογέννητο αντιμετωπίστηκε κατά λάθος με μία εφάπαξ δόση 16 mg/kg μικαφουγκίνης χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες.<sup>137</sup> Οι περισσότεροι συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη μικαφουγκίνη είναι η διάρροια, η ναυτία, ο έμετος, ο πυρετός, η θρομβοπενία και η κεφαλαλγία.<sup>146</sup> Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων, αλλά όχι ο FDA των ΗΠΑ, εξέδωσε προειδοποίηση για πιθανή ανάπτυξη εστιών μεταλλαγμένων ηπατοκυττάρων (FAHs) και για ηπατοκυτταρικούς όγκους καθώς προκλινικά δεδομένα κατέδειξαν ότι αυτοί οι όγκοι σε αρουραίους που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υψηλή δόση μικαφουγκίνης για 13 εβδομάδες.<sup>137</sup> Μετά τη διακοπή της θεραπείας, οι αρουραίοι ανάρρωσαν για 13 εβδομάδες, αλλά τα FAHs ήταν ακόμη παρόντα. Τουλάχιστον ένα μέρος αυτών των εστιών δεν ήταν αναστρέψιμο.<sup>133</sup> Η επίπτωση της πιθανής ηπατοκαρκινογόνου δράσης για χρήση στους ανθρώπους είναι άγνωστη. Μέχρι και σήμερα, δεν έχουν υπάρξει περιπτώσεις που να αναφέρουν αυτή την επίπτωση στους ανθρώπους.

Επίσης, ποικίλλες μελέτες έχουν δημοσιευτεί τόσο για την επίδρασή της στον οφθαλμό όσο και συστηματικά. Συγκεκριμένα, η επίδραση της ηπατικής δυσλειτουργίας διερευνήθηκε ως μέρος μελέτης σε οκτώ εθελοντές με μέτρια ηπατική δυσλειτουργία λόγω ηπατίτιδας C, πρωτοπαθούς ηπατικής κίρρωσης ή κατάχρηση αλκοόλ, με βαθμολογία Child-Pugh που κυμαινόταν μεταξύ 7 και 9. Η έκθεση μετά από εφάπαξ δόση των 100 mg μειώθηκε σε κατά μέσο όρο 98 mg h/L, έναντι 126 mg h/L σε υγιείς εθελοντές. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε μια μελέτη οκτώ ατόμων με σοβαρή ηπατική

ανεπάρκεια που είχαν έκθεση σε 100 έναντι των 142 mg h/L σε οκτώ υγιείς μάρτυρες. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να ανευρεθεί στα μειωμένα επίπεδα αλβουμίνης, με αποτέλεσμα ένα αυξημένο ελεύθερο κλάσμα μικαφουγκίνης.<sup>152, 155</sup> Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια χαμηλότερη συνολική συγκέντρωση στο πλάσμα χωρίς όμως να θεωρείται κλινικά σημαντική και δεν συνιστάται προσαρμογή της δόσης για τους ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε τρεις μελέτες με 34 λήπτες μοσχεύματος ήπατος με έναν ασθενή να αποτελεί αξιοσημείωτη εξαίρεση.<sup>176-178</sup> Αυτός ο ασθενής είχε ένα μικρό σε μέγεθος μόσχευμα ήπατος με όγκο μόλις το 26% ενός υγιούς ήπατος και έδειξε φυσιολογικό χρόνο ημίσειας ζωής 16 ωρών μετά από μια δόση 50 mg. Ωστόσο, μετά τη χορήγηση της δόσης των 100 mg, ο χρόνος ημίσειας ζωής αυξήθηκε στις 76 ώρες και μάλιστα αυξήθηκε και η συγκέντρωση της μικαφουγκίνης στο πλάσμα σε βαθμό που αντιστοιχεί μετά από δόση 1000 mg σε ένα υγιές άτομο.<sup>178</sup>

Παρόλο που η μικαφουγκίνη δεν απεκκρίνεται νεφρικά, οι ασθενείς που πάσχουν από νεφρική δυσλειτουργία μπορεί να έχουν επηρεασμένη φαρμακοκινητική λόγω μεταβολών στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης που είναι διαθέσιμες για δέσμευση πρωτεϊνών. Η επίδραση της νεφρικής δυσλειτουργίας στη φαρμακοκινητική της μικαφουγκίνης ερευνήθηκε σε εννέα ασθενείς με καθαρή κρεατίνη κάτω από 30mL/min μετά από μία εφάπαξ δόση των 100 mg, και συγκρίθηκε με εννέα υγιή άτομα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων και ως εκ τούτου δεν απαιτούνται προσαρμογές για ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία.<sup>146, 152</sup>

Η μικαφουγκίνη στην κλινική πράξη χορηγείται κυρίως ενδοφλεβίως ή τοπικά. Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση έχει επιχειρηθεί μόνο σε πειραματικά πρωτόκολλα με ζώα εργαστηρίου. Λόγω των θεραπευτικών αποτελεσμάτων της και του μικρού αριθμού ανεπιθύμητων επιδράσεων της, πολλά υποσχόμενη παρουσιάζεται η ενδοϋαλοειδική χορήγηση της καθώς η ενδοφλέβια χορήγηση έχει οδηγήσει πολλές φορές σε μη επίτευξη των επιθυμητών επιπέδων του φαρμάκου στους οφθαλ-

μικρούς ιστούς, ενώ η τοπική χορήγηση έχει καλύτερα αποτελέσματα στη θεραπεία των μυκητιασικών κερατιτίδων παρά των ενδοφθαλμίτιδων.<sup>2,5</sup> Όσον αφορά τη μέγιστη μη τοξική δόση, σύμφωνα με τον Karim και τους συνεργάτες του, η ενδοϋαλοειδική χορήγηση της μυκαφουγκίνης σε δόση των 0.025mg/0.1ml αποτελεί μια μη τοξική-ασφαλή δόση έναρξης της αντιμυκητιασικής θεραπείας σε ζώα εργαστηρίου σε πειραματικά πρωτόκολλα και, συνεπώς, τη δόση έναρξης για μελλοντική χρήση στη θεραπεία της μυκητιασικής ενδοφθαλμίτιδας στον άνθρωπο.<sup>13</sup>

### 3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

#### 3.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Ανοσοϊστοχημεία ονομάζουμε μια εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Πρόκειται για μια ομάδα ανοσοσημασμένων τεχνικών, που επιτυγχάνουν να καταστήσουν ορατά διάφορα αντιγόνα σε ιστούς και κύτταρα. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφόσον είναι παρόν.

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και το είδος της ουσίας-ετικέτας που χρησιμοποιούμε, η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ελέγχεται με κοινό, φθορίζον ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.<sup>179</sup>

Η αρχική μέθοδος ξεκίνησε από τον Coons ο οποίος πρώτος είχε τη ιδέα να σμάνει με φθορίζοντα ιχνηθέτη ένα αντίσωμα που ανέπτυξε σε πειραματόζωο και κατόπιν να αναζητήσει σε ιστική τομή το αντιγόνο εναντίον του οποίου είχε αναπτυχθεί το αντίσωμα ξεετάζοντας τον ιστό (μετά την επώαση) με φθορίζον μικροσκόπιο. Αλλά μόνο μετά την εισαγωγή των σεσημασμένων με

ένζυμα αντισωμάτων, η ανοσοϊστοχημεία έγινε γενικά αποδεκτή σαν ένα απλό, έξυπνο και πρακτικό εργαλείο στη διαγνωστική ιστοπαθολογία. Το αμέσως επόμενο βήμα, που ήταν η εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία, πρόσφερε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο μια ανεξάντλητη πηγή ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων σε ιστούς και κύτταρα.<sup>180, 181</sup>

Το σύμπλεγμα αντισώματος-ένζυμου διατηρεί τόσο τις ανοσολογικές όσο και τις ενζυμικές του ιδιότητες και έτσι είναι σε θέση να δεσμεύει τόσο το αντιγόνο που αναζητούμε στον ιστό, όσο και να μεταβάλλει το χρώμα του κατάλληλου χρωμογόνου, καθιστώντας το ορατό με το μικροσκόπιο.<sup>182</sup> Η ανοσοϊστοχημεία συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα από οποιαδήποτε άλλη διαγνωστική μέθοδο ή τεχνική. Πολύ ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα, δυνατότητα εφαρμογής σε αρχαιακό υλικό ρουτίνας ακόμα και μετά την παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος, επαναληψιμότητα και δυνατότητα συσχέτισης με τις μορφολογικές παραμέτρους. Είναι συμβατή με όλα σχεδόν τα μονιμοποιητικά υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα, μπορεί να εφαρμοστεί ακόμα και μετά από αφαλάτωση του υλικού, δίνει αποτελέσματα και σε υλικά που έχουν υποστεί αυτόλυση ή ακόμη και νέκρωση και τέλος σε περίπτωση που αυτό απαιτείται μπορεί να εφαρμοσθεί και σε ιστολογική τομή που είχε προηγουμένως υποστεί χρώση ρουτίνας.<sup>183-187</sup> Εφαρμόζεται με πολύ καλά αποτελέσματα σε κυτταρολογικό υλικό, σε υλικό για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και μπορεί να συνδυαστεί με άλλες, ιστοχημικές χρώσεις στην ίδια τομή. Πολλές τεχνικές είναι σήμερα διαθέσιμες για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση αντιγόνων με πλέον χρησιμοποιούμενες, αυτές του ανοσοσυμπλέγματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP method) και της ανοσοενζυμικής τεχνικής βιοτίνης-αβιδίνης (Biotin-Avidin procedure).<sup>188-193</sup>

#### 3.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των αντισωμάτων δεικτών που διατίθενται προς χρήση, δημιουργεί σε κάθε εργαστήριο την ανάγκη ταξινόμησής τους, που

μπορεί να γίνεται: α) ανάλογα με το είδος των ιστών στους οποίους ανιχνεύονται και να έχουμε έτσι δείκτες επιθηλιακούς, μεσεγγυματικούς, λεμφικούς κ.λ.π., β) ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής τους και έχουμε έτσι μονοκλωνικούς ή πολυκλωνικούς δείκτες ή γ) ανάλογα με την ειδικότητά τους και να έχουμε δείκτες ειδικούς και μη ειδικούς. Σαν ειδικούς χαρακτηρίζουμε τους δείκτες που η έκφρασή τους περιορίζεται σε μια κυτταρική σειρά και χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου δείκτη είναι το ειδικό προστατικό αντιγόνο που εκφράζεται στο αδενικό επιθήλιο του προστάτη αδένου. Όμως, οι περισσότεροι από τους δείκτες που χρησιμοποιούμε είναι μη ειδικοί εκφραζόμενοι σε περισσότερους από έναν κυτταρικούς τύπους. Αυτό βέβαια δεν μειώνει τη χρησιμότητά τους καθώς μας επιτρέπουν να εντάξουμε έναν κυτταρικό πληθυσμό σε μια γενική κατηγορία π.χ. επιθηλιακός, μεσεγγυματικός, λεμφικός κ.ά.<sup>182</sup>

Η διαγνωστική αξία των διαφόρων δεικτών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι η ειδικότητα και η ευαισθησία. Με βάση αυτές τις δύο ιδιότητες μπορούμε να διακρίνουμε τους δείκτες μας σε πολύ χρήσιμους και απλά χρήσιμους. Στην κατηγορία των πολύ χρήσιμων δεικτών ανήκουν αυτοί που είναι όχι μόνο ειδικοί για μια κυτταρική σειρά αλλά και εκφράζονται από την συγκεκριμένη σειρά με πολύ μεγάλη συχνότητα. Τέτοιοι δείκτες είναι, επομένως, πολύ χρήσιμοι τόσο όταν το αποτέλεσμα είναι θετικό, αλλά και όταν είναι αρνητικό. Δυστυχώς δείκτες με τέτοια ειδικότητα και ευαισθησία υπάρχουν λίγοι, ο αριθμός τους όμως αυξάνεται σταδιακά. Στην κατηγορία των χρήσιμων δεικτών ανήκει η μεγάλη πλειοψηφία των χρησιμοποιούμενων στη διάγνωση δεικτών. Μερικοί από αυτούς έχουν πολύ μεγάλη ειδικότητα για έναν κυτταρικό τύπο αλλά δεν εκφράζονται με μεγάλη συχνότητα από νεοπλασμάτα του τύπου αυτού. Τέτοιοι δείκτες είναι επομένως χρήσιμοι όταν δίνουν θετικό αποτέλεσμα, όχι όμως όταν δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα.<sup>182</sup>

Οι κυτοκίνες λειτουργούν κανονικά ως αυτοκρινείς και παρακρινείς ρυθμιστικές ορμόνες για την κυττα-

ρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, λειτουργία, αναστολή και απόπτωση. Οι κυτοκίνες τύπου I περιλαμβάνουν 1) ανοσορρυθμιστικές κυτοκίνες (IL-2, -4, -7, -9 και -15), 2) αιμοποιητικές κυτοκίνες (IL-3, -5 και τον διεγερτικό παράγοντα της αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF)), 3) κυτοκίνες που σχετίζονται με κυτταροκίνηση του αιματοποιητικού συστήματος, του ανοσοποιητικού συστήματος, του καρδιαγγειακού και κεντρικού νευρικού συστήματος (IL-6, IL 11, ογκοστατίνη M ή OSM), 4) τον ανασταλτικό παράγοντα λευκαϊμίας (LIF), 5) τον ακτινωτό νευροτροφικό παράγοντα (CNTF) και 6) την καρδιοτροφίνη-1 που εμπλέκει έναν κοινό γλυκοπρωτεϊνικό (gp) 130 υποδοχέα σε ποικίλες φλεγμονώδεις νόσους ή όγκους μέσω ενεργοποίησης τυροσινικών κινασών και τελικά κυτταρικής ανοσίας και κυτοκινών αιμοποίησης (IL-12, -21, και -23). Οι κυτοκίνες τύπου II (τύπου I IFN-α, β και ω, τύπου II IFN-γ και IL-10) καταστέλλουν τη φλεγμονή.<sup>194</sup> Η IL-6 σύμφωνα με τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) και την οικογένεια της IL-1, μεσολαβεί στην οξεία φλεγμονή και την πολλαπλή ενεργοποίηση των φυσικών ανοσοποιητικών μηχανισμών και στις σημαντικές μεταβολικές μεταβολές εντός 24-48 ωρών. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται ανοσομετατροπή με αυξητική ορμόνη, καταστολή προλακτίνης, γλυκοκορτικοειδή και αύξηση κατεχολαμίνης. Στην οξεία φάση της φλεγμονής, οι κυτοκίνες τύπου IL-6 συμπεριλαμβανομένων των IL-6, IL-11, LIF, καθώς και των OSM, CNTF, καρδιοτροφίνης-1 και διαμεσολαβητών κυτοκινών που μοιάζουν με την καρδιοτροφίνη, σχετίζονται και μοιράζονται την ίδια αλυσίδα μετατροπέα σήματος gp130. Οποιαδήποτε ανωμαλία στη σηματοδότηση κυτοκίνης τύπου IL-6 μπορεί να προκαλέσει διάφορες διαταραχές και διάφορους τύπους καρκίνου<sup>195</sup>. Τα μακροφάγα μπορούν να συνθέσουν πολλές κυτοκίνες συμπεριλαμβανομένων των IL-1, ανταγωνιστή υποδοχέα IL-1 (IL 1ra), IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α, IFN-α, IFN-γ, χημειοτακτικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων (MCP-1), MCP-3, ανασταλτικού παράγοντα μετανάστευσης μακροφάγων (MIF), διεγερτικού παράγοντα αποικίας μακροφάγων (M-CSF), διεγερτικού παράγοντα αποικί-

ας κοκκιοκυττάρων (G-CSF), GM-CSF, φλεγμονώδους πρωτεΐνης μακροφάγων (MIP) -1 και 2 και μετασχηματισμένος αυξητικός παράγοντας (TGF) - $\beta$ .<sup>196</sup>

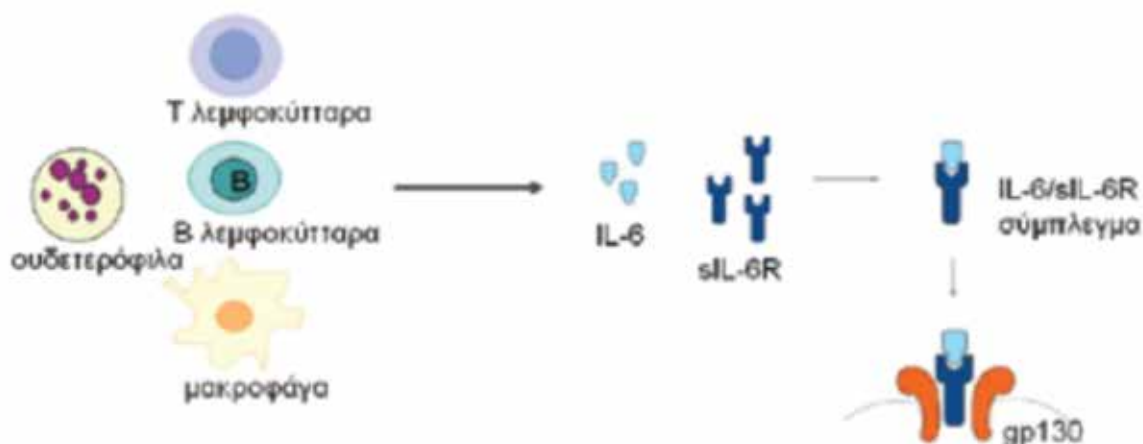
Στο παρόν πειραματικό πρωτόκολλο, πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε δύο κυτοκίνες, την IL-6 και τον TNF-a, οι οποίες και αναλύονται παρακάτω.

### 3.2.1 IL-6

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται από διάφορα κύτταρα όπως τα T- και B-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τους ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα ηπατοκύτταρα, τα μεσαγγειακά κύτταρα καθώς και από διάφορα καρκινικά κύτταρα. Διαμεσολαβεί και ρυθμίζει ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού.<sup>197-199</sup> Πιο συγκεκριμένα, η IL-6 παίζει ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των δραστηριοτήτων σε B κύτταρα, πλασμακυτώματα μυελώματος, T κύτταρα, ηπατοκύτταρα και αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα με διπλή σύνδεση, τόσο με υποδοχείς υψηλής συγγένειας όσο και με υποδοχείς χαμηλής συγγένειας.<sup>200,201</sup> Αρχικά δεσμεύεται στον μεμβρανικό της υποδοχέα (IL-6R) δημιουργώντας το σύμπλοκο IL-6/IL-6R, το οποίο στη συνέχεια δεσμεύεται στον υποδοχέα gp130 για τη μετάδοση του σήματος (κλασσική οδός). Επιπλέον, ο διαλυτός της υποδοχέας (sIL-6R) δεσμεύει την IL-6 και δημιουργεί σύμπλοκο με τον υποδοχέα gp130 και μετάδοση του σήματος στο

εσωτερικό του κυττάρου (εναλλακτική οδός).<sup>202</sup> (Εικόνα 3.2.1.1) Κύτταρα που δεν μπορούν να διεγερθούν με την κλασσική οδό εξαιτίας έλλειψης του μεμβρανικού υποδοχέα, ενεργοποιούνται με την εναλλακτική οδό. Η πρόσδεση της IL-6 στον υποδοχέα, είτε με την κλασσική είτε με την εναλλακτική οδό, ενεργοποιεί δυο οδούς, αυτή των MAP κινασών (p38, JNK, ERK), και αυτή της STAT-3.<sup>203</sup> Το γεγονός ότι όλα τα κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα gp130 εξηγεί την πλειοτροπική δράση της IL-6 στη διαφοροποίηση των B- και T-λεμφοκυττάρων (Th17 και T FH ) και των μεγακαρουκυττάρων, στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων/μακροφάγων, των ηπατοκυττάρων, των οστεοκλαστών και των ινοβλαστών.<sup>204-216</sup> Η IL-6 εμποδίζει τη διαφοροποίηση των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων-Tregs, καθώς παρουσία της τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε Th17, ενώ τα ήδη διαφοροποιημένα Tregs παρουσία IL-6 μετατρέπονται σε Th17, και επομένως αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων.<sup>197, 217-219</sup>

Η IL-6 ως μια από τις σημαντικότερες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες έχει πρόσφατα ληφθεί υπόψιν σε πολλά οφθαλμολογικά ερευνητικά άρθρα. Κατά κύριο λόγο η έρευνα επικεντρώνεται, αλλά δεν περιορίζεται, σε διαταραχές της οφθαλμικής επιφάνειας, ιδιαίτερα στον ξηρό οφθαλμό, σε παθολογικές καταστάσεις του κερατοειδούς, σε διαταραχές του ραγοειδούς χιτώνα, σε υαλοειδοαμφιβληστροειδικές ανωμαλίες (κυρίως αυτές



Εικόνα 3.2.1.1: Σχηματική απεικόνιση της εναλλακτικής οδού πρόσδεσης της IL-6 στον υποδοχέα gp130.<sup>197</sup>



που σχετίζονται με υαλοειδοαμφιβληστροειδική αγγειογένεση) ή σε φλεγμονώδεις διαταραχές. Αυτό το εκτεταμένο και ευρύ φάσμα των επιδράσεων της IL-6 ενθάρρυνε τους ερευνητές στη χρησιμοποίηση ανοσοθεραπείας στοχευμένης στην IL-6.<sup>220</sup> Έχουν προταθεί αρκετές λειτουργίες για την IL-6. Η αγγειογένεση της οφθαλμικής επιφάνειας είναι επιβλαβής για τους οφθαλμικούς ιστούς στις περισσότερες περιπτώσεις. Ο πιο συχνός τύπος αγγειογενετικής δραστηριότητας στους ανθρώπους είναι το πτερόγιο.<sup>221,222</sup>

Η αγγειογένεση του κερατοειδούς παρατηρείται σε πολλές, συχνές παθολογικές διαταραχές, όπως η διαμπερής κερατοπλαστική ή τα ξένα σώματα του κερατοειδούς.<sup>223</sup> Τα επίπεδα των IL-6, IL-8 και MCP-1 στο υαλοειδές είναι σημαντικά αυξημένα σε υαλοειδοαμφιβληστροειδικές παθήσεις που περιλαμβάνουν το διαβητικό οίδημα της ωχράς, την παραγωγική διαβητική αμφ/θεια, την απόφραξη κλάδου της κεντρικής φλέβας του αμφ/δούς, την απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφ/δούς και τη ρηγματογενή αποκόλληση του αμφ/δούς. Η αύξηση του VEGF συσχετίστηκε σημαντικά με τις IL-6, IL-8 και MCP-1. Επίσης, η IL-6, η IL-8 και η MCP-1 συσχετίστηκαν ισχυρά μεταξύ τους υποδεικνύοντας έναν κοινό μηχανισμό που εμπλέκεται στις φλεγμονώδεις και ισχαιμικές διεργασίες στις υαλοειδοαμφιβληστροειδικές παθήσεις.<sup>224</sup>

Πιο συγκεκριμένα, η IL-6 παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση στον οφθαλμό. Μαζί με τους άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της IL-8, τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), την αγγειογενίνη, τον MCP-1 και τον TGF-β1, η IL-6 έχει κλινικά σημαντικές αγγειογενετικές δραστηριότητες.<sup>225</sup> Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-6 και ο TNF-α προκαλούν αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση μέσω αυξημένης έκφρασης του VEGF και των μεταλλοπρωτεϊνών στρώματος (MMP) -9 στην ερπητική στρωματική κερατίτιδα (HSK).<sup>226</sup> Το αμυλοειδές A στον ορό και στο υαλοειδές που μπορεί να ρυθμίσει την αγγειογένεση και η IL-6 ως προφλεγμονώδεις παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην αγγειογένεση του αμφιβληστροειδούς και στην εξέλιξη της παραγωγικής

διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (PDR).<sup>227</sup> Εκτός από την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η IL-6 και ο VEGF παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση του αμφιβληστροειδούς στη νόσο του Eales.<sup>228</sup>

Επίσης, τα επίπεδα της IL-6 στα δάκρυα ανιχνεύονται μεταξύ 100 και 400pg/ml σε φυσιολογικούς οφθαλμούς.<sup>229</sup> Μάλιστα, ο Sharma υποστηρίζει ότι η ελάχιστη ανιχνεύσιμη τιμή της IL-6 ήταν 5.81pg/ml.<sup>230</sup>

Η IL-6 έχει συσχετισθεί επιπρόσθετα με παθήσεις της οφθαλμικής επιφάνειας και του κερατοειδούς. Σε ασθενείς με ξηροφθαλμία, οι κυτοκίνες IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-1β και 1 χημοκίνη IL-8 υπερπαραγονται σημαντικά σε επίπεδο ανάλογο με τη σοβαρότητα της νόσου.<sup>231</sup> Ωστόσο, μόνο η sIL-6R και η sIL-6Rsgp130 σε συνδυασμό με την IL-1β είναι οι πιθανοί δείκτες για την νόσο του ξηρού οφθαλμού.<sup>232</sup> Επίσης, στο σύνδρομο Sjogren οι IL-1Ra, IL-6, IL-8 και MMP-9 υπερεκφράζονται σημαντικά στα δάκρυα.<sup>233</sup> Στη νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή, τα επίπεδα των IL-6 και IFN-γ στα δάκρυα αυξήθηκαν σημαντικά.<sup>234</sup> Επίσης, η IL-6 έχει μελετηθεί στο σύνδρομο δυσλειτουργίας δακρύων καθώς και στις υποτροπιάζουσες αποπτώσεις του κερατοειδούς.<sup>235,236</sup> Σε κερατίτιδα από *Pseudomonas aeruginosa*, η IL-6 βρέθηκε αυξημένη σε όψιμα στάδια για τον έλεγχο της εξέλιξης της λοίμωξης.<sup>237</sup> Όσον αφορά την ελκωτική κερατίτιδα υπάρχουν δεδομένα από μια μικρή σειρά 7 ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) στους οποίους διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου της IL-6 σε δείγματα από την περιοχή των ελκών του κερατοειδούς στο 100% των περιπτώσεων. Αν και δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου για σύγκριση, οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF-α, δύναται να επάγει την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών που συμβάλλουν στην κολλαγονολυτική βλάβη του κερατοειδούς. Οι παραγόμενες από τα κερατινοκύτταρα των ασθενών IL-6 και TNF-α φλεγμονώδεις κυτταροκίνες φαίνεται ότι αντιπροσωπεύουν μία από τις κύριες αιτίες ή αποτελέσματα της ελκωτικής κερατίτιδας που σχετίζεται με RA.<sup>238</sup> Επίσης, πιο εντατική φλεγμονώδης απόκριση ανευρέθει στη φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή (PRK)

από ό,τι στην ενδοστρωματική κερατοσμίλευση με laser (LASIK) με αυξημένες συγκεντρώσεις των TNF-a, IL-1β, IL-6 και IL-8 στα δάκρυα. Τα επίπεδα των IL-6, IL-1β και IFN-γ έχουν βρεθεί αυξημένα στα δάκρυα ασθενών με κερατόκωνο (KCN). Ωστόσο, η IL-6 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική άμυνα της οφθαλμικής επιφάνειας και μειώνει τη σοβαρότητα και την πιθανότητα της κερατίτιδας που σχετίζεται με τους φακούς επαφής.<sup>200, 239, 240</sup>

Στην χάλαση του επιπεφυκότα, τα επίπεδα των IL-6 και IL-8 βρέθηκαν αυξημένα στα δάκρυα σε επίπεδα ανάλογα με τη σοβαρότητα και τα στάδια των ασθενειών.<sup>241</sup> Σε αποπική κερατοεπιπεφυκίτιδα (AKC), οι ερεθισμοί του επιπεφυκότα από αλλεργιογόνα στον αέρα οδηγούν σε σημαντική αύξηση της IFN-γ και της IL-6 στα δάκρυα.<sup>242</sup> Επίσης, η IL-6 και η IL-15 του βλεννογόνου του επιπεφυκότα αποτελούν παράγοντες κινδύνου για χρόνια ουλώδες τράχωμα.<sup>243</sup> Η IL-8, και σε κάποιο βαθμό, η IL-6 και ο VEGF εκφράζονται από το επιθήλιο του περυγίου, το οποίο επιδεινώνεται μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.<sup>221</sup> Η IL-6 έχει βρεθεί αυξημένη στο στρώμα του επιπεφυκότα σε ουλώδες πεμφιγοειδές (OCP).<sup>244</sup> Η IL-6, η IL-8 και η IL-10 εκφράζονται σημαντικά αυξημένες στο επιθήλιο του επιπεφυκότα σε ασθενείς με γλαύκωμα.<sup>245</sup> Σε ασθενείς με πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας (POAG), τα επίπεδα της IL-4 και της IL-6 στον ορό ήταν υψηλότερα από ό,τι σε φυσιολογικά άτομα.<sup>246</sup> Η ίριδα από ασθενείς με νεοαγγειακό γλαύκωμα (NVG) εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα IL-6 από ό,τι σε ασθενείς με πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας.<sup>247</sup> Σε πρώιμο ψευδοαποφολιδωτικό (PEX) σύνδρομο, η έκφραση των IL-6 και IL-8 ήταν σημαντικά αυξημένη στο ακτινωτό σώμα και στην ίριδα. Μάλιστα, το ακτινωτό σώμα αποτελεί την πιο πιθανή πηγή για την IL-6 και την IL-8 στο υδατοειδές υγρό (περίπου 100 φορές περισσότερο από όλους τους άλλους φυσιολογικούς οφθαλμικούς ιστούς).<sup>248</sup>

Η επίδραση της IL-6 στον ραγοειδή χιτώνα έχει συσχετισθεί με πληθώρα παθήσεων. Η ανοσομεσολαβούμενη ραγοειδίτιδα, με ή χωρίς συστηματική ασθένεια, ευθύνεται για το 10% όλων των τυφλών σε ασθενείς

κάτω των 65 ετών. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένης της IL-6, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλούς τύπους ραγοειδίτιδας.<sup>249</sup> Σε ορισμένους τύπους ραγοειδίτιδας, όπως στην ετεροχρωμική ιριδοκυκλίτιδα του Fuchs και στη ραγοειδίτιδα από τοξόπλασμα, τα επίπεδα της IL-6 στο υδατοειδές υγρό αυξάνονται σημαντικά ανεξάρτητα από την μεταβολή της IL-6 στον ορό. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η IL-6 στο υδατοειδές παίζει σημαντικό ρόλο στη ραγοειδίτιδα μετά από χειρουργική επέμβαση καταρράκτη<sup>250</sup>, ενώ, μάλιστα, ανευρίσκεται αυξημένη στη νόσο Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) και στη σαρκοειδωση.<sup>251, 252</sup> Ωστόσο, τα επίπεδα της IL-8 και της IL-6 στον ορό αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με ενεργή ραγοειδίτιδα αλλά μειώνονται κατά την ύφεση. Τα επίπεδα της IL-8 ανευρίσκονται υψηλότερα σε ασθενείς με πρόσθια και οξεία ραγοειδίτιδα, ενώ της IL-6 είναι υψηλότερα στη χρόνια ραγοειδίτιδα.<sup>253</sup> Σε ασθενείς με απόρριψη μοσχεύματος μετά από διαμπερή κερατοπλαστική (PK), η σημαντική αύξηση των αναλογιών IL-6/IL-10 και IL-8/IL-10 στα δάκρυα αποτελεί σημαντικό δείκτη για την απόρριψη του ενδοθηλίου του κερατοειδούς κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης.<sup>254</sup> Επίσης, τα επίπεδα των IL-1β, IL-6 και προσταγλανδίνης (PG) E2 βρέθηκε σημαντικά αυξημένη μετά από χειρουργική επέμβαση καταρράκτη με laser femtosecond, γεγονός που μπορεί να είναι η αιτία της διεγχειρητικής μύσης.<sup>255</sup>

Τα επίπεδα των IL-6, IL-8 και MCP-1 στο υδατοειδές υγρό ασθενών με καταρράκτη και γλαύκωμα ανοικτής γωνίας αυξάνεται ταυτόχρονα.<sup>256</sup> Σε γλαυκωματικούς ασθενείς, υψηλότερα προεγχειρητικά επίπεδα TNF-a και IL-6 στο υδατοειδές υγρό σχετίζονται με επιδείνωση της αναμενόμενης έκβασης της χειρουργικής επέμβασης γλαυκώματος.<sup>257</sup> Επίσης, τα επίπεδα των IL-6, IL-8 και IL-1β στο υδατοειδές υγρό αυξάνονται σημαντικά σε οφθαλμούς με μελάνωμα του χοριοειδούς χιτώνα.<sup>258</sup> Σε ασθενείς με απόφραξη κύριου φλεβικού κλάδου του αμφιβληστροειδούς (BRVO), τα επίπεδα των IL-6, IL-8, VEGF και MCP-1 είναι σημαντικά αυξημένα.<sup>259</sup> Οι κυτοκίνες IFN-γ, IL-6 και MIP-1β είναι οι πιο συνήθεις δείκτες στο υδατοειδές υγρό σε ασθενείς με

οφθαλμική τοξοπλάσμωση και ιογενή ραγοειδίτιδα.<sup>260</sup> Επίσης, η IL-6, η IL-8, ο MCP-1 και ο VEGF συσχετίζονται με την ογκογένεση και συγκεκριμένα με τις διαστάσεις του όγκου.<sup>261</sup> Στο μελάνωμα του χοριοειδούς, τα επίπεδα της IL-6 και της επαγόμενης από την IFN- $\gamma$  πρωτεΐνης 10 (IP-10) στο υαλοειδές αυξάνονται με διήθηση των ρυθμιστικών T-κυττάρων και μόνο η IL-6 συσχετίζεται θετικά με διήθηση των μακροφάγων.<sup>262</sup> Στη διάμεση ραγοειδίτιδα, ειδικά με κυστεοειδές οίδημα της ωχράς κηλίδας (CME) και ενεργό νόσο, η IL-6 και η IL-8 αυξάνονται σημαντικά.<sup>263</sup> Επίσης, αύξηση της IL-6 παρατηρείται και στη ραγοειδίτιδα στα πλαίσια της νόσου του Behcet.<sup>264</sup> Φαίνεται, συνεπώς, ότι στο υαλοειδές σώμα ασθενών με ενεργό διάμεση ή οπίσθια ραγοειδίτιδα αλλά και με χρόνια ανθεκτική ραγοειδίτιδα αφθονεί η IL6. Αυξημένες συγκεντρώσεις IL-6, βρέθηκαν όχι μόνο στον οφθαλμό αλλά και στον ορό ασθενών με οξεία ραγοειδίτιδα (πρόσθια, οπίσθια ή πανραγοειδίτιδα) στο 50% των περιπτώσεων. Οι τιμές της IL-6 υποχώρησαν με την ύφεση της ραγοειδίτιδας, παρέμειναν όμως αυξημένες και μάλιστα σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση απόλυτων επιπέδων IL-6 και σοβαρότητας της νόσου ή χρόνου λήψης του κάθε δείγματος και έναρξης της νόσου.<sup>254, 265, 266</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένα ευρήματα σε ποντικούς με πειραματικά προκλητή αυτοάνοση ραγοειδίτιδα, όπου ανευρέθηκε ότι τα Th17 λεμφοκύτταρα ήταν τα κύρια κύτταρα που εμπλέκονταν στην εξέλιξη της φλεγμονής προς χρονιότητα. Επιπλέον, η χορήγηση αντισώματος κατά του υποδοχέα της IL-6, βελτίωσε τη ραγοειδίτιδα μέσω μείωσης της Th17 διαφοροποίησης. Οι ερευνητές κατέληξαν στην υπόθεση ότι αυξημένες συγκεντρώσεις της IL-6 στην κυκλοφορία προκάλεσαν διαφοροποίηση-αύξηση των Th17 και την κατά συνέπεια συσσώρευση κυττάρων φλεγμονής (μακροφάγων και πολυμορφοκυττάρων) στο ραγοειδή χιτώνα, την τοπική έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών και την επακόλουθη καταστροφή.<sup>266</sup>

Έχει επίσης μελετηθεί ο ρόλος της IL-6 στον αμφιβληστροειδή και το υαλοειδές σώμα. Μια φλεγμονώδης-α-

νοσοποιητική διαδικασία εμπλέκεται στην παθογένεση της παραγωγικής διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.<sup>267</sup> Στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, τα επίπεδα της IL-6 και του VEGF βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα και μπορεί να είναι χρήσιμοι δείκτες για έγκαιρη ανίχνευση και πρόγνωση της νόσου.<sup>268</sup> Μάλιστα, τα επίπεδα της IL-6 στο υατοειδές συσχετίζονται θετικά με τον συνολικό όγκο και πάχος της ωχράς κηλίδας.<sup>269</sup>

Τα επίπεδα των IL-6, IL-8, VEGF και MCP-1 στο υατοειδές και στο υαλοειδές έχουν βρεθεί αυξημένα σε όλους τους ασθενείς με απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς και απόφραξη κλάδου φλέβας του αμφιβληστροειδούς, παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας, κλινικά σημαντικό οίδημα της ωχράς κηλίδας, νεοαγγειακή ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, ρηγματογενή αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς, και παραγωγική υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια.<sup>270-273</sup> Τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι IL 6 και IL-8, αυξάνονται στο υατοειδές υγρό μετά την υαλοειδεκτομή, γεγονός που μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη καταρράκτη και γλαυκώματος.<sup>274,275</sup> Σε ασθενείς με PDR, τα επίπεδα VEGF συσχετίζονται σημαντικά με την αύξηση των IL-6, IL-8 και MCP-1 που συσχετίζεται στενά μεταξύ τους, δείχνοντας ένα κοινό μονοπάτι που εμπλέκεται στη φλεγμονώδη διαδικασία στο ασθένειες του υαλοειδούς. Στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, τα επίπεδα της IL-6 στο υαλοειδές παίζουν σημαντικότερο ρόλο από ό,τι στην απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς.<sup>276</sup> Στην παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, τα επίπεδα των IL 4, IL-6, IL-17A, IL-21, IL-22, και TNF-a στο υαλοειδές είναι υψηλότερα από αυτά στον ορό και υψηλότερα από ό,τι στην επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη ή την οπή της ωχράς κηλίδας.<sup>277</sup> Στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, τα επίπεδα του VEGF σχετίζονται σημαντικά με τη χοριοειδική νεοαγγειακή δραστηριότητα αλλά τα επίπεδα των IL-6 και IL-8 συσχετίζονται σημαντικά με το μέγεθός της.<sup>278</sup> Επίσης, τα επίπεδα της IL-6 αυξάνονται σημαντικά στην ενεργή και ανενεργή αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας, αλλά ο

VEGF έχει τον ισχυρότερο συσχετισμό με την αγγειακή δραστηριότητα.<sup>279</sup>

Σε ασθενείς με ενδοφθαλμίτιδα, τα επίπεδα των IL-1β, IL-6, IL-17 και MIP-3α/α έχουν αυξηθεί τόσο στο υδατοειδές όσο και στο υαλοειδές.<sup>280</sup> Στη νόσο του Behcet με ενεργή φλεγμονή των οπισθίων μορίων, τα επίπεδα στον ορό των IL-6, IL-8, TNF-α, VEGF και MDA, και τα επίπεδα στο υδατοειδές των IL-6, IL-8, VEGF και MCP-1 ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά χωρίς ενεργό ενδοφθαλμιακή φλεγμονή.<sup>281</sup> Στη νόσο του Eales, η έκφραση της IL-6 στον ορό και στο υαλοειδές διεγείρει οξείες φλεγμονώδεις και αγγειογενετικές αντιδράσεις μέσω της διαμόρφωσης των συγκεντρώσεων της CRP και του VEGF.<sup>282</sup> Επίσης, συχνά ένα πρωτοπαθές λέμφωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος μεταμφιέζεται σε ραγοειδίτιδα. Μια αναλογία στο υαλοειδές της IL-10 προς την IL-6 μεγαλύτερη από 1 και η ανίχνευση της βαριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης και των αναδιατάξεων των γονιδίων του υποδοχέα των T-κυττάρων παρέχουν μοριακή διάγνωση λεμφώματος B- και T-κυττάρων, αντίστοιχα, με ευαισθησία και ειδικότητα μεγαλύτερη από 95%.<sup>283</sup>

Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με ενεργό θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια, τα επίπεδα της IL-1β, IL-6 και IL-8 στα δάκρυα είναι σημαντικά αυξημένα και σχετίζονται θετικά με την κλινική βαθμολόγηση της διαταραχής καθώς και το αξονικό και στεφανιαίο μέγεθος του δακρυϊκού αδένου.<sup>284</sup> Αυτοί οι παράγοντες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή του οφθαλμικού κόγχου και στη διαδικασία ίνωσης.<sup>285</sup> Στην οφθαλμοπάθεια Graves, η αναλογία CD4 προς CD8 και η έκκριση των IL-6, IL-10, και TNF-α αυξάνονται σημαντικά.<sup>286</sup> Συντοίς άλλους, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες των δακρύων, συμπεριλαμβανομένης της IL-6, αυξάνονται κατά τη διάρκεια της απόφραξης του ρινοδακρυϊκού πόρου.<sup>287</sup>

Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί ένα ευρύ φάσμα αντι-IL-6 βιολογικών παρασκευασμάτων, όπως η ριτουξιμάμπη και η τοσιλιζουμάμπη, ένας αντι-IL-6 mAb αποκλειστής του υποδοχέα ή αμπατασέπτη και ο CTLA4 αναστολέας πρωτεΐνης σχεδιασμένης να στοχεύει το συν-διεγερτικό σήμα του T κυττάρου που διαμεσολα-

βείται μέσω της οδού CD28-CD80/86. Η IL-6 ως σημαντικός μεσολαβητής έχει πολυάριθμες ανοσολογικές επιδράσεις και επομένως μπορεί να μην είναι επιθυμητή η πλήρης αναστολή των σηματοδοτικών οδών της. Σε αυτή τη σημαντική κλινική απόφαση, εκτός από την πιθανή μη ανταπόκριση ορισμένων ασθενών, υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα και ανεπιθύμητες παρενέργειες που πρέπει να λάβουμε υπόψη για τους εμπλεκόμενους ασθενείς.<sup>200, 288, 289</sup>

Συμπερασματικά, η IL-6 διαδραματίζει διπλό ρόλο στους οφθαλμούς. Από τη μία πλευρά, προστατεύει τους οφθαλμικούς ιστούς από ανεπιθύμητες λοιμώξεις και από την άλλη πλευρά, η IL-6 μπορεί να καταστρέψει και να βλάψει τα ευαίσθητα στοιχεία των οφθαλμών μέσω ανεπιθύμητης νεοαγγείωσης ή επιδείνωσης της φλεγμονής. Η IL-6 παίζει και ρυθμίζει πολλούς σημαντικούς ρόλους στην οφθαλμική φλεγμονή και αγγειογένεση στον επιπεφυκότα, τον κερατοειδή, την ίριδα, τον αμφιβληστροειδή και τον κόγχο. Νέες μέθοδοι θεραπείας, εκτός από την αντι-IL-6 στοχευμένη ανοσοθεραπεία, έχουν παρουσιαστεί τα τελευταία χρόνια. Τέτοιες παρεμβάσεις θα πρέπει να εξετάζονται μόνο σε κρίσιμες περιπτώσεις για να αποφευχθούν οι κίνδυνοι αυτών των θεραπειών.<sup>200</sup>

### 3.2.2 TNF-α

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α) είναι μια σημαντική προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη με πλειοτροπικές λειτουργίες που συντίθεται κυρίως από T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα/μονοκύτταρα και σε μικρότερο βαθμό από ουδετερόφιλα και μαστοκύτταρα<sup>290, 291</sup> κατά τη διάρκεια οξείας φλεγμονής και είναι υπεύθυνη για μια ποικιλία συμβάντων σηματοδότησης εντός των κυττάρων, οδηγώντας σε νέκρωση ή απόπτωση. Η πρωτεΐνη είναι επίσης σημαντική για την αντοχή σε λοίμωξη και καρκίνους.<sup>290, 292-298</sup>

Υπάρχουν δύο μορφές του TNF-α: μια διαλυτή και μια διαμεμβρανική μορφή. Η διαλυτή μορφή του TNF-α ασκεί πολλές από τις επιδράσεις της συνδεόμενης, ως τριμερές, είτε σε έναν υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης ο οποίος ονομάζεται TNFR-1 55 kDa



είτε σε έναν υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζεται TNFR-2 75kDa. Και οι δύο αυτοί υποδοχείς ανήκουν στη λεγόμενη υπεροικογένεια του υποδοχέα TNF. Η υπεροικογένεια περιλαμβάνει τους FAS, CD40, CD27 και RANK. Το καθοριστικό γνώρισμα αυτών των υποδοχέων είναι μια εξωκυτταρική περιοχή που αποτελείται από δύο έως έξι επαναλήψεις μοτίβων πλούσιων σε κυστεΐνη. Επιπροσθέτως, υπάρχει ένας αριθμός δομικά συγγενών «υποδοχέων-δόλωμα» που δρουν για την απομόνωση των μορίων TNF, με αποτέλεσμα τη διάσωση των κυττάρων από απόπτωση. Οι κρυσταλλικές δομές του TNF-α, του TNF-β, του εξωκυτταρικού τμήματος του TNFR-1 (που δηλώνεται sTNFR-1) και του συμπλέγματος TNF-β sTNFR-1 έχουν καθοριστεί με κρυσταλλογραφία.<sup>292</sup>

Η διαμεμβρανική μορφή του TNF-α, ένας πρόδρομος της διαλυτής μορφής του TNF-α, εκφράζεται σε ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων. Μετά την επεξεργασία από το μεταπρωτεϊνικό ένζυμο του TNF-α (TACE), η διαλυτή μορφή του TNF-α διασπάται από τον διαμεμβρανικό TNF-α και ασκεί τις βιολογικές της δραστηριότητες μέσω δέσμευσης στους υποδοχείς TNF τύπου 1 και 2 (TNF-R1 και -R2) σε απομακρυσμένους ιστούς. Η πλειονότητα των μελετών δείχνει ότι τόσο η διαλυτή όσο και η διαμεμβρανική μορφή του TNF-α εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση. Ο διαμεμβρανικός TNF-α δρα ως διπολικό μόριο που μεταδίδει σήματα τόσο ως συνδέτης όσο και ως υποδοχέας σε έναν κύτταρο προς κύτταρο τρόπο επαφής. Ο διαμεμβρανικός TNF-α σε κύτταρα που παράγουν TNF-α δεσμεύεται στους TNF-R1 και -R2 και μεταδίδει σήματα στα κύτταρα-στόχους ως συνδέτης, ενώ δρα επίσης ως υποδοχέας που μεταδίδει από «έξω προς τα μέσα» (ανάστροφα) σήματα πίσω στα κύτταρα μετά τη δέσμευση στους φυσικούς υποδοχείς της.<sup>293</sup>

Η φλεγμονή έχει εμπλακεί ως ένας από τους βασικούς μεσολαβητές του τραυματισμού του αμφιβληστροειδούς στην παθογένεση των περισσότερων οφθαλμικών παθήσεων που απειλούν την όραση, συμπεριλαμβανομένης της ραγοειδίτιδας, της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και του διαβητικού οιδήματος της ωχράς

κηλίδας και της ατροφικής και νεοαγγειακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας.<sup>299</sup> Ο TNF-α λόγω του ρόλου του και της δράσης του, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών κυττάρων, στην αναστολή της ογκογένεσης και στην αναστολή της αντιγραφής του ιού<sup>300-303</sup>, εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών φλεγμονωδών οφθαλμικών παθήσεων, με ιδιαίτερη έμφαση στις προαναφερθείσες.<sup>290</sup>

Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) είναι μια φλεγμονώδης κυτοκίνη που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα.<sup>304,305</sup> Ενώ ο TNF-α μπορεί να συμμετέχει στη φυσιολογική ανάπτυξη και συντήρηση του νευρικού ιστού, είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της έμφυτης ανοσοαπόκρισης στο ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένου του αμφιβληστροειδούς.<sup>304-308</sup> Έχει αποδειχθεί ότι ο TNF-α παίζει σε μεγάλο βαθμό επιβλαβή ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα νευροεκφυλιστικών καταστάσεων του αμφιβληστροειδούς, όπως το γλαύκωμα και η ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς, οι οποίες είναι κύριες αιτίες τύφλωσης ενηλίκων στον κόσμο<sup>307, 308</sup>. Αυτό ήταν ένα εκπληκτικό εύρημα, επειδή ο TNF-α μπορεί όχι μόνο να μεσολαβεί στον κυτταρικό θάνατο και την τοξικότητα, αλλά μπορεί επίσης να προάγει την κυτταρική επιβίωση.<sup>309</sup>

Η απώλεια αμφιβληστροειδικών γαγγλιακών κυττάρων είναι χαρακτηριστική σε πολλές νευροεκφυλιστικές καταστάσεις του αμφιβληστροειδούς συμπεριλαμβανομένου του γλαυκώματος και της αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.<sup>307,308</sup> Σε τέτοιες νευροεκφυλιστικές συνθήκες, τα αστροκύτταρα μπορούν να διευκολύνουν τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων.<sup>310-313</sup> Τα αστροκύτταρα είναι ένας σημαντικός τύπος νευρογλοιακού κυττάρου με τα οποία τα γαγγλιακά κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή. Τα αστροκύτταρα σε φυσιολογικό ιστό υποστηρίζουν τους νευρώνες και διευκολύνουν τη νευρωνική λειτουργία.<sup>314</sup> Ωστόσο, τα αστροκύτταρα έχουν συσχετιστεί κυρίως με νευρωνική απώλεια σε παθολογικές καταστάσεις στο ΚΝΣ.<sup>311, 313, 315</sup> Έχει ήδη αποδειχθεί ότι ο TNF-α που παράγεται και εκκρίνεται από αστροκύτταρα, διευκολύνει τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων.

ρων του αμφιβληστροειδούς σε συν-καλλιέργειές τους. Συνεπώς, οι παθολογικές επιδράσεις του TNF-α που παρατηρούνται στον αμφιβληστροειδή μπορούν να εξηγηθούν εν μέρει με την ενεργοποίηση καταστροφικών σηματοδοτικών οδών στα γαγγλιακά κύτταρα άμεσα και έμμεσα λόγω της νευροτοξικής δραστηριότητας των αστροκυττάρων που προκαλείται από τον TNF-α.<sup>316, 317</sup>

Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι οι υποδοχείς TNF-α εκφράζονται σε αμφότερα τα γαγγλιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα<sup>308, 318</sup>. Αναφέρεται ότι η σύνδεση του TNF-α στον υποδοχέα μπορεί να εκκινήσει τις σηματοδοτικές οδούς στο κύτταρο και των δύο πυρηνικών παραγόντων kappa B (NF-κB) και c-Jun N-terminal κινάση (JNK)<sup>319</sup>. Ενεργοποίηση του NF-κB και παροδική ενεργοποίηση του JNK σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, ενώ η συνεχής ενεργοποίηση του JNK συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο. Είναι σημαντικό ότι έχει αποδειχθεί ότι η μειωμένη δραστηριότητα του NF-κB έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη ενεργοποίηση του JNK και τον κυτταρικό θάνατο<sup>320, 321</sup>. Εν τω μεταξύ, η ενεργοποίηση του NF-κB στα αστροκύτταρα προάγει την παραγωγή νευροτοξικών προφλεγμονωδών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του TNF-α σε αυτά τα κύτταρα, και αυτό μεσολαβεί στο θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων<sup>311, 316</sup>.

H Dvoriantschikova και οι συνεργάτες της, μάλιστα, προτείνουν ένα μοντέλο τοξικότητας του TNF-α στον αμφιβληστροειδή. Ο TNF-α που παράγεται στον αμφιβληστροειδή ως αποτέλεσμα νευροεκφυλιστικών καταστάσεων προωθεί τη συνεχή ενεργοποίηση του JNK στα γαγγλιακά κύτταρα τα οποία, ελλείψει της δραστηριότητας του NF-κB, μεσολαβεί στο θάνατο του γαγγλιακού κυττάρου, κυρίως με νέκρωση. Ενώ η ενεργοποίηση του NF-κB στα αστροκύτταρα προάγει την επιβίωση αυτών των κυττάρων, αυτό ξεκινά μια τοξική προφλεγμονώδη απόκριση στον αμφιβληστροειδή. Αυτή η απόκριση δημιουργεί ακόμη χειρότερες συνθήκες στον αμφιβληστροειδή και αυξάνεται ο θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων. Επιπλέον, οι ενδογενείς παράγοντες που απελευθερώνονται από τα νεκρω-

τικά γαγγλιακά κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν από τα αστροκύτταρα ως σήματα για «κίνδυνο» (έτσι ονομάζονται μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβες ή DAMPs). Μετά την ενεργοποίηση των DAMPs, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων όπως υποδοχείς τύπου toll (π.χ. TLR4) ενεργοποιούν τους καταρράκτες σηματοδότησης, οι οποίοι προκαλούν φλεγμονή και βλάβη.<sup>317, 322-325</sup> Με άλλα λόγια, εάν το κύτταρο πεθάνει από νέκρωση, αυτό το συμβάν οδηγεί στην προφλεγμονώδη τοξικότητα που διεγείρει το θάνατο των περιβαλλόντων κυττάρων που έχουν επιβιώσει από το αρχικό stress. Ως εκ τούτου, η TNF-μεσολαβούμενη νέκρωση του γαγγλιακού κυττάρου μπορεί να αυξήσει την απόκριση των νευροτοξικών αστροκυττάρων, προωθώντας έτσι έμμεσα το θάνατο του γαγγλιακού κυττάρου. Αυτό το μοντέλο μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες αντιφάσεις. Συγκεκριμένα, αυτό το μοντέλο μπορεί να εξηγήσει το λόγο που η αναστολή του αστρογλοϊκού NF-κB προστατεύει από βλάβες και νευρωνικές απώλειες σε πειραματικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών ασθενειών του αμφιβληστροειδούς.<sup>311, 313, 317, 326</sup>

Συμπερασματικά, τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι οι επιδράσεις του TNF καθώς και των καταρράκτων σηματοδότησης NF-κB και JNK που ενεργοποιούνται από τον TNF στον αμφιβληστροειδή είναι ειδικές για τα κύτταρα και, ως εκ τούτου, περισσότερο περίπλοκες από ό, τι πιστευόταν στο παρελθόν. Παρουσία του TNF, οι καταρράκτες σηματοδότησης NF-κB και JNK ενεργοποιούνται με αντίθετους τρόπους στα γαγγλιακά κύτταρα και στα αστροκύτταρα, γεγονός που συμβάλλει στο θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων. Έτσι, ο σχεδιασμός αποτελεσματικής θεραπείας για ασθενείς που πάσχουν από νευροεκφυλιστικές ασθένειες του αμφιβληστροειδούς θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τις ειδικές για το κύτταρο ευεργετικές και επιζήμιες επιδράσεις της σηματοδότησης του TNF-α.<sup>317</sup>

Επίσης, σύμφωνα με τον Chen και τους συνεργάτες του, που μέτρησαν με τη μέθοδο ELISA τις συγκεντρώσεις των IL-1β και TNF-α στο υποαμφιβληστροειδικό υγρό από 49 ασθενείς με ρηγματογενή αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς με παραγωγική υαλοειδοαμφιβλη-

στροειδοπάθεια, ανευρέθηκε ότι όλα τα υγρά περιείχαν IL-1β, οι συγκεντρώσεις τους είχαν θετική συσχέτιση με τη σοβαρότητα της νόσου ( $r = 0,667$ ) ενώ καμία συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο, τις οπές, τα εύρη και τους χρόνους αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς δεν βρέθηκε. Ο TNF-a ανιχνεύθηκε σε 18 από τους 49 ασθενείς με αποτέλεσμα να προτείνεται ότι η IL-1β και ο TNF-a εμπλέκονται στην παθογένεση της παραγωγικής υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθειας.<sup>327</sup>

Μια ποικιλία αντιφλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών παραγόντων έχουν ελεγχθεί ως πιθανές μονοθεραπείες ή συνδυαστικές θεραπείες στην αντιμετώπιση της ενδοφθάλμιας φλεγμονής, της υπερδιαπερατότητας και της νεοαγγειογένεσης. Παραδοσιακά, τα κορτικοστεροειδή αποτελούν την τυπική προσέγγιση αυτής της αναστολής της φλεγμονώδους οδού. Ωστόσο, τα συστηματικά και οφθαλμικά προφίλ ασφάλειας περιορίζουν τη χρήση τους.<sup>328</sup> Κατά συνέπεια, ο ρόλος και η δράση του TNF-a οδήγησε στην ενδοϋαλοειδική έγχυση αναστολέων του, κυρίως των ετανερσέπτη, ινφλιξιμάμπη και αδαλιμουμάμπη, για την αντιμετώπιση ποικίλων οφθαλμικών παθήσεων, δίνοντας ακόμη μεγαλύτερη έμφαση στο ρόλο του στον οφθαλμό.<sup>290</sup>

## HISTOLOGICAL STUDY OF THE EFFECTS OF INTRAHYLOIDAL ADMINISTRATION OF ANTIMICROIDS IN AMPHIBLISTROIDS: AN EXPERIMENTAL STUDY

S. Karachrysafi<sup>1</sup>, A. Sioga<sup>1</sup>, A. Komnenou<sup>2</sup>, A. Karamitsos<sup>3</sup>, M. Chioteli<sup>4</sup>, I. Dori<sup>4</sup>, G. Delis<sup>5</sup>, E. Kofidou<sup>2</sup>, P. Anastasiadou<sup>6</sup>, S. Sotiriou<sup>7</sup>, V. Karampatakis<sup>8</sup>, T. Papamitsou<sup>1</sup>

1. Laboratory of Histology-Embryology, School of Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki
2. School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki
3. 2nd University Eye Clinic, Papageorgiou Hospital, Aristotle University of Thessaloniki
4. Laboratory of Anatomy, Histology and Embryology, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki
5. Laboratory of Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki
6. Department of Oral Medicine/Pathology, School of Dentistry, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki
7. Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA
8. Laboratory of Experimental Ophthalmology, School of Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki

## ABSTRACT

Endophthalmitis is one of the most devastating diseases in ophthalmology, often leading to partial or complete loss of vision in a short period of time, regardless of the infectious agent, which requires immediate and effective treatment. Although fungal endophthalmitis is rare in the spectrum of all intraocular infections, it remains a major clinical problem in ophthalmology due to its

potentially devastating consequences. In addition, fungal ocular infections have traditionally been very difficult to treat due to the limited treatment options available both systemically and intravitreally. In the past, Amphotericin B (AMB) was the only antifungal agent approved for intravitreal administration. However, amphotericin B has been reduced due to significant nephrotoxicity and relatively low intraocular penetration, retinal necrosis caused at low concentrations as well as the development of resistance to its action by many fungal species, necessitating the use of other antifungals with fewer side effects and probably more effective in treating fungal endophthalmitis. In fact, in recent years, there have been significant steps in the development of antifungal agents. Newer antifungal drugs have broad-spectrum antifungal activity, good bioavailability through various routes of administration, and ocular penetration. The newest representatives of these drugs studied in the present study are Voriconazole, from the class of Azoles and Micafungin, from the class of Echinocandins. A protocol was implemented using albino New Zealand rabbits. Both eyes of each animal were used. The right eyes of the animals were the study group, while the left eyes of the animals were the control group for the infusion of each drug respectively. All drugs were administered by intravitreal injection. Voriconazole solution was administered at a dose of 40 µg / 0.1ml to achieve an intravitreal concentration of 25µg / ml, while micafungin solution was administered at a dose of 25µg / 0.1ml, i.e. the highest safe dose according to the literature. More specifically, subgroups C1 and C2 were the control groups in which one and two injections of 0.1ml BSS solution were injected, respectively. Subgroups V1 and V2 were the study groups for single and double injection of voriconazole respectively. Subgroups M1 and M2 were the study groups for single and double injection of micafungin respectively. While the VM group was the study group for the combined injection of voriconazole and micafungin. The first injection was performed on day 0, the second injection on day 4 and the scheduled euthanasia of the animals was performed 10 days after the end of the intravitreal injections. An ophthalmological examination was also performed prior to the euthanasia. This was followed by the removal of the

eyes and taking samples from the retinas, in order to undergo the appropriate preparation for observation under the optical microscope and the application of immunohistochemical stainings, as well as under the electron microscope. Regarding the results of the observation of the samples, voriconazole in both single and double injection protocol does not cause microscopic lesions but ultrastructural lesions. In fact, with one injection, lesions are found in the nerve fiber layer, in the ganglion cell layer and in the outer nuclear layer, while with two injections, more severe lesions are found in the aforementioned layers as well as additionally in the inner nuclear layer and in the layer of rods and cones. Micafungin in a single injection protocol does not cause microscopic lesions, while the two injections protocol causes lesions in the ganglion cell layer. However, ultrastructural lesions in almost all retinal layers are found in all specimens with both single and double micafungin injections, and in fact with the double injection's lesions being more extensive and pronounced than the ones of the single injection. Co-administration of voriconazole and micafungin caused both microscopic and ultrastructural lesions in almost all layers, especially in the ganglion cell layer and the layer of rods and cones. Regarding the immunohistochemical staining for marker TNF-a, it was negative in all subgroups except the eyes with the combined infusion of voriconazole and micafungin in which it was detected as mildly positive in the presence of apoptotic cells in the ganglion cell layer in 2 of the 3 eyes of the subgroup. Regarding the staining for marker IL-6, it was negative in all subgroups except the eyes with a single injection of voriconazole in which it was detected as mildly positive in all samples. In conclusion, voriconazole appears to be more toxic in a multi-dose protocol. The immunohistochemical marker TNF-a does not seem to play a pathogenetic role in the lesions caused by voriconazole in the retina. On the contrary, the conclusions regarding the role of IL-6-mediated inflammation in causing retinal lesions by voriconazole are contradictory. As for micafungin, it is toxic to the retina and based on the extent and intensity of its caused lesions it seems to be more toxic than voriconazole. However, the TNF-a and IL-6 immunohistochemical markers do not appear to play a pathogenetic role in micafungin-induced



retinal lesions. Finally, toxic effect on the retina caused by the combination of the two antifungal agents was found with TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis appearing to belong to the mechanisms of retinal damage caused by the combined administration of voriconazole and micafungin. In contrast, IL-6-mediated inflammation does not appear to contribute to retinal lesions caused by the combined administration of the two agents.

*Key words:* voriconazole, micafungin, intravitreal, histology.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kernt M, Neubauer AS, De Kaspar HM, Kampik A. Intravitreal voriconazole: in vitro safety-profile for fungal endophthalmitis. *Retina* 2009; 29(3):362-370.
2. Patil A, Majumdar, S. Echinocandins in Ocular Therapeutics. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2017.
3. Kim EL, Patel SR, George MS, Ameri H. Ochroconis gallopava endophthalmitis successfully treated with intravitreal voriconazole and amphotericin B. *Retinal Cases and Brief Reports* 2017.
4. Heralgi MM, Badami A, Vokuda H, Venkatachalam K. An Update on Voriconazole in Ophthalmology. *The Official Scientific Journal of Delhi Ophthalmological Society* 2016; 27(1):9-15.
5. Müller GG, Kara-José N, Castro RSD. Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. *Revista Brasileira de Oftalmologia* 2013; 72(2):132-141.
6. Shen YC, Wang MY, Wang CY, Tsai TC, Tsai HY, Lee YF, Wei LC. Clearance of intravitreal voriconazole. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(5):2238-2241.
7. Gao H, Pennesi M E, Shah K, Qiao X, Hariprasad SM, Mieler WF, Holz ER. Intravitreal voriconazole: an electroretinographic and histopathologic study. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(11):1687-1692.
8. Kernt M, Kampik A. Intracameral voriconazole: in vitro safety for human ocular cells. *Toxicology* 2009; 258(2):84-93.
9. Harrison JM, Glickman RD, Ballentine CS, Trigo Y, Pena MA, Kurian P, Graybill JR. Retinal function assessed by ERG before and after induction of ocular aspergillosis and treatment by the anti-fungal, micafungin, in rabbits. *Documenta ophthalmologica*, 2005; 110(1):37-55.
10. Hua G, Pennesi M, Shah K, Qiao X, Hariprasad SM, Mieler WF, Holz ER. Safety of intravitreal voriconazole: electroretinographic and histopathologic studies. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 2003; 101:183.
11. Paris GR, Trujillo F, Woodward L, Trigo Y, Ballentine CS, Najvar LK, Sponsel WE. Micafungin vs Amphotericin B in the Treatment of Experimental Aspergillosis Endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004; 45(13):4014-4014.
12. Karagoz E, Ugan RA, Duzgun E, Cadirci E, Keles S, Uyanik MH, Turhan V. A Comparative Study of the Effects of Intravitreal Anidulafungin, Voriconazole, and Amphotericin B in an Experimental Candida Endophthalmitis Model. *Current Eye Research* 2017; 42(2):225-232.
13. Kapur R, Kim B, Tu EY, Birnbaum A, Fiscella R, Navare S, Lim JI. The Safe and Non-Toxic Dose of Intravitreal Micafungin and Caspofungin in a Rabbit Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(13):3324-3324.
14. Snell SR, Lemp AM. Κλινική Ανατομία του Οφθαλμού. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2η Έκδοση 2006; 6:189-201.
15. Snell SR, Lemp AM. Κλινική Ανατομία του Οφθαλμού. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2η Έκδοση 2006; 1:2-14.
16. Moore LK, Persaud TVN. Η Ανθρώπινη Διάπλωση: Εμβρυολογία Κλινικού Προσανατολισμού. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 1η Ελληνική Έκδοση 2009; 18:478-484.
17. Ovalle KW, Nahirney CP. *Netter's Essential Histology*. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης 2008; 19:429-448.
18. Spalton JD, Hichings AR, Hunter AP. Κλινική Οφθαλμολογία. Δεύτερη έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 1992; 13:13.2-13.9.
19. Ramanjit S, Radhika T. (2005). *Parsons' Diseases of the Eye*. 22nd Edition. Elsevier 2005; 1:3-15, 2:16-20, 3:21-27.

20. Beauchamp GR, Knapper PA. Role of the neural crest in anterior segment development and disease. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1984; 21:209-214.
21. Duke-Elder S, Cook C. (1963). Normal and abnormal development. Embryology. In: Duke-Elder S (Ed.). *System of Ophthalmology*. Vol. III. London: CV Mosby, 1963; 23-24.
22. Gray H. *Gray's Anatomy*, 38th ed. Edinburgh: Churchill Living stone 1989.
23. Noden DM. Periocular mesenchyme. Neural crest and mesodermal interactions. In: Jakobiec FA (Ed.). *Ocular Anatomy, Embryology and Teratology*. Philadelphia: Harper & Row 1982; 97-119.
24. Ozaincs V, Jakobiec F. Prenatal development of the eye and its adnexa. In: Jakobiec FA (Ed.). *Ocular Anatomy, Embryology and Teratology*. Philadelphia: Harper & Row 1982; 11-96.
25. Wolff E. *Anatomy of the Eye and Orbit*, 7th ed. London: HK Lewis 1976.
26. Brad Bowling. *Kanski's Clinical Ophthalmology: A systematic Approach*. Elsevier. 8th Edition. Chapters 13,14,16,19.
27. *Retina and Vitreous*. Basic and Clinical Science Course. American Academy of Ophthalmology 2011-2012, Section 12.
28. Yanoff M, Duker SJ. *Ophthalmology*. 5th Edition. Elsevier 2019; 6:419-430.
29. Junqueira LC, Carneiro J. *Βασική Ιστολογία II*. 5η Ελληνική Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2004; 24:613-633.
30. Anthony L.Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th Edition. McGraw-Hill Education 2016; 23:490-508.
31. Στάγκος NT & συνεργάτες. *Κλινική Οφθαλμολογία*. UNIVERSITY STUDIO PRESS, 2002.
32. Applebury ML, Hargrave PA. Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res* 1986; 26:1881.
33. Becker RS. The visual process: Photophysics and photo-isomerization of model visual pigments and the primary reaction. *Photoch Photobiol* 1988; 48:369.
34. Armington JC. *The electroretinogram*. Academic Press 1974.
35. Mariani AP. Biplexiform cells: ganglion cells of the primate retina that contact photoreceptors. *Science* 1982; 216:1134.
36. Guyton CA, Hall EJ. *Ιατρική Φυσιολογία*. 11η Έκδοση. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 2008; 50-51:712-740.
37. Toyoda JL, Hashimoto H, Ohtsu K. Bipolar-amacrine transmission in the carp retina. *Vision Res* 1973; 13:295.
38. Μόσχος MN. *Νευρο-Οφθαλμολογία* 1998; 2:25-32.
39. MacDonald WI. The conduction in the optic nerve. *Trans Ophthalm Soc* 1976; 96:352.
40. Leber TH. Keratomycosis aspergillina als ursache von hypopyonkeratites. *Graefes Ach Clin Exp Ophthalmol* 1879; 25:285-301.
41. Thomas, P. Fungal infections of the cornea. *Eye* 2003; 17:852-862.
42. Collier S, Gronostaj M, MacGurn A, Cope J, Yoder J, Beach M. Estimated Burden of Keratitis—United States. *MMWR* 2010; 63:1027-1030, 2014.
43. Huang S, Dugel P, Williams G, et al. Notes from the field: Multistate outbreak of postprocedural fungal endophthalmitis associated with a single compounding pharmacy—United States. *MMWR* 2012; 61:310-311.
44. Jeng B, Gritz D, Kumar A, et al. Epidemiology of ulcerative keratitis in Northern California. *Arch Ophthalmol* 2010; 128:1022-1028.
45. CDC. *Fusarium keratitis-multiple states*, 2006; 55:400-401.
46. Thomas P, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:210-220.
47. Keay L, Gower E, Iovieno A, et al. Clinical and microbiological characteristics of fungal keratitis in the United States, 2001–2007: a multicenter study. *Ophthalmol* 2011; 118:920-926.
48. Lingappan A, Wykoff CC, Albin TA, et al. Endogenous fungal endophthalmitis: causative organisms, management strategies, and visual acuity outcomes. *Am J Ophthalmol* 2012; 153:162-166.e1.
49. Weishaar PD, Flynn HW Jr, Murray TG, et al. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis. Clinical features and treatment outcomes. *Ophthalmology* 1998; 05:57-65.

50. Chee YE, Elliott D. The role of vitrectomy in the management of fungal endophthalmitis. *Semin Ophthalmol* 2017; 32(1):29-35.
51. Sallam A, Taylor SR, Khan A, et al. Factors determining visual outcome in endogenous *Candida*. *Retina*. 2012; 32:1129-1134.
52. Bennett J. Agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos. In: Brunton L, editor. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill 2007; 1103-1117.
53. Reddy PR, Reddy PS, Reddy AR, Saboo NK. A comparative evaluation of Nystatin, Amphotericin-B and Miconazole in keratomycosis. *Indian J Ophthalmol* 1982; 30(4):249-250.
54. Oliveira PR, Resende SM, Oliveira FC, Oliveira AC. Ceratite fúngica. *Arq Bras Oftalmol* 2001; 64(1):75-79.
55. Gray K, Palacios D, Dailey I, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:2234-2239.
56. Ito J, Hooshmand-Rad R. Treatment of *Candida* Infections with Amphotericin B Lipid Complex. *Clin Infect Dis* 2005; 40:384-391.
57. Segal B, Walsh T. Amphotericin B Is Still the Drug of Choice for Invasive Aspergillosis. *Am J Respir Critic Care Med* 2006; 174.
58. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela J. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:805-809.
59. Carrasco M, Genesoni G. Treatment of severe fungal keratitis with subconjunctival amphotericin B. *Cornea* 2010; 30:608-611.
60. Mahdy R, Nada W, Wageh M. Topical amphotericin B and subconjunctival injection of fluconazole (combination therapy) versus topical amphotericin B (monotherapy) in treatment of keratomycosis. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26:281-285.
61. Shao Y, Yu Y, Pei C, et al. Therapeutic efficacy of intracameral amphotericin B injection for 60 patients with keratomycosis. *Int J Ophthalmol* 2010, 3:257-260.
62. Yoon K, Jeong I, Im S, Chae H, Yang S. Therapeutic effect of intracameral amphotericin B injection in the treatment of fungal keratitis. *Cornea* 2007; 26:814-818.
63. Garcia-Valenzuela E, Song C. Intracorneal injection of amphotericin B for recurrent fungal keratitis and endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 2005; 123:1721-1723.
64. Baldinger J, Doft B, Burns S, Johnson B. Retinal toxicity of amphotericin B in vitrectomised versus nonvitrectomised eyes. *Br J Ophthalmol* 1986; 70:657-661.
65. Kaji Y, Yamamoto E, Hiraoka T, Oshika T. Toxicities and pharmacokinetics of subconjunctival injection of liposomal amphotericin B. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 247:549-553.
66. Qu L, Li L, Xie H. Toxicity and pharmacokinetics of intrastromal injection of amphotericin B in a rabbit model. *Curr Eye Res* 2013; 39:340-347.
67. Axelrod A, Peyman G, Apple D. Toxicity of Intravitreal Injection of Amphotericin B. *Am J Ophthalmol* 1973; 76:578-583.
68. Cannon J, Fiscella R, Pattharachayakul S, et al. Comparative Toxicity and Concentrations of Intravitreal Amphotericin B Formulations in a Rabbit Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2112-2117.
69. O'Day D, Head W, Robinson R, Clanton J. Corneal penetration of topical amphotericin B and natamycin. *Curr Eye Res* 1986; 5:877-882.
70. Gaudana R, Ananthula H, Parenky A, Mitra A. Ocular Drug Delivery. *AAPS J* 2010; 348-360.
71. Goldblum D, Rohrer K, Frueh B, Theurillat R, Thormann W, Zimmerli S. Ocular Distribution of Intravenously Administered Lipid Formulations of Amphotericin B in a Rabbit Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3719-3723.
72. Natacyn Product Insert. 2017. [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/050514s009lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050514s009lbl.pdf)
73. te Welscher Y, ten Napel H, Balague M, et al. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *J Biol Chem* 2008; 283:6393-6401.
74. Müller G, Kara-Jose N, de Castro R. Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. *Rev Bras Oftalmol* 2013; 72:132-141.

75. Qiu S, Zhao G, Lin J, et al. Natamycin in the treatment of fungal keratitis: a systematic review and Meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 2015; 597-602.
76. Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(2):171-179.
77. O'Day DM, Head WS, Robinson RD, Stern WH, Freeman JM. Intraocular penetration of systemically administered antifungal agents. *Curr Eye Res* 1985; 4(2):131-134.
78. Oliveira PR, Resende SM, Oliveira FC, Oliveira AC. Ceratite fúngica. *Arq Bras Oftalmol* 2001; 64(1):75-79.
79. Marangon FB, Miller D, Giaconi JA, Alfonso EC. In vitro investigation of voriconazole susceptibility for keratitis and endophthalmitis fungal pathogens. *Am J Ophthalmol* 2004; 137(5):820-825.
80. Mabon M. Fungal keratitis. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38(4):115-123.
81. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol* 2006; 32(5):449-460.
82. Amaral VCS, Nunes Junior GP. Ketoconazole- and fluconazole-induced embryotoxicity and skeletal anomalies in wistar rats: a comparative study. *Braz Arch Biol Technol* 2008; 51(6):1153-1161.
83. Schulz J, Kluwe F, Mikus G, Michelet R, Kloft C. Novel insights into the complex pharmacokinetics of voriconazole: a review of its metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 2009. DOI: 10.1080/03602532.2019.1632888
84. Pfizer. 2018. VFEND Summary of product characteristics.
85. Tucker L, Higgins T, Egelund EF, et al. Voriconazole monitoring in children with invasive fungal infections. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2015; 20(1):17-23.
86. Damle B, Varma MV, Wood N. Pharmacokinetics of voriconazole administered concomitantly with fluconazole and population-based simulation for sequential use. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 55(11):5172-5177.
87. European Medicines Agency. European public assessment reports 2012; 1-154.
88. Hariprasad SM, Mieler WF, Lin TK, Sponsel WE, Graybill JR. Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(7):871-878.
89. Perraut LE Jr, Perraut LE, Bleiman B, Lyons J. Successful treatment of *Candida albicans* endophthalmitis with intravitreal amphotericin B. *Arch Ophthalmol* 1981; 99(9):1565-1567.
90. Freda R. Use of oral voriconazole as adjunctive treatment of severe cornea fungal infection: case report. *Arq Bras Oftalmol* 2006; 69(3):431-434.
91. Han K, Capitano B, Bies R, et al. Bioavailability and Population Pharmacokinetics of Voriconazole in Lung Transplant Recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(10):4424-4431.
92. Veringa A, Geling S, Span LFR, et al. Bioavailability of voriconazole in hospitalised patients. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49(2):243-246.
93. Lin X, Li Z, Yan M, et al. Population pharmacokinetics of voriconazole and CYP2C19 polymorphisms for optimizing dosing regimens in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2018; 84(7):1587-1597.
94. Scholz I, Oberwittler H, Riedel KD, et al. Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68(6):906-915.
95. Karlsson MO, Lutsar I, Milligan PA. Population pharmacokinetic analysis of voriconazole plasma concentration data from pediatric studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(3):935-944.
96. Lutsar I, Roffey S, Troke P. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37(5):728-732.
97. Roffey SJ, Cole S, Comby P, et al. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(6):731-741.
98. Kirbs C, Kluwe F, Drescher F, et al. High voriconazole target-site exposure after approved sequence dosing due to nonlinear pharmacokinetics assessed by long-term microdialysis. *Eur J Pharm Sci* 2019; 131:218-229.
99. Vanstraelen K, Wauters J, de Loor H, et al. Protein-binding characteristics of voriconazole determined by



- high-throughput equilibrium dialysis. *J Pharm Sci* 2014; 103(8):2565-2570.
100. Werk AN, Cascorbi I. Functional Gene Variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 2014; 96(3):340-348.
101. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med* 2016; 1-9.
102. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20(4):1.
103. Moriyama B, Obeng AO, Barbarino J, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP2C19 and Voriconazole Therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2017; 102(1):45-51.
104. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of Voriconazole. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(7):649-663.
105. Klont R, Eggink C, Rijs A, Wesseling P, Verweij P. Successful Treatment of Fusarium Keratitis with Cornea Transplantation and Topical and Systemic Voriconazole. *Clin Infect Dis* 2005; 40:110-112.
106. Varma D, Thaker H, Moss P, Wedgwood K, Innes J. Use of voriconazole in Candida retinitis. *Eye* 2004; 19:485-487.
107. Al-Badriyeh D, Neoh C, Stewart K, Kong D. Clinical utility of voriconazole eye drops in ophthalmic fungal keratitis. *Clin Ophthalmol* 2010; 4:391-405.
108. Hariprasad SM, Mieler WF. Antibiotics. *Dev Ophthalmol* 2016; 55:344-356. doi: 10.1159/000438961.
109. Ghannoum MA, Kuhn DM. Voriconazole – better chances for patients with invasive mycoses. *Eur J Med Res* 2002; 7:242-256.
110. Sabo JA, Abdel-Rahman SM. Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann Pharmacother* 2000; 34:1032-1043.
111. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B. Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347(6):40815.
112. Al-Badriyeh D, Neoh CF, Stewart K, Kong DC. Clinical utility of voriconazole eye drops in ophthalmic fungal keratitis. *Clin Ophthalmol* 2010; 4:391-405.
113. Dupuis A, Tournier N, Le Moal G, Venisse N. Preparation and stability of voriconazole eye drop solution. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(2):798-799.
114. Haddad R, El-Mollayess G. Combination of Intracameral and Intrastromal Voriconazole in the Treatment of Recalcitrant Acremonium Fungal Keratitis. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2012; 19:265-268.
115. Kalaiselvi G, Narayana S, Krishnan T, Sengupta S. Intrastromal voriconazole for deep recalcitrant fungal keratitis: a case series. *Br J Ophthalmol* 2014; 99:195-198.
116. Lekhanont K, Nonpassopon M, Nimvorapun N, Santanirand P. Treatment With Intrastromal and Intracameral Voriconazole in 2 Eyes With Lasiodiplodia theobromae Keratitis: case reports. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94.
117. Sharma N, Agarwal P, Sinha R, Titiyal J, Velpandian T, Vajpayee R. Evaluation of intrastromal voriconazole injection in recalcitrant deep fungal keratitis: case series. *Br J Ophthalmol* 2011; 95:1735-1737.
118. Lee S, Lee J, Kim S. Topical and Oral Voriconazole in the Treatment of Fungal Keratitis. *Korean J Ophthalmol* 2009; 23:46-48.
119. Kramer M, Kramer M, Blau H, Bishara J, AxerSiegel R, Weinberger D. Intravitreal voriconazole for the treatment of endogenous Aspergillus endophthalmitis. *Ophthalmol* 2006; 113:1184-1186.
120. Vila Arteaga J, Suriano M, Stirbu O. Intravitreal voriconazole for the treatment of Aspergillus chorioretinitis. *Int Ophthalmol* 2011; 31:341-344.
121. Hariprasad S, Mieler W, Holz E, et al. Determination of vitreous, aqueous, and plasma concentration of orally administered voriconazole in humans. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:42-47.
122. Morris MI, Villmann M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63(18):1693-1703.
123. Morris MI, Villmann M. Echinocandins in the

management of invasive fungal infections, Part 2. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63(19):1813-1820. Review.

124. Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, López-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(11):3591-3596.

125. Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M, Prajna NV, Acharya NR, Fothergill AW, et al. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(6):789-793.

126. Wagner C, Graninger W, Presterl E, Joukhadar C. The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Pharmacology* 2006; 78(4):161-177.

127. Grossman N, Chiller T, Lockhart S. Epidemiology of Echinocandin Resistance in *Candida*. *Curr Fungal Infect Rep* 2016; 8:243-248.

128. Mayr A, Lass-Flörl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease - review of the literature. *Eur J Med Res* 2011; 16.

129. Goldblum D, Frueh BE, Sarra GM, Katsoulis K, Zimmerli S. Topical caspofungin for treatment of keratitis caused by *Candida albicans* in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4):1359-1363.

130. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Fujishima H, Tsubota K. Successful topical application of a new antifungal agent, micafungin, in the treatment of refractory fungal corneal ulcers: report of three cases and literature review. *Cornea* 2005; 24(6):748-753.

131. Matsumoto Y, Murat D, Kojima T, Shimazaki J, Tsubota K. The comparison of solitary topical micafungin or fluconazole application in the treatment of *Candida* fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 2011; 95(10):1406-1409.

132. Livermore J, Felton T, Abbott J, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anidulafungin for Experimental *Candida* Endophthalmitis: insights into the Utility of Echinocandins for Treatment of a Potentially Sight-Threatening Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:281-288.

133. European Medicines Agency. 2008. Assessment

report for mycamine. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/000734/WC500031079.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000734/WC500031079.pdf).

134. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 279(2):198-204.

135. Chiou CC, Mavrogiorgos N, Tillem E, Hector R, Walsh TJ. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(12):3310-3321.

136. Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 2011; 71(1):11-41.

137. European Medicines Agency. 2012. Summary of product characteristics: mycamine. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000734/WC500031075.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000734/WC500031075.pdf).

138. Ascher S, Smith PB, Benjamin DK Jr. Safety of micafungin in infants: insights into optimal dosing. *Expert Opin Drug Saf* 2011; 10(2):281-286.

139. Calandra T, Roberts JA, Antonelli M, Bassetti M, Vincent JL. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. *Crit Care* 2016; 20(1):125.

140. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2016; 374(8):794-795.

141. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis* 2012; 54(8):1110-1122.

142. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 62(4):e1-50.

143. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli

- C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(7):53-67.
144. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2010; 18(7):19-37.
145. European Medicines Agency. 2012. Summary of product characteristics: ecalta. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000788/WC500020673.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000788/WC500020673.pdf).
146. Food and Drug Administration. 2004. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s): mycamine. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2005/21-506\\_Mycamine\\_biopharmr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/21-506_Mycamine_biopharmr.pdf).
147. Food and Drug Administration. 2012. Clinical pharmacology review—pediatric sNDA: mycamine. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/ucm363606.pdf>.
148. Tabata K, Katashima M, Kawamura A, Kagayama A, Kohno S. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of micafungin in Japanese patients with deep-seated mycosis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 31(2):123-128.
149. Hiemenz J, Cagnoni P, Simpson D, Devine S, Chao N, Keirns J, et al. Pharmacokinetic and maximum tolerated dose study of micafungin in combination with fluconazole versus fluconazole alone for prophylaxis of fungal infections in adult patients undergoing a bone marrow or peripheral stem cell transplant. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4):1331-1336.
150. Hebert MF, Townsend RW, Austin S, Balan G, Blough DK, Buell D, et al. Concomitant cyclosporine and micafungin pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2005; 45(8):954-960.
151. Hebert MF, Blough DK, Townsend RW, Allison M, Buell D, Keirns J, et al. Concomitant tacrolimus and micafungin pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2005; 45(9):1018-1024.
152. Hebert MF, Smith HE, Marbury TC, Swan SK, Smith WB, Townsend RW, et al. Pharmacokinetics of micafungin in healthy volunteers, volunteers with moderate liver disease, and volunteers with renal dysfunction. *J Clin Pharmacol* 2005; 45(10):1145-1152.
153. Keirns J, Sawamoto T, Holum M, Buell D, Wisemandle W, Alak A. Steady-state pharmacokinetics of micafungin and voriconazole after separate and concomitant dosing in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(2):787-790.
154. Krishna G, Vickery D, Ma L, Yu X, Noren C, Power E, et al. Lack of pharmacokinetic drug interaction between oral posaconazole and caspofungin or micafungin. *J Clin Pharmacol* 2011; 51(1):84-92.
155. Undre N, Pretorius B, Stevenson P. Pharmacokinetics of micafungin in subjects with severe hepatic dysfunction. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2015; 40(3):285-293.
156. Undre N, Stevenson P, Kuse ER, Demeyer I. Pharmacokinetics of Micafungin in Adult patients with Invasive Candidiasis and Candidemia. *Open J Med Microbiol* 2012; 2(3):84-90.
157. Undre N, Stevenson P, Baraldi E. Pharmacokinetics of micafungin in HIV positive patients with confirmed esophageal candidiasis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 37(1):31-38
158. Wasmann ER, Muilwijk WE, Burger MD, Verweij EP, Knibbe AC, Brüggemann JR. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Micafungin. *Clin Pharmacokinet* 2018; 57:267-286. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0578-5>.
159. Kane LE, Muzevich KM. Micafungin in the treatment of candiduria: A case series. *Med Mycol Case Rep* 2016; 11:5-8.
160. Lagrotteria D, Rotstein C, Lee CH. Treatment of candiduria with micafungin: A case series. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007; 18(2):149-150.
161. Lat A, Thompson GR 3rd, Rinaldi MG, Dorsey SA, Pennick G, Lewis JS 2nd. Micafungin concentrations from brain tissue and pancreatic pseudocyst fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(2):943-944.
162. Maruyama T, Takei Y, Gabazza EC, Morser J,

Taguchi O. Different bile concentration of micafungin and itraconazole in a patient with candidal cholecystitis. *J Infect* 2009; 58(4):315-316.

163. Matsuda T, Koreeda Y, Mataka H, Taira T, Noma S, Higashimoto I. A case of *Aspergillus empyema* successfully treated with combination therapy of voriconazole and micafungin: excellent penetration of voriconazole and micafungin into pleural fluid. *Intern Med* 2010; 49(12):1163-1169.

164. Mochizuki K, Murase H, Yasuda Y, Suematsu H, Yamagishi Y, Mikamo H. Discrepancy of in-vitro data and clinical efficacy of micafungin against *Candida tropicalis* endophthalmitis. *J Infect Chemother* 2012; 18(5):786-789.

165. Mochizuki K, Sawada A, Suemori S, Kawakami H, Niwa Y, Kondo Y, et al. Intraocular penetration of intravenous micafungin in inflamed human eyes. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(8):4027-4030.

166. Mochizuki K, Suemori S, Udo K, Komori S, Ohkusu K, Yamada N, et al. Intraocular penetration of micafungin in patient with *Candida albicans* endophthalmitis. *J Ocular Pharmacol Ther* 2011; 27(5):531-533.

167. Okugawa S, Ota Y, Tatsuno K, Tsukada K, Kishino S, Koike K. A case of invasive central nervous system aspergillosis treated with micafungin with monitoring of micafungin concentrations in the cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(4):344-346.

168. Pieralli F, Bazzini C, Vannucchi V, Mancini A, Nozzoli C. A case of *Candida glabrata* severe urinary sepsis successfully treated with micafungin. *Med Mycol Case Rep* 2014; 5(1):1-3.

169. Auriti C, Falcone M, Ronchetti MP, Goffredo BM, Cairoli S, Crisafulli R, et al. High-dose micafungin for preterm neonates and infants with invasive and central nervous system candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(12):7333-7339.

170. Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(1):68-88.

171. Farowski F, Cornely OA, Vehreschild JJ, Bauer T, Hartmann P, Steinbach A, et al. Intracellular concentrations of micafungin in different cellular compartments of the peripheral blood. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(3):228-231.

172. Tabata K, Katashima M, Kawamura A, Tanigawara Y, Sunagawa K. Linear pharmacokinetics of micafungin and its active metabolites in Japanese pediatric patients with fungal infections. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8):1706-1711.

173. Gumbo T. Single or 2-dose micafungin regimen for treatment of invasive candidiasis: *therapia sterilisans magna!* *Clin Infect Dis* 2015; 61(6):635-642.

174. Bochennek K, Balan A, Muller-Scholden L, Becker M, Farowski F, Muller C, et al. Micafungin twice weekly as antifungal prophylaxis in paediatric patients at high risk for invasive fungal disease. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(5):1527-1530.

175. Sirohi B, Powles RL, Chopra R, Russell N, Byrne JL, Prentice HG, et al. A study to determine the safety profile and maximum tolerated dose of micafungin (FK463) in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38(1):47-51.

176. Kishino S, Ohno K, Shimamura T, Furukawato H. Optimal prophylactic dosage and disposition of micafungin in living donor liver recipients. *Clin Transplant* 2004; 18(6):676-680.

177. Muraki Y, Iwamoto T, Kagawa Y, Sakurai H, Usui M, Isaji S, et al. The impact of total bilirubin on plasma micafungin levels in living-donor liver transplantation recipients with severe liver dysfunction. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(4):750-754.

178. Mochizuki N, Matsumoto K, Ohno K, Shimamura T, Furukawa H, Todo S, et al. Effects of hepatic CYP3A4 activity on disposition of micafungin in liver transplant recipients with markedly small-for-size grafts. *Transplant Proc* 2006; 38(10):3649-3650.

179. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. Mosby. 9th Edition 2004; 1:37-89.

180. Avrameas S, Uriel J. Methode de marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *CR Acad Sci* 1966; 262:2543.

181. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966; 14:929.

182. Silverberg SG. *Principles and Practice of surgical Pathology*. Churchill-Livingstone. 2nd Edition, 1990.



183. Jacobsen M, Jacobsen JK. The influence of various fixatives on the immunohistochemical demonstration of a number of plasma proteins and oncofetal proteins in paraffin embedded material. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A)* 1984; 92:461-468.
184. Larsson L. Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1993; 1:2-16.
185. Mukai K, Yoshimura S, Anzai M. Effects of decalcification on immunoperoxidase staining. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:413-419.
186. Judkins AR, Montone KT, LiVolsi VA, van de Rijn M. Sensitivity and specificity of antibodies on necrotic tumor tissue. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:641-646.
187. Ordonez NG, Brooks T, Tompson S, Batsakis JG. Use of *Ulex europaeus* agglutinin I in the identification of lymphatic and blood vessel invasion in previously stained microscopic slides. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:543-550.
188. Chess Q, Hajdu SI. The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytol (Baltimore)* 1985; 30:1-7.
189. Domagala W, Lubonski J, Weber K, Osborn M. Intermediate filament typing of tumor cells in fine needle aspirates by means of monoclonal antibodies. *Acta Cytol (Baltimore)* 1986; 30:214-224.
190. Li CY, Lazcano-Villareal O, Pierre RV, Yam LT. Immunohistochemical Identification of cells in serous effusions. Technical considerations. *Am J Clin Pathol* 1987; 88:696-706.
191. Herrera GA. Ultrastructural immunolabeling. A general overview of techniques and applications. *Ultrastruct Pathol* 1992; 16:37-45.
192. Mount SL, Taatjes DJ, von Turkovich M, Tindle BH, Trainer TD. Diagnostic immunoelectron microscopy in surgical pathology. Assessment of various tissue fixation and processing protocols. *Ultrastruct Pathol* 1993; 17:547-556.
193. Lundqvist M, Wilander E. A simple procedure for immunocytochemical and silver staining of endocrine cells in the same section. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A)* 1983; 91:493-494.
194. Berczi I, Szentivanyi A. Cytokines and chemokines. In: Istvan Berczi and Andor Szentivanyi, eds. *NeuroImmune Biology: The Immune-Neuroendocrine Circuitry History and Progress*. Volume 3. ed. Toronto, Canada: Elsevier 2003; 191-220.
195. Berczi I, Szentivanyi A. The acute phase response. In: Istvan Berczi and Andor Szentivanyi, eds. *NeuroImmune Biology: The Immune-Neuroendocrine Circuitry History and Progress*. Volume 3. ed. Toronto, Canada: Elsevier 2003; 463-494.
196. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374(1):1-20.
197. Κάτσικας Γ, Τζίμα Σ. Ο Ρόλος της Ιντερλευκίνης-6 στις Συστηματικές και στις Έξω-αρθρικές εκδηλώσεις της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας. *Ελληνική Ρευματολογία* 2009; 20(1):36-47.
198. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74(1):1-10.
199. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature clinical practice* 2006; 2(11):619-626.
200. Hassan Ghasemi. Roles of IL-6 in Ocular Inflammation: A Review. *Ocul Immunol Inflam* 2018; 26(1):37-50.
201. Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Faghihzadeh S, Hassan ZM. Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review. *Ocul Immunol Inflam* 2011; 19(6):401-412.
202. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seeger D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets* 2007; 11(5):613-624.
203. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical J* 1998; 334(2):297-314.
204. Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, KoscoVilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Experim Med* 1998; 188(10):1895-1906.
205. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasmacell development. *Nature reviews* 2005; 5(3):230-242.
206. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation

of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nature Immunol* 2008; 9(6):641-649.

207. O'Garra A, Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nature Immunol* 2008; 9(6):588-590.

208. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2):179-189.

209. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008; 29(1):138-149.

210. Jenkins BJ, Roberts AW, Greenhill CJ, et al. Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis. *Blood* 2007; 109(6):2380-2388.

211. Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, et al. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86(19):751-754.

212. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology* 2003; 24(1):25-29.

213. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS letters* 1988; 232(2):347-350.

214. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* 2003; 32(1):1-7.

215. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(24):11924-11928.

216. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, et al.

Antiinterleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumat* 2003; 48(6):1521-1529.

217. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090):235-238.

218. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453(7198):1051-1057.

219. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008; 29(1):44-56.

220. Wornle M, Merkle M, Wolf A, et al. Inhibition of TLR3mediated proinflammatory effects by alkylphosphocholines in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(9):6536-6544.

221. Skwor TA, Atik B, Kandel RP, Adhikari HK, Sharma B, Dean D. Role of secreted conjunctival mucosal cytokine and chemokine proteins in different stages of trachomatous disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(7):264.

222. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy* 2016; 8(8):959-970.

223. Di GN, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(11):3430-3437.

224. Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, et al. Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. *Br J Ophthalmol* 2015; 99(7):960-966.

225. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, et al. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor 1992; 255 (5050):1434-1437.

226. Forooghian F, Das B. Anti-angiogenic effects of ribonucleic acid interference targeting vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha. *Am J Ophthalmol* 2007; 144(5):761-768.

227. Bryant-Hudson KM, Gurung HR, Zheng M, Carr

- DJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 facilitate corneal lymphangiogenesis in response to herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* 2014; 88(24):14451-14457.
228. Ma Y, Tao Y, Lu Q, Jiang YR. Intraocular expression of serum amyloid a and interleukin-6 in proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2011; 152 (4):678-685.
229. Murugeswari P, Shukla D, Kim R, Namperumalsamy P, Stitt AW, Muthukkaruppan V. Angiogenic potential of vitreous from proliferative diabetic retinopathy and Eales' disease patients. *PLoS One* 2014; 9(10): e107551.
230. Carreno E, Enriquez-de-Salamanca A, Teson M, et al. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol* 2010; 88(7):250-258.
231. Sharma RK, Rogojina AT, Chalam KV. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor. *Mol Vis* 2009; 15:60-69.
232. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea* 2009; 28(9):1023-1027.
233. Na KS, Mok JW, Kim JY, Rho CR, Joo CK. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(9):5443-5450.
234. Enriquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010; 16:862-873.
235. Lopez-Miguel A, Teson M, Martin-Montanez V, et al. Clinical and molecular inflammatory response in Sjogren syndrome-associated dry eye patients under desiccating stress. *Am J Ophthalmol* 2016; 161:133-141.e1-2. doi: 10.1016/j.ajo.2015.09.039.
236. Chotikavanich S, De Paiva CS, Li dQ, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(7):3203-3209.
237. Kucherenko AM, Pampukha VM, Drozhzhyna GI, Livshits LA. IL1beta, IL6 and IL8 gene polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies. *Tsitol Genet* 2013; 47(3):42-45.
238. Prada J, Noelle B, Baatz H, Hartmann C, Pleyer U. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 gene expression in keratocytes from patients with rheumatoid corneal ulcerations. *Br J Ophthalmol* 2003; 87(5):548-550.
239. Jin X, Lin Z, Xie X. The delayed response of Toll-like receptors may relate to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis exacerbating rapidly at the early stages of infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(2):231-238.
240. Resan M, Vukosavljevic M, Vojvodic D, Pajic-Eggspuehler B, Pajic B. The acute phase of inflammatory response involved in the wound-healing process after excimer laser treatment. *Clin Ophthalmol* 2015; 10:993-1000. doi: 10.2147/OPHTH.S105880.
241. Carnt NA, Willcox MD, Hau S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms of interleukins-1beta, -6, and -12B with contact lens keratitis susceptibility and severity. *Ophthalmology* 2012; 119(7):1320-1327.
242. Erdogan-Poyraz C, Mocan MC, Bozkurt B, Gariboglu S, Irkec M, Orhan M. Elevated tear interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with conjunctivochalasis. *Cornea* 2009; 28(2):189-193.
243. Nivenius E, Van dP I, Gafvelin G, Van HM, Montan PG. Conjunctival provocation with airborne allergen in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2012; 42(1):58-65.
244. Di GN, Wakefield D, Coroneo MT. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(6):2430-2437.
245. Suelves AM, Zhao TZ, Siddique SS, Foster CS. Profile of local interleukin expression in a cohort of ocular cicatricial pemphigoid patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(13):8112-8117.
246. Baudouin C, Hamard P, Liang H, Creuzot-Garcher C, Bensoussan L, Brignole F. Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology* 2004; 111(12):2186-2192.
247. Huang P, Qi Y, Xu YS, et al. Serum cytokine alteration

is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma. *J Glaucoma* 2010; 19(5):324-330.

248. Hou XR, Miao H, Tao Y, Li XX, Wong IY. Expression of cytokines on the iris of patients with neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol* 2015; 93(2):100-104.

249. Zenkel M, Lewczuk P, Junemann A, Kruse FE, Naumann GO, Schlotzer-Schrehardt U. Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Am J Pathol* 2010; 176(6):2868-2879.

250. Murray PI, Hoekzema R, van Haren MA, de Hon FD, Kijlstra A. Aqueous humor interleukin-6 levels in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(5):917-920.

251. Malecaze F, Chollet P, Cavrois E, Vita N, Arne JL, Ferrara P. Role of interleukin 6 in the inflammatory response after cataract surgery. An experimental and clinical study. *Arch Ophthalmol* 1991; 109(12):1681-1683.

252. Norose K, Yano A, Wang XC, et al. Dominance of activated T cells and interleukin-6 in aqueous humor in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(1):33-39.

253. Sakaguchi M, Sugita S, Sagawa K, Itoh K, Mochizuki M. Cytokine production by T cells infiltrating in the eye of uveitis patients. *Jpn J Ophthalmol* 1998; 42(4):262-268.

254. Kramer M, Monselise Y, Bahar I, Cohen Y, Weinberger D, Goldenberg-Cohen N. Serum cytokine levels in active uveitis and remission. *Curr Eye Res* 2007; 32(7-8):669-675.

255. Fodor M, Gogolak P, Rajnavolgyi E, et al. Long-term kinetics of cytokine responses in human tears after penetrating keratoplasty. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29(7):375-380.

256. Wang L, Zhang Z, Koch DD, Jia Y, Cao W, Zhang S. Anterior chamber interleukin 1beta, interleukin 6 and prostaglandin E2 in patients undergoing femtosecond laser-assisted cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 2016; 100(4):579-582.

257. Inoue T, Kawaji T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in pseudophakic glaucomatous eyes. *J Cataract Refract Surg*

2012; 38(8):1389-1397.

258. Cvenkel B, Kopitar AN, Ihan A. Inflammatory molecules in aqueous humour and on ocular surface and glaucoma surgery outcome. *Mediators Inflammation* 2010; 2010:939602. doi: 10.1155/2010/939602.

259. Lee CS, Jun IH, Kim TI, Byeon SH, Koh HJ, Lee SC. Expression of 12 cytokines in aqueous humour of uveal melanoma before and after combined Ruthenium-106 brachytherapy and transpupillary thermotherapy. *Acta Ophthalmol* 2012; 90(4):314-320.

260. Lim JW. Intravitreal bevacizumab and cytokine levels in major and macular branch retinal vein occlusion. *Ophthalmologica* 2011; 225(3):150-154.

261. Lahmar I, bou-Bacar A, Abdelrahman T, et al. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J Infect Dis* 2009; 199(8):1239-1249.

262. Dunavoelgyi R, Funk M, Sacu S, et al. Intraocular activation of angiogenic and inflammatory pathways in uveal melanoma. *Retina* 2012; 32(7):1373-1384.

263. Nagarkatti-Gude N, Bronkhorst IH, van Duinen SG, Luyten GP, Jager MJ. Cytokines and chemokines in the vitreous fluid of eyes with uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(11):6748-6755.

264. Valentincic NV, de Groot-Mijnes JD, Kraut A, Korosec P, Hawlina M, Rothova A. Intraocular and serum cytokine profiles in patients with intermediate uveitis. *Mol Vis* 2011; 17:2003-2010.

265. Perez VL, Papaliadis GN, Chu D, Anzaar F, Christen W, Foster CS. Elevated levels of interleukin 6 in the vitreous fluid of patients with pars planitis and posterior uveitis: the Massachusetts eye & ear experience and review of previous studies. *Ocul Immunol Inflamm* 2004; 12(3):193-201.

266. Yoshimura T, Sonoda KH, Ohguro N, et al. Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology* 2009; 48(4):347-354.

267. Simon D, Denniston AK, Tomlins PJ, et al. Soluble gp130, an antagonist of IL-6 transsignaling, is elevated in uveitis aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(9):3988-3991.

268. Miec-Mroczek J, Oficjalska-Mlynczak J. Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine



levels in the vitreous body of patients with type 2 diabetes: role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(12):1665-1670.

269. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Wong TY, Tsai MY. Are inflammatory factors related to retinal vessel caliber? The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(1):87-94.

270. Oh IK, Kim SW, Oh J, Lee TS, Huh K. Inflammatory and angiogenic factors in the aqueous humor and the relationship to diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2010; 35(12):1116-1127.

271. Roh MI, Kim HS, Song JH, Lim JB, Kwon OW. Effect of intravitreal bevacizumab injection on aqueous humor cytokine levels in clinically significant macular edema. *Ophthalmology* 2009; 116(1):80-86.

272. Sohn HJ, Han DH, Kim IT, et al. Changes in aqueous concentrations of various cytokines after intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2011; 152(4):686-694.

273. Campochiaro PA, Choy DF, Do DV, et al. Monitoring ocular drug therapy by analysis of aqueous samples. *Ophthalmology* 2009; 116(11):2158-2164.

274. Ricker LJ, Kijlstra A, de JW, Liem AT, Hendrikse F, La Heij EC. Chemokine levels in subretinal fluid obtained during scleral buckling surgery after rhegmatogenous retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(8):4143-4150.

275. Gu R, Zhou M, Jiang C, Yu J, Xu G. Elevated concentration of cytokines in aqueous in post-vitrectomy eyes. *Clin Exp Ophthalmol* 2016; 44(2):128-134.

276. Er H, Doganay S, Turkoz Y, et al. The levels of cytokines and nitric oxide in rabbit vitreous humor after retinal laser photocoagulation. *Ophthalmic Surg Lasers* 2000; 31(6):479-483.

277. Suzuki Y, Nakazawa M, Suzuki K, Yamazaki H, Miyagawa Y. Expression profiles of cytokines and chemokines in vitreous fluid in diabetic retinopathy and central retinal vein occlusion. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55(3):256-263.

278. Wang JJ, Ross RJ, Tuo J, et al. The LOC387715

polymorphism, inflammatory markers, smoking, and age-related macular degeneration. A population-based case-control study. *Ophthalmology* 2008; 115(4):693-699.

279. Roh MI, Kim HS, Song JH, Lim JB, Koh HJ, Kwon OW. Concentration of cytokines in the aqueous humor of patients with naive, recurrent and regressed CNV associated with AMD after bevacizumab treatment. *Retina* 2009; 29(4):523-529.

280. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2009; 116(11):2165-2169.

281. Hao X, Yi C, Wang Y, et al. Identification of intraocular inflammatory mediators in patients with endophthalmitis. *Mol Vis* 2016; 22:563-574.

282. Ozdamar Y, Berker N, Bahar G, et al. Inflammatory mediators and posterior segment involvement in ocular Behcet disease. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19(6):998-1003.

283. Sen A, Paine SK, Chowdhury IH, et al. Impact of interleukin-6 promoter polymorphism and serum interleukin-6 level on the acute inflammation and neovascularization stages of patients with Eales' disease. *Mol Vis* 2011; 17:2552-2563.

284. Wang Y, Shen D, Wang VM, Sen HN, Chan CC. Molecular biomarkers for the diagnosis of primary vitreoretinal lymphoma. *Int J Mol Sci* 2011; 12(9):5684-5697.

285. Huang D, Luo Q, Yang H, Mao Y. Changes of lacrimal gland and tear inflammatory cytokines in thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(8):4935-4943.

286. Naik V, Khadavi N, Naik MN, et al. Biologic therapeutics in thyroid-associated ophthalmopathy: translating disease mechanism into therapy. *Thyroid* 2008; 18(9):967-971.

287. Khong JJ, McNab AA, Ebeling PR, Craig JE, Selva D. Pathogenesis of thyroid eye disease: review and update on molecular mechanisms. *Br J Ophthalmol* 2016; 100(1):142-150.

288. Fodor M, Facsco A, Rajnavolgyi E, et al. Enhanced release of IL-6 and IL-8 into tears in various anterior segment eye diseases. *Ophthalm Res* 2006; 38(4):182-188.

289. Astorri E, Nerviani A, Bombardieri M, Pitzalis

C. Towards a stratified targeted approach with biologic treatments in rheumatoid arthritis: role of synovial pathobiology. *Curr Pharm Des* 2015; 21(17):2216-2224.

290. Pascual-Camps I, Hernández-Martínez P, Monje-Fernández L, Dolz-Marco R, Gallego-Pinazo R, Wu L, Arévalo JF, Díaz-Llopis M. Update on intravitreal anti-tumor necrosis factor alpha therapies for ocular disorders. *J Ophthalm Inflamm Infect* 2014; 4:26.

291. Theodossiadis PG, Markomichelakis NN, Sfikakis PP. Tumor necrosis factor antagonists: preliminary evidence for an emerging approach in the treatment of ocular inflammation. *Retina* 2007; 27:399-413.

292. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; 50(3):184-195.

293. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-a: structure, function and interaction with anti-TNF agents *Rheumatology* 2010; 49:1215-1228.

294. Dutz PJ. Pathomechanisms of Cutaneous Lupus Erythematosus. *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes* 2013; 23:310-318.

295. Ayadi EA, Herndon ND, Finnerty CC. Biomarkers in Burn Patient Care. *Total Burn Care* 2008; 21:232-235.

296. Ravussin E, Smith RS. Role of the Adipocyte in Metabolism and Endocrine Function. *Endocrinology: Adult and Pediatric* 2016; 36:627-647.

297. Brummer GY, Cheng NA. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. *Advances in Cancer Research* 2016; 8(132):265-367.

298. Kinne WR, Stuhlmüller B, Burmester RG. Macrophages. *Rheumatoid Arthritis* 2009; 8C:107-115.

299. Augustin AJ, Kirchhof J. Inflammation and the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13:641-651.

300. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334:1717-1724.

301. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF-a therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001; 19:163-196.

302. Sfikakis PP, Kollias G. TNF biology in experimental

and clinical arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:380-386.

303. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:271-285.

304. Perry SW, Dewhurst S, Bellizzi MJ, Gelbard HA. Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *J Neurovirol* 2002; 8:611-624.

305. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflamm* 2008; 5:45-60.

306. De Simoni MG, Imeri L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. *Biol Signal Recept* 1998; 7:33-44.

307. Berger S, Savitz SI, Nijhawan S, Singh M, David J, Rosenbaum PS, Rosenbaum DM. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalm Vis Sci* 2008; 49:3605-3610.

308. Tezel G. TNF-alpha signaling in glaucomatous neurodegeneration. *Prog Brain Res* 2008; 173:409-421.

309. Marques-Fernandez F, Planells-Ferrer L, Gozzelino R, Galenkamp KM, Reix S, Llecha-Cano N, Lopez-Soriano J, Yuste VJ, Moubarak RS, Comella JX. TNFalpha induces survival through the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *Cell Death Dis* 2013; 4:493-500.

310. Varela HJ, Hernandez MR. Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 1997; 6:303-313.

311. Dvorianchikova G, Barakat D, Brambilla R, Agudelo C, Hernandez E, Bethea JR, Shestopalov VI, Ivanov D. Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur J Neurosci* 2009; 30:175-185.

312. Son JL, Soto I, Oglesby E, Lopez-Roca T, Pease ME, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss. *Glia* 2010; 58:780-789.

313. Barakat DJ, Dvorianchikova G, Ivanov D, Shestopalov VI. Astroglial NF-kappaB mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. *J Neurochem* 2012; 120:586-597.

314. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* 2002; 298:556-562.

315. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; 50:427-434.
316. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000; 20:8693-8700.
317. Dvorianchikova G, Ivanov D. Tumor necrosis factor-alpha mediates activation of NF- $\kappa$ B and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways. *European J Neuroscience* 2014; 40:3171-3178. doi:10.1111/ejn.12710.
318. Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB. TNF-alpha and TNFalpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalm Vis Sci* 2001; 42:1787-1794.
319. Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res* 2002; 4(3):243-252.
320. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005; 120:649-661.
321. Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, Dean K, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* 2006; 13:712-729.
322. Dvorianchikova G, Hernandez E, Grant J, Santos AR, Yang H, Ivanov D. The high-mobility group box-1 nuclear factor mediates retinal injury after ischemia reperfusion. *Invest Ophthalm Vis Sci* 2011; 52:7187-7194.
323. Dvorianchikova G, Degterev A, Ivanov D. Retinal ganglion cell (RGC) programmed necrosis contributes to ischemia-reperfusion-induced retinal damage. *Exp Eye Res* 2014; 123:1-7.
324. Challa S, Chan FK. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:3241-3253.
325. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediat Inflamm* 2010; 1-20.
326. Brambilla R, Dvorianchikova G, Barakat D, Ivanov D, Bethea JR, Shestopalov VI. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappaB protects from optic nerve damage and retinal ganglion cell loss in experimental optic neuritis. *J Neuroinflamm* 2012; 9:213-225.
327. Chen B, Jiand D, Huang P, Tang L. Relationship between IL-1 beta and TNF-alpha in subretinal fluids of rhegmatogenous retinal detachment with PVR. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1998; 23(5):483-485.
328. Wang Y, Wang VM, Chan CC. The role of anti-inflammatory agents in age-related macular degeneration (AMD) treatment. *Eye* 2011; 25:127-139.