

## ATTIVITÀ NEUROPROTETTIVA DI UNA ASSOCIAZIONE DI FORSKOLIN, OMOTAUURINA E CARNOSINA SU CELLULE GANGLIONARI RETINICHE IN VITRO SOTTOPOSTE A STRESS OSSIDATIVO

Dan JF, Neville N. OSBORNE<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Nuffield Laboratory of Ophthalmology, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

<sup>b</sup> Fundación de Investigación Oftalmológica, Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Oviedo, Spain

**Objective:** the aim of this study has been to assess the ability of a combination of forskolin, carnosine and homotaurine to attenuate the cytotoxic effects due to mitochondrial poisoning with sodium azide or rotenone on retinal ganglion cells grown in vitro. The rationale of the study is based on the notion that glaucoma is a slowly progressive degenerative neuropathy in which retinal ganglion cells die by apoptosis in response to a complex series of events. Such events finally result in an increase of oxidative stress, which is at least in part due to mitochondrial damage caused by high frequency light radiations.

**Procedures:** cell cultures of rat retinal ganglion cells (RGC5) have been subjected to mitochondrial oxidative stress by treatment with rotenone or sodium azide, and their survival

in the presence or absence of a neuroprotective mix (forskolin, homotaurine and carnosine) evaluated by a metabolic colorimetric test.

**Results:** the results obtained showed no cytotoxicity of the association alone in the two test concentrations used. The highest concentration of the association was able to significantly counteract cell death induced by sodium azide or rotenone.

**Conclusions:** in conclusion, the association of forskolin, homotaurine and carnosine is able to effectively counteract the effects of damage induced to mitochondria by sodium azide or rotenone, and therefore it is a candidate as a possible treatment for neuroprotection in glaucoma patients.

*Ottica fisiopat 2012; XVII: 173-182*

### INTRODUZIONE E OBIETTIVO

Il glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) è una malattia neurodegenerativa a lenta progressione che coinvolge le cellule ganglionari retiniche (RGC), per arrivare ad interessare quelle del nucleo genicolato laterale e quindi l'area visiva della corteccia cerebrale<sup>1</sup>. L'innalzamento della pressione intraoculare (IOP) è il principale fattore di rischio conosciuto per l'insorgenza e la progressione del POAG, e l'unico bersaglio terapeutico attualmente riconosciuto<sup>2</sup>, sebbene sia noto che la normalizzazione della IOP non arresta la progressione della malattia. Infatti, in ciascuno dei principali studi randomizzati sulla progressione del glaucoma quali l'Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS)<sup>3-4</sup>, il Collaborative Normal Tension Glaucoma Study (CNTGS)<sup>5,6</sup>,

il Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study (CIGTS)<sup>7</sup> e lo Early Manifest Glaucoma Trial (EMGT)<sup>8</sup> si è verificata una progressione della malattia nonostante un abbassamento significativo della IOP. Inoltre, è noto che molti pazienti mantengono una IOP superiore alla norma per molti anni senza sviluppare glaucoma<sup>9</sup>. Perciò la riduzione della IOP sembra essere una condizione necessaria, ma non sufficiente per un adeguato controllo della malattia glaucomatosa. A fianco delle terapie ipotensive è allora stata proposta la neuroprotezione come trattamento complementare all'abbassamento della IOP, allo scopo di ridurre la perdita delle RGC dovuta ai molteplici eventi tossici che si possono verificare a loro carico<sup>10-11</sup>. Tra questi eventi, un ruolo importante sembrano averlo i mitocondri, che nel nervo ottico

### RINGRAZIAMENTI

Gli esperimenti sono stati eseguiti nei laboratori inglesi dal Dott. Dan Ji. Si ringrazia il Dott. Dario Rusciano per il supporto fornito nel disegno sperimentale e per la traduzione in italiano dell'articolo.

### AUTORE CORRISPONDENTE

Neville N. Osborne, Nuffield Laboratory of Ophthalmology University of Oxford, Walton Street, Oxford. OX2 6AW. U.K. neville.osborne@eye.ox.ac.uk

### PAROLE CHIAVE:

glaucoma, neuroprotezione, mitocondri, stress ossidativo, rotenone, sodio azide.

### KEY WORDS:

Glaucoma, neuroprotection, mitochondria, oxidative stress, rotenone, sodium azide.

fig. 1

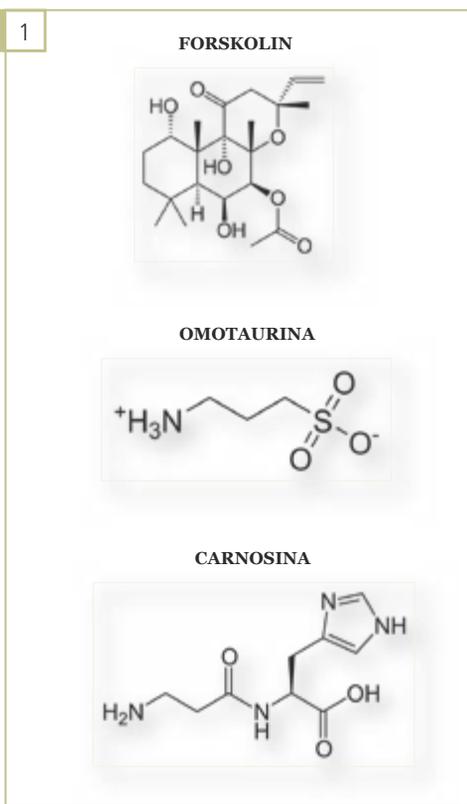


fig. 1  
Struttura  
molecolare  
di forskolin,  
omotaurina e  
carnosina.

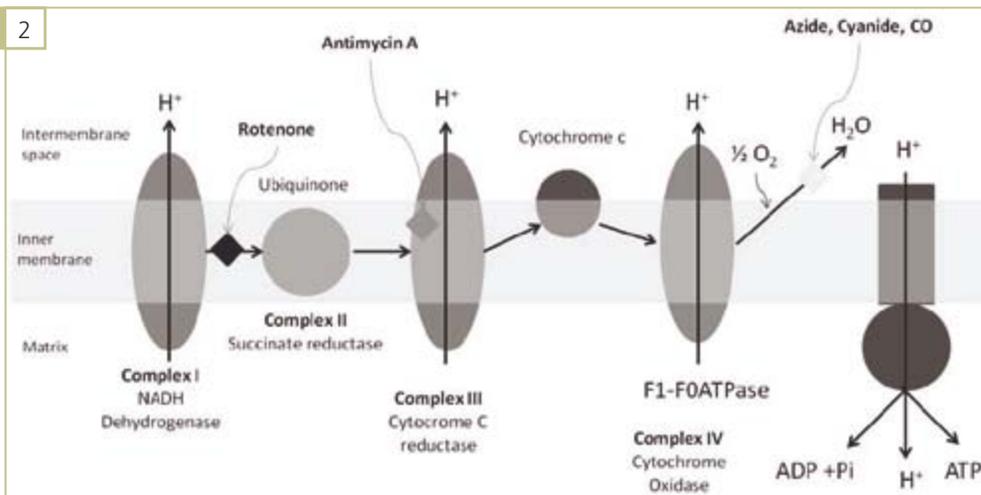
fig. 2  
Schema  
della catena  
respiratoria  
mitocondriale  
dove si  
evidenziano  
i bersagli  
molecolari di  
rotenone e  
sodio azide.

si affollano principalmente nella porzione preliminare non mielinata degli assoni delle RGC<sup>12</sup>. Questi mitocondri sono esposti ad un possibile danneggiamento da parte delle radiazioni luminose, che vengono assorbite da enzimi mitocondriali come i citocromi e le flavina ossidasi, generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) e stress ossidativo che possono

mettere a rischio la sopravvivenza delle RGC che si trovino in una condizione di sofferenza come può avvenire nel glaucoma o nelle neuropatie ottiche ereditarie<sup>13</sup>. Perciò, la protezione dallo stress ossidativo mitocondriale può essere un fattore importante per preservare la vitalità delle RGC in situazioni patologiche che ne abbiano già compromesso la capacità di recupero.

Forskolin, omotaurina e carnosina (Fig. 1) sono tre composti naturali le cui proprietà li rendono adatti a sostenere il metabolismo delle RGC, migliorandone le capacità di sopravvivenza in condizioni di stress ossidativo. **Forskolin**, un labdano diterpene estratto dalle radici della pianta *coleus forskohlii*, è un attivatore recettore-indipendente della adenilato ciclasi<sup>14</sup>, e in grado perciò di stimolare la produzione della neurotrofina BDNF da parte di astrociti<sup>15</sup> e cellule endoteliali<sup>16</sup>, nonché l'espressione del relativo recettore TrkB sulle RGC<sup>17</sup>. L'**omotaurina** è un analogo della taurina (un aminoacido modificato, in cui il gruppo acido invece che

fig. 2



essere un acido carbossilico è un acido solfonico), che ha dimostrato attività di neuroprotezione nelle strutture della neuroretina, quali fotorecettori e RGC<sup>18</sup>. L'omotaurina funziona da agonista del neurotrasmettitore acido gamma-amino-butirrico (GABA)<sup>19</sup>, di cui è nota l'attività di neuroprotezione<sup>20</sup>, mentre inibisce l'attività del recettore NMDA per il glutammato<sup>19</sup>, laddove una sovrastimolazione del recettore NMDA risulta in un accumulo di radicali liberi con effetto neurotossico<sup>21</sup>. La **carnosina** è un dipeptide degli aminoacidi beta-alanina e istidina, e si trova naturalmente concentrato nel tessuto muscolare ed in quello cerebrale. Anche la carnosina contribuisce a ridurre la eccitotossicità da glutammato sia in vitro che in vivo nei neuroni cerebrali, contrastando efficacemente la produzione mitocondriale di ROS indotta da rotenone<sup>22</sup>.

In questo studio abbiamo perciò voluto verificare se una miscela di queste tre molecole fosse in grado di contrastare gli effetti citotossici dello stress ossidativo mitocondriale indotti da trattamento con sodio azide (inibitore del complesso mitocondriale citocromo-ossidasi) o rotenone (inibitore del complesso mitocondriale NADH deidrogenasi) (Fig. 2) su una linea cellulare murina con caratteristiche simili alle RGC (RGC5). I risultati ottenuti indicano in effetti una migliore sopravvivenza delle RGC5 al trattamento coi due agenti citotossici quando la combinazione di forskolin, omotaurina e carnosina era presente nel terreno di coltura.

## METODOLOGIA

Forskolin, omotaurina e carnosina (Truffini & Reggè, Milano) erano solubilizzati in DMSO ad una concentrazione 100/200 volte superiore alle due concentrazioni finali utilizzate (low: forskolin 5  $\mu$ M, carnosina 30  $\mu$ M, omotaurina 100  $\mu$ M; high: forskolin 10  $\mu$ M, carnosina 60  $\mu$ M, omotaurina 200  $\mu$ M). La linea cellulare di ratto RGC5<sup>23</sup> è stata mantenuta in vitro come monostrato in un terreno di coltura DMEM arricchito con glucosio 25 mM e siero fetale bovino al 10% e con antibiotici (penicillina e streptomina), in atmosfera controllata al 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub> e alla temperatura di 37°C. In queste condizioni il tempo di duplicazione delle cellule è di circa 24 ore. Colture confluenti venivano staccate dal substrato con tripsina/EDTA, e propagate ad un rapporto di 1/8. Cento microlitri di questa sospensione, contenente circa 5.000 cellule, erano anche seminate in ciascun pozzetto di una piastra da 96 pozzetti per i saggi sperimentali. Dopo 24 ore dalla semina, il terreno di coltura era supplementato con la miscela di forskolin-omotaurina e carnosina alle due dosi previste, e dopo un'ora venivano aggiunte anche le dosi di sodio azide (5 mM) o rotenone (1  $\mu$ M). Dopo altre 24 ore di incubazione, le cellule erano colorate col colorante vitale resazurina, che le cellule metabolicamente ed energeticamente attive convertono nel composto fluorescente resorufina, che può essere quantificato spettrofotometricamente (eccitazione a 530 nm, emissione a 590 nm)<sup>24</sup>.

fig. 3

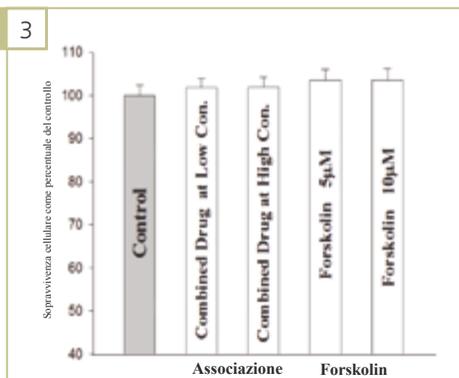
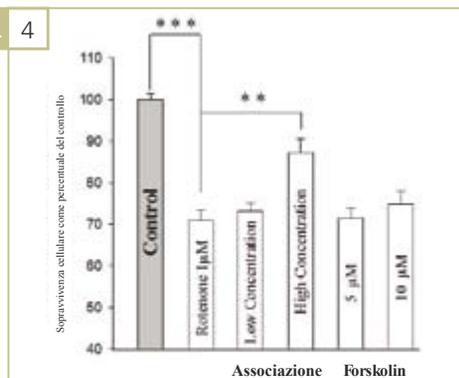


fig. 4



## RISULTATI

Nel primo esperimento si è valutato se l'aggiunta al terreno completo di coltura delle due dosi prescelte (high e low) della associazione di forskolin, omotaurina e carnosina poteva interferire con la crescita o alterare lo stato metabolico delle RGC5 in coltura. La figura 3 mostra che né l'associazione, né il forskolin da solo a 5 o 10 µM modificava nelle 25 ore la crescita delle cellule neuronali.

Nel secondo esperimento le cellule RGC5 sono state trattate con rotenone 1 µM, un noto inibitore del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, e in grado di indurre la morte per apoptosi delle RGC5<sup>25</sup>. La figura 4 mostra infatti che il trattamento con rotenone riduce di circa il 30% la vitalità cellulare, e che né il forskolin da solo (a 5 o 10 µM), né l'associazione alla dose più bassa erano in grado di contrastare quest'azione citotossica. Somministrando invece l'associazione alla dose più alta, si otteneva un efficiente e statisticamente significativo effetto di attenuazione del danno, con una vitalità cellulare che si rialzava in modo significativo intorno a valori dell'85%.

Nel terzo esperimento è stata utilizzata la sodio azide come agente citotossico, per la sua proprietà di inibire il

complesso IV (citocromo ossidasi) della catena respiratoria mitocondriale<sup>26</sup>. La figura 5 indica che un po' di più del 30% delle RGC5 subisce apoptosi dopo le 24 ore di trattamento, e anche in questo caso né il forskolin da solo (a 5 o 10 µM), né l'associazione alla dose più bassa potevano contrastare quest'azione citotossica. Il trattamento in presenza della dose più alta dell'associazione esitava invece in un significativo incremento della sopravvivenza, che si attestava intorno all'85%.

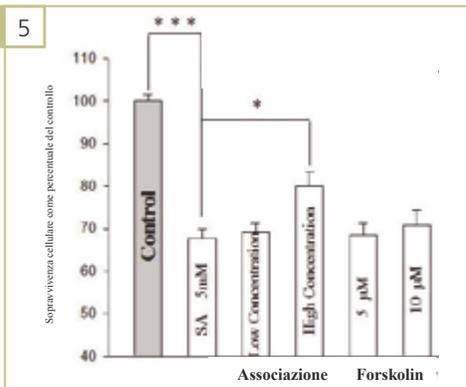
## DISCUSSIONE

La neuroprotezione è un nuovo paradigma terapeutico che si sta affermando nel trattamento coadiuvante di quelle patologie neurodegenerative (la maggioranza) per cui non esiste una cura ed un preciso bersaglio terapeutico, quali malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, corea di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica, e glaucoma primario ad angolo aperto. La mancanza di un bersaglio terapeutico è dovuta ad una ancora incompleta conoscenza dell'eziologia di queste patologie. Più recentemente, si sta facendo strada l'ipotesi di un coinvolgimento dei mitocondri nell'insorgenza e progressione delle patologie neurodegenerative<sup>27-29</sup>, incluse quelle retiniche<sup>30</sup> e lo stesso

fig. 3  
Prove di citotossicità: Forskolin da solo o in combinazione con Carnosina e Omotaurina non altera lo stato metabolico e di crescita delle cellule RGC5.

fig. 4  
La presenza in coltura della dose alta dell'associazione Forskolin-Omotaurina-Carnosina riduce significativamente la mortalità delle cellule RGC5 indotta da rotenone.

fig. 5



glaucoma<sup>31</sup>. In particolare, nella malattia di Alzheimer alterazioni della catena respiratoria mitocondriale appaiono giocare un ruolo determinante nell'instaurarsi della patologia<sup>32-33</sup>. La citocromo-ossidasi è un enzima critico in questi eventi<sup>34</sup>, e la sua specifica intossicazione con sodio-azide produce un eccesso di radicali liberi, diminuisce il metabolismo energetico aerobico e causa danno eccitotossico, innestando una spirale neurodegenerativa che provoca sintomi simili alla malattia di Alzheimer nel modello animale sperimentale<sup>26, 35</sup>. È interessante notare a questo proposito che spesso la malattia di Alzheimer si accompagna a difetti della visione di origine retinica, quali appunto glaucoma o degenerazione maculare<sup>36</sup>. Peptidi e citochine caratteristici della malattia di Alzheimer si ritrovano nell'umore acqueo<sup>37</sup> e nel liquido cerebro-spinale in correlazione alla progressione del glaucoma<sup>38</sup>, e sembrano poter contribuire alla morte per apoptosi delle RGC<sup>39</sup>. Modelli sperimentali animali mostrano che trattamenti volti a ridurre la presenza dei peptidi amiloidi<sup>40</sup> o a contrastare il danno ossidativo mitocondriale<sup>41</sup> riducono rispettivamente la perdita neuronale in modelli di glaucoma<sup>40</sup> o di Alzheimer<sup>41</sup>. Perciò, in questo lavoro sperimentale abbiamo voluto valutare se la combinazione di tre molecole con

attività di neuroprotezione fosse in grado di proteggere cellule con caratteristiche simili ai neuroni retinici (linea RGC5) da un danno mitocondriale causato da due noti agenti citotossici quali la sodio azide e il rotenone. I risultati ottenuti mostrano un'assenza di tossicità (Fig. 3) e un chiaro effetto neuroprotettivo (Fig. 4 e 5) dell'associazione di forskolin, omotaurina e carnosina alla dose più alta provata nei confronti dell'apoptosi indotta dalla intossicazione mitocondriale. È interessante notare che l'effetto si ottiene dall'associazione, mentre il forskolin da solo, anche alla dose più alta di 10 µM, non è in grado di contrastare efficacemente nessuno dei due agenti citotossici. Il forskolin infatti è dotato di un modesto potere antiossidante, e la sua attività principale risiede nella attivazione della adenilato ciclastasi che, attraverso la produzione di cAMP, regola in maniera tessuto-specifica molteplici funzioni cellulari, tra cui nel polmone anche la produzione di enzimi antiossidanti quali superossido-dismutasi (SOD), catalasi, glutazione (GSH) e glutazione perossidasi (GPx)<sup>42</sup>. D'altra parte, l'attività della adenilato ciclastasi è essenziale per la sopravvivenza delle RGC<sup>43</sup>. Infatti, nelle cellule neuronali retiniche forskolin è in grado di incrementare l'espressione della neurotrofina BDNF da parte degli astrociti<sup>15</sup> e di modulare l'espressione in membrana del relativo recettore TrkB<sup>17</sup>, meccanismo questo di rilevante importanza nel glaucoma ipertensivo dove si suppone che l'elevata IOP provochi uno strozzamento a livello della lamina cribrosa attraverso cui

fig. 5  
La presenza in coltura della dose alta dell'associazione Forskolin-Omotaurina-Carnosina riduce significativamente la mortalità delle cellule RGC5 indotta da sodio-azide.

transita il nervo ottico, determinando anche un rallentamento del flusso assonale di neurotrofine e quindi di stimolazione autocrina delle RGC<sup>44-46</sup>. Forskolin potrebbe perciò attivare un meccanismo paracrino dagli astrociti<sup>15</sup> e dalle cellule endoteliali<sup>16</sup>, supplendo così alla carenza di flusso assonale. Questo meccanismo però, rilevante in vivo, non sembra esserlo nella monocultura di RGC5 in vitro, soggetta a stress ossidativo mitocondriale da rotenone o sodio azide.

L'aggiunta di omotaurina e carnosina è in grado di rendere la miscela neuroprotettiva nei confronti del danno mitocondriale.

L'omotaurina, che si distingue dalla taurina per avere un carbonio extra nella catena, è stata principalmente studiata nella malattia di Alzheimer per la sua capacità di legare l'amiloide beta (A $\beta$ ) solubile, riducendo quindi la formazione degli aggregati insolubili neurotossici<sup>47</sup>.

L'attività neuroprotettiva dell'omotaurina è dimostrata in vitro in colture d'organo di ippocampo di ratto, dove è in grado di contrastare la neurotossicità indotta dai depositi di A $\beta$ <sup>48</sup>, e in vivo dove riduce i depositi di A $\beta$  nel cervello di topi transgenici TgCRND8<sup>48</sup>. Un recente studio clinico (Alphase) conferma i precedenti risultati, indicando una minor perdita di volume dell'ippocampo nei pazienti con Alzheimer trattati con omotaurina<sup>49</sup>.

L'attività neuroprotettiva dell'omotaurina sembra procedere attraverso sia un meccanismo GABA-dipendente, per cui l'omotaurina - data la sua similarità con l'acido

gamma amino butirrico (GABA) - stimola i recettori GABA-A i quali vanno a bloccare l'attivazione delle caspasi pro-apoptotiche (caspasi 3, 7 e 9) che sarebbero altrimenti attivate dalla presenza dei depositi di amiloide o anche da stress ischemici o nutrizionali; sia attraverso un meccanismo GABA-indipendente, per cui l'omotaurina previene l'attivazione delle proteine MAPK (ERK1/2) inibendo quindi gli eventi proapoptotici che ne seguirebbero<sup>50</sup>. La carnosina è una molecola che si trova naturalmente concentrata in quei tessuti, come il muscolo scheletrico ed il cervello, in cui la elevata attività metabolica determina una produzione importante di radicali liberi che potrebbero quindi danneggiare le strutture cellulari dei tessuti stessi<sup>51</sup>. La carnosina è infatti un antiossidante a largo spettro capace di neutralizzare molti tipi di radicali liberi quali il radicale ossigeno e i radicali ossidrillici e perossidici; essendo inoltre idrosolubile, la carnosina è in grado di inibire la perossidazione dei lipidi di membrana dovuta all'azione dei radicali liberi e dei metalli pesanti quali ferro, zinco e rame, essendone un chelante<sup>52-53</sup>. Inoltre, la carnosina protegge dalla eccitotossicità indotta da glutammato<sup>54</sup>, meccanismo questo che la rende neuroprotettiva anche nei confronti del danno indotto dai depositi di beta amiloide<sup>55</sup>. La carnosina esogena è in grado di passare la barriera emato-encefalica<sup>56</sup>, e protegge il cervello dai danni indotti da una ischemia cerebrale permanente dopo occlusione della arteria cerebrale media<sup>57-58</sup>.

## CONCLUSIONI

In conclusione, perciò, i meccanismi d'azione delle tre molecole (forskolin, omotaurina e carnosina) appaiono essere diversi e complementari tra di loro nel supportare la sopravvivenza delle cellule neuronali, e difenderle dai vari insulti a cui nel tempo il sistema nervoso è soggetto. In particolare, nella situazione di stress permanente in cui le cellule ganglionari retiniche ed il nervo ottico si vengono a trovare nel paziente glaucomatoso, dovuta sia ad una elevata pressione intraoculare e/o a difetti di circolazione e perfusione ematica della retina e del nervo ottico, tale associazione si propone di mitigare la neurotossicità conseguente ad un alterato equilibrio neurotrofico, alla formazione di derivati insolubili di beta amiloide e allo stress ossidativo che può generalmente conseguire a queste situazioni. I risultati sperimentali in vitro presentati in questo lavoro indicano che l'associazione neuroprotettiva analizzata è in grado di contrastare il danno dovuto all'intossicazione mitocondriale, che anche sembra giocare un ruolo importante nella progressione delle patologie neurodegenerative, glaucoma incluso. Questi risultati incoraggiano perciò ad approfondire gli studi sulla neuroprotezione dell'associazione proposta in modelli animali di ischemia retinica e in studi clinici controllati in pazienti glaucomatosi trattati con un supplemento dietetico a base dei tre elementi considerati.

## RIASSUNTO

*Obiettivo: obiettivo dello studio è stata la valutazione della capacità di una associazione di forskolin, omotaurina*

*e carnosina di attenuare gli effetti citotossici su cellule ganglionari retiniche cresciute in vitro, conseguenti ad un'intossicazione mitocondriale con sodio azide o rotenone. Il razionale dello studio parte dalla nozione che il glaucoma è una neuropatia degenerativa a lenta progressione in cui le cellule ganglionari retiniche muoiono per apoptosi in seguito ad una serie complessa di eventi che risultano comunque in un aumento dello stress ossidativo dovuto in parte ad un danno mitocondriale causato dalle radiazioni luminose ad alta frequenza.*

*Procedure di base: colture cellulari di cellule ganglionari retiniche di ratto (RGC5) sono state sottoposte a stress ossidativo mitocondriale mediante trattamento con rotenone o sodio azide, e la sopravvivenza valutata mediante test colorimetrico metabolico, sia in presenza che in assenza di molecole ad attività neuroprotettiva (forskolin, omotaurina, carnosina).*

*Risultati: i risultati ottenuti hanno dimostrato la non citotossicità della sola associazione nelle due concentrazioni sperimentali utilizzate. La concentrazione più elevata dell'associazione era inoltre in grado di contrastare in maniera significativa la morte cellulare indotta da sodio azide o rotenone.*

*Conclusioni: in conclusione, un'associazione di forskolin, omotaurina e carnosina è in grado di contrastare efficacemente gli effetti del danno indotto ai mitocondri da sodio azide o rotenone, e si candida quindi come un possibile trattamento di neuroprotezione nei pazienti glaucomatosi.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Vrabec JP, Levin LA. *The neurobiology of cell death in glaucoma*. Eye (Lond) **21**: S11-4, 2007
2. Rao HL, Addepalli UK, Jonnadula GB, Kumbar T, Senthil S, Garudadri CS. *Relationship Between Intraocular Pressure and Rate of Visual Field Progression in Treated Glaucoma*. J Glaucoma. 2012 May 16 [Epub ahead of print]
3. The AGIS Investigators. *The advanced glaucoma intervention study, 6: effect of cataract on visual field and visual acuity*. Arch Ophthalmol **118**: 1639-1652, 2000
4. The AGIS Investigators. *The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 1. Study design and methods and baseline characteristics of study patients*. Control Clin Trials **15**: 299-325, 1994
5. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma*. Am J Ophthalmol **126**: 498-505, 1998
6. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures*. Am J Ophthalmol **126**: 487-497, 1998
7. Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA. *Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery*. Ophthalmology **108**: 1943-1953, 2001
8. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Hussein M. *Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial*. Arch Ophthalmol **120**: 1268-1279, 2002
9. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Kass MA. *The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol **120**(6): 714-720, 2002 Jun
10. Danesh-Meyer HV. *Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions*. Curr Opin Ophthalmol **22**: 78-86, 2011
11. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. *Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role?* Exp Eye Res **91**: 554-566, 2010
12. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. *Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies*. Prog Retin Eye Res **23**: 53-89, 2004
13. Osborne NN, Li GY, Ji D, Mortiboys HJ, Jackson S. *Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies*. J Neurochem **105**: 2013-2028, 2008
14. Seamon KB, Daly JW. *Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems*. J. Cyclic Nucleotide Res **7**: 201-224, 1981
15. Juric DM, Loncar D, Carman-Krzan M. *Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors*. Neurochem Int **52**: 297-306, 2008
16. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B. *Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor*. FEBS Lett **470**: 113-117, 2000
17. Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG Jr, Reichardt LF, Barres BA. *Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons*. Neuron **21**: 681-693, 1998
18. Jammoul F, Dégardin J, Pain D, Gondouin P, Simonutti M, Dubus E, Caplette R, Fouquet S, Craft CM, Sahel JA, Picaud S. *Taurine deficiency damages photoreceptors and retinal ganglion cells in vigabatrin-treated neonatal rats*. Mol Cell Neurosci **43**: 414-421, 2010
19. Olive MF. *Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system*. Amino Acids **23**: 345-357, 2002
20. Ricci L, Valoti M, Sgaragli G, Frosini M. *Neuroprotection Afforded by GABA Against Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Injury in Rat Cortical Brain Slices: An Hormetic Dose-Response Effect*. Am J Pharmacol Toxicol **3**: 160-167, 2008
21. Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. *Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum*. Eur J Pharmacol **468**: 21-25, 2003
22. Shen Y, He P, Fan YY, Zhang JX, Yan HJ, Hu WW, Ohtsu H, Chen Z. *Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity*. Free Radic Biol Med **48**: 727-735, 2010
23. Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ, Pang IH, Shade D, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF, Agarwal N. *Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line*.

- Brain Res Mol Brain Res **86**: 1-12, 2001
24. Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE. *A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay.* J Immunol Methods **170**: 211-224, 1994
  25. Kamalden TA, Ji D, Osborne NN. *Rotenone-induced death of RGC-5 cells is caspase independent, involves the JNK and p38 pathways and is attenuated by specific green tea flavonoids.* Neurochem Res **37**: 1091-1101, 2012
  26. Szabados T, Dul C, Majtényi K, Hargitai J, Péntzes Z, Urbanics R. *A chronic Alzheimer's model evoked by mitochondrial poison sodium azide for pharmacological investigations.* Behav Brain Res **154**: 31-40, 2004
  27. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. *Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration.* J Neurol Sci 2012 Jun 3 [Epub ahead of print]
  28. Martin LJ. *Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases.* Prog Mol Biol Transl Sci **107**: 355-415, 2012
  29. Morán M, Moreno-Lastres D, Marín-Buera L, Arenas J, Martín MA, Ugalde C. *Mitochondrial respiratory chain dysfunction: Implications in neurodegeneration.* Free Radic Biol Med, 2012 May 14 [Epub ahead of print]
  30. Barot M, Gokulgandhi MR, Mitra AK. *Mitochondrial dysfunction in retinal diseases.* Curr Eye Res **36**: 1069-1077, 2011
  31. Kong GY, Van Bergen NJ, Trounce IA, Crowston JG. *Mitochondrial dysfunction and glaucoma.* J Glaucoma **18**: 93-100, 2009
  32. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis.* J Alzheimers Dis 20 Suppl 2: S265-279, 2010
  33. Schon EA, Area-Gomez E. *Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes?* J Alzheimers Dis **20** Suppl 2: S281-292, 2010
  34. Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. *Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease.* Neurology **40**: 1302-1303, 1990
  35. Brouillet E, Hyman BT, Jenkins BG, Henshaw DR, Schulz JB, Sodhi P, Rosen BR, Beal MF. *Systemic or local administration of azide produces striatal lesions by an energy impairment-induced excitotoxic mechanism.* Exp Neurol **129**: 175-182, 1994
  36. Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, Blanks RH. *Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina.* Neurobiol Aging **17**: 377-384, 1996
  37. Janciauskiene S, Westin K, Grip O, Krakau T. *Detection of Alzheimer peptides and chemokines in the aqueous humor.* Eur J Ophthalmol **21**: 104-111, 2011
  38. Nucci C, Martucci A, Martorana A, Sancesario GM, Cerulli L. *Glaucoma progression associated with altered cerebral spinal fluid levels of amyloid beta and tau proteins.* Clin Experiment Ophthalmol **39**: 279-281, 2011
  39. Yin H, Chen L, Chen X, Liu X. *Soluble amyloid beta oligomers may contribute to apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma.* Med Hypotheses **71**: 77-80, 2008
  40. Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF. *Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment.* Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 13444-13449, 2007
  41. Manczak M, Mao P, Calkins MJ, Cornea A, Reddy AP, Murphy MP, Szeto HH, Park B, Reddy PH. *Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons.* J Alzheimers Dis **20** Suppl 2: S609-631, 2010
  42. Rao DS, Rao VP, Rao KRS. *Pharmacological effects of forskolin isolated from coleus aromaticus on the lung damage rats.* Pharnanest **1**: 17-21, 2010
  43. Corredor RG, Trakhtenberg EF, Pita-Thomas W, Jin X, Hu Y, Goldberg JL. *Soluble adenyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth.* J Neurosci **32**: 7734-7744, 2012
  44. Guo Y, Johnson E, Cepurna W, Jia L, Dyck J, Morrison JC. *Does elevated intraocular pressure reduce retinal TRKB-mediated survival signaling in experimental glaucoma?* Exp Eye Res **89**: 921-933, 2009
  45. Iwabe S, Moreno-Mendoza NA, Trigo-Tavera F, Crowder C, García-Sánchez GA. *Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma.* Vet Ophthalmol 10 Suppl **1**: 12-19, 2007
  46. Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. *Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma.* Invest Ophthalmol Vis Sci **41**: 764-774, 2000
  47. Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, Szarek WA, Tremblay P. *Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis.* Neurobiol Aging **28**: 537-547, 2007
  48. Krzywkowski P, Sebastiani G, Williams S. *Tramiprosate Prevents Amyloid Beta-induced*

- Inhibition of Long-term Potentiation in Rat Hippocampal Slices.* 8th International Conference AD/PD; Salzburg, Austria, 2007, 14-18
49. Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, Saumier D, Haine D, Garceau D, Duong A, Suhy J, Oh J, Lau WC, Sampalis J. *Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study).* Arch Med Sci **7**: 102-111, 2011
  50. Scapagnini G. Presented at: GerontoNet Symposium Roma. *Clinical Trials in the frail elderly person.* November 2009.
  51. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. *Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain.* Proc Natl Acad Sci U S A **85**: 3175-3179, 1988
  52. Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DT, Worthington VC, Keown M, Michaelis J, Lawrence J, Mateen A, Allende L, Eagles PA, Abbott NJ. *Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide.* Ann N Y Acad Sci **854**: 37-53, 1998
  53. Holliday R, McFarland GA. *A role for carnosine in cellular maintenance.* Biochemistry (Mosc) **65**: 843-848, 2000
  54. Shen Y, Hu WW, Fan YY, Dai HB, Fu QL, Wei EQ, Luo JH, Chen Z. *Carnosine protects against NMDA-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells through carnosine-histidine-histamine pathway and H(1)/H(3) receptors.* Biochem Pharmacol **73**: 709-717, 2007
  55. Fu Q, Dai H, Hu W, Fan Y, Shen Y, Zhang W, Chen Z. *Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells.* Cell Mol Neurobiol **28**: 307-316, 2008
  56. Jin CL, Yang LX, Wu XH, Li Q, Ding MP, Fan YY, Zhang WP, Luo JH, Chen Z. *Effects of carnosine on amygdaloid-kindled seizures in Sprague-Dawley rats.* Neuroscience **135**: 939-947, 2005
  57. Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, Frenkel MB, Chen AF, Gupta R, Majid A. *Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice.* Stroke **38**: 3023-3031, 2007
  58. Min J, Senut MC, Rajanikant K, Greenberg E, Bandagi R, Zemke D, Mousa A, Kassab M, Farooq MU, Gupta R, Majid A. *Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine, and N-acetyl carnosine against permanent focal ischemia.* J Neurosci Res **86**: 2984-2991, 2008